

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

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Diplomchemikerin

Franziska Lange

geboren am 19. September 1979 in Leipzig

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

Tag der Verteidigung: 06.09.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012838

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

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

Danksagung

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

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

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

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

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

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

Kurzfassung

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

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

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

Abstract

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

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

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

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

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

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

Abkürzungsverzeichnis

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

Abkürzungsverzeichnis

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

1	EINLEITUNG.....	1
2	ALLGEMEINER TEIL	3
2.1	PHARMAZEUTISCHE RESTSTOFFE UND ANDERE PROBLEMSTOFFE URBANEN EINFLUSSES IN DER UMWELT UND DEREN SPURENANALYSE	3
2.2	HUMANPHARMAKA MIT BESONDEREM FOKUS.....	5
2.2.1	<i>Carbamazepin</i>	6
2.2.2	<i>Clarithromycin</i>	8
2.2.3	<i>Metoprolol</i>	9
2.3	PROBENVORBEREITUNG	9
2.3.1	<i>Extraktionsmethoden – erschöpfende vs. Gleichgewichtsmethoden</i>	9
2.3.1.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).....	11
2.3.1.2	Festphasenextraktion (SPE).....	11
2.3.1.3	Festphasenmikroextraktion (SPME).....	12
2.3.2	<i>Membranen</i>	12
2.3.2.1	Grundlagen	12
2.3.2.2	Membranvermittelte Flüssig-Flüssig-Extraktion	14
2.3.2.3	Membranunterstützte Lösungsmittlextraktion	15
2.4	TRENN- UND DETEKTIONSTECHNIKEN – QUANTIFIZIERUNG UND IDENTIFIKATION DER PROBLEMSTOFFE UND IHRER METABOLITEN	16
2.4.1	<i>Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)</i>	17
2.4.2	<i>Das Prinzip der Chemischen Ionisation in der GC-MS</i>	18
2.4.3	<i>Die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)</i>	19
2.4.4	<i>Die Funktionsweise der APPI-Quelle</i>	20
2.4.5	<i>Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)</i>	21
2.4.5.1	Q1 Full Scan	22
2.4.5.2	Product Ion Scan.....	23
2.4.5.3	Precursor Ion Scan.....	23
2.4.5.4	Constant Neutral Loss	24
2.4.5.5	Selected Ion Monitoring (SIM).....	24
2.4.5.6	Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	25
2.4.6	<i>Der Einsatz von Derivatisierungen in der GC und HPLC</i>	25
2.5	OXIDATIONSPROZESSE ZUM ABBAU PROBLEMATISCHER VERBINDUNGEN	27
2.5.1	<i>Ozonierung</i>	27
2.5.2	<i>Oxidation mit FENTON´S Reagenz</i>	28
3	EXPERIMENTELLER TEIL	29
3.1	GERÄTE	29
3.1.1	<i>GC-MS</i>	29
3.1.2	<i>HPLC-MS/MS</i>	29
3.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN	31
3.3	PROBEN	31

3.3.1	<i>Probenvorbereitung der Vergleichsmethode</i>	32
	SPE.....	32
	Cleanup.....	32
	Derivatisierung.....	32
3.3.2	<i>Probenvorbereitung der online-SPE-HPLC-MS/MS</i>	33
3.3.3	<i>Probenvorbereitung der Mini-MASE</i>	33
3.4	ONLINE-SPE-HPLC-MS/MS – AUFBAU UND VERWENDETES MATERIAL	33
3.5	HALBAUTOMATISIERTE MEMBRANUNTERSTÜTZTE EXTRAKTION (MINI-MASE) – ARBEITSSCHRITTE UND APPARATUR	34
3.6	BESTIMMUNG DER ANALYTISCHEN PARAMETER	34
	Nachweisgrenze (NWG)	34
	Relative Standardabweichung (RSD)	34
	Anreicherungsfaktor (AF)	35
3.7	VERSUCHE ZUM BIOLOGISCHEN ABBAU VON CARBAMAZEPIN	35
3.8	CHEMISCHE OXIDATION VON CARBAMAZEPIN MIT FENTON´S REAGENZ	37
3.9	OZONIERUNG VON CLARITHROMYCIN UND METOPROLOL	37
3.10	UMSETZUNG VON ALDEHYDEN UND KETONEN MIT DINITROPHENYL-HYDRAZIN (DNPH) ZU DEN ENTSPRECHENDEN HYDRAZONEN.....	38
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	39
4.1	BESTIMMUNG PHARMAZEUTISCHER RESTSTOFFE IN WÄSSERN	39
4.1.1	<i>Vergleichsmethode</i>	39
4.1.2	<i>Neue Anreicherungsverfahren</i>	46
4.1.2.1	Online-SPE-HPLC-MS/MS.....	46
	Chromatographie.....	47
	Lösemittelvolumen.....	48
	Probevolumen.....	49
	Anreicherungsgeschwindigkeit	50
	Nachweisgrenze, Wiederfindung.....	51
	Linearität der online-Anreicherung, Reproduzierbarkeit.....	52
4.1.2.2	Membranunterstützte Analytanreicherung.....	54
	Aufbau einer membranunterstützten Extraktionsapparatur	54
	Folienmaterial.....	56
	Aussalzeffekt.....	56
	Anreicherungsfaktoren	57
	pH-Wert-Abhängigkeit des Anreicherungsfaktors	58
	Temperaturabhängigkeit des Anreicherungsfaktors	59
	Optimierung der Extraktionsdauer, Präzision der Nicht-GGW-Methode.....	59
4.1.3	<i>Realproben</i>	62
4.1.3.1	online-SPE-LC-MS/MS.....	62
4.1.3.2	Mini-MASE.....	64
4.1.4	<i>Photoionisation – ein neues Interface zur Atmosphärendruckionisation in der LC-MS..</i>	66
4.1.4.1	Dopantauswahl	67

Inhaltsverzeichnis

4.1.4.2	Dopantmenge.....	68
4.1.4.3	Laufmittelzusammensetzung	68
4.1.4.4	Matrixeinfluss.....	69
4.1.4.5	Vergleich der Elektrosprayionisation und der Atmosphärendruck-photoionisation in der LC-MS/MS der relevanten Verbindungen.....	71
4.2	IDENTIFIKATION VON METABOLITEN/UMSETZUNGSPRODUKTEN DER PHARMAZEUTISCHEN RESTSTOFFE	73
4.2.1	<i>Carbamazepin – Produkte des biologischen Abbaus</i>	<i>74</i>
4.2.2	<i>Carbamazepin – Produkte des chemisch oxidativen Abbaus (FENTON'S Reaktion)</i>	<i>76</i>
4.2.3	<i>Ozonierung</i>	<i>85</i>
4.2.3.1	Ozonierung von Clarithromycin	86
	Clarithromycin – Produkte der Ozonierung.....	87
4.2.3.2	Ozonierung von Metoprolol	91
	Metoprolol – Produkte der Ozonierung.....	93
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	98
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	105
	TABELLENVERZEICHNIS.....	108
	ANHANG	I