

# **Anreicherung und Bestimmung von Arzneistoffspuren in Wässern mit Flüssigmembransystemen und HPLC-MS**

Der Fakultät für Naturwissenschaften  
Department Chemie  
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation

von  
Bedia Kurtulus (geb. Haciosmanoglu)  
aus Istanbul



Diese Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis Juli 2004 an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie des Departments Chemie der Fakultät für Naturwissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote gefertigt.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

M. Grote, B. Haciosmanoglu, J. Nolte, *Extraction of Drug Traces with Liquid Membrane Systems*, Proceedings of the International Solvent Extraction Conference, ISEC 2002, Cape Town, South Africa, März 17–21, 2002; K. Sole, C., Cole, M., Preston, J.S., Robinson, D.J., Eds.; Chris van Rensburg Publications (Pty) Ltd: Melville, South Africa; 2002; Vol. 1, 607 – 613.

B. Haciosmanoglu, M. Grote, J. Nolte, M. Bataineh, *The Separation of Drug Traces from Contaminated Water with Particular Membrane Systems*, "Appropriate Environmental and Solid Waste Management and technologies for Developing Countries", Vol. 3, p. 1801-1808, Istanbul, July 2002.; Ed.: G. Kocasoy, T. Ataburat and I. Nuhoglu; Proceeding of ISWA World Environmental Congress & Exhibition, Istanbul, Turkey July 8-12, 2002 (ISBN 975-518-179-2)

M. Grote, B. Haciosmanoglu, J. Nolte, M. Bataineh, *Separation of drug traces from water with particular membrane systems*, Special Issue of the J. Environ. Sci. Health, Part A, Vol. A 39, No. 4 (2004) 1039-1053.

B. Haciosmanoglu, M. Grote, D. H. Yolcu, J. Nolte, *Extraction of Pharmaceuticals from Water Samples by Liquid Membrane Systems*, Posterpräsentation, EUROANALYSIS-12, 8-13 September 2002.

J. Nolte, M. Bataineh, B. Haciosmanoglu, M. Grote, *Membrane systems for the separation of pharmaceutical residues from water*, Proceedings of the International Conference IEX2004 "Ion Exchange Technology for Today and Tomorrow 2004", Cambridge, 4-8 Juli 2004; Ed.: M. Cox.; Published by Society of Chemical Industry (SCI), London.

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote

2. Referent: Prof. Dr. H.-J. Warnecke

Eingereicht am 19.1.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 15.2.2005



Die vorliegende Arbeit wurde durch das Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz NRW finanziell unterstützt.



## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und für die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Warnecke spreche ich meinen Dank für die freundliche Übernahme des Koreferates aus.

Herrn Dr. Nolte, Herrn M. Bataineh und Frau H. Geltenpoth (ISAS, Institute of Analytical Sciences, Dortmund) möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft.

Frau Dipl.-Ing. N. Zullei-Seibert und Frau Dr. B. Kuhlmann (IfW, Institut für Wasserforschung, Schwerte) danke ich für die Bereitstellung der Oberflächenwasserproben.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere Didem Yolcu, Elcim Seckin, Nur Gül Ata, Rodica Knaup, Dr. Qaiser Nazir, die durch ihr Mitwirken zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich allen, die außerhalb des Arbeitskreises zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei meinen Eltern, bei meinem Mann Rafet Kurtulus und bei allen Freunden für die vielfältige Unterstützung bedanken.



Für meine Eltern



---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ARZNEISTOFFE IN DER UMWELT</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Transportwege der Arzneiwirkstoffe</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Auswahl der eingesetzten Arzneiwirkstoffe</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>Metabolisierung der Arzneistoffe</b>	<b>7</b>
<b>2.4</b>	<b>Toxizitätspotential der Arzneiwirkstoffe in der Umwelt</b>	<b>10</b>
2.4.1	Ökotoxikologische Wirkung	11
2.4.1.1	Bewertung ökotoxikologischer Wirkungen	11
2.4.1.2	Abschätzung der Ausscheidungsmengen – Expositionsanalyse	11
2.4.1.3	Ökotoxikologische Wirkung ausgewählter Arzneistoffe	12
2.4.2	Humantoxikologische Wirkung	13
<b>3</b>	<b>ANALYTIK DER ARZNEISTOFFE</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Stand der Arzneistoff-Analytik in Wässern</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MEMBRANTYPEN UND ANWENDUNGSBEREICHE</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Feste Membrane</b>	<b>21</b>
4.1.1	Biologische Membrane	21
4.1.2	Polymer Membrane - Trennung durch Teilchengröße	22
4.1.2.1	Filtration	22
4.1.2.2	Dialyse	22
4.1.2.3	Elektrodialyse	23
<b>4.2</b>	<b>Membranverfahren in der Analytik</b>	<b>23</b>
4.2.1	Flüssig-Emulsion-Membrane	24
4.2.2	Bulk-Flüssig-Membrane	25
4.2.3	Trägerstützte Flüssig-Membranen, SLM	25
4.2.4	Theorie und Prinzipien der Flüssigmembran-Extraktion	25
4.2.4.1	Carrier-freie Flüssigmembrane – Direktes Trapping	28
4.2.4.1.1	Einfluss der Säurekonstante auf die Flüssigmembranextraktion	28
4.2.4.1.2	Einfluss der Hydrophobie	29
4.2.4.2	Carrier-beladene Flüssigmembrane - Indirektes Trapping	31
4.2.4.2.1	Kationentransport mit neutralem Carrier	31
4.2.4.2.2	Kationentransport mit saurem Carrier	33
4.2.4.2.3	Anionentransport mit basischem Carrier	35
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchungsmethodik für die ausgewählten Arzneistoffe</b>	<b>36</b>

---

<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen mit Bulk-Flüssigmembranen</b>	<b>40</b>
5.2.1	Experimentelle Bedingungen	40
5.2.2	Durchführung der Versuche	41
5.2.3	Carrier-freie Systeme	42
5.2.3.1	Optimierung der Versuchsparameter	44
5.2.3.1.1	Einfluss der HCl-Konzentration in der Strip-Phase	45
5.2.3.1.2	Vergleich von NaCl- und HCl-Lösungen als Strip-Phase	47
5.2.3.1.3	Langzeitextraktion in Decanol	47
5.2.3.1.4	Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport	48
5.2.3.1.5	Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen	49
5.2.4	Carrier-modifizierte Membransysteme	50
5.2.4.1	Basischer Carrier	50
5.2.4.2	Saurer Carrier	51
5.2.4.3	Metallchelate-Carrier	53
5.2.4.3.1	Einfluss von Cu(II)EHEX	53
5.2.4.3.2	Einfluss von Ca(II)EHEX	54
5.2.4.4	Optimierung der Versuchsparameter	55
5.2.4.4.1	Einfluss des pH-Gradienten	56
5.2.4.4.2	Einfluss der NaOH-Konzentration in der Strip-Phase	57
5.2.4.4.3	Vergleich von NaCl- und NaOH-Lösungen als Strip-Phase	58
5.2.4.4.4	Einfluss von Huminstoffe	59
5.2.4.4.5	Langzeitextraktion	60
5.2.4.4.6	Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport	61
5.2.4.4.7	Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen	62
5.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse mit Bulk-Flüssig-Membranen	62
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen mit trägergestützten Membranen</b>	<b>64</b>
5.3.1	Octansulfonsäure in DHE als SL-Membran	65
5.3.2	Einfluss der Huminstoffe auf SLM-Extraktion	66
5.3.3	Anreicherungsversuche mit SLM-Systemen	66
5.3.3.1	Kammer-Module	66
5.3.3.2	Trägergestützte PP-Beutelmole	68
5.3.3.3	Wiederholversuche mit dem gleichen PP-Beutel	69
<b>5.4</b>	<b>Entwicklung einer Probenvorbereitungsmethode mit SL-Membranen</b>	<b>71</b>
5.4.1	Doppelkamm-Schichtpressmodule – Herstellung der PP-Module	71
5.4.2	Präparation der SLM-Beutelmole	72
5.4.3	Ermittelte Kenngrößen	73
5.4.4	Einfluss der Eintauchzeit	73

---

5.4.5	Einfluss der Extraktionszeit	74
5.4.6	Strip-Volumina	74
5.4.7	Variation der Flüssigmembran-Zusammensetzung	75
5.4.9	Vergleich zwischen SPE (Festphasenextraktion) und SLM	75
5.4.9.1	Vergleich verschiedener Festphasenmaterialien	75
5.4.9.2	Vergleich der SPE mit der SLM-Extraktion	77
<b>5.5</b>	<b>Bestimmung der Arzneiwirkstoffe mit der LC-UV-MS/MS-Methode</b>	<b>78</b>
5.5.1	Aufnahme der UV-Spektren - Ermittlung der Absorptionsmaxima	78
5.5.2	Ermittlung der mobilen Phase - Optimierung des Gradientenverlaufes	80
5.5.3	Auswahl der Trennsäule	82
5.5.4	Optimierung der massenspektrometrischen Detektion	84
5.5.5	Einfluss der Probenmatrix auf die Analyt-Stabilität und Chromatographie	89
5.5.6	Zusammenfassung der Methodenentwicklung	92
<b>5.6</b>	<b>Validierung des entwickelten LC-UV-MS/MS Verfahrens</b>	<b>93</b>
5.6.1	Validierung des entwickelten HPLC-UV-Verfahrens	94
5.6.1.1	Wahl des Arbeitsbereiches	94
5.6.1.2	Ermittlung der Kalibrierfunktion	95
5.6.1.3	Empfindlichkeit	96
5.6.1.4	Überprüfung der Linearität	96
5.6.1.5	Absicherung der unteren Arbeitsgrenze	99
5.6.1.6	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	100
5.6.2	Validierung des entwickelten LC-MS/MS-Verfahrens	100
5.6.2.1	Wahl des Arbeitsbereiches und Kalibrierung	100
5.6.2.2	Absicherung der unteren Arbeitsgrenze	104
5.6.2.3	Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	104
5.6.4	Abschließende Beurteilung der Validierungsergebnisse	104
<b>5.7</b>	<b>Anwendung der SLM-Beutelmole</b>	<b>106</b>
5.7.1	Probenahme und Probenvorbereitung (SLM-Extraktion)	106
5.7.2	Analyse mit der HPLC-UV-MS/MS	107
5.7.3	Zusammenfassung	110
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>114</b>
<b>7.1</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>114</b>
<b>7.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>114</b>
<b>7.3</b>	<b>Chromatographische Bedingungen</b>	<b>115</b>
<b>7.4</b>	<b>Untersuchungen mit Flüssigmembransystemen</b>	<b>116</b>
7.4.1	Herstellung der verwendeten Lösungen	116

---

7.4.1.1	Herstellung der mobilen Phase	116
7.4.1.2	Herstellung der Arzneiwirkstoff-Stammlösungen	116
7.4.1.3	Herstellung der Feed-Phase	116
7.4.1.4	Herstellung der flüssigen Membran Phasen	117
7.4.2	Extraktionsversuche	117
7.4.3	Probenahme	118
7.4.4	Neutralisation	118
7.4.5	Carrier-freie Systeme	119
7.4.5.1	Optimierung der Zusammensetzung der Strip-Phase	119
7.4.5.1.1	Einfluss der HCl-Konzentration in der Strip-Phase	119
7.4.5.1.2	NaCl-Lösung als Strip-Phase	119
7.4.5.1.3	Langzeitextraktion	120
7.4.5.1.4	Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport	120
7.4.5.1.5	Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen	120
7.4.6	Carrier-modifizierte Membransysteme	120
7.4.6.1	Basischer Carrier	120
7.4.6.2	Saurer Carrier	120
7.4.6.3	Metallchelate-Carrier	120
7.4.6.3.1	Einfluss von Cu(II)EHEX	121
7.4.6.3.2	Einfluss von Ca(II)EHEX	123
7.4.7	Optimierung der Versuchsparameter	121
7.4.7.1	Einfluss des pH-Gradienten	121
7.4.7.2	Optimierung der Zusammensetzung der Strip-Phase	122
7.4.7.2.1	Einfluss der NaOH-Konzentration in der Strip-Phase	122
7.4.7.2.2	NaCl-Lösung als Strip-Phase	122
7.4.7.3	Einfluss von Huminstoffen	122
7.4.7.4	Langzeitextraktion	124
7.4.7.5	Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport	124
7.4.7.6	Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen	124
<b>7.5</b>	<b>Untersuchungen mit trägergestützten Membranen</b>	<b>124</b>
7.5.1	Octansulfonsäure in DHE als SL-Membran	124
7.5.2	Einfluss der Huminstoffe auf SLM-Extraktion	124
7.5.3	Anreicherungsversuche mit SLM-Systemen	125
7.5.3.1	Kammer-Module	125
7.5.3.2	SL-PP-Beutel-Module	125
7.5.3.3	Wiederholversuche mit dem gleichen PP-Beutel	125
<b>7.6</b>	<b>Entwicklung einer Probenvorbereitungsmethode mit SL-Membranen</b>	<b>126</b>

---

7.6.1	Doppelkamm-Schichtpressmodule – Herstellung der PP-Module	126
7.6.2	Einfluss der Eintauchzeit	126
7.6.3	Einfluss der Extraktionszeit	126
7.6.4	Einfluss der Strip-Volumina	126
<b>7.7</b>	<b>Bestimmung der Arzneiwirkstoffe mit der LC-UV-MS/MS-Methode</b>	<b>127</b>
7.7.1	Aufnahme der UV-Spektren und Ermittlung der Absorptionsmaxima	127
7.7.2	Ermittlung der mobilen Phase - Optimierung des Gradienten	127
7.7.3	Auswahl der Trennsäule	127
7.7.4	Einfluss der Probenmatrix auf die Analyt - Stabilität und Chromatographie	127
7.7.5	Optimierung der massenspektrometrischen Detektion	128
<b>7.8</b>	<b>Validierung des entwickelten LC-UV-MS/MS-Verfahrens</b>	<b>129</b>
7.8.1	Validierung des entwickelten HPLC-UV-Verfahrens	129
7.8.1.1	Wahl des Arbeitsbereiches- Ermittlung der Kalibrierfunktion	129
7.8.2	Validierung des entwickelten LC-MS/MS-Verfahrens	129
7.8.2.1	Wahl des Arbeitsbereiches und Kalibrierung	129
<b>7.9</b>	<b>Anwendung der SLM-Beutelmole - Analyse von Oberflächenwasser</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>130</b>



## Symbolverzeichnis

$A$	Oberfläche der Membran
a, b, c	Koeffizienten der Geradengleichungen
$[A]_m$	Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der organischen Phase
$[AH^+]_a$	Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der ionischen Form
$[A]_a$	Gleichgewichtskonzentration des Analyten in der nicht ionischen Form
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
$\alpha_F$	Analyt-Fractionen in der Feed-Phase
$\alpha_S$	Analyt-Fractionen in der Strip-Phase
$C_F$	Konzentration der Analyten in der Feed-Phase
$C_S$	Konzentration der Analyten in der Strip-Phase
$dC/dx$	Konzentrationsgradient
Ca(II)EHEX	Calcium(II)-2-ethylhexanoat
CBZ	Carbamazepin
Cu(II)EHEX	Kupfer(II)-2-ethylhexanoat
$D_m$	Diffusionskoeffizient
DAD	Dioden Array Detektor
DCF	Diclofenac
DHE	Dihexylether
DIN	Deutsche Industrie Norm
$DS^2$	Differenzen der Varianzen
$d_i$	Residuen
$E$	Extraktionseffektivität
$E_{e(\max)}$	Maximal erreichbarer Anreicherungsfaktor
$E_e$	Anreicherungsfaktor
ESI	Electrospray Ionisation
$f$	Freiheitsgrade
$g$	Gramm
GC	Gas Chromatographie
$h$	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
$H_p$	Hydrodynamische Permeabilität

---

IBU	Ibuprofen
$J_m$	Massenfluss
$J_v$	Volumenfluss bei der Filtration
$K$	Verteilungskoeffizient
$K_a$	Dissoziationskonstante
$K_{OW}$	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
$K_F$	Verteilungskoeffizient der Analyten zwischen der Strip-Lösung und der organischen Membran
$K_S$	Verteilungskoeffizient der Analyten zwischen der Strip-Lösung und der organischen Membran
$k_D$	Verteilungskonstante des Analyten zwischen der organischen Phase und der Strip-Phase
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect-level
mg	Milligramm
mL	Milliliter
$\mu\text{L}$	Mikroliter
min	Minute
n	Zahl der Messungen
N	Anzahl der Konzentrationen
ng	Nanogramm
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level
$n_F$	Molzahl der Analyten in der Feed-Phase
$n_S$	Molzahl der Analyten in der Strip-Phase
OcSA	Octansulfonsäure
$dP/dx$	Druckgradient
$\Delta P$	Differenzdruck
PEC	Predicted environmental concentration
PNEC	Predicted No Effect Concentration
PP	Polypropylen
PTFE	Teflon (Polytetrafluorethylene)
$PW$	Prüfwert
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
$R^2$	Bestimmtheitsmaß
$r$	Porendurchmesser

---

SLM	Trägergestützte Flüssigmembran
SPE	Festphasenextraktion
SIM	Selektiv Ion Monitoring
SRM	Selektive Reaction Monitoring
SFM	Sulfamethoxazol
$s_{rel}$	Relative Standardabweichung
$s_{xo}$	Verfahrensstandardabweichung
$s_y$	Reststandardabweichung
$\gamma$	Grenzflächenspannung
$\theta$	Netzwinkel
TOA	Triocetylamin
$V_F$	Volumen der Feed-Phase
$V_S$	Volumen der Strip-Phase
$V_{xo}$	Verfahrensvariationskoeffizient
$x_l$	kleinste Konzentration
$x_p$	abgesicherte untere Konzentrationsgrenze
$X_{BG}$	Bestimmungsgrenze
$X_{EG}$	Erfassungsgrenze
$X_F$	Peakfläche des Analyten in der Feed-Phase
$X_{NG}$	Nachweisgrenze
$X_S$	Peakfläche des Analyten in der Strip-Phase



# 1 Einleitung

Die Anwendung von Pharmaka ist ein unverzichtbarer Bestandteil der modernen Human- und Veterinärmedizin. Hierbei kommen viele hydrophile Substanzen zum Einsatz. Wird die Anzahl der pro Jahr in Deutschland verordneten Tagesdosen verschiedener Wirkstoff-Präparate betrachtet und diese mit der Menge einer Dosis multipliziert, so ergeben sich Verordnungsmengen von mehreren Tonnen [1-3].

Rückstände von Arzneimitteln aus humanmedizinischen Anwendungen sowie deren Metabolite gelangen durch menschliche Ausscheidungen in kommunale Kläranlagen, wo sie nicht in allen Fällen vollständig eliminiert werden und sie sind, wenn auch nur in Spurengehalten, in den Umwelt-Kompartimenten Wasser und Boden nachweisbar [1-39]. Sie können durch Direkteinleitungen oder aus Kläranlagenabläufen über den Weg der Fließgewässer in das Grund- und letztlich auch Trinkwasser gelangen [1-3]. Auch die veterinärmedizinischen Arzneimittel gelangen nach der Ausscheidung durch Gülle über Bodenpassage in die aquatische Umwelt.

Die grundsätzlich bestehende gesundheitliche und ökologische Gefährdung durch Arzneiwirkstoffeinträge erfordert vorsorgende und nachhaltig wirksame Maßnahmen zur Erhaltung von Wasser- bzw. Gewässerqualität, um Risiken rechtzeitig zu erkennen und abzuwehren. Daraus ergeben sich die folgenden Zielsetzungen:

- Entwicklung einer **zuverlässigen Analytik** zur Überwachung der Arzneiwirkstoffe von Wässern.
- Die Entwicklung einer **zuverlässigen Technologie** zur Eliminierung von Arzneistoffeinträgen aus besonders belasteten Abwässern und Rohwässern.

Alternativ zu den klassischen Extraktions- und Sorptionsverfahren bietet die Stofftrennung mit Fest- und Flüssigmembranen prinzipielle Vorteile, die u.a. in der großen Flexibilität der Membraneigenschaften begründet sind. Die außerordentliche Vielfalt biologischer Membranvorgänge, die Stofftransporte mit hoher Effektivität und Selektivität steuern, ist Vorbild für die Entwicklung technischer Membranprozesse. Aus diesem Grunde finden Membranverfahren ständig neue Einsatzbereiche, z.B. in der Abwasserbehandlung (Umkehrosmose zur Behandlung von Deponiesickerwässern), Medizin (Dialyse, Plasmafiltration), Pharmaindustrie/Biotechnologie (Reinigung von Fermentationsprodukten) und Analytik.

In der Analytik bieten besonders die Flüssigmembrane neue Anwendungsgebiete zur Probenvorbereitung und Anreicherung von einer großen Anzahl von Verbindungsklassen (organische Säuren und Basen, Zucker, Peptide, Pestizide, einige Pharmaka und auch

Metallionen). Sie zeigen im Vergleich zu den anderen Methoden mehrere Vorteile, z.B. sehr hohe Selektivitätsfaktoren, effektive Abtrennung von sehr komplexen Matrices (z.B. Blut-, Pflanzen- und Umwelt-Proben), hohe Anreicherungsfaktoren ohne Verlust an Selektivität und geringeren Verbrauch an organischen Lösemitteln [40-45].

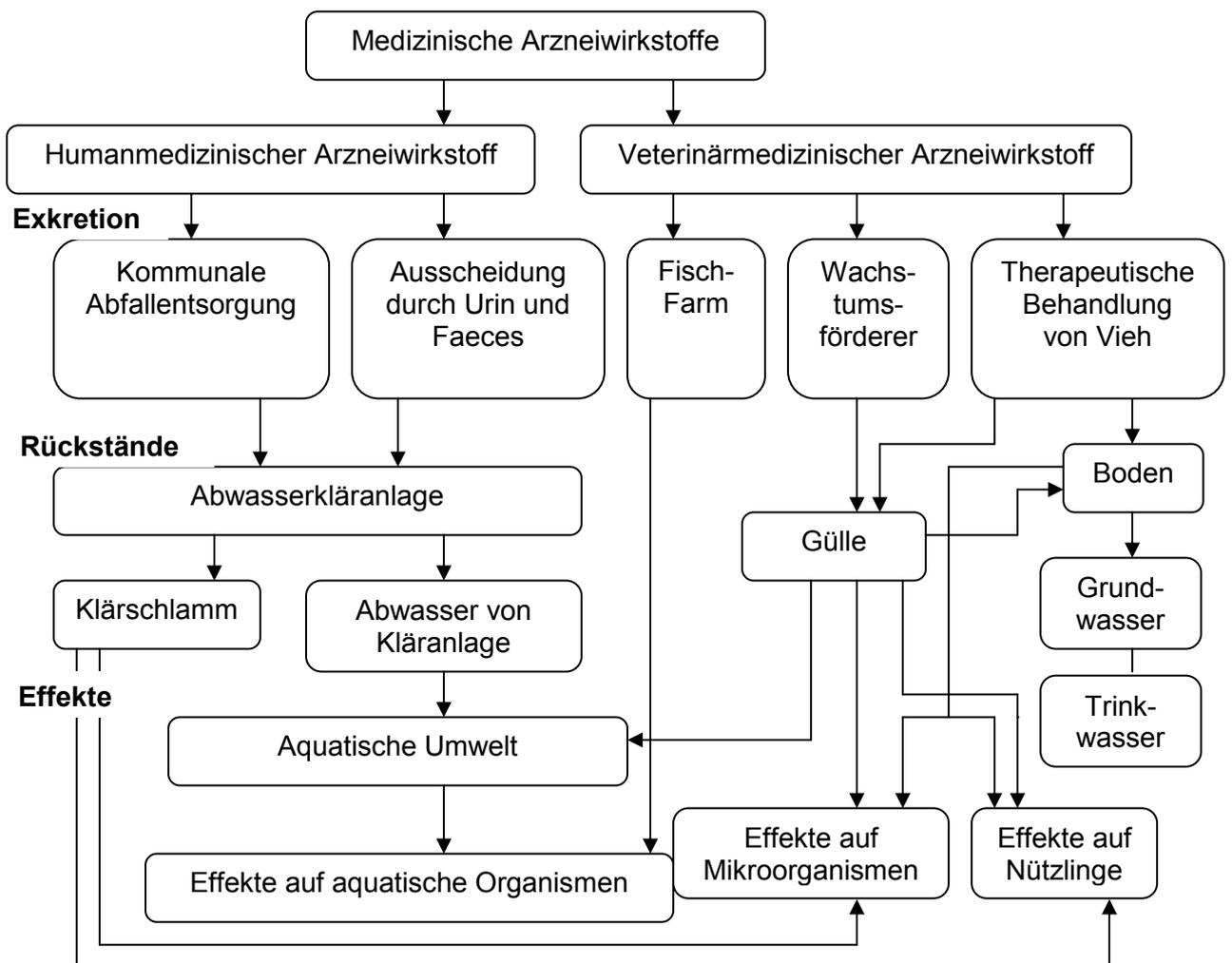
Im Rahmen dieser Arbeit sollten Flüssigmembran-Methoden zur Trennung und Anreicherung ausgewählter Arzneiwirkstoffe aus wässrigen Medien entwickelt werden. Die Versuche waren mit unterschiedlichen Mehrphasen-Zell- und -Kammersystemen durchzuführen, deren Konstruktion einen Membran-Transport zwischen zwei wässrigen Phasen über eine Membran-Phase ermöglicht. Um optimale Transport-Bedingungen zu ermitteln, sollten die Zusammensetzung der drei Phasen und auch Betriebsparameter variiert werden, wie z.B. Rührgeschwindigkeit, Zellgröße, Extraktionszeit, Konzentration der Strip-Phase, Konzentration der Analyten in der Feed-Phase, sowie Carrier-Zusatz in der Membran-Phase. Für die Untersuchungen mit den Flüssigmembranen wurden vier Arzneiwirkstoffe als Leitsubstanzen ausgewählt, die in zahlreichen Abwässern, sowie Grund- und Trinkwässern auftreten [1-34]. Diese Wirkstoffe sind Carbamazepin, Diclofenac, Ibuprofen und Sulfamethoxazol.

Schließlich waren die zu entwickelnden Flüssigmembran-Systeme mit chromatographischen Bestimmungsmethoden (HPLC-UV und LC-MS) zu kombinieren, um Arzneistoffspuren in Wässern empfindlich und zuverlässig nachzuweisen.

## 2 Arzneistoffe in der Umwelt

### 2.1 Transportwege der Arzneiwirkstoffe

Human- und Tierarzneimittel gelangen nach der therapeutischen Anwendung in der Regel über die natürlichen Ausscheidungswege wie Urin und Faeces sowohl in unveränderter Form der Wirkstoffe als auch der entsprechenden Metabolite das Abwassersystem und nach Passage der Kläranlagen in das aquatische System [1-39]. Pharmaka werden größtenteils als Metabolite ausgeschieden, die in der Regel höhere Polarität aufweisen als die Ausgangssubstanzen [1, 2]. Daher ist zu erwarten, dass sie in den Kläranlagen schlechter eliminiert werden. Auch die unsachgemäße Entsorgung von Medikamenten über die Toilette stellt einen potentiellen Eintragspfad dar [1, 2].



**Abb. 1:** Eintragspfade, Transport und Effekte von human- und tiermedizinischen Arzneistoffen (nach [5])

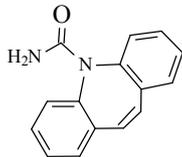
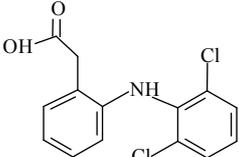
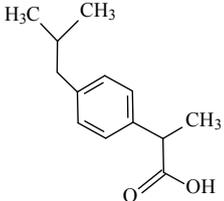
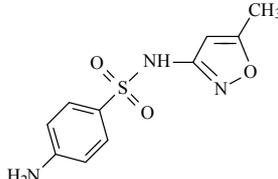
In der **Abb.1** sind die Transportwege und Effekte von human- und tiermedizinischer Arzneiwirkstoffen graphisch dargestellt.

Weltweit werden Arzneistoffe in Kläranlagenabläufen, Oberflächenwässern, Grundwasser und in manchen Fällen auch im Trinkwasser nachgewiesen [1-39]. Die Medianwerte der Pharmaka in den Fließgewässern liegen unter 0,1 µg/L, wobei die Maximalwerte über 1 µg/L erreichen können. In Kläranlagenzu- und -abläufen liegen die Konzentrationen deutlich über 1 µg/L, wobei sich Zu- und Abläufe für die meisten Stoffe nicht signifikant unterscheiden [1]. Das zeigt, dass für diese Stoffe kein wesentlicher Abbau und keine erhebliche Rückhaltung beim Klärungsprozess stattfinden.

## 2.2 Auswahl der eingesetzten Arzneiwirkstoffe

Von den gefundenen, hauptsächlich in der Humanmedizin eingesetzten Arzneistoffen tritt in Abwasser- und Umweltproben meistens ein sehr ähnliches Spektrum von Arzneistoffen auf. Bei den meisten Proben findet man eine Carbamazepin-, Diclofenac-, Ibuprofen- und Sulfamethoxazol-Belastung.

**Tabelle 1:** Strukturformeln, Indikationsgruppe, Tagesdosen und Jahresverordnungen der ausgewählten Arzneistoffe [1]

Wirkstoff	Strukturformel	Indikationsgruppe	Tagesdosen DDD [Mio]	Verordnung [t/Jahr]
Carbamazepin (CBZ)		Antiepileptikum	104,5	100
Diclofenac (DCF)		Nicht-steroidales Antiphlogistikum	386,1	38,61
Ibuprofen (IBU)		Nicht-steroidales Antiphlogistikum	93,7	112,44
Sulfamethoxazol (SFM)		Antibiotikum	38,2	61

Deshalb wurden für die Untersuchungen diese Wirkstoffe auf der Basis der Abschätzungen des potentiellen Umwelteintrages ausgewählt. Diese treten aufgrund verschiedener Umweltstudien nahezu ubiquitär in relativ hohen Konzentrationen in Gewässern auf und sie werden als ökologisch relevant eingestuft. In der **Tabelle 1** sind die Tagesdosen, Jahresverordnungen und die Indikationsgruppe von den ausgewählten vier Arzneistoffen aufgeführt [1].

### **Carbamazepin**

CBZ gehört zu den Wirkstoffen, die in der überwiegenden Anzahl der untersuchten Oberflächenwasserproben und in einigen Grundwasserproben nachgewiesen werden konnten. In den Kläranlagen wird CBZ nur zum geringeren Teil eliminiert und zeigt eine hohe Persistenz, womit die hohen Umweltkonzentrationen begründet werden [46]. Durch Photodegradation und Ozonierung wird CBZ sehr gering abgebaut, Huminstoffe und Nitrate in Wässern hemmen die Degradation [47].

**Tabelle 2:** CBZ-Konzentrationen in der aquatischen Umwelt [1]

	<b>[µg/L]</b>
<b>Abwasser-Kläranlagenzulauf</b>	1,60
<b>Abwasser-Kläranlagenablauf</b>	0,41
<b>Rhein/Karlsruhe</b>	0,18
<b>Grundwasser</b>	0,11

### **Diclofenac**

DCF ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (Arzneistoff mit entzündungshemmender Wirkung; durch Hemmung der Prostaglandin-E-Synthese [48]), das antipyretisch und auch analgetisch wirkt. Es gehört damit zu den 20 verordnungshäufigsten Indikationsgruppen. DCF wird in Abwasserkläranlagen unvollständig eliminiert. Tabelle 3 zeigt deutlich, dass die DCF-Konzentrationen nach dem Prozess in Abwasserkläranlagen auch durch die Ozonierung nicht abnehmen [49-51]. Der Eliminierungsprozess findet bei DCF im Gegensatz zu IBU in Oberflächenwässern bei der Photodegradation durch Sonnenlicht statt. Deshalb gehen die DCF-Konzentrationen in Oberflächenwässern im Sommer zurück [18, 52].

**Tabelle 3:** DCF-Konzentrationen in der aquatischen Umwelt [1]

	[µg/L]
<b>Abwasser-Kläranlagenzulauf</b>	1,62
<b>Abwasser-Kläranlagenablauf</b>	1,70
<b>Rhein/Karlsruhe</b>	0,02
<b>Grundwasser</b>	0,03

### Ibuprofen

IBU wird im Gegensatz zu Diclofenac nur unter nicht-sterilen Bedingungen sowohl im Dunkeln als auch im Licht abgebaut. Allerdings zeigt die Degradation hohe Enantiomeren-Selektivität. Im Abwasser-System und auch in Oberflächenwässern wird das S-Enantiomer schneller degradiert als das R-Enantiomer [17]. IBU gilt als biologisch leicht abbaubar und wird in Kläranlagen größtenteils eliminiert, welches durch den Vergleich der Konzentrationen in Kläranlagenzu- und -abläufen auch bestätigt wird (siehe **Tab. 4**) [49, 50]. Auch durch die Ozonierung wird IBU zwischen 30-70 % eliminiert, je nachdem, unter welchen Bedingungen die Reaktion stattfindet [53].

**Tabelle 4:** IBU-Konzentrationen in der aquatischen Umwelt [1]

	[µg/L]
<b>Abwasser-Kläranlagenzulauf</b>	3,00
<b>Abwasser-Kläranlagenablauf</b>	0,09
<b>Rhein/Karlsruhe</b>	0,01
<b>Grundwasser</b>	<BG

### Sulfamethoxazol

SFM wird in der Human- und Tiermedizin als Antibiotikum eingesetzt und gehört zu den sog. Sulfonamiden. Sulfonamide verdrängen die für das Bakterienwachstum wichtige 4-Aminobenzoessäure [54]. Nach der humanmedizinischen Anwendung wird SFM durch Urin oder Faeces ausgeschieden und gelangt ins Abwasser. In Abwasserkläranlagen wird SFM nicht vollständig, sondern nur zum geringen Teil abgebaut und gelangt anschließend in die aquatische Umwelt (siehe **Tab. 5**) [1]. Als Tierpharmaka eingesetzte Antibiotika werden auch nach der Ausscheidung direkt oder über die Gülledüngung in Boden und anschließend in die aquatische Umwelt getragen (**Abb. 1**).

