

**EINSATZ VON CHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN MIT
SELEKTIVER DETEKTION ZUM NACHWEIS VON
ARZNEIMITTELWIRKSTOFFEN IN ABWASSER UND
OBERFLÄCHENWASSER**



VOM FACHBEREICH C (MATHEMATIK UND NATURWISSENSCHAFTEN)
DER BERGISCHEN UNIVERSITÄT WUPPERTAL
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

- DR. RER. NAT. -

GENEHMIGTE DISSERTATION

VORGELEGT VON
SILKE MÖSCHTER
AUS NEUNKIRCHEN

WUPPERTAL

JUNI 2005

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20050245

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20050245>]

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Siegmar Gäb

an der Bergischen Universität Wuppertal
im Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

Arbeitsgruppe Analytische Chemie

in der Zeit von Mai 2001 bis Juni 2005

Mein großer Dank gilt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU), die diese
Arbeit finanziell gefördert hat.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Siegmund Gäß, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die hilfreiche und stetige Unterstützung in Form von Diskussionen und Hilfe bei auftretenden Schwierigkeiten.

Bei Herrn habil. Dr. Oliver Schmitz möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates wie auch für die unzähligen Ideen und Anregungen im Laufe dieser Arbeit sehr bedanken.

Bei Herrn Walter Turner bedanke ich mich vor allem für die Hilfe bei der "Verenglichung" diverser Schriftstücke.

Frau Rahil Taheri danke ich für die Einarbeitung und freundliche Unterstützung bei den Messungen am GCxGC-TOFMS-Gerät.

Bei Herrn Marc Constapel bedanke ich mich insbesondere für die Aufnahme der Präzisionsmassenspektren der fluoreszenzmarkierten Wirkstoffe.

Herrn Marc Schellenträger danke ich für die umfangreichen Experimente zur "atmospheric pressure laser ionization" der Arzneimittelwirkstoffe - auch wenn diese Messungen hier nicht auftauchen.

Ganz herzlich danken möchte ich auch der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, die diese Arbeit finanziell gefördert hat. Hier danke ich besonders Herrn Dr. Lay, der durch die sehr interessante Gestaltung der Stipendiatenseminare mein Interesse auch für weiter entfernte Fachgebiete geweckt hat.

Des weiteren gilt mein Dank auch Herrn Dr. Hans-Dieter Stock vom Landesumweltamt Nordrhein Westfalen für die schnelle und unkomplizierte Bereitstellung der Realproben.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir das Universitätsstudium ermöglicht und mich stets auf alle erdenklichen Arten unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Peter Hirth für die seelische und moralische Unterstützung in diesen vier Jahren sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Arbeitskreis der Analytischen Chemie für die kollegiale Atmosphäre. Hier danke ich besonders Herrn Stefan Droste, mit dem ich das Labor teilte, für die nette und oft sehr lustige Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Arzneimittelwirkstoffe in Oberflächenwässern	1
1.2	Nachweis der Arzneimittelwirkstoffe.....	3
1.3	Untersuchte Arzneimittelwirkstoffe.....	7
1.4	Hochleistungsflüssigchromatographie	8
1.5	Kapillarelektrophorese	9
1.5.1	Ionenwanderung im elektrischen Feld	10
1.5.2	Elektroosmotischer Fluss	11
1.5.3	Arten der Kapillarelektrophorese.....	13
1.5.3.1	Kapillarzonenelektrophorese	13
1.5.3.2	Mizellare elektrokinetische Chromatographie	14
1.6	Zweidimensionale Gaschromatographie.....	15
1.6.1	Klassische zweidimensionale Gaschromatographie (GC-GC)	15
1.6.2	Comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie (GCxGC).....	17
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	22
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	23
3.1	Anreicherung von polaren Analyten aus Gewässerproben.....	23
3.1.1	Silanisieren der Glasgeräte.....	25
3.1.2	Angewandte Anreicherungsverfahren	26
3.1.2.1	SPE mit absolut Nexus [®] -Kartuschen	30
3.1.2.2	SPE mit Bond Elut C18-Kartuschen.....	32
3.1.2.3	Anreicherung mit einer C18-HPLC-Säule.....	35
3.2	Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektion.....	37
3.3	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion	37

3.3.1	Fluoreszenzmarkierung der Arzneimittelwirkstoffe	37
3.3.2	Eigenschaften moderner Fluoreszenzmarker	38
3.3.3	Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzmarkers	40
3.3.4	Derivatisierung in wässrigen Lösungsmitteln	41
3.3.5	Derivatisierung in organischen Lösungsmitteln	45
3.3.6	Derivatisierung in einem Zweiphasen-System	49
3.3.7	Derivatisierung geringer Arzneimittelmengen	54
3.3.8	Charakterisierung der Umsetzungsprodukte mittels Massenspektrometrie	56
3.3.9	Optimierung der HPLC-Trennung	59
3.3.9.1	Variation der stationären Phase	59
3.3.9.2	Variation der mobilen Phase	61
3.3.10	Störungen der Fluoreszenzdetektion im Bereich kleiner Konzentrationen	62
3.3.11	Probenanreicherung	62
3.4	Kapillarelektrophoretischer Nachweis mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	63
3.4.1	Derivatisierung der Arzneimittelwirkstoffe	63
3.4.2	Optimierung der Trennbedingungen	64
3.4.3	Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit	70
3.4.4	Probenanreicherung	73
3.4.5	Anreicherung und Detektion der fluoreszenzmarkierten Wirkstoffe	73
3.5	Einsatz der comprehensiven zweidimensionalen Gaschromatographie	78
3.5.1	Derivatisierung der Arzneimittelwirkstoffe	79
3.5.1.1	Detektion der Wirkstoffderivate	81
3.5.1.2	Einfluss des Lösungsmittels auf die Signalgröße	81
3.5.1.3	Einfluss der TMSH-Menge auf die Signalgröße	82
3.5.2	Probenanreicherung	83
3.5.3	Analyse einer Arzneimittelstandardmischung	84
3.5.4	Analyse eines Kläranlagenablaufs	86
3.5.5	Analyse von Oberflächenwasser	91
3.5.6	Abschätzung der Nachweisgrenze	94
4	ZUSAMMENFASSUNG	96

5	EXPERIMENTELLER TEIL	98
5.1	Materialien und Geräte	98
5.1.1	Chemikalien	98
5.1.2	Verwendete Materialien und Geräteeinstellungen	99
5.1.2.1	Festphasenextraktion	99
5.1.2.2	Fluoreszenzmarkierung	100
5.1.2.3	HPLC	100
5.1.2.4	Kapillarelektrophorese	102
5.1.2.5	LC-MS	103
5.1.2.6	GCxGC-TOFMS	104
5.2	Methoden / Arbeitsvorschriften.....	105
6	ANHANG	108
6.1	Ergänzende Tabellen und Abbildungen	108
6.1.1	Strukturen und Angaben zu den analysierten Stoffen.....	108
6.1.2	Präzisionsmassenspektren der BODIPY-Derivate.....	110
6.1.3	EI-Massenspektren der Methylester der analysierten Stoffe	112
6.2	Retentionszeiten GCxGC-TOFMS	120
6.3	Zur Quantifizierung verwendete Fragmentionen bei der Analyse mittels GCxGC-TOFMS	120
6.4	Auswertung der Analysen mittels Standardadditionsverfahren	121
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	125
8	TABELLENVERZEICHNIS	129
9	LITERATUR.....	131

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AED	Atomemissionsdetektor
BODIPY [®] FL EDA	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiamin- hydrochlorid
BODIPY [®] FL Hydrazid	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäurehydrazid
CD - MEKC	Cyclodextrin-modifizierte Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CMC	kritische mizellare Konzentration
CMC	1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
2,4-DBS	2,4-Dichlorbenzoesäure
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
d _f	Filmdicke
DMDCS	Dimethyldichlorsilan
ECD	Electron Capture Detector = Elektroneneinfangdetektor
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
F _{ep}	Beschleunigungskraft
F _R	Reibungskraft
f _v	Volumenfluss
GC	Gaschromatographie
GC-GC	zweidimensionale Gaschromatographie
GCxGC	comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie - Massenspektrometrie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
I.D.	Innendurchmesser
I.S.	interner Standard

KA	Kläranlage
KH	Krankenhaus
LC-MS	Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
LLE	Liquid-Liquid-Extraction = Flüssig-Flüssig-Extraktion
LMCS	Longitudinally Modulated Cryogenic System
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
NPD	Thermionischer Detektor
NSAR	nicht-steroidale Antiphlogistika / Antirheumatika
Q-TOF	Quadrupole - Time of Flight
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Solid Phase Extraction = Festphasenextraktion
SPME	Solid Phase Micro Extraction = Festphasen-Mikroextraktion
TFA	Trifluoressigsäure
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TOFMS	Time-of-Flight-Massenspektrometer = Flugzeit-Massenspektrometer
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/Sichtbarer Bereich

1 Einleitung

1.1 Arzneimittelwirkstoffe in Oberflächenwässern

Synthetisch hergestellte Arzneimittel sind unverzichtbarer Hauptbestandteil unseres Gesundheitswesens. In den letzten 10 bis 15 Jahren ist offensichtlich geworden, dass viele Arzneimittelwirkstoffe sowie deren Metabolite aufgrund ihrer verbreiteten Anwendung inzwischen auch in Oberflächenwässern zu finden sind [1 - 5]. Die nachgewiesenen Pharmakarückstände gehören sowohl zu den Human- als auch zu den Veterinärpharmaka [1, 4, 6].

Seit den siebziger Jahren ist die Existenz von Arzneimittelrückständen in der Umwelt bekannt; damals wurde von *NORPOTH et al.* und *TABAC et al.* das Verhalten von Steroidhormonen in der aquatischen Umwelt untersucht [7, 8]. Beide Gruppen stellten fest, dass diese Substanzen biologisch schlecht abgebaut werden können und somit in der Lage sind, in der Umwelt zu persistieren. Allerdings waren zur damaligen Zeit die analytischen Nachweismethoden nicht empfindlich genug, um die in Spurenkonzentrationen von wenigen ng/L vorkommenden Stoffe qualitativ und quantitativ bestimmen zu können. So gab es nur sehr wenige weiterführende Untersuchungen.

Mitte der 1980er Jahre wurden weitere Überlegungen zum Verbleib der Arzneimittel angestellt; allerdings handelte es sich eher um theoretische Betrachtungen, da zu diesem Thema kaum Daten vorhanden waren [9]. Zu Beginn der 1990er Jahre änderte sich dies allerdings. Durch neue Routinemethoden wurden sehr viel empfindlichere Nachweise möglich, und so konnten bisher über 100 pharmazeutisch genutzte Wirkstoffe sowie deren Metabolite in Abwasser [10], Abflüssen aus Kläranlagen [11, 12], Oberflächenwasser [11, 13], Grundwasser [13, 14], Trinkwasser [13, 15], Gülle [16, 17] und im Boden [18] nachgewiesen werden. Da die hierbei detektierten Konzentrationen weit unterhalb der therapeutisch wirksamen Dosen liegen, ist ein direkter Einfluss auf die menschliche Gesundheit nicht zu erwarten [5, 19]. Allerdings ist eine Risikoabschätzung für diese Rückstände sehr schwierig. Die bisher gewonnenen Daten reichen nicht aus, um konkrete Aussagen bezüglich der Gefährdung sowohl von Menschen als auch der aquatischen Umwelt machen zu können. Von einigen Forschergruppen konnte aber gezeigt werden, dass bei andauerndem Kontakt mit Pharmazeutika und Stoffen des persönlichen Gebrauchs (PSPG, englisch: PPCP) Langzeiteffekte bei Fischen zu beobachten sind [20, 21].

Zudem wurden bereits resistente Bakterienstämme in der Nähe von Abflüssen von Krankenhausabwässern nachgewiesen, die auf mit Antibiotikarückständen verunreinigtes Klinikabwasser zurückzuführen sind. Dies bedeutet, dass das Abwassersystem eine weitere Quelle für den Eintrag von multiresistenten Bakterien (z.B. Pseudomonaden) in die Umwelt ist [22].

Humanpharmaka gelangen zum großen Teil über die natürlichen Ausscheidungen unverändert oder als Metaboliten in die häuslichen Abwässer. Dieser Weg wird als Haupteintragspfad der Wirkstoffe in die aquatische Umwelt angesehen [23]. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass Arzneimittelwirkstoffe im Körper über verschiedene Enzymsysteme in unterschiedlichem Ausmaß metabolisiert und teilweise durch den Einbau von polaren Substanzen wie beispielsweise Glucuronsäure erst eliminierbar gemacht werden. Diese ausgeschiedenen Arzneimittelkonjugate gelangen anschließend über das Abwassersystem in die Kläranlagen. Durch Mikroorganismen kann dort eine Abspaltung des polaren Restes erfolgen, so dass im gereinigten Abwasser neben den Metaboliten auch wieder die ursprüngliche Wirkform nachgewiesen werden kann [20, 24].

Arzneistoffe wie zum Beispiel die Antirheumatika Diclofenac und Ibuprofen als Inhaltsstoffe von Salben gelangen auch durch Abwaschen der Haut zu einem großen Teil unverändert in das Abwassersystem, da die Resorptionsrate über die Haut gering ist. Dagegen spielen Ausscheidungen über die Haut und Atemluft mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle [25].

Gewässerverunreinigungen über Produktionsabwässer bei der Herstellung von Arzneimitteln sind in der Regel gering, da viele große Produktionsbetriebe eigene Kläranlagen besitzen. Allerdings kann es durchaus zu punktuellen Einträgen kommen, die aber mengenmäßig vernachlässigbar sind [26].

Mit dem Abwasser gelangen die Arzneimittelwirkstoffe in die Klärwerke. Bereits beim Transport über das Kanalsystem kann über undichte Rohre eine Infiltration von Substanzen in das Grundwasser erfolgen. Diese Art des Eintrags in das Grundwasser muss berücksichtigt werden, da nach Untersuchungen von *BERGER et al.* mindestens 17% des Kanalnetzes als kurz- bis mittelfristig und weitere 14% als langfristig sanierungsbedürftig gelten [27].

In den Kläranlagen werden die meisten Wirkstoffe aufgrund ihrer Hydrophilie nicht vollständig aus dem Abwasser entfernt. Für die Wirkstoffe Phenazon und Naproxen ist beispielsweise bekannt, dass sie nur zu 33% bzw. 66% eliminiert werden [28]. Große Mengen gelangen so mit dem gereinigten Abwasser in die als Vorfluter genutzten Oberflächengewässer [4, 29],

über die diese Arzneimittelwirkstoffe in Abhängigkeit von ihrer Stabilität und Wasserlöslichkeit sogar bis in das Grund- oder Trinkwasser transportiert werden können [28].

Auch der Eintrag durch die unsachgemäße Entsorgung von Arzneimitteln über die Toilette muss berücksichtigt werden, allerdings ist diese Eintragsmenge nur schwer abschätzbar [28]. Mit dem Hausmüll entsorgte Medikamente werden teilweise auf Deponien gebracht; dorthin gelangen zum Teil auch an Klärschlamm adsorbierte lipophile Arzneistoffe. Bei Undichtigkeiten im Deponiegrund kann so ein Einsickern von Wirkstoffen in das Grundwasser beobachtet werden.

Die Eintragspfade der Veterinärpharmaka und Futtermittelzusatzstoffe müssen getrennt von denen der Humanpharmaka betrachtet werden. Ausscheidungen von Nutztieren werden nicht in Kläranlagen behandelt, sondern meistens als Düngemittel für landwirtschaftlich genutzte Flächen eingesetzt. Durch den Gülleeinsatz auf den Feldern sind besonders Boden- und Grundwasserbelastungen zu erwarten, da die ausgeschiedenen Veterinärpharmaka im Boden versickern können oder aber auch durch Abschwemmungen in beträchtlichem Maße aus der Gülle ausgewaschen werden ("run-off") und so in den Wasserkreislauf gelangen [1, 28].

Abbildung 1.1 zeigt eine Übersicht der Eintragswege [28].

Auch wenn sich die nachgewiesenen Konzentrationen nur im Nanogramm- und seltener im Mikrogrammbereich je Liter bewegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Arzneimittelrückstände in Gewässern ein nicht zu vernachlässigendes, aber bislang nur unzureichend erforschtes ökotoxikologisches Risiko darstellen.

1.2 Nachweis der Arzneimittelwirkstoffe

Da die Arzneimittelwirkstoffe in Konzentrationen im Bereich von ng/L bis zu maximal einigen µg/L in den zu untersuchenden Gewässern vorkommen, müssen sehr empfindliche Nachweismethoden eingesetzt werden, um diese Substanzen detektieren zu können.

Die Spurenanalyse anthropogener organischer Stoffe in wässrigen Proben macht Verfahren mit zum Teil erheblichem instrumentellen Aufwand erforderlich. Gaschromatographische Methoden mit unterschiedlichen Detektionsarten (GC-FID, GC-NPD, GC-ECD) und die HPLC mit Einwellen-, Mehrwellenlängen- bzw. DAD-Detektion (HPLC-DAD) sind inzwi-

schen weit verbreitet. Aber auch Kopplungstechniken der GC und der LC mit der Massenspektrometrie (GC-MS, LC-MS) werden inzwischen routinemäßig eingesetzt, um die verschiedenen Kontaminanten sicher nachweisen zu können.

Eine hinreichende Analysenempfindlichkeit wird trotz chromatographischer Verfahren mit hochsensitiven Detektoren nur durch eine Extraktion der Analyten aus der Originalprobe in Verbindung mit einer Aufkonzentration erreicht. Die Extraktion der Analyten aus der wässrigen Phase kann entweder mit einem organischen Lösungsmittel (Flüssig-Flüssig-Extraktion, LLE) oder aber mit der sogenannten Festphasenextraktion (SPE) erreicht werden.

Seit einiger Zeit - so zeigen entsprechende Literaturstellen - wird auch die Kapillarelektrophorese zum Nachweis von Arzneimittelwirkstoffen in Gewässern immer mehr zur gängigen Praxis [30 - 33].

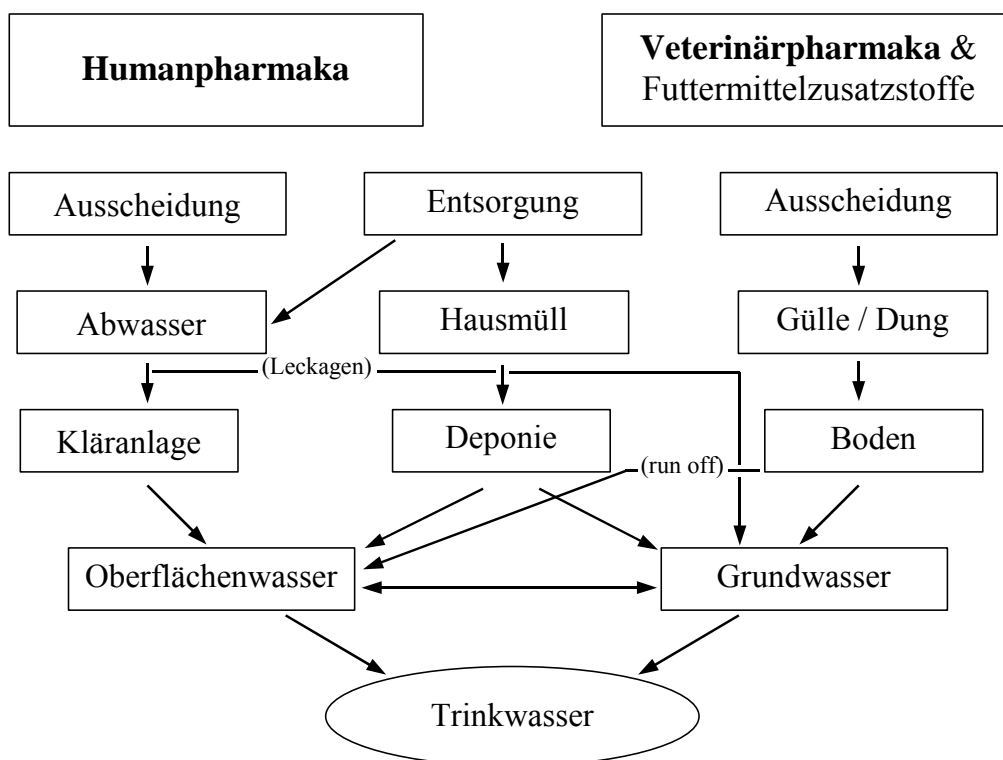


Abbildung 1.1: Potentielle Eintragswege von Arzneimitteln in die aquatische Umwelt

Eine Auswahl über bereits nachgewiesene Wirkstoffe mit den dazu eingesetzten Analyseverfahren ist in Tabelle 1.1 zu finden.

Die genauen Verbrauchsmengen von Arzneimitteln in Deutschland sind der Öffentlichkeit nicht zugänglich. Allerdings werden vom "Institut für medizinische Statistik" die ungefähren Verkaufsmengen berechnet. Die Zahlen für viele gängige Arzneimittelwirkstoffe aus dem Jahr 1999 sind in Abbildung 1.2 gezeigt.

Hormone wurden weder in Tabelle 1.1 noch in Abbildung 1.2 aufgeführt, da diese Stoffgruppe ein sehr umfangreiches eigenständiges Gebiet darstellt, das im Zuge dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden soll.

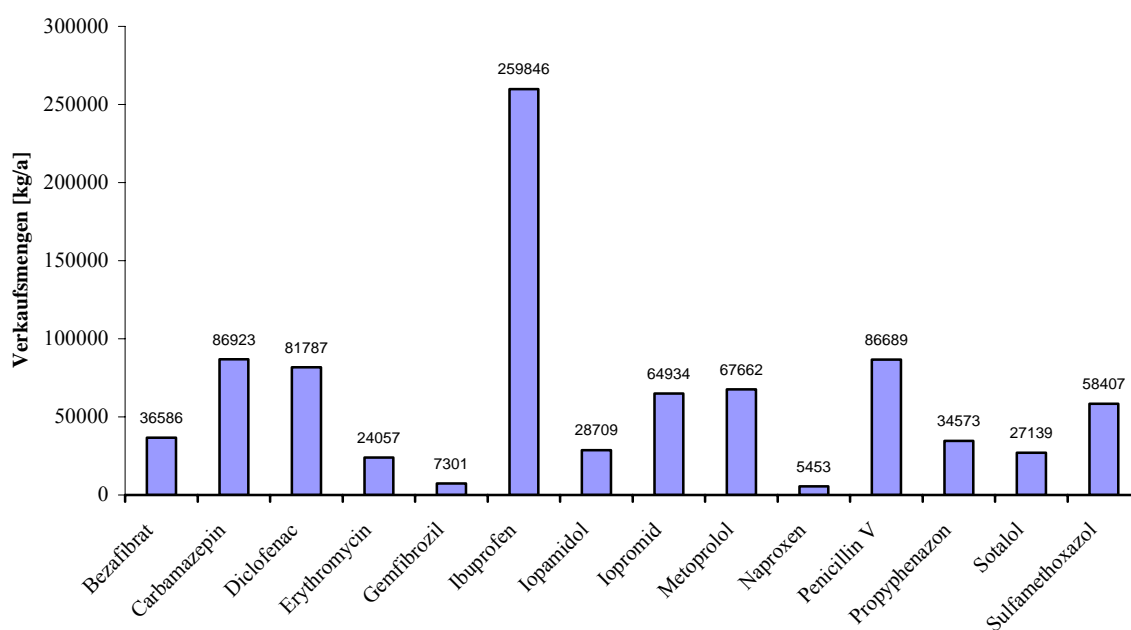


Abbildung 1.2: Verbrauch ausgewählter Arzneimittel des Jahres 1999 in kg Wirkstoff (BRD), die häufig als Rückstände in Wässern auftreten (Angaben nach IMS Health AG, Frankfurt/M. [34])

Arzneistoff-klasse	Arzneimittel-wirkstoff	Nachweis-methode	Umwelt-kompartiment	Konzentration (gerundet)	Literatur
Analgetika/ Anti-rheumatika	Acetylsalicyl-säure	SPE-GC/MS(/MS)	KA-Ablauf	max. 1,5 µg/L	[11]
	Diclofenac			max. 1,6 µg/L	[11]
		LLE oder SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 0,4 µg/L	[31]
	Ibuprofen	SPE-GC/MS	KA-Ablauf (Schweiz)	0,3 µg/L	[35]
		SPE-GC/MS(/MS)	KA-Ablauf	3,4 µg/L	[24]
	Indometacin	SPE-GC/MS(/MS)		max. 0,5 µg/L	[11]
Naproxen	LLE oder SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 38 ng/L	[31]	
Anti-biotika	Ciprofloxacin	SPE-LC/MS	KA-Ablauf	0,6 µg/L	[36]
	Sulfameth-oxazol	Lyophilisation-LC/MS	Grundwasser	max. 0,5 µg/L	[37]
		SPE-LC/MS	KA-Ablauf (Kana-da)	max. 0,9 µg/L	[12]
Anti-epileptika	Carbamazepin		KA-Ablauf (Ita-lien)	max. 23 ng/L	[38]
			Fluss (Italien)	20 ng/L	[38]
Beta-blocker	Metoprolol	SPE-LC/MS/MS	KA-Ablauf	0,7 µg/L	[24]
		SPE-GC/MS	Fluss	0,5 µg/L	[24]
	Propranolol		KA-Ablauf	max. 0,3 µg/L	[39]
			Fluss	max. 98 ng/L	[39]
Sotalol	SPE-LC/MS/MS	Grundwasser	max. 0,6 µg/L	[40]	
Broncho-spasmolytika	Salbutamol	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 0,24 µg/L	[39]
	Terbutalin			max. 0,1 µg/L	[39]
Lipid-senker	Bezafibrat	LLE oder SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 20 ng/L	[31]
		SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 4,6 µg/L	[24]
	Clofibrin-säure	LLE oder SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 44 ng/L	[31]
		SPE-GC/MS	Trinkwasser (Ber- lin)	max. 0,3 µg/L	[15]
			KA-Ablauf (Schweiz)	max. 0,2 µg/L	[13]
	Gemfibrozil	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	1,5 µg/L	[24]
SPE-GC/MS(/MS)		Fluss	0,5 µg/L	[24]	
Röntgen-kontrast-mittel	Diatrizoat	SPE-LC/MS/MS	Fluss (Rhein)	80 ng/L	[41]
			KA-Ablauf	8,7 µg/L	[41]
	Iopamidol		Oberflächenwasser	0,2 µg/L	[42]
			KA-Ablauf	0,6 µg/L	[42]
Zytostatika	Ifosfamid	SPE-GC/MS	KH-Abwasser (Abteilung Tu-morbiologie)	max. 1,9 µg/L	[43]
			KA-Ablauf	max. 43 ng/L	[43]

Tabelle 1.1: Gekürzte Übersicht über in Fließgewässern bereits nachgewiesenen Arzneimittelwirkstoffe (KA = Kläranlage; KH = Krankenhaus; LLE = Flüssig-flüssig-Extraktion)

1.3 Untersuchte Arzneimittelwirkstoffe

Für die Arbeit musste zunächst eine Auswahl an geeigneten Arzneimittelwirkstoffen getroffen werden. Dazu wurde in Betracht gezogen, dass die Wirkstoffe für eine geplante Derivatisierungsreaktion eine Carboxylfunktion aufweisen sollten. Zwei großen Gruppen, bei denen diese Charakteristik häufig vorkommt, sind die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) sowie die Lipidsenker.

Nicht-steroidale Antirheumatika

Als nicht-steroidale Antirheumatika werden Substanzen bezeichnet, die neben der analgetischen (schmerzlindernd) und antipyretischen (fiebersenkend) meist auch eine ausgeprägte antiphlogistische (antientzündliche) Wirkung besitzen. Diese Analgetika sind zumeist saure Verbindungen. Die NSAR stellen eine sehr heterogene Gruppe von Wirkstoffen dar, da sie zum Teil stark unterschiedliche Grundgerüste aufweisen. Als bekanntester Vertreter ist die Acetylsalicylsäure (z.B. in Aspirin[®]) zu nennen, von deren Grundstruktur sich einige Wirkstoffe ableiten lassen. Desweiteren gibt es Derivate der Phenyllessigsäure sowie Heteroarylessigsäure; hierzu gehören unter anderem Diclofenac (z.B. in Voltaren[®]) oder Indometacin (z.B. in Amuno[®]). Eine weitere Gruppe stellen die Phenylpropionsäure-Derivate oder Profene dar, bekannte Vertreter sind Ibuprofen (z.B. in Dolormin[®]) und Naproxen (z.B. in Proxen[®]).

Diese Stoffe werden bei leichten bis mittelstarken Schmerzen oder auch bei rheumatischen Erkrankungen häufig angewandt und sind zum Teil frei verkäuflich, was sich in den hohen Verbrauchszahlen widerspiegelt. Die vier genannten Stoffe werden nicht nur in der Humanmedizin sondern auch in der Veterinärmedizin häufig verwendet.

Als Analyte für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus dieser Wirkstoffgruppe Diclofenac, Ibuprofen, Indometacin und Naproxen ausgewählt, da diese wahrscheinlich in Oberflächenwässern zu finden sein sollten. Diese Annahme ergibt sich zum einen aus den Verkaufszahlen der Präparate und zum andern aus dem Umweltverhaltensmuster hinsichtlich Persistenz und Mobilität. Ausschlaggebend war auch, dass diese Stoffe bereits früher in der Umwelt nachgewiesen werden konnten [24, 31, 35].

Lipidsenker

Lipidsenker werden gegen zu hohe Blutfettwerte eingesetzt. Hohe Blutfettwerte erhöhen das Risiko der Arteriosklerose und können so Ursache von Herzinfarkten sein. Zur Behandlung dieser Erkrankung gibt eine Reihe von Therapieansätzen mit unterschiedlichen Arzneimitteln aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen. Eine dieser Gruppen sind die sogenannten Fibrate, zu denen die Substanzen Clofibrat, Etofibrat, Etofyllinfibrat, Fenofibrat, Bezafibrat und Gemfibrozil gehören.

Clofibrat, Etofibrat und Etofyllinfibrat sind sogenannte *prodrugs*, welche erst im Organismus durch Protolyse in die eigentliche Wirkform, die Clofibrinsäure, umgewandelt werden. Clofibrat stellte lange Zeit den Prototyp der Fibrate dar und war auch der Hauptvertreter dieser Arzneistoffgruppe [44]. In den 1990er Jahren wurden große Mengen dieser Substanzen eingesetzt (1993: 15 - 21 t [11]); in der modernen Therapie spielen diese Wirkstoffe aufgrund von erheblichen Nebenwirkungen allerdings nur noch eine untergeordnete Rolle. Aufgrund der hohen Persistenz in der aquatischen Umwelt wird besonders Clofibrinsäure auch heute noch sehr häufig detektiert. Diese Substanz wird hauptsächlich als Glucuronid ausgeschieden [25] und kann in der Umwelt wieder zu Clofibrinsäure hydrolysiert und in dieser Form nachgewiesen werden.

Clofibrat-Analoga, die noch eine gewisse therapeutische Bedeutung besitzen, sind Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil. Fenofibrat hydrolysiert in saurer Lösung rasch zur Fenofibrinsäure [11]; aus diesem Grund wird diese Substanz nicht in die Untersuchungen einbezogen.

Als zu analysierende Substanzen aus der Gruppe der Lipidsenker wurden somit der aktive Metabolit Clofibrinsäure sowie die Wirkstoffe Bezafibrat und Gemfibrozil ausgewählt.

1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Anfänge der Flüssigchromatographie gehen auf den russischen Botaniker *TSWETT* zurück, der zu Beginn des 20. Jahrhunderts Blattfarbstoffe mittels einer mit Calciumcarbonat gefüllten Säule auftrennte [45, 46]. In den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelten *MARTIN* und *SYNGE* die Verteilungschromatographie [47]; für ihre Forschungsergebnisse erhielten sie 1952 den Nobelpreis für Chemie. Die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) wurde Mitte der 1960er Jahre von *HORVÁTH* und *LIPSKY* begründet [48]. Schon der Namen

verdeutlicht die Abgrenzung zu der herkömmlichen Säulenchromatographie; die Leistungsfähigkeit der HPLC ist sehr viel größer. Die verbesserte Trennleistung und die höhere Geschwindigkeit der Trennungen wird zum einen durch die Verwendung kleinerer Teilchengrößen in der stationären Phase und zum andern durch erhöhte Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase durch Anwendung von hohen Drücken erreicht [49, 50].

Bei der HPLC wird das Fließmittel mit konstanter (isokratischer Elution) oder sich ändernder (Gradientenelution) Zusammensetzung mittels Pumpen durch eine die stationäre Phase enthaltende Säule gefördert. Dabei werden meistens Drücke zwischen 80 und 160 bar angewendet.

Die Trennung eines Analysengemisches beruht auf Verteilungsvorgängen der einzelnen Komponenten zwischen mobiler und stationärer Phase. Eine Trennung wird erreicht, wenn sich die Verteilungskoeffizienten der Komponenten ausreichend unterscheiden. Der Nachweis der von der Säule eluierenden Komponenten erfolgt mit einem Detektor, dessen Signal an einen Schreiber ausgegeben wird oder - häufiger - der elektronischen Datenverarbeitung zugeführt wird.

1.5 Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem Ionen aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld getrennt werden. Die Kapillarelektrophorese (CE) geht zurück auf *HJERTÉN*, der 1967 über die erste kapillarelektrophoretische Trennung in einer offenen Glasröhre berichtete [51]. Im Laufe der Jahre wurde die Leistungsfähigkeit dieser Technik durch viele Forschergruppen enorm gesteigert [52, 53]. Heutzutage ist der Einsatz von Quarzkapillaren selbstverständlich, mit denen eine on-line UV-Detektion möglich ist. Als weitere Detektionsarten für die CE seien unter anderem die Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) [54] oder die Kopplung der CE mit der Massenspektrometrie [55] genannt.

1.5.1 Ionenwanderung im elektrischen Feld

Bei elektrophoretischen Trennungen nutzt man die Tatsache, dass sich Ionen innerhalb eines elektrischen Feldes mit konstanter Geschwindigkeit bewegen [56]. Die elektrophoretische Geschwindigkeit v_{ep} ist proportional zur Feldstärke E und gegeben durch:

$$(1.1) \quad v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E$$

v_{ep} : elektrophoretische Geschwindigkeit; μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität; E : Feldstärke

Die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} [m^2/Vs] stellt für eine ionische Spezies in Abhängigkeit von den verwendeten Lösungsmittel eine Konstante dar und repräsentiert die Wanderungsgeschwindigkeit bei einer angelegten Feldstärke von 1 V/m. Die Werte der elektrophoretischen Mobilitäten unterschiedlicher Ionen unter Standardbedingungen sind tabelliert. Die elektrophoretischen Mobilitäten der Kationen erhalten ein positives, die der Anionen ein negatives Vorzeichen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen ist abhängig von ihrer Größe und Ladung. Außerdem hängt sie von der Temperatur, dem pH-Wert, der Viskosität des Trennmediums und der elektrischen Feldstärke ab.

Substanzen, die in einer Elektrolytlösung als Ionen vorliegen, sind im elektrischen Feld der Beschleunigungskraft F_{ep} und der Reibungskraft F_R ausgesetzt. Die Beschleunigungskraft F_{ep} wird wie folgt berechnet:

$$(1.2) \quad F_{ep} = z_i \cdot e \cdot E$$

F_{ep} : Beschleunigungskraft; z_i : Ladungszahl des Ions; e : Elementarladung ($1,6022 \cdot 10^{-19}$ C)

Der Beschleunigungskraft ist die Reibungskraft entgegengerichtet. Sie kann für ein kugelförmiges Teilchen in Lösung nach Stokes durch Gleichung 1.3 beschrieben werden.

$$(1.3) \quad F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_{ep}$$

F_R : Reibungskraft; η : Viskosität des Lösungsmittels; r_i : Stokescher Radius des Ions

Da im Kräftegleichgewicht F_{ep} gleich F_R gesetzt werden kann, ergibt sich aus diesen Formeln und der Gleichung 1.1 die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} zu:

$$(1.4) \quad \mu_{ep} = \frac{z_i \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i}$$

Die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität nach Gleichung 1.4 ist in der Regel nicht möglich, da diese nur für sphärische Teilchen in unendlich verdünnten Lösungen gilt. Der Stokesche Radius ist aber für die meisten Ionen nicht bekannt und mit dem messbaren Ionenradius in Kristallgittern nicht korreliert [56].

1.5.2 Elektroosmotischer Fluss

Während die Elektrophorese die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt, verursacht die Elektroosmose einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld. Unter der Elektroosmose versteht man die Bewegung einer Elektrolytlösung relativ zu einer geladenen Oberfläche durch ein angelegtes elektrisches Feld. Im Prinzip basiert das Phänomen der Elektroosmose auf einem von *HELMHOLTZ* und *STERN* beschriebenen Zweiphasen-System, das aus einer stationären festen Phase (fused-silica Kapillare) und einer beweglichen flüssigen Phase (Elektrolyt) besteht. Zwischen beiden bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus.

Die Stärke des elektroosmotischen Flusses (EOF) hängt unter anderem von der Ladungsverteilung auf der Kapillareninnenwand ab. Bei fused-silica Kapillaren sind die Silanolgruppen mit einem $\text{pK}_{(\text{SiOH})}$ -Wert zwischen 2 und 3 je nach pH-Wert der Elektrolytlösung mehr oder weniger stark dissoziiert. An diese negativen Ladungen lagern sich entsprechend entgegengesetzt geladene Ionen aus dem Puffer an. Ein Teil dieser Kationen wird durch die elektrostatische Anziehungskraft in der Nähe der Kapillarwand fixiert. Diese starre Grenzschicht mit adsorbierten Kationen wird auch als "Sternschicht" bezeichnet. Bedingt durch ihre Hydrathülle können aber diese Kationen nicht alle ungeladenen SiO^- -Gruppen an der Oberfläche "neutralisieren". Um die verbleibenden negativen Ladungen an der Kapillaroberfläche auszugleichen, werden deshalb weitere Gegenionen angelagert. Es entsteht im Anschluss an die Sternschicht eine diffuse Grenzschicht, die sogenannte "Gouy-Chapman-Schicht", deren Kationenkonzentration exponentiell mit dem Abstand von der fused-silica Oberfläche abnimmt.

Mit größer werdender Entfernung zwischen negativer Kapillarwand und Kationen der "Gouy-Chapman-Schicht" verringert sich die Coulombsche Wechselwirkung und ermöglicht die Wanderung der diffusen Grenzschicht zum negativ geladenen Pol. Dabei gleitet die "Gouy-Chapman-Schicht" über die an der Kapillarwand fixierte erste Schicht, was zu einer Scherfläche zwischen den Schichten führt. In Abbildung 1.3 (links) ist der Aufbau der elektrischen Doppelschicht schematisch dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung 1.3 ist der Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand der Kationen zur negativen Kapillaroberfläche skizziert. Die starre Sternschicht, in der das Potential mit zunehmender Entfernung zur Kapillarwand linear abnimmt, ist im Gleichgewicht mit der diffusen Grenzschicht, in der das Potential exponentiell auf 0 zurückgeht. Die Elektroosmose ist von dem Potential an der Scherfläche zwischen starrer und beweglicher Schicht abhängig. Dieses ζ -Potential (zeta-Potential) ist eine experimentell indirekt zugängliche Größe.

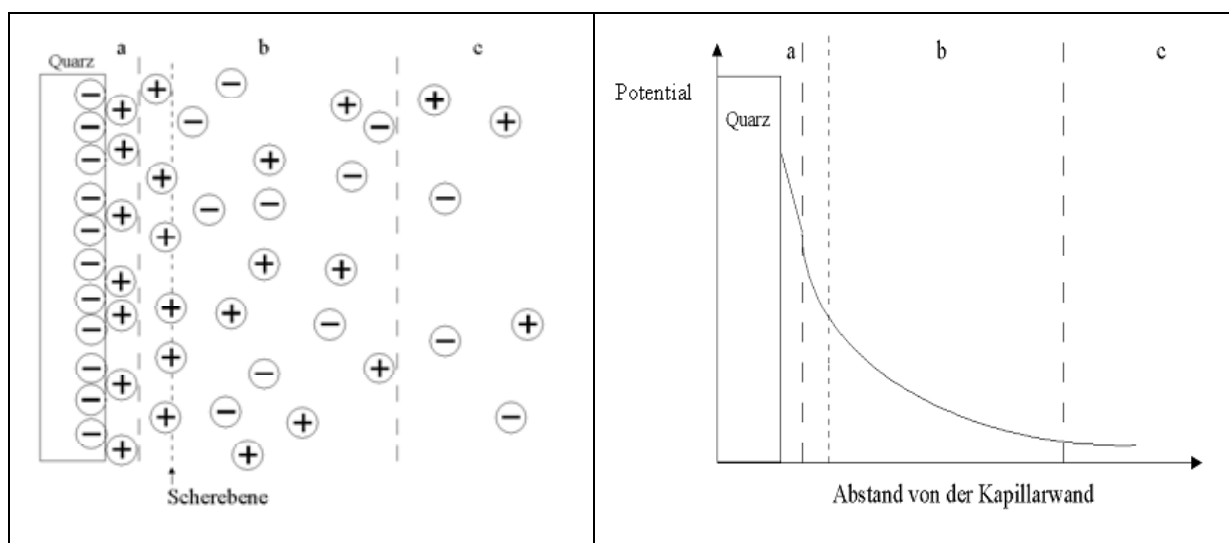


Abbildung 1.3: Ladungsverteilung an der Quarzoberfläche und Verlauf des Zeta-Potentials an der Grenzfläche Puffer/Quarz; a) Stern-Schicht, b) Gouy-Chapman-Schicht, c) Lösung

Wird nun längs der mit Elektrolyt gefüllten Kapillare ein elektrisches Feld angelegt, werden die beweglichen Kationen der diffusen Schicht in Richtung der negativen Elektrode angezogen. Diese Ionen sind solvatisiert und ziehen deshalb die sie umgebenden Lösungsmittelmoleküle mit sich. Im Falle von fused-silica Kapillaren mit einer Anreicherung von positiven Ionen in der Grenzschicht ist der EOF zur Kathode gerichtet.

Es bildet sich ein extrem flaches, stempelförmiges Strömungsprofil aus, welches zu einer sehr geringen Dispersion der Probenzone und daher zu schmalen Peaks und hohen Effizienzen führt. Die effektive Mobilität eines Ions ergibt sich aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Mobilität des Ions und der elektroosmotischen Mobilität im jeweiligen System.

Die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} lässt sich wie folgt beschreiben:

$$(1.5) \quad \mu_{eof} = -\frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

μ_{eof} : elektroosmotische Mobilität; ε : Dielektrizitätskonstante; ζ : Zeta-Potential; η : Viskosität des Puffers

1.5.3 Arten der Kapillarelektrophorese

Der Begriff "Kapillarelektrophorese" ist ein Oberbegriff für eine Anzahl verschiedener Trennmethoden. Die beiden am häufigsten eingesetzten Verfahren sind die Kapillarzonen-elektrophorese (CZE) und die mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC).

1.5.3.1 Kapillarzonen-elektrophorese

Die Kapillarzonen-elektrophorese (CZE) ist das einfachste und am weitesten verbreitete Verfahren in der CE. Die Anwendungsgebiete umfassen die Analyse von Aminosäuren, Peptiden und leicht ionisierbaren Spezies wie beispielsweise Aminen oder Phenolen. Nach Anlegen der Hochspannung beginnt die Trennung der Analyten, die auf den unterschiedlichen Migrationszeiten im elektrischen Feld beruht. Unter Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses gelingt mit Hilfe der CZE die Bewegung von Kationen, Anionen und ungeladenen Molekülen in Richtung Kathode. Anionische Analyten können nur detektiert werden, wenn ihre elektrophoretischen Mobilitäten kleiner als die des EOF sind, so dass der EOF die entgegengerichtete Migration der Anionen überkompensiert. Somit werden die Anionen nach den Kationen und den ungeladenen Molekülen die Kathode erreichen.

Bei der CZE erfolgt die Trennung der Proben aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten.

Eine Optimierung der Trennung ist hauptsächlich durch Änderungen der Elektrolytkonzentration und -zusammensetzung möglich, aber auch durch die Variation des pH-Wertes. Aus diesen Gründen ist es wichtig, dass der Elektrolyt entsprechend dem jeweiligen Trennproblem angepaßt wird.

1.5.3.2 Mizellare elektrokinetische Chromatographie

Die MEKC hat gegenüber der CZE den Vorteil, dass neben geladenen auch ungeladene Probenmoleküle aufgetrennt werden können. Der wichtigste Trennmechanismus in der MEKC, die von *TERABE et al.* 1984 beschrieben wurde [57, 58], beruht auf der Verteilung der Analytmoleküle zwischen einer mobilen, durch Elektroosmose bewegten Phase und einer "pseudo-stationären Phase", welche durch Mizellen gebildet wird. Diese Mizellen entstehen, wenn einer Lösung Tenside oberhalb ihrer kritischen mizellaren Konzentration (CMC) zugesetzt werden. Die polare Kopfgruppe der oberflächenaktiven Substanz kann sowohl kationisch, anionisch, neutral oder auch zwitterionisch sein. Das am häufigsten eingesetzte Tensid ist das Natriumdodecylsulfat (SDS). Eine Übersicht über weitere in der MEKC gebräuchlichen Mizellbildner ist der Literatur zu entnehmen [59 - 63].

Bei Mizellen handelt es sich meist um sphärische Gebilde, deren hydrophobes Ende in das Innere der Mizelle hin orientiert ist und der ladungstragende Teil nach außen weist. Diese Aggregate tragen im Fall anionischer Tenside eine negative, im Fall kationischer Tenside eine positive Ladung. Geladenen Mizellen wandern im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die proportional zu ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis ist.

Die Analyten verteilen sich nun abhängig von ihrer Lipophilie zwischen dem Puffer (bei neutralen Analyten: Wanderung zur Kathode mit dem EOF) und dem Inneren der Mizellen (Transport mit der Geschwindigkeit der Mizelle). In Analogie zur CZE ergibt sich die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Mizellen sowie die der Probensubstanzen aus der vektoriellen Summe der elektroosmotischen Geschwindigkeit und der elektrophoretischen Wanderung.

Neben der MEKC gibt es weitere elektrokinetische Chromatographiearten, bei denen anstelle der Mizellbildner andere Pufferadditive zugesetzt werden. Hier sind beispielsweise Cyclo-dextrine [64, 65] oder Kronenether [66, 67] zu nennen, die als Selektoren wirken können.

1.6 Zweidimensionale Gaschromatographie

Die klassische Gaschromatographie ist eine weit verbreitete Analysetechnik, die in vielen Bereichen eingesetzt werden kann. Voraussetzung für die Analyse ist eine unzersetzt verdampfbare Probe. Schwer flüchtige Verbindungen können oftmals über einen Derivatisierungsschritt in leichter flüchtige Substanzen überführt werden.

Die konventionelle Gaschromatographie kann zwar hohe Peakkapazitäten aufweisen, allerdings reicht die Trennleistung nicht aus, um alle Komponenten aus komplexen Gemischen wie beispielsweise petrochemische Fraktionen, Duftstoffe oder Zigarettenrauch aufzutrennen [68 - 70]. In diesen Fällen ist eine intensive Probenvorbereitung erforderlich und selbst dann kann in der Regel nur ein Teil der Probe analysiert werden. Um diesem Nachteil entgegenzuwirken, wurden Kopplungen von zwei oder mehr Säulen entwickelt. Durch das Überführen des Eluats von der ersten auf die zweite Trennsäule, deren Selektivität sich von der ersten Säule unterscheidet, erhält man eine multidimensionale Auftrennung eines Teils bzw. der gesamten Probe [71].

Die zweidimensionale GC gewinnt zunehmend an Bedeutung, da sie für die Analytik von leicht flüchtigen organischen Stoffen aus komplexen Probenmatrices hervorragend geeignet ist [72].

1.6.1 Klassische zweidimensionale Gaschromatographie (GC-GC)

Bei der GC-GC werden eine oder mehrere nicht aufgetrennte Fraktionen von einer ersten Kapillarsäule (erste Dimension) auf eine zweite anderer Polarität (zweite Dimension) überführt. Generell ist die erste Kapillare unpolar und zwischen 30 und 60 m lang. Die zweite weist meistens eine Länge von 30 m auf und besitzt eine höhere Polarität. Durch diese Kopplung ist die Möglichkeit gegeben, die Auflösung der ausgewählten Fraktionen zu erhöhen. Um dies technisch zu erreichen, wurden schon relativ früh Säulenschaltungen entwickelt, bei denen mittels Umschaltventilen Fraktionen aus der ersten Trennung auf die zweite Trennsäule überführt und erneut aufgetrennt werden können [73]. Diese Ventile sind recht anfällig und haben auch den Nachteil, dass die Metalloberfläche der Ventile katalytisch wirken oder Analyten adsorbiert werden können [74]. Weiterhin können Totvolumina sowie Hitzeempfindlichkeit der Schaltventile Probleme bereiten [75]. 1968 entwickelte *DEANS* eine Kopplung von zwei

Säulen, bei der der Eluentenstrom nicht mehr mittels Umschaltventilen, sondern durch unterschiedliche Gasdruckverhältnisse über drei T-Stücke gesteuert wurde [76]. Durch kontrollierte und steuerbare Gasflüsse an der Probenaufgabe und an dem Kreuzungspunkt der Säulen können die eluierenden Fraktionen wahlweise zum ersten Detektor oder auf die zweite Säule geleitet werden. Abbildung 1.4 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Gerätes. Durch diese Art der Gasflusststeuerung treten die für die Ventilschaltung beschriebenen Probleme nicht mehr auf.

Diese Techniken der Säulenschaltung haben unter anderem als "heart cutting Gaschromatographie" Eingang in die Analytik gefunden. Sie sind für Proben gut geeignet, bei denen nur einzelne Fraktionen von analytischem Interesse sind, da in der Regel nur wenige Fraktionen der ersten Analyse weiter aufgetrennt werden können. Für den Fall, dass die ganze Probe analysiert werden muss, sind viele Reinjektionen der Probe notwendig, was sehr aufwendig und zeitintensiv ist.

