

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte

3.1.1 GC-MS

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

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

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

Die verwendeten Target- und Qualifierionen sind im Anhang aufgelistet.

3.1.2 HPLC-MS/MS

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

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

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

Methode	Laufmittel A	Laufmittel B	Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Gradient	MS/MS
ESI-1	Wasser	MeOH	200	isokratisch 5 % A	MRM pos.
ESI-2	Wasser	MeOH	200	isokratisch 5 % A	MRM neg.
ESI-3	Wasser	MeOH	300	0 min: 100 % A 2 min: 57 % A 13 min: 57 % A 14 min: 100 % A 19 min: 100 % A	Scan pos.
ESI-4	ACN	MeOH	200	isokratisch 5 % A	Scan pos.
ESI-5	Wasser	MeOH	200	isokratisch 57 % A	Scan pos.
ESI-6	Wasser	MeOH	200	isokratisch 57 % A	Scan neg.

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

Methode	Laufmittel A	Laufmittel B	Fluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Gradient	MS/MS
APPI-1	Wasser	MeOH	200	isokratisch 20 % A	MRM pos.
APPI-2	Wasser	MeOH	200	isokratisch 20 % A	MRM neg.
APPI-3	Wasser	MeOH	200	isokratisch 20 % A	Scan

Bei der Verwendung der APPI-Quelle wurde als Dopant isokratisch 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ Aceton oder Toluol mit der zum API2000 gehörenden separaten Spritzenpumpe zugegeben.

3.2 Verwendete Chemikalien

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

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

Modelabwasser wurde hergestellt angelehnt an DIN 38412 T24. Es beinhaltet als Matrix u. a. Casein, Fleischextrakt, Harnstoff und K₂HPO₄ bei einem DOC von 125 mg/L und einem BSB₅ von 195 mg/L. Huminsäure (Fa. Roth) wurde in Wasser gelöst.

3.3 Proben

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

3.3.1 Probenvorbereitung der Vergleichsmethode

SPE

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

Cleanup

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

Derivatisierung

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

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

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

3.3.3 Probenvorbereitung der Mini-MASE

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

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

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

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

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

3.6 Bestimmung der analytischen Parameter

Nachweisgrenze (NWG)

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

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

S ... *engl.* signal – Signal

N ... *engl.* noise – Rauschen

Relative Standardabweichung (RSD)

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

Anreicherungsfaktor (AF)

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

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

3.7 Versuche zum biologischen Abbau von Carbamazepin

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

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

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

Die Analyse der Proben wurde nach Extraktion mit Essigester (10 mL Probe, 2 x 2 mL EE, 10 min Schüttler bei 200 rpm, Trocknen über Na₂SO₄, Einengen auf 1 mL) mittels GC-MS durchgeführt bzw. auch durch Direktinjektion der filtrierten (0,1 µm) Proben ins HPLC-MS/MS.

Tabelle 4: Varianten des biologischen Abbauversuches mit Carbamazepin

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

Delitzsch ... Schlamm aus der Belebungsanlage in Delitzsch

Saale ... Saaleschlamm

3.8 Chemische Oxidation von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz

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

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

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

3.9 Ozonierung von Clarithromycin und Metoprolol

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

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

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

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

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

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

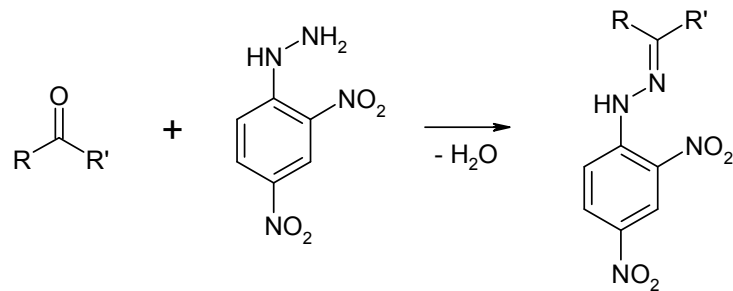


Abbildung 15: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Hydrazonen aus Carbonylverbindungen mit DNPH