**Tabelle 5:** SFM-Konzentrationen in der aquatischen Umwelt [1]

	[µg/L]
<b>Abwasser-Kläranlagenzulauf</b>	0,39
<b>Abwasser-Kläranlagenablauf</b>	0,33
<b>Rhein/Karlsruhe</b>	0,01
<b>Grundwasser</b>	0,03

Über diese Wege können Antibiotika über die Nahrungskette wieder vom Menschen aufgenommen werden. Im Zusammenhang mit dem zunehmenden Auftreten von Resistenzen muss dem Eintrag von Antibiotika besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden [55].

### 2.3 Metabolisierung der Arzneistoffe

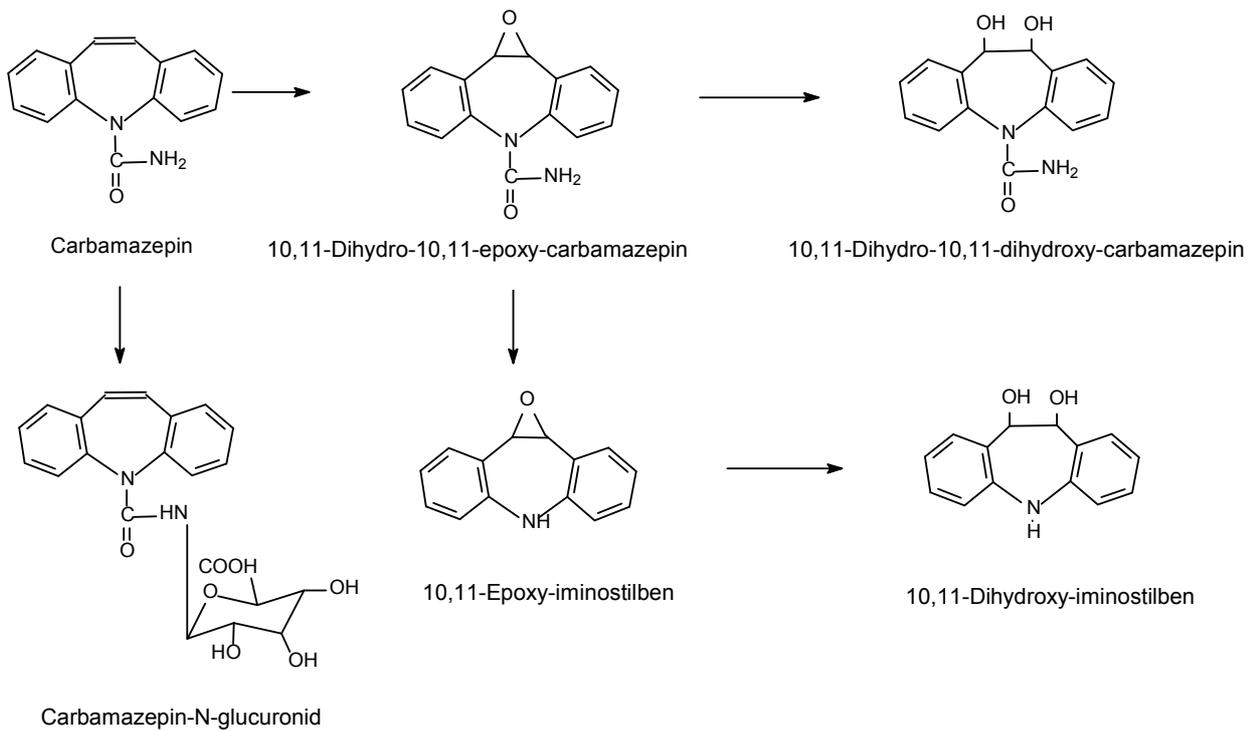
#### **Carbamazepin**

In der Literatur sind zahlreiche Angaben über die Metabolisierungswege von CBZ [56-67]. Nach der Einnahme wird CBZ zu 72 % über den Urin und 28 % mit den Faeces ausgeschieden. Davon sind 10-15 % in Faeces, bzw. 2-3 % in Urin unverändert. **Abb. 2** schematisiert die Hauptwege zur Metabolisierung von CBZ [2]. Ausgeschiedene Glukuronidkonjugate werden in der Abwasserklärung vermutlich durch vorhandene  $\beta$ -Glukuronidase (z. B. E. Coli oder als Exoenzyme) gespalten, wodurch der ursprüngliche Wirkstoff wieder freigesetzt wird.

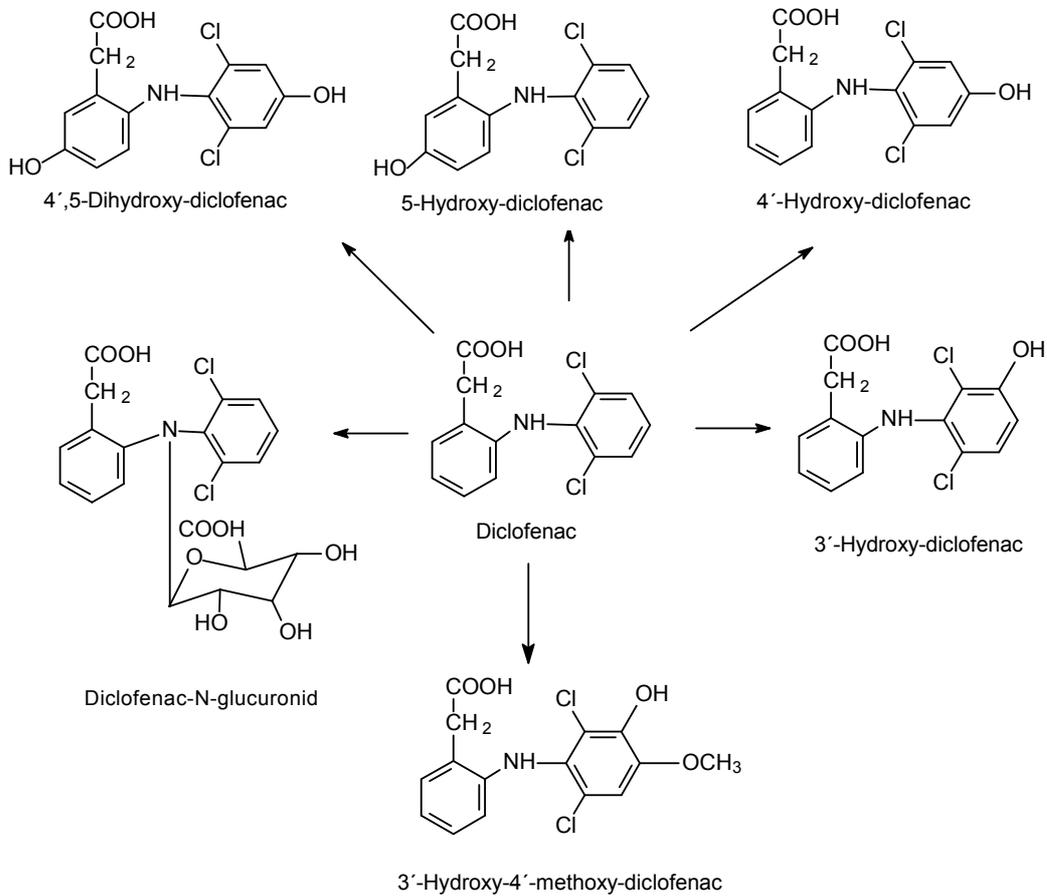
#### **Diclofenac**

DCF wird im menschlichen Körper zum Teil in der Leber metabolisiert, so dass lediglich 35-70 % des Wirkstoffes unverändert die posthepatische Zirkulation (Pfortadersystem hinter der Leber gelegen [48]) erreicht. Die weitere nahezu vollständige Umsetzung erfolgt rasch [2]. Die Metaboliten werden zu etwa 30-40 % über die Faeces und zu etwa 60-70 % renal eliminiert. Ein Anteil von 0,2-0,7 % wird über den Urin unverändert ausgeschieden. Der Hauptmetabolit ist 4'-Hydroxydiclofenac, was etwa 40 % der insgesamt ausgeschiedenen Tagesdosis ausmacht [2].

In der **Abb. 3** werden Wege der Metabolisierung und Strukturen der DCF-Metabolite aufgeführt.



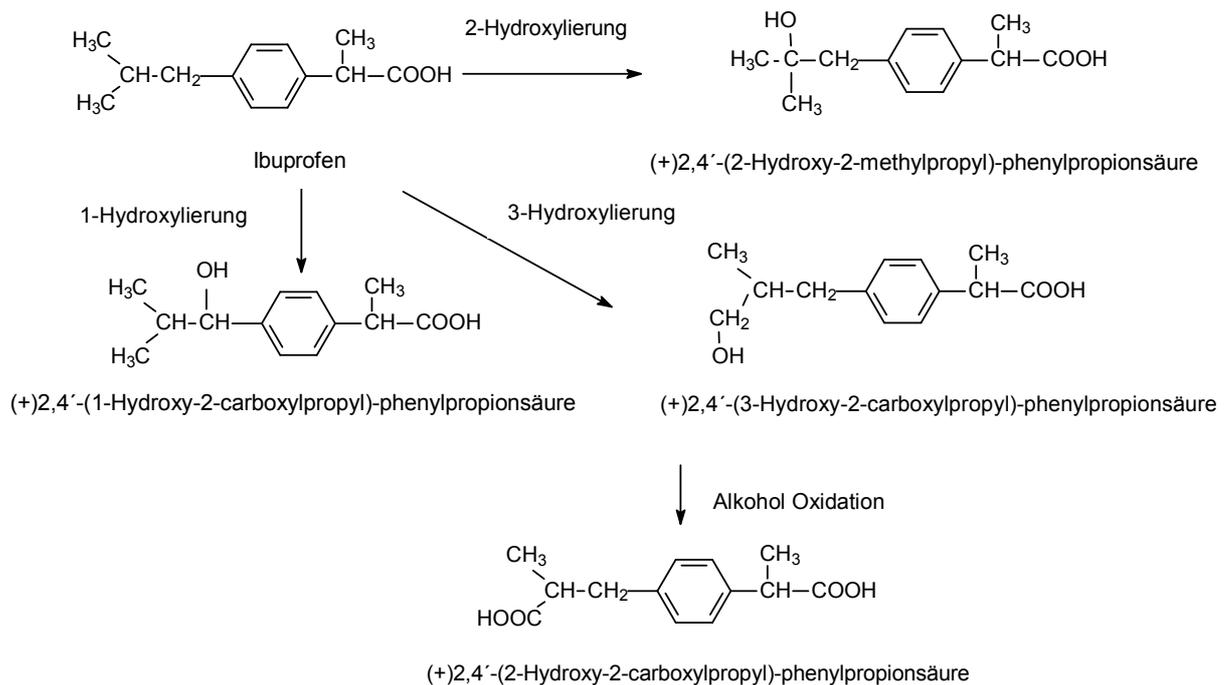
**Abb. 2:** Wege der Metabolisierung des CBZ [2]



**Abb. 3:** Wege der Metabolisierung des DCF [2, 68, 69].

### Ibuprofen

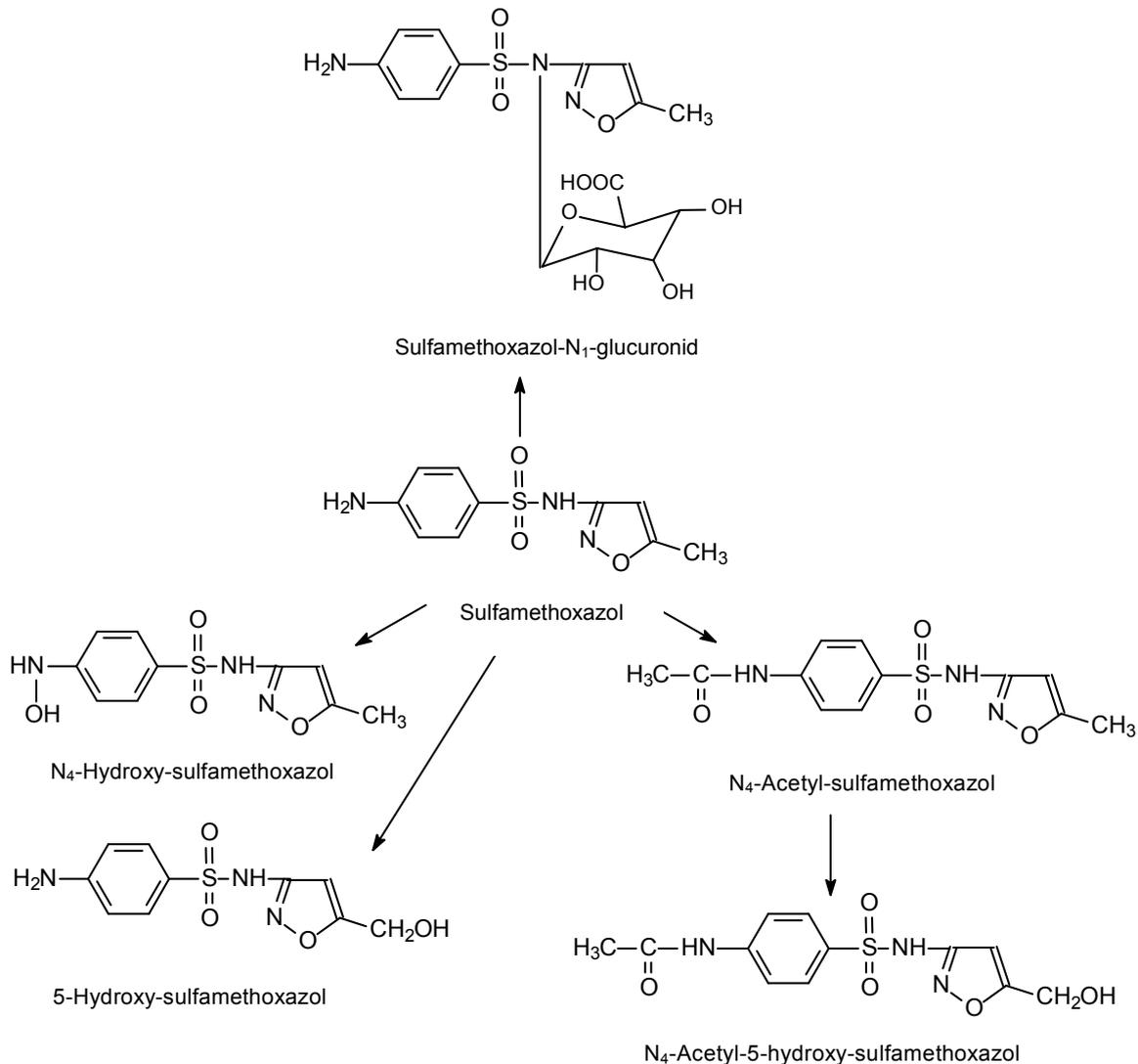
IBU wird nach oraler Gabe schnell resorbiert. Die Hauptmetabolite sind (+)-2,4'-(2-Hydroxy-2-methylpropyl)phenylpropionsäure (25 %) und (+)-2,4'-(2-Carboxypropyl) phenylpropionsäure (43 %) (siehe **Abb. 4**). Freies IBU befindet sich zu 11-15 % in Urin [2, 70-72]. Der Hauptmetabolit (+)-2,4'-(2-Hydroxy-2-methylpropyl) phenylpropionsäure wurde bei vielen Kläranlagenabläufen und in Flüssen nachgewiesen. Die Untersuchungen in Biofilmreaktoren und Batch-Anlagen deuten darauf hin, dass die Metabolite auch durch oxische und anoxische Biodegradation nicht vollständig abgebaut werden [53].



**Abb. 4:** Wege der Metabolisierung des IBU [2, 70-72]

### Sulfamethoxazol

SFM wird in Kombination mit Trimethoprim eingesetzt und die Wirkstoff-Kombination wird schnell und vollständig in Magen-Darm-Trakt resorbiert. Die SFM-Metabolite sind in der Abb. 5 aufgeführt. Der Hauptmetabolit N<sub>4</sub>-Acetyl-SFM macht 61 % der Tagesdosis aus [2, 73, 74] (s. Abb. 5). Auch der Glucuronid-Metabolit konnte in Abwässern nachgewiesen werden. Nur 10-15 % des SFM werden unverändert ausgeschieden. Das Acetyl-Derivat von SFM ist nicht bakteriostatisch wirksam, aber toxischer als der Wirkstoff. Der N<sub>4</sub>-Acetyl-Metabolit wird im Abwasser fast vollständig deacyliert.



**Abb. 5:** Wege der Metabolisierung des SFM [74].

## 2.4 Toxizitätspotential der Arzneiwirkstoffe in der Umwelt

Arzneistoffe sind aufgrund ihrer Zweckbestimmung biologisch wirksam. Wenn sie in die Umwelt gelangen, können sie biologisch auch auf andere Lebewesen, bzw. Nicht-Zielorganismen wirken. Das betrifft die natürlichen Lebensgemeinschaften in Gewässern und wenn sie in Trinkwasser gelangen, auch den Menschen. Das bedeutet, dass im Rahmen einer ökotoxikologischen Bewertung von Arzneistoffen nicht nur deren vorgesehener Wirkmechanismus im Säugerorganismus, sondern auch Schadwirkungen auf Nichtzielorganismen berücksichtigt werden müssen. Besonders bedeutend sind die Wirkungen von Antibiotika, Sexualhormonen und Zytostatika, die vergleichsweise in geringeren Mengen ins Abwasser und anschließend in Gewässer gelangen [1].

### 2.4.1 Ökotoxikologische Wirkung

In der Literatur werden ökotoxikologische Daten zur Arzneiwirkstoff-Konzentrationen nur vereinzelt beschrieben, bei denen es sich ausschließlich um Alt-Pharmaka aus dem humanmedizinischen Bereich in Kläranlagen, Fließgewässern und in einigen Trinkwässern handelt [4, 5, 7, 9, 15, 46, 75-78]. Daher besteht ein erheblicher Forschungsbedarf zur Klärung der ökotoxikologischen Wirkung der Arzneiwirkstoffe. Bei den vorhandenen Standardsystemen, die zur Umweltverträglichkeitsprüfung nach dem Chemikaliengesetz (ChemG), Pflanzen-Schutzgesetz (PflSchG) oder Biozidrichtlinie verwendet werden, wurden nicht für die spezifischen Wirkungen der Arzneiwirkstoffe entwickelt, so dass die Umwelttoxizität der Stoffe nur unzureichend wiedergegeben wird [2]. Aufgrund dessen sollten die vorhandenen Systeme modifiziert oder neu entwickelt werden. Wie den Tab. 2-5 zu entnehmen sind, liegen die Arzneiwirkstoff-Konzentrationen in Abwässern im Bereich von Nanogramm bis Mikrogramm pro Liter vor. Nach diesen Konzentrationen sind eher chronische Toxizitätseffekte zu erwarten [2]. Die in der Literatur beschriebenen ökotoxikologischen Daten stammen größtenteils von akuten Testsystemen. Die Effektkonzentrationen der untersuchten Pharmaka liegen in der Regel im mg/L-Bereich und nach diesen Tests werden die Substanzen relativ untoxisch eingestuft. Aufgrund der spezifischen pharmakologischen Wirkungen ist eher die chronische Toxizität zu erwarten [2].

#### 2.4.1.1 Bewertung ökotoxikologischer Wirkungen

Die Bewertung möglicher Wirkungen erfolgt im Rahmen des Zulassungsverfahrens von neuen Arzneimitteln anhand des Leitfadens der europäischen Arzneimittel Agentur (EMA 2001) [1]. Nach diesem abgestuften Bewertungskonzept werden die möglichen Umweltkonzentrationen (PEC-predicted environmental concentration) mit den Ergebnissen experimenteller Prüfungen zur Ökotoxizität unter Berücksichtigung von Unsicherheitsfaktoren verglichen. Ist der Quotient aus abgeschätzter Umweltkonzentration (PEC) und Wirkung (PNEC: Predicted No Effect Concentration) größer als 1, so besteht ein Risiko für die Umwelt [1, 2].

#### 2.4.1.2 Abschätzung der Ausscheidungsmengen – Expositionsanalyse

PEC-Abschätzungen werden unter Verwendung einer EU-Formel (EU-Draft-Guideline III/5504/94) berechnet. Dabei wurde von einem zehnfachen Verdünnungsfaktor ausgegangen, der den Übergang vom Abwasser zum Oberflächenwasser berücksichtigt.

$$PEC = \frac{A \times (100 - R)}{365 \times P \times V \times D \times 100} \quad (1)$$

---

PEC	Predicted Environmental Concentrations [g/L]
A	Voraussichtlich höchste Produktionsmenge in einem EU-Staat [kg/Jahr]
R	Eliminierung (Abbau oder Verflüchtigung) [%]
P	Einwohnerzahl in dem betreffenden Staat
V	Menge des Abwassers pro Tag und Person (meist 0,15 - 0,2 m <sup>3</sup> ) [m <sup>3</sup> /Tag]
D	Verdünnungsfaktor beim Übergang vom Abwasser zum Oberflächenwasser (durchschnittlich: D=10)

Im Sinne einer „Worst-Case-Berechnung“ wurde davon ausgegangen, dass die eingenommenen Arzneistoffe unverändert wieder ausgeschieden werden, über das Abwasser in die Kläranlagen gelangen und da nicht eliminiert werden. Vergleiche der Worst-Case-Abschätzungen mit den gemessenen Konzentrationen zeigen, dass die ermittelten Konzentrationen mit den PEC-Werten in der Größenordnung übereinstimmen und die PEC-Berechnung prinzipiell geeignet ist die Wirkstoffkonzentrationen in Oberflächenwasser vorherzusagen [1, 2].

Im folgenden Kapitel wird das Ökotoxizitätspotential der ausgewählten Arzneistoffe ausführlich diskutiert.

### 2.4.1.3 Ökotoxikologische Wirkung ausgewählter Arzneistoffe

#### ***Carbamazepin***

CBZ wurde in der überwiegenden Anzahl der untersuchten Oberflächenwasser-Proben nachgewiesen, welches auf die schlechten Eliminierungsraten in Kläranlagen und Persistenz zurückzuführen ist. CBZ adsorbiert in Kläranlagen an Belebtschlamm und wird bei Eintrag in Oberflächengewässer teilweise in das Sediment verlagert. In der Literatur sind Untersuchungen zur ökotoxikologischen Relevanz von Arzneiwirkstoffen beschrieben, in denen Algentests und akute Daphnientests mit einer Reihe von Wirkstoffen eine Rolle spielen. Dabei wurden die so genannten EC<sub>50</sub>-Werte ermittelt und festgestellt, dass CBZ gegenüber Algen (EC<sub>50</sub> = 85 mg/L) und Daphnien (EC<sub>50</sub> = 157 mg/L) akut mäßig toxisch wirkt [75, 77, 78].

CBZ wurde als Dauerbelastung in Rhein-Main (100-200 ng/L) und Donau (<100 ng/L) festgestellt. Bei diesen Gehalten in Wässern liegt keine Fischtoxizität oder eine andere akute Gefährdung der Umwelt vor [1, 76]. In Studien zur chronischen Toxizität mit verschiedenen Testsubstanzen wurden NOEC-Werte berechnet und festgestellt, dass CBZ toxisch auf aquatische Crustaceen (eine Klasse der aquatischen Tiere, zu der Krabben, Schrimps und

Wasserflöhe gehören [79]) (NOEC = 25 mg/L) und gering toxisch auf Fische (NOEC = 25 mg/L) wirkt [1].

### **Diclofenac**

DCF zeigt keine akute Toxizität und erwies sich als gering chronisch toxisch gegenüber aquatischen Crustaceen und Fischen [78].

### **Ibuprofen**

Die verfügbaren ökotoxikologischen Wirkungswerte zeigen für Algen eine toxische ( $EC_{50} = 7,1$  mg/L) und für Daphnien und Fische eine mäßig toxische Wirkung [1, 76]. Nach GefStoffV wird IBU mit R-Sätzen 51/53 als giftig für Wasserorganismen eingestuft und es kann in Gewässern langfristig schädliche Wirkungen ausüben [1].

### **Sulfamethoxazol**

Die Antibiotika-Rückstände werden in Abwasserkläranlagen nicht eliminiert, verursachen induktive Resistenzbildung der Bakterien und die Bakterien werden gegenüber Antibiotika unempfindlich. Der genetische Cod für die Antibiotika-Resistenz befindet sich in so genannten R-Plasmiden, der zwischen Bakterien übertragbar ist [4, 5].

Viele Studien untersuchen die bakteriellen Populationen in Abwasserkläranlagen. In der Regel werden über 95 % der kolonieförmigen Bakterien in Kläranlagen eliminiert und die meisten restlichen Bakterien zeigen Resistenz. Überall sind 70 % der Bakterien gegen Antibiotika unempfindlich und viele zeigen auch multiple Resistenz [4, 5, 15].

Antibiotika-Resistenz-Bildung ist sowohl aus ökotoxikologischer als auch aus humantoxikologischer Sicht von großer Bedeutung. Epidemische Krankheiten in Krankenhäusern werden öfters durch resistente *Klebsiella* Bakterien (überall verbreitete, kleine, gram-negative, fakultativ anaerobische Bakterien, die oft im Darm-Trakt vorkommen und die Ursache von Wunde-Infektionen sind [79]) verursacht, die 90 % unempfindlich gegen Ampicillin sind und 6 % multiple Resistenz zeigen [4].

## **2.4.2 Humantoxikologische Wirkung**

Um eine humantoxikologische Abschätzung zur Wirkung der im Wasser ermittelten bzw. abgeschätzten Arzneistoff-Konzentrationen vorzunehmen, soll die niedrigste therapeutische Dosis als Lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) herangezogen und durch Verwendung eines Faktors von 10 ein No-observed-adverse-effect-level (NOAEL) festgelegt

werden. Nach diesen Abschätzungen ist davon auszugehen, dass durch die Konzentrationen in Oberflächenwässern für die Arzneiwirkstoffe keine humantoxikologische Bedeutung besteht. Auch ausgewählte Arzneistoffe wurden auf ihr Vorkommen in Trinkwässern untersucht und festgestellt, dass sie keinerlei Hinweis auf eine humantoxikologische Bedeutung zeigen [2]. Allerdings ist eine solche Abschätzung mit erheblichen Unsicherheiten behaftet, da Pharmakodosierungen nicht für eine lebenslange Aufnahme berechnet werden und somit keine Aussagen über deren Wirkung bei lebenslanger Aufnahme getroffen werden können. Außerdem werden bei einer derartigen Abschätzung besonders empfindliche Personen, wie beispielsweise Leber- oder Nierengeschädigte nicht berücksichtigt [2].

## 3 Analytik der Arzneistoffe

### 3.1 Stand der Arzneistoff-Analytik in Wässern

Arzneistoffe wurden in der Vergangenheit vorwiegend in klinischen Studien erfasst, wobei sie meistens in Urin [61, 69-74, 80], Gewebe [56, 66, 80-82] oder in Blutserum [58, 61-65, 71, 81-88] untersucht worden sind. Die Konzentrationen der Arzneiwirkstoffe liegen bei biologischen Proben im µg/L bis mg/L- Bereich, in dem eine HPLC-Bestimmung mit der UV- oder Fluoreszenz-Detektion ausreichen würde. In den aquatischen Proben sind wegen des großen Verdünnungseffektes deutlich niedrigere Konzentrationen (ng/L bis µg/L) zu erwarten, wobei ein effektiver Anreicherungsschritt und viel empfindlichere Detektionsgeräte erforderlich werden [89-100].

In der Umweltanalytik hat sich die **LC-MS-Methode** mittlerweile etabliert. So können Substanzen in komplexen Matrices wie Kläranlagenabwasser analysiert werden. Der Vorteil liegt hierbei darin, dass die Analyte mit ähnlicher Empfindlichkeit wie bei der GC-MS-Methode, aber ohne den aufwendigen Derivatisierungsschritt messbar sind. Außerdem ist keine prinzipielle Limitierung bezüglich des Molekulargewichtes gegeben. Ein weiterer Vorteil der LC-MS/MS ist die sichere Identifizierung über Fragmentierung der Analyten, welche besonders in komplexen Matrizen von großer Bedeutung ist [101-109].

Besonders die Elektrospray-Ionisierung zeigt eine sehr hohe Selektivität, da in den Betriebsmodi „*selective ion monitoring, SIM*“ und „*selective reaction monitoring, SRM*“ meist keine sichtbaren Interferenzen eines Analyten mit Begleitstoffen entstehen, die die Quantifizierung stören würden. Bei der Ionisierung mit Elektrospray entsteht jedoch Konkurrenz zwischen den Analyten und den co-eluierenden Substanzen um die zur Verfügung stehenden Ladungen. Daraus kann eine Signalunterdrückung des Analyten in einem Extrakt im Vergleich zum Signal des Analyten in reinem Lösungsmittel resultieren. Dieser Matrixeffekt wird bei der Ionenbildung des Elektrosprayprozesses erzeugt und kann durch die technischen Maßnahmen nicht beseitigt werden [103].

Die vier ausgewählten Arzneiwirkstoffe wurden bislang in vielen Studien analytisch erfasst [3, 10, 11, 16, 23-34, 56-74, 79-99]. Die in der Literatur beschriebenen Probenvorbereitungs- und Bestimmungsmethoden für diese Stoffe wurden im Folgenden einzeln ausgewertet und diskutiert.

#### **Carbamazepin**

CBZ konnte nach Sacher et. al. in vielen Fließgewässern neben zahlreichen weiteren Verbindungen bestimmt werden [10]. Das Analysenverfahren beruhte auf dem Nachweis mittels GC/MS/MS-Kopplung nach automatischer Festphasenanreicherung auf unpolarem RP-C18ec-Material, Elution mit 1-Propanol. Mit diesem Verfahren ließen sich

Bestimmungsgrenzen im unteren ng/L-Bereich erreichen. 1 L Wasserprobe wurde mit der Fließgeschwindigkeit 5 mL/min über die Kartusche gegeben, anschließend wurde die Festphase 60 min über Stickstoffstrom getrocknet und die Analyten portionsweise mit 4 mL 1-Propanol eluiert. Eluat wurde danach auf ca. 150 µL eingengt und anschließend mittels GC/MS/MS analysiert.

Stolker et. al. beschreiben ein Analysenverfahren zur Bestimmung verschiedener neutraler Pharmaka u.a. CBZ, IBU und DCF in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser mittels Festphasenanreicherung auf Oasis-MCX-Material und Messung durch LC/MS/MS [23]. Die LC-Trennung erfolgte mit Gradientenverlauf über eine RP-C18-Säule mit Ammoniumacetat im Wasser als Laufmittel A und Ammoniumacetat in Methanol als Laufmittel B. Detektiert wurde mit einem Triple-Quadrupol oder Quadrupole-Time-of-Flight-Massenspektrometer im ng/L-Bereich, wobei CBZ, DCF im positiven und IBU im negativen Mode erfasst wurden. Ein weiteres Screeningverfahren zur Bestimmung von organischen Kontaminanten u.a. auch CBZ in Elbe wurde von Franke et. al. vorgestellt [14]. Das Analysenverfahren beschreibt zur Anreicherung der Analyten Flüssig-Flüssigextraktion mit n-Hexan und Bestimmung mittels GC/MS. Die GC/MS-Bestimmung erfordert einen Derivatisierungsschritt. Die Detektion mit LC/MS/MS ist für Abwasser und Oberflächenwasser in jedem Falle der GC/MS vorzuziehen. CBZ und CBZ-Metabolite wurden von Miao. et. al. in Abwasserkläranlagenabläufen und Oberflächenwasser bestimmt [57]. Proben wurden durch einen 1, 5 µm Glasfilter filtriert, welches mit einem Hexan/Dichlormethan (1:1) gewaschen wurde. Nach der Filtration wurde der pH-Wert der Probe mit 3,0 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder 1,0 mol/L NaOH auf 7 eingestellt. Anschließend wurde Probe mit einer Fließgeschwindigkeit 10 mL/min auf das Festphasenmaterial Oasis hydrophilic-lipophilic balance (HLB, Waters) gegeben, welches zuerst mit jeweils 6 mL Aceton, Methanol und HPLC-Wasser konditioniert wurde. Nach dem Eluieren mit Methanol und Trocknen an der Vakuum-Zentrifuge wurden die Proben in 0,25 mL Methanol/Wasser (3:2) aufgenommen. Die SRM-Experimente mit ESI-MS/MS erfolgten für CBZ und Metabolite im positiven Mode und die Analyten konnten in ng/L-Bereich detektiert und identifiziert werden. Wiederfindungsraten für CBZ waren in Oberflächenwasser 100,6 %; in Abwasserkläranlagenabläufen 90,6 % und in Abwasserkläranlagenzuläufen 89,5 % [57].

### ***Sulfamethoxazol***

In der ersten Hälfte der neunziger Jahre war die HPLC-Methode mit der UV-Detektion sehr verbreitet. Analyse mit GC/MS nach der Derivatisierung und HPLC-DAD-Kopplung wurden auch sehr oft zur Analyse der Sulfonamide eingesetzt. In der Wasseranalytik bietet die LC/MS/MS-Methode die besten Selektivitätsmöglichkeiten und sichere Identifizierung der Analyten ohne den aufwendigen Derivatisierungsschritt.

Ein Screeningverfahren zur Bestimmung von 18 Antibiotikawirkstoffen u.a. SFM in Kläranlagenabläufen und Flüssen wurde von Hirsch et al. vorgestellt [5]. Das Analysenverfahren beschreibt zur Anreicherung der Analyten alternativ sowohl die Möglichkeit der Festphasenanreicherung als auch die Anreicherung über Gefriertrocknung. Die Wirkstoffe werden ohne Derivatisierungsschritt mittels HPLC getrennt und hochselektiv durch einen MS/MS Detektor erfasst. SFM wurde im positiven Mode detektiert. Zur Bestimmung aller 18 Wirkstoffe sind drei LC/MS/MS-Läufe erforderlich, da eine zufriedenstellende Trennung der Analyten nur mit unterschiedlichen HPLC-Bedingungen gelang.