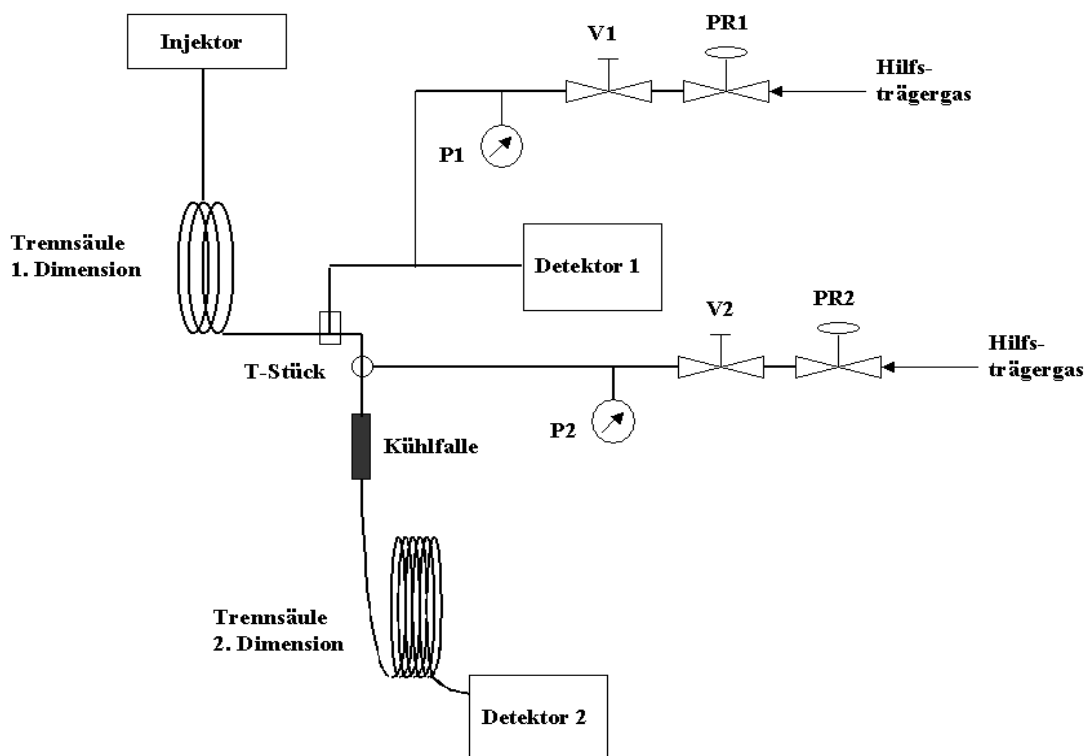


Abbildung 1.4: Schema eines GC-GC-Systems

PR: Druckregulator; V: Nadelventil; P: Manometer

Die theoretische Gesamtpeakkapazität $n_{(\text{tot})}$ eines derartig gekoppelten gaschromatographischen Systems ergibt sich aus dem Produkt der durchschnittlichen Peakkapazitäten der eingesetzten Säulen und der Anzahl der durchgeführten Auftrennungsvorgänge. Wenn mehrere Fraktionen aufgetrennt werden, wird jede dieser Auftrennungen in die Gesamtpeakkapazität mit einberechnet. Diese ergibt sich demnach zu

$$(1.4) \quad n_{(\text{tot})} = \bar{n} \cdot \text{Säulenanzahl}$$

wobei \bar{n} die durchschnittliche Peakkapazität der Säulen darstellt [77]. Für weitergehende Informationen über die GC-GC sei auf die Literatur verwiesen [71, 77].

1.6.2 Comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie (GCxGC)

Die Implementierung dieser Methode gelang 1991 *PHILLIPS* und *LIU* [78]. Bei dieser Technik werden nicht nur einzelne Fraktionen, sondern die gesamte Probe auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polaritäten aufgetrennt. Mit Hilfe eines sogenannten Modulators wird das Eluat der ersten Trennsäule in viele kleine Fraktionen aufgeteilt und anschließend auf die zweite Säule überführt. Durch eine schnelle Trennung auf der zweiten, sehr viel kürzeren Säule wird die Auflösung aus der ersten Trennung beibehalten [79]. Abbildung 1.5 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Gerätes mit einem Kryomodulator.

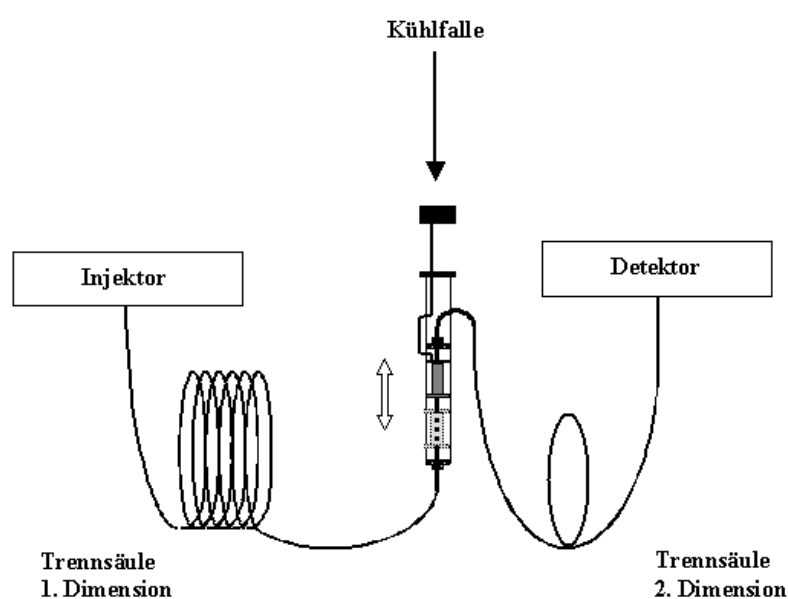


Abbildung 1.5: Schema eines GCxGC-Systems mit Kryomodulator

Orthogonalität

Zweidimensionale Trennungen sind nur effektiv, wenn die Trennmechanismen in den unterschiedlichen Dimensionen verschieden sind. Nur bei voneinander unabhängigen Trennmechanismen werden für die Probenkomponenten Trennungen über die komplette Chromatogrammfläche erzielt (siehe Abbildung 1.6). Für jede Probenkomponente ergeben sich somit zwei Retentionszeiten, eine für jede Trenndimension. Diese Trennungen nennt man orthogonal [80].

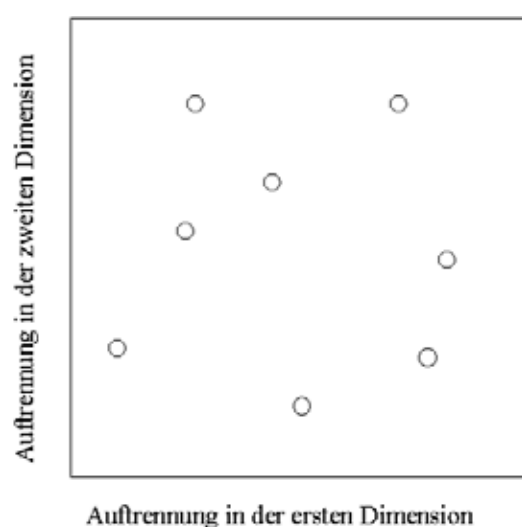


Abbildung 1.6: Darstellung einer orthogonalen Trennung

Trennungen in der GC basieren auf zwei Parametern: a) dem Dampfdruck der Substanzen und b) den Wechselwirkungen der Substanzen mit der stationären Phase. In der GCxGC wird Orthogonalität durch den Einsatz voneinander verschiedener Säulenmaterialien und mit Hilfe eines Temperaturgradienten erreicht [72]. Wenn nun als erste Säule eine unpolare Trennkapillare gewählt wird, findet die Trennung aufgrund des unterschiedlichen Dampfdrucks der Substanzen statt. Jede der Fraktionen, die von der ersten Säule eluiert, enthält demnach Analyten mit ähnlichen Siedepunkten. In der zweiten Dimension (polare Phase) wird durch die quasi isotherme Trennung der Einfluss des Dampfdrucks der Substanzen auf das Trennergebnis ausgeschaltet. Aus diesem Grund erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen der Substanzen mit der stationären Phase [81]. Somit sind die Trennmechanis-

men der beiden Säulen voneinander unabhängig, und die Orthogonalität der Trennmethode ist gegeben.

Peakkapazitäten

Die Kapazitäten der eindimensionalen Gaschromatographie sind für die Analyse von komplexen Proben mit mehr als 150 bis 250 Komponenten nicht ausreichend [72]. Um solche Proben auftrennen zu können, ist eine enorme Erhöhung der Bodenzahl notwendig. Ein Ansatz, diese Bodenzahlen erreichen zu können, ist die Analyse der Probe mittels einer orthogonalen Analysenmethode.

Die Auftrennung einer Probe mittels einer orthogonalen Trennung - wie es bei der GCxGC der Fall ist - führt zu Peakkapazitäten $n_{(tot)}$, die sich demnach rechnerisch aus dem Produkt der Peakkapazitäten der einzelnen Säulen ergeben [72].

$$(1.5) \quad n_{(tot)} = n_{(S\ddot{a}ule\ 1)} \cdot n_{(S\ddot{a}ule\ 2)}$$

Säulenmaterialien

Die Probe wird zuerst auf einer Kapillarsäule (15-30 m x 0,25-0,32 mm Innendurchmesser (I.D.); Filmdicke (d_f) = 1 μ m) getrennt, die eine unpolare stationäre Phase enthält [82]. Somit erreicht man eine Trennung der Substanzen aufgrund der unterschiedlichen Dampfdrücke.

Die zweite Säule ist sehr viel kürzer und weist einen geringeren Innendurchmesser auf. Sie ist mit einem dünnen Film aus polarem Material belegt (1-2 m x 0,1 mm I.D.; d_f = 0,1 μ m) [82]. Die Trennzeit dieser Säule liegt im Allgemeinen im Bereich weniger Sekunden gegenüber Laufzeiten von 45 bis 100 Minuten auf der ersten Säule. Diese schnelle Trennung auf der zweiten Säule ist erforderlich, damit der nächsten Fraktion, die in dieser Zeit vom Modulator gesammelt worden ist, wieder eine freie Trennsäule zur Verfügung steht.

Modulator

Der Modulator ist das "Herzstück" einer solchen Anordnung; er führt drei Schritte in permanenter Wiederholung aus: er sammelt Fraktionen der Trennung der ersten Säule, fokussiert

diese und führt sie zur weiteren Auftrennung der zweiten Säule zu. Dabei wird die auf der ersten Säule erhaltene Trennung "konserviert", was eine enorme Verbesserung im Vergleich zu der klassischen zweidimensionalen GC darstellt. Dieser Modulationsvorgang wiederholt sich sehr rasch alle 2-4 Sekunden und teilt das Eluat der ersten Säule somit in eine Vielzahl von Fraktionen, die die zweite Säule passieren und dort weiter aufgetrennt werden.

Der Schritt der Fokussierung ist für die weitere Chromatographie von großem Vorteil, da so der Effekt der Peakverbreiterung aus der ersten Trennung wieder aufgehoben werden kann. Dies führt zu sehr schmalen und dadurch höheren Signalen nach der zweiten Trennung, wodurch niedrigere Nachweisgrenzen und höhere Effizienzen erreicht werden können [83].

Modulatorarten

Für den Modulationsvorgang sind verschiedene Techniken entwickelt worden, hier wird nur auf die gängigsten Methoden eingegangen. Als weiterführende Literatur zu diesen und anderen Modulationstechniken sei auf den Übersichtsartikel von *PURSCH* verwiesen [84].

PHILLIPS entwickelte 1991 einen thermischen Modulator, der ein kurzes Stück einer Kapillarsäule mit hoher Filmdicke ausnutzt, um die Analyten dort zu retardieren. Die Analyten werden auf diese Weise aufkonzentriert, und mittels eines rotierenden Heizelementes erfolgt durch Erhöhung der Temperatur die Desorption und Injektion in die zweite Säule [78].

MARRIOTT und *KINGHORN* entwickelten wenige Jahre später einen Kryomodulator. Dieser Modulator arbeitet längs der eingesetzten Kapillarsäulen der ersten oder zweiten Dimension, und das System wurde daher als "longitudinally modulated cryogenic system" (LMCS) bezeichnet [85 - 87]. Dieses Gerät besteht im Wesentlichen aus einer Kryofalle, welche mittels eines Motors auf einem Schlitten vor oder hinter dem Verbindungsstück der beiden Kapillaren bewegt wird [88]. Während der nur wenige Sekunden dauernden Akkumulationsphase gelangen die Analyten aus der ersten Säule in die Kryofalle und werden dort gesammelt. Nach dieser Kühlphase bewegt sich die Falle entlang der Kapillarsäule in ihre vorherige Position und setzt somit das gekühlte Teilstück mit den Analyten wieder der es umgebenden Ofentemperatur aus, was zu einer Mobilisierung führt. Die Trennung auf der zweiten Säule kann dann beginnen. Das in Abbildung 1.5 dargestellte Schema zeigt diese Modulationsart.

Die dritte häufig eingesetzte Technik ist die eines 2- oder 4-Jet-Modulators. Bei dem 2-Jet-Modulator wird die Probe über eine, beim 4-Jet-Modulator über zwei Kühldüsen mittels einer Mischung aus flüssigem und gasförmigen N_2 eingefroren, und die Desorption erfolgt über eine bzw. zwei Heizdüsen. Der Vorteil dieses Gerätes gegenüber dem LMCS-System besteht darin, dass keine anfällige Mechanik vorhanden ist.

Detektionssysteme

Aufgrund der sehr raschen Trennung in der zweiten Dimension beträgt die Peakbreite in der GCxGC zwischen 50 und 200 ms [88-90]. So sind für die GCxGC auch nur sehr schnell ansprechende Detektoren einsetzbar. Meist werden ein schneller Flammenionisations-Detektor (FID) [91, 92] oder ein Time-of-Flight-Massenspektrometer (TOFMS) [81, 93, 94] als Detektionseinheiten eingesetzt. Einige Arbeiten sind auch mit einem Mikro-Elektroneneinfangdetektor (μ -ECD) [95] oder einem Atomemissionsdetektor (AED) [96] durchgeführt worden.

Bei einem TOFMS werden beispielsweise positive Ionen durch einen Ionisationspuls gebildet. Die so erzeugten Ionen werden dann durch einen elektrischen Impuls der Spannung U beschleunigt. Anschließend gelangen sie in eine feldfreie Driftregion (Flugrohr). Da die Ionen beim Eintritt in das Flugrohr die gleiche kinetische Energie E_{kin} aufweisen, fliegen sie mit einer Geschwindigkeit v weiter, die umgekehrt proportional zu der Quadratwurzel ihrer Masse m ist. Somit erreichen die leichteren Ionen eher den Detektor als die schwereren. Der Zusammenhang dieser Größen ist in den Gleichungen 2.10 und 2.11 dargestellt. Nach jedem Ionisationspuls können so komplette Massenspektren aufgenommen werden; als Detektionseinheit werden meist Elektronenvervielfacher (z.B. Multichannelplates) eingesetzt.

$$(2.10) \quad E_{kin} = z \cdot e \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

$$(2.11) \quad v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot U}{m}}$$

E_{kin} : kinetische Energie; z : Ladungszahl; e : Elementarladung; U : Beschleunigungsspannung; m : Ionenmasse; v : Ionengeschwindigkeit

2 Problemstellung und Zielsetzung

Spurenanalytische Untersuchungen von Umweltproben erfolgen meist standardmäßig mittels Festphasenextraktion und anschließender GC-MS. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, alternative Methoden für die spurenanalytische Bestimmung von ausgewählten Arzneimittelwirkstoffen aus Umweltproben aufzuzeigen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein Methodenvergleich für die Rückstandsanalytik bestimmter Arzneimittelwirkstoffe in Abwässern und Oberflächenwässern erarbeitet werden. Hierbei sollten sowohl klassische als auch moderne Analysenverfahren eingesetzt und auf ihre Anwendbarkeit getestet werden. Als wichtiges Kriterium für die Anwendbarkeit der Methoden ist hier die erforderliche Sensitivität zu nennen, da die Substanzen im unteren $\mu\text{g/L}$ - bis ng/L -Bereich in den Gewässern vorkommen.

Um dieser Anforderung Rechnung zu tragen, sollte zunächst eine Methode zur Anreicherung der Substanzen erarbeitet werden.

Um die höhere Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion mittels HPLC und CE nutzen zu können, sollten die Arzneimittelwirkstoffe mit einem geeigneten Fluoreszenzmarker gekoppelt werden; hierzu musste eine chemische Derivatisierung entwickelt werden. Die so markierten Analyten sollten zum einen mit der HPLC getrennt und mit nachgeschalteter Fluoreszenzdetektion detektiert werden. Zum anderen sollten die derivatisierten Substanzen kapillarelektrophoretisch getrennt und mittels Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF) nachgewiesen werden.

Desweiteren sollte die GCxGC eingesetzt werden, um die Analyten aufzutrennen und anschließend mittels TOFMS empfindlich und selektiv nachzuweisen. Bei dieser Methode ist es erforderlich, die polaren Arzneimittelwirkstoffe zunächst zu derivatisieren, um sie in leichter flüchtige Verbindungen umzuwandeln.

Schließlich sollte noch die Anwendbarkeit der erarbeiteten Methoden - soweit es möglich ist - auf Realproben festgestellt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Anreicherung von polaren Analyten aus Gewässerproben

Allgemeines

Die nachzuweisenden Stoffe finden sich in der aquatischen Umwelt in nano- bis pikomolaren Konzentrationsbereichen. Daher ist bei der Bestimmung organischer Rückstände in Wasser die Anreicherung der Analyten ein unumgänglicher Schritt, da trotz der Verwendung chromatischer Verfahren mit sensitiven Detektoren oft keine hinreichende Empfindlichkeit erreicht wird. Deshalb wird eine Extraktion der zu analysierenden Stoffe aus der Originalprobe angestrebt, wodurch eine Aufkonzentrierung ermöglicht wird.

Zur Extraktion der Analyten sind grundsätzlich mehrere Verfahren einsetzbar. Beispielsweise kann die Extraktion der ungeladenen Analyten aus der wässrigen Phase mit einem organischen Lösungsmittel erfolgen, in dem die Analyten löslich sind [97], oder aber die Aufkonzentrierung wird durch die sogenannte Festphasenextraktion (SPE) erreicht [98].

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) ist die ältere der beiden Methoden und mit einigen Nachteilen behaftet. Hier ist beispielsweise der große Verbrauch an hochreinen, teuren und unter Umständen toxischen Lösungsmitteln zu nennen, da hohe Extraktionsausbeuten nur durch Mehrfachextraktion erreichbar sind [99]. Darüber hinaus ist die Eignung der LLE bei polaren Substanzen begrenzt, da diese zum Teil in der wässrigen Phase löslich und daher schlecht extrahierbar sind [100]. Aus diesen und anderen Gründen wie der einfachen Handhabbarkeit oder Automatisierbarkeit hat sich die SPE in den letzten Jahren für die Aufkonzentrierung von Analyten aus Gewässerproben als Methode der Wahl durchgesetzt.

Als weitere Verfahren, die in diesem Bereich seltener eingesetzt werden, sind der Vollständigkeit halber die Lyophilisation [37] oder die Festphasen-Mikroextraktion (SPME) zu nennen. Das Prinzip der SPME wurde zum ersten Mal 1989 von *PAWLISZYN* und *BELARDI* veröffentlicht [101]. Einen Überblick zur Entwicklung und den Einsatzmöglichkeiten der SPME geben *LORD* und *PAWLISZYN* [102].

Aufgrund der geschilderten Vorteile der SPE wurde in dieser Arbeit von den beschriebenen Verfahren nur dieses eingesetzt. Im Folgenden wird daher näher auf diese Methode eingegangen. Für weitere Informationen zu den anderen Anreicherungsverfahren sei auf einen Übersichtsartikel von *SMITH* verwiesen [103].

Prinzip der SPE

Die SPE ist mit einem flüssigchromatographischen Verfahren vergleichbar, bei dem das Sorbens die stationäre Phase und die flüssige Probe zusammen mit dem Elutionsmittel die mobile Phase darstellt [104]. Hierbei unterscheidet man zum einen zwischen der online-SPE, die in das chromatographische System eingliedert ist und der offline-SPE, welche mittels separater Kartuschen durchgeführt wird.

Die Retention entsteht durch starke, reversible Wechselwirkungen zwischen Analytmolekül und Oberfläche des Sorbens. Typisch sind hydrophobe (Van der Waals-Kräfte), polare (Wasserstoffbrücken-Bindungen und Dipol-Dipol-Kräfte) oder ionische Wechselwirkungen.

Bei einer Anreicherung von Analyten mittels Adsorption an Festphasen werden die folgenden Schritte durchlaufen, wobei der dritte Punkt eher optionaler Natur ist:

- Konditionierung des Sorbens
- Aufgabe der Probenlösung
- Waschen des Sorbens
- Trocknen des Sorbens
- Elution des/der Analyten

Bei der Auswahl des Sorbens spielen die chemische Struktur und die Eigenschaften der Analyten eine entscheidende Rolle, da die funktionellen Gruppen auf der Sorbensoberfläche bestimmen, welche Analyten während des Anreicherungsprozesses zurückgehalten werden.

Die Selektivität des Sorbens wird sowohl durch das Grundgerüst (z.B. SiO₂ oder organische Polymere) als auch durch die Art und Anzahl der funktionellen Gruppen beeinflusst. Diese Faktoren haben zudem Einfluss auf die pH-Stabilität und die Kapazität des Sorbensmaterials.

Die Oberfläche des Sorbens nimmt mit steigender Porosität des Materials zu, was eine Erhöhung der Anzahl an aktiven Bindungszentren zur Folge hat. Über diese lässt sich letztlich die Kapazität des Materials erhöhen. Die notwendige Kapazität und somit die benötigte Masse an Festphase hängt nicht nur alleine von der angenommenen Analytkonzentration ab; hier müssen zudem in der Lösung enthaltene Matrixkomponenten wie z.B. Huminstoffe berücksichtigt werden, die ebenfalls sorbiert werden können und gegebenenfalls die Sorbenskapazität stark mindern. Die Sorbensmenge muss daher auf das anzureichernde Probenvolumen und dessen erwartete Zusammensetzung abgestimmt sein.

Ein Durchbruch der Analyten kann somit zum einen durch eine unzureichende Kapazität des Sorbens bedingt sein [105], die auch durch die Adsorption von Matrixbestandteilen verursacht sein kann [106], oder aber durch mangelnde Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens.

SPE-Sorbentien

In der Wasseranalytik werden zur Adsorption von sauren Analyten häufig modifizierte Kieselgele als Sorbentien eingesetzt, wie sie auch in der HPLC Verwendung finden [13, 14, 105, 107 - 109]. Des Weiteren sind organische Polymere [10, 110, 111], Ionenaustauscher [112] sowie Mixed-mode-Sorbentien [113 - 115] als geeignet für die Festphasenextraktion dieser sauren Substanzen beschrieben worden. Auch in Eigenherstellung erzeugte Mischungen unterschiedlicher Sorbensphasen werden verwendet. In Einzelfällen handelt es sich beispielsweise um Mischungen aus C18-Material mit Polymerphasen, wie zum Beispiel Polystyrol-Divinylbenzol [11].

3.1.1 Silanisieren der Glasgeräte

Da für viele Analyten die Tendenz beschrieben ist, an Oberflächen anzuhaften, liegt die Vermutung nahe, dass dies auch bei den eingesetzten Probenbehältnissen aus Glas der Fall sein kann. Um diese Möglichkeit auszuschließen, können Glasoberflächen durch eine Silanisie-

rung deaktiviert werden. Als Silanisierungsreagenz kann beispielsweise Dimethyldichlorsilan (DMDCS) verwendet werden, welches in verschiedenen Arbeiten mit sauren Arzneimittelwirkstoffen bereits erfolgreich eingesetzt worden ist [30]. Hierbei reagieren die Silanolgruppen der Glasoberfläche mit dem Silanisierungsreagenz, wobei die Glasoberfläche teilweise passiviert wird. Die behandelten Oberflächen verhalten sich neutral, hydrophob und werden durch Lösungsmittel nicht angegriffen [116]. Der wasserabweisende Film auf der Glasoberfläche ist bei normalem Gebrauch einige Wochen haltbar. Die Vorgehensweise für das Silanisieren ist in Kapitel 5.2. beschrieben.

Silanisiert wurden in dieser Arbeit die Glasflaschen, die zur Probenahme genutzt wurden und die Glaskolben, die für die SPE-Proben verwendet worden sind. So wurde die Möglichkeit des Minderbefundes aufgrund einer Adsorption der Analyten an der Glaswand verhindert.

3.1.2 Angewandte Anreicherungsverfahren

Um die in sehr geringen Konzentrationen vorkommenden Arzneimittelwirkstoffe nachweisen zu können, sind in der Literatur meist zwischen 0,5 und 4 L Oberflächenwasser angereichert worden [14, 32, 115, 117]. Um ein geeignetes Sorbens für die Extraktion aller nachzuweisenden Arzneimittelwirkstoffe auswählen zu können, wurden in Vorversuchen unterschiedliche Sorbensmaterialien eingesetzt. Nach diesen Vorversuchen stellten sich die Materialien absolut Nexus[®] und Bond Elut C18 als am geeignetsten heraus, um saure Testsubstanzen aus einer geringen Menge an Probenlösung zu extrahieren.

Die nachfolgend beschriebenen Möglichkeiten der Probenanreicherung wurden nicht bei jedem der entwickelten Nachweisverfahren für die Arzneimittelwirkstoffe eingesetzt, da sie im Laufe der Arbeit sukzessive entwickelt worden sind. Die absolut Nexus[®]-Kartuschen wurden hauptsächlich bei der Analytik mittels HPLC und CE und die C18-Phasen bei dem Nachweisverfahren mittels GCxGC eingesetzt. Die ebenfalls für das GCxGC-Verfahren getestete Fast-HPLC-Säule (Kapitel 3.1.2.3) wurde parallel zu der C18-Phase verwendet. Die Besonderheiten der einzelnen Anreicherungsverfahren sind in den entsprechenden Kapiteln zur Probenanreicherung bei den Nachweisverfahren erwähnt.

Zur Anreicherung von Arzneimitteln oder Insektiziden aus Gewässerproben werden sehr häufig C18-modifizierte Kieselgele eingesetzt [14, 15, 105, 118]. Bei der Auswahl kommerzieller

C18-Kartuschen wurden sowohl endcappede als auch nicht-endcappede Sorbensmaterialien berücksichtigt. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die durch vorhandene Silanolgruppen entstehenden polaren Wechselwirkungen mit den Analyten für die Wiederfindung von größerer Bedeutung sind als die hydrophoben Wechselwirkungen bei endcappeden Materialien. Als Sorbensmaterial ohne Endcapping wurde Chromabond C18 Hydra (Macherey-Nagel, Düren) und als Sorbens mit Endcapping Bond Elut C18 (Varian, Harbour City, CA, USA) eingesetzt.

Darüber hinaus wurde die endcappede Phenylphase Bond Elut PH (Varian, Harbour City, CA, USA) getestet, um eventuelle Wechselwirkungen mit dem aromatischen System der Analyten auszunutzen [119].

Aus der Überlegung heraus, dass die anzureichernden Substanzen im Basischen als Anionen vorliegen, wurden auch Materialien mit quartären Ammoniumgruppen als Ionenaustauscher getestet. Hierzu zählte zum einen das Sorbens Strata SAX (Phenomenex, Torrance, CA, USA) sowie das Oasis[®] MAX (Waters, Milford, MA, USA), welches eine Mischung aus einem Anionenaustauschersorbens und einer Polymerphase darstellt. Als Sorbens mit einer Mischung aus Anionenaustauschermaterial und C8-Umkehrphase wurde Strata Screen A (Phenomenex, Torrance, CA, USA) eingesetzt, welches laut Herstellerangaben speziell für die Extraktion von sauren Arzneimittelwirkstoffen entwickelt worden ist. Ein Vorteil der Ionenaustauscherkartuschen ist die selektive Anreicherung von Anionen, wodurch viele der unter Umständen die weitere Analytik störenden Matrixbestandteile bereits abgetrennt werden können.

Zudem wurden unterschiedliche Polymere getestet. Hierzu gehört beispielsweise das Divinylbenzol-N-vinylpyrrolidon-Copolymer, welches unter dem Namen Oasis[®] HLB (Waters, Milford, MA, USA) vermarktet und in der Wasseranalytik häufig eingesetzt wird [6, 114, 115]. Der Zusatz HLB steht für die Bezeichnung "hydrophile-lipophile Balance" und bedeutet, dass das Sorbens zum einen über Divinylbenzol hydrophobe Wechselwirkungen eingehen kann und zum anderen durch das N-Vinylpyrrolidon hydrophile Eigenschaften besitzt, welche eine sehr gute Wasserbenetzbarkeit des Sorbens gewährleisten sollen. Aufgrund der großen Oberfläche (800 m²/g) und der Protonenakzeptoreigenschaften des N-Vinylpyrrolidons können polare Analyten wie Salicylsäure aus Plasma angereichert werden [120]. Als Vertreter der Styroldivinylbenzol-Methacrylat-Copolymere ist das Adsorbens absolut Nexus[®] (Varian, Harbour City, CA, USA) gewählt worden, welches laut Hersteller sowohl für polare als auch unpolare Analyten geeignet sein soll. Als ähnliches bifunktionelles Polystyrol-Divinylbenzol-

Copolymer wurde weiterhin das Material Chromabond easy (Macherey-Nagel, Düren) untersucht.

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe erfolgte mittels kapillarelektrophoretischer Trennung (CZE) im UV-Bereich bei 195 nm. Es wurde eine nicht-oberflächenbeschichtete Kapillare (Gesamtlänge (L_{ges}) = 50 cm, effektive Länge (L_{eff}) = 43 cm; Innendurchmesser = 50 μm) eingesetzt. Abbildung 3.1 zeigt ein Elektropherogramm der Trennung der underivatisierten Arzneimittelwirkstoffe nach der Festphasenextraktion. Benzoesäure diente als interner Standard.

Die Kapillarelektrophorese wurde der HPLC in diesem Fall vorgezogen, da die Messung wesentlich schneller und der Lösungsmittelverbrauch erheblich niedriger ist. Unter den gewählten Bedingungen ist die elektrophoretische Wanderung der anionisch vorliegenden Arzneimittelwirkstoffe geringer als der entgegengesetzt gerichtete elektroosmotische Fluss, weshalb die Analyten mit dem EOF zur Kathode wandern und dort detektiert werden können.

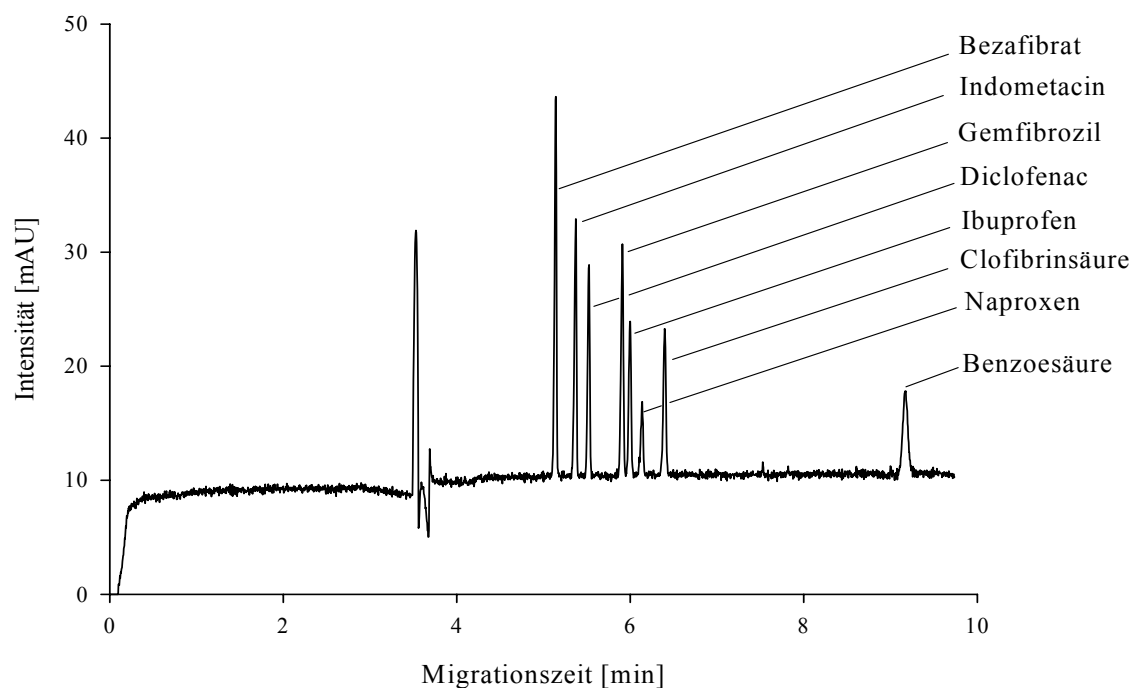


Abbildung 3.1: Trennung der underivatisierten Wirkstoffe mittels CE

Trennelektrolyt: 50 mM Natriumhydrogenphosphat pH 8,0; UV-Detektion bei 195 nm

Die Übersicht in Tabelle 3.1 zeigt das Ergebnis der Vorversuche. Als Probe dienten jeweils 20 mL einer 1 mM Ibuprofenlösung in Reinstwasser. Der in der Tabelle angegebene pH-Wert bezieht sich auf diese Probenlösung und wurde mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl eingestellt. Die mg-Angabe gibt die verwendete Sorbensmenge an, und das Elutionsvolumen betrug für alle Versuche 5 mL. Die Wiederfindungsrate ergab sich aus zwei Messungen. Die Eluate wurden in einer Vakuumzentrifuge mit angeschlossener Kühlfalle bei Raumtemperatur (RT) zur Trockne eingedampft. Die Wiederfindungsraten wurden im Vergleich zu einer direkt eingedampften Standardlösung bestimmt, die 100% der jeweiligen Konzentration an Arzneimittelwirkstoff enthielt.

Kartusche	Chemische Struktur	Wiederfindungsrate [%]	Standardabweichung
C18 Hydra Macherey-Nagel, 1000 mg; pH 2,0	C18-modifiziertes Kieselgel, ohne endcapping	67	2,0
Bond Elut C18 Varian, 500 mg; pH 2,0	C18-modifiziertes Kieselgel, mit endcapping	84	1,6
Bond Elut PH Varian, 500 mg; pH 2,0	Phenylphase	56	1,3
Strata SAX Phenomenex, 500 mg; pH 9,0	Quartäre Ammoniumgruppen	52	2,5
Strata Screen A Phenomenex, 200 mg; pH 9,0	C8-modifiziertes Kieselgel mit quartären Ammoniumgruppen	130	7,7
Oasis [®] MAX Waters, 150 mg; pH 9,0	Divinylbenzol-N- Vinylpyrrolidon-Copolymer mit quartären Ammoniumgruppen	50	17,1
Oasis [®] HLB Waters, 60 mg; pH 3,0	Divinylbenzol-N- Vinylpyrrolidon-Copolymer	45	5,8
Chromabond easy Macherey-Nagel, 200 mg; pH 8,5	Polar modifiziertes Polystyrol- Divinylbenzol-Copolymer	73	1,9
absolut Nexus [®] Varian, 200 mg; pH 8,5	Styroldivinylbenzol/Methacrylat- Copolymer	92	2,5
absolut Nexus [®] Varian, 200 mg; pH 2,0	Styroldivinylbenzol/Methacrylat- Copolymer	72	0,8

Tabelle 3.1 Wiederfindungsraten von Ibuprofen (20 mL, 1 mM) bei der Festphasenextraktion

Von den getesteten stationären Phasen zeigten die absolut Nexus[®]- sowie die Bond Elut C18-Kartuschen (beide Firma Varian) die besten Wiederfindungsraten für Ibuprofen und wurden deshalb für die weitere Optimierung der Festphasenextraktion eingesetzt. Die Gründe für die sehr niedrigen Wiederfindungsraten bei der Verwendung der Ionenaustauscher der Firma J.T. Baker sowie der Polymerphasen der Firmen Macherey-Nagel und Waters wurden nicht weiter untersucht. Das unterschiedlich gute Verhalten der getesteten C18-Phasen ist wahrscheinlich auf das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein (Bond Elut C18 bzw. C18 Hydra) des *Endcappings* zurückzuführen. Bei den vorliegenden Analyten scheinen die unpolaren Wechselwirkungen von größerer Bedeutung zu sein als polare Wechselwirkungen mit freien SiOH-Gruppen. Diese Beobachtung ist auch von *AHRER et al.* beschrieben worden [31].

3.1.2.1 SPE mit absolut Nexus[®]-Kartuschen

Die absolut Nexus[®]-Kartuschen bestehen aus einem Styroldivinylbenzol-Methacrylat-Copolymer und weisen somit Funktionalitäten auf, die in der Lage sind, sowohl polare als auch unpolare Analyten aus der entsprechenden Matrix zu extrahieren.

Das schwach polare Copolymer hat gegenüber den C18-modifizierten Kieselgelen den Vorteil, dass es über den gesamten pH-Bereich stabil ist [121, 122]. Durch die starke Vernetzung besitzt das Material eine große spezifische Oberfläche von etwa 575 m²/g, und aufgrund der möglichen π - π -Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der Polymermatrix wird das Retentionsvermögen des Sorbens erhöht [123]. Diese Wechselwirkungen machen es möglich, ionische organische Verbindungen anzureichern, wie es beispielsweise für die Extraktion von Pestiziden mit polaren funktionellen Gruppen beschrieben worden ist [124].

Für die Extraktion der Analyten aus den Wasserproben wurden zunächst 200 mg Sorbens eingesetzt. Als Probenmatrix diente Wasser, welches mit Hilfe einer Millipore-Anlage (Milli-Q Synthesis A 10; Millipore, Billerica, Mass., USA) aufgereinigt wurde und im Folgenden als Reinstwasser bezeichnet wird. Dieses Reinstwasser wurde mit unterschiedlichen Mengen einer Arzneimittelstammllösung ($c = 0,143$ mM je Wirkstoff) dotiert.

Der Einfluss des pH-Wertes der Proben wurde für pH 2,0, pH 5,5 und pH 8,5 untersucht, wobei für alle Analyten bei pH 8,5 die besten Wiederfindungen erzielt werden konnten. Dieses Phänomen ist bereits in der Literatur beschrieben [112].

Um die Wiederfindungsraten der Analyten zu optimieren, wurden unterschiedliche Elutionsmittel (Aceton, Acetonitril, Isopropanol und Methanol) bzw. Elutionsmittelgemische (jeweils 1:1-Mischungen von Acetonitril/Methanol und Methanol/Aceton) eingesetzt. Hier erwies sich Isopropanol als bestes Elutionsmittel. Um das für eine vollständige Elution benötigte Volumen an Elutionsmittel festzustellen, wurden Volumina von 1 bis 5 mL getestet. Es zeigte sich, dass bereits 3 mL Isopropanol für ein optimales Elutionsergebnis genügen.

Die optimierten Bedingungen für die SPE mittels abeslut Nexus[®]-Kartuschen sind in Tabelle 3.2 angegeben. Nach Aufnahme des Rückstands in der Elektrolytlösung wurden die Proben sofort kapillarelektrophoretisch untersucht.

Analysenschritt	Optimierte Bedingungen
Festphasenextraktion	Konditionierung: 6 mL Isopropanol 9 mL Reinstwasser pH 8,5 Probenaufgabe: 10 min für 20 mL Probenlösung ¹⁾ ca. 895 mbar Trocknen : 1 min 844 mbar 5 min 778 mbar Elution : 3,5 mL Isopropanol Eindampfen: zur Trockne mittels Vakuumzentrifuge; ohne Heizung, mit Gaseinlass Aufnahme: 100 µL einer 1:1-Mischung aus 50 mM Natriumphosphat pH 9,0 / MeOH

Tabelle 3.2: Optimierte Bedingungen für die SPE mittels abeslut Nexus[®]-Kartuschen

¹⁾ Probenlösung: 20 mL Reinstwasser pH 8,5 (eingestellt mit 1 M NaOH) + 100 µL Arzneimittelstammlösung in Acetonitril (ACN)/Reinstwasser (8:2); entspricht 0,7 µM je Arzneimittelwirkstoff

Arzneimittelstammlösung: sieben jeweils 1 mM Arzneimittelwirkstoff-Lösungen werden zu gleichen Teilen zusammengegeben und gemischt

Anhand von neun Einzelproben ergaben sich die in Tabelle 3.3 aufgeführten Wiederfindungsraten. Die erhaltenen Werte liegen für die Festphasenextraktion in einem akzeptablen Bereich. Für den Nachweis von Arzneimitteln in Oberflächenwasser ist die angereicherte Wassermenge aufgrund der geringen zu erwartenden Wirkstoffkonzentrationen noch nicht ausreichend, weshalb das Probenvolumen bei gleicher Menge an Arzneimittelstammlösung auf 100 mL erhöht wurde.

Arzneimittel- wirkstoff	Wiederfindung [%]	Standardab- weichung
Bezafibrat	94	3,8
Indometacin	73	0,5
Gemfibrozil	85	5,6
Diclofenac	89	7,2
Ibuprofen	94	4,6
Naproxen	93	5,9
Clofibrinsäure	87	2,9

Tabelle 3.3: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mit absolut Nexus[®]-Kartuschen

Bereits bei einem auf 100 mL erhöhtem Probenvolumen des mit Arzneimittelwirkstoffen dotierten Reinstwasser zeigten sich große Verluste für die Substanz Clofibrinsäure; die Wiederfindung sank auf 24% (n = 4 Messungen). Vermutlich ist dieser Stoff zu polar, um bei vergrößerten Probenvolumina ausreichende Wechselwirkungen mit dem Sorbens der absolut Nexus[®]-Kartuschen einzugehen und wird so mit der sehr polaren Probenaufgabelösung durchgespült. Auch bei den anderen Analyten waren Substanzverluste festzustellen, diese fielen allerdings bei weitem nicht so groß aus wie bei der Clofibrinsäure.

Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die verwendeten Polymerkartuschen bei geringen Probenvolumina gut geeignet sind, polare Analyten anzureichern, wie auch in der Literatur beschrieben ist [125]. Allerdings reichen die Wechselwirkungen nicht aus, um aus größeren Probenvolumina polare Substanzen quantitativ zu adsorbieren. Eine Erhöhung der Sorbensmasse auf 500 mg kam aus Kostengründen nicht in Frage.

Aufgrund der unzureichenden Retention der Analyten bei hohen Probenvolumina auf den absolut Nexus[®]-Kartuschen wurde die Anreicherung im Laufe der Arbeiten auf die Bond Elut C18-Kartuschen der Firma Varian verlagert, die bei den Vorversuchen ebenfalls gute Ergebnisse gezeigt hatten.

3.1.2.2 SPE mit Bond Elut C18-Kartuschen

Die für die Festphasenextraktion eingesetzten C18-modifizierten Kieselgele sind im Vergleich zu denen in der HPLC eingesetzten sehr porös. Sie weisen - analog zu den polymeren Materialien - eine große spezifische Oberfläche auf (Bond Elut C18: 500 m²/g).

Da das Retentionsvermögen dieser Sorbentien geringer ist als das der Polymerphasen, wurde bereits bei den ersten Versuchen mit einem Probenvolumen von 100 mL die Sorbensmasse auf 500 mg erhöht. Hierbei konnten Wiederfindungsraten für die einzelnen Substanzen von 81 bis 96% erzielt werden. Bei der Erhöhung des Probenvolumens auf 200 mL bei gleicher Analytmenge (100 μ L Arzneimittelstammlösung) wurde ein Durchbruch sowohl für Clofibrinsäure als auch für Ibuprofen festgestellt; daher wurde die Sorbensmasse auf 1 g erhöht, um die Kapazität zu vergrößern. Mit dieser Sorbensmasse konnten die gesuchten Analyten problemlos aus Wasserproben von bis zu 500 mL extrahiert werden, was für die weitere Analytik (speziell mit GCxGC) ausreichend sein sollte.

Als Elutionsmittel zeigte sich Methanol im Vergleich mit Isopropanol und Acetonitril überlegen. Eine Optimierung erfolgte anschließend hinsichtlich des benötigten Elutionsmittelvolumens. Bei Versuchen mit fraktionierter Elution konnte festgestellt werden, dass 4 mL MeOH ausreichend sind (siehe Abbildung 3.2), um die Analyten quantitativ zu eluieren. Um einen gewissen Sicherheitsfaktor zu gewährleisten, wurde das Elutionsvolumen für die weiteren Experimente auf 4,5 mL festgesetzt.

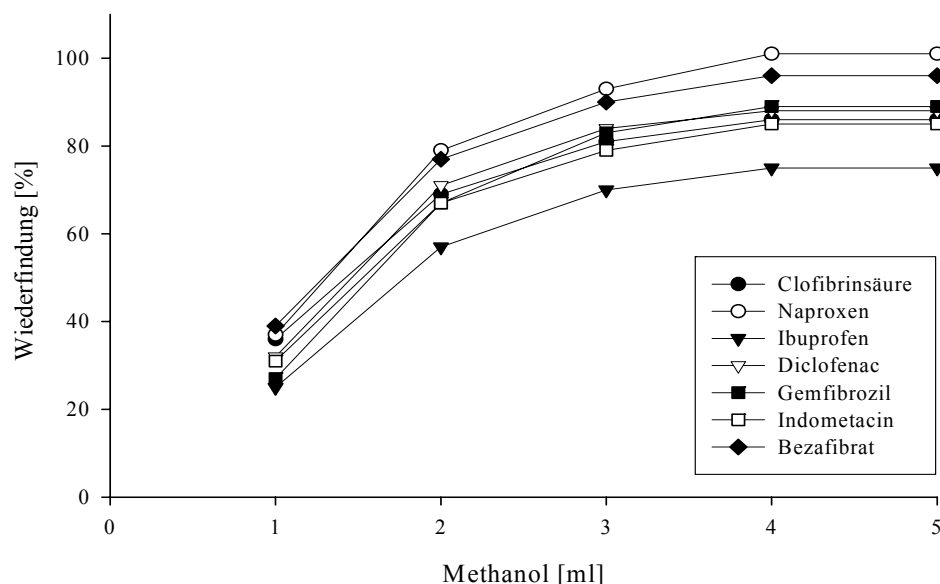


Abbildung 3.2: Benötigtes Elutionsmittelvolumen für Bond Elut C18-Kartuschen

Der Einfluss des pH-Wertes der Proben wurde für pH 2,0, pH 5,5 und pH 8,5 untersucht, wobei erwartungsgemäß für alle Analyten bei pH 2,0 die besten Wiederfindungsraten erzielt

werden konnten. Bei diesem pH-Wert sind die Substanzen ungeladen und zeigen die größtmöglichen Wechselwirkungen mit einer unpolaren Oberfläche.

Die optimierten Bedingungen für die SPE mittels Bond Elut C18-Kartuschen sind in Tabelle 3.4 angegeben. Der Rückstand wurde unmittelbar nach Aufnahme in der Elektrolytlösung kapillarelektrophoretisch untersucht.

Analysenschritt	optimierte Bedingungen
Festphasenextraktion	Konditionierung: 6 mL Aceton 9 mL MeOH 6 mL Reinstwasser pH 2,0 Probenaufgabe: 6 mL/min für 500 mL Probenlösung ¹⁾ ca. 895 mbar Trocknen: 1 min 844 mbar 5 min 608 mbar Elution: 4,5 mL MeOH Eindampfen: zur Trockne mittels Vakuumzentrifuge; ohne Heizung, mit Gaseinlass Aufnahme: 100 µL einer 1:1-Mischung aus 50 mM Natriumphosphat pH 9,0 / MeOH

Tabelle 3.4: Optimierte Bedingungen für die SPE mittels Bond Elut C18-Kartuschen

¹⁾ Probenlösung: 500 mL Reinstwasser pH 2,0 (eingestellt mit 1 M HCl) + 100 µL Arzneimittelstammlösung in ACN; entspricht 29 nM je Arzneimittelwirkstoff

Arzneimittelwirkstoffstammlösung: sieben jeweils 1 mM Arzneimittelwirkstofflösungen werden zu gleichen Teilen zusammengegeben

Die Wiederfindungsraten wurden durch Messungen von neun Einzelproben bestimmt und sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben. Anhand der ermittelten Wiederfindungsraten und Standardabweichungen zeigen sich die eingesetzten Bond Elut C18-Kartuschen mit einer Sorbensmasse von 1 g als gut geeignet, um aus großen Probenvolumina die zu analysierenden Arzneimittelwirkstoffe quantitativ zu extrahieren.

Diese Methode der Probenanreicherung wurde im Verlauf der Arbeit entwickelt und hauptsächlich für die Analytik der Arzneimittelwirkstoffe mittels GCxGC-TOFMS eingesetzt. Für diese Anwendung wurden weitere Versuche mit geringeren Wirkstoffkonzentrationen notwendig, um die Übertragbarkeit auf Realproben gewährleisten zu können. Auf die hierzu durchgeführten Experimente wird in Kapitel 3.5.2 eingegangen.

Arzneimittel- wirkstoff	Wiederfindung [%]	Standardab- weichung
Bezafibrat	100	3,3
Indometacin	83	8,3
Gemfibrozil	93	7,0
Diclofenac	90	8,7
Ibuprofen	81	2,7
Naproxen	92	7,7
Clofibrinsäure	93	4,6

Tabelle 3.5: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mit Bond Elut C18-Kartuschen

3.1.2.3 Anreicherung mit einer C18-HPLC-Säule

Als weitere Möglichkeit für das Aufkonzentrieren der Analyten wurde der Einsatz einer HPLC-Säule mit einer HPLC-Pumpe und UV/VIS-Detektor getestet. Hierzu wurde die Fast-HPLC-Säule Platinum Rocket (C18; 53 x 7 mm; 3 μ m) der Firma Alltech (Deerfield, IL, USA) eingesetzt. Die optimierten Bedingungen für diese Art der Probenanreicherung sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Analysenschritt	optimierte Bedingungen
Probenanreicherung	Äquilibration: 6 min entgastes Reinstwasser pH 2,0 (Volumenfluss (f_v) = 1 mL/min)
	Probenaufgabe: 50 bzw. 100 mL Probenlösung ¹⁾ (f_v = 1 mL/min)
	Nachspülen: 1 min entgastes Reinstwasser pH 2,0 (f_v = 1 mL/min)
	Elution: 5 mL MeOH
	Eindampfen: zur Trockne mittels Vakuumzentrifuge; ohne Heizung mit Gaseinlass
	Aufnahme: 100 μ L einer 1:1-Mischung aus 50 mM Natriumphosphat pH 9,0 / MeOH

Tabelle 3.6: Optimierte Bedingungen für die Probenanreicherung mittels Alltech Platinum Rocket HPLC-Säule

¹⁾ Probenlösung: 50 bzw. 100 mL Reinstwasser pH 2,0 (eingestellt mit 1 M HCl) + 100 μ L Arzneimittelwirkstoffstammlösung in ACN; entspricht 286 nM bzw. 143 nM je Arzneimittelwirkstoff

Arzneimittelwirkstoffstammlösung: sieben jeweils 1 mM Arzneimittelwirkstofflösungen werden zu gleichen Teilen zusammengegeben

Da das in diesem Verfahren eingesetzte Sorbens die gleichen Charakteristiken aufweist wie das bei der Anreicherung mittels C18-Kartusche, wurde der pH-Wert der Proben auf 2,0 festgelegt, da die ungeladenen Wirkstoffe die besten Wechselwirkungen mit dem unpolaren Sorbens zeigen. Bei einem pH-Wert von unter 2,0 kommt es zur sauren Hydrolyse der Bindung der C18-Ketten an der Silica-Oberfläche und somit zur Zerstörung des Packungsmaterials.