SFM wurde auch neben anderen Sulfonamiden von Renew et. al. in Abwasser untersucht, wobei Festphasenanreicherung zur Probenvorbereitung eingesetzt war und die Stoffe über LC-MS bestimmt worden sind [100]. Zwei Festphasenkartuschen wurden verglichen, nämlich eine Isolute-Kartusche mit Anionenaustauscher und eine HLB-Kartusche. Nach der Konditionierung der Kartuschen wurde 1 Liter Abwasser-Probe mit einer Fließgeschwindigkeit von 6 mL/min auf die Kartusche gegeben. Anschließend wurden mit 10 mL 95 % Methanol und 5 % (v/v) 4,38 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  eluiert. Nach dem Trocknen bei 30°C Wasserbad wurden die Sulfonamide in die 1 mL Methanol/  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung aufgenommen. Anschließend erfolgte die LC-MS Analyse.

### ***Diclofenac und Ibuprofen***

DCF und IBU wurden in vielen Arbeiten in der Literatur zusammen erfasst [10, 11, 16, 26, 28, 29, 32, 76, 93, 94]. Sacher et. al. beschreiben ein Analysenverfahren zur Bestimmung zahlreicher Pharmaka u.a. DCF und IBU in Oberflächenwässern mittels GC/MS/MS-Kopplung nach automatischer Festphasenanreicherung auf unpolarem RP-C18-ec-material, wobei Bestimmungsgrenzen im unteren ng/L-Bereich erzielt wurden [10]. DCF und IBU konnten nach Stumpf et al. neben weiteren Analgetika in Kläranlagenabläufen nach entsprechender Anreicherung an LiChrolut-EN und Derivatisierung mittels GC/MS und GS/MS/MS bestimmt werden [11]. DCF und IBU wurden auch nach Jux. et. al. [16] in Kölner Flüssen nach Anreicherung an LiChrolut-EN mittels GC/MS bestimmt. Ein anderer Festphasenmaterial, Waters Oasis HLB wurde von Öllers. et. al. zur Anreicherung von DCF und IBU verwendet und anschließend wurden die Wirkstoffe mittels GC/MS bestimmt [29].

## **3.2 Zielsetzung**

### ***Probenvorbereitung***

Die Analyse der Arzneistoffe ist durch die sehr niedrigen Konzentrationen und Matrixeffekte begrenzt. Daher ist allgemein festzustellen, dass trotz der empfindlichen Methoden wie LC-MS und GC-MS eine Probenvorbereitung notwendig ist. In der Literatur sind zahlreiche

Arbeiten beschrieben, in denen Arzneistoffe durch Festphasenextraktion abgetrennt, angereichert und anschließend mittels GC/MS/MS und LC/MS/MS bestimmt wurden [76, 80, 89-95, 98-100]. Die Wirkstoffe besitzen unterschiedliche Sorptionseigenschaften und Säure-, Base-Konstanten, so dass der pH-Wert der Probe für verschiedene Wirkstoffklassen entsprechend angepasst werden muss und unterschiedliche Festphasenmaterialien erforderlich sind.

In der Wasseranalytik werden für eine Festphasenextraktion in der Regel mehrere Stunden benötigt, da ein hoher Anreicherungsfaktor erzielt und dazu große Probenvolumina (>1000 mL) auf das Festphasenmaterial mit einer Fließgeschwindigkeit 1-5 mL/min aufgegeben werden. Davor ist das SP-Material noch über mehrere Schritte zu konditionieren.

Bei der Festphasenextraktion lässt sich die Effektivität der Extraktionsschritte durch Auswahl geeigneter chemisch modifizierbarer Festphasen, also durch Anpassung von Polarität und Art der Wechselwirkungen an strukturelle Parameter des Analyten, nur in Grenzen optimieren. Insgesamt kann die Festphasenextraktion als eine relativ zeitaufwendige und kostenintensive Methode eingestuft werden.

Als eine weitere Probenvorbereitungsmethode wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion verwendet, welche mit hohem Lösemittel-Verbrauch verbunden sein kann. Ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass keine on-line-Kopplung mit analytischen Instrumenten möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die **Flüssigmembranextraktion** zur Abtrennung und Anreicherung von Arzneiwirkstoffen aus Wässern eingesetzt werden. Im Vergleich zu den anderen Anreicherungsmethoden haben diese Membran-Techniken prinzipiell mehrere Vorteile, die im folgenden Kapitel 4 ausführlich diskutiert werden. Mit Flüssigmembranextraktion sind höchste Selektivitätsfaktoren und die Abtrennung der Analyte von sehr komplexen Matrices erreichbar. Der Verbrauch an organischen Lösemitteln, welcher ein großes Defizit bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion darstellt [110], kann äußerst gering sein und sinkt bei manchen Methoden auf „Null“ [40-44]. Flüssigmembranextraktion bietet zuverlässige Probenvorbereitungsmethoden für eine große Anzahl von Verbindungsklassen in sehr unterschiedlichen Matrices und Konzentrationsbereichen [40-44].

### **Analytische Bestimmung**

Für die Bestimmung der mit Flüssigmembranen abgetrennten und angereicherten Arzneistoffe werden ein HPLC-UV-System (Photodiodenarray, DA Detektion) und auch ein LC-MS/MS-System mit ESI und Ion-Trap-Analysator eingesetzt. Die ESI-Technik ist eine schonende Ionisierungsmethode und daher besonders geeignet zur Analyse der polaren, thermolabilen Substanzen.

---

Dazu waren Fragmentierungsuntersuchungen (CID – im MS<sup>2</sup>-Modus) und Betriebsparameter des Ion-Trap-MS-Detektors zu optimieren, so dass die Wirkstoffe über die Produkt-Ionen identifiziert und selektiv detektiert werden konnten.

## 4 Membrantypen und Anwendungsbereiche

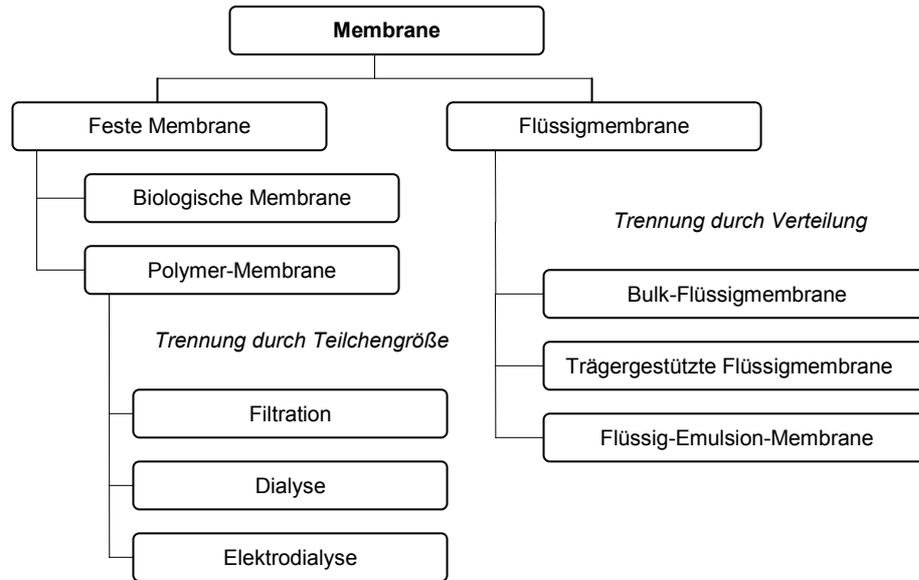
Membranverfahren werden in vielen Anwendungsgebieten eingesetzt. Die außerordentliche Vielfalt der biologischen Membranvorgänge, die Stofftransporte mit hoher Effektivität und Selektivität steuern, ist Vorbild für die Entwicklung technischer Membranprozesse. Aus diesem Grund finden Membranverfahren ständig neue Einsatzgebiete, wie die folgenden Beispiele verdeutlichen:

- Probenvorbereitung [40-45, 111-178]
- Abwasserbehandlung (Umkehrosmose zur Behandlung von Deponiesickerwässern) und Wasseraufbereitung [179-190]
- Medizin (Dialyse, Plasmafiltration, extrakorpore Blutwäsche) [191-194]
- Pharmaindustrie/Biotechnologie (Reinigung von Fermentationsprodukten: Antibiotika) [195-206]

Damit ist das Anwendungspotential von Membranverfahren sowohl in der Wasseraufbereitung als auch im Bereich der analytischen Probenvorbereitung noch längst nicht ausgeschöpft.

### Klassifizierung der Membrantrennmethode

Eine Membran ist eine selektive Barriere zwischen zwei Phasen, wodurch zu trennende Stoffe aus einer Phase (z. B. Feed, bzw. Donor) in eine andere Phase (z. B. Strip, bzw. Acceptor) transportiert werden. Es gibt zwei Haupttypen der Membranverfahren. Das eine basiert auf der mechanischen Trennung durch die Teilchengröße der zu trennenden Spezies, der so genannte Siebeffekt (siehe Abb. 6), wobei die Membran eine Festmembran und auch in den meisten Fällen ein Polymermaterial ist, wie z.B. Polypropylene, Polysulfone oder Cellulose-Derivate. Hierbei beruht die Trennung auf dem Prinzip, dass die kleineren Moleküle durch die Membran diffundieren und die größeren Moleküle nicht durch die Membran durchgelassen werden. Diese Membrane werden durch so genannte „molecular weight cut-off“ (MWCO)-Wert charakterisiert und meistens bei den Filtrationsverfahren, bei der Dialyse und bei der Elektrodialyse eingesetzt. Während bei den Filtrationsverfahren ein Druck ausgeübt wird, liegt bei der Dialyse und Elektrodialyse ein Konzentrationsgradient vor. Jedoch ist bei der Elektrodialyse der Konzentrationsgradient mit einem elektrischen Potential gekoppelt [44]. Auch die natürlichen biologischen Membrane fallen unter der Klasse der festen Membrane, die auch in der Analytik und zur Trennung der Arzneistoffe aus Wässern eingesetzt werden.



**Abb. 6:** Klassifizierung der Membrantypen und -methoden

Das andere Prinzip der Membrantrennung erfordert eine chemische Interaktion zwischen dem Membranmaterial und dem Analyten, anschließend eine Verteilung der Analyten zwischen der Membran-Phase und der Probe. Das sind Extraktionsmembrane und in der Regel homogene Flüssigkeiten oder feste Materialien mit mikroporösen Strukturen, die mit organischen Lösemitteln imprägniert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Flüssigmembrane auf ihre Eignung zur Trennung und Anreicherung von Arzneistoffspuren aus wässrigen Proben getestet. Aus diesem Grunde werden in dem folgenden Kapitel eher die Flüssigmembranextraktionsverfahren diskutiert und die anderen Membranverfahren nur kurz beschrieben.

## 4.1 Feste Membrane

### 4.1.1 Biologische Membrane

Die „natürlichen“ biologischen Flachmembranen wurden zur Arzneistoff-Trennung aus Wässern in Dialysekammersystemen durchgeführt. Nolte et. al. in *Institute For Analytical Sciences (ISAS)* in Dortmund führten Untersuchungen mit unterschiedlichen biologischen Membranen aus tierischer Herkunft. Dabei zeigte das *Goldschlägerhäutchen* (Teil des Rinder-Blinddarmes) die besten Permeationseigenschaften zur Abtrennung von CBZ, SFM, DCF und IBU [207-209].

## 4.1.2 Polymer Membrane – Trennung durch Teilchengröße

### 4.1.2.1 Filtration

Bei den Filtrationsprozessen ist erforderlich, dass auf die Membrangewebe Druck ausgeübt wird. Die Zahl der Moleküle, die pro Zeiteinheit durch die Membran diffundieren, wird durch die Hagen-Poiseuille-Gleichung beschrieben (siehe Gl. 2).

$$J_v = -H_p \cdot A \cdot (dP/dx) \quad (2)$$

$J_v$	Volumenfluss
$dP/dx$	Druckgradient
$A$	Oberfläche der Membran
$H_p$	hydrodynamische Permeabilität

Hydrodynamische Permeabilität wird durch die Viskosität der Probe und den von der Porengröße abhängigen Membranwiderstand definiert. Bei der Filtration spielt die Porengröße eine entscheidende Rolle. Durch die Vergrößerung der Porengröße wird ein überproportional stärkerer Volumenfluss erreicht. Filtration hat viele Vorteile gegenüber anderen Membrantrennverfahren, die auf die Teilchengröße basieren, vor allem dürfen sehr schnelle Trennung und Wiederfindung erreicht werden. Der Nachteil dabei ist, dass die zutrennenden Komponente auf der Membranoberfläche akkumulieren und durch die Polarisation der Membran einen Widerstand bilden. Das hängt von dem auf die Oberfläche ausgeübten Druck ab. Bei niedrigerem Druck ist der Widerstand auch klein, bei sehr hohem Druck entsteht ein totaler Widerstand. Durch die Rührung während der Filtration in der Probe kann die Akkumulation und daraus entstehende Widerstand verhindert werden. Bei der *Cross-Flow-Filtration* wird die Probe durch die Hohlfaser laminar gepumpt, welche den turbulenten Fluss beschleunigt und dadurch Polarisierungseffekt und Akkumulation verhindert [44].

### 4.1.2.2 Dialyse

Bei der Dialyse wird die Probe an der Feed-Seite der Membran platziert und die Analyten diffundieren aufgrund des Konzentrationsgradienten durch die Membran. Massentransport pro Zeiteinheit ist durch die 1. Fick'sche Gesetz (Gl. 3) beschrieben.

$$J_m = -D_m \cdot A \cdot (dC/dx) \quad (3)$$

$J_m$	Massenfluss
$dC/dx$	Konzentrationsgradient
$A$	Oberfläche der Membran

$D_m$  Diffusionskoeffizient

Der Diffusionskoeffizient ist durch die Viskosität der Probe, Temperatur und molekulare Dimension der Analyten im Vergleich der Porengröße der Membran definiert. Für die Dialyse werden Membranmaterialien mit MWCO von 10-15 kDA eingesetzt, die die biologischen Makromoleküle nicht durchlassen. Bei der Dialyse wird nach maximal 50 % ige Wiederfindung ein Gleichgewicht erreicht, danach liegt kein Konzentrationsgradient mehr vor. Um die Wiederfindung zu erhöhen, sollen die Analyte von der Strip-Phase entfernt werden, damit immer ein Konzentrationsgradient zwischen den beiden Seiten herrscht. Dialyse-Membrane werden öfters in Kombination mit Mikroseparationstechniken angewendet. Sie werden auch mit der Kapillar-Elektrophorese gekoppelt, wobei die Analyten durch die Hohlfaser-Dialyse-Membran fließen und in die Kapillar-Elektrophorese gelangen [44].

#### 4.1.2.3 Elektrodialyse

Bei der Elektrodialyse werden die geladenen Teilchen aufgrund des Konzentrationsgradienten und elektrischen Potentials durch die Membran transportiert. Nach dem Anlegen des elektrischen Potentials an die Membran werden die geladenen Verbindungen zu der Elektrode in der Strip-Phase transportiert, während umgekehrt geladene Teilchen in die andere Elektrode fließen, wodurch sie zurückgehalten werden können. Die neutralen Teilchen werden nur durch passive Diffusion transportiert. Elektrodialyse ermöglicht neben der Selektivität durch die Teilchengröße auch die Selektivität durch die Ladung der Teilchen. Membran kann neutral oder geladen sein. Bei neutralen Membranen werden höhere Flüsse erreicht als bei der normalen Dialyse. Bei den geladenen Membranen wird die Selektivität höher, weil die gleich geladenen Teilchen zurückgehalten werden [44].

## 4.2 Membranverfahren in der Analytik

In der Analytik finden Membrantrennverfahren ihre Anwendung meistens zur Anreicherung von Stoffen. Mikro- und Ultrafiltration werden für die Anreicherung von Partikeln (z.B. Bakterien in Lösungen) oder suspendierten Feinstoffen (z.B. Aerosole in Gasen) eingesetzt. Mikroporöse Membrane werden auch für die Ermittlung von Mikroorganismen in Wasser, Getränken und Pharmaprodukten eingesetzt. Die Mikrofilter werden als Träger für Zellkulturen eingesetzt. Die Blotting-Techniken mit dem Transfer von Makromolekülen vom Elektrophoresegel auf eine mikroporöse Membran werden für die Festphasen-Immunoassay-Analytik von Proteinen angewandt. Auch für Reinigungsoperationen in der Analytik werden

Membrane eingesetzt, z.B. in der Sterilfiltration. Daneben ermöglicht die Dialyse in Verbindung mit der Fließinjektionsanalyse zur automatisierbarer Bestimmung von Ionen und kleinen neutralen Molekülen in komplex zusammengesetzten Matrices in der Analytik [191].

Auch Flüssigmembrane werden in der Analytik eingesetzt. Sie stellen eine neuartige und effektive Methode zur selektiven Abtrennung und Anreicherung verschiedener Spezies dar und bieten viele Vorteile gegenüber anderen Probenvorbereitungsmethoden.

Höhere Selektivität und Anreicherungsfaktoren sind die wichtigsten Vorteile der Flüssigmembrane und ermöglichen die Analyse in sehr komplexen Matrices. Demgegenüber zeigt die Festphasenextraktion niedrige Anreicherungsfaktoren und Selektivität [40-44]. Eine große Anzahl von Verbindungsklassen, wie z.B. Säuren [44, 112-116, 202-206, 210-211], Basen [44, 117-121], Metallspezies [44, 122-132], Aminosäuren [44, 133-139], Peptide [44, 137-142], Zucker [44, 143-144], Herbizide [44, 145-159], Phenole [160-165] und Amine [44, 166-171] in unterschiedlichen Probenmatrices und Konzentrationsbereichen können mit Flüssigmembranen erfolgreich abgetrennt und angereichert werden. Daher wird die Flüssigmembranextraktion immer mehr in der Bio-, Umwelt- und Nahrungsmittelanalytik eingesetzt.

Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu der Festphasen- und Flüssig-Flüssig-Extraktion ist der geringere Lösemittelverbrauch besonders bei den trägergestützten Flüssigmembranen. Weitere Faktoren sind die niedrigen Kosten und die Möglichkeit zur on-line Kopplung und Automatisierung mit der Chromatographie [40-43, 151, 153, 159, 169, 177, 212, 213].

Folgende Flüssigmembransysteme sind unterscheidbar:

- Flüssig-Emulsion-Membrane
- Bulk-Flüssigmembrane
- Trägergestützte Flüssigmembrane (SLM: Supported Liquid Membrane) mit
  - Hohlfasermembrane als Träger
  - Flachmembrane als Träger

#### **4.2.1 Flüssig-Emulsion-Membrane**

Bei den Flüssig-Emulsion-Membranen wird die Strip-Phase als sehr feine Tröpfchen in die Membran emulgiert. Die Emulsion wird in die Feed-Phase zerstreut, die die zu extrahierenden Spezies enthält. Prinzip des Stofftransportes bei den Flüssig-Emulsion-Membranen ist ähnlich wie bei den Bulk-Flüssigmembranen, wobei eine Extraktion und Rückextraktion simultan erfolgt. Flüssig-Emulsion-Membrane finden sehr oft bei der Rückgewinnung von Metallen und Kohlenhydraten aus Abwässern und bei der Trennung der Fermentationsprodukten (z. B. Antibiotika) Anwendung [214-215].

### 4.2.2 Bulk-Flüssigmembrane

Bei der Bulk-Flüssigmembrantechnik werden die verwendeten Phasen jeweils als größere zusammenhängende Volumina eingesetzt. Die flüssige Membran besteht aus einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösemittel (Solvens) mit oder ohne Carrier-Zusatz. Die beiden miteinander mischbaren wässrigen Phasen sind bei dieser Technik durch einen meist geringen apparativen Aufwand in der Bulk-Flüssigmembranzelle voneinander getrennt. Die Bulk-Flüssigmembrane sind *ungestützte* Membrane. Dadurch lassen sich die Größe der Phasengrenzflächen und somit die Grenzflächenwiderstände bei diesem Typ von Membran leicht bestimmen. Das organische Lösemittel kann auch ohne Carrier aus der wässrigen Feed-Phase Stoffe extrahieren.

Die physikalische Flüssig-Flüssig-Extraktion beruht auf der Verteilung der gelösten Komponenten zwischen den Phasen entsprechend dem Nernst'schen Verteilungsgleichgewicht und richtet sich kinetisch nach den Transportgeschwindigkeiten des Überganges in die andere Phase. In Flüssigmembranprozessen sind die Extraktion und Rückextraktion in einem kombinierten Schritt vereinigt. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wird eine wässrige Phase, die zu transportierenden Moleküle (Analyte) enthält, als „Feed-“ oder „Donor-Phase“ bezeichnet. Die andere wässrige Phase, die zum Abfangen der durch die angrenzende organische Bulk-Membranphase transportierten Moleküle dient, wird als „Strip-“ oder „Acceptor-Phase“ bezeichnet. Die Moleküle werden aus der wässrigen Feed-Phase zur Phasengrenzfläche „Feed-Lösung/Flüssigmembranen“ transportiert, gehen eine Reaktion an der Phasengrenze mit dem Carrier ein, treten in die flüssige Membranphase über und gelangen wieder durch einen Transport-Vorgang an der Membran/Strip-Phasengrenzfläche in die Strip-Phase.

### 4.2.3 Trägerstützte Flüssigmembrane, SLM

#### Flachmembrane

Bei den trägergestützten Flüssigmembranen werden verschiedene hydrophobe Polymerkörper verwendet. Zur präparativen trägergestützten Flüssigmembranen wird das poröse Trägermaterial mit einer Flüssigmembran getränkt. Dieses wird dann zwischen der Feed- und Strip-Phase als Trennwand eingesetzt.

#### Hohlfasermembrane

Die auch in SLM-Technik eingesetzten Polymerfasern mit einem Lumen von ca. 0,1-0,8 mm, die unterschiedlich chemisch funktionalisiert sowie mikro- und makroporös sein können, lassen sich zu Bündeln in einem Membranmodul zusammenfassen. Somit sind hohe

Austauschflächen und hohe Permeationsraten bei geringem Transmembrandruck erreichbar, die u.a. vorteilhafte technische Anwendungen zur Crossflow-Mikrofiltration und Gegenstrom-Dialyse bieten. Die Module werden auch für analytische Zwecke miniaturisiert und in der Probenvorbereitung eingesetzt [216-220].

Mit dem Zitat von Jönsson; "*Supported liquid membrane extraction is the most versatile membrane extraction technique for analytical sample preparation* [43]", wird die Bedeutung der trägergestützten Flüssigmembrane in der Analytik unterstrichen. Jönsson et. al. haben diese Systeme zur Anreicherung vieler verschiedener Stoffe in unterschiedlichen Matrices angewendet. Dabei wurden Flach- und Hohlfaser-Membranmodule verwendet, wo die Feed- und Strip-Phasen während der Extraktion bzw. Anreicherung kontinuierlich durch die Membran flossen. In diesem System wurden große Feed-Volumina verwendet und die Stoffe in ein kleineres Strip-Volumen (10-1000  $\mu\text{L}$ ) aufgenommen. Diese Membran-Module konnten mit der HPLC on-line gekoppelt werden. Hohe Selektivität und Anreicherungs-faktoren wurden erreicht, wobei die Extraktionseffektivität  $E$  (s. Gl. 6) im Bereich von 20-80 % und die Anreicherungs-faktoren  $E_e$  bis zu 2000 lagen. Jedoch unterscheiden sich die Extraktionseffektivitäten und Anreicherungs-faktoren je nach der Stoffklasse und der Matrix. Jönsson et. al. haben die Ropivacaine-Metabolite in Urin untersucht, wobei die Anreicherungs-faktoren nur bei 6-136 und Extraktionseffektivitäten bei 35-73 % lagen [221]. Theoretisch kann bei den trägergestützten Flüssigmembransystemen eine über 4000 fache Anreicherung erreicht werden. Als Flüssigmembrane wurden PTFE-Trägermaterial (in flacher oder Hohlfaser-Form) in Dihexylether oder n-Undecan mit und ohne Carrier-Zusatz eingesetzt [40-42, 109-110, 115, 149-152, 155, 158, 162, 164, 167].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bulk-Flüssig-Membrane und trägergestützte Flüssigmembrane getestet. Bei den trägergestützten Membransystemen wurden Flachmembranmaterialien verwendet und unterschiedliche Kammer- und Beutel-Module für die Flüssigmembran-Untersuchungen entwickelt, welche sehr hohe Volumenunterschiede zwischen der Feed- und Strip-Phase aufweisen (s. Kap. 5.3.3.1, Abb. 33 und Kap. 5.4.2, Abb. 36). Diese Module unterscheiden sich von den herkömmlichen trägergestützten Membran-Modulen dadurch, dass es sich bei diesen Systemen um keine *fließenden* Feed- und Strip-Phasen handelt, sondern bestimmte Volumina der beiden Phasen in Kammer- oder Beutel- Systemen gefüllt und unter kontinuierlicher Rührung der beiden Phasen die Extraktionsvorgänge über Konvektion gesteuert werden. Das Ziel hierbei war, die Flüssigmembrane für die Anreicherung und analytische Bestimmung der in Wasser-Proben in Spuren (ng/l bis  $\mu\text{g/L}$ ) enthaltenen Arzneistoffe einzusetzen. Da das Extraktionsverhalten dieser Stoffe mit Flüssigmembranen noch nicht untersucht wurde, stellt dieses Ziel eine neue

Herausforderung für die Anwendung der Flüssigmembrane in der Analytik dar. In Kapitel 4.2.4 werden die Theorie und Prinzipien der Flüssigmembranvorgänge ausführlicher diskutiert. Die Untersuchungsmethodik für die ausgewählten Arzneistoffe (SFM, CBZ, DCF und IBU) ist in dem Kap. 5.1 aufgeführt.

#### 4.2.4 Theorie und Prinzipien der Flüssigmembran-Extraktion

Flüssigmembranextraktion kann als eine kombinierte Extraktion aus zwei Flüssig-Flüssig-Extraktionen, zuerst in eine organische Solvent und dann eine Reextraktion in eine sekundäre wässrige Phase gesehen werden. Das besondere bei den Flüssigmembranen ist, dass die Extraktionsschritte simultan erfolgen und dadurch der Massentransferkinetik effizienter ist. Der Massentransfer von der Feed- zu Strip-Phase ist proportional zum Konzentrationsgradienten ( $\Delta C$ ).

$$\Delta C = \alpha_F \cdot C_F - \alpha_S \cdot C_S \quad (4)$$

$\alpha_F, \alpha_S$  Die Fraktionen von den Analyten, die in extrahierbarer Form in aktueller Phase vorliegen.

$C_S$  Konzentration in der Strip-Phase

$C_F$  Konzentration in der Feed-Phase

$\Delta C$  Konzentrationsgradient zwischen Feed- und Strip-Phase

Am Anfang der Extraktion ist  $C_S$  Null.

$$E_{e(\max)} = (C_F / C_S)_{\max} = \alpha_F / \alpha_S \quad (5)$$

$E_{e(\max)}$  Maximal erreichbarer Anreicherungsfaktor

Im Prinzip sind zwei Flüssigmembranextraktionsarten möglich; membrankontrollierte und feedkontrollierte Extraktion. Wenn die Extraktion membrankontrolliert ist, diffundieren die Analyte durch die Membran, so dass eine langsame Extraktion erreicht wird. Beim feedkontrollierten Prozess ist der Massentransfer größer. Wenn der Verteilungskoeffizient zwischen Feed- und Membran-Phase ( $K$ ) kleiner als eins ist, ist die Extraktion typisch membrankontrolliert. Bei den Verteilungskoeffizienten größer als zehn läuft der Massentransfer feedkontrolliert ab [44]. Der Verteilungskoeffizient hat sonst keinen großen Einfluss auf die Effektivität der Extraktion. Der Massentransfer nimmt nur leicht mit dem zunehmenden Verteilungskoeffizienten  $K$  zu. Da der Verteilungskoeffizient  $K$  nicht in der Gl. 5 vorhanden ist, beeinflusst den maximalen Anreicherungsfaktor nicht, sondern nur die Rate des Massentransfers. Das ist der Kontrast zu den normalen Flüssig-Flüssig-Extraktions-Konditionen. Ein sehr hoher Partitionskoeffizient ist auch nicht günstig, weil die

Extraktion von der Membran in die Strip-Phase stark abnimmt. Dieses Phänomen wird Memory-Effekt genannt [44].

Die Extraktionseffektivität ( $E$ ) ist üblicherweise definiert als die Fraktion von Analyten in der Feed- zu der Fraktion in der Strip-Phase.

$$E = n_S / n_F \quad (6)$$

$n_F$  Molzahl in der Feed-Phase

$n_S$  Molzahl in der Strip-Phase

$E$  Extraktionseffektivität bezogen auf die in die Strip-Phase extrahierte Menge

Als Alternative kann die folgende Gleichung angewendet werden:

$$E' = (n_F - n_W) / n_F \quad (7)$$

$E'$  Extraktionseffektivität bezogen auf die von der Feed-Phase extrahierte Menge

$n_W$  Die Molzahl der Analyten, die die Feed-Phase verlassen.

$n_F$  Die Molzahl der Analyten in der Feed-Phase

Gl. 6 zeigt, wie viel in die Strip-Phase aufgenommen wird, während die Gl. 7 zeigt, wie viel von der Feed-Phase aus extrahiert wird. Die Wiederfindung wird durch die folgende Gleichung definiert:

$$\text{Wiederfindung: } R = E / E' \quad (8)$$

Wenn die Wiederfindung 100 % ( $E = E'$ ) ist, heißt es, dass keine Analyte verloren wurden. Wenn  $E < E'$  ist, wird ein Teil der Analyte in der Apparatur entweder adsorbiert oder sie haben die Membran-Phase nicht verlassen.

Aus den Gl. 4, 5 sind zu entnehmen, dass für eine effektive Flüssigmembranextraktion die Analyten in der Feed Phase in neutrale, extrahierbare Form umgewandelt werden sollen ( $\alpha_F$  unendlich). Diese sollen durch die Membran in die Strip-Phase transportiert werden, in der sie in eine unextrahierbare Form umwandelt werden, d.h.  $n_S$  soll Null werden. Dieser Durchgang wird Trapping genannt und über einige chemische Wege erreicht, welche direktes und indirektes Trapping genannt werden [44].

#### 4.2.4.1 Carrier-freie Flüssigmembrane – Direktes Trapping

##### 4.2.4.1.1 Einfluss der Säurekonstante der Analyten auf die Flüssigmembranextraktion

Bei der einfachen Permeation von einer basischen Verbindung, z.B. von einem Amin muss der pH-Wert in der Feed-Phase höher als der  $pK_a$ -Wert des Amins liegen, während der pH-Wert in der Strip-Phase niedriger eingestellt werden muss, damit die Analyten in der Strip-Phase polarer vorliegen. Beim Kontakt der Probe mit der Flüssigmembran verteilen sich die ungeladenen Teilchen in die Membran-Phase. Um die Amine wieder effektiv in die Strip-

Phase zu extrahieren, muss die Strip-Phase sauer eingestellt werden, damit die Amin-Moleküle schnell protoniert werden und nicht wieder in die Membran zurückkehren. Für ein einfachprotoniertes, basisches Molekül ist  $\alpha_S$  für die nicht ionisierten Moleküle in der Strip-Phase durch die folgende Gleichung gegeben:

$$\alpha_S = K_a / ([H^+] + K_a) \quad (9)$$

$K_a$  Dissoziationskonstante für das Ammonium-Ion.

Es wurde festgestellt, dass der niedrigste  $\alpha_S$ -Wert praktisch 0,0005 ist. D.h. nach der Gl. 9 soll der pH-Wert in der Strip-Phase 3,3 Einheiten unter dem  $pK_a$ -Wert liegen. Für die sauren Verbindungen soll der pH-Wert in der Strip-Phase ähnlicher Weise 3,3 Einheiten über den  $pK_a$ -Wert liegen. Der pH-Wert in der Feed-Phase soll dementsprechend eingestellt werden, so dass  $\alpha_F = 1$  ist. Unter diesen Bedingungen können über 2000 fache Anreicherungsfaktoren erreicht werden.

Geladene Makromoleküle, wie Proteine werden mit der Flüssigmembranextraktion nicht angereichert, auch die Extraktionsrate von ungeladenen Makromolekülen ist wegen ihres niedrigen Diffusionskoeffizienten sehr niedrig.

#### 4.2.4.2 Einfluss der Hydrophobie der Analyten auf die Flüssigmembranextraktion

Die Hydrophobie der Verbindungen spielt eine sehr große Rolle bei der Flüssigmembranextraktion. Die hydrophilen Verbindungen verteilen sich unwillig in der Membran, während die sehr hydrophoben neutralen Moleküle sich leicht in die Membran akkumulieren, aber nicht in die Strip-Phase weiter extrahieren lassen [44].

Als Kriterium für die Hydrophobie wurde der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und Octanol gewählt [222-224]. Octanol enthält eine hydrophobe Seitenkette, die die Mischbarkeit mit Wasser aus entropischen Gründen verhindert und zur Bildung eines Zweiphasensystems mit Wasser führt.

Nach der mathematischen Grundlage ist der Verteilungskoeffizient die Hauptquelle des Widerstandes für Massentransfer zwischen Feed-Phase und die Membran. Bei einem feedkontrollierten Extraktionsprozess nimmt der Massentransfer mit zunehmendem Octanol/Wasser-Partitionskoeffizienten ( $K_{OW}$ ) zu. Die Extraktionseffektivität nimmt mit einem sehr hohen  $K_{OW}$  öfters wieder ab [44]. Dieser Effekt kann mit der existierenden Massentransfer-Kinetik nicht erklärt werden.

$$\Delta C = \alpha_F \cdot C_F - \alpha_S \cdot C_S \cdot \frac{K_{OW,S}}{K_{OW,F}} \quad (10)$$

$\alpha_F, \alpha_S$  Analyt-Fractionen in extrahierbarer Form (nicht geladen)

$K_{OW,F}$ ,  $K_{OW,S}$  Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient in Feed- bzw. Strip-Phase.