Die Wiederfindungsraten wurden durch Messung von elf Einzelproben bestimmt. Als Einzelproben wurden jeweils 50 bzw. 100 mL Reinstwasser eingesetzt, welches mit 100 μ L Arzneimittelstandardlösung (143 μ M je Wirkstoff) in Acetonitril dotiert war. Aus den Analysen ergaben sich die in Tabelle 3.7 dargestellten Wiederfindungsraten und Standardabweichungen.

Arzneimittel- wirkstoff	Wiederfindung [%]	Standardab- weichung
Bezafibrat	100	4,7
Indometacin	98	8,6
Gemfibrozil	89	6,9
Diclofenac	91	8,0
Ibuprofen	78	6,3
Naproxen	99	4,1
Clofibrinsäure	83	7,3

Tabelle 3.7: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mit der Alltech Platinum Rocket HPLC-Säule

Bei einer Erhöhung des Probenvolumens auf 150 mL zeigte sich eine Abnahme der Wiederfindungsrate für die Substanz Clofibrinsäure von 83 auf etwa 60%; bei einem Probenvolumen von 200 mL konnte diese Substanz nur noch im einstelligen Prozentbereich detektiert werden. Zusätzlich nahm auch die Wiederfindung von Naproxen von nahezu 100 auf 40% ab.

Die erarbeitete Anreicherungs-methode mittels HPLC-Säule ist gut geeignet, um die sauren Arzneimittelwirkstoffe aus Probenvolumina bis zu 100 mL zu extrahieren. Allerdings ist bei dieser Methode von Nachteil, dass die Elution nicht zu 100% verläuft und geringe Spuren der Analyten auf der Säule zurückbleiben. Dieses Phänomen konnte bei der UV-Detektion der konzentrierteren Proben nicht festgestellt werden; die Spuren wurden nur bei der sehr empfindlichen Detektion mit Hilfe der GCxGC-TOFMS nachgewiesen. Da diese Rückstände sukzessive und nicht reproduzierbar in den anschließenden Experimenten eluiert wurden, führten

sie zu unkorrekten Wiederfindungsraten im Spurenbereich. Dieses Problem wird in Kapitel 3.5.2 ausführlicher diskutiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anreicherung der zu bestimmenden Analyten mit einer HPLC-Säule aufgrund der unvollständigen Elution (Memoryeffekt) für die quantitative Bestimmung von Wirkstoffmengen im Spurenbereich nicht geeignet ist.

3.2 Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektion

Bei den vorliegenden Substanzen handelt es sich um aromatische Verbindungen, die eine Carboxylgruppe aufweisen und somit bei $\lambda = 204 \text{ nm}$ (Carboxylfunktion) und $\lambda = 254 \text{ nm}$ (aromatisches System) ultraviolettes Licht absorbieren können. Sie sind daher mit Hilfe eines UV-Detektors detektierbar.

Eine HPLC-Methode mit UV-Detektion hätte den Vorteil, dass die Arzneimittelwirkstoffe nach einer Aufkonzentrierung ohne weitere Arbeitsschritte direkt bestimmt werden könnten. Eine Aufkonzentrierung ist für diese Methode unerlässlich, da die Wirkstoffe nur in sehr geringen Konzentrationen in Oberflächenwasser vorkommen. Bei einer Aufkonzentrierung der Gewässerproben werden allerdings auch die darin vorkommenden Matrixbestandteile aufkonzentriert, die die Detektion der zu untersuchenden Substanzen stören. Ein HPLC-UV-Nachweis der zu analysierenden Arzneimittelwirkstoffe ist aufgrund der komplexen Matrix von Wasserproben und der geringen Selektivität und Sensitivität der UV-Detektion nicht möglich.

3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion

3.3.1 Fluoreszenzmarkierung der Arzneimittelwirkstoffe

Wie bereits in Kapitel 3.2 ausgeführt wurde, eignet sich eine Detektion mittels UV-Messung aufgrund mangelnder Selektivität und Sensitivität nicht für den Spurennachweis der Arzneimittelwirkstoffe in Gewässerproben [126]. Eine Möglichkeit, sowohl die Selektivität als auch die Sensitivität für die Detektion von Wirkstoffen mit einer Carboxylfunktion zu erhöhen, ist die Kopplung dieser funktionellen Gruppe mit einem entsprechenden Fluoreszenzmarker. Das

so entstehende fluoreszierende Derivat sollte sich anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors empfindlich nachweisen lassen.

Eine Derivatisierungsreaktion kann prinzipiell sowohl vor als auch nach einer chromatographischen Trennung ausgeführt werden. Da im Zuge dieser Arbeit die chromatographische (HPLC) mit der kapillarelektrophoretischen Trennung verglichen werden sollte, bot sich die Entwicklung einer Derivatisierung vor der Auftrennung mit den genannten Methoden an. Weitere Vorteile dieser Art der Derivatisierung sind [127]:

- die Reaktionsbedingungen können frei gewählt und optimiert werden
- das Reaktionsmedium muss nicht mit dem Trennsystem kompatibel sein
- die Reaktionszeit kann für die Reaktion optimiert werden
- Neben- und Abbauprodukte des Derivatisierungsreagenzes können vor dem chromatographischen Prozeß durch einen Aufreinigungsschritt entfernt werden

Verbindungen, die für die Fluoreszenzmarkierung eingesetzt werden, bestehen in der Regel aus zwei Teilen: dem eigentlichen Fluorophor als Signalgeber und der Ankergruppe, die die Anbindung an den Analyten möglich macht. Um sterische Effekte und Wechselwirkungen zwischen Analytmolekül und Fluorophor weitgehend zu vermeiden, wird häufig noch ein Abstandshalter (Spacer) zwischen Ankergruppe und Fluorophor eingebaut [128].

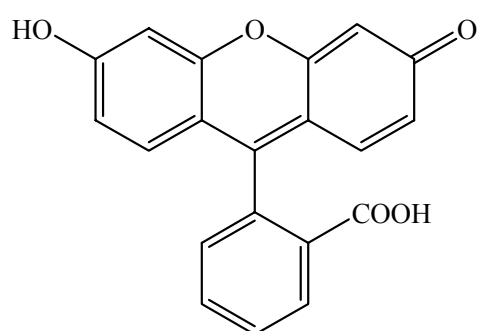
Die Anwendungsbreite der momentan verfügbaren Fluoreszenzmarker ist immens; unterschiedlichste Fluorophore werden mit immer neuen Ankerguppen kombiniert und ebnen so den Weg für weitere Anwendungsgebiete. Hierbei ist zusätzlich von Bedeutung, dass die spektralen Eigenschaften der Fluorophore durch Substituenten beeinflussbar sind und so für nahezu jede Aufgabe der passende Marker synthetisiert werden kann.

3.3.2 Eigenschaften moderner Fluoreszenzmarker

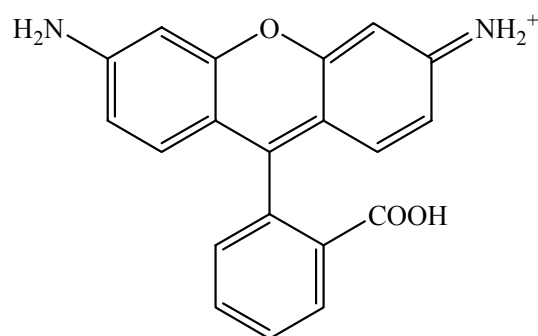
Wie bereits ausgeführt, beinhalten die als Fluoreszenzmarker eingesetzten Moleküle sowohl ein Fluorophor als auch eine Ankergruppe [128].

a) Fluorophore

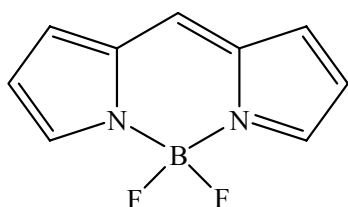
Als Fluorophore werden meist konjugierte Ringsysteme wie beispielsweise Xanthenfarbstoffe eingesetzt. Hierzu gehören beispielsweise die Farbstoffe Fluorescein [129] und Rhodamin [129]. Eine weitere oft verwendete Gruppe sind Indacen-Farbstoffe wie BODIPY® [130] (Abbildung 3.3). Durch chemische Modifikationen der fluorophoren Grundgerüste sind die spektroskopischen Eigenschaften in weiten Bereichen variabel, so dass für unterschiedliche Wellenlängenbereiche ein jeweils geeigneter Fluoreszenzmarker zur Verfügung steht.



2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-
benzoesäure
"Fluorescein"



6-Amino-9-(2-carboxy-phenyl)-xanthen-
3-yliden-ammonium
"Rhodamin"



4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen
"BODIPY®"

Abbildung 3.3: Grundgerüste häufig verwendeter Fluorophore

Unter den dargestellten Grundgerüsten weist das BODIPY®-Fluorophor einige Besonderheiten auf, die es dem Fluorescein gegenüber überlegen erscheinen lassen. So ist beispielsweise die Fluoreszenz unabhängig vom pH-Wert und der Polarität des Lösungsmittels [129, 131].

b) Ankergruppen für die Derivatisierung von Carbonsäuren

Je nach verwendeter Ankergruppe können Carbonsäuren zu Amiden, Estern, Hydraziden oder Hydroxamsäuren umgesetzt werden [129]. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, ob die Umsetzung der Carboxylfunktion mit der entsprechenden Ankergruppe in wässriger oder in organischer Lösung stattfinden soll, da nicht alle Reaktionen in beiden Medien erfolgreich durchführbar sind.

In wässriger Lösung sind beispielsweise Umsetzungen mit Hydrazinen, Hydroxylaminen oder Aminen unter Verwendung von wasserlöslichen Carbodiimiden beschrieben worden [132, 133]. Aufgrund der sehr geringen Reaktivität von Carbonsäuren ist die Aktivierung mit einem Carbodiimid unumgänglich [134]. Als Carbodiimide werden meist N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-carbodiimid (EDC) in wässrigen oder N,N'-Dicyclo-hexylcarbodiimid (DCC) in organischen Lösungsmitteln eingesetzt [134, 135].

In organischen Lösungsmitteln sind zahlreiche Umsetzungen von Carbonsäuren mit Aminen hauptsächlich für die Peptidsynthese bekannt [136, 137]. Auch hier ist die Aktivierung der Carbonsäure mit einem Carbodiimid erforderlich [129]. Eine weitere Art der Umsetzung in organischer Lösung ist die Veresterung der Carbonsäure; diese Art der Markierung wird im Bereich der biomedizinischen Chromatographie oft für biologische Moleküle wie Fettsäuren, Gallensäuresalze oder Prostaglandine eingesetzt [138].

3.3.3 Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzmarkers

Da bei der zu entwickelnden Derivatisierung die Carboxylfunktion der Arzneimittelwirkstoffe mit einem Carbodiimid aktiviert wird, sollte der Fluoreszenzmarker selbst nicht über eine derartige funktionelle Gruppe verfügen, um eine intramolekulare Reaktion zu vermeiden [139]. Somit scheinen die klassischen Fluoreszenzmarker wie Fluorescein- oder Rhodamin-derivate eher ungeeignet zu sein. Ein Fluoreszenzmarker, der diese Bedingung erfüllt, ist das in Abbildung 3.4 dargestellte 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiaminhydrochlorid (BODIPY[®] FL EDA) der Firma Molecular Probes (Eugene, Oregon USA).

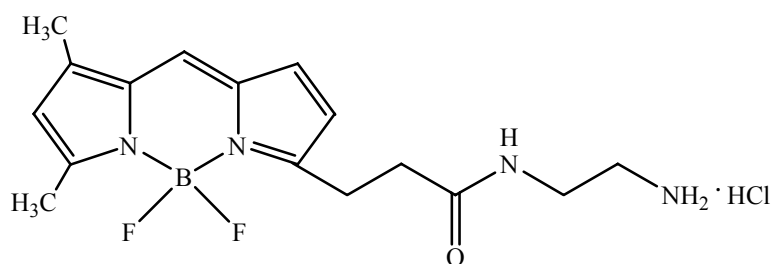


Abbildung 3.4: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylenediaminhydrochlorid (BODIPY[®] FL EDA)

Die spektroskopischen Eigenschaften dieses Fluoreszenzmarkers ($\lambda_{\text{ex}} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$) [129] sind geeignet zur Anregung mit einem Argon-Ionen-Laser ($\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$). Ein weiterer Vorteil dieses Markers ist neben der ausreichenden Wasserlöslichkeit [129] die Unabhängigkeit der Fluoreszenz von den Eigenschaften des Lösungsmittels und dem pH-Wert [129, 131]. Deshalb ergeben sich bei der Trennung der Derivatisierungsprodukte mit der HPLC oder CE keine Einschränkungen. Speziell dieser Marker wurde bereits erfolgreich in einer Arbeit von WÖRTH [128] verwendet, um Mononukleotide über die Phosphatgruppe nach Carbodiimidaktivierung mittels EDC zu markieren.

3.3.4 Derivatisierung in wässrigen Lösungsmitteln

Da das eingesetzte Carbodiimid (EDC) in der Lage ist, sowohl Phosphatgruppen als auch Carboxylgruppen zu aktivieren [135], wurde die von WÖRTH *et al.* beschriebene Reaktion nach Modifizierung zur Kopplung von BODIPY[®] FL EDA an die ausgewählten Arzneimittelwirkstoffe verwendet [141].

Allgemein beruht die aktivierende Wirkung des Carbodiimids bei Carbonsäuren auf der Bildung eines intermediären O-Acylisoharnstoffs. Der Carbonylkohlenstoff dieses Intermediats kann nun durch das Amin leichter nukleophil angegriffen werden, und so erfolgt die Amidbildung aus der aktivierten Carbonsäure und dem entsprechenden Amin. Als Nebenprodukt entsteht aus dem Carbodiimid ein Harnstoffderivat [142]. In Abbildung 3.5 ist das Reaktionsschema allgemein dargestellt.

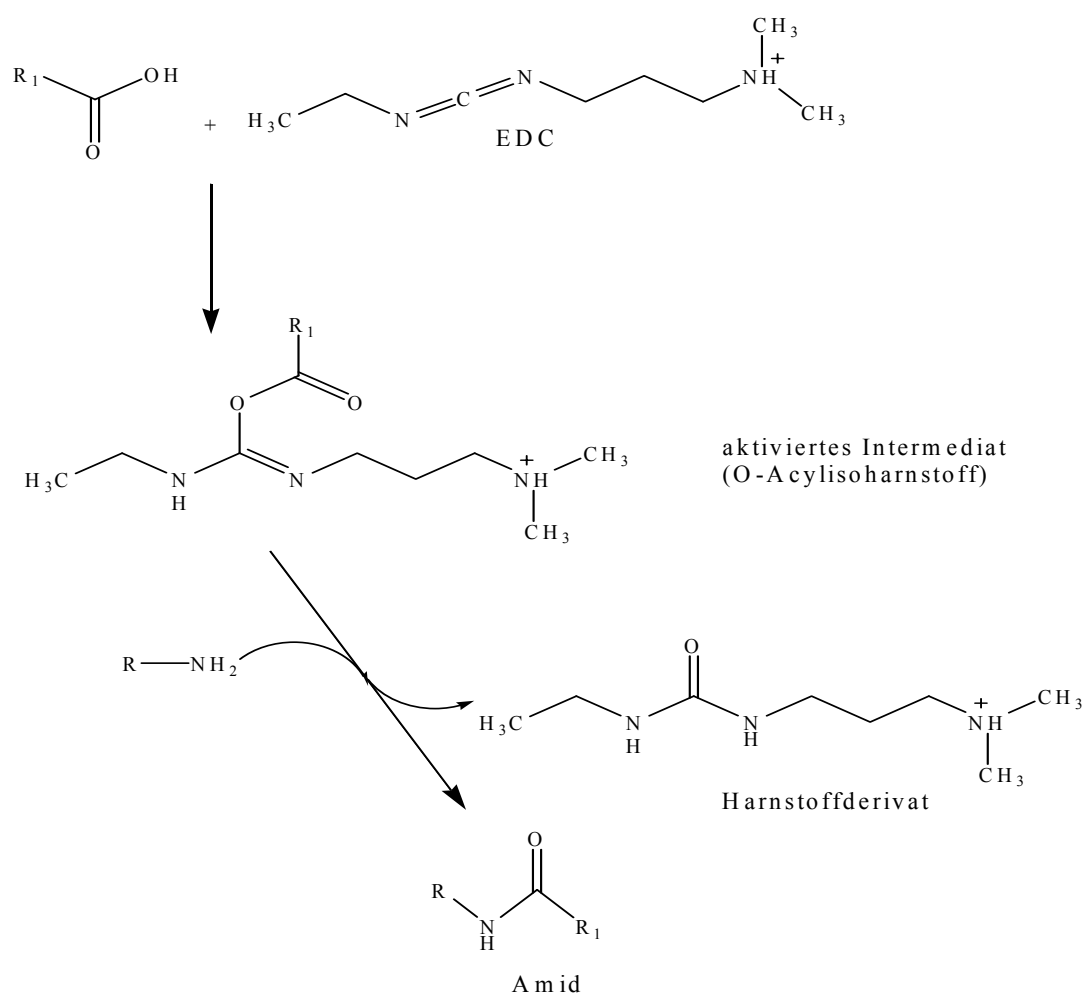


Abbildung 3.5: Darstellung der EDC-vermittelten Amidbildung aus Carbonsäure und Amin, aus [139]

In Tabelle 3.8 ist die modifizierte Reaktionsvorschrift nach *WÖRTH et al.* wiedergegeben, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet worden ist. Gegenüber der Originalvorschrift von *WÖRTH et al.* [141] wurde nur das Nukleotid gegen den Arzneimittelwirkstoff ausgetauscht, die eingesetzten Volumina und Konzentrationen der anderen Stoffe sind beibehalten worden.

Die Reaktionslösung wurde nach 24 Stunden Reaktionszeit sowohl mit HPLC als auch mit CE unter Verwendung eines Fluoreszenzdetektors analysiert. Es ließen sich keine Umsetzungsprodukte der Arzneimittelwirkstoffe mit dem Fluoreszenzmarker nachweisen. Da die starke pH-Abhängigkeit dieser Reaktion bekannt ist (EDC kann in verschiedenen tautomeren Formen vorliegen) [143], wurde zunächst der pH-Wert der Pufferlösung (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure = HEPES) in einem Bereich von pH = 2 bis

pH = 11 variiert. Desweiteren wurde die Reaktionszeit verändert (zwischen 15 und 48 h). Diese Optimierungsschritte und auch Änderungen der eingesetzten Arzneimittelkonzentrationen führten nicht zu den gewünschten Umsetzungsprodukten.

Analysenschritt	Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	1 mM Arzneimittellösung in HEPES-Puffer pH = 6,5 + gleiches Volumen 1,8 M EDC-Lösung in 800 mM HEPES-Puffer pH = 6,5 + gleiches Volumen 800 mM BODIPY [®] FL EDA-Lösung in 800 mM HEPES-Puffer pH = 6,5 Schütteln der Reaktionslösung bei Raumtemperatur in einem Thermomixer für 24 h bei 800 U/min

Tabelle 3.8: Derivatisierungsansatz nach *WORTH et al.* [142]

Um auszuschließen, dass die Derivatisierung aufgrund sterischer Hinderungen der Arzneimittelstrukturen nicht möglich ist, wurden 4-Hydroxyphenylelessigsäure und Dichloressigsäure als Substrate eingesetzt. Auch mit diesen Substanzen ergaben sich bei der Umsetzung mit BODIPY[®] FL EDA keine Reaktionsprodukte.

Somit musste festgestellt werden, dass diese Derivatisierungsreaktion zwar sehr gut für die Phosphoramidatbildung geeignet ist, aber mit den ausgewählten Arzneimittelwirkstoffen nicht zu den gewünschten Ergebnissen führt. Aus diesem Grund wurde von dieser Derivatisierungsreaktion Abstand genommen und andere in der Literatur beschriebene Reaktionsansätze verfolgt, bei denen ebenfalls Aminanker für eine Kopplung an Carbonsäuren eingesetzt worden sind.

Bei der von *NIWA et al.* erarbeiteten Amidsynthese in Wasser wurde 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid (CMC) als Aktivator eingesetzt [144]. Für die Übertragung auf die in dieser Arbeit zu derivatisierenden Substanzen wurde das Amin durch BODIPY[®] FL EDA ersetzt und die Carbonsäure gegen einen Arzneimittelwirkstoff ausgetauscht; das Carbodiimid und die Arbeitsvorschrift entsprachen der Literatur. Auch mit diesem Ansatz konnte keine Umsetzung der Arzneimittelwirkstoffe mit BODIPY[®] FL EDA beobachtet werden. Ebenfalls die von *BECK et al.* [145] und von *NAKAMURA et al.* [146] beschriebenen Amidie-

rungsreaktionen in wässriger Lösung ergaben keine Reaktion der Arzneimittelwirkstoffe mit dem Fluoreszenzmarker.

Da die Umsetzung der Arzneimittelwirkstoffe mit dem Aminanker des Fluoreszenzmarkers nicht erfolgreich war, wurde unter Beibehaltung des Fluorophors zu einem Hydrazid-Anker gewechselt. *MANK et al.* haben zur Derivatisierung von n-Alkylcarbonsäuren einen Fluoreszenzmarker mit Hydrazidanker verwendet [147]. Durch den Zusatz des schwach basischen Pyridins kann von der Carbonsäure das Proton abstrahiert und ein Carboxylatanion gebildet werden. Dieses ist im Vergleich zu der freien Säure reaktiver und erleichtert den nukleophilen Angriff der Ankergruppe des Fluoreszenzmarkers an den Carbonylkohlenstoff [127]. Da der von *MANK et al.* verwendete Marker nicht für die Detektion mit dem Argon-Ionen-Laser geeignet ist, wurde für die weiteren Versuche das BODIPY[®]-Fluorophor mit einem Hydrazid-Anker eingesetzt. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäurehydrazid (BODIPY[®] FL Hydrazid; Firma Molecular Probes, Eugene, Oregon USA) ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Die Absorptions- und Emissionswellenlängen entsprechen nahezu denen von BODIPY[®] FL EDA, somit ist die Anregung mit dem vorhandenen Argon-Ionen-Laser möglich.

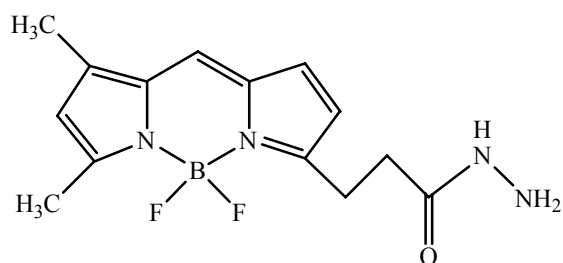


Abbildung 3.6: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäurehydrazid (BODIPY[®] FL Hydrazid)

Die gewählten Derivatisierungsbedingungen wurden - leicht modifiziert - der Vorschrift von *MANK et al.* [147] entnommen und sind in Tabelle 3.9 wiedergegeben.

Mit diesem Ansatz konnte ebenfalls - auch nach Variation der eingesetzten Pyridin- und der Arzneimittelwirkstoffkonzentrationen - keine Umsetzung der Säuren mit dem Fluoreszenzmarker gefunden werden.

Analysenschritt	Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	200 μL 0,1 mM Arzneimittellösung in Wasser + 60 μL 2 M EDC in Wasser + 100 μL 10% Pyridin in Wasser + 100 μL 5 mM BODIPY [®] FL Hydrazid in Dimethylformamid 1 min mit Vortex-Gerät mixen, Schütteln der Reaktionslösung bei 45 °C für 30 min bei 800 U/min

Tabelle 3.9: Derivatisierungsbedingungen in wässriger Lösung, modifiziert nach *MANK et al.* [147]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Umsetzung der Arzneimittelwirkstoffe im wässrigen Milieu nach Aktivierung mittels Carbodiimiden unter den getesteten Reaktionsbedingungen nicht gelang.

3.3.5 Derivatisierung in organischen Lösungsmitteln

Die von *MANK et al.* erarbeitete Vorschrift für die Umsetzung von Carbonsäuren mit Hydraziden in organischen Lösungsmitteln ist in modifizierter Form in Tabelle 3.10 wiedergegeben [147]. Der verwendete Aktivator Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurde gegen das weniger giftige CMC ausgetauscht, ebenso wurde der Fluorophor gewechselt, da der von *MANK et al.* eingesetzte Fluoreszenzmarker nicht für die Anregung mit einem Argon-Ionen-Laser geeignet ist. Die in der Literatur angegebenen Mengen und Konzentrationen wurde beibehalten.

Analysenschritt	Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	250 μL 0,1 mM Arzneimittellösung in Acetonitril + 50 μL 5% Pyridin in Acetonitril + 100 μL 0,1 M CMC in Acetonitril + 100 μL 0,2 mM BODIPY [®] FL Hydrazid in Acetonitril 1 min mit Vortex-Gerät mixen, Schütteln der Reaktionslösung bei 45 °C für 15 min bei 800 U/min

Tabelle 3.10: Derivatisierungsbedingungen in organischer Lösung, modifiziert nach *MANK et al.* [147]

Unter diesen Bedingungen konnte für die Modellsubstanzen Clofibrinsäure und Naproxen eine Umsetzung mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY[®] FL Hydrazid nachgewiesen werden (Abbildung 3.7). Die HPLC-Trennung gelang an einer RP18-Phase; es wurde ein Fließmittelgradient aus Wasser, Acetonitril und 25 mM Ammoniumacetat eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$).

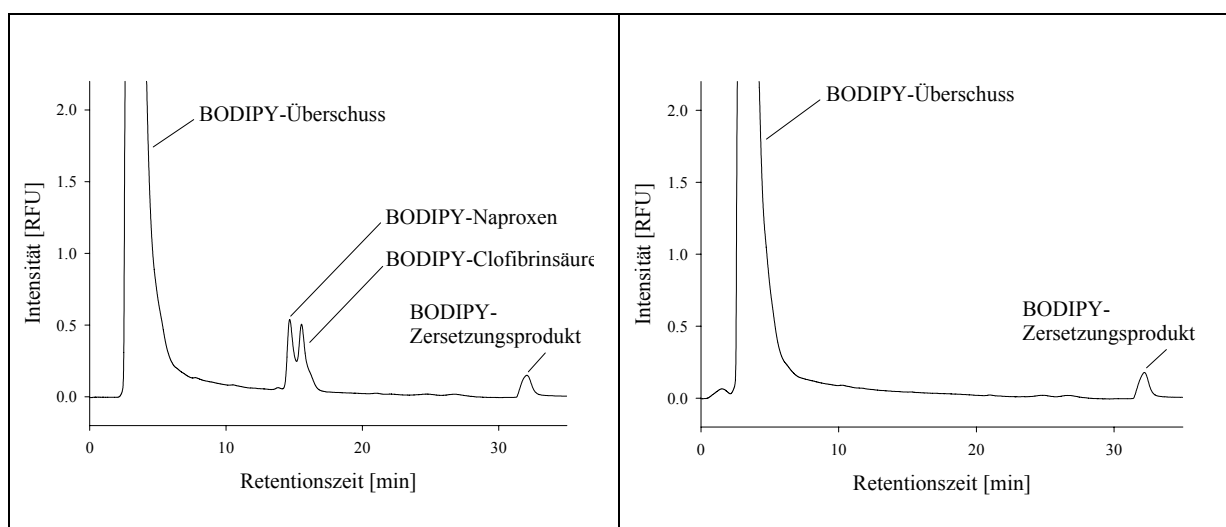


Abbildung 3.7: Umsetzung von Naproxen und Clofibrinsäure mit BODIPY[®] FL Hydrazid unter CMC-Aktivierung; links: Probe, rechts: Blindprobe (HPLC-Trennung)

Messbedingungen: Inertsil ODS-3 (5 μm), 250 x 2,1 mm; Gradientenelution mit Wasser, Acetonitril und 25 mM Ammoniumacetatpuffer; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Der linke Teil der Abbildung zeigt die Umsetzungsprodukte der beiden Arzneimittelwirkstoffe (BODIPY-Naproxen und BODIPY-Clofibrinsäure), der rechte Teil die entsprechende Blindprobe. Aufgrund der kleinen Signale der Umsetzungsprodukte und des großen Signals für den Überschuss des Fluoreszenzmarkers ist ein geringer Umsatz offensichtlich.

Dementsprechend waren Maßnahmen erforderlich, die eine Erhöhung der Produktausbeute zum Ziel hatten. Basierend auf dem in Tabelle 3.10 dargestellten Reaktionsansatz wurden folgende Variationen der Reaktionsbedingungen durchgeführt:

- Reaktionszeit (0,25 - 24 h)
- Reaktionstemperatur (30 - 45 °C)
- Austausch des Lösungsmittels

- Einsatz unterschiedlicher Ankergruppen des Fluoreszenzmarkers:
BODIPY[®] FL Hydrazid
BODIPY[®] FL EDA
- Verwendung unterschiedlicher Carbodiimide
- Einsatz unterschiedlicher Carbodiimid - Konzentrationen (0 - 1 M)
- Einsatz unterschiedlicher BODIPY[®] FL EDA - Konzentrationen (0,5 - 3 mM)
- Einsatz unterschiedlicher Pyridin - Konzentrationen (0 - 75 Vol.% in Acetonitril)

Hieraus ergaben sich folgende optimierte Derivatisierungsbedingungen:

Analysenschritt	Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	250 μ L 0,1 mM Arzneimittellösung in Acetonitril + 50 μ L 50% Pyridin in Acetonitril + 100 μ L 0,1 M CMC in Acetonitril + 100 μ L 0,2 mM BODIPY [®] FL EDA in Acetonitril 1 min mit Vortex-Gerät mixen, Schütteln der Reaktionslösung bei 45 °C für 30 min bei 800 U/min

Tabelle 3.11: Optimierte Derivatisierungsbedingungen in organischer Lösung

Wie Tabelle 3.11 zu entnehmen ist, erfolgte im Verlauf der Optimierung ein Wechsel der Ankergruppe zurück zur Aminofunktion. Dieser Wechsel führte im Fall des Aminankers zu einer deutlich effektiveren Umsetzung der Reaktanden. Der Pyridinzusatz stellte sich als essentiell heraus, ebenso war auf den Carbodiimidzusatz nicht zu verzichten. Ohne diese Substanzen erfolgte keine Reaktion zwischen den Arzneimittelwirkstoffen und der Ankergruppe des Fluoreszenzmarkers.

Abbildung 3.8 zeigt die Trennung einiger Arzneimittelwirkstoffe im Anschluß an die Derivatisierung nach der Vorschrift in Tabelle 3.11 auf einer C18-HPLC-Säule. Die Zuordnung der in der Abbildung gezeigten Wirkstoffderivate erfolgte durch Aufstocken der Reaktionslösung mit Standards. Die im dargestellten Chromatogramm nicht beschrifteten Signale sind auf Zersetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers zurückzuführen. Der in der Abbildung nicht gezeigte Arzneimittelwirkstoff Ibuprofen ließ sich unter den in Tabelle 3.11 angegebenen Derivatisierungsbedingungen umsetzen, war aber in der Probe nicht enthalten. Der einzige

Wirkstoff, der unter diesen Bedingungen keine Reaktion zeigte, war Diclofenac. Wahrscheinlich wird die Carboxylfunktion durch die Aminogruppe und eines der beiden vorhandenen Chloratome abgeschirmt, wodurch die nukleophile Substitution erschwert wird.

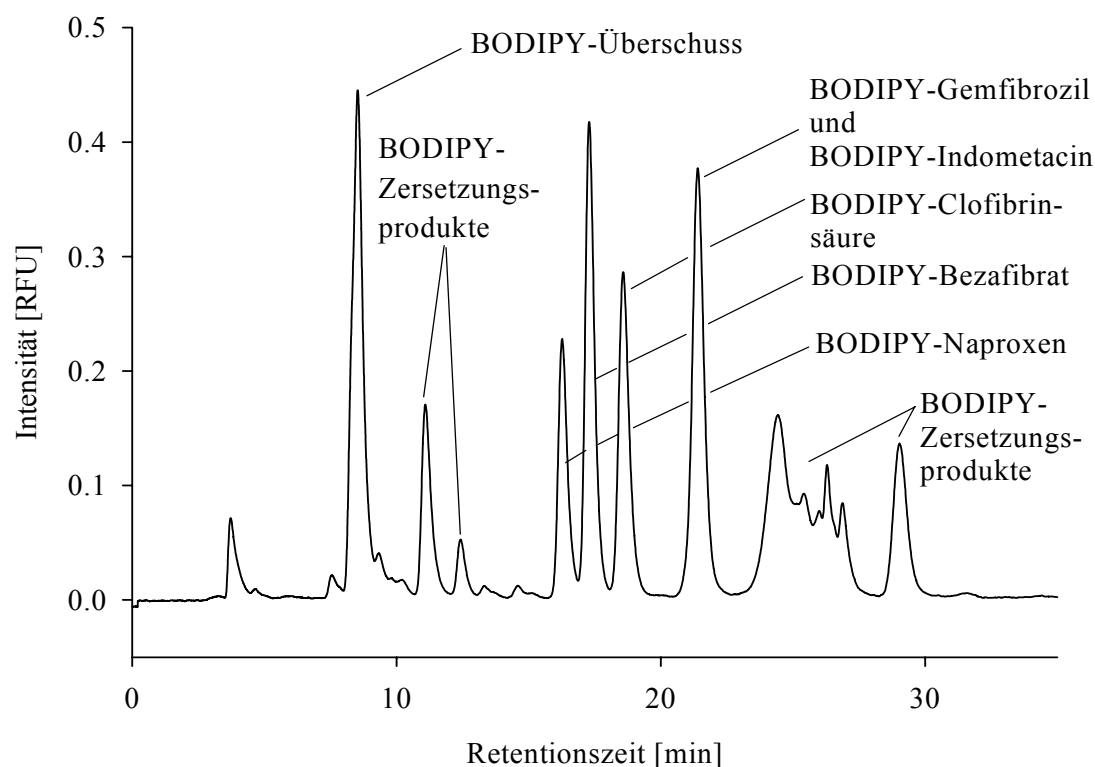


Abbildung 3.8: HPLC-Trennung einiger Wirkstoffprodukte mit BODIPY[®] FL EDA

Messbedingungen: LiChrospher[®] C18 (5 μ m), 250 x 4 mm; Gradientenelution mit Acetonitril, Wasser und 2,5 mM Ammoniumacetatpuffer; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm)

Dem Chromatogramm (Abbildung 3.8) ist auch zu entnehmen, dass durch die Zersetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers viele zusätzliche Signale auftreten, die die Analyse erschweren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Umsetzung im organischen Medium für sechs der sieben Arzneimittelwirkstoffe gezeigt werden konnte. Die Umsetzungsraten konnten durch die Optimierungsschritte deutlich verbessert werden, was anhand des Vergleiches der Peakflächen für den Überschuss des Fluoreszenzmarkers in den Abbildungen 3.7 und 3.8

zu sehen ist. Allerdings muss als Nachteil gewertet werden, dass der Fluoreszenzmarker nicht sehr stabil ist, und so viele Neben- und Zersetzungsprodukte die Detektion der Umsetzungsprodukte erschweren.

3.3.6 Derivatisierung in einem Zweiphasen-System

Basierend auf den bisherigen Derivatisierungsergebnissen in wässriger bzw. organischer Phase mit variierenden Bedingungen lag die Vermutung nahe, dass die Reaktionsausbeute durch eine Zweiphasen-Reaktion mit anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion erhöht werden könnte, da das Reaktionsprodukt lipophil ist und sich daher in eine organische Phase überführen lassen müsste. Wenn die Reaktion in der wässrigen oder der organischen Phase oder an der Grenzfläche beider Phasen stattfindet, könnte so das sich einstellende Gleichgewicht verschoben werden. Durch diese Maßnahme sollte sich die Reaktionsausbeute enorm vergrößern lassen. Darüber hinaus wäre eine Reaktion in einem Zweiphasen-System von Vorteil, da das Reaktionsprodukt in der organischen Phase vorliegt, während der Fluoreszenzmarker in der wässrigen Phase verbleiben würde.

Der von *MANK et al.* beschriebene Ansatz (vgl. Tabelle 3.11) musste aufgrund der nun vorhandenen wässrigen Phase verändert werden. Während dieser Arbeiten zeigte sich, dass bei der Verwendung von protischen Lösungsmitteln auf den Zusatz von Pyridin verzichtet werden kann. Die ermittelten Bedingungen sind in Tabelle 3.12 angegeben.

Analysenschritt	Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	40 μ L 1 mM Arzneimittellösung in 800 mM HEPES-Puffer pH 6,5 und Methanol (8:2) + 40 μ L 1,8 M DCC in Methanol + 40 μ L 25 mM BODIPY [®] FL EDA in 800 mM HEPES-Puffer pH 6,5 und Methanol (8:2) + 100 μ L nicht mit Wasser mischbares organisches Lösungsmittel 1 min mit Vortex-Gerät mixen, Schütteln der Reaktionslösung bei 25 °C für 60 min bei 800 U/min

Tabelle 3.12: Reaktionsbedingungen für die Zweiphasen-Reaktion

Eine weitere Verbesserung brachte die Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) anstelle von EDC. DCC wurde bereits von *JOHNSON et al.* für die Umsetzung von Fettsäuren mit Aminen genutzt [148]. Durch den Wechsel des Carbodiimids ließ sich nun auch Diclofenac umsetzen, welches bisher nicht derivatisiert werden konnte. Auch wurde eine Kombination von DCC und EDC getestet, ob so die postulierte Reaktion an der Grenzfläche positiv zu beeinflussen wäre. Dies war nicht der Fall.

Ausgehend von diesem Reaktionsansatz wurde das optimale organische Lösungsmittel ermittelt. Dies wurde am Beispiel des Wirkstoffs Clofibrinsäure für die Lösungsmittel Dichlormethan, Chloroform, Diethylether und Toluol untersucht. Die Konzentration an fluoreszenzmarkierter Clofibrinsäure in den entsprechenden Lösungsmitteln wurde mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion untersucht. Darüber hinaus waren die Anzahl und Größe der Neben- und Zersetzungsprodukte, die durch den Fluoreszenzmarker entstehen, für die Auswertung wichtig. Diese Signale könnten die Analyse später stören. Abbildung 3.9 zeigt das BODIPY-Clofibrinsäure-Derivat, den überschüssigen Fluoreszenzmarker und seine Zersetzungsprodukte in Abhängigkeit vom eingesetzten organischen Lösungsmittel.

Die in der Abbildung nicht beschrifteten Signale stammen von dem Überschuss (bei 40 Minuten) bzw. den Zersetzungsprodukten des Fluoreszenzmarkers. Der Überschuss des Markers wird von der eingesetzten Cyanophase nach dem Wirkstoffderivat und den Zersetzungsprodukten eluiert. Anhand der Chromatogramme zeigt sich, dass sowohl bei der Umsetzung in Chloroform als auch in Diethylether neben dem derivatisierten Wirkstoff sehr viele zusätzliche Substanzen in der organischen Phase zu finden sind, die die Zuordnung der Derivate stören können. Zudem ist mit Diethylether auch nur eine geringe Ausbeute des Wirkstoffderivats zu erreichen. Somit wurden diese beiden Lösungsmittel nicht weiter eingesetzt. Bei Dichlormethan ist das Signal für den umgesetzte Arzneimittelwirkstoff zwar etwa doppelt so groß wie bei Toluol, aber auch die Anzahl und Größe der unerwünschten Nebensignale sind im Vergleich zu Toluol größer. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Toluol als das am besten geeignete Lösungsmittel für die weiteren Experimente ausgewählt.

Um die Ausbeute an Umsetzungsprodukt weiter zu erhöhen, wurde eine Mehrfachextraktion des Reaktionsansatzes mit Toluol durchgeführt. Hier zeigte sich nach der Abtrennung der Toluolphase eine anschließende zweite und dritte Extraktion als guter Kompromiss zwischen zusätzlichem Aufwand und erhöhter Ausbeute.

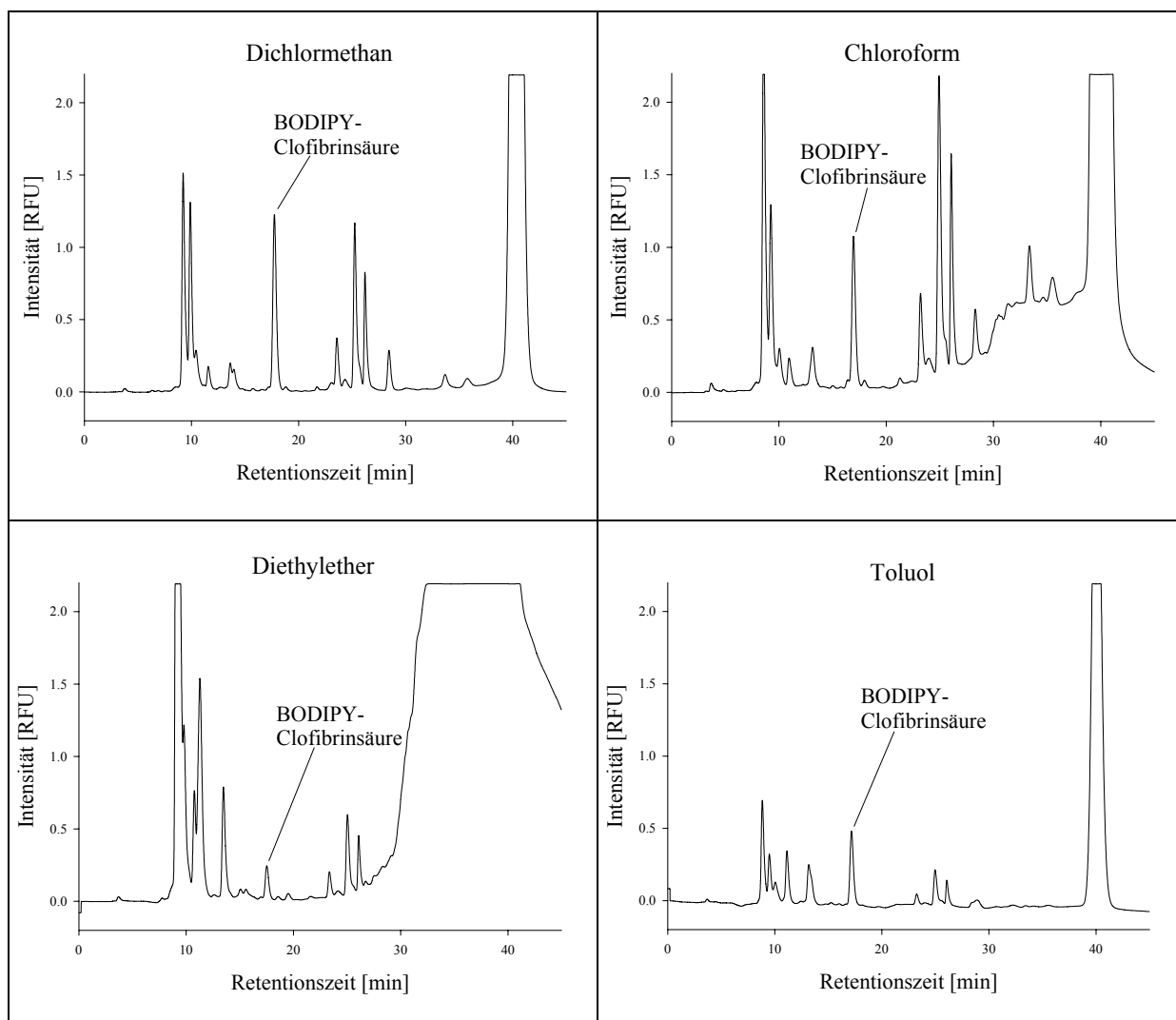


Abbildung 3.9: Zusammensetzung der organischen Phase bei der Derivatisierung in einem Zweiphasen-System

Messbedingungen: LiChrospher® 100 CN (5 μm), 250 x 4 mm; Gradientenelution mit Acetonitril, Wasser und 2,5 mM Ammoniumacetatpuffer; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Die oben beschriebenen Reaktionsbedingungen stellten eine gute Basis dar, von der aus mit einer gezielten Optimierung der einzelnen Parameter begonnen werden konnte. Dazu wurden konzentriertere Arzneimittellösungen eingesetzt als sie in der Umwelt zu erwarten sind, um die Einflüsse der einzelnen Reaktionsparameter besser beurteilen zu können. Später sollte dann eine Übertragung auf weniger konzentrierte Wirkstofflösungen erfolgen. Die Variation der Parameter ist im Folgenden beschrieben.

Einfluss der Reaktionstemperatur (15, 25, 35 und 45 °C); Reaktionszeit: 60 Minuten

Es wurde gefunden, dass sich BODIPY[®] FL EDA bei Temperaturen ab 35 °C unter den gewählten Reaktionsbedingungen leicht zersetzt und es somit zu einer verstärkten Bildung von Nebenprodukten kommt. Auch war die Produktausbeute nicht größer als bei den anderen getesteten Temperaturen. Ähnliche Ausbeuten konnten auch bei 15 und 25 °C festgestellt werden, allerdings entstanden bei 15 °C weniger Zersetzungsprodukte. Aus diesem Grund wurde die Reaktionstemperatur in den weiteren Experimenten auf 15 °C festgelegt.

Einfluss der Reaktionszeit (2 - 16 h; Probenahme alle zwei Stunden)

Für die Umsetzung bei 15 °C wurde nach 14 Stunden die maximale Ausbeute erreicht. Allerdings ist diese Umsetzungszeit für die Routineanalytik nicht akzeptabel. Da bereits nach vier Stunden etwa 80% der maximalen Signalhöhen erreicht wurden und sich nach dieser Zeit auch verstärkt die Signale der Zersetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers erhöhten, wurde die Reaktionszeit auf 4 Stunden festgelegt. Dies stellt einen guten Kompromiss zwischen der Reaktionsausbeute und einer für die Routineanalytik praktikablen Reaktionszeit dar.

Einfluss der eingesetzten BODIPY[®] FL EDA-Konzentration (1 - 32 mM)

Der Fluoreszenzmarker wurde in Konzentrationen von 1, 2, 4, 8, 16, 20, 25, 30 und 32 mM eingesetzt. Bei der Auswertung zeigte sich, dass sowohl mit der Konzentration von 8 mM als auch mit 16 mM gute Ausbeuten erzielt werden konnten. Somit lag die Vermutung nahe, dass das Optimum wahrscheinlich zwischen diesen beiden Konzentrationen liegt. Es erfolgten weitere Umsetzungen mit Konzentrationen des Fluoreszenzmarkers von 10 mM, 12,5 mM und 15 mM. Bis zu einer Konzentration von 12,5 mM zeigte sich eine Erhöhung der Reaktionsausbeute. Durch eine weitere Konzentrationssteigerung konnte keine Verbesserung der Ausbeuten erreicht werden. Daher wurde die optimale BODIPY[®] FL EDA-Konzentration auf 12,5 mM festgelegt.

Einfluss der eingesetzten DCC-Konzentration (1,8 - 10,8 M):

Ausgehend von der in Tabelle 3.12 verwendeten DCC-Konzentration von 1,8 M wurden die Konzentrationen 3,6 M, 5,4 M und 10,8 M eingesetzt. Bis zu einer Konzentration von 5,4 M

erhöhte sich die Ausbeute, die sich mit einer zusätzlichen Erhöhung der DCC-Konzentration nicht weiter steigern ließ.

Aus den einzelnen Optimierungsschritten ergaben sich die in Tabelle 3.13 zusammengefassten Reaktionsbedingungen.

Analysenschritt	Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	10 μL 1 mM Arzneimittellösung in 800 mM HEPES-Puffer pH 6,5 + 10 μL 5,4 M DCC in Toluol + 10 μL 12,5 mM BODIPY [®] FL EDA in 800 mM HEPES-Puffer pH 6,5 + 200 μL Toluol Kurz mit Vortex-Gerät mixen, Schütteln der Reaktionslösung bei 15 °C für 4 h bei 800 U/min Nach 4 h werden 185 μL organische Phase abpipettiert, 200 μL Toluol werden zugesetzt, gemixt und erneut 185 μL Toluol abpipettiert. Der Vorgang wird ein drittes Mal wiederholt und so erhält man ein Gesamtvolumen von 555 μL organischer Phase (3 x 185 μL). Dies wird zu jeweils 50 μL aliquotiert und bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft.

Tabelle 3.13: Optimierte Reaktionsbedingungen mit anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion

KIBLER und *BÄCHMANN* haben 1999 eine zweistufige Phasentransfer-katalysierte Fluoreszenzmarkierung beschrieben, bei der das Reaktionsendprodukt wieder in die wässrige Phase reextrahiert werden muss [149]. Im Vergleich zu der beschriebenen Reaktionsführung ist die in dieser Arbeit entwickelte Methode komfortabler, da auf den Reextraktionsschritt verzichtet werden kann. Abbildung 3.10 zeigt modellhaft die postulierte Reaktionsführung, bei der DCC als Aktivator verwendet wird.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Umsetzung aller zu untersuchenden Arzneimittelwirkstoffe mit dem Fluoreszenzmarker im rein wässrigen Milieu nicht durchgeführt werden konnte. Die Derivatisierung im rein organischen Milieu konnte zwar gezeigt werden, aber die geringen Ausbeuten der Wirkstoffderivate waren für die Spurenanalytik nicht akzeptabel. Die Umsetzung konnte mit hohen Ausbeuten in einem Zweiphasen-System aus HEPES-Puffer

und Toluol durchgeführt werden. Unter den erarbeiteten Derivatisierungsbedingungen lassen sich alle sieben Arzneimittelwirkstoffe mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY[®] FL EDA umsetzen.