Ob der Extraktionsprozess feed- oder membrankontrolliert abläuft, hängt von dem  $K_{OW}$  ab. Bei großen  $K_{OW,F}$ -Werten ist der Extraktionsprozess feedkontrolliert, während er bei kleinen  $K_{OW,F}$ -Werten membrankontrolliert abläuft. Bei sehr hohen  $K_{OW}$ -Werten nimmt die Extraktionseffektivität wieder ab und die Analyten werden nicht aus der Membran-Phase in die Strip-Phase reextrahiert [44].

Die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten werden durch die Gleichungen von (11) bis (14) bestimmt [117].

Verteilungskoeffizient der Analyten zwischen der Feed-Lösung und der organischen Membran:

$$K_F = \left\{ \frac{[A]_{F(i)} - [A]_{F(f)}}{[A]_{F(i)}} \right\} \quad (11)$$

$[A]_{F(i)}$ ,  $[A]_{F(f)}$  gemessene Konzentrationen in der Feed-Phase vor und nach der Extraktion

Verteilungskoeffizient der Analyten zwischen der Strip-Lösung und der organischen Membran:

$$K_S = k_D / \alpha_A \quad (12)$$

$k_D$  ist die Verteilungskonstante der Analyten zwischen der organischen Phase und der Strip-Phase.  $k_D$  und  $\alpha_A$  werden durch die folgenden Gleichungen berechnet:

$$k_D = [A]_m / ([A]_a + [AH^+]_a) \quad (13)$$

$$\alpha_A = K_a / [H^+] + K_a \quad (14)$$

$[A]_m$  ist die Konzentration des Analyten in der organischen Phase im Gleichgewicht.  $[AH^+]_a$  und  $[A]_a$  sind die Gleichgewichtskonzentrationen der Analyten in der ionischen und nicht-ionischen Form in der Strip-Lösung.  $K_a$  ist die Dissoziationskonstante des Analyten.  $[H^+]$  ist Konzentration der Protonen in der Strip-Lösung.

Die Flüssigmembranextraktion soll am besten bei hydrophoben Verbindungen mit  $K_{OW}$ -Werten, die kleiner als drei ist, anzuwenden sein [44].

Zur experimentellen Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten beschrieb Hansch eine Standardbestimmungsmethode [222]. Dabei werden definierte Volumina von Wasser und Octanol zusammengegeben, 24 h geschüttelt und dann ruhen gelassen, bis sich die Phasen wieder getrennt haben und ein Zustand gegenseitiger Sättigung erreicht ist.

Anschließend wurde die Substanz einer bestimmten Menge in Octanol gelöst, ein exakt abgemessenes Volumen dieser Lösung zum Zwei-Phasen-System gegeben und bei 20-25°C 24 h geschüttelt. Beide Phasen wurden in einer thermostatisierten Zentrifuge getrennt und jeweils die Konzentration der Substanz in den Phasen bestimmt.

Allerdings ist diese Messmethodik mit möglichen Ungenauigkeiten verbunden, weil die Dissoziation der Chemikalien vernachlässigt wird, die Temperatur nicht konstant bleibt, Verdampfungsverluste und Emulsionen entstehen, das Gleichgewicht zwischen beiden Phasen nicht erreicht und die Aggregation von Molekülen nicht berücksichtigt wird [222].

Es gibt mittlerweile auch zahlreiche Computerprogramme zur Berechnung der Verteilungskoeffizienten. Für die Membran-Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden  $\log K_{ow}$ -Werte der Arzneiwirkstoffe von dem ACD-Labor berechnet (s. Tab. 6, Kap. 5).

#### 4.2.5 Carrier-beladene Flüssigmembrane - Indirektes Trapping

Beim indirekten Trapping werden Ionenpaar-Bildungs- oder Chelatierungs-Reagenzien in die Feed- oder Membran-Phase dazuaddiert, um die Selektivität und den Massentransfer zu erhöhen und die extrahierten Moleküle nicht wieder in die Membran zurückzulassen. Beim indirekten Trapping geschieht gleichzeitig auch das direkte Trapping.

Für die Extraktion von Anionen wird der Carrier z.B. ein tertiäres Amin in die Feed-Phase dazugemischt, mit dem die Anionen in die extrahierbaren Komplexe überführt werden. Die extrahierten Moleküle werden mit einem anderen Ligand in die Strip-Phase zurückextrahiert. Neben dem Transport der Haupt-Ionen geschieht auch ein Counter-Transport in die umgekehrte Richtung. Die Analyten werden in derselben Form in die Strip-Phase überführt. Die Transportmechanismen mit den Carrier-Molekülen sind in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

##### 4.2.5.1 Kationentransport mit neutralem Carrier

Kationen können durch zwei unterschiedliche Arten von Carrier-Molekülen – neutralen und sauren - transportiert werden. Als neutraler Carrier können nicht-ionische Tenside, wie z.B. Alkylpolyglycoside eingesetzt werden. Ein neutraler Carrier transportiert ein organisches Kation ( $[M^+]$ ) zusammen mit einem Anion ( $[X^-]$ ). Es resultiert ein so genannter **Co-Transport**, der schematisch in der **Abb. 7** dargestellt ist.

Beim Transport von einem Ionenpaar ( $M^+X^-$ ) mittels eines neutralen Carriers ( $[C]$ ) sind vier elementare Prozesse beteiligt:

- 1- An der Phasengrenze zwischen Feed-Phase und Membran kommt es zur Komplexbildung mit dem neutralen Carrier.

*Die Reaktion an der Phasengrenze zwischen der Feed- und Membran-Phase:*



$\overline{MCX}$  : Lipophiler Ionenpaar-Komplex

$\overline{\quad}$  : organische Phase (fortlaufend)

Der resultierende lipophile Ionenpaar-Komplex diffundiert durch die Membran.

- 2- An der Grenzfläche zwischen Membran und Strip-Phase dissoziiert der Komplex und das verbleibende Ionenpaar gelangt in die Strip-Phase.

*Die Reaktion an der Phasengrenze zwischen der Membran- und Strip-Phase:*



- 3- Der freie Carrier diffundiert von der Phasengrenze in die Bulk-Membranphase zurück.

Der Konzentrationsgradient der Substanz in der Membran lässt sich einfach aus der Extraktionskonstante (K) des Carriers und der Weglänge (L) berechnen:

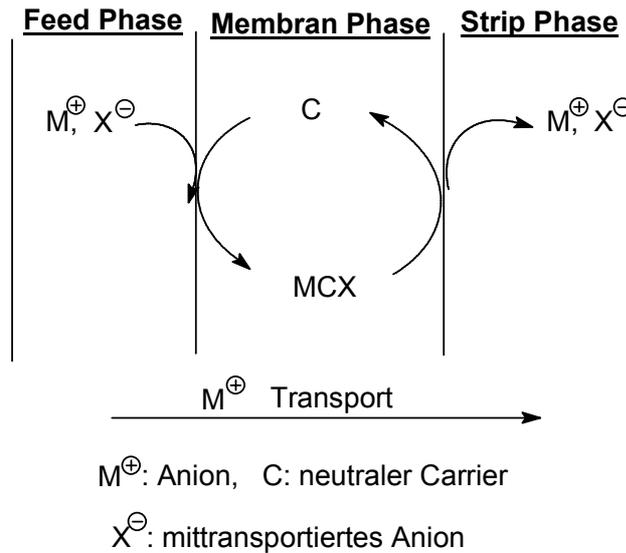
$$\frac{([\text{Carrier} - M^+]^S - [\text{Carrier} - M^+]^F)}{K} = \frac{K \cdot [\text{Carrier}]_{total}}{L} \left( \frac{[M^+]_S}{1 + [M^+]_S \cdot K} - \frac{[M^+]_F}{1 + [M^+]_F \cdot K} \right) \quad (17)$$

Damit ergibt sich für den Massenfluss der Substanz die folgende Gleichung:

$$J_m = - \frac{D \cdot K \cdot [\text{Carrier}]_{total}}{L} \left( \frac{[M^+]_S}{1 + [M^+]_S \cdot K} - \frac{[M^+]_F}{1 + [M^+]_F \cdot K} \right) \quad (18)$$

$M^+$  Kation,  $K$  Extraktionskonstante,  $L$  Weglänge,  $J_m$  Massenfluss,

$D$  Diffusionskoeffizient, Index F Feed-Phase, Index S Strip-Phase



**Abb. 7:** Schematische Darstellung eines Co-Transport-Membransystems (Symport) für Kationentransport

#### 4.2.5.2 Kationentransport mit saurem Carrier

Die zweite Möglichkeit des Kationentransportes bieten „anionentragende“ Carrier. Als saure Carrier können organische Säuren, wie z.B. Octansulfonsäure eingesetzt werden. Die Gastkationen werden durch einen Kation/Proton-Austauschmechanismus transportiert. Bei einem Transport mit anionischem Carrier handelt es sich um den so genannten **Counter-Transport**, bei dem ein anderes Kation (in dem Fall ein **Proton** als Gegenion), welches sich in der Strip-Phase befindet, entgegen der zu transportierenden Substanz in die Feed-Phase gelangt. Schematisch stellt sich der Vorgang wie folgt dar:

- 1- An der Grenzfläche zwischen der Feed-Phase und Membran bildet sich aus dem anionischen Carrier und dem kationischen Wirkstoff ein elektrisch neutraler Komplex.

*Die Reaktion an der Phasengrenze zwischen der Feed- und Membran-Phase:*

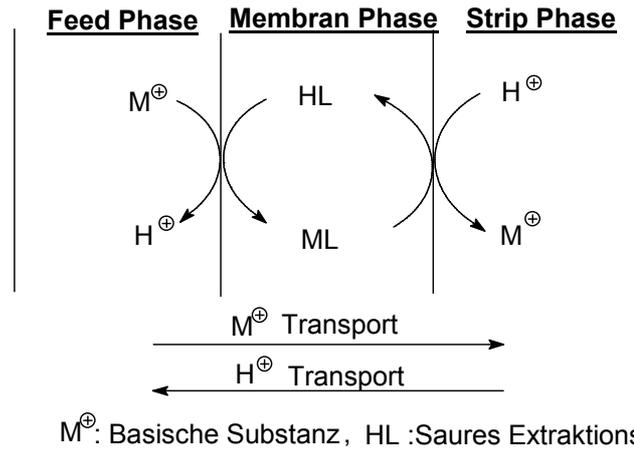


- 2- Der resultierende lipophile Ionenpaar-Komplex diffundiert durch die Membran.
- 3- Eine Austauschreaktion mit dem entgegengesetzt transportierten Proton führt zur Freisetzung der Komponente an der Grenzschicht Membran/Strip-Phase.

*Die Reaktion an der Phasengrenze zwischen der Membran- und Strip-Phase:*



- 4- Der protonierte Carrier-Komplex diffundiert durch die Membran zurück.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung eines Counter-Transport-Membransystems (Antiport) für den Kationentransport

Im Ergebnis dieses Prozesses werden das zu transportierende Kation und das entgegen transportierte Proton in die jeweils gegenüberliegende Lösung überführt. Weil Protonen entgegengesetzt transportiert werden, wird deutlich, dass dieser Transport stark vom jeweiligen pH-Wert der wässrigen Phasen (Feed und Strip) abhängig sein muss. Die Formulierung des Ausdrucks für die Extraktionskonstante  $K$  verdeutlicht diesen Zusammenhang folgendermaßen:

$$K = \frac{[\text{Carrier}^- \cdot M^+] \cdot [H^+]}{[\text{Carrier}] \cdot [M^+]} \quad (21)$$

Damit ergibt sich für den Protonengekoppelten Substanztransport die Gleichung für den Massenfluss:

$$J_m = \frac{D \cdot K \cdot [\text{Carrier}]_{\text{total}}}{L} \left( \frac{[M^+]_S}{1 + [M^+]_S \cdot K} - \frac{[M^+]_F}{1 + [M^+]_F \cdot K} \right) \quad (22)$$

$M^+$  Kation,  $K$  Extraktionskonstante,  $L$  Weglänge,  $J_m$  Massenfluss,

$D$  Diffusionskoeffizient, Index F Feed-Phase, Index S Strip-Phase

Mit diesem Carriertyp lassen sich sowohl der „Uphill-“ als auch der „Downhill-Transport“ verwirklichen. Unter dem Uphill-Transport, auch aktiver Transport genannt, wird der Vorgang verstanden, dass die Kationen entgegen ihrem eigenem Konzentrationsgradienten in die entgegengesetzte wässrige Phase gelangen können. Beim Downhill-Transport tritt eine dem Konzentrationsgradienten gleichgerichtete Stoffübertragung auf. Ein Anionentransport läuft nach gleichartigen Mechanismen, nur mit „umgekehrten Vorzeichen“ ab.

#### 4.2.5.3 Anionentransport mit basischem Carrier

Eine Möglichkeit des Anionentransports ist durch basische Carrier gegeben. Als basische Carrier können tertiäre und quaternäre Ammonium-Salze, wie z.B. Trioctylamin oder Tetrahexylammoniumcarbonat eingesetzt werden.

Die einzelnen hieran beteiligten Schritte lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1- An der Grenzfläche zwischen der Feed-Phase und der Membran bildet sich aus dem basischen Carrier und dem Anion ein elektrisch neutraler Komplex (s. **Abb. 9**).

*Die Reaktion an der Phasengrenze zwischen der Feed- und Membran-Phase:*



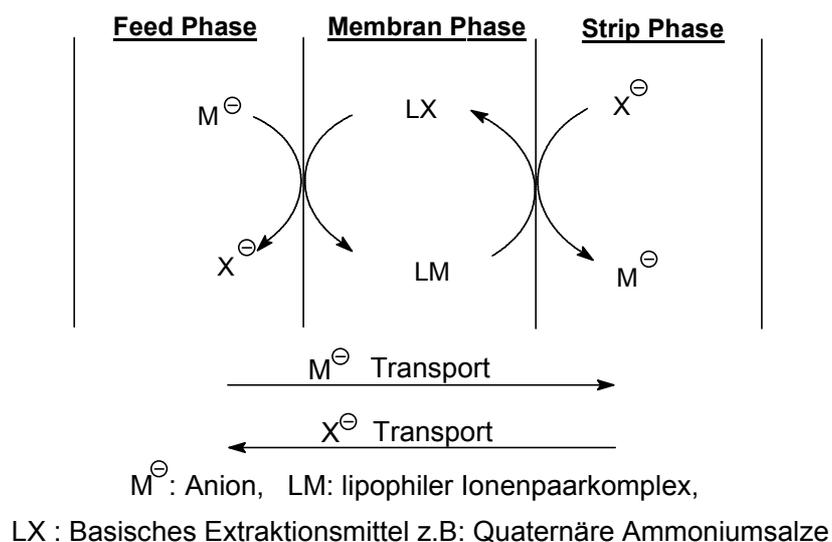
- 2- Der resultierende lipophile Ionenpaar-Komplex diffundiert durch die Membran.
- 3- Eine Anionen-Austauschreaktion mit dem entgegengesetzt transportierten Anion führt zur Freisetzung der Substanz an der Grenzschicht Membran/Strip-Phase (s. **Abb. 9**).

*Die Reaktion an der Phasengrenze zwischen der Membran- und Strip-Phase:*



- 4- Der gebildete Carrier-Komplex diffundiert durch die Membran zurück.

Die organische Komponente und das entgegen transportierte Anion sollten zur jeweils gegenüberliegenden wässrigen Phase transportiert werden. Werden Hydroxid-Ionen entgegen transportiert, ist zu erkennen, dass dieser Transport stark vom jeweiligen pH-Wert abhängig sein muss.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung eines Counter-Transport-Membransystems (Antiport) für den Anionentransport

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Untersuchungsmethodik für die ausgewählten Arzneistoffe

Bei den folgenden Untersuchungen wurden unterschiedliche Flüssig-Membran-Kombinationen entwickelt und auf die ausgewählten Arzneiwirkstoffe angewendet. Inwieweit die aufgeführten Transportmechanismen dabei eine Rolle spielen, werden die Ergebnisse zeigen.

#### Carrier-freie Flüssigmembrane

Die ausgewählten Arzneiwirkstoffe sind durch polare, basische (Carbamazepin), amphotere (Sulfamethoxazol) und sowie saure Gruppen (Diclofenac, Ibuprofen) charakterisiert, woraus sich die auszuwählenden, grundlegenden Typen für prinzipiell geeignete Membransysteme ergeben. In der Tabelle 6 sind die Säurekonstanten ( $pK_a$ ) und die berechneten Wasser-Octanol-Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) der eingesetzten Arzneiwirkstoffe zusammengestellt worden.

**Tabelle 6:** Säurekonstanten ( $pK_a$ ) und Wasser-Octanol-Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) der eingesetzten Wirkstoffe

Arzneiwirkstoff	$pK_a$ <sup>1</sup>	$\log K_{ow}$ <sup>1</sup>
Sulfamethoxazol (SFM)	$pK_{a1} = 2.0$ $pK_{a2} = 5.7$	0,89
Carbamazepin (CBZ)	13,94	2,67
Ibuprofen (IBU)	4,41	3.72
Diclofenac (DCF)	4,18	3,28

<sup>1</sup>Berechnet mit dem Programm ACD/ $\log K_{ow}$  und ACD/ $pK_a$  (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Kanada)

#### **Sulfamethoxazol**

SFM hat den niedrigen Verteilungskoeffizient (s. Tab. 6), welcher darauf hinweist, dass SFM sehr schwer aus der wässrigen Phase zu extrahieren ist. Als Membran kommen polarere organische Lösemitteln zur Auswahl für die SFM-Extraktion, wie z.B. Decanol. SFM hat zwei Säurekonstanten,  $pK_{a1} = 2.0$  und  $pK_{a2} = 5.7$ . Bei der Extraktion aus der Feed- in die Membran-Phase soll die Feed-Phase neutral oder basisch eingestellt sein, damit die SFM-Moleküle in der nicht-ionischen Form vorliegen. Als Strip-Phase sollen leicht saure Lösungen

verwendet werden, so dass die extrahierten Moleküle nicht in die Membran re-extrahiert werden.

### **Carbamazepin**

CBZ hat im Vergleich zu SFM einen größeren Wasser/Octanol-Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow} = 2,67$ ). Bei diesem Verteilungskoeffizienten ist zu erwarten, dass auch für CBZ-Extraktion ein polareres organisches Lösemittel, wie z.B. Decanol zur Extraktion benötigt wird (Polaritätsvergleich der LM; siehe Kap. 5.1.3). CBZ ist ein basischer Wirkstoff mit dem  $pK_a$ -Wert von 13,94, deshalb soll die Feed-Phase bei der Flüssigmembranextraktion basisch eingestellt sein, damit CBZ-Moleküle in der nicht-ionischen Form vorliegen und in die Membran-Phase extrahiert werden. Dementsprechend soll die Strip-Phase sauer eingestellt werden.

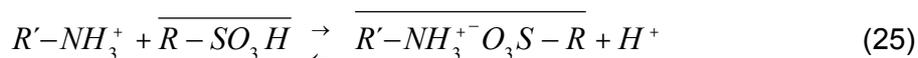
### **Ibuprofen und Diclofenac**

IBU und DCF haben beide Carbonsäure-Gruppen und deren Säurekonstanten liegen relativ nah beieinander (s. Tab. 6). Bei diesen Wirkstoffen soll die Feed-Phase sauer eingestellt werden, wobei die Extraktion in die Membran erleichtert wird. Als Strip-Phase sollen basische Lösungen verwendet werden, damit die beiden Carbonsäuren in der Strip-Phase in ionischer Form vorliegen und nicht in die Membran re-extrahiert werden. Die beiden Wirkstoffe haben höhere Wasser/Octanol-Verteilungskoeffizienten, so dass im Vergleich zu SFM und CBZ eine Erleichterung der Extraktion in die organische Membran und höhere Extraktionsausbeuten zu erwarten sind (s. Tab. 6).

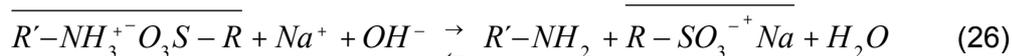
## **Carrier-beladene Flüssigmembrane**

### **Sulfamethoxazol und Carbamazepin**

SFM und CBZ besitzen Amino-Gruppen (Struktur s. Abb. 2) und können mit einem sauren Carrier-Molekül, wie Octansulfonsäure, ein Ionenpaar an der Phasengrenze Feed/Membran bilden. Die Feed-Phase wird sauer eingestellt, so dass die Amino-Gruppen protoniert vorliegen und leichter mit der Säure Ionenpaare bilden. Die Reaktion an der Phasengrenze Feed/Membran lautet:



SFM und CBZ sollen an der Phasengrenze Membran/Strip wieder freigesetzt und in die Strip-Phase transportiert werden. Als Strip-Phase wird Natriumhydroxid eingesetzt und Hydroxid-Ionen werden als Gegenion in die entgegengesetzte Richtung transportiert (in die Membran). Die Reaktion an der Phasengrenze Membran/Strip geschieht wie im Folgenden:

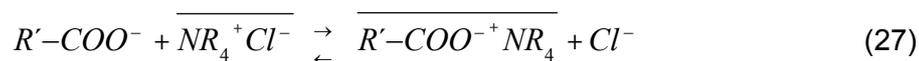


$R'-NH_2$  : Carbamazepin oder Sulfamethoxazol;  $R-SO_3H$  : Octansulfonsäure

Dieses Transportmechanismus wurde bei der Extraktion von SFM und CBZ erwartet. Die Feed-Lösung soll aber aus allen vier Arzneistoffen hergestellt werden, so dass auch das Transportverhalten von DCF und IBU bei dieser Membran-Kombination verfolgt werden kann.

### **Ibuprofen und Diclofenac**

IBU und DCF besitzen Carbonsäure-Gruppen und bilden mit einem quaternären oder tertiären Amin als Carrier Ionenpaare an der Phasengrenze Feed/Membran. Verwendet wurden Tetrahexylammoniumchlorid als quaternäres Amin und Trioctylamin als tertiäres Amin. Mit Tetrahexylammoniumchlorid geschieht an der Phasengrenze Feed/Membran die folgende Reaktion:



An der Phasengrenze Membran/Strip dissoziiert der Wirkstoff-Carrier-Komplex und die Carbonsäure-Moleküle werden von der Strip-Phase extrahiert, wobei ein Gegenion, in dem Fall ein Proton, in die Membran-Phase gelangt. In der anschließenden Gleichung wird die Reaktion an der Phasengrenze Membran/Strip ausgeführt:



$R'-COOH$  : Ibuprofen oder Diclofenac;  $NR_4Cl$  : Tetrahexylammoniumchlorid

Bei diesem Membrantransport sollte der pH-Wert der Feed-Phase höher als die Säurekonstante der beiden Wirkstoffe sein, damit die Komplexbildung mit Carrier-Molekülen erleichtert wird. Als Strip-Phase wird HCl-Lösung verwendet, so dass die Protonen in die entgegengesetzte Richtung transportiert werden. Unter diesen Bedingungen wurde der Transport von IBU und DCF erwartet, wobei die Feed-Phase alle vier Arzneistoffe enthalten wird, so dass auch das Transportverhalten von SFM und CBZ verfolgt werden kann.

Der Grund hierfür ist, dass während eines indirekten Trapping durch einen Carrier simultan auch ein direktes Trapping (Extraktion durch organische Membran) erfolgt. Die geplanten Drei-Phasen-Kombinationen können sowohl die Extraktion von den Ziel-Wirkstoffen als auch die von den anderen Wirkstoffen ermöglichen, wobei hierfür die Feed-, Membran-, Strip-Zusammensetzungen im ersten Blick ungünstig erscheinen. Beispielsweise wird bei einem indirekten Trapping (Extraktion durch Ionenpaarbildung mit Carrier) der sauren Wirkstoffe

(Ziel-Wirkstoffe) die Feed-Phase basisch und Strip-Phase sauer eingestellt. Diese Bedingungen sind für ein direktes Trapping (Extraktion ohne Carrier) von DCF und IBU ungünstig, weil die Feed-Phase basisch eingestellt ist und die Carbonsäuren in dissoziierter Form vorliegen. Allerdings werden die basischen Wirkstoffe (Nicht-Ziel-Wirkstoffe) dabei besser extrahiert (direktes Trapping), weil sie in der Feed-Phase in nicht-ionischer Form vorliegen, obwohl sie mit dem ausgewählten Carrier-Molekül keine Ionenpaare bilden können. Das gleiche gilt auch bei der Verwendung von den mit sauren Carrier beladenen Membranen, wobei neben den basischen Ziel-Wirkstoffen auch die sauren Wirkstoffe transportiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Flüssigmembransysteme angewendet. Zuerst sollen mit den *Bulk-Flüssigmembran-Systemen* die optimalen Drei-Phasen-Systeme und Betriebsparameter ermittelt werden. Dazu zählen u.a. der Einfluss von:

- Zusammensetzung der Feed-Phase
- Zusammensetzung der Strip-Phase
- Zusammensetzung der Membran-Phase:
  - Einfluss des Lösemittels
  - Einfluss des Carriers
    - Basische Carrier (z.B. tertiäre und quaternäre Alkylamine)
    - Saure Carrier (z.B. Alkyl-Sulfonsäuren)
    - Metallionen-beladene Carrier (Ausnutzung der Affinitäten der Wirkstoffe, z.B. gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ )
- pH-Wert bzw. pH-Gradient zwischen Feed- und Strip-Phase
- Konzentration der Arzneiwirkstoffe
- Rührgeschwindigkeit
- Verhältnisse der Phasenvolumina
- Langzeitextraktion

In dem zweiten Teil der Arbeit sollen die Phasenkombinationen, die sich durch ihre besondere Transporteffektivität und Selektivität auszeichnen, auf *tränergestützte Flüssigmembran-Systeme* übertragen werden.

## 5.2 Untersuchungen mit Bulk-Flüssigmembranen

### 5.2.1 Experimentelle Bedingungen

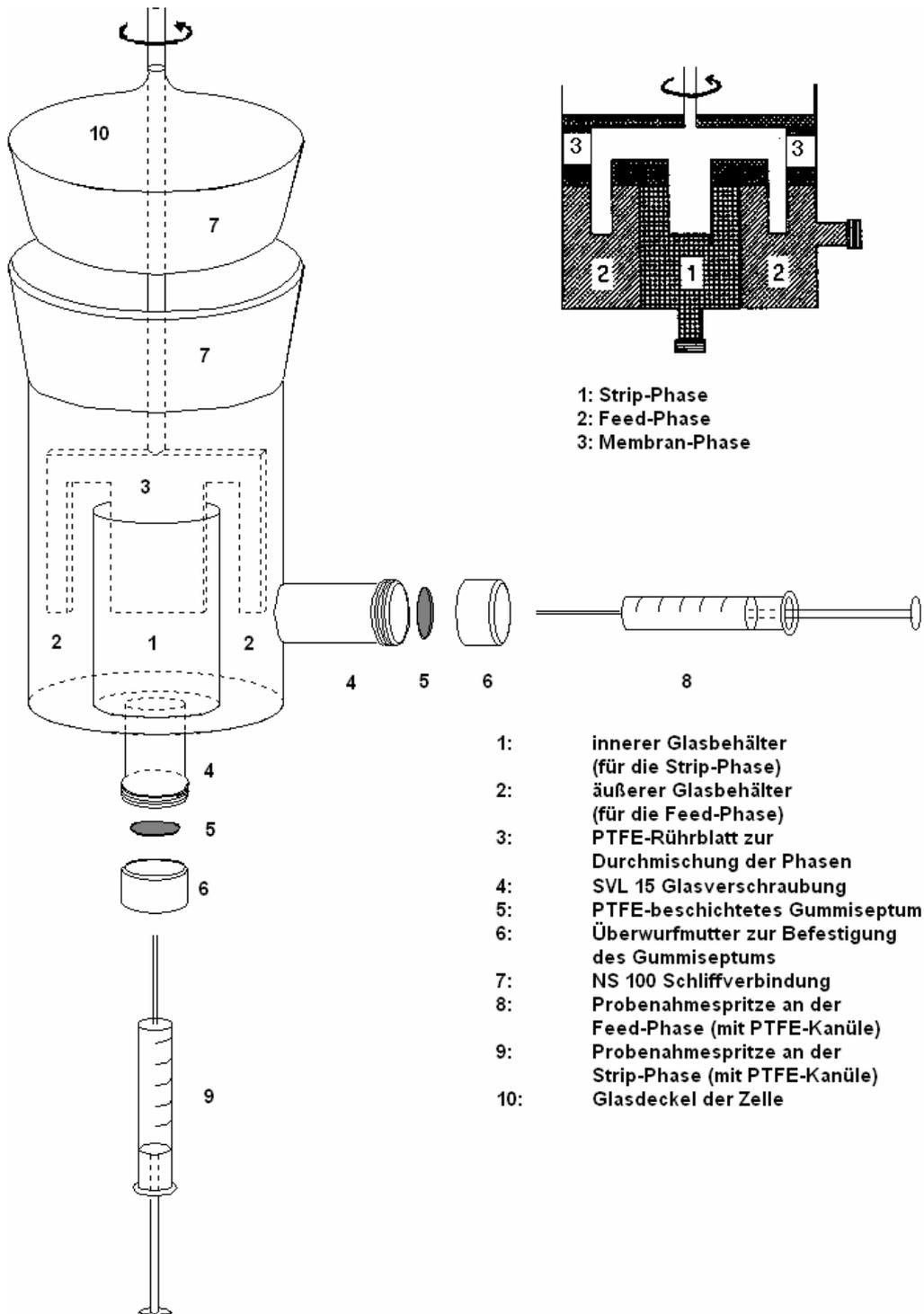
Es wurden zur Durchführung der Arzneiwirkstoff-Extraktion Drei-Phasen-Rührzellen unterschiedlicher Größe verwendet (Abb. 9, Tab. 7). Die komplett aus Glas gefertigte Zelle ist so aufgebaut, dass sie aus zwei Kammern besteht, in denen sich die beiden wässrigen Phasen befinden, welche durch die organische Phase miteinander in Verbindung stehen. Das größere Kompartiment dient zur Aufnahme der Feed-Phase. Die Strip-Phase befindet sich im kleineren Teil. Das größere, äußere Kompartiment ist am oberen Ende mit einer NS 100 Schliffverbindung ausgestattet, auf die ein passender Glasdeckel als Schutz vor Verdunstung bei Verwendung von mittelflüchtigen Lösemitteln aufgesetzt werden kann. Diese Konstruktion bei Zellen gewährleistet eine Probenahme, die mit Hilfe einer Spritze aus beiden wässrigen Phasen weitgehend ohne Störung erfolgt, wobei Gummisepten die Behälter abdichten. Die drei Phasen wurden gemeinsam mit einem aus PTFE hergestellten Rührblatt, das von oben mit einem KPG-Rührmotor gekoppelt ist, koaxial durchmischt. Alle Phasen wurden synchron und kontinuierlich gerührt, so dass die Transportreaktionen nicht durch Diffusion, sondern durch Konvektion bestimmt wurden [225]. Es wurden zwei unterschiedlich große Zellen dieser Konstruktionsart verwendet. Die jeweiligen Volumenverhältnisse (Feed-Membran-Strip) sind in der Tab. 7 zusammengestellt.

**Tabelle 7:** Kenngrößen der Bulk-Flüssigmembran-Zellen

	<b>Feed / Strip / Membran</b>	
Phasenvolumina (cm <sup>3</sup> )	32 / 25 / 20	*Zelle 1 („klein“)
Volumenverhältnisse	1 : 0,62 : 0,78	
Phasenvolumina (cm <sup>3</sup> )	70 / 50 / 35	Zelle 2 („groß“)
Volumenverhältnisse	1 : 0,71 : 0,5	

\* Wenn nicht anders angegeben, wurde Zelle 1 verwendet

Die Konstruktion der Zellen gewährleistet Probennahmen während des Betriebes ohne Unterbrechung mit Hilfe von Mikroliterspritzen aus beiden wässrigen Phasen sowie aus der Membranphase. Es wurden in der Reihenfolge nach 5, 15 und 30 min, sowie nach 1, 2 und 4 h oder noch längerer Reaktionszeit jeweils 0,5 mL Aliquot entnommen und anschließend mit der HPLC-UV-MS/MS die Konzentrationen der einzeln oder kombiniert vorliegenden Wirkstoffe analysiert. Überwiegend wurden die Wirkstoffe kombiniert vorgelegt und das simultane Extraktions- und Strip-Verhalten verfolgt.



**Abb. 10:** Aufbau einer koaxialen Dreiphasen-Rührzelle

### 5.2.2 Durchführung der Versuche

Die Zellen wurden im äußeren Bereich mit der Feed-Lösung und im inneren Bereich mit der Strip-Lösung gefüllt. Beide Phasen wurden vorsichtig mit der Membranphase, die aus einem Carrier und einem organischen Solvent besteht, überschichtet. Dieser Zeitpunkt stellte den

Beginn des Versuchs dar. Die Einstellung der richtigen Rührdrehzahl erfolgte so, dass eine gute Durchmischung jeder Phase, jedoch keine Verwirbelungen der Phasen untereinander auftraten.

Die Proben wurden bei der Kurzzeitextraktion in 5, 15, 30, 60, 120 und 240 min, bei der Langzeitextraktion in 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden mit Einmalkanülen und -spritzen entnommen und dann mit der HPLC-UV analysiert. Zur Analyse der Proben aus Anreicherungsversuchen (s. Kap. 5.2.3) wurde eine HPLC-UV-MS/MS-Verfahren (s. Kap. 5.4) entwickelt. Vor der Anwendung auf die Membranversuche wurde das entwickelte HPLC-UV-MS/MS-Verfahren validiert (s. Kap. 5.5).