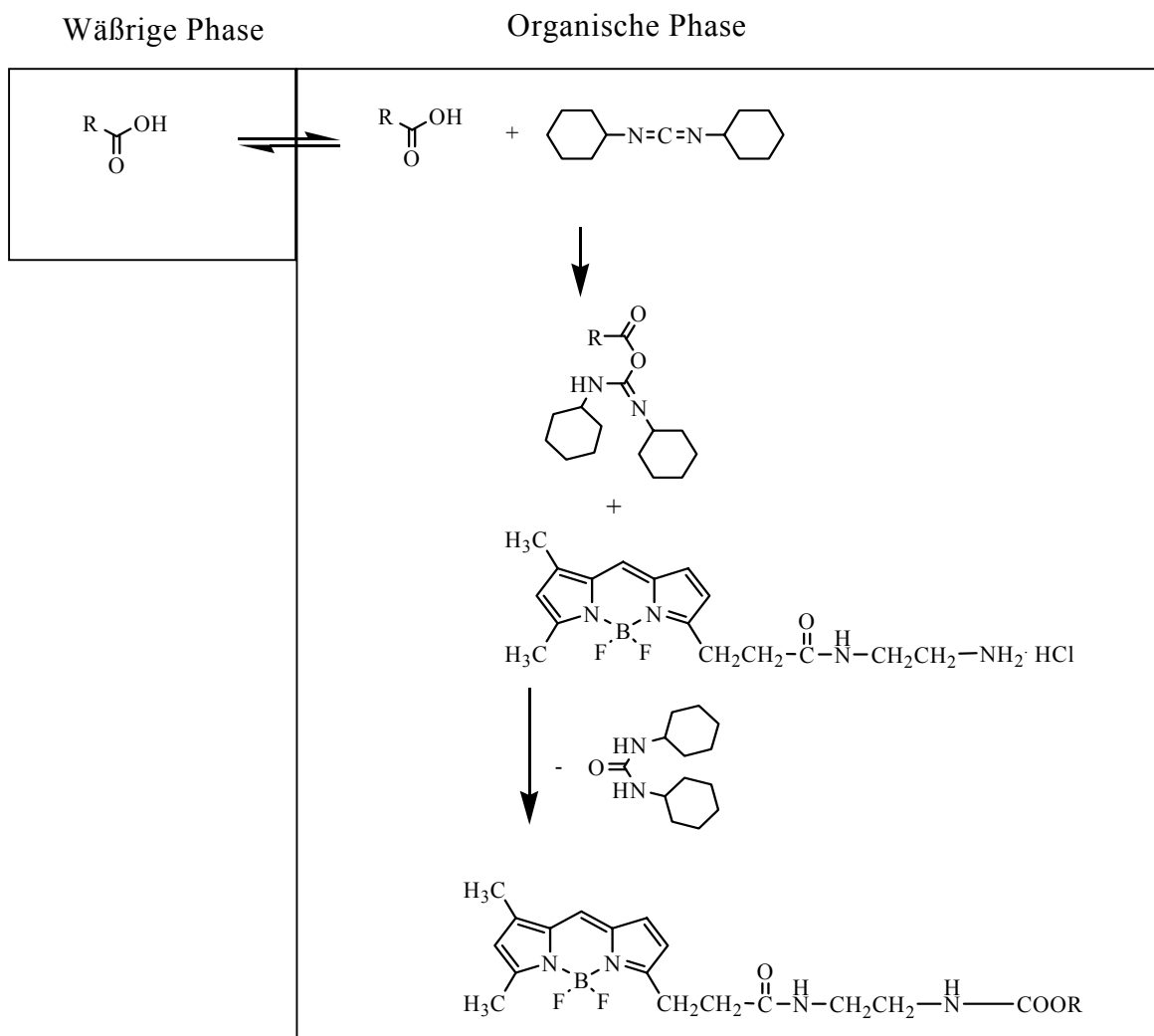


Abbildung 3.10: Amidbildung aus Carbonsäuren und BODIPY[®] FL EDA unter DCC-Aktivierung und Phasentransfer

3.3.7 Derivatisierung geringer Arzneimittelmengen

Da in realen Proben weitaus geringere Mengen an Arzneimittelwirkstoffen vorliegen als bisher in dieser Arbeit untersucht worden sind, wurden nun unter den gleichen Bedingungen stärker verdünnte Probenlösungen derivatisiert. Hierzu wurden Stoffmengen eingesetzt, die

10 μL einer maximal 25 μM Arzneimittelwirkstofflösung entsprechen. Es zeigte sich, dass eine einfache Verringerung der Konzentrationen der Arzneimittelwirkstoffe und des Fluoreszenzmarkers nicht zu den gewünschten Ergebnissen führte, da die Detektion der Wirkstoffderivate durch viele Zersetzungsprodukte des Markers gestört wurde. Somit musste die gesamte Reaktionsführung optimiert werden. Die Auswertung der einzelnen Optimierungsschritte erfolgte näherungsweise über die mittels Fluoreszenzdetektor gemessenen Signalhöhen der Umsetzungsprodukte nach HPLC- oder CE-Trennung. Die einzelnen Parameter mit den dazugehörigen Variationsbreiten sind im Folgenden aufgelistet:

Parameter	Variationsbereich
BODIPY [®] FL EDA-Konzentration	12,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM, 0,125 mM und 0,0625 mM
Reaktionstemperatur	15 °C und 35 °C in Schritten von jeweils 5 °C
Reaktionszeit	3, 4 und 5 Stunden
HEPES-Konzentration	10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM und 800 mM
HEPES-pH-Wert	pH 6,0 bis 8,0 in Schritten von jeweils 0,5 pH-Einheiten
DCC-Konzentration	0 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 270 mM, 540 mM und 5,4 M
Gesamtoluolmenge für die Extraktion	130, 400 und 600 μL

Optimierte Derivatisierungsbedingungen

Aus den einzelnen Optimierungsschritten ergaben sich die in Tabelle 3.14 zusammengefassten Reaktionsbedingungen.

Analysenschritt	optimierte Derivatisierungsbedingungen
Fluoreszenzderivatisierung	<p>10 μL 25 μM bzw. 5 μM mM Arzneimittellösung in 50 mM HEPES-Puffer pH 6,0</p> <p>+ 10 μL 10 mM DCC in Toluol</p> <p>+ 10 μL 0,125 mM BODIPY[®] FL EDA in 50 mM HEPES pH 6,0</p> <p>+ 30 μL Toluol</p> <p>Kurz mit Vortex-Gerät mixen, Schütteln der Reaktionslösung bei 25 °C für 4 h bei 800 U/min</p> <p>Nach 4 h werden 25 μL organische Phase abpipettiert, 50 μL Toluol werden zum Reaktionsansatz zugesetzt, gemixt und 45 μL organische Phase abpipettiert. Der Vorgang wird wiederholt und so erhält man ein Gesamtvolumen von 115 μL organischer Phase. Dies wird zu jeweils 50 μL aliquotiert und bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft.</p>

Tabelle 3.14: Optimierte Reaktionsbedingungen im Zweiphasen-System bei geringen Arzneimittelkonzentrationen

3.3.8 Charakterisierung der Umsetzungsprodukte mittels Massenspektrometrie

Durch Aufstockverfahren sowohl bei der HPLC als auch bei der CE war bekannt, dass es sich bei den beobachteten Signalen um die fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe handelte. Allerdings ist eine Zuordnung aufgrund von Retentionszeiten nicht mit absoluter Sicherheit möglich. Aus diesem Grund wurde eine massenspektrometrische Untersuchung der Umsetzungsprodukte durchgeführt. Zur Charakterisierung der Umsetzungsprodukte wurden mittels LC-MS-Messungen die Präzisionsmassen der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe mit Hilfe des *Locksprayverfahrens* bestimmt.

Mit dem Begriff Präzisionsmasse wird im Allgemeinen eine Masse bezeichnet, die so bestimmt wurde, dass die Abweichung von der theoretischen Masse kleiner als 5 ppm ist. Diese Art der Massenbestimmung erlaubt es unter anderem, von unbekanntem Verbindungen die Summenformeln zu ermitteln. Als Beispiel seien die isotopenreinen Verbindungen $^{14}\text{N}_2$ ($m = 28,0061$ Da) und $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ ($m = 27,9949$ Da) genannt, deren Massen um etwa 400 ppm differieren. Durch die Bestimmung der Präzisionsmassen sind sie leicht zu unterscheiden. Zudem bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, eine bekannte Summenformel zu bestätigen.

Somit ist es möglich, eine Kontrolle von Reaktionen mit bekannten Endprodukten durchzuführen, wie es in dieser Arbeit der Fall ist.

Für die Präzisionsmassenbestimmung sind Massenspektrometer mit einer hohen Auflösung erforderlich. Dazu wird von der Firma Micromass ein Locksprayverfahren angeboten, das für die LC-MS-Kopplung mit einer Elektrosprayquelle geeignet ist. Mittels Lockspray wird die Referenzlösung in das Massenspektrometer eingebracht. Dieser Einlass ist um 90° zum Einlass der Probe der LC versetzt (Abbildung 3.11). Eine sich schnell drehende Kasette öffnet für fünf Sekunden den Weg für das Spray der LC. Danach dreht sich die Kasette und versperrt diesen Einlass. Gleichzeitig öffnet sich der Weg für das Lockspray für eine Sekunde. Anschließend geht die Kasette wieder zum Ausgangspunkt zurück und der Vorgang wiederholt sich. Somit ist mit diesem Verfahren eine zeitnahe Messung von Standardsubstanzen möglich, ohne dass dies einen Einfluss auf den Ionisationsprozess der Analyten hat. Mit Hilfe des eingesetzten Standards (in der Regel Phosphorsäure) kann anschließend die Korrektur der zu bestimmenden Massen durchgeführt werden. Da die Messungen relativ aufwendig sind und relativ große Mengen an Fluoreszenzmarker verbraucht werden, wurden aus Kostengründen nur vier der sieben Wirkstoffderivate mit dieser Methode analysiert.

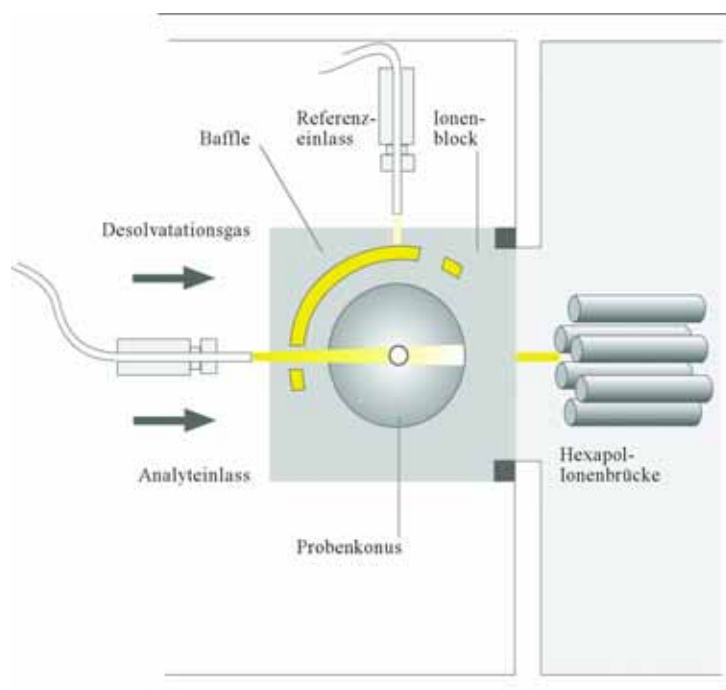


Abbildung 3.11: Lockspray der Firma Micromass

Bei der LC-MS sollten generell Eluenten eingesetzt werden, die leicht flüchtig sind, um eine Verschmutzung des Massenspektrometers zu vermeiden. Somit konnte nicht wie bei den übrigen HPLC-Fluoreszenz-Messungen mit Trifluoressigsäure (TFA) gearbeitet werden. Stattdessen wurde die leichter flüchtigere Ameisensäure eingesetzt. Die genauen Angaben zu den Messungen sowie die erhaltenen Spektren finden sich in den Kapiteln 5.1.2.5 bzw. 6.1.2.

Die ermittelten Massen sowie die Abweichungen sind in Tabelle 3.15 angegeben, wobei die gemessenen Präzisionsmassen mit Hilfe des eingesetzten Phosphorsäurestandards korrigiert wurden.

	Summenformel [M-H] ⁻	Theoretische Masse [M-H] ⁻ [Da]	Präzisions- masse, gemessen [Da]	Präzisions- masse, korrigiert [Da]	Abweichung [ppm]
BODIPY- Bezafibrat	C ₃₅ H ₃₉ BF ₂ ClN ₅ O ₄	676,2674	676,2794	676,2697	3,4
BODIPY- Clofibrinsäure	C ₂₆ H ₃₀ BF ₂ ClN ₄ O ₃	529,1990	529,1858	529,2041	9,6
BODIPY- Ibuprofen	C ₂₉ H ₃₇ BF ₂ N ₄ O ₂	521,2900	521,2991	521,2852	9,2
BODIPY- Naproxen	C ₃₀ H ₃₃ BF ₂ N ₄ O ₃	545,2536	545,2415	545,2528	1,5

Tabelle 3.15: Vergleich berechneter, gemessener und korrigierter Präzisionsmassen (ESI-negativ)

Auch wenn die ermittelten Massen für BODIPY-Clofibrinsäure und BODIPY-Ibuprofen strenggenommen nicht den Anforderungen an die Präzisionsmassenbestimmung genügen, reichen sie hier für die Absicherung völlig aus. Mittels der gemessenen Werte konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei den Signalen, die den Umsetzungsprodukten zugeordnet worden sind, tatsächlich um die Umsetzungsprodukte der Arzneimittelwirkstoffe mit BODIPY[®] FL EDA handelt.

3.3.9 Optimierung der HPLC-Trennung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Leistungsfähigkeit unterschiedlicher analytischer Verfahren bei der quantitativen Bestimmung der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe miteinander zu vergleichen. Hierbei sollte die Leistungsfähigkeit der HPLC unter Verwendung eines herkömmlichen Fluoreszenzdetektors mit der kapillarelektrophoretischen Trennung mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion verglichen werden. Daher wurde eine Trennmethode für die sieben derivatisierten Arzneimittelwirkstoffe erarbeitet, die im Folgenden dargestellt wird.

3.3.9.1 Variation der stationären Phase

Aus der Überlegung heraus, dass die fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe durch teilweise vorhandene polare Gruppen mit polaren Säulenfüllmaterialien wechselwirken können, wurde zunächst eine Trennung auf Säulen mit polar modifizierten Kieselgelen untersucht. Hierzu wurden eine Aminphase der Firma Phenomenex (Luna NH₂, 150 x 2mm; 3 µm, 100 Å) sowie eine Cyanophase der Firma Merck (LiChrospher 100 CN, 250 x 4 mm; 5 µm) eingesetzt.

Beide Säulen zeigten sich als nicht sehr geeignet, da der Überschuss des Fluoreszenzmarkers erst sehr spät eluiert. Die Analysenzeiten waren sehr lang und zudem traten Memoryeffekte auf, die sich nur durch aufwendige Spülschritte beseitigen ließen.

Daher wurde die Trennung auf unpolare Säulen verlagert, bei denen der Fluoreszenzmarker problemlos gleich zu Beginn der Trennung eluiert wurde. Als unpolare Säulen kamen eine LiChrocart[®] RP-8-Phase (7 µm) und eine LiChrospher[®] RP-18(e)-Phase (5 µm, 100 Å) (beide Firma Merck; beide 250 x 4 mm) zum Einsatz. Hier erwies sich die unpolare RP-18 - Phase als geeigneter. Es zeigte sich aber, dass die Trennleistung noch nicht ausreichend war, um alle sieben Derivate basisliniengetrennt darstellen zu können (vgl. Abbildung 3.12 oben).

Um eine Erhöhung der Effizienz zu erreichen, wurde für die Trennung der derivatisierten Arzneimittelwirkstoffe eine Säule mit feinkörnigerem Packungsmaterial verwendet. Hierbei handelte es sich um eine RP-18-Phase (J'sphere H 80) der Firma YMC mit den Abmessungen 250 x 4 mm; 4 µm, 80 Å. Da bekanntlich ein abnehmender Partikeldurchmesser des Packungsmaterials zu niedrigeren Bodenhöhen führt, durfte eine Basislinientrennung erwartet werden.

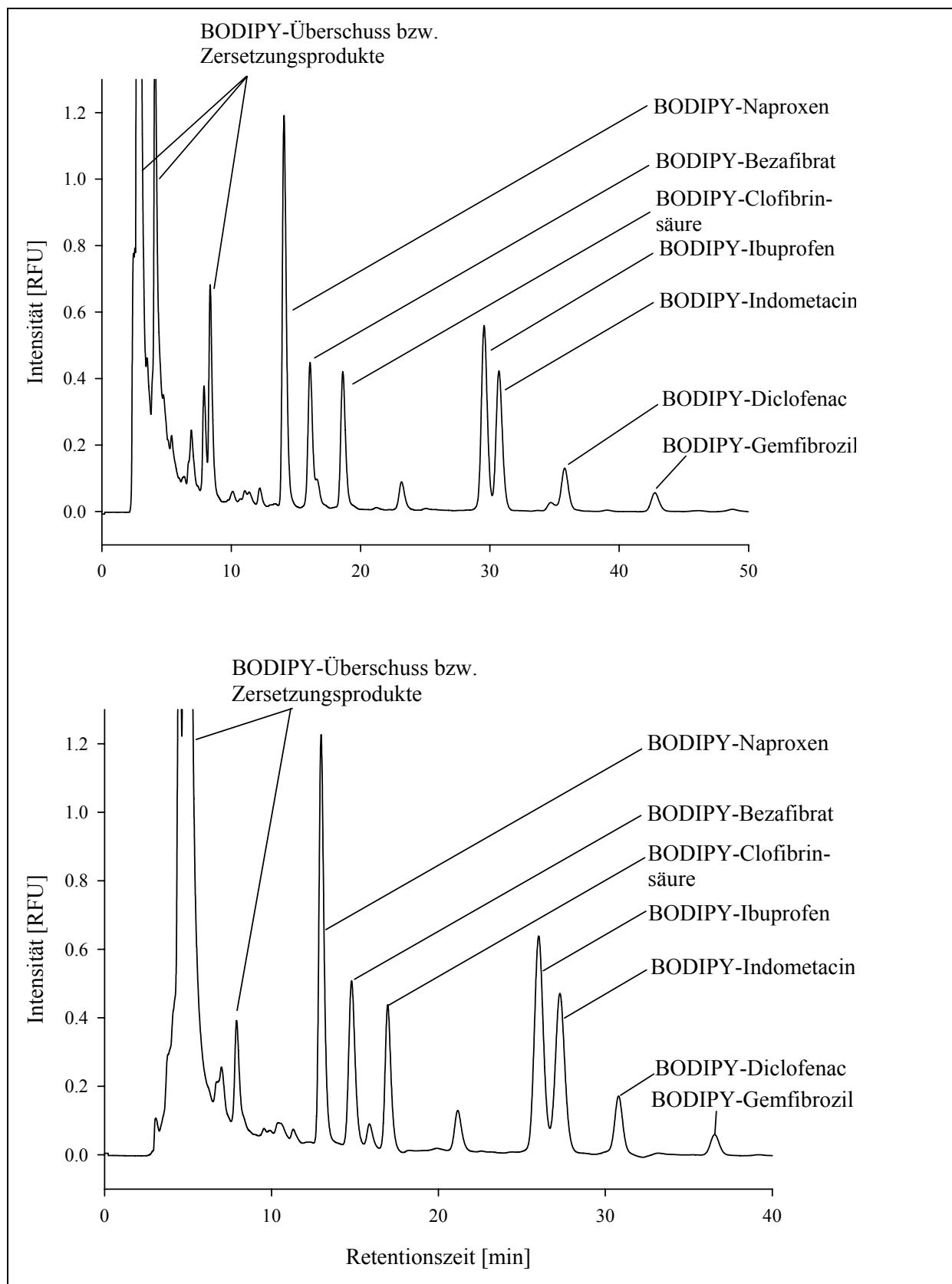


Abbildung 3.12: Säulenvergleich der HPLC-Trennung der derivatisierten Wirkstoffe mit einer LiChrospher® RP-18(e) 5 µm, 100 Å (oben) und einer J'sphere H 80 4 µm, 80 Å (unten)

Messbedingungen: Elution mit einem Gemisch aus Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure, Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$)

In Abbildung 3.12 sind die optimierten Trennungen an den beiden RP-18-Phasen unterschiedlicher Korngröße dargestellt. Es zeigt sich, dass die Trennung mit Hilfe des 4 μm -Packungsmaterials verbessert wird. Vor allem im vorderen Bereich des Chromatogramms ist die Auflösung größer, die Schulter am Peak des Bezafibratderivates wird getrennt. Allerdings konnte auch mit dieser Säule keine Basislinientrennung der Derivate des Ibuprofens und des Indometacins erreicht werden.

3.3.9.2 Variation der mobilen Phase

Als mobile Phase werden in der Literatur für die Trennung von ungeladenen Arzneimittelwirkstoffen häufig Mischungen aus Acetonitril oder Methanol mit Wasser verwendet, denen saure Zusätze beigemischt sind. Dies liegt darin begründet, dass bei pH-Werten unter 3 sowohl die restlichen Silanolgruppen des Säulenmaterials als auch die Analyten vollständig protoniert sind [150]. Um diese niedrigen pH-Werte zu stabilisieren, kann beispielsweise Trifluoressigsäure (TFA) als Puffersubstanz zugesetzt werden [150].

Die Variation des Laufmittels ergab als Optimum ein Gemisch aus Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure. Die genaue Fließmittelzusammensetzung sowie die übrigen Trennparameter sind Tabelle 3.16 zu entnehmen. Mit diesem Gemisch gelang unter isokratischen Bedingungen die Trennung der sieben Derivate, wie sie im unteren Teil der Abbildung 3.12 gezeigt ist.

Da das Ergebnis trotz unvollständiger Trennung der Derivate des Ibuprofens und Indometacins für eine Quantifizierung ausreichend ist, wurden keine weiteren Optimierungsschritte durchgeführt.

Analysenschritt	optimierte Bedingungen
HPLC-Trennung	YMC J'sphere C18-Säule (4 μm), 250 x 4 mm 80 Å Injektionsvolumen: 10 μL isokratisch: 40% Fließmittel A: 90% H_2O / 10% ACN + 0,05 Vol.% TFA 60% Fließmittel B: 90% ACN / 10% H_2O + 0,05 Vol.% TFA Volumenfluss: 0,6 mL/min

Tabelle 3.16: Optimierte Bedingungen für die HPLC-Trennung der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe

3.3.10 Störungen der Fluoreszenzdetektion im Bereich kleiner Konzentrationen

Da das Nachweisvermögen von HPLC-Fluoreszenzdetektion und CE-LIF verglichen werden sollte, wurde zunächst getestet, welche Arzneimittelkonzentrationen nach erfolgter Derivatisierung mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion noch detektierbar sind. Bereits bei Standardproben, die mit Reinstwasser hergestellt waren, traten bereits bei einer für die Derivatisierung eingesetzten Ausgangsmenge von 10 μL einer 25 μM Wirkstofflösung zahlreiche Störsignale auf, die zum Teil die Signale der Arzneimittelwirkstoffderivate überlagerten und eine Quantifizierung unmöglich machten. Abbildung 3.13 zeigt links das entsprechende Chromatogramm der vier Arzneimittelwirkstoffe nach der Derivatisierung und Aliquotierung der organischen Lösungsmittelphase mit einer Konzentration von jeweils 500 nM (bei angenommener 100%iger Umsetzung) und rechts die entsprechende Blindprobe.

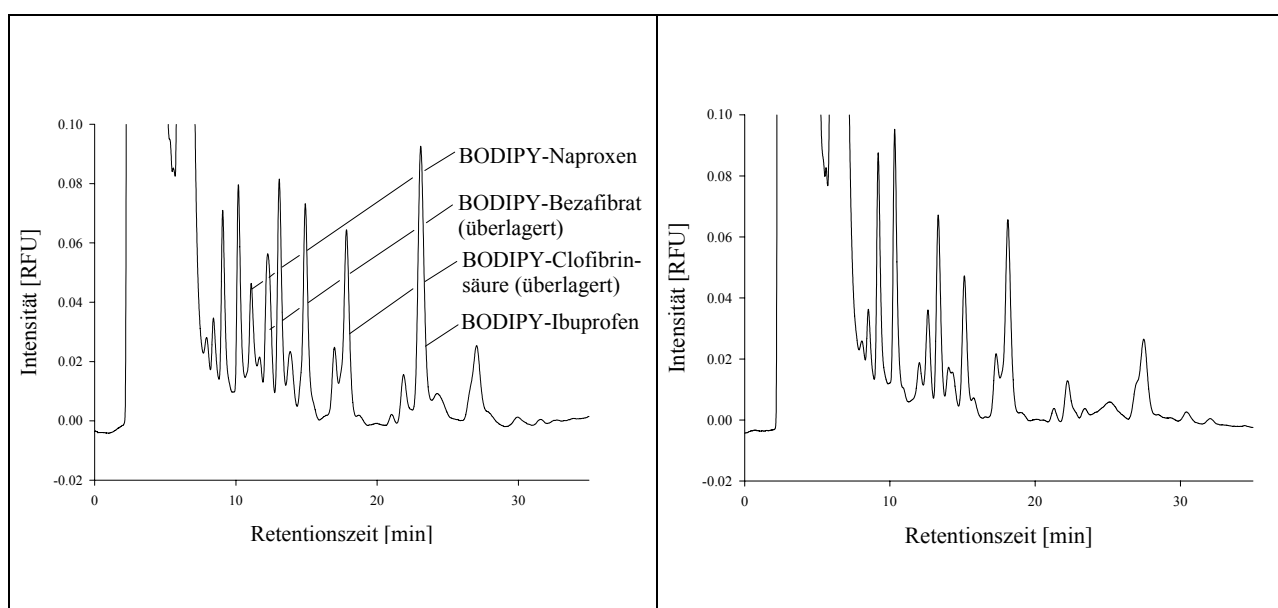


Abbildung 3.13: Chromatogramm eines Arzneimittelwirkstoffstandards (links) und einer Blindprobe (rechts); Konzentration je Wirkstoff: 500 nM

Messbedingungen: J'sphere H 80 (4 μm), 80 \AA , Elution mit einem Gemisch aus Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure, Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

3.3.11 Probenanreicherung

Die in 3.3.10 beschriebenen Störungen der Fluoreszenzdetektion im Bereich kleiner Konzentrationen schränken die Anwendung der Methode ein. Um in Konzentrationsbereiche zu gelangen, wie sie bei Realproben zu erwarten sind, ist daher eine Wirkstoffanreicherung min-

destens um Faktor 1000 notwendig. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass eine Detektion der Wirkstoffe nach Aufkonzentrierung mittels SPE und anschließender Fluoreszenzdetektion aufgrund zahlreicher störender Signale im Chromatogramm unmöglich war. Da diese Aufkonzentrierung sowohl für die HPLC-Fluoreszenz- als auch für die CE-LIF-Methode notwendig ist, wird darauf in Kapitel 3.4.5 eingegangen.

3.4 Kapillarelektrophoretischer Nachweis mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion

Die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion ist eine sehr empfindliche Methode für den Nachweis fluoreszierender Verbindungen. Mittels CE-LIF sind Nachweisgrenzen für Salicylsäure in Kläranlagenabläufen von etwa 100 ng/L (7×10^{-10} M) berichtet worden [32]. Somit sollten sich auch die für diese Arbeit ausgewählten fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe mit hoher Empfindlichkeit nachweisen lassen.

Wie bei dem Nachweis der Arzneimittel mit HPLC-Fluoreszenzdetektion wurden auch bei diesem Nachweisverfahren folgende Schritte eingehalten:

1. Probenanreicherung aus der wässrigen Matrix
2. Derivatisierung der Arzneimittelwirkstoffe
3. Vermessung eines Aliquots der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe mittels Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion

Die Messungen der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe wurden mit einem P/ACE MDQ-Gerät der Firma Beckman (Fullerton, Californien, USA) durchgeführt. Dieses ist mit einem Argon-Ionen-Laser ausgestattet und weist somit die geeignete Wellenlänge auf, um den eingesetzten Fluoreszenzmarker bei 488 nm anregen zu können. Für die Analysen wurde eine nicht-oberflächenbehandelte Kapillare ($L_{\text{ges}} = 50$ cm, $L_{\text{eff}} = 40$ cm; I.D. = 50 μm) eingesetzt. Die Detektion erfolgte kathodisch.

3.4.1 Derivatisierung der Arzneimittelwirkstoffe

Wie auch bei der HPLC-Methode sollten die Arzneimittelwirkstoffe in einer Amidierungsreaktion mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY[®] FL EDA umgesetzt werden. Da die erarbeite-

te Fluoreszenzmarkierung gleichermaßen für die Detektion mittels HPLC-Fluoreszenz und CE-LIF gilt, wird auf Kapitel 3.3 verwiesen. Die optimierten Derivatisierungsbedingungen sind Tabelle 3.14 zu entnehmen. Hierbei handelt es sich um eine Zweiphasen-Reaktion mit anschließender mehrfacher Extraktion der lipophilen Reaktionsprodukte mittels Toluol aus der wässrigen Phase. Der Extrakt wird anschließend mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedampft und nach Aufnahme in Pufferlösung erfolgt die Bestimmung der Bestandteile mittels CE.

3.4.2 Optimierung der Trennbedingungen

Da die zu analysierenden Arzneimittelderivate ungeladen vorliegen, ist eine Trennung mittels CZE nicht möglich. Somit kam als Trennprinzip die mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) in Frage. Das ionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) wird wegen hoher Wasserlöslichkeit, niedriger CMC (ca. 8 mmol/L in reinem Wasser; ist bei wässrigen Elektrolytlösungen auf 3 mmol/L herabgesetzt [61]), geringer UV-Absorption und niedriger Kosten bei der MEKC besonders häufig verwendet [56, 151 - 153].

Somit wurde SDS für die ersten Trennungsversuche als Mizellbildner in Konzentrationen zwischen 10 und 80 mM einem basischen Natriumphosphatpuffer zugesetzt. Für die Analyten ließ sich keine Trennung erreichen, wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Selektivität von SDS für dieses Trennproblem nicht ausreicht. Bereits von *KHALEDI* wurde beschrieben, dass SDS eine mangelnde Selektivität zeigt, um große Moleküle zu trennen, die sich nur relativ gering in ihrer Struktur unterscheiden [63], wie es auch bei den vorliegenden Analyten der Fall ist.

Zur Verbesserung der Trennleistung kann der mobilen Phase ein organischer Modifier wie Acetonitril oder Methanol zugesetzt werden, welcher komplexe Einflüsse auf das Trennsystem ausübt. So ändert sich in diesem Fall nicht nur die Polarität des Trennelektrolyten, sondern auch die Stärke des elektroosmotischen Flusses sowie der Verteilungskoeffizient der Wirkstoffderivate zwischen Pufferlösung und mizellarer Phase [56]. Zur Optimierung des vorliegenden Trennproblems wurden dem Phosphatpuffer Acetonitril oder Methanol in Anteilen zwischen 5 und 30% (V/V) zugegeben. Allerdings ließ sich die Trennung auch so nicht ausreichend verbessern.

Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität eines Trennsystems zu variieren, ist der komplette Austausch des Detergens. Andere einsetzbare Selektoren sind beispielsweise Cyclodextrine oder Gallensäuresalze. Beide Substanzklassen werden oftmals als chirale Selektoren zur Trennung enantiomerer Gemische eingesetzt [154 - 161], können aber auch zur Verbesserung der Trennung bei nicht-chiralen Analyten beitragen [162 - 165]. Während der Erarbeitung eines Trennsystems für die fluoreszenzmarkierten Wirkstoffe wurde SDS sowohl gegen ein Cyclodextrin-Derivat (Cavasol[®] W7 TMA = 2-Hydroxy-3-trimethylammoniopropyl- β -Cyclodextrin) als auch gegen Cholsäure ausgetauscht. Mit beiden Additiven konnte zwar eine Verbesserung der Trennung erreicht werden, aber auch hier war die Selektivität für eine Basislinien-trennung der Analyten nicht ausreichend.

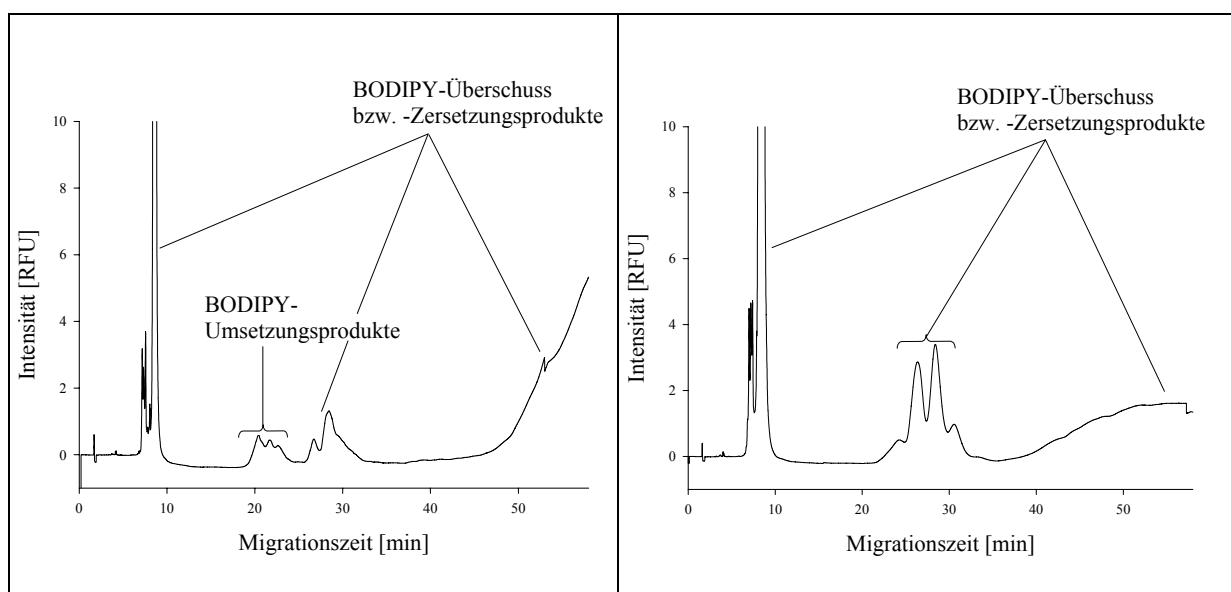


Abbildung 3.14: MEKC der sieben Wirkstoffderivate (links) bzw. der entsprechenden Blindprobe (rechts)

Trennelektrolyt: 20 mM SDS in 20 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Eine weitere Art der Elektrolytvariation ist die Mischung von zwei unterschiedlichen Detergenzien, wodurch eine Modifikation der Mizellen erreicht wird [56]. Es wird postuliert, dass Mischmizellen ausgebildet werden [166, 167]; die Vorgänge bei dieser Art der Modifikation sind jedoch bisher nicht genau geklärt. Zusätzliche Vorteile dieser Variationsmöglichkeit sind neben der Vergrößerung des Elutionsfensters die Änderung der Verteilungskoeffizienten der Analyten sowie die Ladungsdichte, wodurch sich oft eine Trennung von Substanzen erreichen

lässt, die mit "einfachen" Mizellen nicht zu trennen sind [62]. Für die Trennung ungeladener Moleküle ist von *CHANKVETADZE et al.* eine Methode beschrieben worden, bei der - neben SDS - Cyclodextrine sowie deren Derivate als Pufferadditive eingesetzt worden sind [64]. Im Fall des Cyclodextrin-Zusatzes zu einem MEKC-Puffers spricht man von der Cyclodextrin-modifizierten MEKC (CD-MEKC) [65]. Insbesondere α -, β - und γ -Cyclodextrine gehören inzwischen zu den am häufigsten eingesetzten Pufferzusätzen in der CE; die Probenbestandteile verteilen sich in diesem Fall zwischen den amphiphilen Additiven und der durch Elektrosmose bewegten mobilen Phase. Cyclodextrine fungieren bei der CD-MEKC neben SDS als dritte Phase im mizellaren System und stellen somit eine Konkurrenz zu den SDS-Mizellen dar [56]. Hierauf aufbauend wurden verschiedene geladene und ungeladene Cyclodextrine neben SDS als Pufferzusätze verwendet, jedoch konnten die in dieser Arbeit erzielten Trennergebnisse nicht überzeugen.

Als weitere Modifikationsmöglichkeit der Mizellen ist von *WESTERLUND et al.* der Zusatz von Cholsäure sowie deren Derivate zum SDS-MEKC-System beschrieben worden [168]. Gallensäuresalze sind wichtige natürliche Detergenzien und werden im Körper eingesetzt, um lipophile Stoffe wie beispielsweise Cholesterol oder Fettsäuren zu solubilisieren [169]. Auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese werden unterschiedliche Gallensäuresalze seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts als Pufferzusätze verwendet [170, 171]. Sie besitzen mehrere Hydroxylgruppen und sind somit polarer als SDS, weshalb viele polarere Analyten stärkere Interaktionen mit Gallensäuresalzen als mit SDS zeigen. Gallensäuresalze selber bilden helikale Mizellen aus (Aggregationszahl ca. 4) [172] und zeigen aufgrund ihrer Struktur und Ladungsverteilung eine von SDS verschiedene Selektivität. Die Stabilität der aus Gallensäuresalzen aufgebauten Mizellen kann durch Zusatz eines organischen Lösungsmittels erhöht werden [60], daher wurde dem Phosphatpuffer anteilig Methanol bis zu maximal 30% (V/V) hinzugefügt.

Bei dem vorliegenden Trennproblem konnte mit einer Mischung der beiden Pufferzusätze SDS und Cholsäure jedoch keine zufriedenstellende Trennung erreicht werden. Für weitere Experimente wurde die Cholsäure durch Taurocholsäure ersetzt, die zusätzlich einen polaren Taurinrest aufweist (Abbildung 3.15), um die Selektivität weiter zu modifizieren.

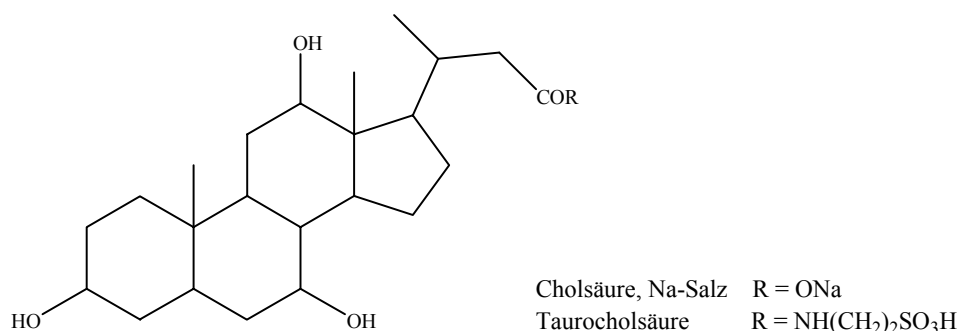


Abbildung 3.15: Strukturen der Gallensäuresalze

Die systematische Variation der Konzentrationsverhältnisse von SDS und Taurocholsäure, des Methanolanteils, der Konzentration des Phosphatpuffers sowie des pH-Wertes führten nicht zu einer Trennung aller sieben Umsetzungsprodukte. In Abbildung 3.16 zeigt der linke Teil die MEKC-Trennung der Umsetzungsprodukte, der rechte die entsprechende Blindprobe. Als bestes Ergebnis konnte eine Trennung von vier Wirkstoffderivaten erreicht werden, die anderen drei wurden nicht zufriedenstellend voneinander bzw. von den Zersetzungsprodukten der Fluoreszenzmarkers getrennt.

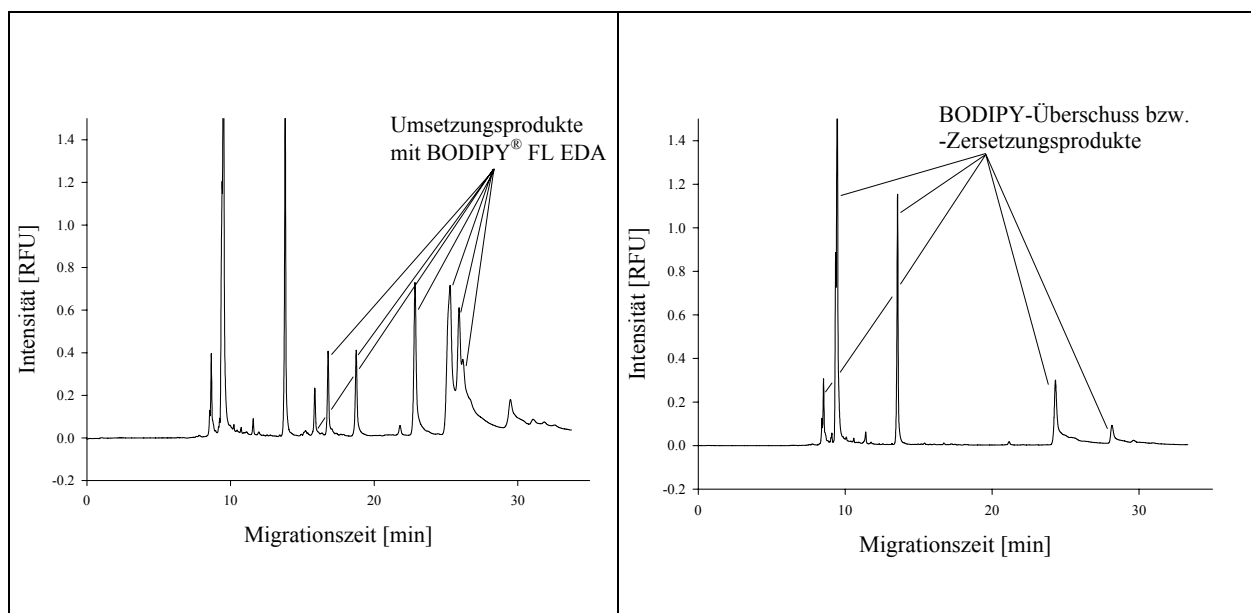


Abbildung 3.16: MEKC der sieben Wirkstoffderivate (links) bzw. der entsprechenden Blindprobe (rechts)

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 6 mM SDS, 25% MeOH in 20 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Bei der Verwendung von Taurocholsäure als Pufferzusatz zeigte sich ein interessanter Aspekt: wurde die Probe wie üblich in einem Methanol / Wasser-Gemisch gelöst, konnte keine Trennung erreicht werden. Wurde sie hingegen im verwendeten Elektrolyten (Trennsystem aus SDS, Taurocholsäure, Methanol und Natriumphosphat) gelöst, zeigte sich sehr rasch eine Antrennung der Substanzen. Das mizellare System scheint in dieser Zusammensetzung besonders empfindlich gegen jegliche Störung zu sein, da selbst geringste Änderungen des Puffersystems sich so immens auf die elektrophoretische Trennung auswirken. Dieser Effekt wurde aus Zeitgründen nicht weiter untersucht.

Da auch die Variation von Parametern wie beispielsweise Kapillartemperatur oder Trennungsspannung zu keiner weiteren Verbesserung führten, wurden die folgenden Untersuchungen auf vier zu analysierende Arzneimittelwirkstoffderivate reduziert.

Hier erschien es sinnvoll, jeweils zwei Hauptvertreter der untersuchten Klassen (Nichtsteroidale Antirheumatika und Lipidsenker) auszuwählen. Die Wahl fiel auf die am meisten verordneten bzw. am häufigsten verkauften Substanzen, Ibuprofen und Naproxen als zum Teil rezeptfrei erhältliche Schmerzmittel sowie Clofibrinsäure und Bezafibrat als Vertreter der Lipidsenker.

Wie in Abbildung 3.17 gezeigt ist, ließ sich nach weiterer Anpassung der Konzentrationsverhältnisse von SDS, Taurocholsäure und Methanol für die vier ausgewählten Umsetzungsprodukte innerhalb von 30 Minuten eine vollständige Auftrennung erzielen. Daran wird deutlich, dass die Modifikation der SDS-Mizellen mit einem weiteren Detergens sowie dem Zusatz eines organischen Modifiers die Selektivität des Trennsystems im Gegensatz zu SDS als einzigem Pufferzusatz erhöht. Weitere Optimierungsversuche, um die Trennung aller sieben Arzneimittelderivate zu erreichen, wurden aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Als mögliche Alternative wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die Kapillarelektrochromatographie (CEC) zu nennen, die die Vorteile der HPLC mit denen der CE kombiniert [173]. Somit könnte unter Umständen eine Trennung der derivatisierten Wirkstoffe möglich sein, da diese Methode durch die große Auswahl an Packungsmaterialien eine höhere Selektivität gegenüber der Kapillarelektrophorese aufweisen kann.

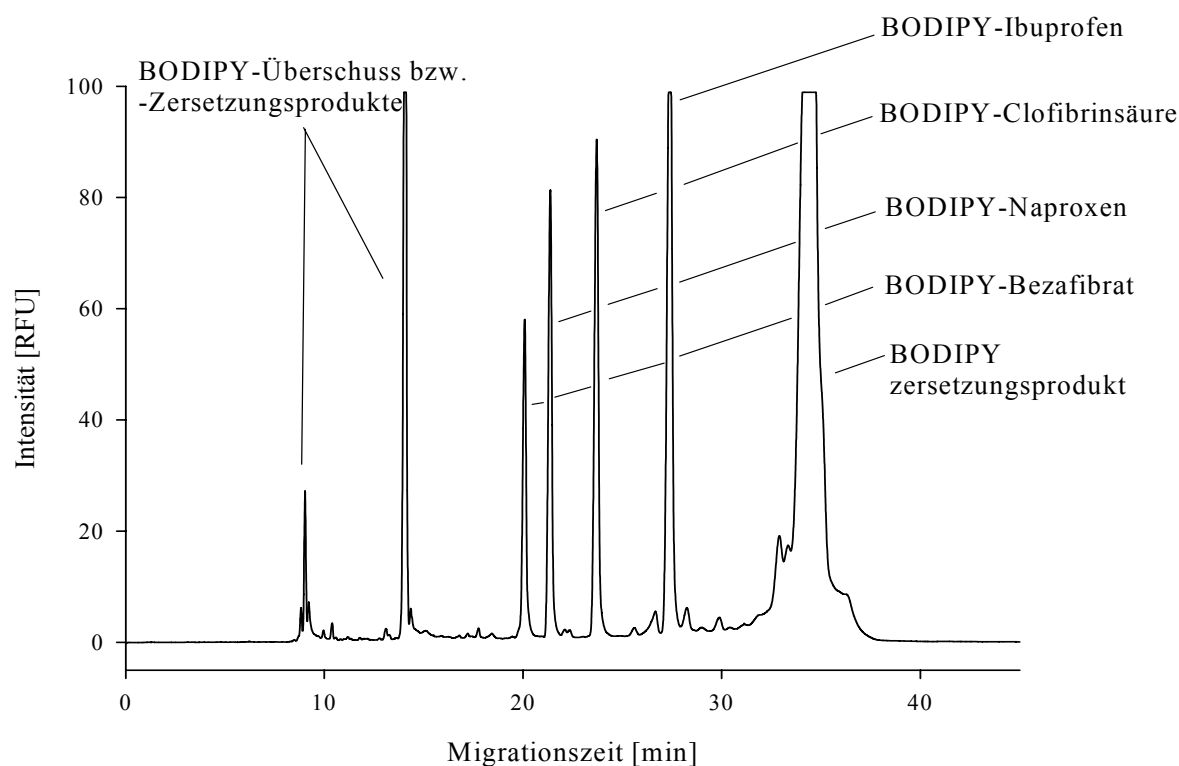


Abbildung 3.17: MEKC der vier ausgewählten Wirkstoffderivate

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% MeOH in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Bei der in Abbildung 3.17 gezeigten Trennung betragen die Konzentrationen der Wirkstoffderivate jeweils $250 \mu\text{mol/L}$. In Tabelle 3.17 sind die ermittelten Trennparameter zusammengefasst, wie sie für die folgenden Untersuchungen beibehalten wurden.

Analysenschritt	optimierte Bedingungen
MEKC	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{\text{ges}} = 50 \text{ cm}$; $L_{\text{eff}} = 40 \text{ cm}$ Innendurchmesser = $50 \mu\text{m}$ Trennungsspannung: 20 kV ($\approx 400 \text{ V/cm}$) hydrodynamische Injektion (0,035 bar; 5,0 sec; entspricht $\approx 6 \text{ nL}$) Trennpuffer: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% Methanol in 30 mM Natriumphosphat pH = 9,0

Tabelle 3.17: Bedingungen für die MEKC-Trennung der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe

3.4.3 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit

Ein sehr wichtiges Kriterium für die Vermessung von Proben ist deren Beständigkeit gegen äußere Einflüsse. Hierbei können besonders Luftsauerstoff und hohe Temperaturen negative Auswirkungen auf die Probenhaltbarkeit haben. Der Fluoreszenzmarker bzw. die fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe sind chemisch nicht ausreichend stabil und somit kann sowohl unter Einfluss von Luftsauerstoff als auch durch Temperaturerhöhung eine Zersetzung beobachtet werden.

Temperatur:

Die derivatisierten Arzneimittelwirkstoffe zeigten sich empfindlich gegenüber Temperaturen oberhalb von 55 °C. Dies wurde während der Herstellung der Proben deutlich. So war es für die Reaktionsausbeute wichtig, ob die organische Phase, die die Wirkstoffderivate enthält, in der Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur oder bei erhöhter Temperatur zur Trockne eingedampft wurde. Bei 55 °C konnte eine teilweise Zersetzung der Derivate festgestellt werden. Damit verstärkte sich auch die Anzahl von Nebenprodukten, die wahrscheinlich auf Zerfallsprodukte des Fluoreszenzmarkers zurückzuführen sind.

Aus diesen Gründen war es erforderlich, die Proben bei Raumtemperatur einzudampfen, was eine Verlängerung der Probenvorbereitung zur Folge hatte.

Luftsauerstoff:

Eine weitere Schwierigkeit im Umgang mit den derivatisierten Arzneimittelwirkstoffen stellte auch deren geringe Stabilität gegenüber Luftsauerstoff dar. Abbildung 3.18 zeigt die Probenveränderung von Lauf zu Lauf (Lauf 1 und Lauf 2) sowie eine Vermessung derselben Probe 24 Stunden später (Lauf 3). Schon eine Stunde nach der Aufnahme der eingedampften Probe im Trennelektrolyten zeigen sich Veränderungen wie zusätzliche kleine Signale, oder aber die Signale entsprachen nicht mehr der idealen Gauss-Form (vgl. Abbildung 3.18, Lauf 2). Besonders drastisch aber waren die Veränderungen nach mehreren Stunden, wie an Lauf 3 zu sehen ist, der einen Tag später vermessen wurde. Die Auflösung der zuvor getrennten Signale ist nicht mehr gegeben und eine Quantifizierung der Umsetzungsprodukte nicht mehr möglich.

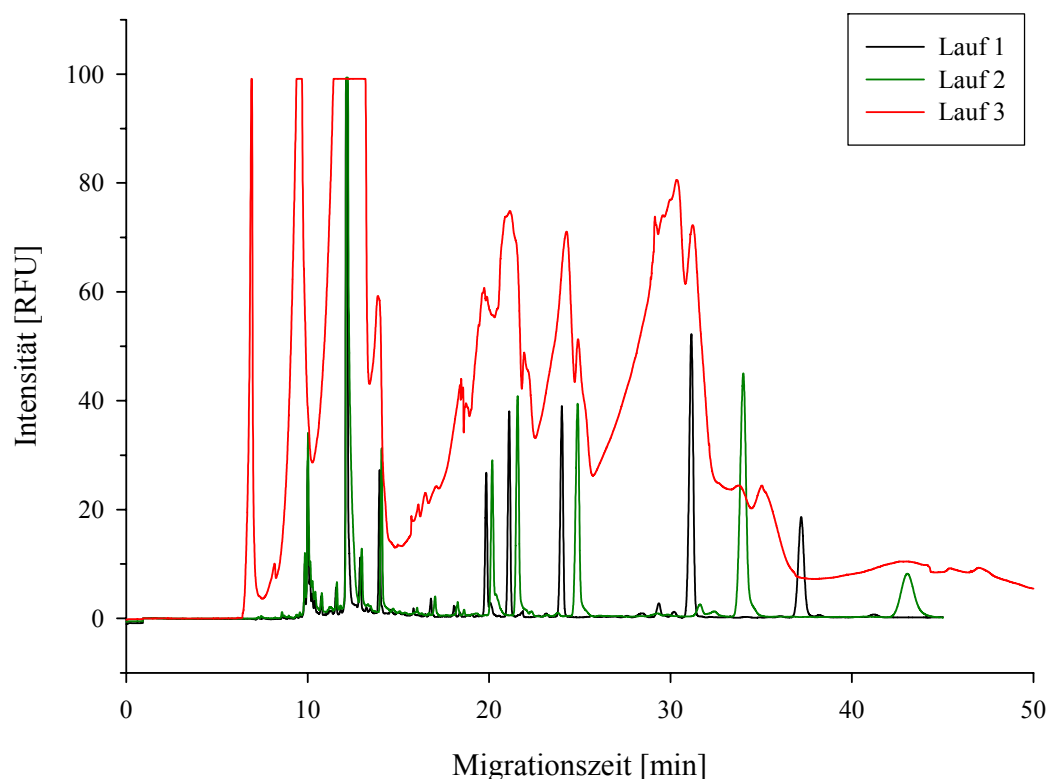


Abbildung 3.18: Einfluss von Luftsauerstoff auf die Probenhaltbarkeit

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 25% MeOH in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Die Tatsache, dass die Probe in Lösung vorliegt, ist offenbar von untergeordneter Bedeutung. Im Vergleich dazu ist der Einfluss des Luftsauerstoffs groß, da eine Überschichtung der Probe mit Paraffinöl die Haltbarkeit für mehrere Tage gewährleistet. Diese Technik ist von *WÄTZIG* und *DETTE* beschrieben worden [174]. Abbildung 3.19 zeigt eine mit Paraffinöl überschichtete Probe, die dreimal vermessen wurde, wobei die Einzelmessungen vier bzw. 72 Stunden auseinander lagen. Durch diese Technik kann nicht nur die Probenhaltbarkeit verbessert werden, sondern ebenso die Haltbarkeit von Trennelektrolyten mit einem hohen Anteil an flüchtigen Substanzen wie z.B. Methanol erhöht werden.

In Abbildung 3.19 ist sehr gut zu sehen, dass nach einem Überschichten der Probe mit Paraffinöl während der 72 Stunden keine zusätzlichen Zersetzungs- oder Abbauprodukte des Fluoreszenzmarkers entstehen; auch die Signalintensitäten der Wirkstoffderivate liegen im Rah-

men der üblichen Schwankungen. Die Differenzen in den Migrationszeiten sind auf eine neu eingebaute fused-silica-Kapillare zurückzuführen; bei neuen Kapillaren schwanken die Migrationszeiten trotz vorheriger Konditionierung teilweise erheblich.

Durch das Überschichten der Proben mit Paraffin ist es möglich geworden, Proben wiederholt zu messen oder aber auch Analysen zeitlich auszudehnen, ohne Änderungen im Analyseergebnis durch Einfluss von Luftsauerstoff befürchten zu müssen. Somit sind die Voraussetzungen für die Routinemessung gegeben.

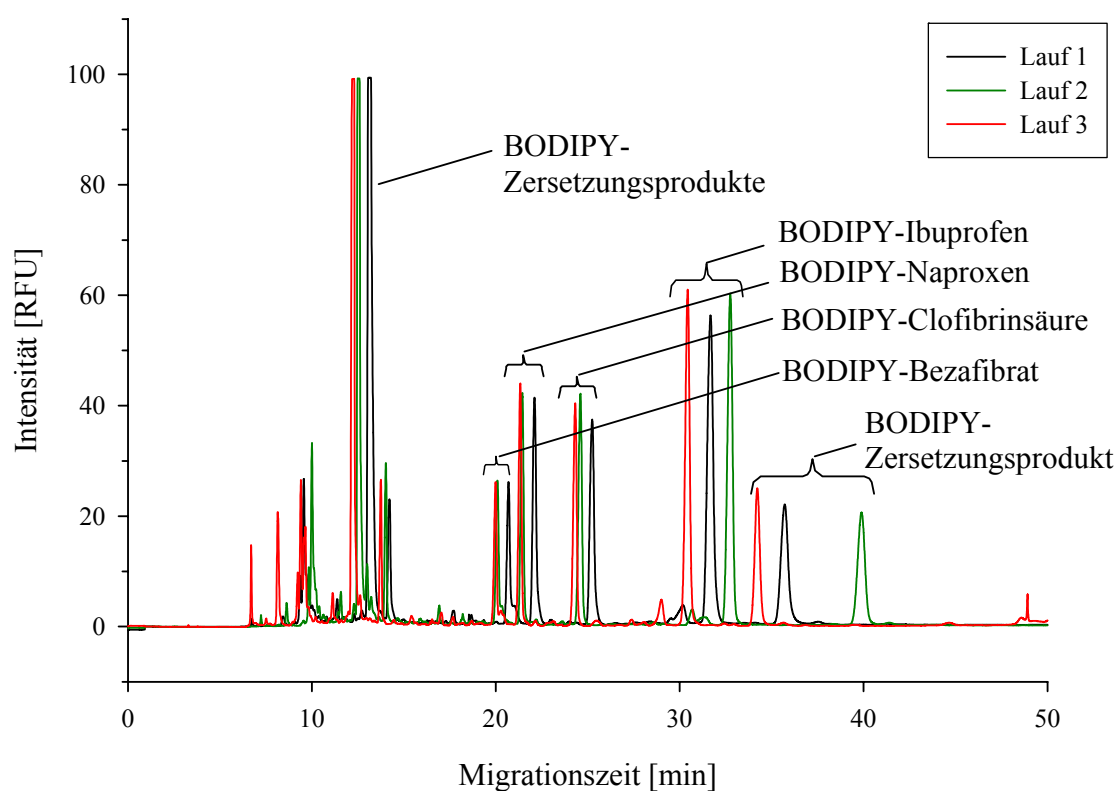


Abbildung 3.19: Probenhaltbarkeit nach Überschichten mit Paraffin

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% MeOH in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

3.4.4 Probenanreicherung

In der Kapillarelektrophorese gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, Proben aufzukonzentrieren. So unterscheidet man on-line-Methoden wie beispielsweise "electrostacking with reversed field" [175, 176] von off-line-Methoden wie der SPE. Bei der genannten on-line-Methode wird das gesamte Kapillarvolumen zur Injektion ausgenutzt, was eine Sensitivitätssteigerung etwa Faktor 50 bis 1000 zur Folge hat. Da die zu entwickelnde Anreicherungsmethode allerdings allen in dieser Arbeit beschriebenen Analysemethoden vorzuschalten war, kam nur eine off-line Methode in Frage. Die Methode der Wahl war aufgrund dieser Vorüberlegungen die Festphasenextraktion, und die Probenanreicherung erfolgte somit – wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben – mit Hilfe der SPE unter Verwendung der absolut Nexus[®]-Kartuschen. Da dieser Schritt mit anschließender Derivatisierung für beide zur Verfügung stehenden Detektionsarten (HPLC-Fluoreszenzdetektion sowie CE-LIF) identisch ist, wird auf die in Kapitel 3.4.5 dargestellten Ergebnisse verwiesen.

3.4.5 Anreicherung und Detektion der fluoreszenzmarkierten Wirkstoffe

Die Ergebnisse hinsichtlich der Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe nach der Anreicherung mittels SPE, die in Kapitel 3.1.2 dargestellt worden sind, wurden bisher ausschließlich durch Analysen im UV-Bereich bestimmt. Da die zu erwartenden Wirkstoffkonzentrationen in Realproben jedoch weitaus geringer sind als mit Hilfe der UV-Detektion nachweisbar ist, musste die eingesetzte Arzneimittelkonzentration gesenkt werden. Um diese Konzentrationen dann sicher bestimmen zu können, ist die Derivatisierung der Wirkstoffe notwendig. So können die Umsetzungsprodukte anschließend mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion ausreichend empfindlich nachgewiesen werden. Bei der Derivatisierung nach einer Probenanreicherung mit den absolut Nexus[®]-Kartuschen zeigten sich schnell Schwierigkeiten, die letztendlich nicht gelöst werden konnten. Somit ist die Methode der Fluoreszenzderivatisierung nicht auf die Analyse von Arzneimittelkonzentrationen übertragbar, wie sie der Umwelt zu erwarten sind. Im Folgenden sind die aufgetretenen Schwierigkeiten dargestellt.

Um die Übertragbarkeit auf Realproben zu testen, wurden (jeweils filtriert) verschiedene Proben nach Anreicherung mittels SPE untersucht: eine Rheinwasserprobe, eine vor der SPE aufgestockte Rheinwasserprobe, eine gespikete Standardprobe sowie eine nach der SPE aufgestockte Rheinwasserprobe. Diese wurden nach der Derivatisierung mit der CE-LIF-Methode

vermessen. Die erhaltenen Elektropherogramme sahen nahezu identisch aus; es gab eine Vielzahl an Signalen, die eine Detektion der gesuchten Umsetzungsprodukte unmöglich machten. Zum Vergleich ist eine der SPE-Proben und eine Standardprobe (Derivatisierung einer Standardarzneimittellösung gleicher Konzentration ohne vorherige SPE-Anreicherung) in Abbildung 3.20 dargestellt.

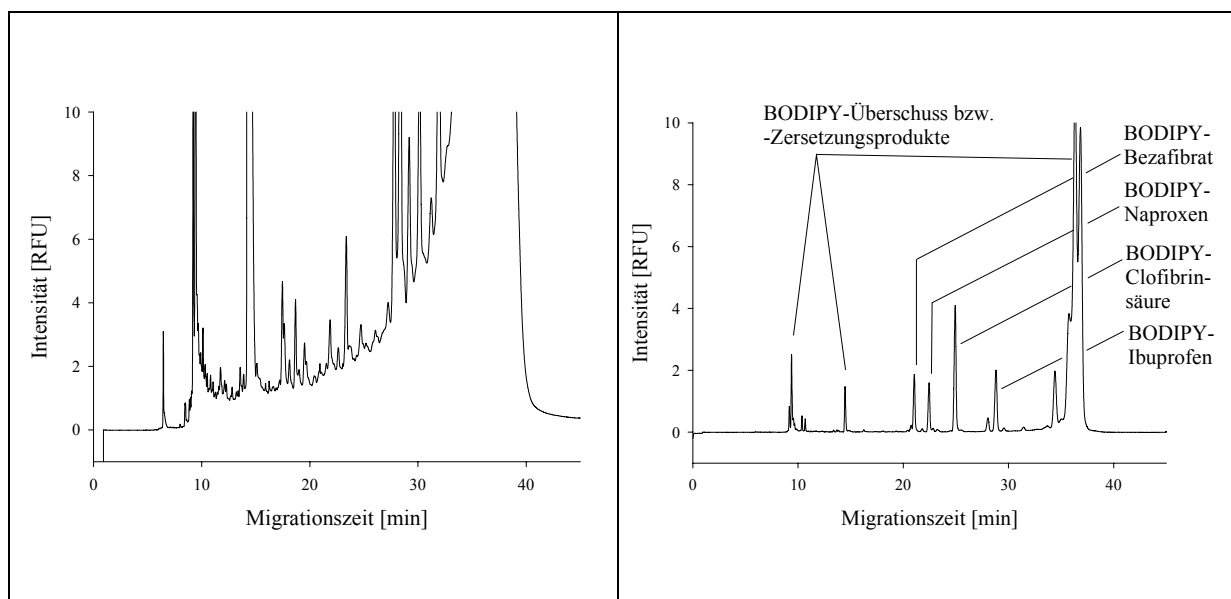


Abbildung 3.20: Derivatisierung nach SPE (links); Standardkontrollprobe mit gleicher Arzneimittelwirkstoffkonzentration (rechts)

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% MeOH in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Hier lag die Überlegung nahe, dass die stark vermehrten Umsetzungs- und/oder Zersetzungsprodukte entweder mit dem bei der SPE verwendeten Elutionsmittel oder mit den Kartuschen in Verbindung zu bringen sind, da auch bei SPE-Blindproben ohne Arzneimittelzusatz in analoger Weise Elektropherogramme erhalten wurden, die eine Vielzahl von zusätzlichen Signalen aufwiesen.

Zur Klärung dieser Effekte wurden umfangreiche Testreihen durchgeführt, aus denen resultierte, dass zum einen störende Substanzen aus dem Kartuschenmaterial eluiert wurden sowie zum anderen Rückstände des Elutionsmittels zu störenden Signalen führten. Daraufhin wurden verschiedenste Elutionsmittel (Methanol, Acetonitril und Isopropanol unterschiedlicher Hersteller) in der Menge des zur Elution verwendeten Lösungsmittels einrotiert und ohne

Arzneimittelwirkstoffzusatz derivatisiert. Auch hier konnten störende Signale festgestellt werden, allerdings waren diese abhängig vom verwendeten Elutionsmittel. Bei Methanol und Isopropanol zeigten sich eine große Anzahl störender Signale, bei Acetonitril hingegen wies die Basislinie der Elektropherogramme nur wenige unerwünschte Signale auf. In Abbildung 3.21 sind beispielhaft die Elektropherogramme von Isopropanol und Acetonitril gezeigt.

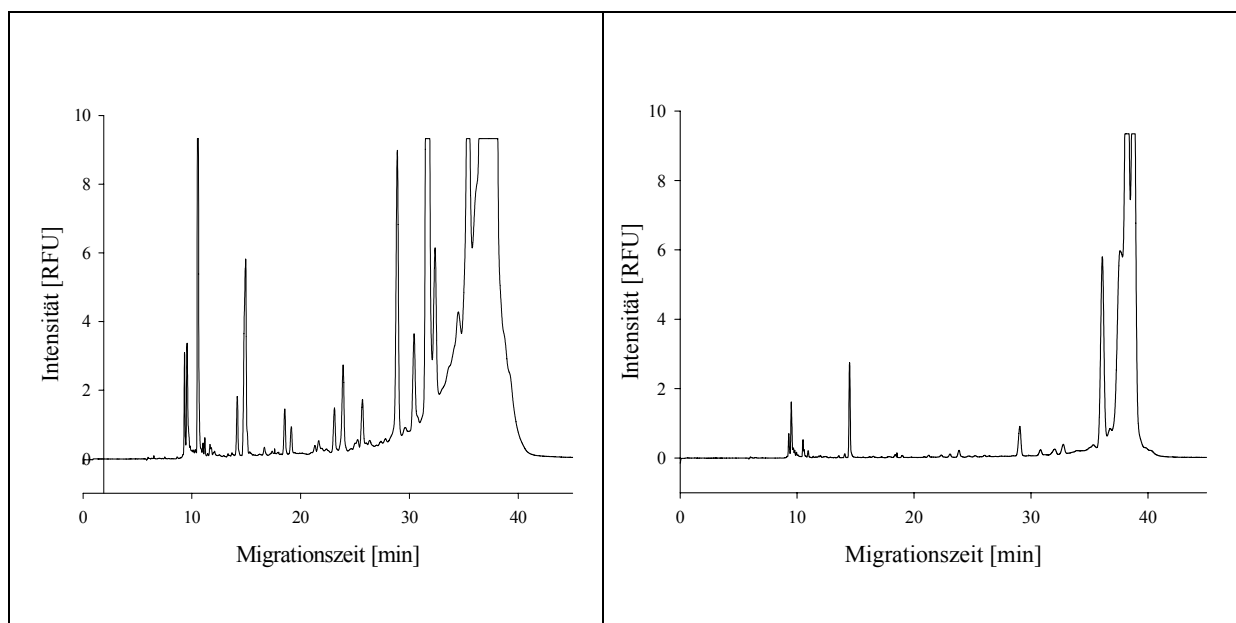


Abbildung 3.21: 3,5 mL Isopropanol HPLC Gradient Grade, Fa. sds; eingedampft und derivatisiert (links); 3,5 mL Acetonitril HPLC Grade, Fa. Acros Organics; eingedampft und derivatisiert (rechts)

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% MeOH in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

So wurden Versuche mit Acetonitril als Elutionsmittel für die absolut Nexus[®]-Kartuschen durchgeführt – aber auch hier wurden ausschließlich nicht auswertbare Elektropherogramme erhalten. Daraufhin wurde der pH-Wert der aufgegebenen Probenlösung sowie die Konditionierung der SPE-Kartuschen variiert, was die Ergebnisse hinsichtlich der Auswertbarkeit der Elektropherogramme weiter verschlechterte. Dies ist beispielhaft in Abbildung 3.22 gezeigt.

Da anhand dieser Versuche sicher nachgewiesen worden war, dass Substanzen aus den Kartuschen eluiert worden sind, wurde untersucht, ob dies auch bei Kartuschen anderer Hersteller der Fall ist. Hierzu wurden eine C18-Phase der Firma Varian (Bond Elut C18) und ein

Ionenaustauscher der Firma Waters (OASIS MAX 3cc) eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass auch bei diesen Kartuschen Sorbensmaterial eluiert wurde und somit keine auswertbaren Elektropherogramme erhalten werden konnten.

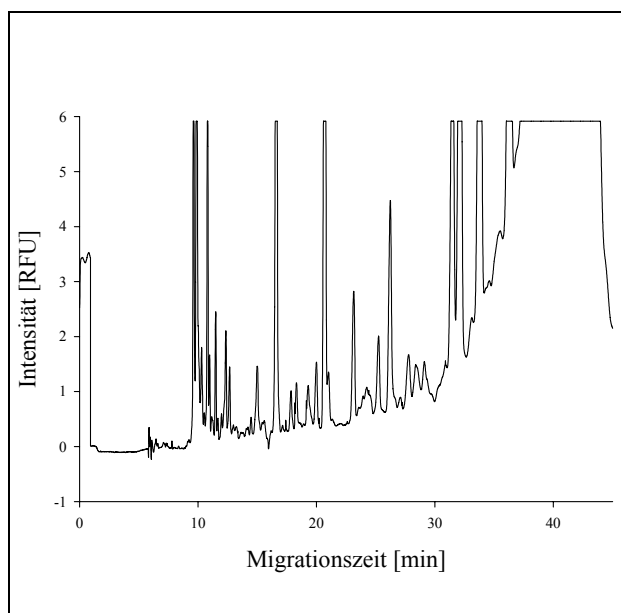


Abbildung 3.22: 3,5 mL Acetonitril über mehrfach konditionierte absolut Nexus[®]-Kartusche gegeben (keine Probenlösung), eingedampft und derivatisiert

Trennelektrolyt: 20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% MeOH in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0; Trennungsspannung: 20 kV; Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)

Zusätzlich wurden die für das Eindampfen des Lösungsmittels verwendeten Eppendorf-Caps ausgetauscht, aber auch diese Maßnahme blieb erfolglos. Auch zeigten Tests, dass es sich bei den beobachteten Signalen nicht um native Fluoreszenz, sondern um Zersetzungs- oder weitere Umsetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers handelte.

Da nun abzusehen war, dass die Anreicherung mit anschließender Derivatisierung der gewünschten Substanzen mit den Möglichkeiten der SPE nicht durchführbar ist, wurden andere Anreicherungsverfahren getestet.

Zunächst wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion getestet; hierzu wurden sowohl Realproben (dotiert und undotiert) als auch Standardproben (dotiertes Reinstwasser) sauer gestellt (pH = 2,0) und dreimal mit je 10 mL Diethylether respektive Toluol extrahiert, der dann unter Stickstoff zur Trockne abgeblasen wurde. Der Rückstand wurde in HEPES-Puffer aufge-

nommen und nach der in Tabelle 3.14 angegebenen optimierten Derivatisierungsmethode im Zweiphasen-System mit dem Fluoreszenzmarker umgesetzt und anschließend mittels CE analysiert. In dem erhaltenen Elektropherogramm ließen sich keine Umsetzungsprodukte nachweisen. Ebenso wurde der Rückstand nach Aufnahme in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch mit der HPLC im UV-Bereich bei 195 nm vermessen, um die extrahierte Menge an Arzneimittelwirkstoffen direkt zu bestimmen. Hier wurde deutlich, dass nur eine sehr geringe Wirkstoffmengen extrahiert worden sind. Vermutlich reicht die Lipophilie der Säuren nicht aus, um in so geringen Mengen quantifizierbar in die organische Phase extrahiert werden zu können, wie schon in Kapitel 3.1 vermutet worden war.

Um das gewünschte Nachweisvermögen letztlich doch noch erreichen zu können, wurde versucht, eine Fast-HPLC-Säule für die Anreicherung zu verwenden. Mit Hilfe einer HPLC-Säule Platinum Rocket (RP-18; 50 x 7 mm; 3 µm) der Firma Alltech sollten die Arzneimittelwirkstoffe adsorbiert und anschließend mit einem polaren Lösungsmittel eluiert werden. Hierzu wurden die gleichen Standardlösungen wie für die Etherextraktion hergestellt und sowohl Acetonitril als auch Methanol als Elutionsmittel getestet. Die zur Trockne eingedampften Eluate wurden nach der in Tabelle 3.14 angegebenen Derivatisierungsmethode umgesetzt. Im Elektropherogramm zeigten sich ebenfalls durch den Fluoreszenzmarker bedingte zusätzliche Zersetzungs- oder Umsetzungsprodukte, die eine LIF-Detektion der markierten Arzneimittelwirkstoffe unmöglich machten.

Nach diesen Versuchen wurden die Experimente zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe nach einer Probenanreicherung beendet.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass eine Kopplung des Nachweises der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe mit den untersuchten Anreicherungsverfahren nicht möglich ist. Da der Fluoreszenzmarker unter den Reaktionsbedingungen nicht ausreichend stabil ist, gäbe es außer einem Wechsel des Fluoreszenzmarkers keine weitere Möglichkeit für einen erfolgreichen Nachweis von fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffen im Spurenbereich. Dies war aus Zeitgründen allerdings nicht möglich. Eine weitere Methode wäre die Änderung der Detektionsmethode. Hier würde sich aufgrund der gewonnenen Erfahrungen eine Methode anbieten, bei der keine Fluoreszenzderivatisierung für den Nachweis notwendig ist. Eine Möglichkeit wäre somit die massenspektrometrische Detektion nach einer chromatographischen Trennung. Da durch die komplexe Zusammensetzung von Gewässerproben die Trennleistung der HPLC oftmals nicht ausreichend ist, sollte als neue Analysenmethode die

comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie für den Nachweis der Arzneimittelwirkstoffe in Gewässerproben untersucht werden.

3.5 Einsatz der comprehensiven zweidimensionalen Gaschromatographie

Die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion ist ein Verfahren, welches neben der HPLC am häufigsten für den Nachweis von Arzneimittelwirkstoffen oder Insektiziden in Gewässerproben eingesetzt wird [108, 177]. Die massenspektrometrische Detektion ist besonders geeignet für die Rückstandsanalytik, da sie – kombiniert mit HPLC oder GC – ein leistungsfähiges Verfahren zur Identifizierung von Substanzen sowie zur Absicherung von Analysendaten in komplexen Gemischen darstellt. Allerdings ist aufgrund der komplexen Matrix der Wasserproben die Auftrennung bei eindimensionaler Gaschromatographie nicht ausreichend, so dass die Massenspektren der zu bestimmenden Substanzen häufig durch Matrixbestandteile überlagert sind. Die in der Literatur beschriebenen Messungen werden häufig im single-ion-mode durchgeführt. Dies erhöht zwar die Empfindlichkeit, schränkt aber die Selektivität des Nachweises ein.

Neben der eindimensionalen Gaschromatographie hat in den letzten Jahren auch die comprehensive zweidimensionale Gaschromatographie (GCxGC) Einzug in die Analytik gehalten. Diese Analysetechnik ist für komplexe Probengemische prädestiniert, da sie den Vorteil der orthogonalen Probenauftrennung bietet. Mit ihrer Hilfe kann ein Mehrfaches der Peakkapazitäten der eindimensionalen GC erlangt werden. Durch die zweidimensionale Auftrennung der Probe sowie durch die Kopplung mit der flugzeitmassenspektrometrischen Detektion (TOFMS) sind Störungen durch die Matrix weitgehend auszuschließen. Somit sollte eine parallele Bestimmung der nachzuweisenden Stoffe durchführbar sein. Diese Analysenmethode konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich zum Nachweis und zur Bestimmung der Arzneimittelwirkstoffe in Oberflächenwässern und Kläranlagenabläufen eingesetzt werden.

Die gaschromatographischen Messungen in dieser Arbeit wurden mit einem GCxGC-TOFMS durchgeführt, welches mit einem 4-Jet-Modulator und einem zweiten Ofen ausgerüstet ist (Abbildung 3.23). Der Modulator besitzt jeweils zwei Kühl- (Cold Jets) und zwei Heizdüsen (Hot Jets), die das schnelle Abkühlen bzw. Aufheizen der einzelnen Eluatfraktionen aus der ersten Säule gewährleisten. Der zusätzliche Ofen, in dem sich die zweite Säule befindet, ist innerhalb des ersten Ofens angebracht und auf eine etwas höhere Temperatur gesetzt. Diese

Temperaturdifferenz leistet einen Beitrag zur hohen Auftrennungsgeschwindigkeit in der zweiten Dimension.

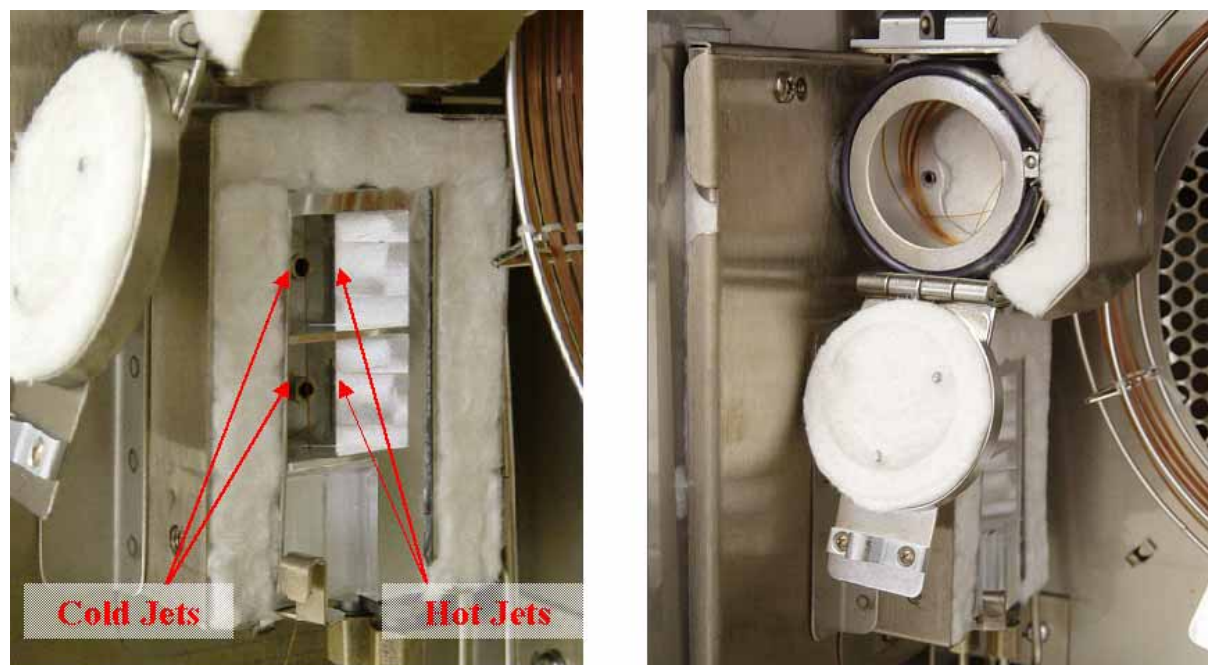


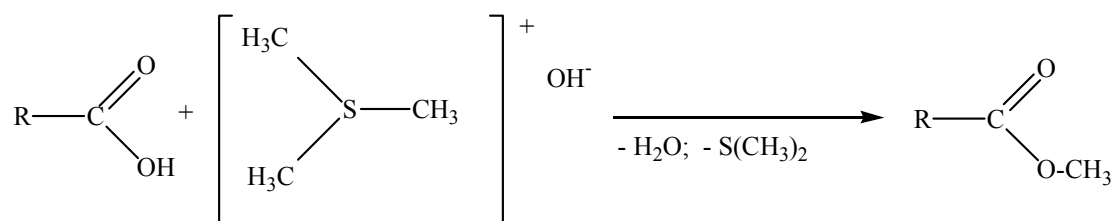
Abbildung 3.23: Modulator (links) und zweiter Ofen (rechts)

3.5.1 Derivatisierung der Arzneimittelwirkstoffe

Für eine gaschromatographische Bestimmung muss der Analyt entweder gasförmig vorliegen oder unzersetzt verdampfbar sein. Polare Verbindungen weisen meist hohe Siedepunkte auf und sind somit nicht leicht verdampfbar. Zu diesen polaren Verbindungen gehören auch die zu untersuchenden Arzneimittelwirkstoffe. Diese müssen daher mittels einer entsprechenden Derivatisierungsreaktion in weniger polare und damit auch flüchtigere Verbindungen überführt werden. Für Carbonsäuren kommen als Derivatisierungsreaktionen Alkylierungs- oder Silylierungsreaktionen in Betracht. In der Literatur sind für die Methylierung Umsetzungen mit Diazomethan [11, 108, 113] oder Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) [111, 178, 179] beschrieben worden. So eignet sich TMSH zur Methylierung verschiedener carboxylgruppenhaltiger Herbizide [180]. Pentafluorobenzylbromid (PFBBr) ist bereits zur Veresterung von einigen der in dieser Arbeit untersuchten Arzneimittelwirkstoffe eingesetzt worden [13, 35,

40, 181]. Da die Umsetzung mit PFBBBr allerdings zeitraubend ist und drastische Bedingungen erfordert [15, 181], wurde dieses Reagenz nicht eingesetzt. Silylierungsreaktionen können beispielsweise mit Hilfe von N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA) [10] oder N-(t-Butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) [14, 182] durchgeführt werden. Die Silylierung mit MSTFA ist für einige der für diese Arbeit ausgewählten Arzneimittelwirkstoffe gezeigt worden [10, 118]. Allerdings haben *PREUSS et al.* beschrieben, dass Bezafibrat mit MSTFA nicht umgesetzt wird [109]. Somit scheint dieses Reagenz eher ungeeignet zu sein. Diazomethan ist explosiv und besitzt allergenes Potential [183], daher wurde von der Verwendung dieser Substanz Abstand genommen. Aus diesen Überlegungen heraus wurden die zu derivatisierenden Stoffe mit TMSH umgesetzt. Diese Reaktion erfordert nur die Reagenzzugabe. Die Entfernung des Überschusses an TMSH ist nicht notwendig, da dieser im Injektor des Gaschromatographen ab 250°C zu leicht flüchtigem Methanol und Dimethylsulfid pyrolysiert wird und so die Analyse nicht stört [184]. Die Derivatisierungsreaktion (Veresterung) läuft entsprechend der in Abbildung 3.24 gezeigten Reaktionsgleichung a) ab.

a) Umsetzung zum Methyleneester



b) Pyrolyse zu Methanol und Dimethylsulfid

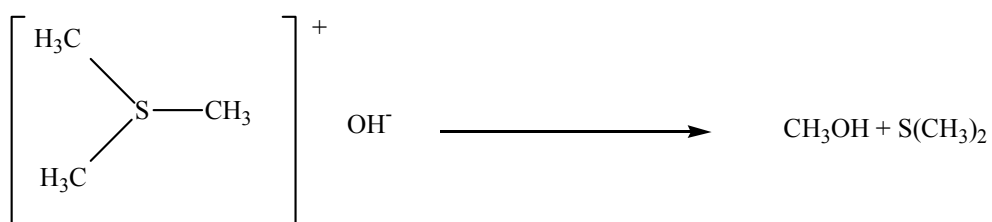


Abbildung 3.24: Reaktionsgleichungen für die Derivatisierung von Carbonsäuren mit TMSH

Die Umsetzung mit TMSH gelang bei Raumtemperatur in Methanol für alle nachzuweisenden Arzneimittelwirkstoffe. Die Substanzen Naproxen, Ibuprofen und Gemfibrozil, die derivatisiert keine bzw. nur sehr kleine Signale zeigten, konnten nun detektiert werden.

3.5.1.1 Detektion der Wirkstoffderivate

Die Detektion erfolgt nach Elektronenstoßionisation (EI-positiv) mit 70 eV im fullscan-Modus. Bei dieser Art der Ionisation entsteht durch Entfernen eines Elektrons aus dem neutralen Molekül zunächst das Radikalkation $[M^{\cdot+}]$. Bei der Wechselwirkung von Molekülen mit energiereichen Elektronen wird jedoch mehr Energie übertragen, als für die bloße Ionisation erforderlich ist. Durch diese zusätzliche Energie, die in dem Molekülion enthalten ist, werden Fragmentierungsvorgänge induziert, bei denen positiv geladene Tochterionen entstehen. Somit werden häufiger Fragment- und seltener Molekülionen detektiert. Für die quantitative Auswertung wurden demzufolge charakteristische Fragmente der Arzneimittelwirkstoffderivate ausgewählt. Die Retentionszeiten der untersuchten Stoffe sowie die zur Quantifizierung ausgewählten Fragmentmassen wurden anhand von Standards ermittelt und finden sich im Anhang (Kapitel 6.2 und 6.3; Tabellen 6.1 und 6.2). Die entsprechenden MS-Spektren sind ebenfalls im Anhang dargestellt (Kapitel 6.1.3; Abbildungen 6.6 bis 6.12).

Bei der gaschromatographischen Trennung zeigte sich, dass Bezafibrat erst sehr spät den Detektor erreicht und aufgrund des zu dieser Zeit bereits starken Säulenblutens nur sehr schlecht detektierbar ist. Da die Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen aus Zeitgründen nicht möglich war, wurde in Kauf genommen, dass diese Substanz nur in hohen Konzentrationen detektiert werden kann und somit wahrscheinlich in Realproben nicht nachweisbar ist. Das Chromatogramm einer Standardprobe ist in Abbildung 3.25 gezeigt.

3.5.1.2 Einfluss des Lösungsmittels auf die Signalgröße

Die Arzneimittelwirkstoffe wurden sowohl in Methanol als auch in Aceton gelöst und nach der Derivatisierung mit TMSH in den Gaschromatographen injiziert, um eventuelle Unterschiede in der Derivatisierungsausbeute feststellen zu können. Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von Aceton als Lösungsmittel für die Substanz Diclofenac im Vergleich zu Methanol ein um etwa 30% größeres Signal erhalten werden konnte. Somit scheint die Umsetzung von Diclofenac in Aceton vollständiger abzulaufen als in Methanol. Dies steht im Wi-

derspruch zu Arbeiten von *SYHRE et al.*, in denen über eine maximale Reaktionsausbeute mit Methanol als Lösungsmittel berichtet wurde [184]. Bei den übrigen Wirkstoffen hatte das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Signalflächen. Da Aceton allerdings sehr leicht flüchtig ist, kann bereits beim Pipettieren durch Verdunsten des Lösungsmittels eine Aufkonzentrierung der Probe stattfinden, was die Messwerte verfälschen würde. Um mögliche Fehlerquellen zu minimieren, wurde trotz der etwas schlechteren Reaktionsausbeute für Diclofenac in den weiteren Versuchen Methanol als Lösungsmittel eingesetzt.

3.5.1.3 Einfluss der TMSH-Menge auf die Signalgröße

Um den Einfluss der Menge an Derivatisierungsreagenz auf die Reaktionsausbeute zu untersuchen, wurden Experimente mit Arzneimittelstandardlösungen ($c = 0,5 \mu\text{mol/L}$ in Methanol) durchgeführt, denen unterschiedliche Mengen (10, 50 und 100 μL) an methanolischer TMSH-Lösung ($c = 0,25 \text{ mmol/L}$) zugesetzt worden waren.

Bei einem eingesetzten TMSH-Volumen von 10 μL zeigten sich für alle Wirkstoffsubstanzen geringere Signalgrößen als bei 50 und 100 μL . Die bei der Verwendung von 50 und 100 μL TMSH-Lösung erhaltenen Signalgrößen waren nahezu identisch.

Die im ersten Experiment zugegebenen 10 μL Derivatisierungsreagenz entsprachen etwa einem etwa 50-fachen molaren Überschuss. Dieser Überschuss reicht dementsprechend nicht für eine quantitative Methylierung der Arzneimittelwirkstoffe aus. Bei der Verwendung von 50 bzw. 100 μL betrug der molare Überschuss etwa 250 respektive 500. Da bei diesen Experimenten annähernd gleiche Signalhöhen erhalten wurden, scheint hier eine Sättigung der Umsatzrate erreicht zu sein.

Die eingesetzte Menge an Derivatisierungsreagenz stimmt mit der in der Literatur zu findenden Angaben überein. So verwendeten *ZWIENER et al.* ebenfalls 50 μL TMSH-Lösung ($c = 0,25 \text{ mmol/L}$) für den Nachweis von Ibuprofen in der aquatischen Umwelt [178]. In dieser Literatur sind allerdings keine Aussagen über stöchiometrische Verhältnisse zu finden. *SYHRE et al.* berichteten, dass ein 150- bis 800-facher molarer Überschuss an TMSH ausreichend ist [184]. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit ermittelten Überschussmengen überein. Allerdings wird die Umsetzung in der angegebenen Literatur bei einer Temperatur von 90 °C und 30 min Reaktionszeit durchgeführt. Eine Erhöhung der Temperatur hat im Allgemeinen eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge. Daher wäre eine Reaktionsführung

bei erhöhter Temperatur durchaus wünschenswert. Bedauerlicherweise lässt sich diese Arbeitsweise nicht auf die Arzneimittelwirkstoffe übertragen, da diese sich bei Temperaturen oberhalb von 50 °C teilweise zersetzen.

Somit wurde das für die weiteren Experimente eingesetzte Volumen an Derivatisierungsreagenz auf 50 µL festgelegt und die Veresterung bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.5.2 Probenanreicherung

Zur Aufkonzentrierung der Arzneimittelwirkstoffe für die Analyse mittels GCxGC-TOFMS wurde zunächst eine Anreicherungsmethode erarbeitet, die auf der Alltech Platinum Rocket HPLC-Säule basierte, wie sie bereits in Kapitel 3.1.2.3 für die UV-Detektion beschrieben worden ist. Allerdings stellte sich bei der Analyse stark verdünnter Standardlösungen mittels GCxGC-TOFMS heraus, dass die Signalflächen von Probe zu Probe größer wurden, was auf Memoryeffekte hinwies. Eine Überprüfung des GCxGC-TOFMS zeigte, dass das Problem nicht auf das Gerät zurückzuführen war (z.B. durch unvollständige Probenverdampfung). Sondern es zeigte sich, dass die Analyten nicht vollständig von der Fast-HPLC-Säule eluiert wurden, was zuvor bei der UV-Detektion mittels CZE aufgrund der höheren Konzentration nicht feststellbar war. Da dieses Problem auch nicht durch die Verwendung anderer Elutionsmittel und Spülschritte behoben werden konnte, wurde diese Art der Probenanreicherung für die geplante Spurenanalytik als nicht brauchbar verworfen.

Das Aufkonzentrieren der Analyten erfolgte daraufhin mittels Festphasenextraktion. Hierzu wurden mit 1 g modifiziertem Kieselgel gefüllte Bond Elut C18-Kartuschen (Varian, Darmstadt) eingesetzt. Die Detektion von Konzentrationen bis 143 µM erfolgte - wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben - mittels CZE im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 195 nm.

Um auch hier die Übertragbarkeit auf die im Oberflächenwasser zu erwartenden Arzneimittelkonzentrationen zu gewährleisten, wurden weitere Versuche mit geringeren Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt, die nicht mehr mittels UV-Messung bestimmt werden können. Da die zu entwickelnde Methode sowohl auf Oberflächenwasser als auch auf den Ablauf von Kläranlagen anwendbar sein sollte, wurden für unterschiedliche Probenvolumina die Wiederfindungsraten ermittelt. Da die zu erwartenden Konzentrationen der Wirkstoffe im Oberflächenwasser geringer sind, wurde hier ein Volumen von 250 mL angereichert, für den Kläran-

lagenablauf hingegen nur ein Volumen von 100 mL. Die Wiederfindungsraten dieser Anreicherungsexperimente wurden mittels GCxGC-TOFMS überprüft. Hierzu wurden sowohl 100 als auch 250 mL Milliporewasser (pH 2,0) mit Wirkstoffstandardlösung gespikt, so dass die Konzentration 0,2 µg/L je Arzneimittelwirkstoff betrug. Für die Elution wurde Methanol verwendet, das Eluat wurde mittels Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedampft. Die Vorgehensweise ist im Anhang beschrieben (Kapitel 5.2). Die Messung erfolgte nach Aufnahme des Rückstands in Methanol und Zugabe von TMSH-Lösung. Als interner Standard (I.S.) diente 2,4-Dichlorbenzoesäure (2,4-DBS).

Die Wiederfindungsraten für die beiden Probevolumina wurden durch Messungen von jeweils drei Einzelproben bestimmt; diese sind mit den entsprechenden Standardabweichungen in Tabelle 3.18 wiedergegeben.

Arzneimittel- wirkstoff	Wiederfindung [%] 100 mL Probe	Standardab- weichung	Wiederfindung [%] 250 mL Probe	Standardab- weichung
Indometacin	107	2,1	92	2,4
Clofibrinsäure	96	7,1	102	6,8
Ibuprofen	136	1,9	75	8,7
Gemfibrozil	78	5,0	74	8,9
Naproxen	94	1,4	113	6,0
Diclofenac	104	2,8	98	0,8

Tabelle 3.18: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mittels GCxGC-TOFMS

Die Wiederfindungsraten sowie die Standardabweichungen liegen in einem akzeptablen Bereich. Anhand dieser Werte zeigt sich, dass die eingesetzten Bond Elut C18-Kartuschen gut geeignet sind, um aus den eingesetzten Probenvolumina die zu analysierenden Arzneimittelwirkstoffe auch in geringen Konzentrationen nahezu quantitativ zu extrahieren.

3.5.3 Analyse einer Arzneimittelstandardmischung

Als Standardmischung wurde eine methanolische Lösung der Arzneimittelwirkstoffe analysiert. Die eingestellte Konzentration von ca. 600 µg/L entsprach in etwa der, die für Realproben (nach SPE-Anreicherung) typisch ist [1, 23, 185]. Nach Zugabe von TMSH wurde die Probe mittels GCxGC-TOFMS analysiert. Abbildung 3.25 zeigt das erhaltene zweidimensio-

nale (2D) Gaschromatogramm, das auf den für die Quantifizierung ausgewählten Fragmentmassen beruht. In der Darstellung sind die Retentionszeiten der 1. und 2. Dimension angegeben.

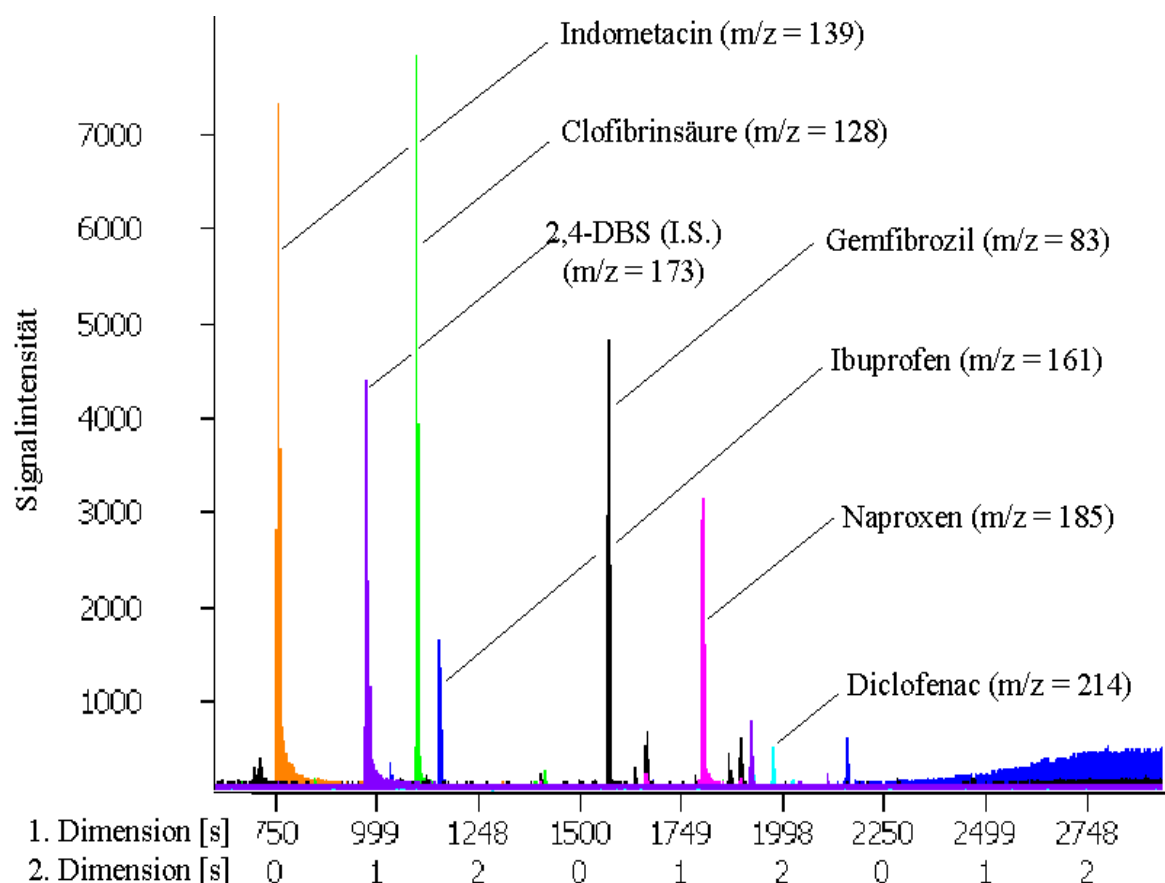


Abbildung 3.25: 2D-Gaschromatogramm einer Standardmischung der Arzneimittelwirkstoffe (nachgewiesen als Methylester)

Die unterschiedlichen Signalhöhen hängen hauptsächlich von zwei Einflussfaktoren ab: zum einen ist die Derivatisierungsausbeute essentiell, und zum anderen ist es von Bedeutung, wie stark der Analyt durch die Elektronenstoß-Ionisation fragmentiert wird. So reagiert beispielsweise Diclofenac nicht sehr gut mit TMSH, wie Vergleichsmessungen von underivatisiertem mit derivatisiertem Wirkstoff zeigten. Zusätzlich wird Diclofenac stark fragmentiert (vgl. Anhang, Kapitel 6.1.3) und liefert daher viele kleine Signale für die einzelnen Fragmentionen. Indometacin hingegen zeigt nur zwei Fragmentmassen und kann daher in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden als Diclofenac (vgl. Kapitel 3.5.6).

3.5.4 Analyse eines Kläranlagenablaufs

Für die Quantifizierung in der GC/MS werden unterschiedliche Verfahren angewandt. So kann die Quantifizierung mit Hilfe eines externen Standards, eines internen Standards oder durch das Standardadditionsverfahren vorgenommen werden [186]. Bei der externen Kalibrierung werden die gemessenen Daten über eine vorher aufgenommene Kalibrierfunktion ausgewertet. Bei dieser Art der Auswertung können durch Untergrundrauschen und Volumenfehler Standardabweichungen von 5 - 10% auftreten [186]. Durch die Verwendung eines internen Standards, der jeder Analysenprobe in gleicher Konzentration zugegeben wird, werden diese Effekte verringert. Als interner Standard wurde den Probenlösungen 2,4-Dichlorbenzoesäure zugesetzt.

Eine weitere Möglichkeit der quantitativen Auswertung ist die Isotopenverdünnungsanalyse (IVA). Hier werden den Lösungen isotopenmarkierte Standards zugesetzt, und über das Verhältnis von markierter zu nichtmarkierter Substanz kann eine sichere Quantifizierung vorgenommen werden. Die Anwendung der IVA ist in dieser Arbeit nicht möglich gewesen, da die zu untersuchenden Arzneimittelwirkstoffe nicht als deuterierte Standards erhältlich sind. Daher wurde zur Quantifizierung das Standardadditionsverfahren gewählt.

Bei der massenspektrometrischen Detektion konnte für die einzelnen Substanzen das gesamte Spektrum beobachtet und zur Absicherung der Identität herangezogen werden; das jeweilige Hauptfragment wurde zur quantitativen Bestimmung verwendet. In den Darstellungen ist der Übersichtlichkeit halber nur die für die Quantifizierung eingesetzte Ionenspur gezeigt.

In der Probe des Kläranlagenablaufs konnten sechs der ausgewählten Arzneimittelwirkstoffe nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte sowohl anhand der beiden Retentionszeiten als auch mit Hilfe der Massenspektren. Quantifizierbar waren die Substanzen Diclofenac, Gemfibrozil, Ibuprofen, Indometacin und Naproxen. Clofibrinsäure konnte zwar detektiert werden, aber die Signalfläche der undotierten Probe lag unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Quantifizierung war demnach nicht möglich. Bezafibrat ließ sich aufgrund des hohen Untergrundrauschens, welches durch das Säulenbluten verursacht wurde, nicht nachweisen. Die mittels Standardaddition erhaltenen Regressionsgeraden der quantifizierbaren Wirkstoffe finden sich im Anhang (Kapitel 6.4). Die Bestimmtheitsmaße (R^2) für die Regressionsgeraden lagen zwischen 0,9659 und 0,9992.