### 5.2.3 Carrier-freie Systeme

Die Effektivität der Arzneiwirkstoff-Extraktion aus der wässrigen Feed-Phase in eine organische Bulk-Membranphase, die ausschließlich aus einem reinen Lösemittel besteht, ist eine Funktion zahlreicher Parameter. Dazu zählen z.B. die Größe des Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) des Wirkstoffes zwischen wässriger und organischer Membranphase, die Zusammensetzung der Strip-Phase und die Dimension der Membran. Komponenten mit hohem  $\log K_{ow}$  sollten einerseits leicht von der Membranphase aufgenommen werden, andererseits kann dann die Reextraktion in die Strip-Lösung schwierig werden, was zu niedriger Transporteffektivität führt. Entsprechend sind bei niedrigen  $\log K_{ow}$ -Werten nur niedrige Extraktionsgrade zu erwarten [44].

Diese allgemein gültigen Abschätzungen werden bei den Ergebnissen der Versuchsreihen bestätigt, die zunächst ohne Carrier-Zusatz mit reinen Lösemitteln unterschiedlicher Polarität als organischer Membran durchgeführt wurden.

Bei den Untersuchungen mit der Drei-Phasen-Rührzelle muss die Membran die folgenden Eigenschaften besitzen:

- Die Dichte der Membran soll größer sein als die vom Wasser, damit die Membran die beiden wässrigen Phasen überschichtet und mit ihnen Kontakt hält.
- Um die Verdunstung der Membran-Phase zu vermeiden, sollten nicht leicht-flüchtige organische Solventen eingesetzt werden.
- Die Wasserlöslichkeit des Membran-Solvents sollte möglichst niedrig sein.

Als Membran-Lösemittel, die diese Eigenschaften besitzen (s. Tab. 8), wurden folgende Lösemittel mit **abgestufter Polarität** eingesetzt:

Decanol, Decan/Decanol-Gemisch (u.a. 11:1, v/v) und Dihexylether (Abk. DHE).

**Tabelle 8:** Physikalische Eigenschaften und Toxizitätsdaten der eingesetzten organischen Lösemittel

	Decanol	Decan	Dihexylether
Siedepunkt (°C)	233	174	226
Kp (°C)	7	-30	-43
Dichte (g/L)	0,83	0,73	0,79
Wasserlöslichkeit	0,037 g/L (25 °C)	nicht löslich	nicht löslich
Toxizität	R: 38-41-52/53* S: 26-39-61	R: 10-36/37/38-65* S:23-24-62	R 66**

\*Decan und Decanol sind schädlich für aquatische Organismen.

\*\*Dihexylether verursacht bei wiederholtem Kontakt trockene Haut.

Aus der Tabelle 9 ist zu entnehmen, dass SFM und CBZ, die vergleichsweise niedrigsten (berechneten)  $\log K_{ow}$  aufweisen (s. Tab. 6), jedoch nur im polaren Decanol nach 4 h effektiv extrahiert werden können, während in den unpolaren Systemen die Extrahierbarkeit sehr gering bleibt. Außerdem ist zu erwarten, dass beide Wirkstoffe nur schwierig zu stripen sein werden.

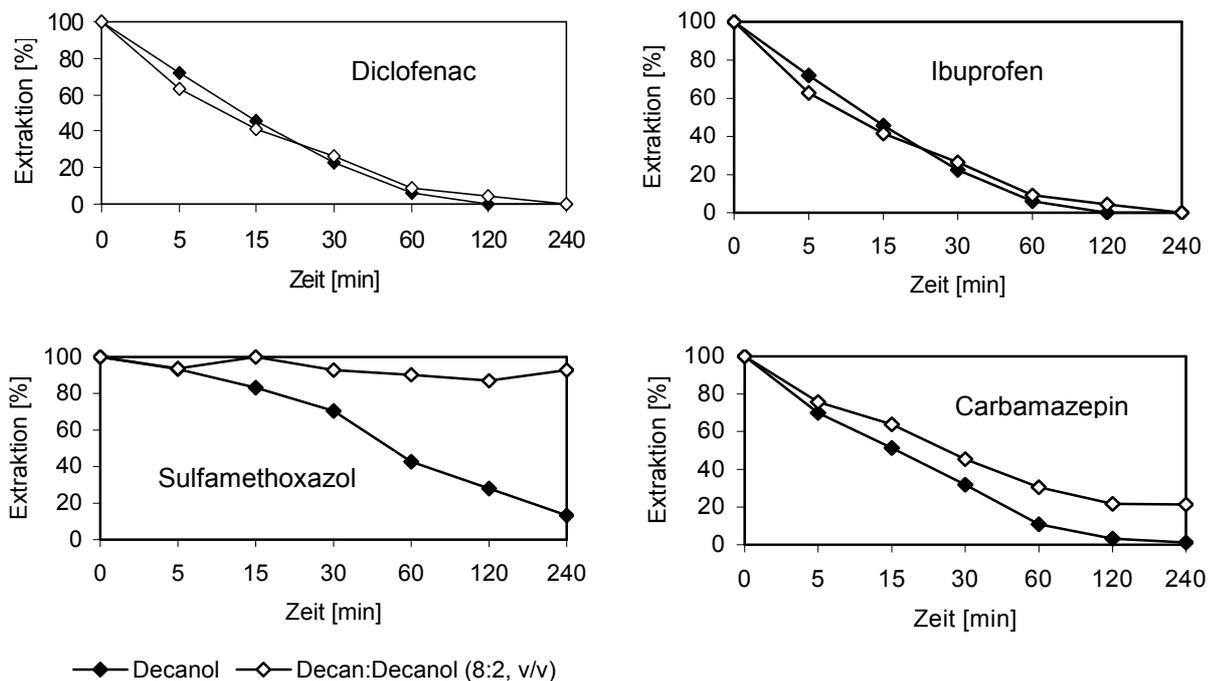
**Tabelle 9:** Extraktionsgrade (%) in Dreiphasen-Bulk-Flüssigmembran-Systemen (Feed-Phase: Arzneiwirkstoffe in Wasser, Strip Phase: 0,1 mol/L HCl, 4 h)

Wirkstoff	Decanol	Decan/Decanol (11:1, v/v)	<sup>2</sup> DHE
			E (%)
Sulfamethoxazol	87,0	10,3	5,1
Carbamazepin	98,9	14,5	31,0
Diclofenac	~100	~100	97,7
Ibuprofen	~100	~100	~100

<sup>1</sup>Extraktionsgrad E (%) bezieht sich auf die Anfangskonzentration (entspr. 100 %) des einzelnen Wirkstoffes in der Feed-Phase; <sup>2</sup>DHE: Dihexylether

Am Beispiel des Sulfamethoxazol wird in Abb. 11 besonders deutlich, wie sich die Polaritätsunterschiede auch auf die Kinetik der Extraktion auswirken, da eine deutlich höhere Extraktionsausbeute mit der polaren Decanol-Phase zu erzielen ist.

Ein völlig anderes Extraktionsverhalten zeigen die beiden Carbonsäuren DCF und IBU, die mit allen eingesetzten polaren und unpolaren organischen Solventen effektiv extrahiert werden, so dass auch mit hohen Transportraten von der Feed- zur Strip-Seite zu rechnen ist. Der Grund hierfür ist, dass die beiden Carbonsäuren im Vergleich zu SFM und CBZ höhere  $pK_{ow}$ -Werte haben und leichter zur organischen Membran-Phase zu extrahieren sind (s. Kap. 5.1, Tab. 6).



**Abb. 11:** Einfluss der Lösemittel-Zusammensetzung (Decan/Decanol) auf die Arzneiwirkstoff-Extraktion von der Feed- in die Membran-Phase (Feed-Phase: Wasser, Strip Phase: 0,1 mol/L HCl)

### 5.2.3.1 Optimierung der Versuchsparameter

Bei den bisherigen Untersuchungen zeigte sich das reine Decanol für CBZ und SFM als bestes Extraktionsmittel, indem die Feed-Phase neutral und die Strip-Phase sauer eingestellt wurden. Bei den weiteren Untersuchungen mit Decanol als Carrier-freie Membran wurde versucht durch die Optimierung der Versuchsparameter und Erprobung unterschiedlicher Strip-Lösungen die beiden ziemlich polaren Wirkstoffe in die Strip-Phase zu reextrahieren und die Extraktionsausbeuten zu erhöhen. Ausgegangen wurde aus dem folgenden Drei-Phasen-System:

Feed-Phase : 10 mg/L je Arzneiwirkstoff (SFM, CBZ, DCF, IBU) in bidest. Wasser

Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl

Membran-Phase: Decanol

Mit diesem Drei-Phasen-System sollten folgende Extraktionsbedingungen und -parameter optimiert werden:

- HCl-Konzentration in der Strip-Phase
- NaCl-Lösung als Strip-Phase
- Rührgeschwindigkeit

- Verhältnisse der Phasenvolumina (Zelldimensionen)
- Langzeitextraktion

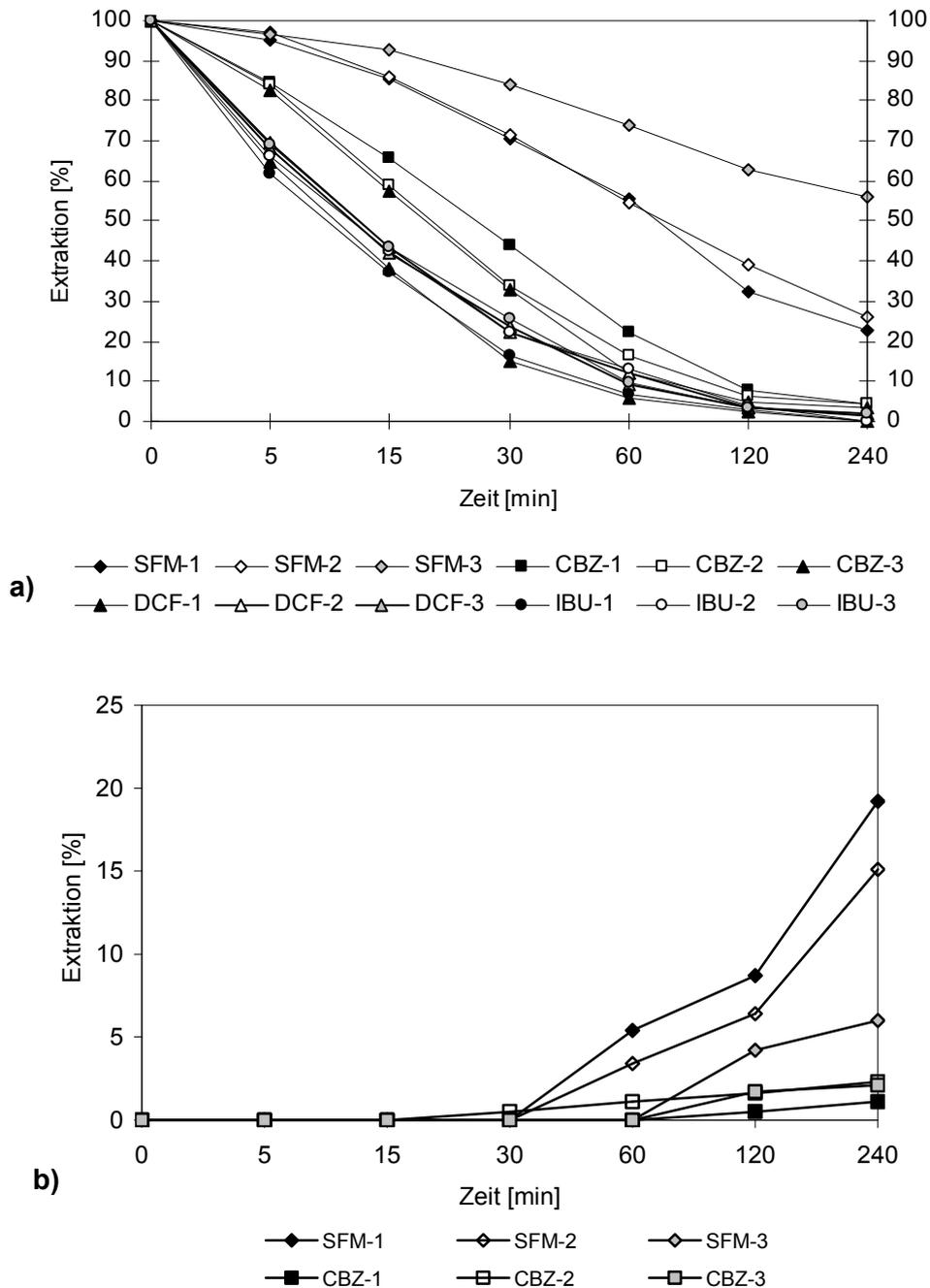
#### **5.2.3.1.1 Einfluss der HCl-Konzentration in der Strip-Phase**

Zur Erklärung des Einflusses der HCl-Konzentration in der Strip-Phase wurden drei verschiedene HCl-Konzentrationen (0,01, 0,1 und 1 mol/L) als Strip-Phase eingesetzt. Die Feed-Phase enthielt 10 mg/L aller vier Arzneiwirkstoffe. Die Membranphase war reines Decanol.

Der SFM-Transport nimmt mit der Zunahme der HCl-Konzentration zu. In der Abb. 12 ist zu sehen, dass SFM mit 1 mol/L HCl als Strip-Mittel zu 56 % von der Feed-Phase extrahiert wurde. Das ist etwa zweifach mehr als bei 0,01 mol/L HCl als Strip-Mittel.

Nach 4 h Extraktion wurden die pH-Werte in den beiden wässrigen Phasen gemessen und festgestellt, dass bei den Versuchen mit 0,1 mol/L und 1,0 mol/L HCl als Strip-Mittel nach der Extraktion die Feed-Phase saurer wurde ( $\text{pH} < 2$ ). Dies kann durch den Kationen-Austausch zwischen den beiden wässrigen Phasen erklärt werden. Durch den höheren Protonen-Gehalt in der Strip-Phase (Strip-Phase-3, s. Abb.12) wird der SFM-Transport beschleunigt, welches auf den Gegentransport von Protonen in die entgegengesetzte Richtung neben SFM-Molekülen zurückzuführen ist. SFM-Moleküle werden nach der Extraktion in die Strip-Phase protoniert und dadurch liegen sie in der Strip-Phase polarer vor, so dass sie nicht in die Membran zurück extrahiert werden. Beim Versuch mit 0,01 mol/L HCl wurde nur SFM in sehr geringen Mengen gestrippt, dementsprechend blieb der pH-Wert in der Feed-Phase neutral (pH-Wert = 7).

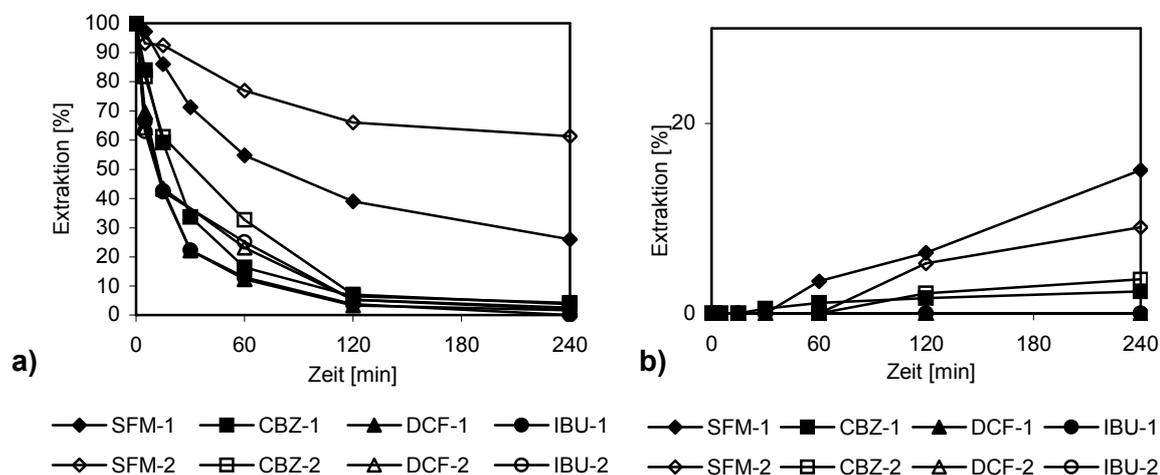
Die Extraktionskinetik wurde für CBZ mit der Abnahme der HCl-Konzentration leicht beeinflusst und die Extraktion wurde schneller. DCF- und IBU-Extraktion wurde nur gering durch die Säurekonzentration beeinflusst, wobei die beiden Wirkstoffe nicht rückextrahiert wurden.



**Abb. 12:** Einfluss der HCl-Konzentration in der Strip-Phase auf den Arzneiwirkstoff-Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in bidest. H<sub>2</sub>O, Membran-Phase: Decanol), **Strip-Phase 1:** 1 mol/L HCl, **Strip-Phase 2:** 0,1 mol/L HCl, **Strip-Phase 3:** 0,01 mol/L HCl

### 5.2.3.1.2 Vergleich von NaCl- und HCl-Lösungen als Strip-Phase

Bei diesem Versuch wurde untersucht, wie 0,1 mol/L NaCl sich als Strip-Phase verhält und ob dadurch eine Verbesserung der Rückextraktion erreicht wird. In der Abb. 13 wurden die Ergebnisse mit denen, die mit 0,1 mol/L HCl als Strip-Phase erzielt wurden, graphisch verglichen.



**Abb. 13:** Vergleich von NaCl- und HCl-Lösungen als Strip-Phase - Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in bidest. H<sub>2</sub>O, Membran-Phase: Decanol), Strip-Phase 1: 0,1 mol/L HCl, Strip-Phase 2: 0,1 mol/L NaCl

Durch das Einsetzen von 0,1 mol/L NaCl als Strip-Mittel wurde keine Verbesserung der Extraktion bzw. Rückextraktion erreicht. Alle vier Analyten wurden mit 0,1 mol/L HCl als Strip-Mittel schneller extrahiert, wobei die Rückextraktion von SFM und CBZ deutlich besser wurden.

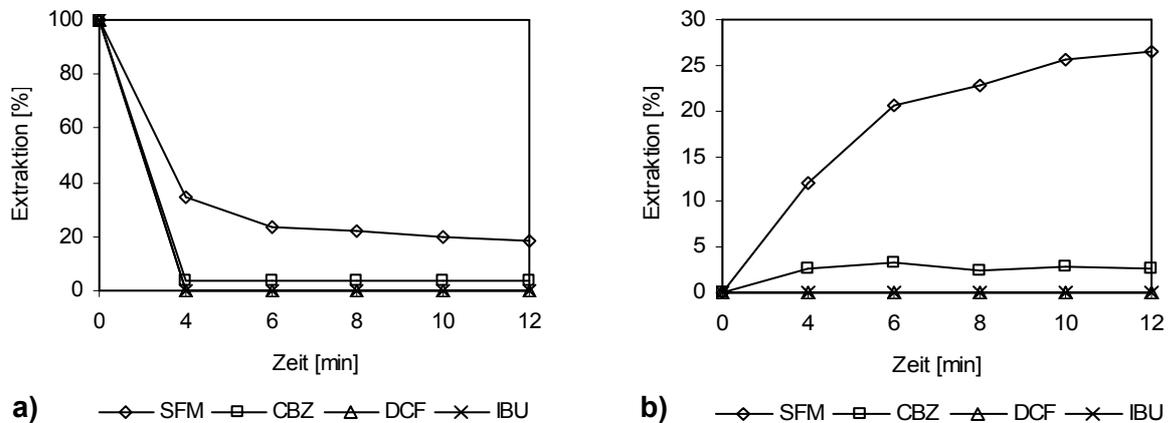
### 5.2.3.1.3 Langzeitextraktion in Decanol

Da sich die reine Decanol-Phase für die Extraktion des SFM als am effektivsten herausgestellt hat, wurde die bisher übliche Extraktionszeit von 4 auf 12 Stunden verlängert, um gegebenenfalls noch eine Verbesserung der Extraktions- und Strip-Ausbeute zu erreichen.

Während des Versuches erfolgten die Probennahmen in Intervallen von 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden. Die Feed-Phase enthielt 10 mg/L aller vier Arzneiwirkstoffe; als Strip-Phase wurde 0,1 mol/L HCl verwendet.

Es stellte sich heraus, dass durch die Verlängerung der Versuchszeit keine gravierende Verbesserung der Transportraten eintritt (s. Abb. 14). Zwar ist bei SFM die Gleichgewichtseinstellung in der Rührzelle sowohl beim Extraktions- als auch beim Rückextraktionsschritt nach vier Stunden noch nicht abgeschlossen. In der verbleibenden

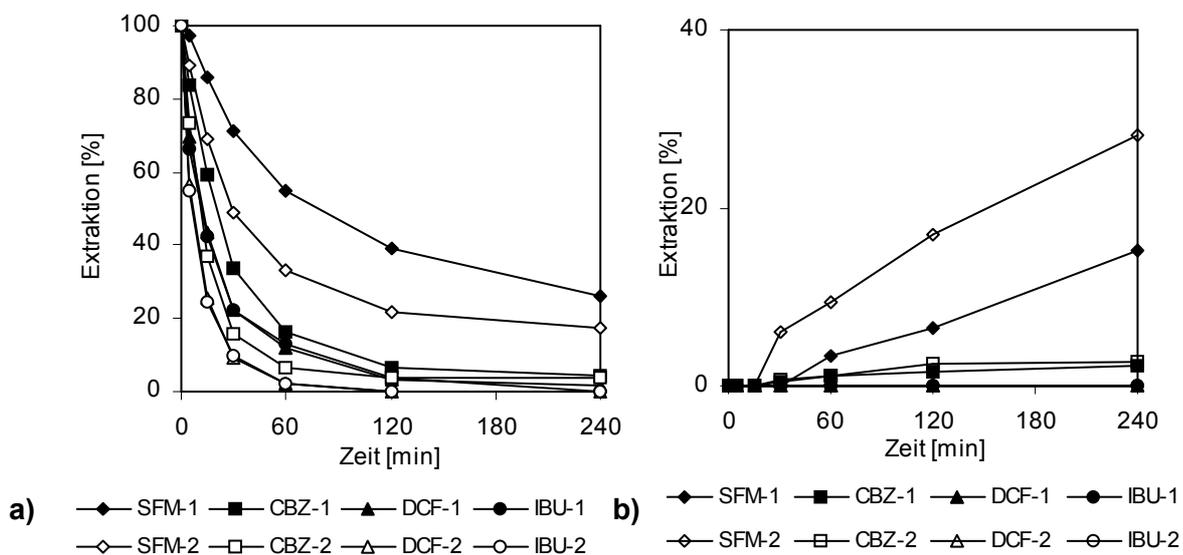
Reaktionszeit steigt der zusätzliche Anteil jedoch nur um ca. 10 % (SFM: extrahiert: 81,6 %, gestrippt: 26,4 %).



**Abb. 14:** Langzeitextraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in Wasser, Membran-Phase: Decanol, Strip Phase: 0,1 mol /L HCl)

#### 5.2.3.1.4 Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport

Die Drei-Phasen-Rührzelle wird während der Extraktion kontinuierlich durch ein PTFE-Blatt gerührt. Zur Erklärung des Einflusses der Rührgeschwindigkeit auf den Arzneiwirkstoff-Transport wurden zwei Extraktionsversuche bei zwei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten und unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt.



**Abb. 15:** Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in bidest. H<sub>2</sub>O, Membran-Phase: Decanol, Strip Phase: 0,1 mol/L HCl), 1. Rührgeschwindigkeit: 60 min<sup>-1</sup>, 2. Rührgeschwindigkeit: 100 min<sup>-1</sup>

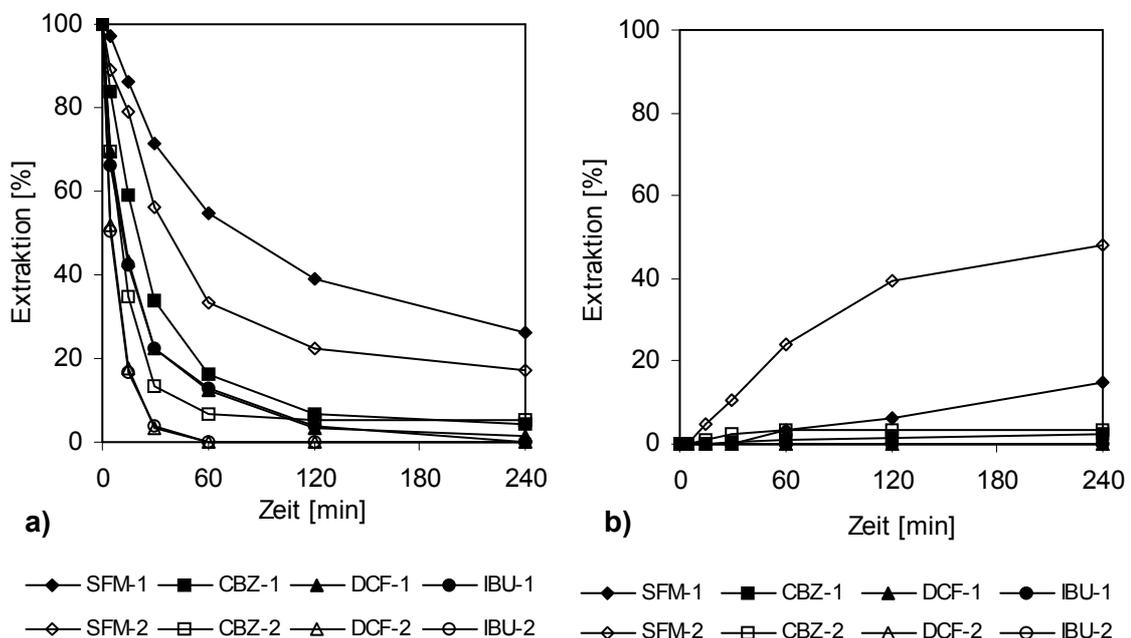
Durch die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit wurde erreicht, dass alle Arzneiwirkstoffe schneller und mit höheren Extraktionsgraden aus der Feed-Phase extrahiert werden (Abb. 15a). Wie aus der Abb. 15b deutlich wird, wurde bei der Rührgeschwindigkeit  $100 \text{ min}^{-1}$  40 % höhere Stripausbeute von SFM erreicht als bei der Rührgeschwindigkeit  $60 \text{ min}^{-1}$ .

### 5.2.3.1.5 Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen

Für diesen Versuch wurden zwei verschiedene Zellgrößen verwendet, welche unterschiedliche geometrische Abmessungen und damit auch unterschiedliche Füllvolumina haben (siehe Tab. 7). Die Kompartiment-Volumina der routinemäßig eingesetzten „kleinen“ Zelle (Feed: 32 mL, Membran: 20 mL, Strip: 25 mL) sind in der zusätzlich gebauten „großen“ Zelle in etwa verdoppelt.

Vergleichende Untersuchungen ergaben, dass von einer Volumenvergrößerung nur das SFM profitiert (Steigerung der Strip-Ausbeute von ca. 15 auf 50 %).

Die Extraktion verhält sich erwartungsgemäß in erster Näherung proportional der Fläche und damit reziprok zu Zeit. Sie wird allerdings bei der kleinen Zelle auch von der Rührgeschwindigkeit beeinflusst. Wie sichtbar in der Abb. 16 wurde, hatte sich die große Zelle für den SFM-Transport als am effektivsten herausgestellt.



**Abb. 16:** Einfluss der Zellgröße auf den Arzneiwirkstoff-Transport-Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ , Membran-Phase: Decanol, Strip Phase: 0,1 mol/L HCl) Zelle 1 (klein): 32 mL Feed-Phase, 25 mL Strip-Phase, 20 mL Membran, Zelle 2 (gross): 75 mL Feed-Phase, 50 mL Strip-Phase, 35 mL Membran

## 5.2.4 Carrier-modifizierte Membransysteme

Prinzipiell sollten in Flüssigmembran-Systemen mit Hilfe von Carrier (basische, saure oder Metallkomplex-bildende Ionenaustauscher, gelöst in einem organischen, mit Wasser nicht mischbarem Solvens) die anzureichernden polaren Arzneiwirkstoffspezies effektiver aus der wässrigen Feed-Phase durch die Flüssig-Membranphase zur Strip-Phase transportiert werden, da neben Verteilungsmechanismen zusätzliche Ionenpaarbildungsreaktionen wirksam werden. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Carrier zu Bildung von Ionenpaaren erprobt, die in **Kap. 5.1** vorgestellt worden sind.

### 5.2.4.1 Basischer Carrier

Zur Untersuchung des Einflusses des basischen Carriers auf den Arzneiwirkstoff-Transport wurden zwei Flüssigmembran-Extraktionen mit der Drei-Phasen-Rührzelle durchgeführt, wobei die Membran-Phase einmal aus einer Decan:Decanol-Mischung (8:2, v/v) besteht und bei dem zweiten Versuch in die Membran ein basischer Carrier Trioctylamin zuaddiert wurde. Die Konzentrationsprofile in **Abb. 17** demonstrieren die Wirkung des basischen Carriers Trioctylamin (TOA), gelöst in Decan-Decanol (Membran-1), im Vergleich zu dem Carrier-freien System (Membran-2).

Sofern in die Membran-Phase Trioctylamin zuaddiert wird, beschleunigt sich die DCF- und IBU-Extraktion erheblich (Halbwertszeit < 2 min). Es ist auf die Ionenpaar-Bildung zwischen der Carbonsäure-Anionen und Carrier-Kationen zurückzuführen. Wie zu erwarten, zeigen dagegen CBZ ( $t_{1/2} \sim 60$  min) und SFM ( $\sim 0$  % Extraktion) keine Beeinflussung durch den basischen Carrier bei der Extraktion in die Membran-Phase, da diese beiden Verbindungen bei diesem Membran-System mit den Carrier-Molekülen an der Phasengrenze keine Ionen-Paare bilden.

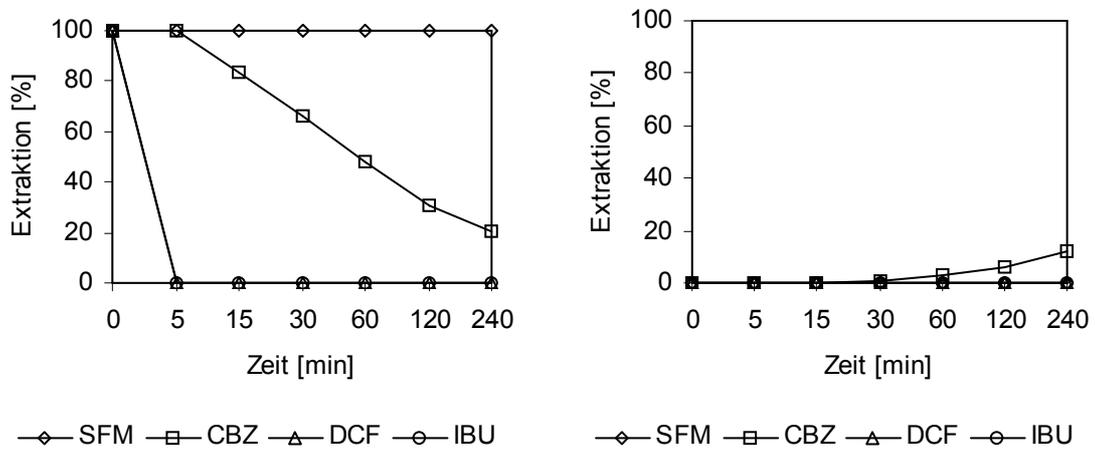
DCF konnte zwar bis über 98 % extrahiert, aber nur spurenweise gestrippt werden. Somit begünstigt im Vergleich zum entsprechenden Carrier-freien System das basische Amin den Extraktionsschritt, doch die Rückextraktionsgrade bleiben äußerst gering. Auffällig ist, dass SFM ohne Carrier bis zu 10 % extrahiert und gestrippt werden kann, während die Carrier-Dotierung den Transport völlig verhindert.

Aus den Voruntersuchungen mit den einzelnen Wirkstoffen ist bekannt, dass unterschiedliche Strip-Reagenzien (2 mol/L  $\text{HClO}_4$  und 1 mol/L  $\text{HCl}$ ) auf das Transportverhalten keine erkennbare Einflüsse hatten, da die Extraktionsverläufe und -ausbeuten für die einzelnen Arzneiwirkstoffe jeweils sehr ähnlich verlaufen [226].

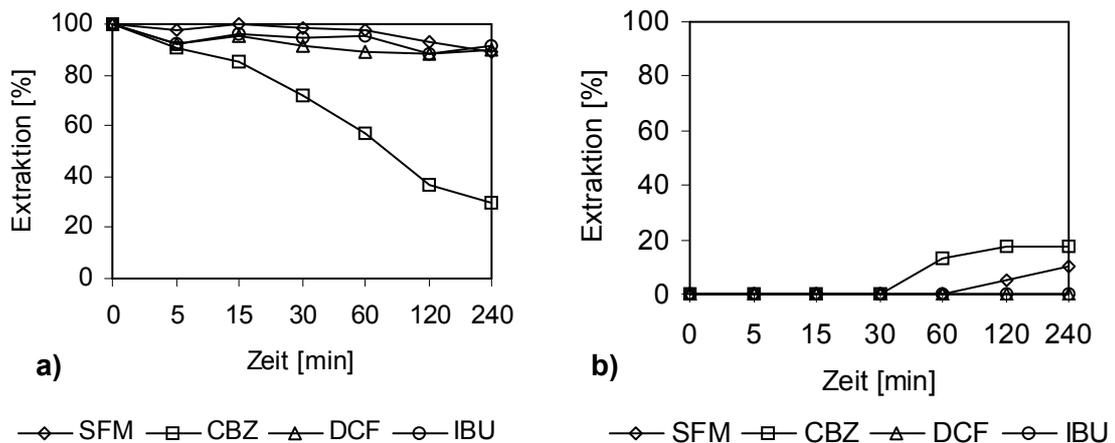
Auch ein quaternäres Ammonium-Salz Tetrahexylammoniumchlorid wurde als basische Carrier eingesetzt und festgestellt, dass Trioctylamin einen besseren Beschleunigungseffekt

zeigte [207, 208]. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Untersuchungen als basische Carrier Trioctylamin verwendet.