Zur Bestimmung der Arzneimittelbelastung im Ablauf der Versuchskläranlage in Neuss wurden Proben vom 03.05.2005 untersucht. Um chemischen und mikrobiologischen Veränderungen vorzubeugen, wurde die Probe bei + 4 °C gelagert und innerhalb von zwei Tagen analysiert. Zur Abtrennung von Schwebstoffen erfolgte eine Filtration. Für die Anreicherung der Proben wurde der pH-Wert auf 2,0 eingestellt und jeweils 100 mL über die Bond Elut C18-Kartuschen gegeben. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 5.2 beschrieben. Da die höchste gespikete Konzentration zirka das Doppelte der erwarteten Konzentration der Realprobe sein sollte [187], wurden drei Aufstockungen mit Volumina von 20, 40 und 60 µL einer Arzneimittelwirkstoffstammlösung in Methanol ($c = 2 \text{ mg/L}$) durchgeführt. Diese Lösungen wurden den methanolischen Eluatlen der SPE zugesetzt, dann wurden die Mischungen zur Trockne eingedampft. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte mit Methanol, welches den internen Standard (2,4-DBS) enthielt. Anschließend erfolgte die Zugabe der TMSH-Lösung. Das Gesamtvolumen der Proben betrug jeweils 100 µL. Daraufhin wurden die Proben mittels GCxGC-TOFMS analysiert. Für jeden Arzneimittelwirkstoff wurden somit vier Messpunkte erhalten. Es wurden jeweils Einfachmessungen der einzelnen Proben durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Kläranlagenablaufs unter Berücksichtigung der ermittelten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 3.19 zusammengestellt. Die dort angegebenen Abweichungen beziehen sich auf die Standardabweichungen der SPE-Analysen (vgl. Tabelle 3.18).

Die für den Kläranlagenablauf ermittelten Analytkonzentrationen liegen im Bereich von Literaturdaten. Der Nachweis konnte durch die zweidimensionale Auftrennung deutlich vereinfacht werden; eine eindimensionale Analyse hätte zu vielen Signalüberlappungen und zu den damit verbundenen Problemen bei der exakten Flächenbestimmung geführt. So wird in der Literatur von einer gaschromatographischen Bestimmung berichtet, bei der nach der Messung eine Untergrundsubtraktion notwendig war [183]. Dies kann mit Fehlern behaftet sein. Zudem ist eine sichere Zuordnung der Messsignale zu den entsprechenden Analyten aufgrund der beiden bekannten Retentionszeiten und des Massenspektrums möglich. Der Vorteil der GCxGC als Analysenmethode für komplexe Proben - wie in diesem Fall ein Kläranlagenablauf - konnte so gezeigt werden. Zudem ist interessant, dass der in vielen Literaturstellen beschriebene quantitative Nachweis des Lipidsenker-Metaboliten Clofibrinsäure in dieser Arbeit nicht gelang. Da diese Substanz als nahezu ubiquitär gilt, wurde mit einer Detektion in nicht

unerheblicher Konzentration gerechnet. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Ergebnissen zum Teil um falsch positive Nachweise handelt.

Arzneimittelwirkstoff	Ermittelte Konzentration
Clofibrinsäure	nachweisbar, aber nicht quantifizierbar
Diclofenac	1,4 ± 0,04 nmol/L (entspricht 413 ± 12 ng/L)
Gemfibrozil	0,2 ± 0,008 nmol/L (entspricht 40 ± 2 ng/L)
Ibuprofen	2,3 ± 0,04 nmol/L (entspricht 474 ± 9 ng/L)
Indometacin	0,6 ± 0,01 nmol/L (entspricht 206 ± 4 ng/L)
Naproxen	2,2 ± 0,03 nmol/L (entspricht 525 ± 7 ng/L)

Tabelle 3.19: Im Kläranlagenablauf ermittelte Wirkstoffkonzentrationen (Versuchskläranlage Neuss, 03.05.2005), GCxGC-TOFMS-Analyse

Die Abbildungen 3.26 bis 3.28 zeigen zweidimensionale Gaschromatogramme von einer angereicherten, aber nicht aufgestockten Probe des Kläranlagenablaufes. Anhand der Chromatogramme des Totalionenstroms (TIC) (Abbildung 3.26) und der ausgewählten Fragmentmassen (Abbildung 3.27) ist die Komplexität der Probenmatrix deutlich zu sehen. Im Vergleich mit den für die Quantifizierung ausgewählten Fragmenten zeigt sich, dass die Signalintensität des TIC etwa um den Faktor 250 größer ist. Da die zu untersuchenden Arzneimittelwirkstoffe im Untergrund des TIC zu finden sind, ist die massenspektrometrische Analyse in Verbindung mit einer eindimensionalen gaschromatographischen Probenauftrennung nur schwer durchführbar.

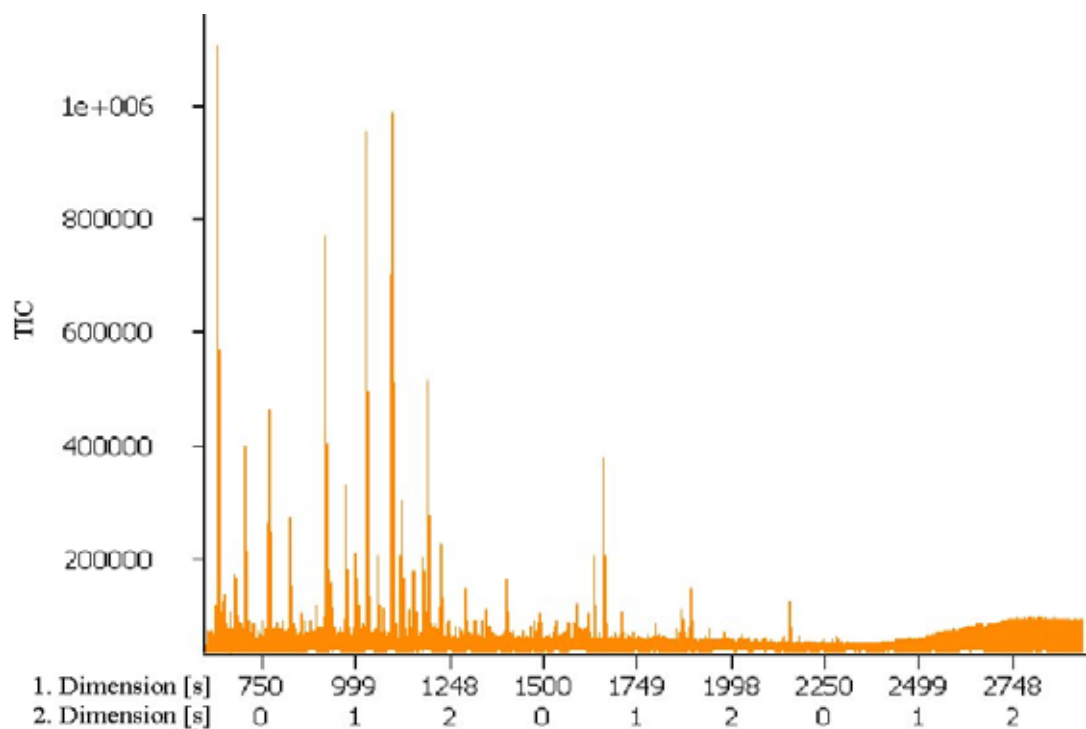


Abbildung 3.26: 2D-Gaschromatogramm (TIC) des Kläranlagenablaufs der Versuchskläranlage Neuss vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18)

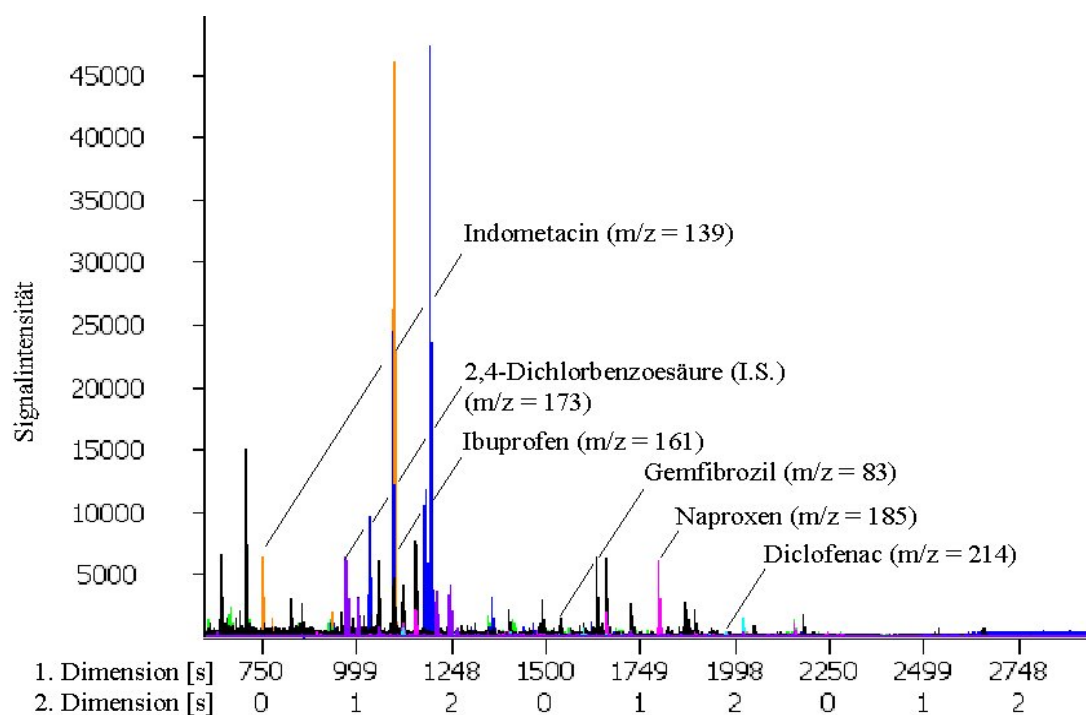


Abbildung 3.27: 2D-Gaschromatogramm der ausgewählten Massenfragmente des Kläranlagenablaufs der Versuchskläranlage Neuss vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18)

Die nachgewiesenen Wirkstoffe sind in den Abbildungen 3.27 und 3.28 in unterschiedlicher Art und Weise dargestellt. Abbildung 3.27 zeigt wie bereits erwähnt die ausgewählten Fragmentmassen mit der Zuordnung zu den entsprechenden Wirkstoffen. In Abbildung 3.28 ist dagegen die zweidimensionale Auftrennung mit den entsprechenden Retentionszeiten der beiden Dimensionen zu sehen. In dieser Darstellung sind nicht alle Spots der Wirkstoffderivate gut erkennbar, da deren Intensität teilweise sehr gering ist. Bei entsprechender Vergrößerung können diese Spots sichtbar gemacht werden; sie sind dann allerdings nicht mehr in einem Übersichtschromatogramm darstellbar. Auch bei dieser Abbildung lässt sich die komplexe Probenmatrix sehr gut erkennen, und es wird deutlich, dass viele Substanzen nur durch die zusätzliche Auftrennung in der zweiten Dimension voneinander getrennt werden können.

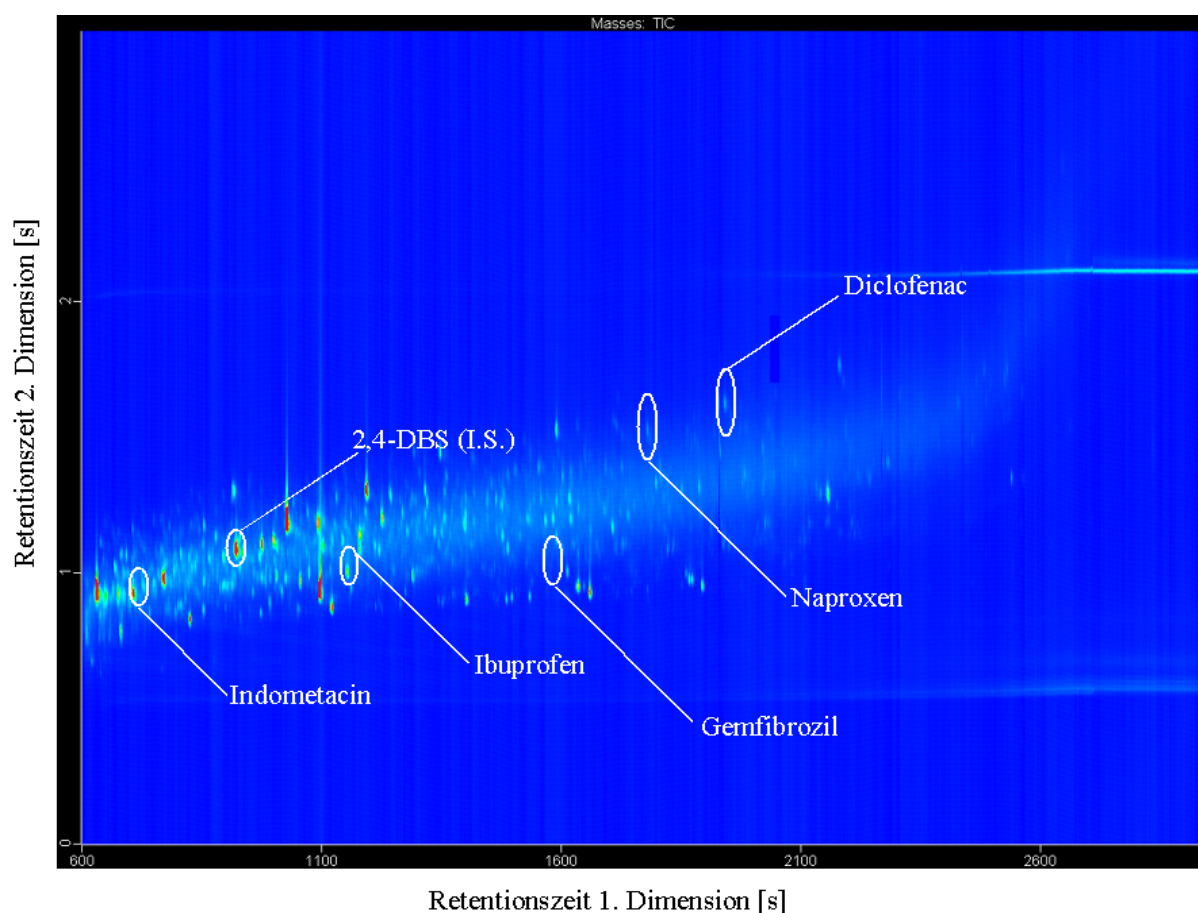


Abbildung 3.28: 2D-Gaschromatogramm (Contour Plot) des Kläranlagenablaufs der Versuchskläranlage Neuss vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18).

Signalintensität: blau (geringe Intensität) nach grün zu gelb zu rot (hohe Intensität)

3.5.5 Analyse von Oberflächenwasser

Das Vorkommen der Arzneimittelwirkstoffe im Oberflächenwasser wurde am Beispiel von Rheinwasser (km 732,2; beprobt am 03.05.2005) untersucht. In dieser Probe konnten fünf der ausgewählten Wirkstoffe nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte – wie bereits bei der Analyse des Kläranlagenablaufs beschrieben – anhand der beiden Retentionszeiten und der entsprechenden vollständigen Massenspektren. Von den detektierten Wirkstoffen waren allerdings nur Indometacin und Naproxen quantifizierbar. Gemfibrozil, Ibuprofen und Clofibrinsäure konnten zwar nachgewiesen werden, aber die Signalflächen der undotierten Probe lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Quantifizierung war demnach nicht möglich. Bezafibrat und Diclofenac konnten nicht gefunden werden. Die mittels Standardaddition erhaltenen Regressionsgeraden sind im Anhang (Kapitel 6.4) dargestellt. Die Bestimmtheitsmaße der Regressionsgeraden lagen bei 0,9944 für Indometacin und 0,9992 für Naproxen.

Die zu untersuchenden Rheinwasserproben wurden ebenfalls bei + 4 °C gelagert. Die Bestimmung der Arzneimittelwirkstoffe erfolgte mittels internem Standard (2,4-DBS) und Standardadditionsverfahren. Bei diesen Proben wurden - nach Filtration und Einstellung des pH-Wertes auf 2,0 – jeweils 250 mL Rheinwasser mit Hilfe der Bond Elut C18-Kartuschen angereichert. Die genaue Vorgehensweise für die Festphasenextraktion ist in Kapitel 5.2 beschrieben. Anschließend erfolgte die Dotierung der methanolischen Eluate mit 10, 20 und 40 µL Arzneimittelstammlösung ($c = 2 \text{ mg/L}$), dann wurden die Lösungen zur Trockne eingedampft. Da im Oberflächenwasser geringere Arzneimittelwirkstoffkonzentrationen als im Kläranlagenablauf zu erwarten waren, wurden die Proben mit geringeren Volumina dotiert (vgl. Kapitel 3.5.4). Der interne Standard sowie die TMSH-Lösung wurden unmittelbar vor der Vermessung zugesetzt. Anschließend erfolgte das Auffüllen der Probe mit Methanol auf 100 µL und die Analyse mittels GCxGC-TOFMS. Auch hier wurden jeweils Einfachmessungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der Analyse der Rheinwasserprobe sind in Tabelle 3.20 aufgeführt. Zur Quantifizierung wurden die Wiederfindungsraten der Festphasenextraktion berücksichtigt; die in Tabelle 3.20 angegebenen Abweichungen beziehen sich auf die Standardabweichungen der SPE-Analysen (vgl. Tabelle 3.18). Die berechneten Konzentrationen liegen auch bei der Analyse des Oberflächenwassers in den Größenordnungen, die in der Literatur zu finden sind.

Arzneimittelwirkstoff	Ermittelte Konzentration
Clofibrinsäure	nachweisbar, aber nicht quantifizierbar
Gemfibrozil	nachweisbar, aber nicht quantifizierbar
Ibuprofen	nachweisbar, aber nicht quantifizierbar
Indometacin	101 ± 2 pmol/L (entspricht 36 ± 1 ng/L)
Naproxen	83 ± 5 pmol/L (entspricht 19 ± 1 ng/L)

Tabelle 3.20: In einer Rheinwasserprobe ermittelte Wirkstoffkonzentrationen, bestimmt mittels GCxGC-TOFMS

Bei den im Folgenden gezeigten Abbildungen 3.29 bis 3.31 handelt es sich um eine angereicherte, aber nicht aufgestockte Rheinwasserprobe. Auch hier ist anhand der Chromatogramme des Totalionenstroms (TIC) (Abbildung 3.29) und der ausgewählten Fragmentmassen (Abbildung 3.30) die Komplexität der Probenmatrix deutlich zu sehen. Die zu untersuchenden Wirkstoffe finden sich auch bei dieser Probe im Untergrund des TIC, wodurch Probleme bei der massenspektrometrischen Detektion nach der eindimensionalen gaschromatographischen Auftrennung zu vermuten sind.

Bei der zweidimensionalen Darstellung in Abbildung 3.31 sind die Spots für die nachgewiesenen Arzneimittelwirkstoffe nur bei entsprechender Verstärkung zu sehen, da die Konzentration der Wirkstoffe und somit die Intensitäten der Spots sehr gering sind. Auch bei dieser Art der Darstellung ist gut erkennbar, wie viele zusätzliche Komponenten in einer solchen Probe vorhanden sind, die die Analyse bei einer eindimensionalen gaschromatographischen Auftrennung erschweren.

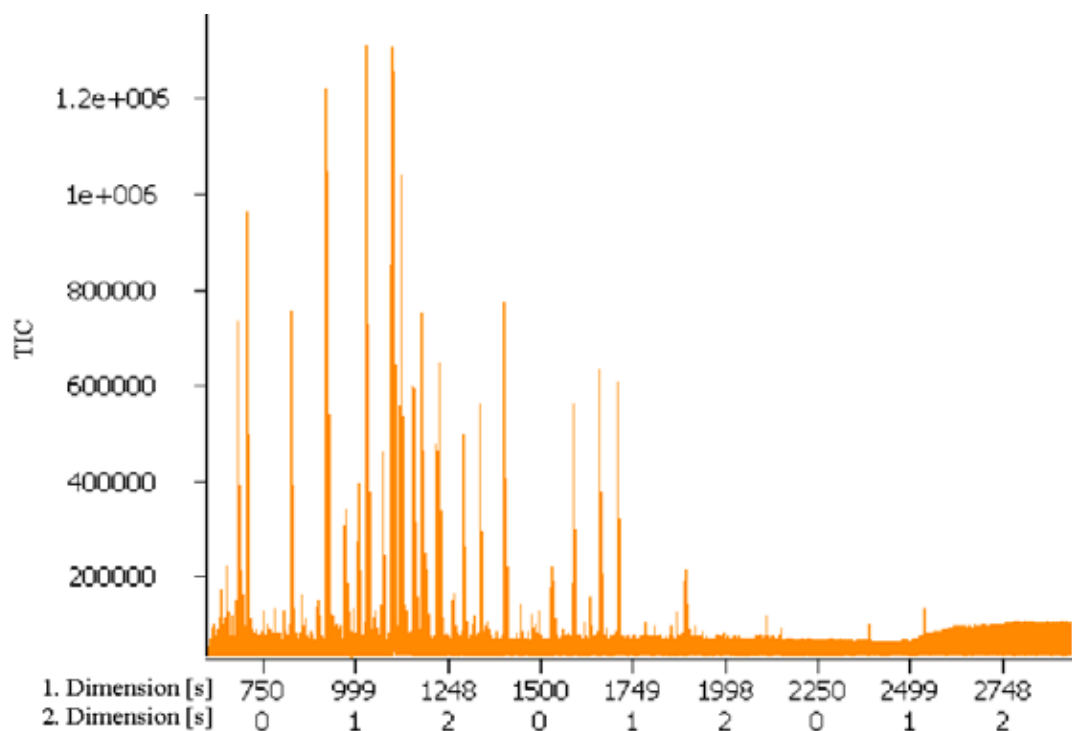


Abbildung 3.29: 2D-Gaschromatogramm (TIC) einer Rheinwasserprobe vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18)

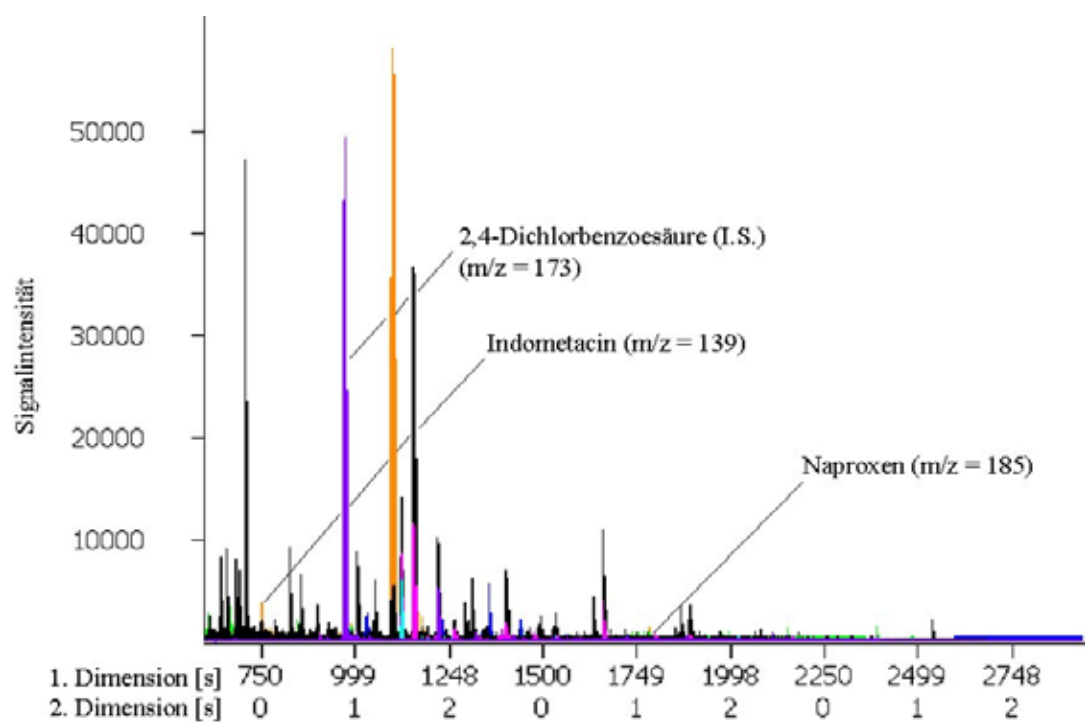


Abbildung 3.30: 2D-Gaschromatogramm der ausgewählten Fragmentmassen einer Rheinwasserprobe vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18)

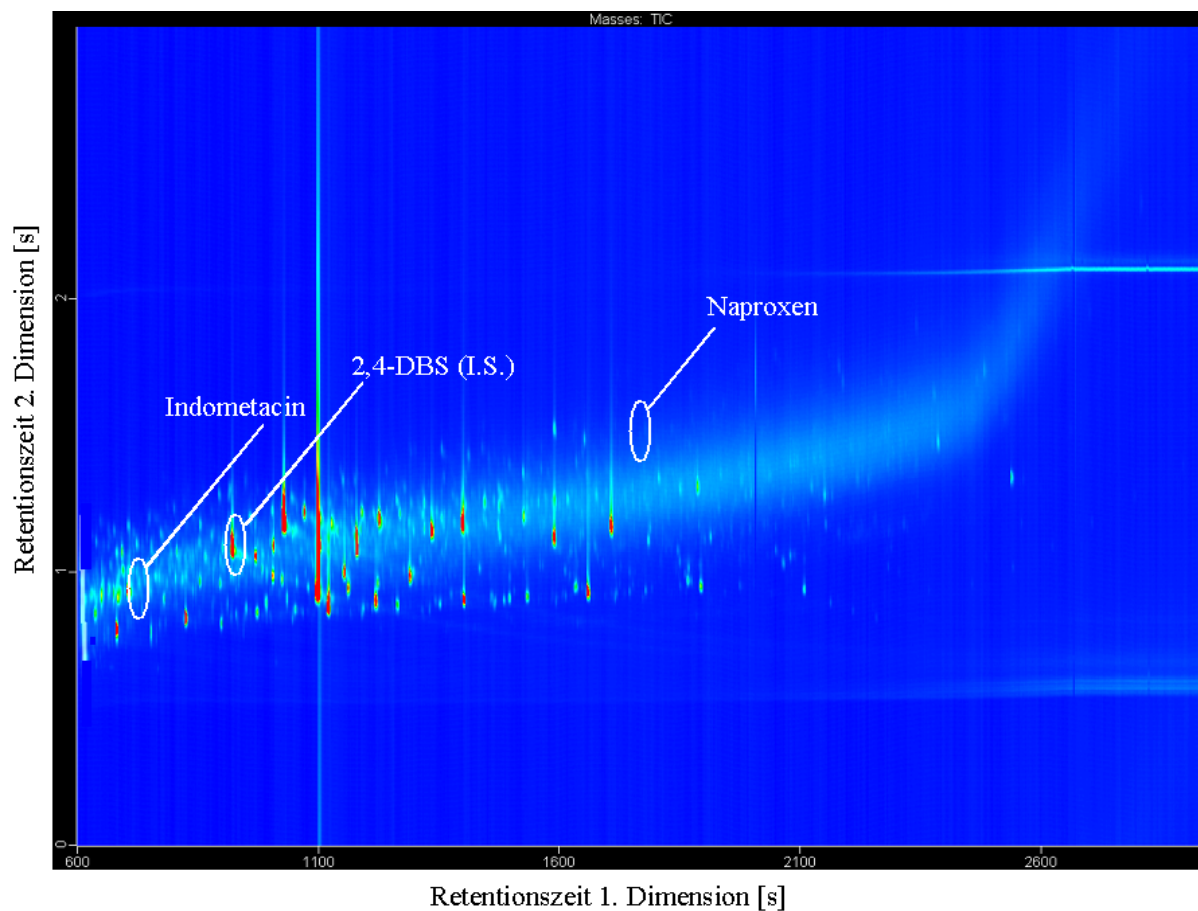


Abbildung 3.31: 2D-Gaschromatogramm (Contour Plot) einer Rheinwasserprobe vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18).

Signalintensität: blau (geringe Intensität) nach grün zu gelb zu rot (hohe Intensität)

3.5.6 Abschätzung der Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze der Methode abzuschätzen, wurden Messungen der methanolischen Arzneimittelwirkstofflösungen nach Derivatisierung mit TMSH durchgeführt. Ein Anreicherungsschritt fand nicht statt.

Die Nachweisgrenzen wurden rechnerisch aus dem Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt. Als Messwert an der Nachweisgrenze wurde die dreifache Intensität der Untergrundsignale festgelegt und über die Kalibrierfunktion die Nachweisgrenze ermittelt. Für Bezafibrat, wel-

ches sich nur sehr schlecht detektieren ließ und auch in den Realproben nicht beobachtet werden konnte, wurde keine Bestimmung durchgeführt.

In Tabelle 3.21 sind die ermittelten Nachweisgrenzen der jeweiligen Stoffe angegeben.

Arzneimittelwirkstoff	abgeschätzte Nachweisgrenze
Clofibrinsäure	15 nmol/L (entspricht 3,2 µg/L)
Diclofenac	50 nmol/L (entspricht 14,7 µg/L)
Gemfibrozil	6 nmol/L (entspricht 1,4 µg/L)
Ibuprofen	16 nmol/L (entspricht 3,4 µg/L)
Indometacin	3 nmol/L (entspricht 1,2 µg/L)
Naproxen	5 nmol/L (entspricht 1,1 µg/L)

Tabelle 3.21: Abgeschätzte Nachweisgrenzen der Arzneimittelwirkstoffe, bestimmt mittels GCxGC-TOFMS

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche chromatographische Verfahren auf ihre Eignung für den Spurennachweis von ausgewählten Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächenwässern und Kläranlagenabläufen untersucht. Die zu detektierenden Substanzen stammten sowohl aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (Diclofenac, Ibuprofen, Indometacin, Naproxen) als auch aus der Gruppe der Lipidsenker (Bezafibrat, Clofibrinsäure, Gemfibrozil). Es wurden folgende Verfahren zum Nachweis der Arzneimittelwirkstoffe eingesetzt:

- Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion
- Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)
- Zweidimensionale comprehensive Gaschromatographie mit flugzeitmassenspektrometrischer Detektion (GCxGC-TOFMS)

Von diesen Methoden war nur die GCxGC-TOFMS uneingeschränkt für den spurenanalytischen Nachweis der Wirkstoffe geeignet. Für die gaschromatographische Bestimmung wurden diese mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) in ihre Methylester überführt. Das Nachweisvermögen der Methode lag für die einzelnen Analyten im Bereich von 1,1 bis 14,7 µg/L. Neben dem hohen Trennvermögen ist bei der GCxGC-TOFMS die gute Absicherung der Analyseergebnisse besonders herauszustellen: die Retentionszeiten der beiden Dimensionen in Kombination mit den vollständigen Spektren ermöglichen die sichere Zuordnung der erhaltenen Signale zu den entsprechenden Analyten. Somit ist auch die Analyse von komplexen Wasserproben möglich, und die Gefahr von falsch positiven Nachweisen ist stark vermindert.

Die entwickelte GCxGC-TOFMS-Methode ließ sich problemlos auf Realproben übertragen. Hierzu wurden die Proben mittels Festphasenextraktion (SPE) an einer C18-Phase aufkonzentriert. Dies gelang für Probenvolumina bis zu 500 mL mit Wiederfindungsraten zwischen 81 und 100%. Nach dem Anreicherungs-schritt konnten Arzneimittelwirkstoffe aus den verschiedenen aquatischen Kompartimenten detektiert und mit Hilfe des Standardadditionsverfahrens quantifiziert werden. Zur Bestimmung der Belastung eines Kläranlagenablaufs reichte die Aufkonzentration von 100 mL Probenvolumen, in dem fünf der sieben untersuchten Arzneimittelwirkstoffe in Konzentrationen zwischen 40 und 525 ng/L nachgewiesen werden konnten. Für die Analyse von Oberflächenwasser wurden 250 mL Rheinwasser aufkonzent-

riert. Hier konnten Indometacin und Naproxen in Konzentrationen von 36 bzw. 19 ng/L detektiert werden.

Für alle anderen Verfahren ergaben sich im Verlauf der Untersuchungen Schwierigkeiten und Begrenzungen:

Zur Fluoreszenzdetektion der Wirkstoffe wurde zunächst eine Derivatisierungsreaktion erarbeitet, um den zur Verfügung stehenden Argon-Ionen-Laser ($\lambda_{em} = 488 \text{ nm}$) nutzen zu können. Zu diesem Zweck musste eine Amidierungsreaktion optimiert werden, bei der die Carboxylgruppe der Arzneimittelwirkstoffe mit dem Aminanker des Fluoreszenzmarkers BODIPY[®] FL EDA ($\lambda_{ex} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$) umgesetzt wurde. Verschiedene in der Literatur beschriebene Reaktionsansätze im wässrigen Milieu verliefen trotz Variation der Umsetzungsparameter ohne Erfolg. In organischen Lösungsmitteln dagegen konnte für sechs der sieben ausgewählten Wirkstoffe eine Umsetzung nachgewiesen werden. Da die Reaktionsausbeuten allerdings nur gering waren, wurde ein Zweiphasensystem bestehend aus Toluol und HEPES-Puffer eingesetzt. Durch diese Reaktionsführung konnten die Arzneimittelwirkstoffe in guten Ausbeuten mit dem Fluoreszenzmarker umgesetzt werden.

Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe gelang mit der HPLC an einer C18-Säule. Mit der MEKC hingegen konnte die Trennung nicht für alle Derivate erreicht werden; hier war die Trennleistung des Systems trotz Anwendung verschiedener Mizellbildner und Puffer nicht ausreichend.

Bei der Übertragung der Methode auf Realproben erfolgte die Probenanreicherung mittels SPE. Sowohl mit absolut Nexus[®]- als auch mit Bond Elut C18-Kartuschen ergaben sich gute Wiederfindungsraten. Allerdings traten bei der Kombination von SPE und anschließender Fluoreszenzmarkierung Interaktionen auf, die zu einer vermehrten Zersetzung des Fluoreszenzmarkers führten. Eine Detektion der markierten Wirkstoffe wurde aufgrund von vielen zusätzlichen Signalen in den Chromatogrammen respektive Elektropherogrammen unmöglich. Somit muss für die beiden Fluoreszenzmethoden (HPLC-Fluoreszenzdetektion und CELIF) festgestellt werden, dass sie zwar generell für den Nachweis von Standards der Arzneimittelwirkstoffe geeignet sind, bei Realproben aber noch unüberwindbare Störungen einem spurenanalytischen Nachweis entgegenstehen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Geräte

5.1.1 Chemikalien

A) Lösemittel und Substanzen

<u>Lösemittel</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	Acros Organics (Geel, Belgien)
Acetonitril	Acros Organics (Geel, Belgien)
Chloroform	Fisher Scientific (Loughborough, GB)
Dichlormethan	Merck (Darmstadt)
Diethylether	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	J. T. Baker (Deventer, Niederlande)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Toluol	Merck (Darmstadt)

Alle eingesetzten Lösungsmittel besaßen mindesten HPLC-Grade.

<u>Arzneimittelwirkstoffe</u>	<u>Hersteller</u>
Bezafibrat	Sigma (Steinheim)
Clofibrinsäure	Acros Organics (Geel, Belgien)
Diclofenac, Na-Salz	Sigma (Steinheim)
Gemfibrocil	Sigma (Steinheim)
Ibuprofen	Fluka (Buchs, Schweiz)
Indometacin	Sigma (Steinheim)
Naproxen	Aldrich (Steinheim)

Die verwendeten Arzneimittelwirkstoffe waren von größtmöglicher Reinheit (> 98%).

<u>Carbodiimide</u>	<u>Hersteller</u>
1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid (als metho-p-toluolsulfonat-Salz)	Sigma (Steinheim)
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid	Fluka (Buchs, Schweiz)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Aldrich (Steinheim)

Standardsubstanzen

Benzoessäure, 99,5%
2,4-Dichlorbenzoessäure, 98%

Hersteller

Aldrich (Steinheim)
Aldrich (Steinheim)

Puffer- und Elektrolytzusätze

Dinatriumhydrogenphosphat
Natriumdihydrogenphosphat
Cavasol
HEPES
SDS
Taurocholsäure
Cholsäure

Hersteller

Fluka (Buchs, Schweiz)
Fluka (Buchs, Schweiz)
Wacker Chemie (Burghausen)
Sigma (Steinheim)
Merck (Darmstadt)
Fluka (Buchs, Schweiz)
Acros Organics (Geel, Belgien)

Derivatisierungsreagenzien

BODIPY[®] FL EDA
BODIPY[®] FL Hydrazid
TMSH (0,25 M in Methanol)

Hersteller

Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
Fluka (Buchs, Schweiz)

Sonstige Substanzen

Natriumhydroxid
Salzsäure, 38%
Trifluoressigsäure
Ameisensäure
Dimethyldichlorsilan
Dichloressigsäure
p-Hydroxyphenyllessigsäure

Hersteller

Carl Roth (Karlsruhe)
Carl Roth (Karlsruhe)
Fluka (Buchs, Schweiz)
Riedel de Haën (Seelze)
Merck (Darmstadt)
Fluka (Buchs, Schweiz)
Sigma (Steinheim)

5.1.2 Verwendete Materialien und Geräteeinstellungen

5.1.2.1 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion eingesetzte Sorbenzien:

absolut Nexus[®]; 200 und 500 mg Sorbensmasse (Varian, Darmstadt)
Bond Elut C18; 500 und 1000 mg Sorbensmasse (Varian, Darmstadt)

Für die Festphasenextraktion genutzte Geräte und Hilfsmittel:

Filtration (bei Re- alproben):	Schleicher & Schuell Faltenfilter, 595 1/2 (Schleicher & Schuell, Das- sel)
pH-Meter:	Beckman pH-Meter Φ 350. pH/Temp/mV (Beckman Instruments, Ful- lerton, CA, USA)
SPE:	LiChrolut Absaugeinheit (Merck, Darmstadt) mit angeschlossener Was- serstrahlpumpe
Eindampfen:	Vakuumzentrifuge RC10.20 mit angeschlossener Kühlfalle RCT 90 (beides Jouan, Saint-Herblain, Frankreich) und Pumpe Pascal 2005 SD (Alcatel, Wertheim)

5.1.2.2 Fluoreszenzmarkierung

Durchmischung der Proben:	Minishaker MS2 (IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA)
Derivatisierungs- vorgang:	Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
Phasentrennung:	miniSpin-Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg)

5.1.2.3 HPLC

HPLC-Anlage:	Merck / Hitachi (Darmstadt)
	Interface: D-6000A
	Pumpe: L-6200A
	Autosampler: AS-2000A
	Fluoreszenzdetektor: F-1080
Injektionsvolumen:	10 μ L

a) *Erste Trennung von zwei fluoreszenzmarkierten Arzneimittelderivaten (vgl. Abbildung 3.7):*

Säule: Inertsil ODS-3 RP-18 (5 μ m), 250 x 2,1 mm

Zeit [min]	Fließmittel A	Fließmittel B	Flussrate [mL/min]
	99,5% H ₂ O / 0,5% ACN + 25 mM Ammoniumacetat	95% ACN / 5% H ₂ O + 25 mM Ammoniumacetat	
0	50	50	0,2
15,0	0	100	0,2
20,0	50	50	0,2

b) Trennung der sieben fluoreszenzmarkierten Arzneimittelderivate (vgl. Abbildung 3.8):

Säule: LiChrospher[®] 100 CN (5 µm), 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Zeit [min]	Fließmittel A	Fließmittel B	Flussrate [mL/min]
	99,5% H ₂ O / 0,5% ACN + 2,5 mM Ammoniumacetat	90% ACN / 10% H ₂ O + 2,5 mM Ammoniumacetat	
0	50	50	0,4
8,0	48	52	0,4
17,0	50	50	0,4
20,0	15	85	0,4
21,0	50	50	0,4

c) Trennung der organischen Phasen nach der Zweiphasenreaktion (vgl. Abbildung 3.9):

Säule: LiChrospher[®] 100 CN (5 µm), 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Zeit [min]	Fließmittel A	Fließmittel B	Flussrate [mL/min]
	99,5% H ₂ O / 0,5% ACN + 2,5 mM Ammoniumacetat	90% ACN / 10% H ₂ O + 2,5 mM Ammoniumacetat	
0	50	50	0,4
13,0	48	52	0,4
14,0	40	60	0,4
23,0	30	70	0,4
25,0	30	70	0,4
26,0	20	80	0,4
38,0	50	50	0,4

d) Trennung der sieben fluoreszenzmarkierten Arzneimittelderivate (vgl. Abbildung 3.12):

Säulen: LiChrospher[®] 100; RP-18(e) (5µm), 250 x 4,0 mm (Merck, Darmstadt) bzw. J'sphere H80 C-18 (4 µm), 250 x 4 mm (YMC, Schermbeck)

Das angegebene isokratische Programm wurde für beide Säulen eingesetzt.

Zeit [min]	Fließmittel A	Fließmittel B	Flussrate [mL/min]
	90% H ₂ O / 10% ACN + 0,05% TFA (v/v)	90% ACN / 10% H ₂ O + 0,05% TFA (v/v)	
0	40	60	0,6
40,0	40	60	0,6

5.1.2.4 Kapillarelektrophorese

Die im Verlauf der Arbeit eingesetzten unbeschichteten Kapillaren wurden vor der Verwendung mit folgendem Programm konditioniert:

Vorgang	Spülschritt
Konditionierung der Kapillaren	15 min 1 M Natriumhydroxidlösung
	15 min 1 M Salzsäurelösung
	15 min 1 M Natriumhydroxidlösung
	5 min Reinstwasser
	15 min Elektrolytlösung

a) Fluoreszenzmessungen

CE-Gerät:	P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) Detektor: Argon-Ionen-Laser (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)
Messwellenlänge:	$\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$
CE-Kapillare:	fused silica-Kapillare (CS Chromatographieservice, Langerwehe) Gesamtlänge: 50 cm; effektive Länge: 40 cm
Trennpuffer:	30 mM Natriumphosphatpuffer pH 9,0 20 mM Taurocholsäure 8 mM SDS + 20% Methanol
Trennungsspannung:	20 kV
Kapillartemperatur:	20 °C
Injektion:	5 s mit 0,035 bar bei 25 °C (entspricht etwa 5,9 nL Injektionsvolumen)

Vor den einzelnen Messungen wurde die Kapillare jeweils eine Minute mit 200 mM SDS-Lösung, 1 mM NaOH, Wasser und anschließend fünf Minuten mit dem Trennpuffer gespült.

b) Bestimmung der SPE-Wiederfindungsraten mittels UV-Detektion

CE-Gerät:	P/ACE System 5510 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) Detektor: P/ACE DAD-Detektor (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)
Messwellenlänge:	195 nm
CE-Kapillare:	fused silica-Kapillare (CS Chromatographieservice, Langerwehe) Gesamtlänge: 50 cm; effektive Länge: 43 cm
Trennpuffer:	50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 8,0
Trennungsspannung:	20 kV
Injektion:	5 s mit 0,035 bar bei 20 °C (entspricht etwa 5,3 nL Injektionsvolumen)

Das methanolische Eluat der SPE-Analysen wurde zunächst bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft und anschließend in einer 1:1 Mischung aus 20 mM Natriumphosphat pH 8,0 und Methanol aufgenommen. Diese Lösung enthielt zusätzlich Benzoesäure, welche als interner Standard zugesetzt wurde.

5.1.2.5 LC-MS

Bestimmung der Präzisionsmassen der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffderivate mit Hilfe des Lockspray-Verfahrens:

Massenspektrometer: Q-TOF Ultima API (Micromass, Milford, MA, USA) mit Elektrospray-Interface

HPLC: Waters 2690 Trennmodul mit Säulenofen (Waters, Eschborn)
Waters 2996 Photo-Dioden-Array-Detektor (Waters, Eschborn)

HPLC-Säule: LiChrospher® 100 RP-18 (e) 5 µm; 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Fließmittel A: 90% H₂O; 10% ACN + 0,005% Ameisensäure

Fließmittel B: 90% ACN; 10% H₂O + 0,005% Ameisensäure

Zusammensetzung: 40% Fließmittel A; 60 % Fließmittel B (isokratisch)

Flussrate: 0,6 mL/min

Messmodus: Elektrospray negativ; V-Modus

Instrument-Parameter: Capillary Voltage: 2,5 kV
Cone Voltage: 40 V
Source Temp.: 95 °C
Desolvation Temp.: 179 °C
Cone Gas: 5-10 L/h
Desolvation Gas: 300 L/h
Collision Energy: 10 eV
TOF: 9,15 kV
Pusher Cycle Time: 35 µs
MCP: 2800 V

5.1.2.6 GCxGC-TOFMS

GCxGC-Anlage	LECO Pegasus III GCxGC-TOFMS (LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach) LECO Thermal Modulation System GC: Agilent® 6890 N (Agilent Technologies, Waldbronn) Autosampler: Agilent® 7683 LECO ChromaTOF™ Software
Injektionsvolumen:	1 µL

GC-Bedingungen:

Säule 1:	FactorFour® VF-5ms (Länge = 30 m; I.D. = 0,25 mm; d _f = 0,25 µm) (Varian, Darmstadt)
Säule 2:	BPX-50 (Länge = 1 m; I.D. = 0,1 mm; d _f = 0,1 µm) (Varian, Darmstadt)
Temperaturprogramm Ofen 1:	70 °C (1 min halten) 40 °C/min bis 200 °C (0 min halten) 5 °C/min bis 320 °C (8 min halten)
Temperaturprogramm Ofen 2:	90 °C (1 min halten) 40 °C/min bis 220 °C (0 min halten) 5 °C/min bis 320 °C (10 min halten)
Trärgas:	Helium; konstant bei 2,2 bar

Modulator-Bedingungen:

Offset Modulator Temperatur:	30 °C
Trennzeit 2. Dimension:	3 s
Modulator und Zeiten:	2 Cold Jets (0,6 s), 2 Hot Jets (0,9 s)

MS-Bedingungen:

Messmodus:	EI positiv; 70 eV
Solvent Delay:	600 s
Massenbereich:	50 - 500 Da
Scanrate:	200 Spektren/s
Temperatur Ionenquelle:	250 °C
Temperatur Transfer Line:	300 °C

5.2 Methoden / Arbeitsvorschriften

Puffer- bzw. Elektrolytlösungen:

Herstellung eines 20 mM Phosphatpuffers pH 9,0:

Zu einer 20 mM Dinatriumhydrogenphosphatlösung (0,284 g/100 mL Na_2HPO_4) wurde eine 20 mM Natriumdihydrogenphosphat (0,312 g/100 mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) zugegeben, bis der pH-Wert 9,0 betrug. Dies wurde anhand des pH-Meters kontrolliert. Analog wurde für die übrigen im Laufe der Arbeit verwendeten Molaritäten und pH-Werte verfahren.

Herstellung des MEKC-Puffers (20 mM Taurocholsäure, 8 mM SDS, 20% Methanol in 30 mM Natriumphosphat pH 9,0:

Zur Trennung fluoreszenzmarkierter Arzneimittelwirkstoffe in unbeschichteten fused-silica-Kapillaren mittels MEKC kam ein Elektrolyt bestehend aus 30 mM Natriumphosphatpuffer, pH = 9,0, 20 mM Taurocholsäure und 8 mM SDS als Mizellbildner und 20% Methanol zum Einsatz. Dazu wurden in 32 mL eines 30 mM Natriumphosphat-Puffers (pH 9,0) 0,4304 g Taurocholsäure gelöst. Diese Lösung wurde anschließend zu einer Suspension aus 8 mL Methanol und 0,0923 g SDS gegeben und so lange im Ultraschallbad gehalten, bis das SDS gelöst war.

800 mM HEPES-Pufferlösung pH 6,5:

Für eine 800 mM HEPES-Pufferlösung wurden 8,58 g HEPES in 45 mL Reinstwasser gelöst. Die anschließende pH-Wert-Einstellung erfolgte mit 0,1-molarer Natriumhydroxidlösung.

Anreicherung der Analyten mittels SPE-Kartuschen:*Kartuschen: absolut Nexus® (Varian, Darmstadt)*

Konditionierung	6 mL Isopropanol 9 mL Millipore-H ₂ O pH 8,5
Probenaufgabe	Volumenfluss (f_v) = 2 mL/min bei 895 mbar
Trocknen	1 min bei 844 mbar 2 min bei 778 mbar
Elution	3,5 mL Isopropanol
Eindampfen	zur Trockne mittels Vakuumzentrifuge; ohne Heizung, mit Gaseinlass

Kartuschen: Bond Elut C18 (Varian, Darmstadt)

Konditionierung	6 mL Isopropanol 9 mL Millipore-H ₂ O pH 2,0
Probenaufgabe	f_v = 5-6 mL/min bei 895mbar
Trocknen	1 min bei 844 mbar 5 min bei 608 mbar
Elution	4,5 mL MeOH
Eindampfen	zur Trockne mittels Vakuumzentrifuge; ohne Heizung, mit Gaseinlass

Anreicherung der Analyten mittels C18 Fast-HPLC-Säule (Alltech, Deerfield, IL, USA)

Äquilibrierung	6 min Millipore-H ₂ O pH 2,0 (f_v = 1 mL/min)
Probenaufgabe	f_v = 1 mL/min
Nachspülen	4 min Millipore-H ₂ O pH 2,0 (f_v = 1 mL/min)
Elutionsvorbereitung	mit Methanol purgen
Elution	4 mL Methanol (f_v = 1 mL/min)
Eindampfen	zur Trockne mittels Vakuumzentrifuge; ohne Heizung, mit Gaseinlass

Silanisieren der Glasgeräte:

Die Vorgehensweise des Silanisierens ist folgende [30]:

Die gereinigten Glasgeräte werden mit einer 10%-igen Lösung von Dimethyldichlorsilan in Toluol etwa. 15 Sekunden gespült, sodass die Oberfläche vollständig benetzt ist. Die Glasoberfläche wird zweimal mit Toluol und anschließend zweimal mit Methanol gespült. Die

Glasgeräte werden dann bei 160 °C im Trockenschrank für 3 Stunden getrocknet. Der Film hält bei normalem Gebrauch etwa einen Monat.