**Membran-1:** 0,025 g/L Trioctylamin in Decan-Decanol (80 % : 20 %, v/v)



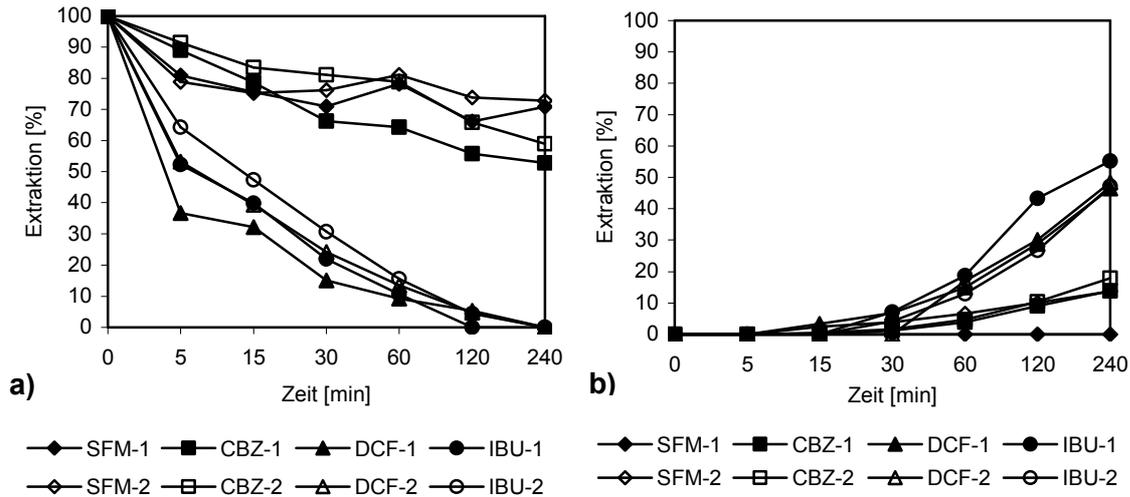
**Membran-2:** Decan-Decanol (80 % : 20 %, v/v)



**Abb. 17:** Einfluss des basischen Carriers TOA auf den Arzneiwirkstoff-Transport - Extraktion **a)** von der Feed- **b)** in die Strip-Phase (Feed-Phase: 0,1 mol/L NaOH, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl)

#### 5.2.4.2 Saurer Carrier

Bei den Untersuchungen mit saurem Carrier wurde 0,025 g/L Octansulfonsäure (Abk. OcSA) in Dihexylether (Abk. DHE) gelöst. Um den Effekt von OcSA auf dem Membran-Transport erkennen zu können, wurde der Versuch einmal mit Carrier und einmal ohne Carrier durchgeführt. Als Feed-Phase wurde eine Lösung aller vier Arzneiwirkstoffe in 0,1 mol/L HCl eingesetzt.



**Abb. 18:** Einfluss des OcSA in DHE als Carrier a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoffe in 0,1 mol/L HCl, Strip Phase: 0,1 mol/L NaOH), Membran-Phase 1: 0,025 g/L OcSA in DHE, Membran-Phase 2: DHE

**Abb. 18** zeigt, wie sich der Carrier sowohl auf die Extraktion als auch auf die Rückextraktion von SFM, CBZ, DCF und IBU auswirkt. Durch den Carrier-Zusatz ist die SFM-Rückextraktion auf Null gesunken, obwohl allein DHE eine 13,7 % ige SFM-Extraktion ermöglichte. Mit dem Carrier werden alle vier Analyte von der Feed-Phase schneller extrahiert, was für SFM und CBZ zu erwarten ist, da der saure Carrier mit den basischen Aminogruppen der beiden Wirkstoffe Ionenpaare bilden kann.

Im Vergleich zu Membranen mit basischem Carrier führt eine Dotierung mit saurem Carrier zu erheblich besseren Transporteigenschaften der Dreiphasensysteme. IBU-Rückextraktion erfolgte mit dem Zusatz von OcSA um 5 % mehr. Der beschleunigende Effekt von OcSA auf die Extraktion von IBU und DCF kann durch die in Kapitel 4.2.5 beschriebenen Transporttheorien nicht erklärt werden, da IBU und DCF keine Ionen-Paare mit der OcSA bilden. Allerdings kann der saure Carrier die Oberflächenspannung der Membran-Phase durch eine Tensid-ähnliche Wirkung senken und dadurch die Extraktion der beiden Wirkstoffe aus der Feed-Phase beschleunigen.

Insbesondere die Kombination aus OcSA und DHE in Verbindung mit einem ausgeprägten pH-Gradienten zwischen Feed-Phase (sauer) und Strip-Phase (alkalisch) erhöht die Extraktionskinetik für DCF und IBU drastisch, so dass in kurzer Zeit ( $t_{1/2} < 5$  min) eine vollständige Extraktion der beiden sauren Wirkstoffe aus der Feed- in die Membran-Phase erreicht wird, wie im Kap. 5.2.4.4.1 ausführlich diskutiert wurde.

### 5.2.4.3 Metallchelate-Carrier

Aus hydrometallurgischen und analytischen Anwendungen ist bekannt, dass sich Metallionen aus wässriger Lösung mit Hilfe koordinationsfähiger Solvent-Extraktanden durch ein Dreiphasen-Flüssigmembransystem transportieren lassen. In einer alternativen Anwendung dieses Prinzips, wobei in organischer Phase lösliche Metallsalze bzw. Metallkomplexe eingesetzt werden, sollten diese gegenüber koordinationsfähigen Wirkstoffmolekülen eine (reversible) Carrier-Funktion übernehmen können. Zur Überprüfung dieses Konzeptes wurden erste orientierende Untersuchungen mit Metallsalzen der Ethylhexansäure (Metalloctoate) gelöst in Decanol durchgeführt:

- Kupfer(II)-2-ethylhexanoat (Cu(II)EHEX) und
- Calcium(II)-2-ethylhexanoat (Ca(II)EHEX)

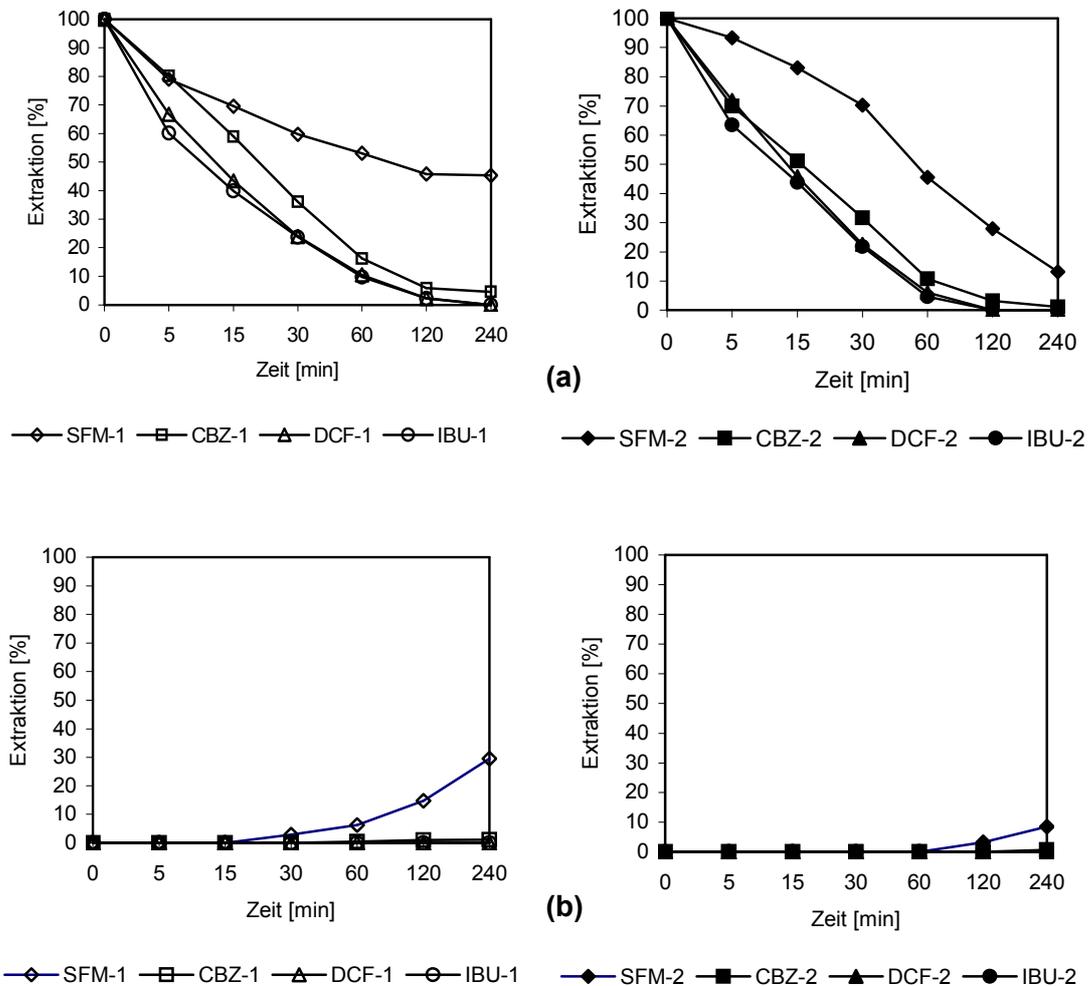
#### 5.2.4.3.1 Einfluss von Cu(II)EHEX

Bei diesem Versuch wurde als Feed-Phase eine wässrige Lösung aller vier Arzneiwirkstoffe eingesetzt. Die **Membran 1** setzte sich aus einer Lösung von Kupfer(II)-2-ethylhexanoat in Decanol zusammen. Als Strip-Phase wurde 0,1 mol/L HCl verwendet. Zum Vergleich wurde reines Decanol im System der **Membran 2** eingesetzt (Abb. 19).

Kupfer(II)-2-ethylhexanoat wirkt sich markant auf das Transportverhalten des SFM aus: Einerseits wird die Extraktionskinetik verlangsamt, andererseits werden bis zu 30% der Feed-Konzentration von verd. Salzsäure gestrippt. Bei allen bisherigen Untersuchungen war das Sulfonamid entweder überhaupt nicht oder nur spurenweise in Strip-Lösungen nachweisbar.

Ergänzende Analysen (Plasma-Emission) der wässrigen Phasen des Flüssigmembransystems auf Cu(II)-Gehalte geben Hinweise auf die Carrier-Funktion der Kupfer-Ionen, die durch Dekomplexierungsreaktionen und Ligandenaustausch ermöglicht wird. Zur Klärung der Carrier-Funktion des Kupferkomplexes wurde ein Blindversuch durchgeführt, wobei als Feed-Phase bidest. Wasser, als Membran Kupfer(II)-2-ethylhexanoat in Decanol und als Strip-Phase 0,1 mol/L HCl verwendet wurde. Die ausführliche Durchführung der Versuche wurde im experimentellen Teil, Kap. 7.4.6.3.1 beschrieben. Die Analyseergebnisse mit dem Plasma-Emissionsspektrometer haben erwiesen, dass Cu(II)-Ionen in Anwesenheit der Arzneistoffe in der Feed-Phase von der Membran in die Feed- und Strip-Phase transportiert wurden. Nach dem Blindversuch mit Wasser als Feed-Phase betrug die Cu(II)-Konzentration in der Feed-Phase 0,99 mg/L und in der Strip-Phase 3,12 mg/L, während die Cu(II)-Konzentrationen in den beiden wässrigen Phasen nach der Arzneiwirkstoff-Extraktion stiegen (Feed-Phase: 3,55 mg/L und Strip-Phase: 3,22 mg/L).

Die Verzögerung der Extraktion in die Membran durch die Cu(II)-Ionen in der Membran konnte durch die vorhandene Theorie der Transportmechanismen nicht geklärt werden (siehe Abb.19, Membran 1, Feed-Phase). Eindeutig ist, dass die Konzentrationen der Kupfer-Ionen in der Feed-Phase durch die SFM-Extraktion in die Membran- und Strip-Phase auch zunehmen.



### Membran 1

### Membran 2

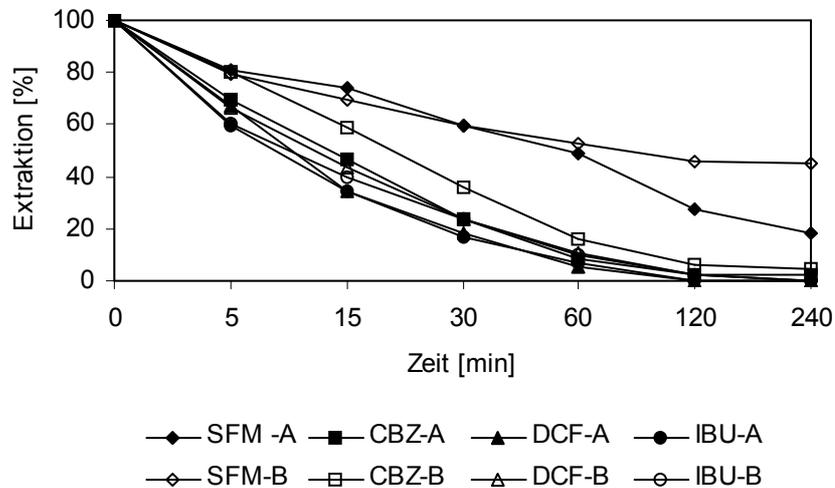
**Membran-1:** 0,1 g/L Cu(II)EHEX in Decanol, **Membran-2:** Decanol

**Abb. 19:** Einfluss des Carriers Kupfer(II)-2-ethylhexanoat: a) Extraktion von der Feed-Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase (Feed-Phase: Wasser, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl).

#### 5.2.4.3.2 Einfluss von Ca(II)EHEX

Calcium-Salz (Ca(II)EHEX) wurde statt Cu(II)EHEX unter sonst gleich bleibenden Bedingungen als Metallionen-beladener Carrier eingesetzt (1 g/L in Decanol). Damit wurden für SFM mit ~82 % nach 4h bessere Extraktionsgrade als mit dem Cu(II)-Salz erreicht (**Abb.**

20). Im Vergleich zur metallfreien Decanol-Phase ist der Verzögerungseffekt durch Ca(II)EHEX auf die Extraktion nur minimal. Dagegen lässt sich der extrahierte Wirkstoff aus der Membranphase nur zu ca. 19 % strippen (aus der Cu(II)-Phase: 30 %).



**Membran-A:** 0,1 g/L Calcium(II)2-ethylhexanoat in Decanol

**Membran-B:** 0,1 g/L Kupfer(II)2-ethylhexanoat in Decanol

**Abb. 20:** Vergleich des Einflusses der Metall-Komplexbildner, Kupfer(II)-2-ethylhexanoat und Calcium(II)-2-ethylhexanoat auf das Transportverhalten der Arzneiwirkstoffe: a) Extraktion von der Feed-Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase (Feed-Phase: Wasser, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl).

#### 5.2.4.4 Optimierung der Versuchsparemeter

Die beiden Carbonsäuren IBU und DCF wurden am effektivsten mit DHE extrahiert. Der Carrier-Zusatz von OcSA erleichterte den weiteren Transport in die Strip-Phase. Weitere Untersuchungen mit dem OcSA in DHE als Membran-Phase wurden durchgeführt, um durch die Optimierung der Versuchsparemeter und Erprobung unterschiedlicher Strip-Lösungen die Extraktionsraten von Carbonsäuren zu verbessern und auch die polaren Wirkstoffe SFM und CBZ zu extrahieren. Ausgegangen wurde aus dem folgenden Drei-Phasen-System:

Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff (SFM, CBZ, DCF, IBU) in 0,1 mol/L HCl

Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH

Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE

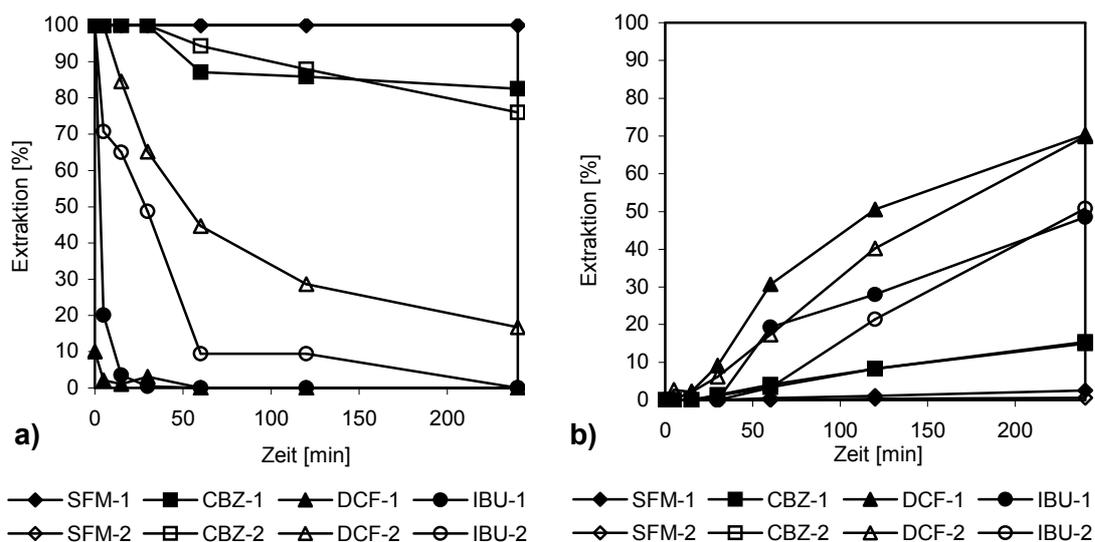
Mit diesem Drei-Phasen-System sollten folgende Extraktionsbedingungen und -parameter optimiert werden:

- Der Einfluss des pH-Gradienten zwischen Feed- und Strip-Phase (gekoppelter Transport)
- NaOH-Konzentration in der Strip-Phase
- NaCl-Lösung als Strip-Phase
- Langzeitextraktion
- Rührgeschwindigkeit
- Verhältnisse der Phasenvolumina (Zelldimensionen)

#### 5.2.4.4.1 Einfluss des pH-Gradienten

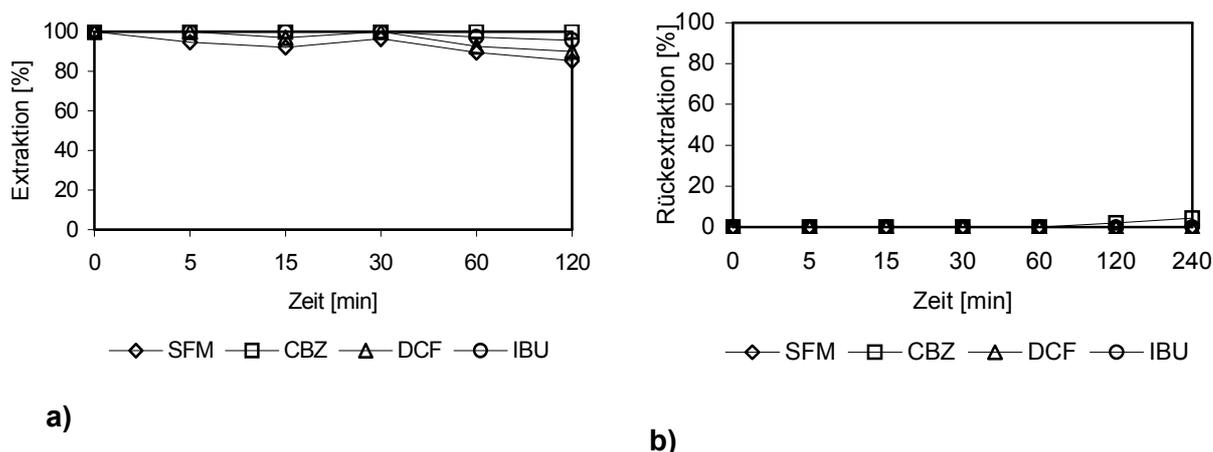
Zur Erklärung des Einflusses des pH-Gradienten zwischen Feed- und Strip-Phase wurde die Feed-Phase einmal neutral und einmal sauer eingestellt. Die Extraktionen wurden unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt und das Extraktionsverhalten der Arzneistoffe verglichen. Als Strip-Phase wurde 0,1 mol/L NaOH und als Membran 0,025 g/L OcSA in DHE verwendet.

Wie in Abb. 21a auch zu sehen ist, wird dadurch ein signifikant schnellerer und vollständiger Transport der beiden sauren Komponenten IBU und DCF in die Membran-Phase erreicht ( $t_{1/2} < 5$  min). Durch den pH-Gradienten wurde das Strip-Verhalten der Arzneistoffe kaum beeinflusst (s. Abb. 21b).



**Abb. 21:** Transport von Arzneiwirkstoffen mit saurem Carrier - Einfluss des pH-Gradienten a) Extraktion von der Feed-Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase (Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) **Feed-1:** 0,1 mol/L HCl, **Feed-2:** Wasser

Die Wirkung des pH-Gradienten zwischen Feed- und Strip-Phase wird bei Anwendung eines inversen Gradienten besonders deutlich. Wird die Feed-Lösung alkalisch und die Strip-Lösung sauer eingestellt, wird eine nahezu vollständige Blockade des Wirkstoff-Transportes beobachtet (s. Abb. 22). Damit wird auch bestätigt, dass Transportmechanismen über Ionenpaarbildungen zwischen Carrier und den schwach sauren Wirkstoffen DCF und IBU in dem Dreiphasensystem eine Rolle spielen.

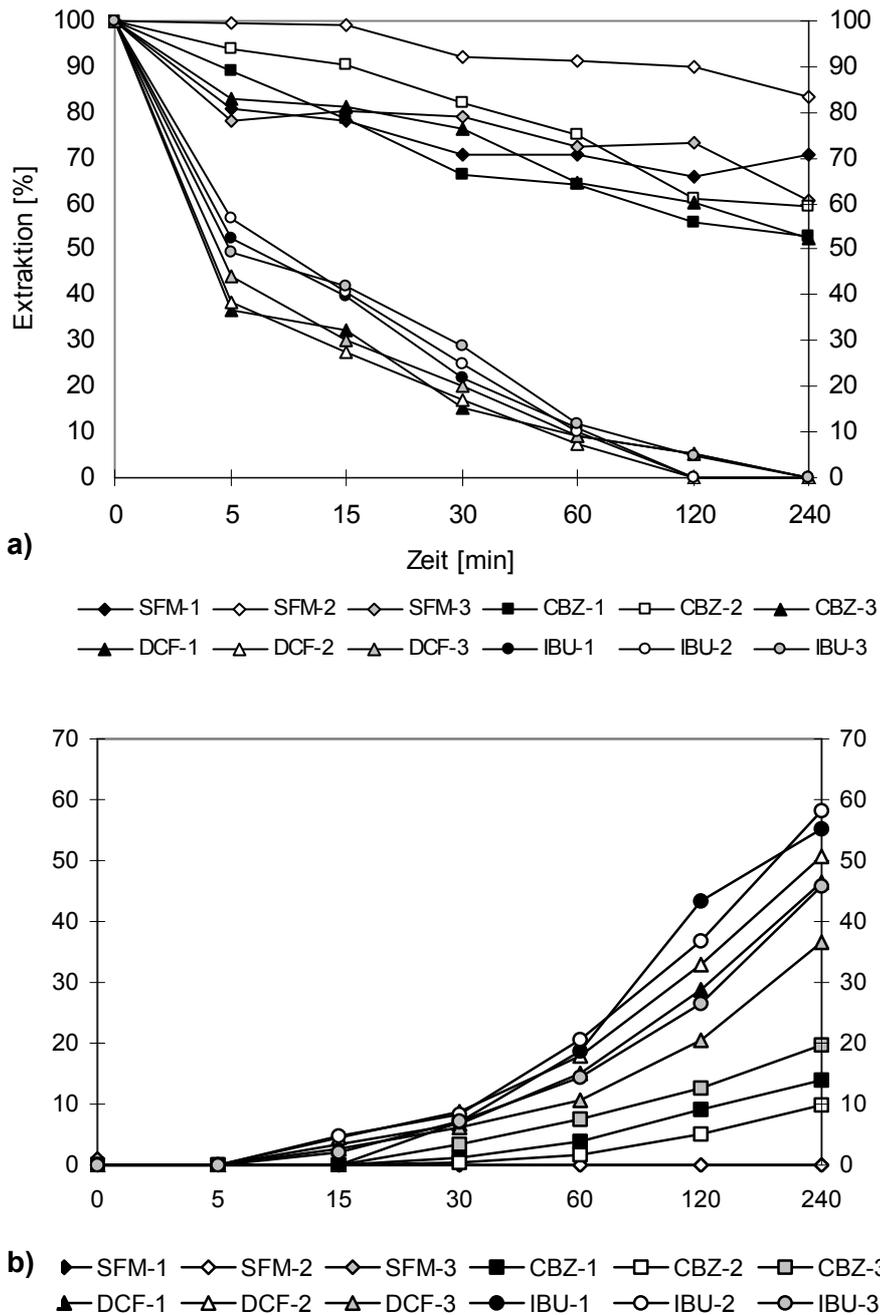


**Abb. 22:** Blockierter Wirkstofftransport mit saurem Carrier bei inversem pH-Gradient a) Extraktion von der Feed-Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase (Feed: 0,1 mol/L NaOH, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl, sonst. Bedingungen wie in Abb. 21)

#### 5.2.4.4.2 Einfluss der NaOH-Konzentration in der Strip-Phase

Zur Erklärung des Einflusses der NaOH-Konzentration als Strip-Lösung auf den Arzneiwirkstoff-Transport wurden drei verschiedene NaOH-Konzentrationen (0,01, 0,1 und 1 mol/L) als Strip-Phase eingesetzt. Die Feed-Phase bestand aus 0,1 mol/L HCl, die 10 mg/L aller vier Arzneiwirkstoffe enthält. Die Membran war 0,025 g/L OcSA in DHE. Der **Abb. 23** können die Ergebnisse dieser Messreihen entnommen werden.

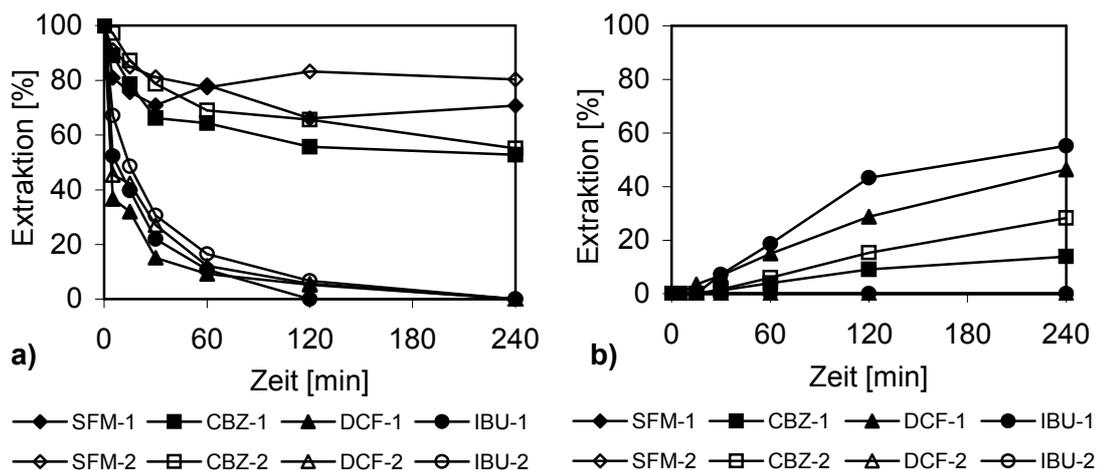
Offensichtlich beeinflusst die NaOH-Konzentration sowohl die Extraktion als auch die Rückextraktion. Durch die 0,1 mol/L NaOH-Lösung in der Strip-Phase wurden die beiden Carbonsäuren IBU und DCF am besten gestrippt (Abb. 23b). Bei CBZ ist im Gegenteil der beste Strip-Effekt bei 0,01 mol/L NaOH zu erreichen. SFM verhielt sich ähnlich und wurde nur mit 0,01 mol/L NaOH gestrippt.



**Abb. 23:** Einfluss der NaOH-Konzentration in der Strip-Phase auf den SFM-Transport-Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE), **Strip-Phase 1:** 1 mol/L NaOH, **Strip-Phase 2:** 0,1 mol/L NaOH, **Strip-Phase 3:** 0,01 mol/L NaOH.

#### 5.2.4.4.3 Vergleich von NaCl- und NaOH-Lösungen als Strip-Phase

NaCl als Strip-Mittel wurde auch bei der Membran-Zusammensetzung OcSA in DHE eingesetzt und der Transport der Analyten wurde in Abb. 24 mit 0,1 mol/L NaOH verglichen.



**Abb. 24:** Vergleich von NaCl- und NaOH-Lösungen als Strip-Phase-Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoffen in 0,1 mol/L HCl, Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE), Strip-Phase 1: 0,1 mol/L NaOH, Strip-Phase 2: 0,1 mol/L NaCl

In der Abb. 24 ist zu sehen, dass die Zusammensetzung der Strip-Phase sowohl auf die Extraktion als auch auf die Rückextraktion einen deutlichen Einfluss hat.

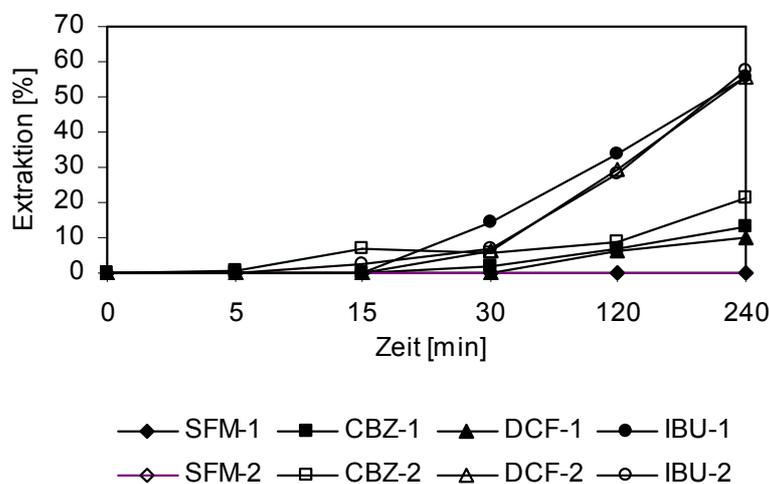
Während mit 0,1 mol/L NaCl kein Strip-Effekt beobachtet wurde, wurden die beiden Carbonsäuren IBU und DCF mit 0,1 mol/L NaOH um ~ 55 % gestrippt. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass für die Rückextraktion der Carbonsäuren die Strip-Phase basisch eingestellt sein sollte, so dass die Wirkstoffe in der Strip-Phase in ionischer Form vorliegen und nicht in die Membran reextrahiert werden. Die einzige Verbesserung war, dass CBZ mit 0,1 mol/L NaCl ca. 30 % gestrippt wurde.

#### 5.2.4.4 Einfluss von Huminstoffe

Es sollte bei den Flüssigmembran-Systemen die Beeinflussung der Wirkstoff-Transporte durch Huminstoffe untersucht werden. Dazu wurde angereicherte HUS-Standard Hohlohsee 13 der wässrigen Feed-Phase zugesetzt. Mit dieser Lösung wurde unter bereits erprobten, effektiven Membran-Bedingungen (OcSA in DHE, pH-Gradient zwischen Feed- und Strip-Phase) Transportversuche durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen verglichen, die aus einer Versuchsreihe stammen, die unter Huminstoff-freien Bedingungen durchgeführt worden sind.

Durch den Huminstoff-Zusatz hatte die Feed-Phase eine leicht-gelbliche Färbung angenommen. Diese blieb während der vierstündigen Extraktionszeit visuell unverändert, wobei sowohl Membran- als auch Strip-Phase keine Färbung annahmen. Dieser Eindruck

wurde durch Photometrie bestätigt, wozu das UV-Vis-photometrische Verfahren nach DIN (C1 / C3-Bestimmung bei 254 und 434 nm) angewendet wurde [227-228]. Danach ist unter den bisher angewandten Flüssig-Membranbedingungen kein Transport von Huminstoffe des Molmassenbereiches  $> 1000$  Dalton nachweisbar. Die Durchführung der photometrischen Messungen wurde im experimentellen Teil (Kap. 7.4.7.3) beschrieben. Es zeigt sich aber, dass die organischen makromolekularen Wasserinhaltsstoffe den Transport bestimmter Pharmaka in die Strip-Phase beeinträchtigen (s. Abb. 25). So sind nach vier Stunden Extraktionszeit im Vergleich zur unbelasteten Wasserprobe die Strip-Ausbeuten für CBZ geringfügig von 21 % auf 13 %, für DCF aber drastisch von  $\sim 70$  % auf 10 % gesunken, während IBU weitgehend unbeeinflusst ist. SFM wird unter beiden Bedingungen nicht rückextrahiert.