Arbeitsvorschrift zur Fluoreszenzmarkierung der Analyten mit BODIPY[®] FL EDA:

10 µL der Arzneimittellösungen (jeweils 25 bzw. 5 µmol/L) in *HEPES*-Puffer (50 mM pH 6,0) werden mit 10 µL DCC-Lösung (10 mM in Toluol) versetzt. Zu dieser Lösung werden 10 µL BODIPY[®] FL EDA (0,125 mmol/L) in *HEPES*-Puffer (50 mM pH 6,0) sowie 30 µL Toluol zugegeben. Diese Reaktionslösung wird kurz gemixt und 4 Stunden bei 25 °C geschüttelt (800 U/min). Nach beendeter Reaktion wird kurz zentrifugiert und 25 µL organische Phase abpipettiert. Zu der Reaktionslösung werden 50 µL Toluol pipettiert, 15 s gemixt, zentrifugiert und 45 µL Toluolphase abpipettiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, und man erhält schließlich ein Gesamtvolumen von 115 µL Toluolphase. Diese wird entsprechend aliquotiert und bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft. Für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wird der Rückstand in 100 µL Trennelektrolyt aufgenommen.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Tabellen und Abbildungen

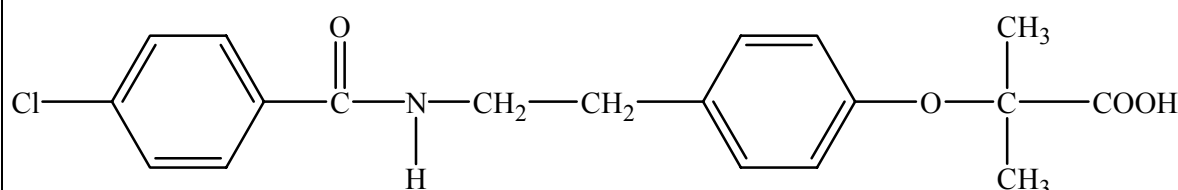
6.1.1 Strukturen und Angaben zu den analysierten Stoffen

Substanzbezeichnung: **Bezafibrat**

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

CAS-Nr.: 41859-67-0

Molekulargewicht: 361,8 g/mol

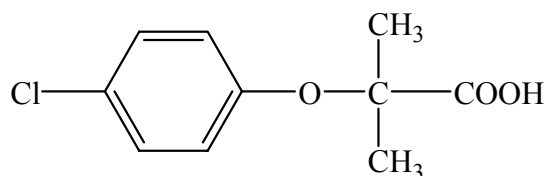


Substanzbezeichnung: **Clofibrinsäure**

Summenformel: $C_{10}H_{11}ClO_3$

CAS-Nr.: 882-09-7

Molekulargewicht: 214,65 g/mol

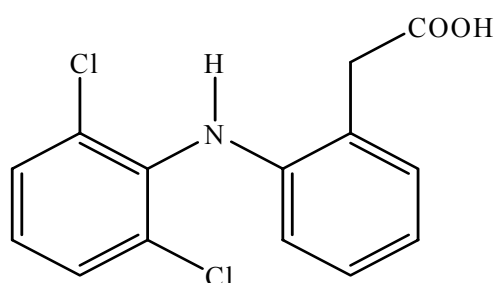


Substanzbezeichnung: **Diclofenac**

Summenformel: $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$

CAS-Nr.: 15307-79-6 (als Na-Salz)

Molekulargewicht: 296,2 g/mol

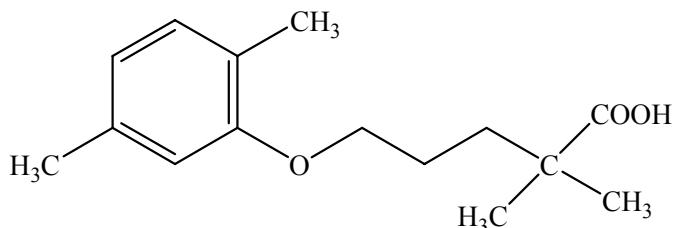


Substanzbezeichnung: **Gemfibrozil**

Summenformel: $C_{15}H_{22}O_3$

CAS-Nr.: 25812-30-0

Molekulargewicht: 250,3 g/mol

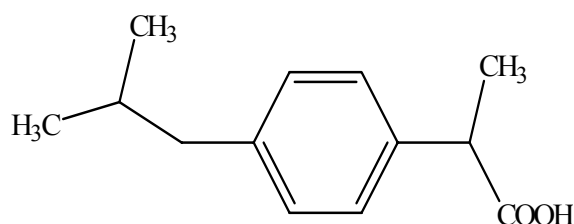


Substanzbezeichnung: **Ibuprofen**

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

CAS-Nr.: 55146-56-6

Molekulargewicht: 206,28 g/mol

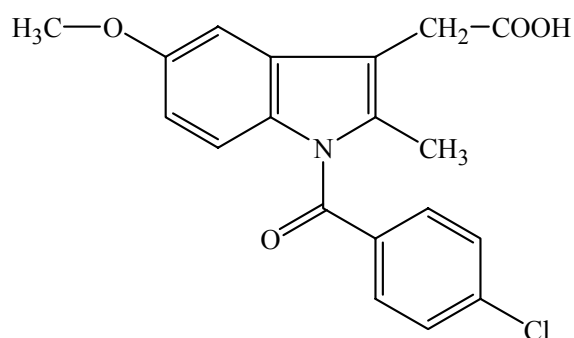


Substanzbezeichnung: **Indometacin**

Summenformel: $C_{19}H_{16}ClNO_4$

CAS-Nr.: 53-86-1

Molekulargewicht: 357,8 g/mol

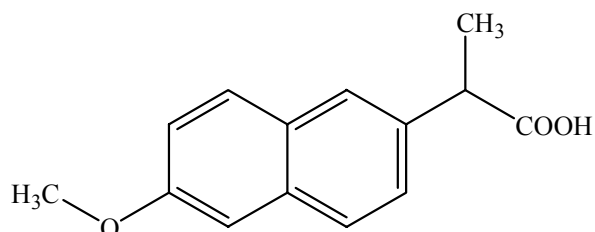


Substanzbezeichnung: **Naproxen**

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

CAS-Nr.: 22204-53-1

Molekulargewicht: 230,27 g/mol

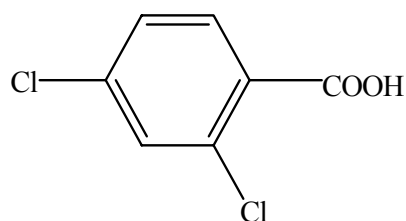


Substanzbezeichnung:
2,4-Dichlorbenzoesäure (I.S.)

Summenformel: $C_7H_4Cl_2O_2$

CAS-Nr.: 50-84-0

Molekulargewicht: 191,01 g/mol



6.1.2 Präzisionsmassenspektren der BODIPY-Derivate

Messmodus: ESI-negativ

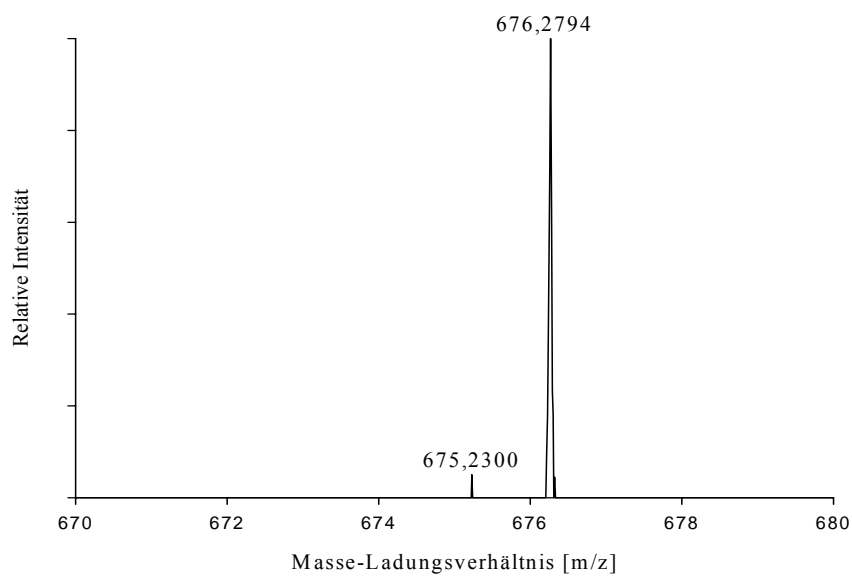


Abbildung 6.1: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Bezafibrat

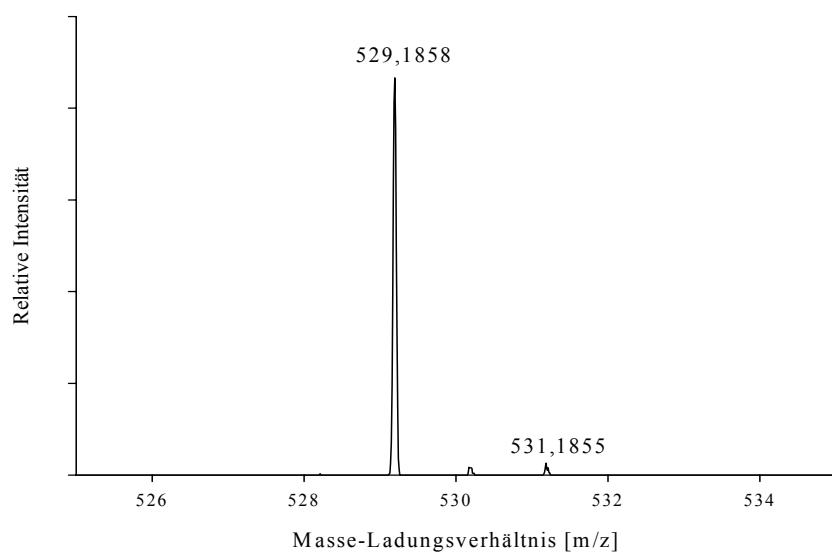


Abbildung 6.2: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Clofibrinsäure

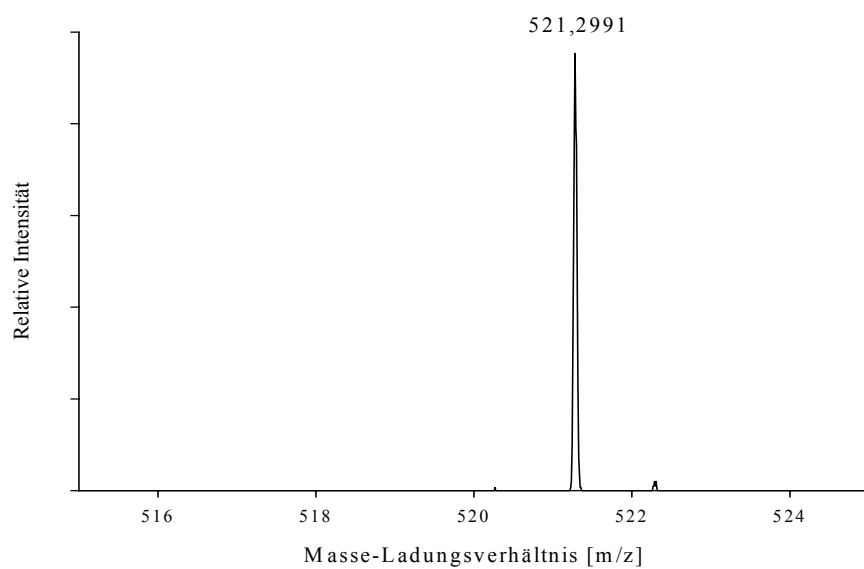


Abbildung 6.3: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Ibuprofen

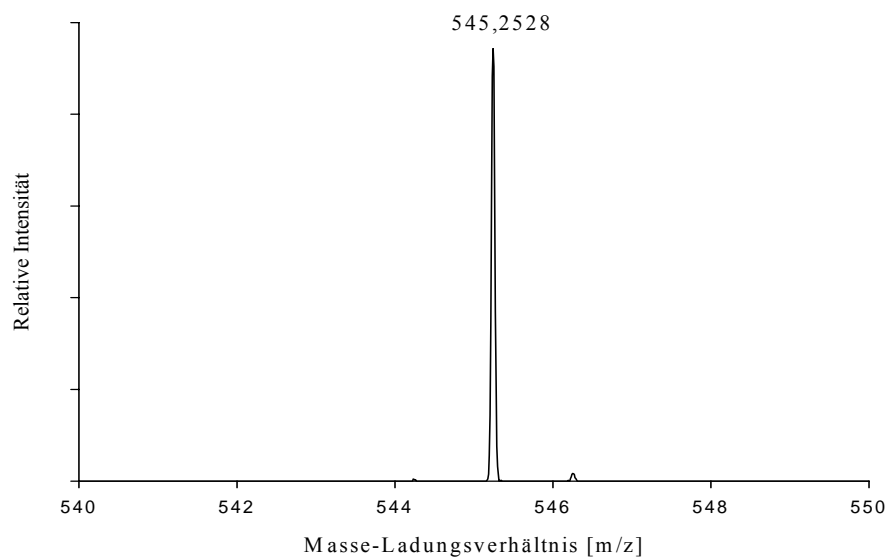


Abbildung 6.4: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Naproxen

6.1.3 EI-Massenspektren der Methylester der analysierten Stoffe

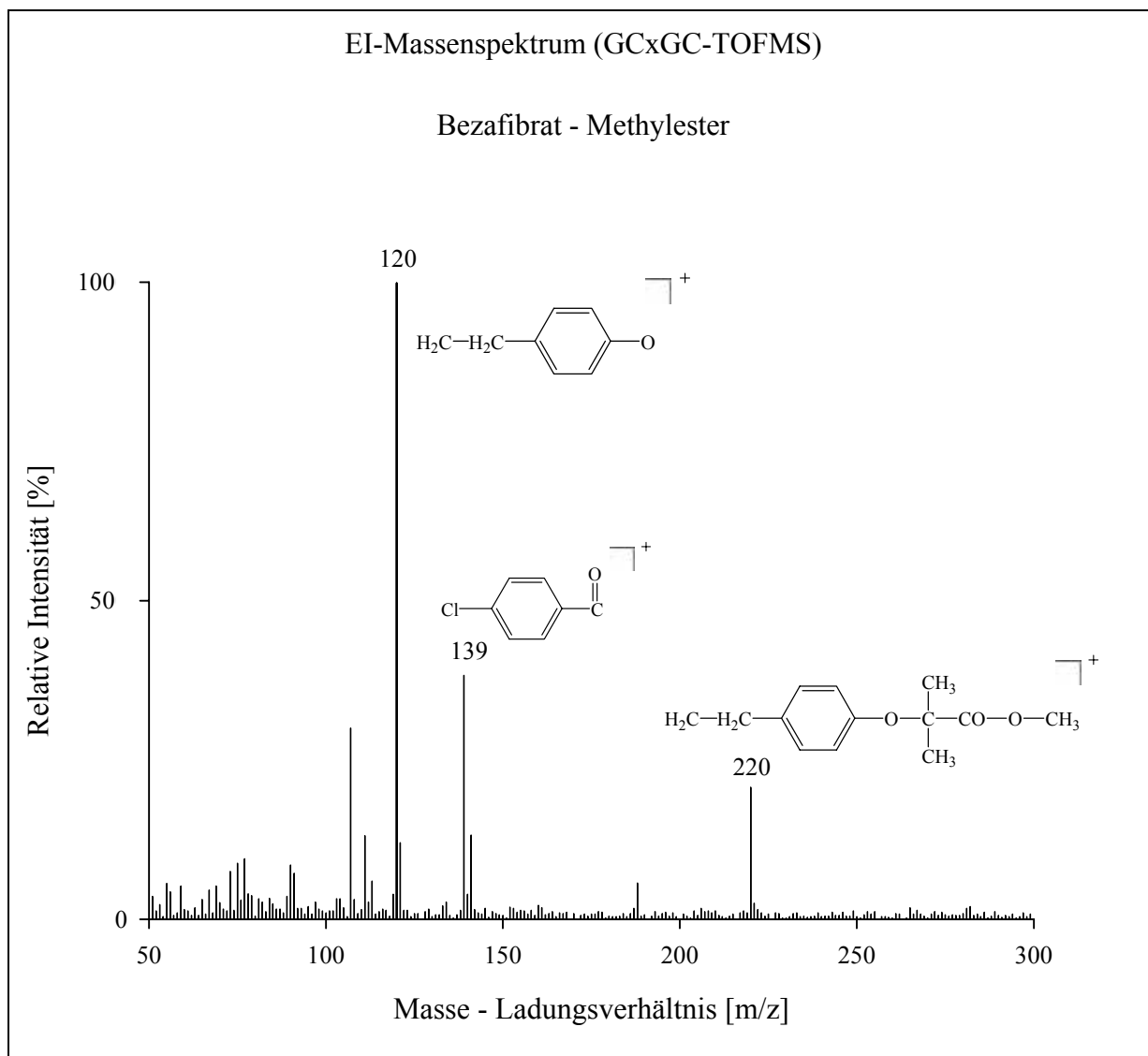


Abbildung 6.5: EI-Massenspektrum von Bezafibrat (als Methylester)

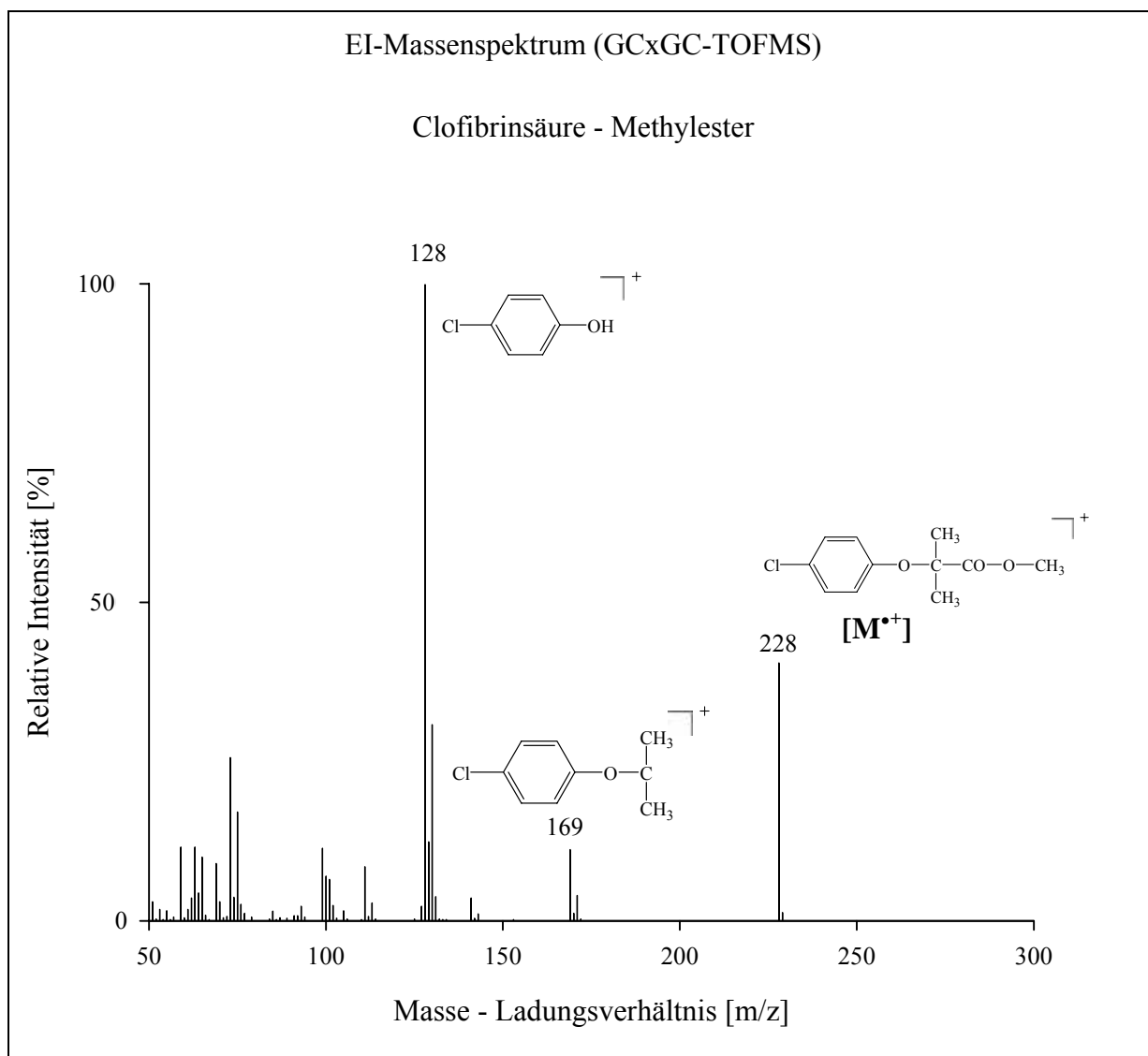


Abbildung 6.6: EI-Massenspektrum von Clofibrinsäure (als Methylester)

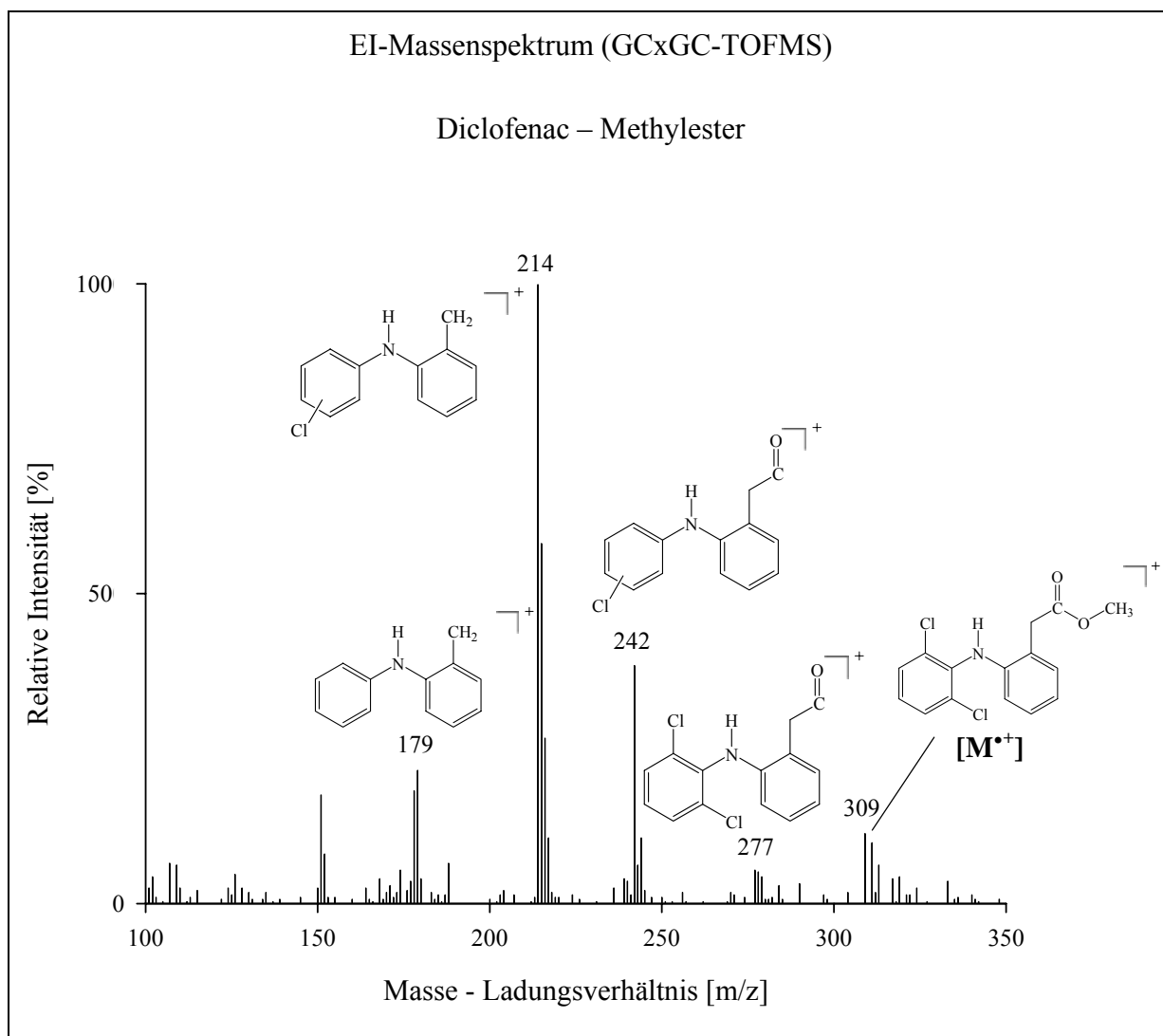


Abbildung 6.7: EI-Massenspektrum von Diclofenac (als Methylester)

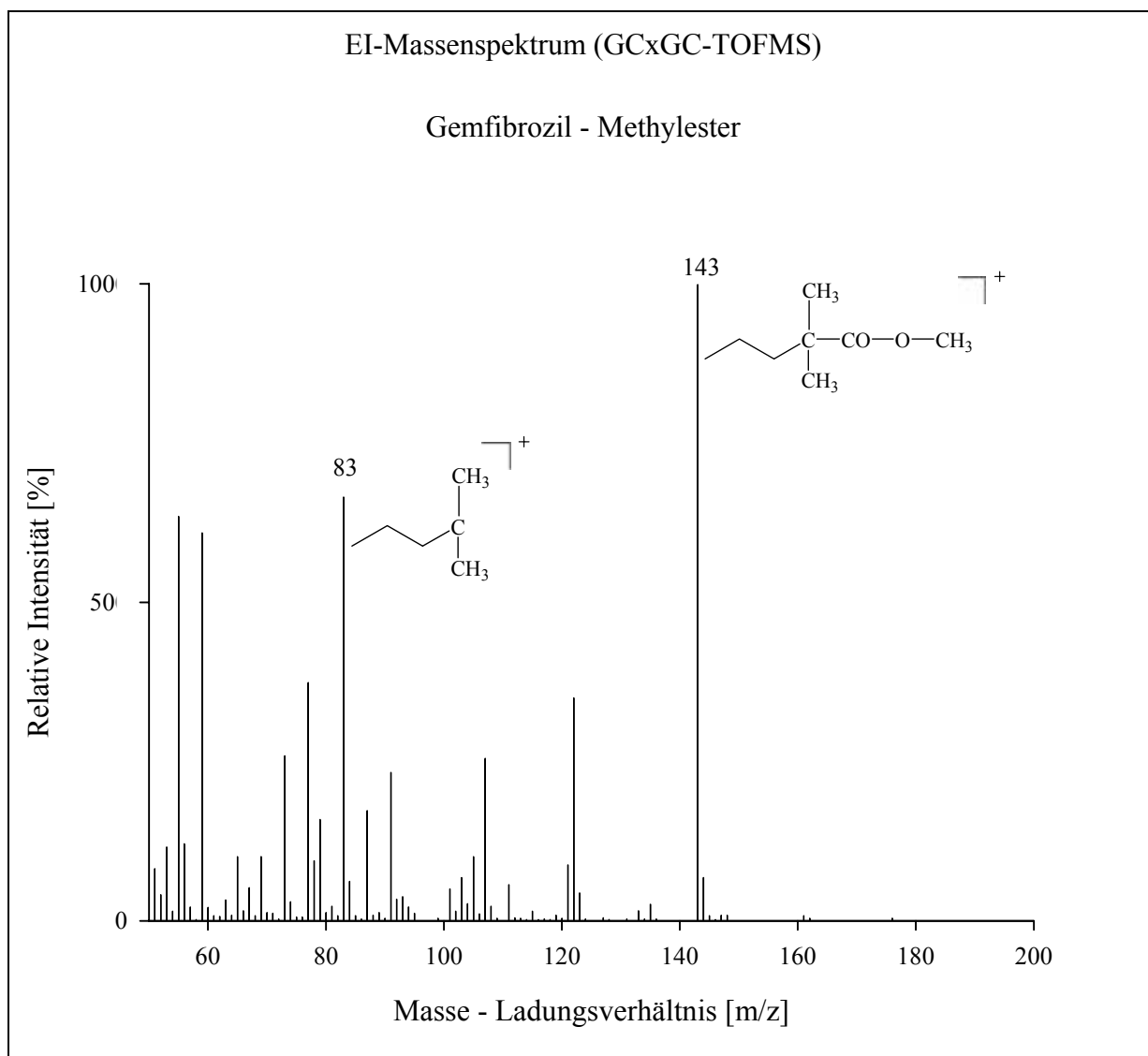


Abbildung 6.8: EI-Massenspektrum von Gemfibrozil (als Methylester)

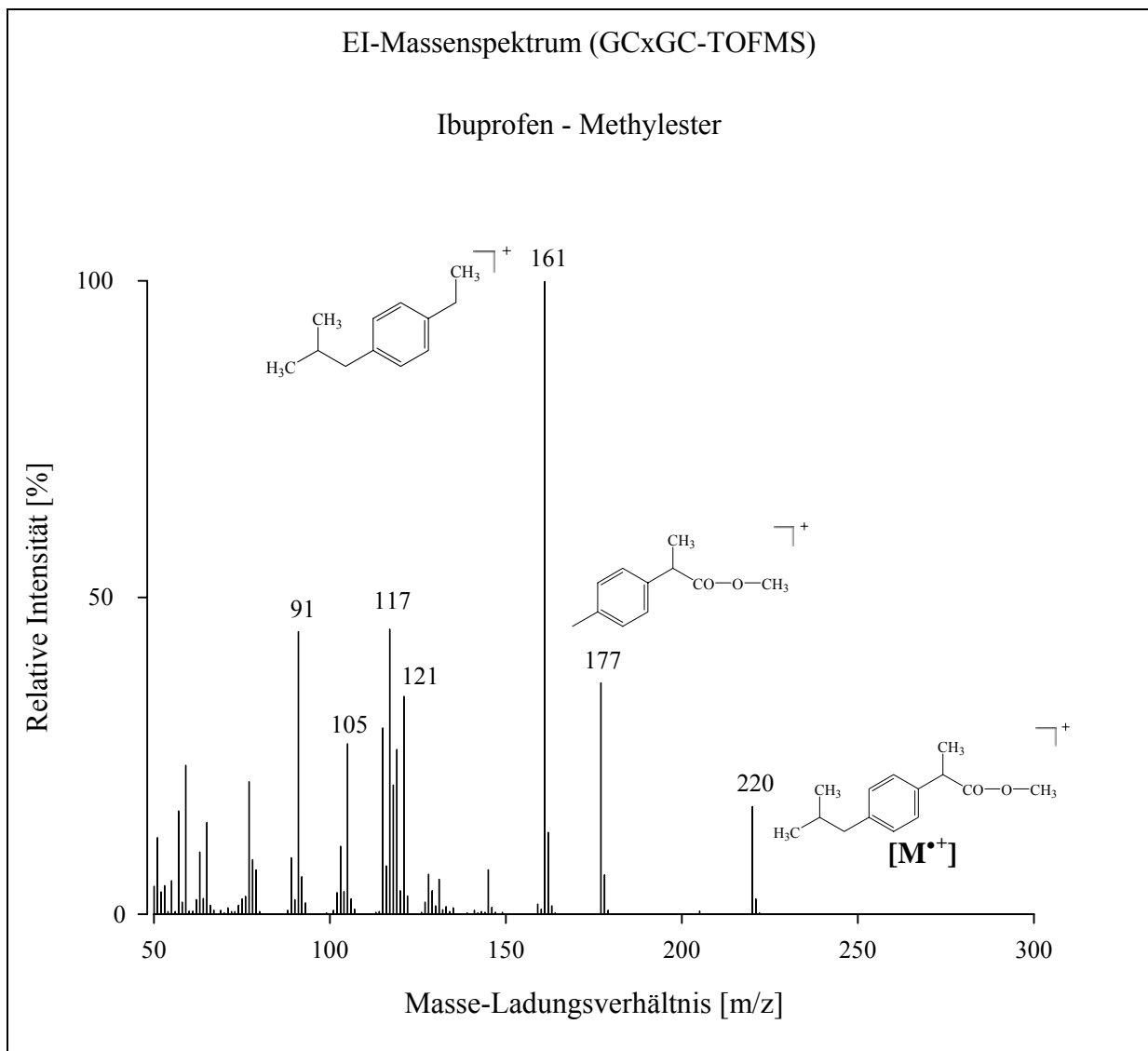


Abbildung 6.9: EI-Massenspektrum von Ibuprofen (als Methylester)

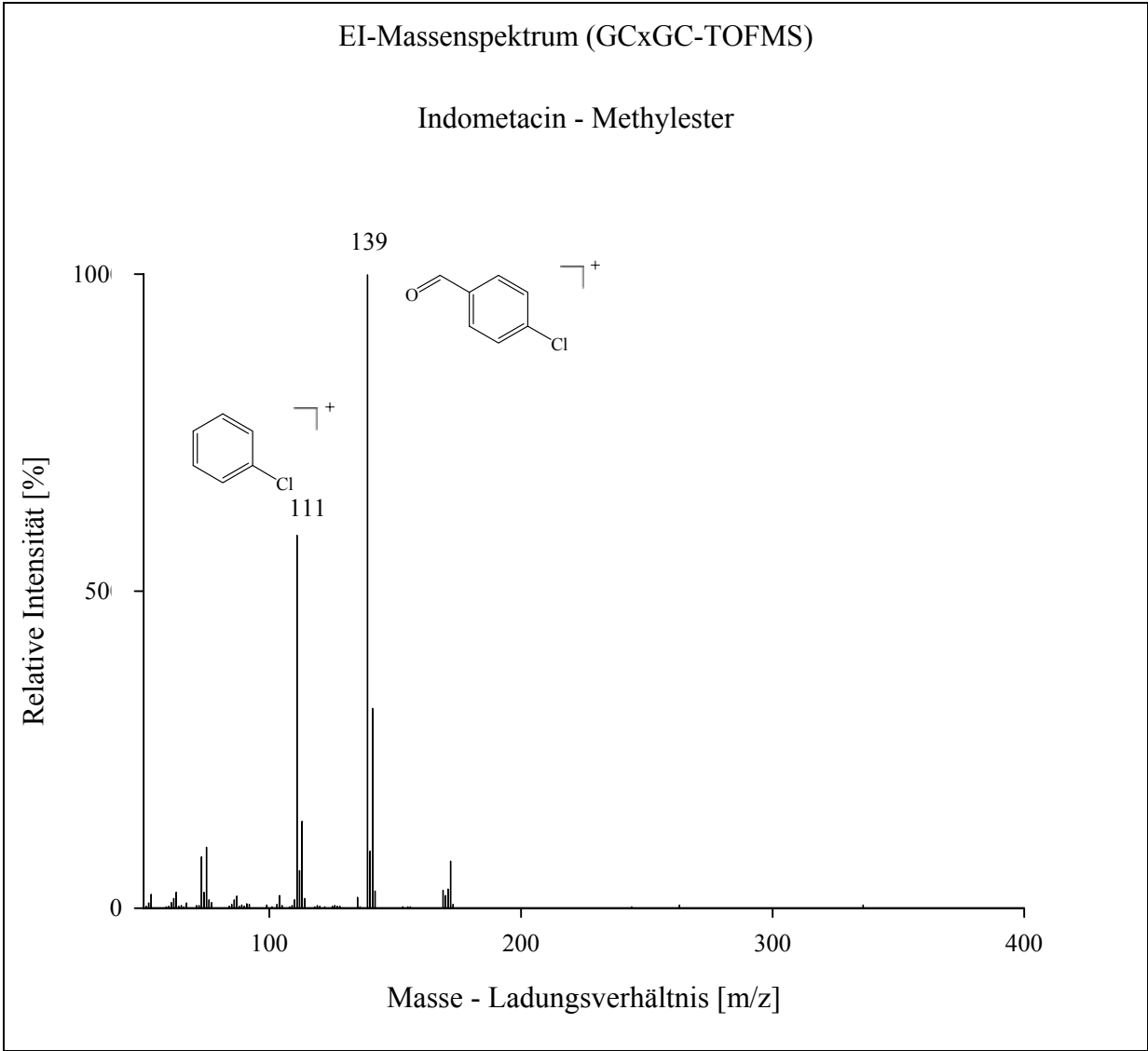


Abbildung 6.10: EI-Massenspektrum von Indometacin (als Methylester)

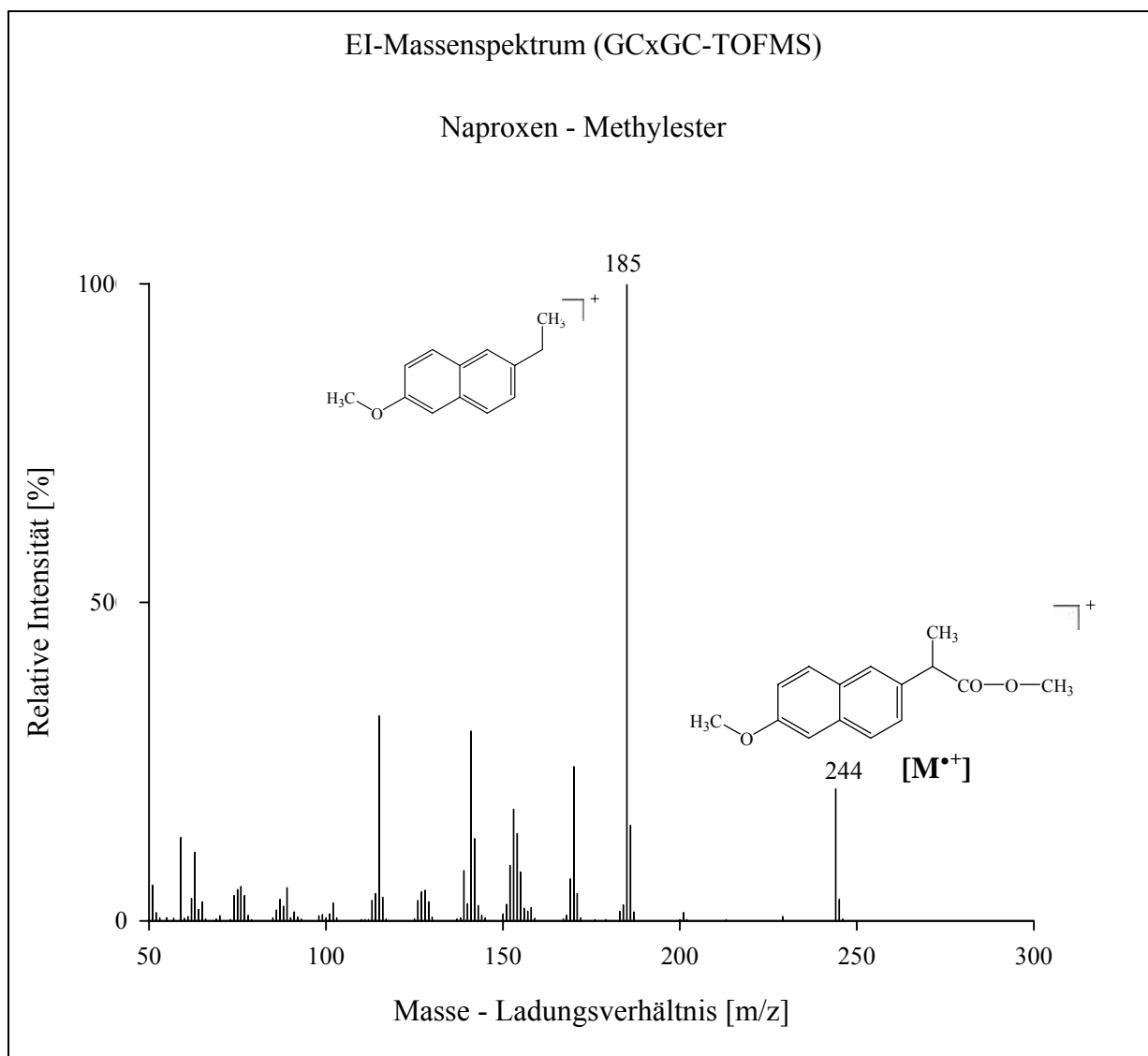


Abbildung 6.11: EI-Massenspektrum von Naproxen (als Methylester)

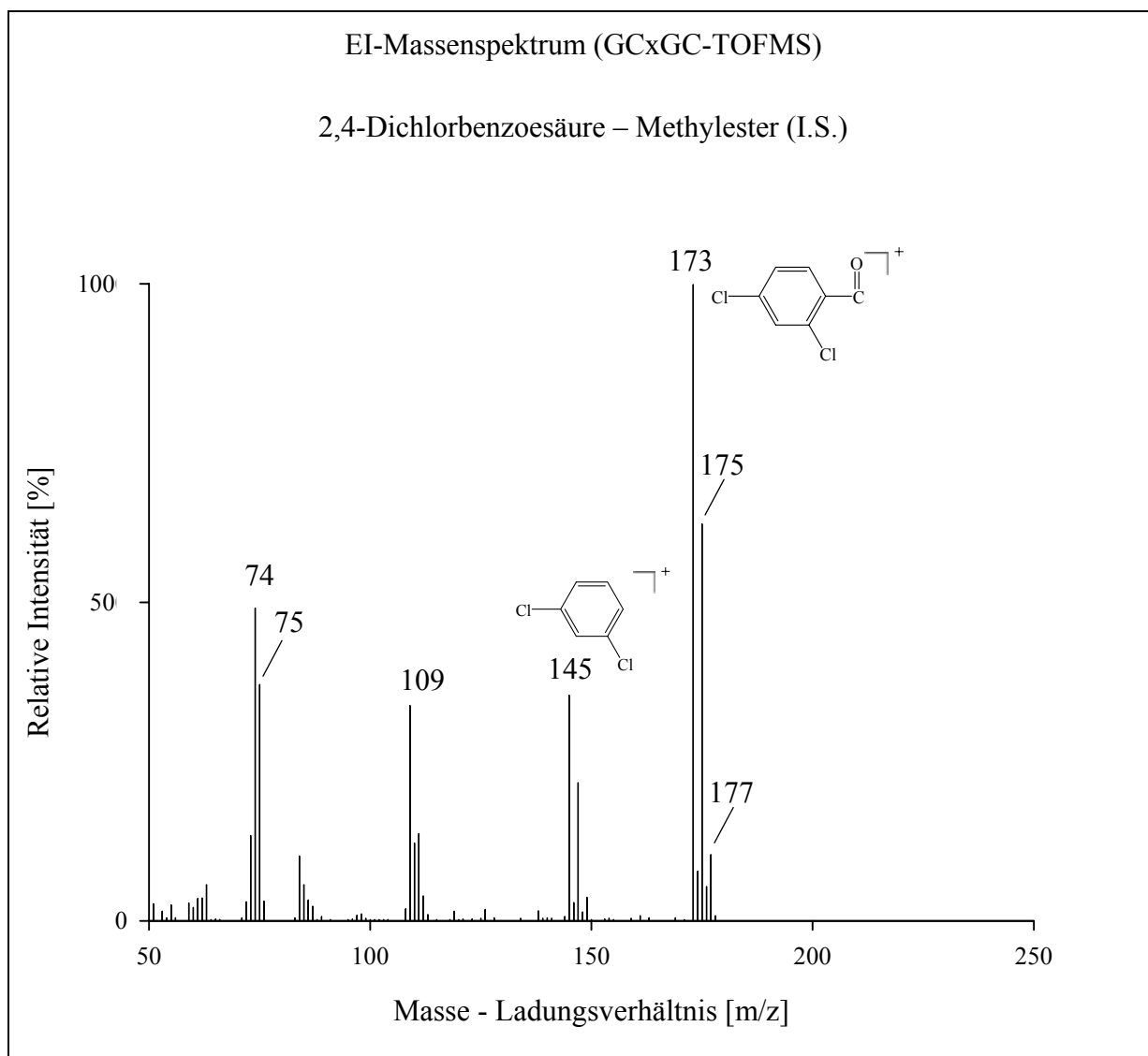


Abbildung 6.12: EI-Massenspektrum von 2,4-Dichlorbenzoesäure (als Methylester)

6.2 Retentionszeiten GCxGC-TOFMS

Arzneimittelwirkstoff	Retentionszeit der Methyl- derivate Säule 1 [s]	Retentionszeit der Methyl- derivate Säule 2 [s]
Indometacin	753	0,995
Clofibrinsäure	1095	1,165
Ibuprofen	1152	1,030
Gemfibrozil	1569	1,075
Naproxen	1797	1,360
Diclofenac	1974	1,645
Bezafibrat	2691	2,689
Interner Standard: 2,4-Dichlorbenzoesäure	972	1,095

Tabelle 6.1: Retentionszeiten der Methyl-derivate der Arzneimittelwirkstoffe

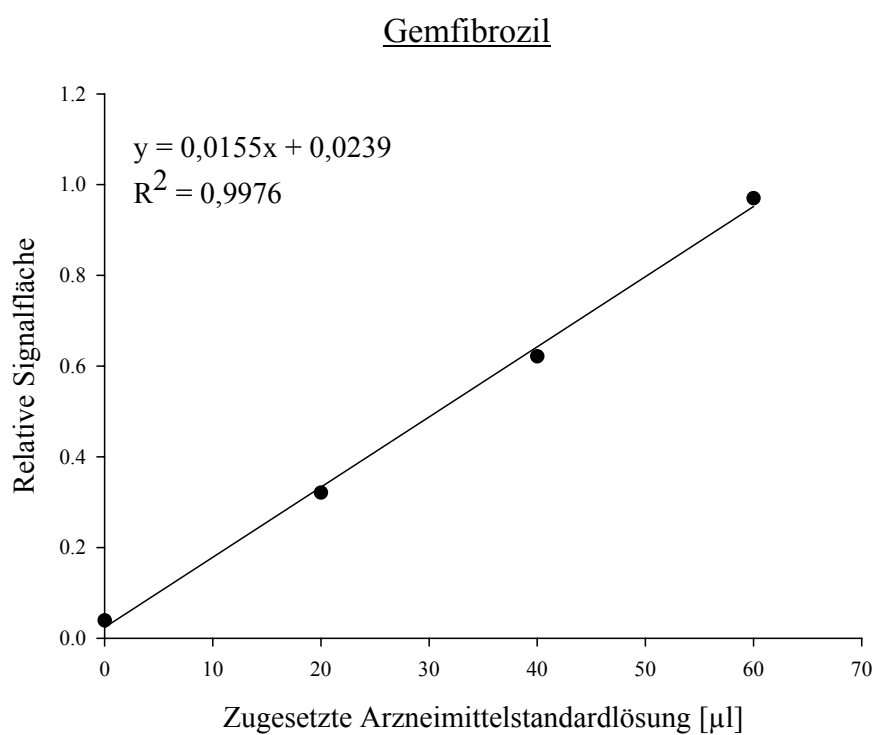
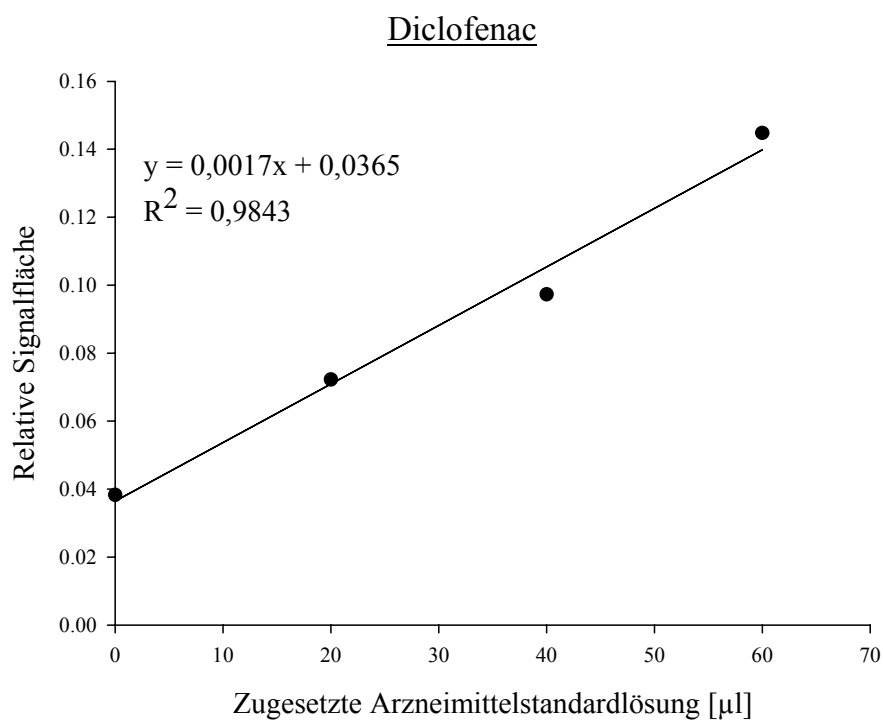
6.3 Zur Quantifizierung verwendete Fragmentionen bei der Analyse mittels GCxGC-TOFMS

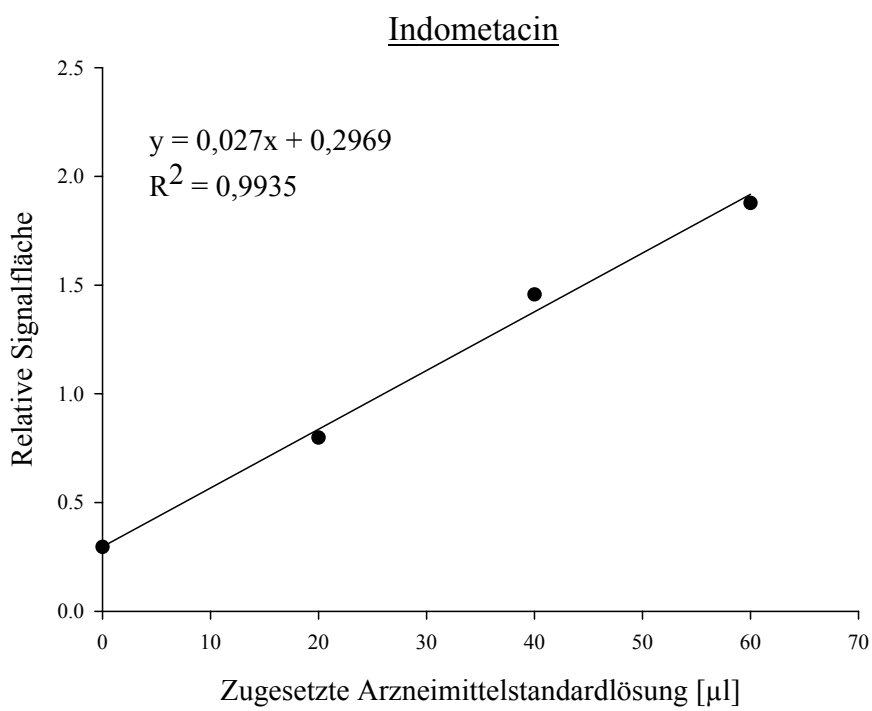
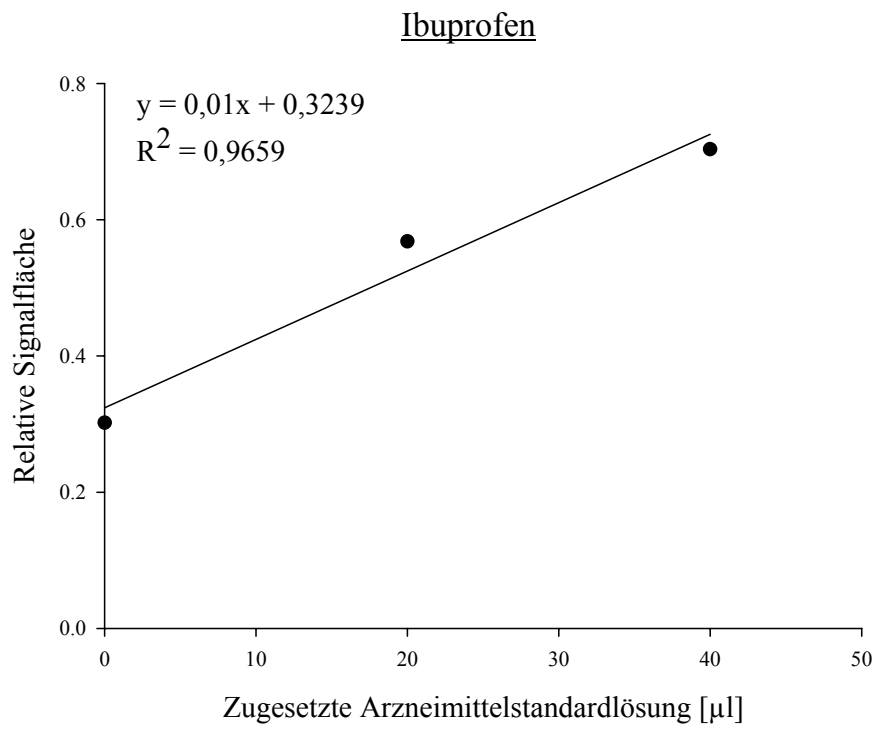
Verbindung	nachgewiesen als	charakteristische, für die Quantifizierung verwendete Fragmentionen [m/z]
Indometacin	Methylester	139
Clofibrinsäure	Methylester	128
Ibuprofen	Methylester	161
Gemfibrozil	Methylester	83
Naproxen	Methylester	185
Diclofenac	Methylester	214
Bezafibrat	Methylester	139
Interner Standard: 2,4-Dichlorbenzoesäure	Methylester	173