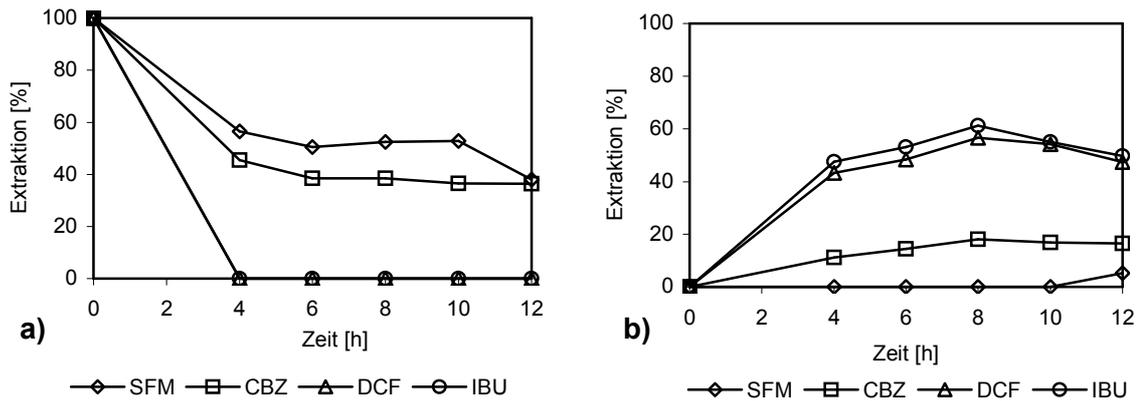


Feed-1: 18 mg/L Huminstoffe in 0,1 mol/L HCl , Feed-2: 0,1 mol/L HCl

**Abb. 25:** Einfluss von Huminstoffe in der Feed-Phase auf den Wirkstofftransport in die Strip-Phase (Membran-Phase: 0,025g/L OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH)

#### 5.2.4.4.5 Langzeitextraktion

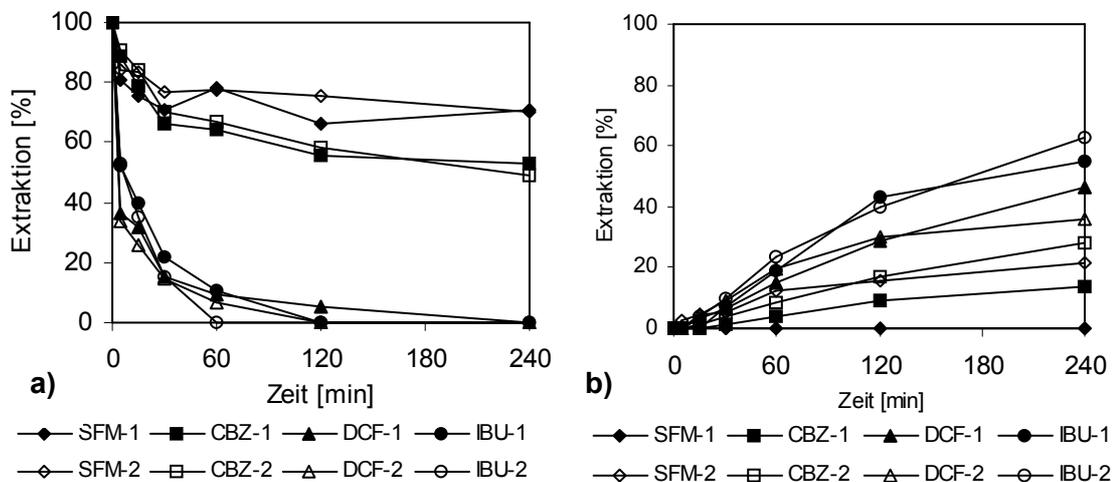
Eine Langzeitextraktion wurde auch mit der Membran-Zusammensetzung OcSA in DHE durchgeführt, um eine Vervollständigung der Rückextraktion von beiden Carbonsäuren zu erreichen (s. Abb. 26). Durch die Verlängerung der Versuchszeit tritt keine Verbesserung der Transportraten ein. Nach 8 h entsteht ein Gleichgewicht zwischen der Membran- und Strip-Phase. Die Analyten wurden teilweise wieder in die Membran-Phase zurück transportiert.



**Abb. 26:** Langzeitextraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH)

#### 5.2.4.4.6 Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport

Die Rührgeschwindigkeit wurde von  $60 \text{ min}^{-1}$  auf  $100 \text{ min}^{-1}$  erhöht. Dabei konnte festgestellt werden, dass dadurch die Extraktion von der Feed-Phase von allen vier Arzneiwirkstoffen beschleunigt wurde (Abb. 27a).



**Abb. 27:** Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH) 1. Rührgeschwindigkeit:  $60 \text{ min}^{-1}$ , 2. Rührgeschwindigkeit:  $100 \text{ min}^{-1}$

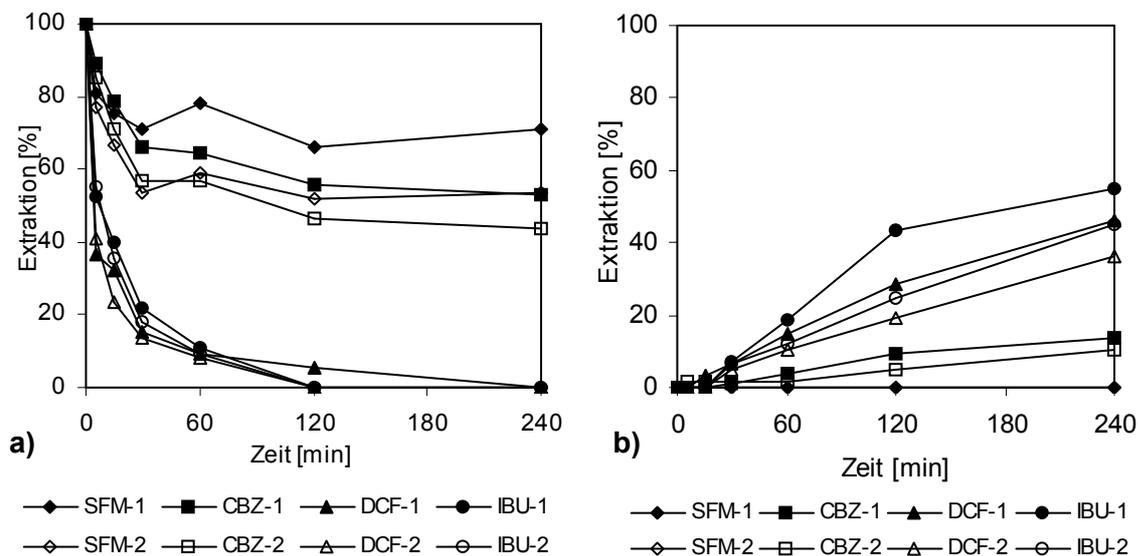
Die Rührgeschwindigkeit ist auch eine dominierende Größe bei der Rückextraktion in die Strip-Phase. Wie aus der Abb. 27b deutlich wird, wurden bei der Rührgeschwindigkeit  $100 \text{ min}^{-1}$  SFM, CBZ, und IBU mehr rückextrahiert als bei der Rührgeschwindigkeit  $60 \text{ min}^{-1}$ . Das

DCF-Stripping wurde dagegen um 10 % niedriger, dessen Ursache durch die vorhandene Kinetik nicht erklärt werden kann.

#### 5.2.4.4.7 Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen

Zur Erklärung des Einflusses der Rührgeschwindigkeit wurde die Kompartiment-Volumina in der zusätzlich gebauten „großen“ Zelle in etwa verdoppelt (s. Tabelle 7).

Anhand der Abb. 28 zeigt sich, dass bei dem Extraktionsversuch mit der größeren Zelle eine Verbesserung der SFM- und CBZ-Extraktion erreicht wurde, wobei die kleinere Zellkonstruktion bessere Eigenschaften für die Rückextraktion zeigte. DCF und IBU wurden mit der kleineren Zelle besser gestrippt, während die Extraktion in die Membran durch die Zellgröße nicht gravierend beeinflusst wurde.



**Abb. 28:** Einfluss der Zellgröße auf den Arzneiwirkstoff-Transport-Extraktion a) von der Feed-Phase b) in die Strip-Phase (Feed-Phase: 10 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH), Zelle 1 (klein): 32 mL Feed-Phase, 25 mL Strip-Phase, 20 mL Membran; Zelle 2 (groß): 75 mL Feed-Phase, 50 mL Strip-Phase, 35 mL Membran

#### 5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse mit Bulk-Flüssigmembranen

Untersuchungen mit Bulk-Flüssigmembranen zeigen, dass die beiden Carbonsäuren DCF und IBU am effektivsten mit OcSA/DHE extrahiert werden. SFM und CBZ fügten dagegen über eine höhere Polarität und ließen sich am besten mit dem polareren Decanol extrahieren. Durch den Zusatz von Kupferethylhexanoat als Metallkomplex-Carrier wurde über 30 % Strip-Effekt erreicht, wobei eine Verlangsamung der Extraktion in die Membran

---

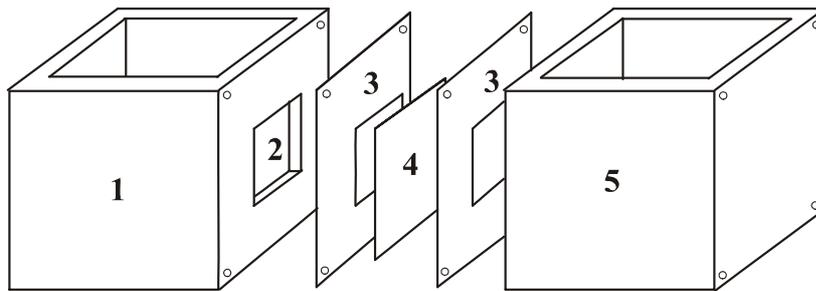
dadurch stattfand. Decanol als Carrier-freie Membran und DHE geladen mit dem sauren Carrier OcSA wurden für die weitere Untersuchungen ausgewählt und Versuchsparameter optimiert, wie z.B. Rührgeschwindigkeit, Zellgröße, Zeit und die Drei-Phasen-Zusammensetzung. Die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit und die Vergrößerung der Zelle hatten einen beschleunigenden Einfluss auf die Extraktion und Rückextraktion. Eine Langzeitextraktion für etwa 12 Stunden hatte keinen gravierenden Einfluss auf die Extraktionsausbeuten. Ein pH-Gradient zwischen Feed- und Strip-Phase beschleunigte den Arzneistoff-Transport und wurde bei den weiteren Bulk-Flüssigmembran- und trägergestützten Flüssigmembran-Untersuchungen eingesetzt.

Die gewonnenen Kenntnisse über die entwickelten Bulk-Flüssigmembran-Systemen wurden auf trägergestützte Flüssigmembrane (SLM) übertragen, wobei ein Polymer-Material (z.B. Polypropylen) in die Flüssigmembran getränkt wurde.

### 5.3 Untersuchungen mit trägergestützten Membranen

Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit Bulk-Flüssigmembranen wurde die Anwendbarkeit des Systems als organische Membran-Phase auf porösen Polypropylen-Trägermaterialien überprüft. Dazu wurden ausgewählte organische Flüssigmembranphasen an poröse, hydrophobe Festmembranen immobilisiert, wodurch trägergestützte Flüssigmembrane (Supported Liquid Membranes, SLM) erhalten wurden.

Die Membranuntersuchungen wurden mit der in der Abb. 29 dargestellten Zelle durchgeführt. Jede der beiden Kammern für die wässrigen Phasen besitzt ein Fassungsvermögen von 150 mL. Der Inhalt beider Kammern wird jeweils durch einen Magnetrührer durchmischt. Die Anwendbarkeit dieser Zelle konnte von PICKERT bestätigt werden [229]. Zwischen den Dichtungen der beiden Blöcke befand sich die Träger-Membran, welche eine Fläche von 16 cm<sup>2</sup> aufwies. Es wurde ein aus mikroporösem Polypropylen bestehender Träger eingesetzt: Membrana 2 E (Dicke: 90 µm, mittlere Durchmesser der Poren: 0,1 µm).



**Abb. 29:** Zelle (**Kammer-1**) zur Durchführung von Permeationsuntersuchungen mit trägergeschützten Membranen; 1: Teflon Block, 2: Fenster zu den Kontakt zur Membran, 3: Silicon-Dichtung, 4: SLM, 5: Strip-Kammer

Zur Präparation der trägergestützten Flüssigmembrane wurde das poröse Trägermaterial mit der organischen Carrier-Lösung geladen. Hierzu wurde ein etwa 5,5 x 5,5 cm großes Folienstück des Trägermaterials für etwa 24 Stunden in die organische Phase getaucht und danach sofort in die Zelle eingebaut. Zur Membran-Permeation soll der Träger vollständig benetzbar sein. Ein Maß für die Benetzbarkeit der Trägeroberfläche ist der Benetzungsdruck (auch Differenzdruck  $\Delta p$  genannt). Eine Stützmembran ist in der Regel Wasser abstoßend, wird aber bei genügend hohen Differenzdrücken von den wässrigen Phasen benetzt. Die aus der Physik bekannte Young-Laplace-Gleichung (Gl. 29) für den Benetzungsdruck beinhaltet als wesentliche Parameter den Porendurchmesser, Grenzflächenspannungen zwischen der wässrigen Lösung und der organischen Lösung, sowie den Netzwinkel:

$$\Delta P = \frac{2\gamma \cos \theta}{r} \quad (29)$$

$\Delta P$  Druckdifferenz,  $\gamma$  Grenzflächenspannung,  $\theta$  Netzwinkel,  $r$  Porendurchmesser

Der Benetzungsdruck nimmt mit wachsendem Durchmesser der Poren und mit sinkender Grenzflächenspannung ab [230-231]. Die Grenzflächenspannungen werden durch die eingesetzten Komplexbildner stark beeinflusst, wobei Werte von über 10 mN/m angestrebt werden sollten [225]. Als Träger wurden mikroporöse Polypropylen- (PP) und Teflon-Materialien (PTFE) unterschiedlicher Porosität erprobt, wobei sich PP in den SLM-Systemen bezüglich Membranstabilität und Permeationseigenschaften als vorteilhaft erwies. PTFE-Materialien zeigten ähnliche Extraktionseigenschaften wie Polypropylen-Materialien, allerdings sind die Extraktionsausbeuten bei Polypropylen-Materialien besser. Als organische Phase wurde überwiegend DHE mit und ohne OcSA-Zusatz eingesetzt. Die Zusammensetzung der Feed- und Strip-Phase orientierte sich an den vorhergehenden Versuchen mit den Bulk-Flüssigmembranen.

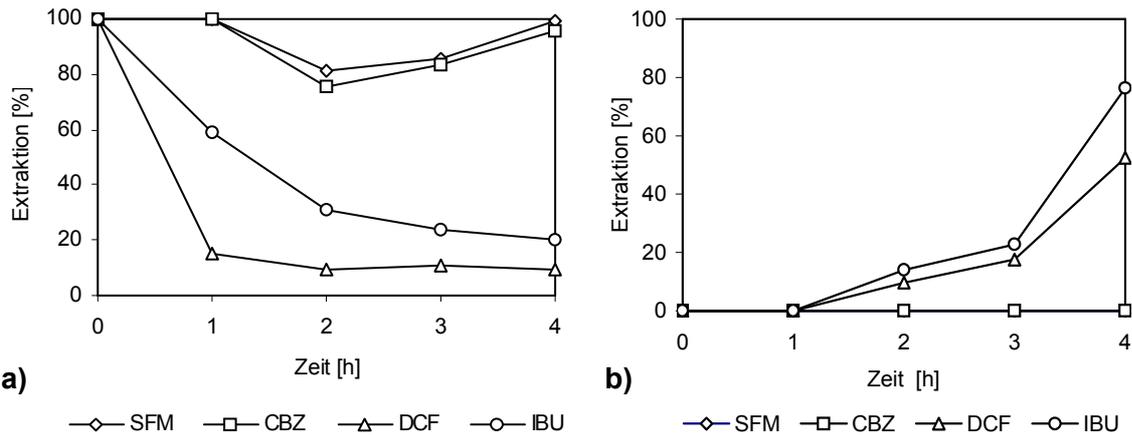
Auch die beiden Seiten der Trägermaterialien zeigten unterschiedliche Permeationseigenschaften. Die Extraktionsausbeuten unterscheiden sich um 10-20 % je nachdem, welche Seite des Trägermaterials zur Feed-, bzw. Strip-Seite angeordnet ist.

Obwohl Decanol sich als bestes Extraktionsmittel für SFM und CBZ bei den Bulk-Flüssigmembran-Versuchen zeigte, ist die Übertragung des Decanol auf das trägergestützte Flüssigmembransystem nicht möglich, weil kein ausreichender Benetzungsdruck auf das Membran-Gewebe ausgeübt wird.

### 5.3.1 Octansulfonsäure in DHE als SL-Membran

Zur Überprüfung der Eignung von DHE mit OcSA-Zusatz als trägergestützte Flüssigmembran wurde ein 5,5 x 5,5 cm großes PP-Stück für vier Stunden mit der flüssigen Membran beladen. Anschließend wurde die trägergestützte Membran zwischen Feed- und Strip-Kammer platziert und befestigt. Als Feed-Phase wurde 10 mg/L Arzneiwirkstoff-Lösung in 0,1 mol/L HCl und als Strip-Phase 0,1 mol/L NaOH eingesetzt. Die Extraktion erfolgte unter Rühren der Feed-Phase für vier Stunden, wobei bei 1, 2, 3 und 4 Stunden von beiden wässrigen Phasen 0,5 mL Probe entnommen und anschließend mit der LC-UV-Methode analysiert wurde.

Wie Abb. 30 zeigt, wurden Betriebsbedingungen gefunden, die ein im Vergleich zu den Bulk-Systemen bei reduzierten Permeationszeiten und geringem Lösemittelaufwand erheblich effektiveres Transportverhalten ermöglichen.



**Abb. 30:** Permeation der Arzneiwirkstoffe durch eine trägergestützte Membran (SLM) Extraktion a) von der Feed- b) in die Strip-Phase (Feed: 0,1 mol/L HCl, PP-Membran: mit Octansulfonsäure in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH), nur Feed-Phase gerührt

Dabei verhalten sich die Wirkstoffe ähnlich wie in der Dreiphasen-Rührzelle, d.h. die Carbonsäuren DCF und IBU werden im Vergleich zum CBZ und SFM am schnellsten zur Strip-Phase transportiert. Nach dem Versuch wurde durch die Kontrolle des pH-Wertes in den beiden Kammern festgestellt, dass sich die beiden wässrigen Phasen mechanisch nicht mischen (pH-Wert in der Strip-Phase: 12,71, pH-Wert in der Feed-Phase: 1,13).

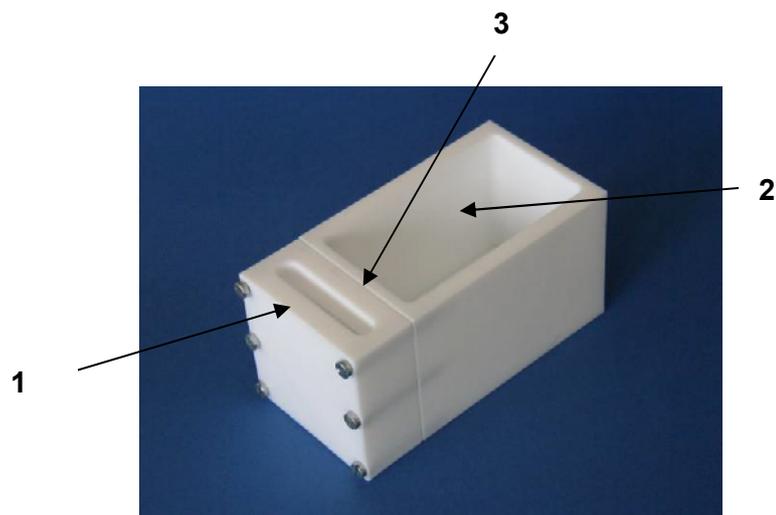
### 5.3.2 Einfluss der Huminstoffe auf SLM-Extraktion

Auch bei den SLM-Systemen wurde der Einfluss von Huminstoffe auf die Extraktion untersucht und festgestellt, dass die zur Feed-Lösung zugesetzten Huminstoffe Hohlohsee 13 (Molmassenbereich < 1000) das Transportverhalten im SLM-System erheblich beeinträchtigen. Bedingt durch die Huminstoff-Anteile nehmen die Stripausbeuten für IBU von 76,4 % auf 20,3 % und für DCF von 52,4 % auf 16 % ab. Es wurde auch festgestellt, dass die Huminstoffe selbst nicht durch die trägergestützte Membran in die Strip-Phase diffundieren.

### 5.3.3 Anreicherungsversuche mit SLM-Systemen

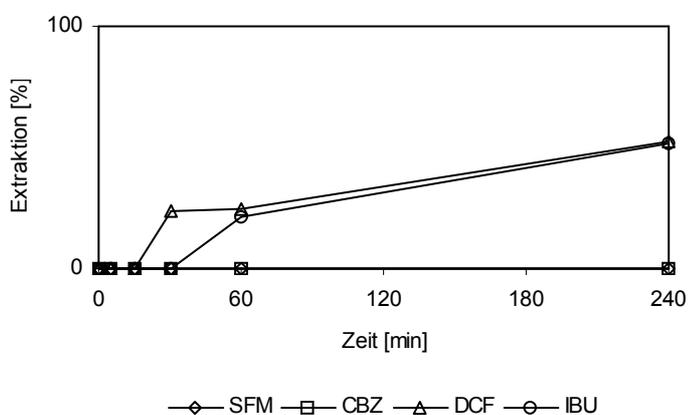
#### 5.3.3.1 Kammer-Module

Da die Arzneiwirkstoffe in Wässern in niedrigeren Konzentrationen liegen, wurden Anreicherungsversuche mit den SLM-Techniken durchgeführt. Der folgende Prototyp des Zweikammersystems bietet Anreicherungsmöglichkeiten, wobei der Anreicherungsfaktor durch das Volumenverhältnis der beiden wässrigen Phasen bestimmt wird (s. Abb. 31).



**Abb. 31:** Zweikammer-Anreicherungszelle (**Kammer-2**) für trägergestützte Flüssigmembranen **1**: PTFE-Kammer (Strip), **2**: PTFE-Kammer (Feed) **3**: SL-Membran, (Volumen der Feed-Phase: 250 mL, Volumen der Strip-Phase: 30 – 40 mL).

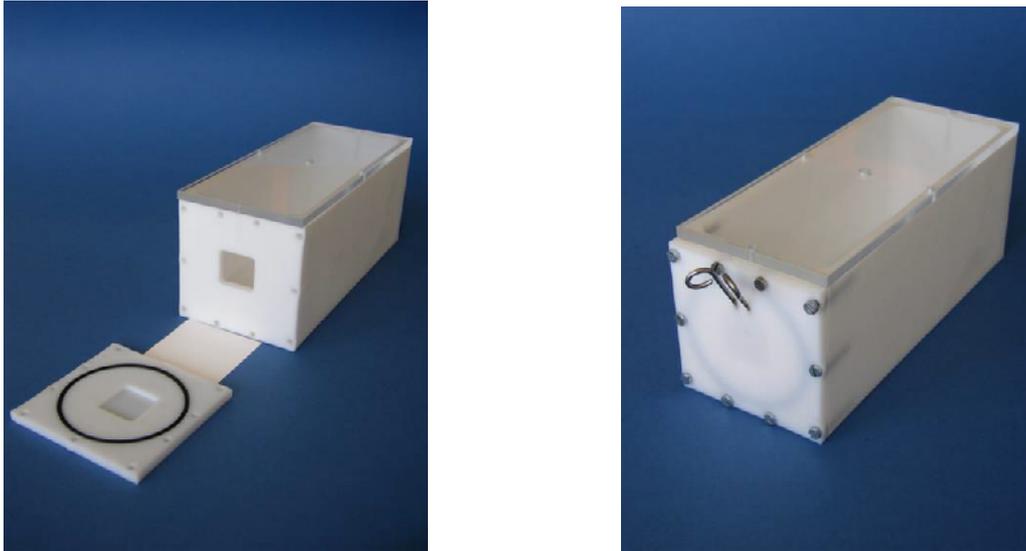
Wie die Konzentrationsprofile in Abb. 32 verdeutlichen, ist mit dieser Zelle eine selektive Abtrennung der Carbonsäuren DCF und IBU von den Begleitkomponenten SFM und CBZ möglich, wobei die permeierenden Komponenten zwischen 30 min und 60 min um den Faktor 2 und nach 4 h ungefähr um den Faktor 4,5 angereichert sind.



**Abb. 32:** Selektive Anreicherung von DCF und IBU durch SLM-Technik (Feed: 1 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Membran: OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH)

Die aus dieser Untersuchungsserie gewonnenen Erkenntnisse über trägergestützte Flüssigmembran-Kombinationen sollen für die Entwicklung neuer miniaturisierter SLM-Module verwendet werden.

Um bessere Anreicherungsfaktoren zu erreichen, wurden die Volumenverhältnisse der beiden wässrigen Phasen vergrößert. Mit dem folgenden Zwei-Kammer-System wurden höhere Anreicherungsfaktoren erreicht (s. Abb. 33).



**Abb. 33:** Anreicherungszone (**Kammer-3**) mit größeren Volumenverhältnissen zwischen Feed- und Strip-Phase ( $V_{\text{Feed}}/V_{\text{Strip}} \sim 312$ )

Mit der Kammer-3 wurden Anreicherungsversuche mit unterschiedlichen Membran-Zusammensetzungen durchgeführt. In der Tabelle 10 sind die erreichten Anreicherungsfaktoren und Extraktionsraten zusammengestellt.

**Tabelle 10:** Anreicherungsversuche mit SLM-Technik (Kammer-3) Feed: 500 mL 100 µg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L, Strip: 1,6 mL 0,1 mol/L NaOH, Trägermaterial: Polypropylen Enka 2E-PP, 24 h eingetränkt in der Membran,  $V_{\text{Feed}}/V_{\text{Strip}} \sim 312$ .

	Konzentration [mg/L]	Extraktion [%]	$E_e$
Membran	<b>DHE</b>		
IBU	3,55	13,3	<b>35,3</b>
DCF	4,16	11,3	<b>41,6</b>
Membran	<b>OcSA in DHE</b>		
IBU	7,72	24,7	<b>77,3</b>
DCF	6,18	19,8	<b>61,9</b>

### 5.3.3.2 Trägergestützte PP-Beutelmodule

Neben Flachmembranmodulen mit steigenden Volumenverhältnissen zwischen Feed- und Strip-Phase wurde erstmalig eine „Beutel-Geometrie“ für trägergestützte Anreicherungs-systeme entwickelt.

Ähnliche, kommerziell erhältliche Module werden angewandt, um mit Flüssig-Flüssig-Extraktion unpolare Wasserinhaltsstoffe in Verbindung mit GC/MS-Bestimmung anzureichern

[110]. Dazu werden nicht poröse, heißversiegelte PP-Membranschläuche eingesetzt. Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 50 und 100 %. Das Volumenverhältnis zwischen Wasserprobe und der organischen Phase beträgt 15 mL : 0,5 mL, d.h. bei 100 % iger Wiederfindung wird eine maximale Anreicherung von  $E_e = 30$  erreicht.

Die Extraktionsversuche mit den von uns hergestellten, mikroporösen PP-Beuteln bestätigten die Annahme, dass mit den SL-Membranbeuteln noch höhere Anreicherungsfaktoren  $E_e$  (~ 300) als mit den kommerziellen Extraktions-Vials und mit den eigenen entwickelten Flachmembranen zu erreichen sind.

Bei den ersten Versuchen zur Herstellung von PP-Beuteln wurde ein Folienverschweißgerät eingesetzt und die Prototypen von PP-Beutel mit unterschiedlichen Maßen wurden hergestellt.

Die Ergebnisse beweisen, dass die Beutelgeometrie und die Volumenunterschiede zwischen Feed- und Strip-Phase einen viel höheren Anreicherungsfaktor ermöglichen (s. **Tab. 11**).

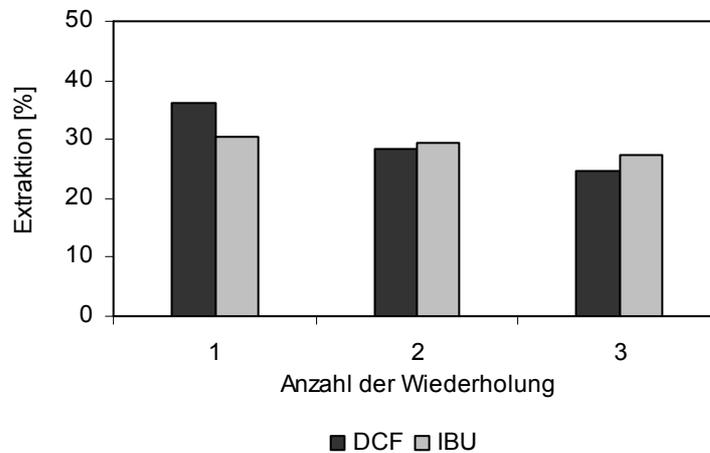
**Tabelle 11:** Anreicherungsversuche mit trägergestützten PP-Beutel (Membran-Phase: PP-Beutel beladen mit 0,025g/L OcSA in DHE, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH, Feed-Phase: 500 mL 0,1 mol/L HCl)

	Feed-Volumen	Strip-Volumen	$E_e$
<b>Beutel 1</b>	<b>400</b>	<b>6</b>	
IBU-Konzentration	0,2	13,0	<b>65</b>
DCF-Konzentration	0,2	12,2	<b>61</b>
<b>Beutel 2</b>	<b>400</b>	<b>0,2</b>	
IBU-Konzentration	0,2	50,9	<b>254</b>
DCF-Konzentration	0,2	56,1	<b>280</b>

### 5.3.3.3 Wiederholversuche mit dem gleichen PP-Beutel

Zur Überprüfung der Wiederverwendbarkeit des PP-Beutels wurde der gleiche Beutel dreimal für die Extraktion eingesetzt und die Ergebnisse wurden in **Abb. 31** dargestellt. Die Arzneiwirkstoff-Konzentration in der Feed-Phase betrug 100 µg/L. Als Strip Lösung wurde in PP-Beutel 600 µL 0,1 mol/L NaOH gegeben und die Extraktion wurde unter Rühren für 4 Stunden gestartet. Nach der Extraktion wurde die Strip-Phase entnommen, mit dem gleichen Volumen 0,1 mol/L HCl neutralisiert und analysiert.

Nach der Extraktion wurde der PP-Beutel mit Methanol und bidest. Wasser gewaschen, für vier Stunden getrocknet und für die nächste Extraktion wieder in der organischen Membran-Lösung (OcSA in DHE) eingetränkt.



**Abb. 34:** Wiederholversuche mit dem gleichen PP-Beutel, Feed Phase: 400 mL 1 µg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Strip Phase: 600 µL,  $E_{e(max)} = 666$

Bei mehrfacher Verwendung des gleichen Beutels nimmt die Extraktion bei IBU 6-8 % und bei DCF um 1-2 % ab. Mit der mehrfachen Verwendung kann die Benetzung der Membran für die nächste Extraktion beeinträchtigt werden, indem die organische Phase sich in Methanol löst, die zum Waschen eingesetzt wird.

Dieser Versuch wurde mit einem mit Verschweißgerät hergestelltem PP-Beutel durchgeführt, zur Überprüfung der mehrfachen Anwendung des gleichen PP-Beutels. Mit der neuen Herstellungsmethode werden PP-Beutel mit gleichen Maßen schnell und mit wenigem Material- und Kostenaufwand hergestellt. In diesem Fall ist es sinnvoller auf Regenerierung der Membran zu verzichten, um die Memory-Effekte auszuschließen.

Bei der Übertragung der Bulk-Flüssigmembrane in das SLM-System ist das wichtigste Kriterium der Benetzungsdruck. Die Flüssigmembran soll auf das Membran-Gewebe genügenden Benetzungsdruck ausüben, damit die Membran aus den Polymer-Geweben durch den Wasserdruck nicht aufgelöst wird. Dies war bei Decanol nicht gelungen, deshalb wurde OcSA in DHE als Membranlösung für die SLM-Versuche eingesetzt. Diese Membranzusammensetzung ermöglichte fast vollständige Extraktion und Rückextraktion von den beiden Carbonsäuren DCF und IBU.

Um einen Anreicherungseffekt zu erzielen, wurden eine neue Kammer und Beutel-Module mit höheren Volumenverhältnissen zwischen Feed- und Strip-Phase hergestellt und die Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass dadurch hohe Anreicherungsfaktoren zu erreichen sind.

## 5.4 Entwicklung einer Probenvorbereitungsmethode mit SL-Membranen

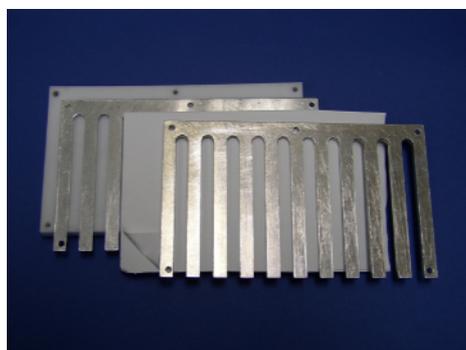
Die Prototypen von PP-Beuteln zeigten, dass durch die Vergrößerung der Volumenverhältnisse zwischen der Feed- und Strip-Phase Anreicherungsfaktoren über 1000 zu erreichen sind. In diesem Kapitel wird die neue Methode zur Herstellung von PP-Beuteln mit reproduzierbaren Eigenschaften und Dimensionen vorgestellt.

### 5.4.1 Doppelkamm-Schichtpressmodule – Herstellung der PP-Module

Um die Extraktionseffektivität der PP-Beutel zur Anwendung auf Wasserproben mit zu erwartenden Arzneistoffgehalten im ng bis  $\mu\text{g/L}$ -Bereich noch zu steigern, wurde die Membrangeometrie weiter miniaturisiert. Zwar gibt es kommerziell erhältliche PTFE-Schläuche, die die entsprechende Dicke und Porengröße für trägergestützte Flüssigmembran-Module vorweisen, aber Polypropylen-Material, das bei den SLM-Versuchen die besten Extraktionseigenschaften zeigt (Fa. Membrana: 2E, PP, 90  $\mu\text{m}$  Dicke, 0,1  $\mu\text{m}$  mittlerer Porendurchmesser), wird nur als Flachmembran geliefert. Deshalb wurde im Verlauf mehrerer Versuchsserien eine Herstellungstechnik entwickelt, die zu PP-Trägermodulen mit reproduzierbaren Maßen und Eigenschaften führt.

Zur Herstellung der PP-Beutel wurde ein Edelstahl-Doppelkamm als Form gebendes, erhitzbares „Schichtpress-Modul“ konstruiert (s. Abb. 35).