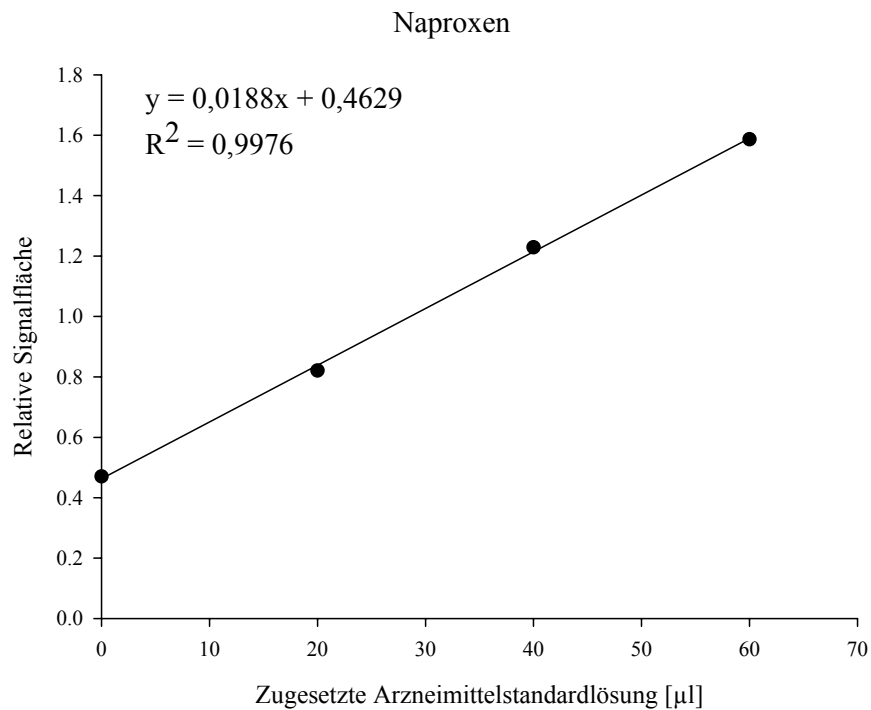
Tabelle 6.2: Für die Quantifizierung verwendete Fragmentionen (m/z) von Derivaten der untersuchten polaren Arzneimittelrückstände

6.4 Auswertung der Analysen mittels Standardadditionsverfahren

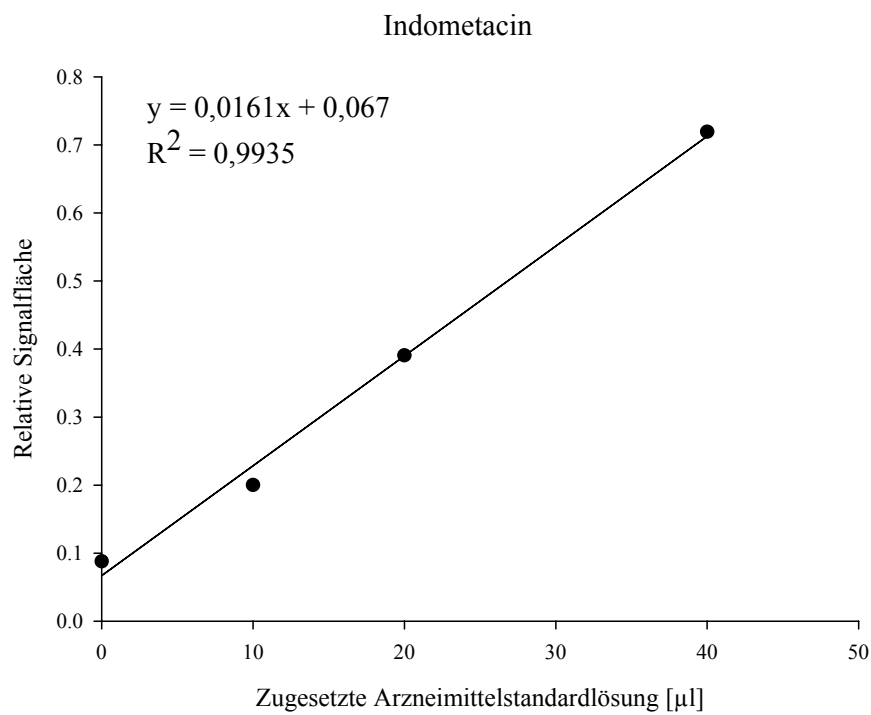
a) Kläranlagenablauf

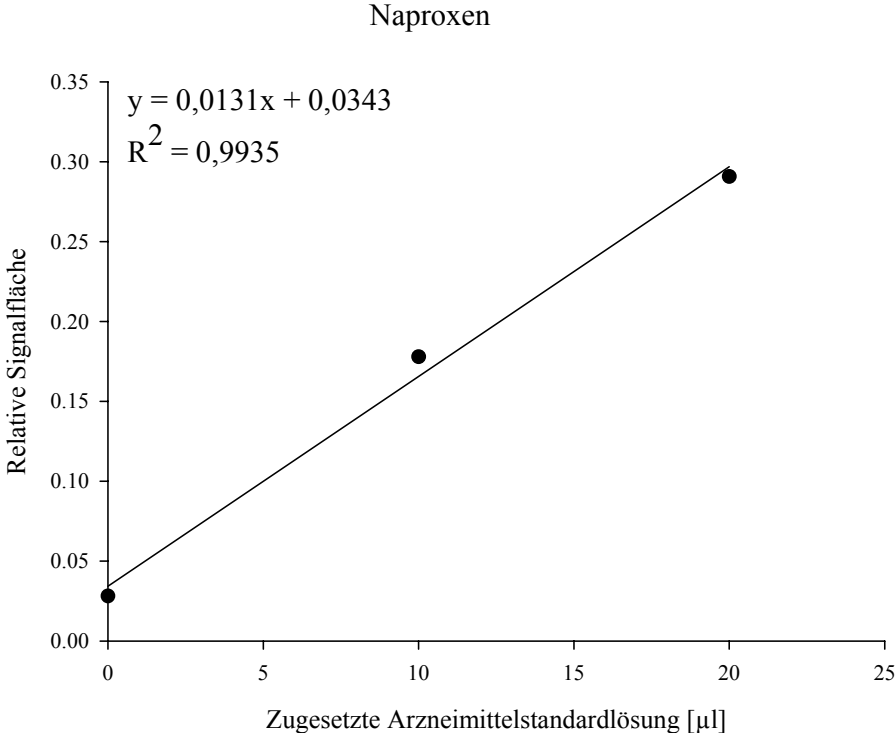






b) Rheinwasser





7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Potentielle Eintragswege von Arzneimitteln in die aquatische Umwelt.....	4
Abbildung 1.2: Verbrauch ausgewählter Arzneimittel des Jahres 1999 in kg Wirkstoff (BRD), die häufig als Rückstände in Wässern auftreten (Angaben nach IMS Health AG, Frankfurt/M. [34])	5
Abbildung 1.3: Ladungsverteilung an der Quarzoberfläche und Verlauf des Zeta-Potentials an der Grenzfläche Puffer/Quarz; a) Stern-Schicht, b) Gouy-Chapman-Schicht, c) Lösung	12
Abbildung 1.4: Schema eines GC-GC-Systems	16
Abbildung 1.5: Schema eines GCxGC-Systems mit Kryomodulator	17
Abbildung 1.6: Darstellung einer orthogonalen Trennung	18
Abbildung 3.1: Trennung der underivatisierten Wirkstoffe mittels CE.....	28
Abbildung 3.2: Benötigtes Elutionsmittelvolumen für Bond Elut C18-Kartuschen.....	33
Abbildung 3.3: Grundgerüste häufig verwendeter Fluorophore	39
Abbildung 3.4: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylen-diaminhydrochlorid (BODIPY [®] FL EDA).....	41
Abbildung 3.5: Darstellung der EDC-vermittelten Amidbildung aus Carbonsäure und Amin, aus [139].....	42
Abbildung 3.6: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionsäure-hydrazid (BODIPY [®] FL Hydrazid).....	44
Abbildung 3.7: Umsetzung von Naproxen und Clofibrinsäure mit BODIPY [®] FL Hydrazid unter CMC-Aktivierung; links: Probe, rechts: Blindprobe (HPLC-Trennung)	46
Abbildung 3.8: HPLC-Trennung einiger Wirkstoffprodukte mit BODIPY [®] FL EDA.....	48
Abbildung 3.9: Zusammensetzung der organischen Phase bei der Derivatisierung in einem Zweiphasen-System	51

Abbildung 3.10: Amidbildung aus Carbonsäuren und BODIPY [®] FL EDA unter DCC-Aktivierung und Phasentransfer	54
Abbildung 3.11: Lockspray der Firma Micromass	57
Abbildung 3.12: Säulenvergleich der HPLC-Trennung der derivatisierten Wirkstoffe mit einer LiChrospher [®] RP-18(e) 5 µm, 100 Å (oben) und einer J'sphere H 80 4 µm, 80 Å (unten)	60
Abbildung 3.13: Chromatogramm eines Arzneimittelwirkstoffstandards (links) und einer Blindprobe (rechts); Konzentration je Wirkstoff: 500 nM.....	62
Abbildung 3.14: MEKC der sieben Wirkstoffderivate (links) bzw. der entsprechenden Blindprobe (rechts).....	65
Abbildung 3.15: Strukturen der Gallensäuresalze.....	67
Abbildung 3.16: MEKC der sieben Wirkstoffderivate (links) bzw. der entsprechenden Blindprobe (rechts).....	67
Abbildung 3.17: MEKC der vier ausgewählten Wirkstoffderivate.....	69
Abbildung 3.18: Einfluss von Luftsauerstoff auf die Probenhaltbarkeit	71
Abbildung 3.19: Probenhaltbarkeit nach Überschichten mit Paraffin	72
Abbildung 3.20: Derivatisierung nach SPE (links); Standardkontrollprobe mit gleicher Arzneimittelwirkstoffkonzentration (rechts).....	74
Abbildung 3.21: 3,5 mL Isopropanol HPLC Gradient Grade, Fa. sds; eingedampft und derivatisiert (links); 3,5 mL Acetonitril HPLC Grade, Fa. Acros Organics; eingedampft und derivatisiert (rechts).....	75
Abbildung 3.22: 3,5 mL Acetonitril über mehrfach konditionierte abselut Nexus [®] -Kartusche gegeben (keine Probenlösung), eingedampft und derivatisiert	76
Abbildung 3.23: Modulator (links) und zweiter Ofen (rechts)	79

Abbildung 3.24: Reaktionsgleichungen für die Derivatisierung von Carbonsäuren mit TMSH	80
Abbildung 3.25: 2D-Gaschromatogramm einer Standardmischung der Arzneimittelwirkstoffe (nachgewiesen als Methylester)	85
Abbildung 3.26: 2D-Gaschromatogramm (TIC) des Kläranlagenablaufs der Versuchskläranlage Neuss vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18)	89
Abbildung 3.27: 2D-Gaschromatogramm der ausgewählten Massenfragmente des Kläranlagenablaufs der Versuchskläranlage Neuss vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18)	89
Abbildung 3.28: 2D-Gaschromatogramm (Contour Plot) des Kläranlagenablaufs der Versuchskläranlage Neuss vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18).	90
Abbildung 3.29: 2D-Gaschromatogramm (TIC) einer Rheinwasserprobe vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18).....	93
Abbildung 3.30: 2D-Gaschromatogramm der ausgewählten Fragmentmassen einer Rheinwasserprobe vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18).....	93
Abbildung 3.31: 2D-Gaschromatogramm (Contour Plot) einer Rheinwasserprobe vom 03.05.2005 nach SPE (Bond Elut C18).....	94
Abbildung 6.1: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Bezafibrat.....	110
Abbildung 6.2: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Clofibrinsäure	110
Abbildung 6.3: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Ibuprofen.....	111
Abbildung 6.4: Präzisionsmassenbestimmung von BODIPY-Naproxen.....	111
Abbildung 6.5: EI-Massenspektrum von Bezafibrat (als Methylester).....	112
Abbildung 6.6: EI-Massenspektrum von Clofibrinsäure (als Methylester)	113
Abbildung 6.7: EI-Massenspektrum von Diclofenac (als Methylester).....	114
Abbildung 6.8: EI-Massenspektrum von Gemfibrozil (als Methylester).....	115

Abbildung 6.9: EI-Massenspektrum von Ibuprofen (als Methylester)	116
Abbildung 6.10: EI-Massenspektrum von Indometacin (als Methylester)	117
Abbildung 6.11: EI-Massenspektrum von Naproxen (als Methylester)	118
Abbildung 6.12: EI-Massenspektrum von 2,4-Dichlorbenzoesäure (als Methylester)	119

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Gekürzte Übersicht über in Fließgewässern bereits nachgewiesenen Arzneimittelwirkstoffe	6
Tabelle 3.1 Wiederfindungsraten von Ibuprofen (20 mL, 1 mM) bei der Festphasenextraktion	29
Tabelle 3.2: Optimierte Bedingungen für die SPE mittels absolut Nexus [®] -Kartuschen.....	31
Tabelle 3.3: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mit absolut Nexus [®] -Kartuschen	32
Tabelle 3.4: Optimierte Bedingungen für die SPE mittels Bond Elut C18-Kartuschen	34
Tabelle 3.5: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mit Bond Elut C18-Kartuschen	35
Tabelle 3.6: Optimierte Bedingungen für die Probenanreicherung mittels Alltech Platinum Rocket HPLC-Säule	35
Tabelle 3.7: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mit der Alltech Platinum Rocket HPLC-Säule	36
Tabelle 3.8: Derivatisierungsansatz nach <i>WÖRTH et al.</i> [142].....	43
Tabelle 3.9: Derivatisierungsbedingungen in wässriger Lösung, modifiziert nach <i>MANK et al.</i> [147]	45
Tabelle 3.10: Derivatisierungsbedingungen in organischer Lösung, modifiziert nach <i>MANK et al.</i> [147].....	46
Tabelle 3.11: Optimierte Derivatisierungsbedingungen in organischer Lösung.....	47
Tabelle 3.12: Reaktionsbedingungen für die Zweiphasen-Reaktion	49
Tabelle 3.13: Optimierte Reaktionsbedingungen mit anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	53

Tabelle 3.14: Optimierte Reaktionsbedingungen im Zweiphasen-System bei geringen Arzneimittelkonzentrationen.....	56
Tabelle 3.15: Vergleich berechneter, gemessener und korrigierter Präzisionsmassen (ESI-negativ).....	58
Tabelle 3.16: Optimierte Bedingungen für die HPLC-Trennung der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe	61
Tabelle 3.17: Bedingungen für die MEKC-Trennung der fluoreszenzmarkierten Arzneimittelwirkstoffe	69
Tabelle 3.18: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe mittels GCxGC-TOFMS.....	84
Tabelle 3.19: Im Kläranlagenablauf ermittelte Wirkstoffkonzentrationen (Versuchskläranlage Neuss, 03.05.2005), GCxGC-TOFMS-Analyse.....	88
Tabelle 3.20: In einer Rheinwasserprobe ermittelte Wirkstoffkonzentrationen, bestimmt mittels GCxGC-TOFMS	92
Tabelle 3.21: Abgeschätzte Nachweisgrenzen der Arzneimittelwirkstoffe, bestimmt mittels GCxGC-TOFMS	95
Tabelle 6.1: Retentionszeiten der Methylderivate der Arzneimittelwirkstoffe.....	120
Tabelle 6.2: Für die Quantifizierung verwendete Fragmentionen (m/z) von Derivaten der untersuchten polaren Arzneimittelrückstände.....	120

9 Literatur

- [1] Halling-Sorensen B., Nielsen S., Lanzky P. F., Ingerslew F., Holten Lützhof H. C., Jorgensen S. E.; Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - a Review.
Chemosphere 36, 357-393. 1998.
- [2] Stumpf M., Ternes T. A., Wilken R.-D., Rodrigues S., Baumann W.; Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil.
The Science of the Total Environment 225, 135-141. 1999.
- [3] Jorgensen S. E., Halling-Sorensen B.; Drugs in the environment.
Chemosphere 40[7], 691-699. 2000.
- [4] Roßknecht H., Hetzenauer H., Ternes T. A.; Arzneimittel im Bodensee?
Nachrichten aus der Chemie 49[2], 145-149. 2001.
- [5] Kümmerer, K.; Pharmaceuticals in the Environment - Sources, Fate, Effects and Risks.
Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York; 2001.
- [6] Kolpin D. W., Furlong E. T., Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S. D., Barber L. B., Buxton H. T.; Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance.
Environmental Science & Technology 36[6], 1202-1211. 2002.
- [7] Tabac H. H., Bunch R. L.; Steroid hormones as water pollutants I: Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage.
Developments in Industrial Microbiology 11, 367-376. 1970.
- [8] Norporth K., Nehr Korn A., Kirchner M., Holsten H., Teipel H.; Untersuchungen zur Frage der Löslichkeit und Stabilität ovulationshemmender Steroide in Wasser, Abwässern und Belebtschlamm.
Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene I. Abt. Orig. 156[B], 500-511. 1973.
- [9] Richardson M. L., Bowron J. M.; The Fate of Pharmaceutical Chemicals in the Aquatic Environment - A Review.
Journal of Pharmaceutical Pharmacology 37, 1-12. 1985.
- [10] Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N.; Analytical method development for the simultaneous determination of five human pharmaceuticals in water and wastewater samples by gas chromatography-mass spectrometry.
Chromatographia 58[7-8], 471-477. 2003.

-
- [11] Stumpf M., Ternes T. A., Haberer K., Seel P., Baumann W.; Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern.
Vom Wasser 86, 291-303. 1996.
- [12] Miao X. S., Bishay F., Chen M., Metcalfe C. D.; Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada.
Environmental Science & Technology 38[13], 3533-3541. 2004.
- [13] Stan H. J., Heberer T., Linkerhäger M.; Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System - Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser?
Vom Wasser 83, 57-68. 1994.
- [14] Heberer T., 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.
Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 26[5], 272-278. 1998.
- [15] Heberer T., Stan H. J.; Vorkommen von polaren organischen Kontaminanten im Berliner Trinkwasser.
Vom Wasser 86, 19-31. 1996.
- [16] Diaz-Cruz M. S., de Alda M. J. L., Barcelo D.; Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge.
Trends in Analytical Chemistry 22[(6)], 340-351. 2003.
- [17] Schlusener M. P., Bester K., Spitteller M.; Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS.
Analytical and Bioanalytical Chemistry 375[7], 942-947. 2003.
- [18] Hamscher G., Sczesny S., Abu-Qare A., Hoper H., Nau H.; Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: Identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 107[8], 332-334. 2000.
- [19] Webb S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak K.; Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water.
Toxicology Letters 142[3], 157-167. 2003.
- [20] Daughton C. G., Ternes T. A.; Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?
Environmental Health Perspectives 107[Suppl. 6], 907-938. 1999.

- [21] Laville N., Ait-Aissa S., Gomez E., Casellas C., Porcher J. M.; Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes.
Toxicology 196[1-2], 41-55. 2004.
- [22] Kohnen W., Schön-Hölz K., Schwartz T., Volkmann H., Rissler K., Wurz A., Obst U., Jansen B.; Bewertung von pharmazeutischen Reststoffen in der Umwelt: Vorkommen - Gefährdungspotential - Techniken zur Eliminierung.
Bremer Colloquium Produktionsintegrierte Wasser- / Abwassertechnik: B-51-B-60. 2004.
- [23] Stan H. J., Heberer T.; Pharmaceuticals in the aquatic environment.
Water Analysis , 20-23. 1996.
- [24] Ternes T. A.; Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.
Water Research 32[11], 3245-3260. 1998.
- [25] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Körting, M.; Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart; 2001.
- [26] Heberer T., Dünnbier U., Reilich Ch., Stan H. J.; Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant.
Fresenius Environmental Bulletin 6, 438-443. 1997.
- [27] Berger Ch., Lohaus J., Wittner A., Schäfer R.; Zustand der Kanalisation in Deutschland - Ergebnisse der ATV-DVWK-Umfrage 2001.
ATV-DVWK Hauptgeschäftsstelle . 2001.
- [28] Ternes T. A.; Abbau und Verhalten von Pharmaka in aquatischen Systemen.
Schriftenreihe Wasserforschung 6, 23-33. 2000.
- [29] Heberer T.; Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.
Toxicology Letters 131[1-2], 5-17. 2002.
- [30] Ahrer W., Buchberger W.; Analysis of acidic pharmaceutical drug residues in surface water by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry.
American Laboratory 33[24], 31-35. 2001.
- [31] Ahrer W., Scherwenk E., Buchberger W.; Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry.
Journal of Chromatography A 910[(1)], 69-78. 2001.

- [32] Flaherty S., Wark S., Street G., Farley J. W., Brumley W. C.; Investigation of capillary electrophoresis-laser induced fluorescence as a tool in the characterization of sewage effluent for fluorescent acids: Determination of salicylic acid.
Electrophoresis 23[14], 2327-2332. 2002.
- [33] Macia A., Borrull F., Aguilar C., Calull M.; Improving sensitivity by large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis in water samples.
Electrophoresis 24[16], 2779-2787. 2003.
- [34] Institut für medizinische Statistik, Frankfurt/M; Intercontinental Marketing Services Health: Index of Drug Chemicals Germany 1996 - 1999.
Institut für medizinische Statistik . 1999.
- [35] Soulet B., Tauxe A., Tarradellas J.; Analysis of acidic drugs in Swiss wastewaters.
International Journal of Environmental Analytical Chemistry 82[10], 659-667. 2002.
- [36] Reverte S., Borrull F., Pocurull E., Marce R. M.; Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry.
Journal of Chromatography A 1010[2], 225-232. 2003.
- [37] Hirsch R., Ternes T. A., Haberer K., Kratz K.-L.; Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.
The Science of the Total Environment 225, 109-118. 1999.
- [38] Loos R., Eisenreich S. J., Hanke G.; Multi-component analysis of polar water pollutants using sequential solid-phase extraction followed by LC-ESI-MS.
Journal of Environmental Monitoring 5[(3)], 384-394. 2003.
- [39] Hirsch R., Ternes T. A., Haberer K., Kratz K.-L.; Nachweis von Betablockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt.
Vom Wasser 87, 263-274. 1996.
- [40] Sacher F., Lange F. T., Brauch H.-J., Blankenhorn I.; Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany.
Journal of Chromatography A 938, 199-210. 2001.
- [41] Ternes T. A., Hirsch R.; Occurrence and Behaviour of X-ray Contrast Media in Sewage Facilities and the Aquatic Environment.
Environmental Science & Technology 34, 2741-2748. 2000.

- [42] Hirsch R., Ternes T. A., Lindart A., Haberer K., Wilken R.-D.; A sensitive method for the determination of iodine containing diagnostic agents in aqueous matrices using LC-electrospray-tandem-MS detection.
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 366, 835-841. 2000.
- [43] Kümmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M.; Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage.
Water Research 31[11], 2705-2710. 1997.
- [44] Roth, H. J., Fenner, H.; Lipidsenkende Wirkstoffe. Arzneistoffe Struktur - Bioreaktivität - Wirkungsbezogene Eigenschaften; Kapitel 30.
Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York; 1994.
- [45] Tswett M. S.; Physikalische-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen.
Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 24, 316-323. 1906.
- [46] Tswett M. S.; Adsorption Analyse und Chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.
Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 24, 384. 1906.
- [47] Martin A. J. P., Synge R. L. M.; A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins.
Biochemistry Journal 35, 1358-1368. 1941.
- [48] Horváth C., Lipsky S. R.; Use of Liquid Ion-Exchange Chromatography for the Separation of Organic Compounds.
Nature 211, 748-749. 1966.
- [49] Skoog, D. A.; Leary, J. L.; Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen.
Springer Verlag: Berlin; 1996.
- [50] Bauer, H.; Hochleistungsflüssigchromatographie. In: Untersuchungsmethoden in der Chemie; Nauer, H., Heller, W., Eds.; Kapitel 4.
Wiley-VCH: Weinheim; 1996.
- [51] Hjertén S.; Free zone electrophoresis.
Chromatographic Reviews 9, 122-239. 1967.
- [52] Mikkers F. E. P., Everaerts F. M., Verheggen Th. P. E. M.; High-Performance Zone Electrophoresis.
Journal of Chromatography 169, 11-20. 1979.

-
- [53] Jorgenson J. W., Lucaks K. D.; High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis.
Journal of Chromatography 218[209], 216. 1981.
- [54] Gassmann E., Kuo J. E., Zare R. N.; Electrokinetic Separation of Chiral Compounds.
Science 230, 813-814. 1985.
- [55] Olivares J. A., Nguyen N. T., Yonker C. R., Smith R. D.; On-Line Mass Spectrometric Detection for Capillary Electrophoresis.
Analytical Chemistry 59, 1230-1232. 1987.
- [56] Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.; Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten.
Vieweg Verlag; Braunschweig/Wiesbaden, 1994.
- [57] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.; Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries.
Analytical Chemistry 56, 111-113. 1984.
- [58] Terabe S., Otsuka K., Ando T.; Electrokinetic Chromatography with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries.
Analytical Chemistry 57, 834-841. 1985.
- [59] Hinze, W. L. Ordered Media in Chemical Separations. Hinze, W. L., Armstrong, D. W., Eds.
American Chemical Society: Washington DC, 1987.
- [60] Kuhn, R.; Hofstetter-Kuhn, S.; Capillary Electrophoresis: Principles and Practice.
Springer Verlag: Berlin; 1993.
- [61] Muijselaar P. G., Otsuka K., Terabe S.; Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography.
Journal of Chromatography A 780[1-2], 41-61. 1997.
- [62] Khaledi M. G.; Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective.
Journal of Chromatography A 780[1-2], 3-40. 1997.
- [63] Khaledi, M. G.; Micellar Electrokinetic Chromatography: Theory, Techniques, and Applications. In *High Performance Capillary Electrophoresis*; Khaledi, M. G., Ed.; Kapitel 3.
John Wiley & Sons: New York; 1998.

- [64] Chankvetadze B., Endresz C., Blaschke G.; Capillary electrophoresis enantioseparation of non-charged and anionic chiral compounds using anionic cyclodextrin derivatives as chiral selectors.
Journal of Capillary Electrophoresis 2[5], 235-240. 1995.
- [65] Otsuka K., Terabe S.; Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants.
Journal of Chromatography A 875[1-2], 163-178. 2000.
- [66] Oehrlé S. A.; Controlled changes in selectivity of cation separations by capillary electrophoresis using various crown-ether additives.
Journal of Chromatography A 745[1-2], 87-92. 1996.
- [67] Fanali S.; Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation.
Journal of Chromatography A 792[1-2], 227-267. 1997.
- [68] Blomberg J., Schoenmakers P. J., Beens J., Tijssen R.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) and its applicability to the characterization of complex (petrochemical) mixtures.
Journal of High Resolution Chromatography 20[10], 539-544. 1997.
- [69] Schoenmakers P. J., Oomen J. L. M. M., Blomberg J., Genuit W., van Velzen G.; Comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography - mass spectrometry for the characterization of complex hydrocarbon mixtures.
Journal of Chromatography A 892[1-2], 29-46. 2000.
- [70] Lu X., Cai J. L., Kong H. W., Wu M., Hua R. X., Zhao M. Y., Liu J. F., Xu G. W.; Analysis of cigarette smoke condensates by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry I acidic fraction.
Analytical Chemistry 75[17], 4441-4451. 2003.
- [71] Schomburg G.; 2-Dimensional Gas-Chromatography - Principles, Instrumentation, Methods.
Journal of Chromatography A 703[1-2], 309-325. 1995.
- [72] Phillips J. B., Beens J.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions.
Journal of Chromatography A 856[1-2], 331-347. 1999.
- [73] Simmons M. C., Snyder L. R.; 2-Stage Gas-Liquid Chromatography.
Analytical Chemistry 30[1], 32-35. 1958.
- [74] MacNamara K., Leardi R., Hoffmann A.; Developments in 2-D gas chromatography with heartcutting.
Lc Gc North America , 82-91. 2004.

- [75] de Alencastro L. F., Grandjean D., Tarradellas J.; Application of multidimensional (heart-cut) gas chromatography to the analysis of complex mixtures of organic pollutants in environmental samples.
Chimia 57[9], 499-504. 2003.
- [76] Deans D. R.; A new technique for heart cutting in gas chromatography.
Chromatographia 1, 18-22. 1968.
- [77] Bertsch W.; Two-dimensional gas chromatography. concepts, instrumentation, and applications - Part 1: Fundamentals, conventional two-dimensional gas chromatography, selected applications.
Journal of High Resolution Chromatography 22[12], 647-665. 1999.
- [78] Liu Z., Phillips J. B.; Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface.
Journal of Chromatographic Science 29, 227-231. 1991.
- [79] Giddings, J. C.; Multidimensional Chromatography - Techniques and Applications.
Marcel Dekker Inc.: New York; 1990.
- [80] Venkatramani C. J., Xu J. Z., Phillips J. B.; Separation orthogonality in temperature-programmed comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Analytical Chemistry 68[9], 1486-1492. 1996.
- [81] Dallüge J., van Rijn M., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts.
Journal of Chromatography A 965[1-2], 207-217. 2002.
- [82] Dallüge J., Beens J., Brinkman U. A. T.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool.
Journal of Chromatography A 1000[1-2], 69-108. 2003.
- [83] de Geus H. J., de Boer J., Phillips J. B., Ledford E. B., Brinkman U. A. T.; Increased signal amplitude due to mass conservation in a thermal desorption modulator.
Journal of High Resolution Chromatography 21[7], 411-413. 1998.
- [84] Pursch M., Sun K., Winniford B., Cortes H., Weber A., McCabe T., Luong J.; Modulation techniques and applications in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC).
Analytical and Bioanalytical Chemistry 373[6], 356-367. 2002.
- [85] Kinghorn R. M., Marriott P. J.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a modulating cryogenic trap.
Journal of High Resolution Chromatography 21[11], 620-622. 1998.

-
- [86] Kinghorn R. M., Marriott P. J., Dawes P. A.; Longitudinal modulation studies for augmentation of injection and detection in capillary gas chromatography.
Journal of Microcolumn Separations 10[7], 611-616. 1998.
- [87] Marriott P. J., Kinghorn R. M.; Modulation and manipulation of gas chromatographic bands by using novel thermal means.
Analytical Sciences 14[4], 651-659. 1998.
- [88] Kinghorn R. M., Marriott P. J.; High speed cryogenic modulation - A technology enabling comprehensive multidimensional gas chromatography.
Journal of High Resolution Chromatography 22[4], 235-238. 1999.
- [89] Lee A. L., Lewis A. C., Bartle K. D., McQuaid J. B., Marriott P. J.; A comparison of modulating interface technologies in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC).
Journal of Microcolumn Separations 12[4], 187-193. 2000.
- [90] Beens J., Adahchour M., Vreuls R. J. J., van Altena K., Brinkman U. A. T.; Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A 919[1], 127-132. 2001.
- [91] Adahchour M., Beens J., Vreuls R. J. J., Batenburg A. M., Rosing E. A. E., Brinkman U. A. T.; Application of solid-phase micro-extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) for flavour analysis.
Chromatographia 55[5-6], 361-367. 2002.
- [92] Shellie R., Mondello L., Marriott P., Dugo G.; Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography.
Journal of Chromatography A 970[1-2], 225-234. 2002.
- [93] Dallüge J., van Stee L. L. P., Xu X. B., Williams J., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T.; Unravelling the composition of very complex samples by comprehensive gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry - Cigarette smoke.
Journal of Chromatography A 974[1-2], 169-184. 2002.
- [94] Zrostlikova J., Hajslova J., Cajka T.; Evaluation of two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit.
Journal of Chromatography A 1019[1-2], 173-186. 2003.
- [95] Harju M., Haglund P.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) of atropisomeric PCBs, combining a narrow bore beta-cyclodextrin column and a liquid crystal column.
Journal of Microcolumn Separations 13[7], 300-305. 2001.

- [96] van Stee L. L. R., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography with atomic emission detection and correlation with mass spectrometric detection: principles and application in petrochemical analysis.
Journal of Chromatography A 1019[1-2], 89-99. 2003.
- [97] Huppert N., Wurtele M., Hahn H. H.; Determination of the plasticizer N-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical Ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME).
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 362[6], 529-536. 1998.
- [98] Gonzalez-Barreiro C., Lores M., Casais M. C., Cela R.; Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater by high-performance liquid chromatography-post-column photochemically induced fluorimetry.
Journal of Chromatography A 993[1-2], 29-37. 2003.
- [99] Pico Y., Rodriguez R., Manes J.; Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues.
Trends in Analytical Chemistry 22[3], 133-151. 2003.
- [100] Chiron S., Alba A. F., Barcelo D.; Comparison of Online Solid-Phase Disk Extraction to Liquid-Liquid-Extraction for Monitoring Selected Pesticides in Environmental Waters.
Environmental Science & Technology 27[12], 2352-2359. 1993.
- [101] Belardi R. G., Pawliszyn J.; The application of chemically modified fused silica fibres in extraction of organics from water matrix samples, and their rapid transfer to capillary column.
Water Pollution Research Journal of Canada 24, 179-191. 1989.
- [102] Lord H., Pawliszyn J.; Evolution of solid-phase microextraction technology.
Journal of Chromatography A 885, 153-193. 2000.
- [103] Smith R. M.; Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques.
Journal of Chromatography A 1000[(1-2)], 3-27. 2003.
- [104] Hennion M. C., Pichon V.; Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water.
Environmental Science & Technology 28[13], 576A-583A. 1994.
- [105] Pichon V., Charpak M., Hennion M. C.; Multiresidue analysis of pesticides using new laminar extraction disks and liquid chromatography and application to the French priority list.
Journal of Chromatography A 795[1], 83-92. 1998.
- [106] Larrivee M. L., Poole C. F.; Solvation Parameter Model for the Prediction of Breakthrough Volumes in Solid-Phase Extraction with Particle-Loaded Membranes.
Analytical Chemistry 66[1], 139-146. 1994.

- [107] Jung M., Brumley W. C.; Trace Analysis of Fluorescein-Derivatized Phenoxy Acid Herbicides by Micellar Electrokinetic Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection.
Journal of Chromatography A 717[1-2], 299-308. 1995.
- [108] Ternes T. A.; Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.
Trends in Analytical Chemistry 20[8], 419-434. 2001.
- [109] Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N.; Verhalten ausgewählter Arzneimittel bei der künstlichen Grundwasseranreicherung - Eliminierung und Effekte auf die mikrobielle Besiedlung.
Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 29[5], 269-277. 2001.
- [110] La Farre M., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barcelo D.; Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*.
Journal of Chromatography A 938[1-2], 187-197. 2001.
- [111] Jux U., Baginsky R. M., Arnold H.-G., Krönke M., Seng P. N.; Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings.
International Journal Hygiene Environmental Health 205, 393-398. 2002.
- [112] Bratton K. D., Lillquist A. S., Williams T. D., Lunte C. E.; The determination and quantification of human pharmaceuticals in aqueous environmental samples.
Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Ms/Ms and Time-Of-Flight Ms 850, 188-206. 2003.
- [113] Oellers S., Singer H. P., Faessler P., Mueller S. R.; Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water.
Journal of Chromatography A 911[2], 225-234. 2001.
- [114] Marchese S., Perret D., Gentili A., Curini R., Pastori F.; Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Chromatographia 58[5-6], 263-269. 2003.
- [115] Tixier C., Singer H. P., Oellers S., Muller S. R.; Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters.
Environmental Science & Technology 37[6], 1061-1068. 2003.
- [116] Scherwenk E.; Probenanreicherungsverfahren für die Spurenanalytik von Arzneimitteln in Wässern.
Diplomarbeit, Johannes-Kepler-Universität Linz: Österreich; 2000.

- [117] Wiegel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Löffler J., Reincke H., Schmidt R., Stachel B., von Tumpling W., Wanke A.; Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries.
Chemosphere 57[2], 107-126. 2004.
- [118] Heberer T.; Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water.
Journal of Hydrology 266[3-4], 175-189. 2002.
- [119] Puig D., Barcelo D.; Off-Line and Online Solid-Phase Extraction Followed by Liquid-Chromatography for the Determination of Priority Phenols in Natural-Waters.
Chromatographia 40[7-8], 435-444. 1995.
- [120] Pirker R., Huck C. W., Popp M., Bonn G. K.; Simultaneous determination of gentisic, salicylic and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry.
Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 809[2], 257-264. 2004.
- [121] Barcelo D., Chiron S., Lacorte S., Martinez E., Salau J. S., Hennion M. C.; Solid-Phase Sample Preparation and Stability of Pesticides in Water Using Empore Disks.
Trends in Analytical Chemistry 13[9], 352-361. 1994.
- [122] Hennion M. C.; Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.
Journal of Chromatography A 856[1-2], 3-54. 1999.
- [123] Pichon V., Coumes C. C. D., Chen L., Guenu S., Hennion M. C.; Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides.
Journal of Chromatography A 737[1], 25-33. 1996.
- [124] Guenu S., Hennion M. C.; Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides.
Journal of Chromatography A 737[1], 15-24. 1996.
- [125] Arcelloni C., Lanzi R., Pedercini S., Molteni G., Fermo I., Pontiroli A., Paroni R.; High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction.
Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 763[1-2], 195-200. 2001.
- [126] Mukherjee P. S., Karnes H. T.; Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acids suitable for high performance liquid chromatography: A review.
Biomedical Chromatography 10[5], 193-204. 1996.

- [127] Lingeman, H.; Underberg, W. J. M.; Derivatization in Liquid Chromatography: Introduction. In Detection Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography; Lingeman, H., Underberg, W. J. M., Eds.; Kapitel 1.
Marcel Dekker Inc.: New York; 1990.
- [128] Wörth C. C. T.; Entwicklung eines Nachweis-Verfahrens für DNA-Addukte basierend auf Fluoreszenzderivatisierung und kapillarelektrophoretischer Trennung.
Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität: Heidelberg; 2000.
- [129] Haughland R. P.; "Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th Edition".
Molecular Probes Inc.: Eugene, USA; 2002.
- [130] Treibs A., Kreuzer F.-H.; Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrolmethenen.
Liebigs Ann.Chem. 718, 208. 1968.
- [131] Karolin J., Johansson L. B. A., Strandberg L., Ny T.; Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid-Membranes, and Proteins.
Journal of the American Chemical Society 116[17], 7801-7806. 1994.
- [132] Iwata T., Hirose T., Nakamura M., Yamaguchi M.; 4-(1-Methylphenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)-benzohydrazine as Derivatization Reagent for Carboxylic Acids in High-performance Liquid Chromatography With Conventional and Laser-induced Fluorescence Detection.
The Analyst 119, 1747-1751. 1994.
- [133] Nakashima K., Taguchi Y., Kuroda N., Akiyama S., Duan G.; 2-(4-Hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole as a versatile fluorescent derivatization reagent for the high-performance liquid chromatographic analysis of free fatty acids.
Journal of Chromatography 619, 1-8. 1993.
- [134] Goto, J.; Fluorescence Derivatization. In Detection Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography; Lingeman, H., Underberg, W. J. M., Eds.; Kapitel 9.
Marcel Dekker Inc.: New York; 1990.
- [135] Bardelmeijer H. A., Lingeman H., de Ruiter C., Underberg W. J. M.; Review: Derivatization in capillary electrophoresis.
Journal of Chromatography A 807, 3-26. 1998.
- [136] Sheehan J. C., Hess G.; A New Method of Forming Peptide Bonds.
Journal of the American Chemical Society 77, 1067-1068. 1955.

- [137] König W., Geiger R.; Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen.
Chemische Berichte 103, 788-798. 1970.
- [138] Ohkura Y., Kai M., Nohta H.; Fluorogenic Reactions for Biomedical Chromatography.
Journal of Chromatography B-Biomedical Applications 659[1-2], 85-107. 1994.
- [139] Hermanson, G. T.; Bioconjugate Techniques.
Academic Press: San Diego; 1996.
- [140] Lundblad, R. L., Noyes, C. M.; In: Chemical Reagents for Protein Modification. Kapitel 4.
Boca Raton; 1984.
- [141] Schmitz O. J., Wörth C. C. T., Stach D., Wiessler M.; Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis.
Angewandte Chemie-International Edition 41[3], 445-448. 2002.
- [142] Sheehan J. C., Cruickshank P. A., Boshart G. L.; A convenient synthesis of water soluble carbodiimides.
Journal of Organic Chemistry 26, 2525-2528. 1961.
- [143] Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A.; Modification of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solution.
Nucleosides & Nucleotides 6[3], 913-934. 1987.
- [144] Niwa R., Konana R., Hiramatsu M., Kamada H.; Synthesis for Spin Labels for ESR Imaging of Living Rat Head.
Chemical and Pharmaceutical Bulletin 45[5], 923-927. 1997.
- [145] Beck R. A., Munch-Petersen B., Dölker M., Cloos L., Tyrsted G., Eger K.; Ligands for the affinity chromatography of mammalian thymidine kinase 1: Strategy, synthesis and evaluation.
Pharmaceutical Acta Helvetiae 71, 279-291. 1996.
- [146] Nakamura K., Kuramitsu R., Kataoka S., Segawa D., Tahara K., Tamura M., Okai H.; Convenient Synthesis of L-Ornithalaurine*HCl and the Effect on Saltiness in a Food Material.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 2481-2485. 1996.
- [147] Mank A. J. G., Beekman M. C., Velthorst N. H., Brinkman U. A. Th., Lingeman H., Gooijer C.; Column liquid chromatography with diode laser-induced fluorescence detection of carboxylic acids after pre-column derivatisation.
Analytica Chimica Acta 315, 209-216. 1995.

- [148] Gallaher D. L. Jr., Johnson M. E.; Development of near-infrared fluorophoric labels for the determination of fatty acids separated by capillary electrophoresis with diode laser fluorescence detection.
The Analyst 124, 1541-1546. 1999.
- [149] Kibler M., Bächmann K.; New derivatization method for carboxylic acids in aqueous solution for analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.
Journal of Chromatography A 836[2], 325-331. 1999.
- [150] Cai B., Li J.; Evaluation of trifluoroacetic acid as an ion-pair reagent in the separation of small ionizable molecules by reversed-phase liquid chromatography.
Analytica Chimica Acta 399, 249-258. 1999.
- [151] Skocir E., Vindevogel J., Sandra P.; Separation of 23 Dansylated Amino-Acids by Micellar Electrokinetic Chromatography at Low-Temperature.
Chromatographia 39[1-2], 7-10. 1994.
- [152] Altria K. D., Howells J. S.; Quantitative-Determination of Organic-Solvents by Capillary Electrophoresis Using Indirect Uv Detection.
Journal of Chromatography A 696[2], 341-348. 1995.
- [153] Macka M., Haddad P. R., Buchberger W.; Separation of Some Metallochromic Ligands by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography.
Journal of Chromatography A 706[1-2], 493-501. 1995.
- [154] Guttman A., Paulus A., Cohen A. S., Grinberg N., Karger B.; Use of complexing agents for selective separation in high-performance capillary electrophoresis. Chiral resolution via cyclodextrins incorporated within polyacrylamide gel columns.
Journal of Chromatography [448], 41-53. 1988.
- [155] Fanali S.; Separation of optical isomers by capillary zone electrophoresis using host-guest complexation with cyclodextrins.
Journal of Chromatography [474], 441-446. 1989.
- [156] Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.; Chiral Separation of Diltiazem, Trimetoquinol and Related-Compounds by Micellar Electrokinetic Chromatography with Bile-Salts.
Journal of Chromatography 515, 233-243. 1990.
- [157] Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.; Separation and Determination of Lipophilic Corticosteroids and Benzothiazepin Analogs by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Bile-Salts.
Journal of Chromatography 513, 279-295. 1990.

- [158] Schmitt T., Engelhardt H.; Charged and Uncharged Cyclodextrins As Chiral Selectors in Capillary Electrophoresis.
Chromatographia 37[9-10], 475-481. 1993.
- [159] Chankvetadze B., Endresz G., Blaschke G.; About Some Aspects of the Use of Charged Cyclodextrins for Capillary Electrophoresis Enantioseparation.
Electrophoresis 15[6], 804-807. 1994.
- [160] Fanali S., Aturki Z.; Use of Cyclodextrins in Capillary Electrophoresis for the Chiral Resolution of Some 2-Arylpropionic Acid Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs.
Journal of Chromatography A 694[1], 297-305. 1995.
- [161] Nishi H.; Enantiomer separation of drugs by electrokinetic chromatography.
Journal of Chromatography A 735[1-2], 57-76. 1996.
- [162] Bumgarner J. G., Khaledi M. G.; Mixed Micellar Electrokinetic Chromatography of Corticosteroids.
Electrophoresis 15[10], 1260-1266. 1994.
- [163] Szolar O. H. J., Brown R. S., Luong J. H. T.; Separation of Paks by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection Using Mixtures of Neutral and Anionic Beta-Cyclodextrins.
Analytical Chemistry 67[17], 3004-3010. 1995.
- [164] Lee Y. H., Lin T. I.; Capillary Electrophoretic Determination of Amino-Acids - Improvement by Cyclodextrin Additives.
Journal of Chromatography A 716[1-2], 335-346. 1995.
- [165] Thompson C. O., Trenerry V. C.; Determination of Synthetic Colors in Confectionery and Cordials by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography.
Journal of Chromatography A 704[1], 195-201. 1995.
- [166] Riekkola M. L., Wiedmer S. K., Valko I. E., Siren H.; Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media.
Journal of Chromatography A 792[1-2], 13-35. 1997.
- [167] Pyell U.; Determination and regulation of the migration window in electrokinetic chromatography.
Journal of Chromatography A 1037[1-2], 479-490. 2004.
- [168] Beijersten I., Westerlund D.; Capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, with taurodeoxycholate as micellar agent, of protein kinase A peptide substrates.
Electrophoresis 17[1], 161-167. 1996.

- [169] Bottari E., D'Archivio A. A., Festa M. R., Galantini L., Giglio E.; Structure and composition of sodium taurocholate micellar aggregates.
Langmuir 15[8], 2996-2998. 1999.
- [170] Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.; Effect of surfactant structure on the separation of cold medicine ingredients by micellar electrokinetic chromatography.
Journal of Pharmaceutical Science [79], 519-523. 1990.
- [171] Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.; Separation and determination of lipophilic corticosteroids and benzothiazepin analogues by micellarelectrokinetic chromatography using bile salts.
Journal of Chromatography [513], 279-295. 1990.
- [172] aus: http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/mekc.htm.
gelesen am 04.05.2005. letzte Aktualisierung der Webseite: 2003.
- [173] Deyl Z., Svec F.; Capillary Electrochromatography. *Journal of Chromatography Library - Volume 62*
Elsevier Verlag: Amsterdam; 2001.
- [174] Wätzig H., Dette C.; Analysis of Acetylcysteine by Capillary Electrophoresis (Ce).3. Quantification.
Pharmazie 49[9], 656-659. 1994.
- [175] Burgi D. S., Chien R. L.; Optimization in Sample Stacking for High-Performance Capillary Electrophoresis.
Analytical Chemistry 63[18], 2042-2047. 1991.
- [176] Chien R. L., Burgi D. S.; Sample Stacking of an Extremely Large Injection Volume in High-Performance Capillary Electrophoresis.
Analytical Chemistry 64[9], 1046-1050. 1992.
- [177] Liska I., Slobodnik J.; Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples.
Journal of Chromatography A 733[1-2], 235-258. 1996.
- [178] Zwiener C., Glauner T., Frimmel F. H.; Biodegradation of pharmaceutical residues investigated by SPE-GC/ITD-MS and on-line derivatization.
Journal of High Resolution Chromatography 23[7-8], 474-478. 2000.
- [179] Breidenich N.; Bestimmung von sauren und neutralen Arzneimittelwirkstoffen in Wasserproben.
Vortragsskript Umweltanalytiktag NRW vom 19. bis 21.06.2000, 1-15. 2000.

-
- [180] Färber H., Peldszus S., Schöler H. F.; Gaschromatographische Bestimmung von aciden Pestiziden in Wasser nach Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid.
Vom Wasser 76, 13-20. 1991.
- [181] Deng A. P., Himmelsbach M., Zhu Q. Z., Frey S., Sengl M., Buchberger W., Niessner R., Knopp D.; Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS.
Environmental Science & Technology 37[15], 3422-3429. 2003.
- [182] Rodriguez I., Quintana J. B., Carpinteiro J., Carro A. M., Lorenzo R. A., Cela R.; Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives.
Journal of Chromatography A 985[1-2], 265-274. 2003.
- [183] Patterson D. B., Brumley W. C., Kelliher V., Ferguson P. L.; Application of US EPA methods to the analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment: Determination of clofibric acid in sewage effluent by GC-MS.
American Laboratory 34[14], 20-28. 2002.
- [184] Syhre M., Hanschmann G., Heber R.; Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik.
GIT Labor Fachzeitschrift 11, 1121-1128. 1996.
- [185] Richardson S. D.; Water Analysis.
Analytical Chemistry 73[12], 2719-2734. 2001.
- [186] Hübschmann, H.-J.; Handbuch der GC/MS - Grundlagen und Anwendung.
Wiley-VCH Verlag: Weinheim; 1996.
- [187] Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G.; Qualitätssicherung in der analytischen Chemie; Seite 116 ff.
Wiley-VCH Verlag: Weinheim; 1992.