Der untere Metallkamm besitzt eine Dicke von 0,1 cm, der obere von 0,5 cm. Zwischen beiden Kämmen werden zwei Lagen der PP-Flachmembran fixiert und diese dann planparallel auf einen PTFE-Block gelegt. Vor dem Verschweißen werden zur Wärmeableitung zwischen die Metallzinken des oberen Kamms passgenaue PTFE-Stücke gesteckt (s. Abb. 35a). Nach fünfminütigem Erhitzen des Metallblocks mit einem Bügeleisen (s. Abb. 35b) sind die PP-Schichten zu Beuteln verschweißt.



a)



b)

**Abb. 35:** Herstellung der PP-Beutel mit Doppelkamm-Schichtpressmodul

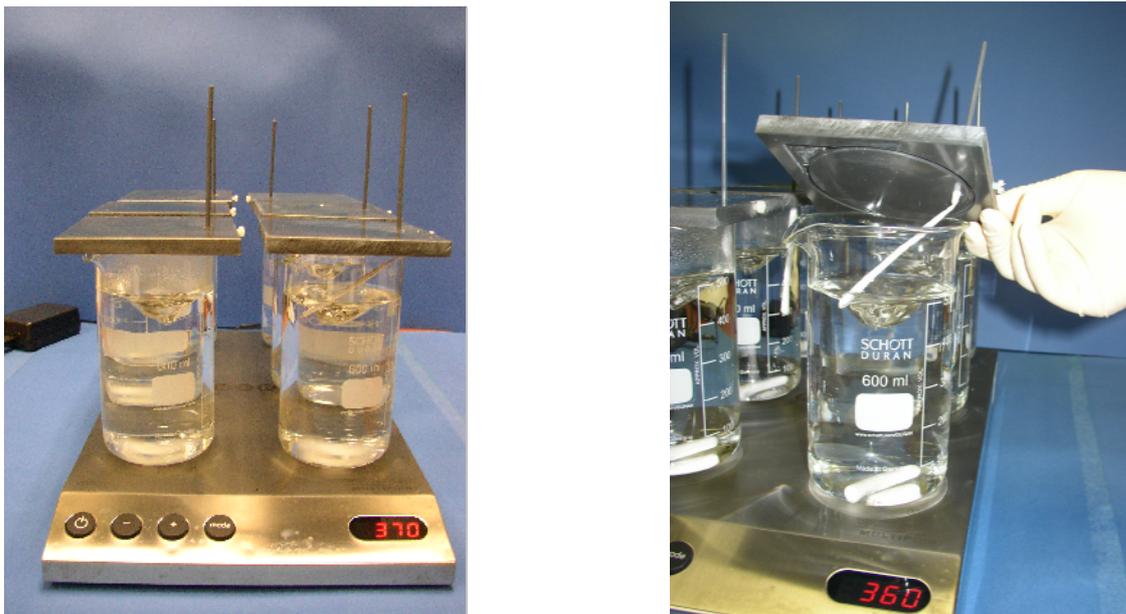
Abschließend werden die PP-Beutel durch vollständige Befüllung mit Wasser auf Undichtigkeiten an den Schweißnähten geprüft, mit Methanol und bidest. Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die beschriebene Technik ermöglicht pro Arbeitsgang die Produktion von maximal 10 PP-Beuteln mit ~ 90 mm Länge, ~ 6 mm Breite (gepresste Form), der Innendurchmesser des offenen Beutels (als SLM-Modul) beträgt ~2,5 mm. Das optimale Aufnahmevolumen für Strip-Lösung liegt im Bereich von 200-500  $\mu\text{L}$ .

#### 5.4.2 Präparation der SLM-Beutelmodule

Die PP-Beutel werden analog zu den trägergestützten Flachmembranen durch Eintauchen für 1–2 h (s.u.) in das entsprechende Lösemittel/Carrier-Gemisch imprägniert und dann unmittelbar für die SLM-Extraktion eingesetzt.

Dazu werden die getränkten PP-Beutel mit der Strip-Lösung gefüllt. Ein zugesetztes Mikro-PTFE-Magnetrührstäbchen (2,0 x 2,0 mm) sorgt dafür, dass auch die Strip-Phase gerührt wird und der PP-Beutel in die wässrige Feed-Phase bzw. Wasserprobe eintaucht, also während der Extraktion nicht auf der Oberfläche schwimmt.

Das derart vorbereitete SLM-Beutelm modul wird an einem Arretierstab fixiert, der mit der Abdeckung für das Probenaufnahmegefäß verbunden ist (s. Abb. 36a). Dann wird der Deckel mit dem fixierten Beutelm modul auf das Probenaufnahmegefäß (600-mL-Becher) gelegt, wodurch das SLM-Modul in die Wasserprobe bzw. Feed-Phase eingetaucht wird. Die Extraktion erfolgt unter Rühren mit einem PTFE-Magnetrührstab bei 370 U/min auf einem Mehrfach-Rührgerät (s. Abb. 36b).



**Abb. 36:** Sechsfache SLM-Extraktionseinheit mit PP-Beuteln

Die Extraktionsbedingungen mit den PP-Beuteln basieren auf den Vorversuchen mit den trägergestützten Flachmembranen und dem Prototyp der PP-Beutel. Die Zusammensetzung der Flüssigmembran- und Strip-Phase sowie die pH-Konditionierung der Feed-Phase waren wie folgt:

- Membran-Phase: 0,025g/L OcSA in DHE
- Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH (300 – 400 µL)
- Feed-Phase/Wasserprobe: 500 mL 0,1 mol/L HCl bzw. Ansäuern mit konz. HCl auf pH 1

Die Extraktion wurde immer sechsfach unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

### 5.4.3 Ermittelte Kenngrößen

Bei Flüssig-Membransystemen ist nach Jönsson der maximale Anreicherungsfaktor  $E_{e(\max)}$  direkt proportional zum Volumenunterschied zwischen Feed- und Strip-Phase (s. Gl. 30) [44].

$$E_{e(\max)} = (C_S / C_F)_{\max} = V_F / V_S \quad (30)$$

$V_F, V_S$ : Volumen der Feed- bzw. Strip-Phase,

$C_F, C_S$ : Konzentration der Analyten in der Feed- bzw. Strip-Phase.

Der Anreicherungsfaktor  $E_e$  zu einem beliebigen Zeitpunkt des Extraktionsverlaufs kann durch die Gleichung 31 berechnet werden.

$$E_e = E \frac{V_F}{V_S} \quad (31)$$

Die Extraktionseffektivität  $E$  bzw.  $E$  (%) ist üblicherweise definiert als das Verhältnis der Stoffmenge  $n_F$  an Analyten in der Feed-Phase vor der Extraktion zur Stoffmenge in der Strip Phase ( $n_S$ ) nach der Extraktion:

$$E = n_S / n_F \quad (32)$$

Mit Hilfe dieser aus den Versuchsdaten berechneten Kenngrößen wurden die Extraktionsbedingungen optimiert.

### 5.4.4 Einfluss der Eintauchzeit

Ursprünglich wurden die PP-Flachmembranen durch 24-stündiges Eintauchen in die organische Membran konditioniert. Wie unsere Versuche mit den PP-Beuteln zeigten, kann diese Zeit aber erheblich verkürzt werden. So wurden PP-Beutel bei einer Extraktionsreihe für eine Stunde und bei der zweiten für zwei Stunden mit der Carrier-Lösung beladen. Die

Konzentration der Analyten in der Feed-Phase betrug 1 µg/L. Die PP-Beutel waren mit 400 µL 0,1 mol/L NaOH als Strip-Lösung gefüllt. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt. Anhand der Daten in der Tabelle 12 lässt sich erkennen, dass eine einstündige Behandlung der PP-Beutel genügt, um eine hocheffektive Anreicherung von IBU und DCF zu ermöglichen, denn der maximale Anreicherungsfaktor von  $E_{e(max)} = 1250$  wird fast erreicht.

**Tabelle 12:** Einfluss der Eintauchzeit (Extraktionszeit: 4 h, Feed-Phase: 500 mL, 1 µg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Strip Phase: 400 µL 0,1 mol/L NaOH; n=6)

Eintauchzeit [h]	$C_S$ [mg/L]	$s_{rel}$ [%]	$E$ [%]	$E_e$ ( $E_{e(max)} = 1250$ )
<b>IBU</b>				
1	1,17	1,0	93,6	1170
2	1,16	8,2	92,8	1160
<b>DCF</b>				
1	1,07	3,8	85,6	1070
2	1,08	9,8	86,4	1080

#### 5.4.5 Einfluss der Extraktionszeit

Um den Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionseffektivität zu klären, wurde bei der SLM-Extraktion die Extraktionszeit von vier Stunden auf eine Stunde gekürzt. Eine vierstündige Extraktionszeit ist notwendig, um maximale Effektivität, also eine nahezu quantitative Extraktion zu erreichen. Tabelle 13 verdeutlicht, dass nach nur einstündigem Versuchsablauf noch keine befriedigende Extraktionsausbeute zu erzielen ist.

**Tabelle 13:** Einfluss der Zeit auf die Extraktion (Bedingungen s. Tab. 12, Eintauchzeit: 1 h)

Extraktionszeit [h]	$C_S$ [mg/L]	$s_{rel}$ [%]	$E$ [%]	$E_e$
<b>IBU</b>				
1	0,83	6,1	66,4	830
4	1,16	8,2	92,8	1160
<b>DCF</b>				
1	0,82	6,7	65,9	820
4	1,08	9,8	86,8	1080

#### 5.4.6 Strip-Volumina

Der maximale Anreicherungsfaktor ( $E_{e(max)}$ ) nimmt mit dem steigenden Volumenverhältnis zwischen der Feed- und Strip-Phase zu (s. Gl. 30). Um den Einfluss des Strip-Volumens auf den Anreicherungsfaktor zu klären, wurden SLM-Extraktionen bei zwei unterschiedlichen Strip-Volumen durchgeführt. In Tabelle 14 sind die bei unterschiedlichen Strip-Volumina ermittelten Kenngrößen aufgeführt.

**Tabelle 14:** Einfluss des Strip-Volumens auf die Anreicherung

(Extraktionszeit: 4 h, Feed- Phase: 500 mL, 1 µg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, n = 6)

Strip-Volumen [µL]	C <sub>s</sub> [mg/L]	E [%]	E <sub>e</sub>
<b>IBU</b>			
400	1,17	93,6	1170
300	1,90	107,9	1900
<b>DCF</b>			
400	1,07	85,6	1070
300	1,80	115	1800

Erwartungsgemäß erreicht man mit dem niedrigen Strip-Volumen von 300 µL die höchste Anreicherungseffektivität und übertrifft damit die Prototypen der PP-Beutel noch um ein Vielfaches.

#### 5.4.7 Variation der Flüssigmembran-Zusammensetzung

Bei den bisherigen SLM-Versuchen konnten ausschließlich DCF und IBU effektiv extrahiert bzw. angereichert werden. Frühere Versuche mit Bulk-Flüssigmembranen ergaben, dass die beiden anderen Arzneistoffe SFM und CBZ bis zu 80 % in die Decanol-Membran extrahiert und bis zu 30 % gestrippt werden können. Leider ist die Übertragung des Decanol auf das trägergestützte Flüssigmembransystem nicht möglich, weil kein ausreichender Benetzungsdruck auf das Membran-Gewebe ausgeübt wird.

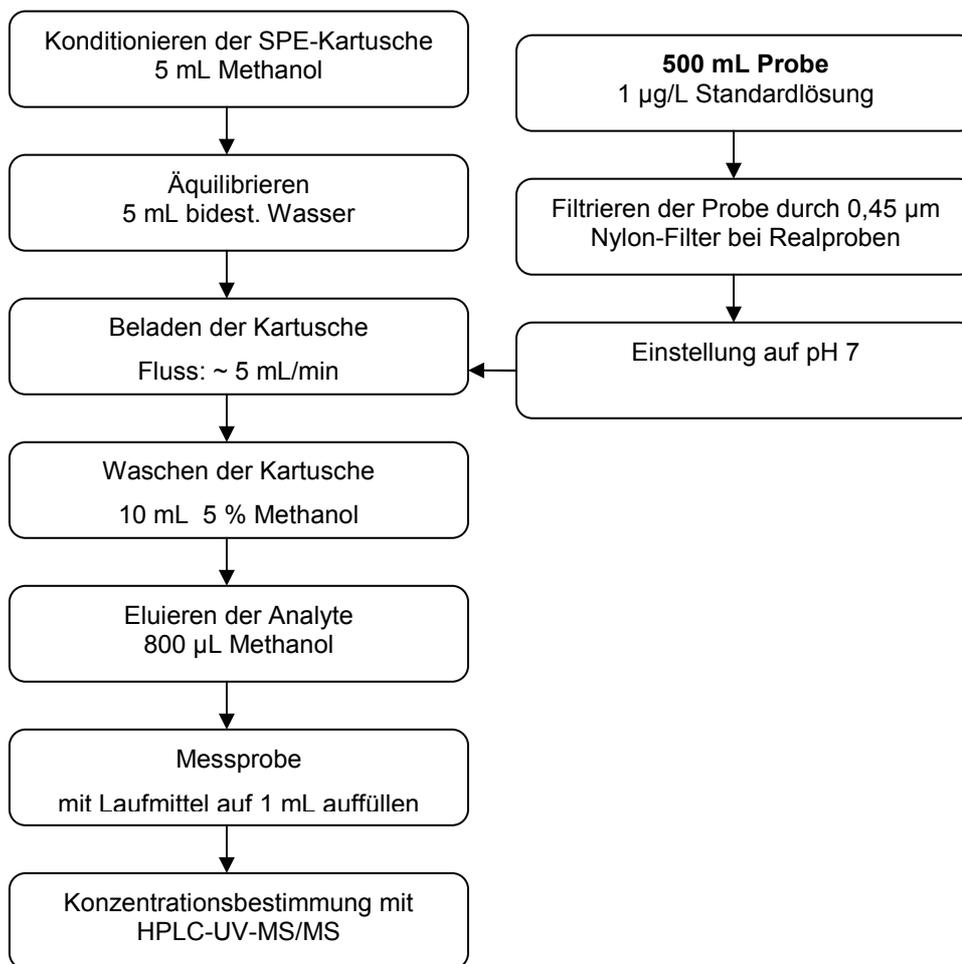
Aus diesem Grund wurden statt des reinen Lösemittels, Decan-Decanol-Gemische (1:1, 2:1, 11:1 v/v) als Membran eingesetzt und der pH-Gradient zwischen Feed- und Strip-Phase umgestellt (Feed: 0,1 mol/L NaOH, Strip: 0,1 mol/L HCl). Allerdings ließ sich auch unter diesen Bedingungen keine Extraktion nachweisen. Der Grund hierfür ist, dass die beiden Leitstoffe einen relativ niedrigen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten aufweisen (logK<sub>OW</sub> SFM: 0,89, CBZ: 2,67), was generell für die Flüssigmembran-Extraktion nachteilig ist.

#### 5.4.8 Vergleich zwischen SPE (Festphasenextraktion) und SLM

##### 5.4.8.1 Vergleich verschiedener Festphasenmaterialien

Um das günstigste Festphasenmaterial für die Wirkstoff-Extraktion zu ermitteln, wurde eine 10 µg/L Standardlösung mit vier unterschiedlichen Festphasenmaterialien angereichert. Der Ablauf der Festphasenextraktion ist in der Abb. 37 schematisch dargestellt. Dazu wurden die Kartuschen zuerst konditioniert und 500 mL Arzneistoff-Standardlösung nach Einstellung auf pH 7 auf die Kartusche gegeben. Die folgenden Kartuschen wurden verwendet:

- **Oasis-HLB:** „hydrophilic-lipophilic balance“
- **Baker C18:** C18-Material
- **Isolute ENV:** feinkörniges Polystyrol-DVB-Copolymer.
- **Strata C18-E:** C18-Material endcapped



**Abb. 37:** Schematische Darstellung der Festphasenextraktion von Arzneiwirkstoffen aus Wässern (1 µg/L Standardlösung in Wasser)

**Tabelle 15:** Wiederfindungsraten unterschiedlicher Festphasenmaterialien (10 µg/L Standardlösung)

SPE-Material	SFM-Wiederfindung	CBZ-Wiederfindung	DCF-Wiederfindung	IBU-Wiederfindung
Backerbond	46,5 %	92,0 %	74,1 %	82,8 %
Strata	22,5 %	88,7 %	76,5 %	85,7 %
Isolute	31,7 %	47,2 %	9,5 %	76,0 %
Oasis	74,6 %	90,0 %	70,7 %	81,2 %

Die Ergebnisse in Tabelle 15 lassen erkennen, dass die besten Wiederfindungsraten mit dem Oasis HLB-Material für alle vier Wirkstoffe erreicht wurden, wobei bei den anderen drei Festphasenmaterialien die SFM-Wiederfindung unter 50 % lag.

#### 5.4.8.2 Vergleich der SPE mit der SLM-Extraktion

Zur Ergänzung der Entwicklung der SLM-Extraktion wurde die gleich konzentrierte Wasserprobe (1 µg/L Standardlösung) auch mit der SPE angereichert. Die Festphasenextraktion wurde, wie in der Abb. 37 dargestellt, durchgeführt. 1000 mL 1 µg/L Standardlösung wurden nach Konditionierung der Kartusche mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min auf die Kartusche gegeben. Danach erfolgte die Eluierung der Wirkstoffe mit 1,4 mL Methanol. Die Leistung der für die DCF und IBU-Anreicherung eingesetzte SL-Membran (OcSA/DHE) wurde mit der Leistung der Festphasenextraktion verglichen. In der Tabelle 16 sind die Wiederfindungsraten und Anreicherungsfaktoren nach den beiden Probenvorbereitungsmethoden aufgeführt.

**Tabelle 16:** Vergleich der Wiederfindungsraten und Anreicherungsfaktoren bei der SLM- und SP-Extraktion (Konzentration der Wasserprobe: 1µg/L, pH-Wert der Probe bei der SLM: 1, pH-Wert der Probe bei der SPE: 7, N=2)

Methoden	DCF- Wiederfindung	IBU- Wiederfindung	$E_{e, DCF}$	$E_{e, IBU}$
<b>SLM (OcSA/DHE)</b>	108 %	115 %	1900	1800
<b>SPE (Oasis HLB)</b>	62,6 %	63,3 %	450	450

Aus der Tabelle 16 ist leicht zu erkennen, dass durch die SLM-Extraktion viel höhere Anreicherungsfaktoren erreicht wurden als mit der Festphasenextraktion. Im Prinzip können auch mittels Festphasenextraktion Anreicherungsfaktoren bis 2000 erreicht werden, indem viel größere Probenvolumina auf die Kartusche gegeben werden, wodurch die Extraktion aber auch viel zeitintensiver wird.

Wenn die Kosten für die beiden Extraktionsmethoden verglichen werden, fällt die Festphasenextraktion viel kostenintensiver aus.

Die Selektivität der SL-Membrane können in diesem Fall als Nachteil gesehen werden, weil die mit der ausgewählten Flüssigmembran nicht zu extrahierenden Stoffe ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, dass für andere Stoffklassen andere Membran-Zusammensetzungen eingesetzt werden sollten. Auf der anderen Seite ermöglicht dieses auch nahezu matrixfreie Extrakte.

## 5.5 Bestimmung der Arzneiwirkstoffe mit der HPLC-UV-MS/MS-Methode

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine simultane Bestimmung der ausgewählten Arzneistoffe und ihrer Metabolite mit dem HPLC-UV-MS/MS-Verfahren in wässrigen Medien entwickelt, wobei zwei unterschiedliche Detektionsarten zur Bestimmung angewendet wurden. Massenspektrometrie wurde hauptsächlich zur Identifizierung der Komponenten eingesetzt, während die UV-Detektion zur Quantifizierung angewendet wurde.

Bei der Analytik der Abwasser- und Oberflächenwasserproben sind die Proben sehr stark matrixbehaftet. Matrixstörungen können auf verschiedene Art und Weise verringert oder kompensiert werden. Durch eine verbesserte Probenvorbereitung, wie z.B. durch Flüssigmembrane sollten die Begleitstoffe zum größten Teil nicht durchgelassen werden.

Die Methodenentwicklung basierte auf den folgenden Schritten:

- Aufnahme der UV-Spektren - Ermittlung der Absorptionsmaxima
- Ermittlung der mobilen Phase - Optimierung des Gradienten
- Auswahl der Trennsäule
- Optimierung der massenspektrometrischen Detektion
- Einfluss der Probenmatrix auf die Analyt-Stabilität und chromatographische Trennung

### 5.5.1 Aufnahme der UV-Spektren - Ermittlung der Absorptionsmaxima

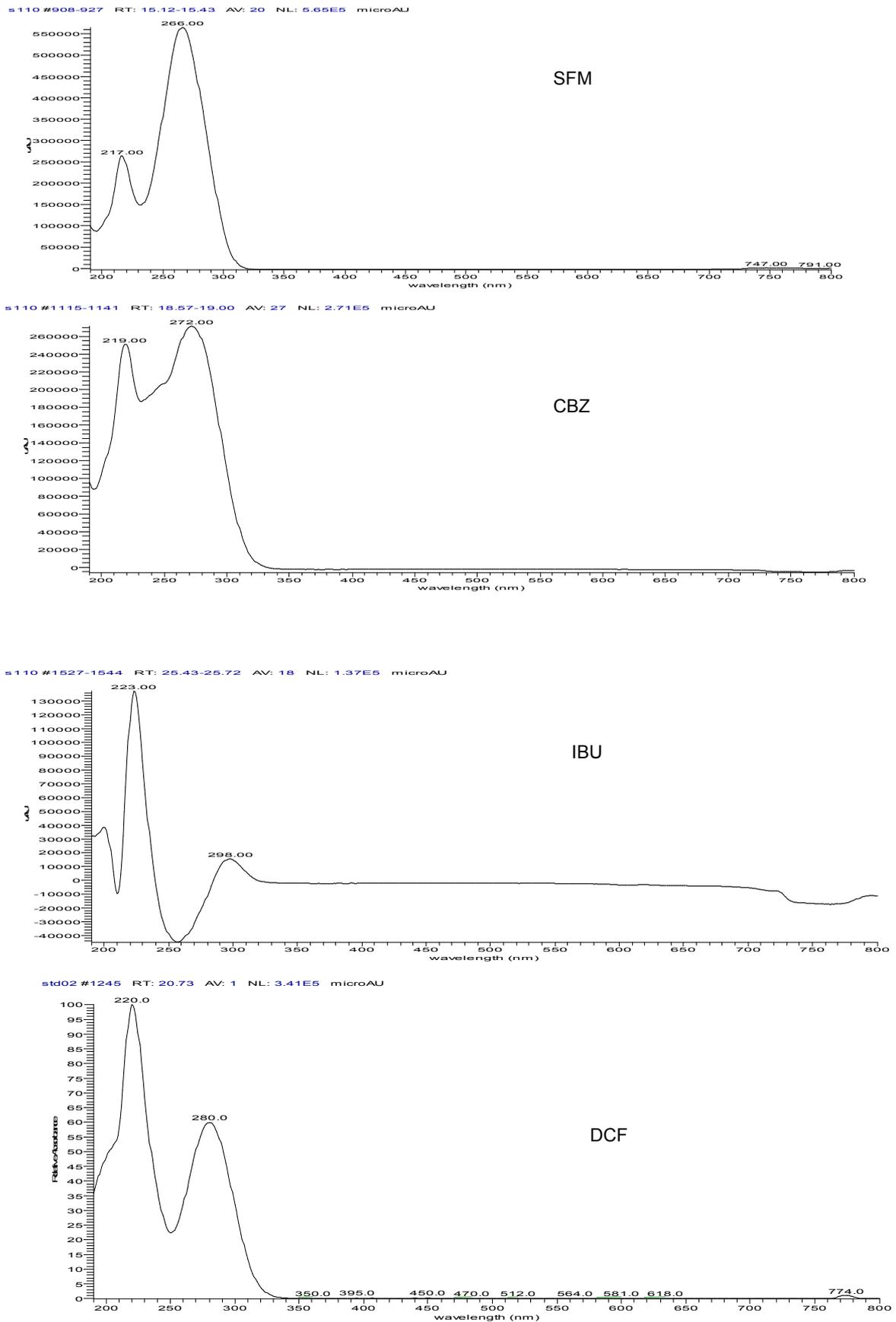
Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden zuerst die UV-Spektren der Arzneistoffe aufgenommen und daraus die Detektionswellenlängen ermittelt. Dazu wurde eine 5 mg/L Arzneistoff-Lösung aus den Stammlösungen durch die Verdünnung mit Wasser hergestellt. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte wie in Exp. Teil, Kap. 7.4.1.2 beschrieben. Danach wurde 5 mg/L Standardlösung chromatographisch getrennt und die Wirkstoffe wurden mit einem PDA (Photodioden Array)-Detektor detektiert. Aus den UV-Spektren, die in der Abb. 38 zu sehen sind, ist zu erkennen, dass die Wirkstoffe die folgenden Absorptionsmaxima haben, die danach als Detektionswellenlänge ausgewählt wurden:

SFM: 266 nm

CBZ: 272 nm

IBU: 223 nm

DCF: 220 nm



**Abb. 38:** UV-Spektren der Arzneiwirkstoffe (5 mg/L je Arzneiwirkstoff in Wasser, mobile Phase A: 10 mmol/L Ammoniumacetat in Wasser, mobile Phase B: 10 mmol/L Ammoniumacetat in CH<sub>3</sub>CN, Säule: LiChrospher C18 ec)

### 5.5.2 Ermittlung der mobilen Phase - Optimierung des Gradientenverlaufes

Bei der Auswahl der mobilen Phase muss darauf geachtet werden, dass die mobile Phase alle Analyte mit möglichst kleineren Retentionszeiten aus der HPLC-Säule eluiert und dabei eine gute Trennung der Analyten ermöglicht.

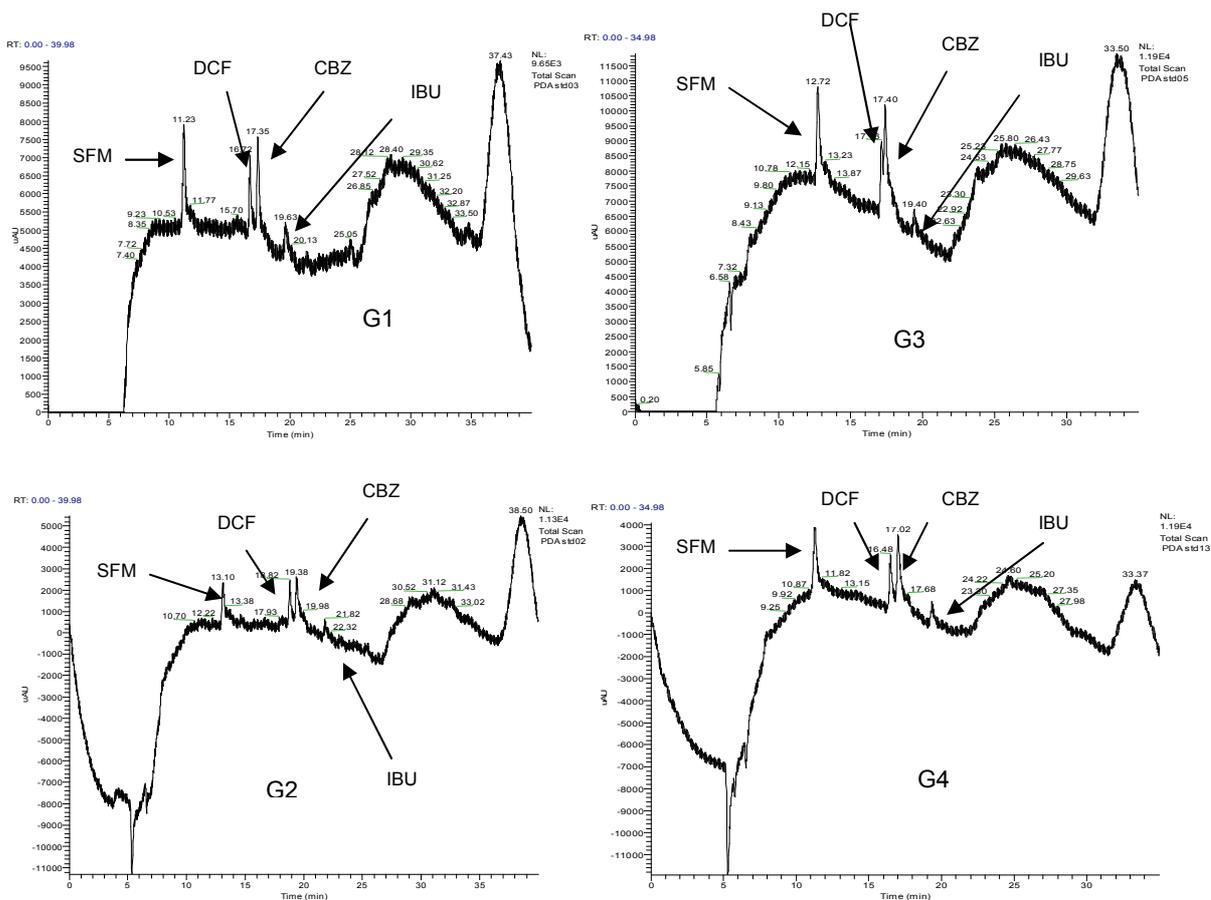
Zur Optimierung der mobilen Phase wurden unterschiedliche Gradienten und Flussraten erprobt. Da eine simultane Detektion mit dem Massenspektrometer erfolgte, sollte die Flussrate nicht höher als 0,6 mL/min sein. Bei den üblichen LC-MS Systemen ist Phosphat-Puffer als mobile Phase unerwünscht. In LCQ-Advantage ist der ESI-Nadel orthogonal zu der Achse der Ion Transfer Kapillare, wobei die Ion Transfer Kapillare vor den nichtflüchtigen Puffersystemen geschützt werden soll. Jedoch setzte sich die Ion Transfer Kapillare bei den Untersuchungen mit dem Phosphat-Puffer als mobile Phase nach einigen Stunden zu. Daher konnte die Verwendung des Phosphat-Puffers ausgeschlossen werden. Bei den anderen Puffersystemen sind auch nur die Konzentrationen höchstens 10 mmol/L erlaubt.

Als nächstes wurde Ammoniumacetat als mobile Phase B eingesetzt, wobei der Gradient während der Chromatographie zunahm. Es wurde festgestellt, dass durch die Zugabe der Ammoniumacetat-Lösung in die mobile Phase die Basislinie schlechter wurde und eine Drift bekam. Beim nächsten Versuch wurde 10 mmol/L Ammoniumacetat sowohl in die mobile Phase A als auch in die mobile Phase B zugemischt. Eine 5 mg/L SFM, CBZ, DCF und IBU-Lösung wurde mit unterschiedlichen Gradienten und Flussraten chromatographiert (s. Tabelle 17). Wie in der Abb. 39 zu sehen ist, konnten die vier Arzneistoffe mit dem Gradient G1 erfolgreich getrennt werden und die Retentionszeiten blieben im Vergleich zu den anderen Gradienten relativ kurz.

Der pH-Wert der mobilen Phase beeinflusst die Elution der Analyten. In der Regel soll der pH-Wert der mobilen Phase zwei Einheiten unter der Säurekonstante der Analyten liegen. Die Säurekonstanten der Arzneistoffe sind sehr unterschiedlich, wobei sie für die beiden Carbonsäuren, DCF und IBU ca. bei 4, für CBZ bei 13,94 und für SFM bei 2 und 5,7 liegen (genauere Daten, s. Tab. 6). Der pH-Wert der mobilen Phase wurde auf 5 eingestellt.

**Tabelle 17:** Optimierung des Gradienten, Mobile Phase A: 10 mmol/L Ammoniumacetat in Wasser, Mobile Phase B: 10 mmol/L Ammoniumacetat in CH<sub>3</sub>CN

	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	A [%]	B [%]
<b>G1</b>	0	0,5	80	20
	20	0,5	20	80
	30	0,5	20	80
	40	0,5	80	20
<b>G2</b>	0	0,4	80	20
	20	0,4	20	80
	30	0,4	20	80
	40	0,4	80	20
<b>G3</b>	0	0,4	80	20
	15	0,4	20	80
	25	0,4	20	80
	35	0,4	80	20
<b>G4</b>	0	0,4	75	25
	15	0,4	25	75
	25	0,4	25	75
	35	0,4	75	25



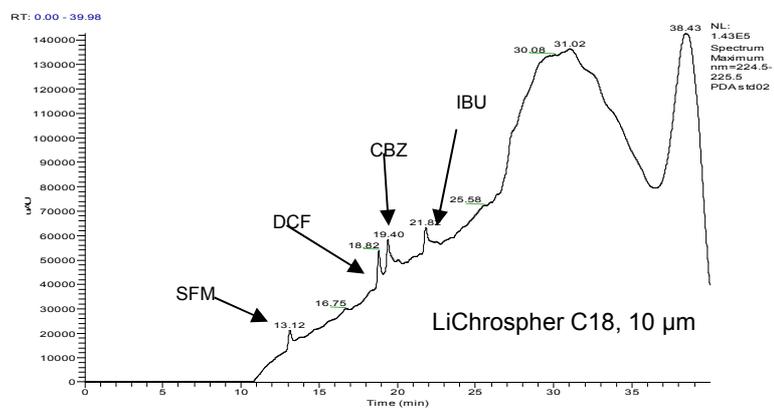
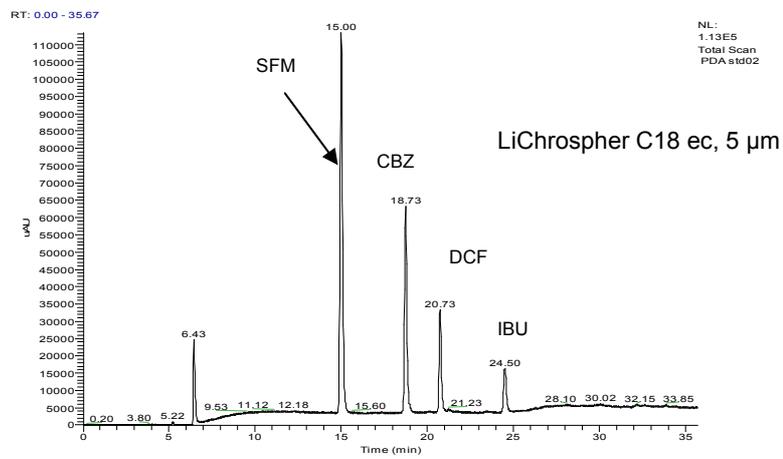
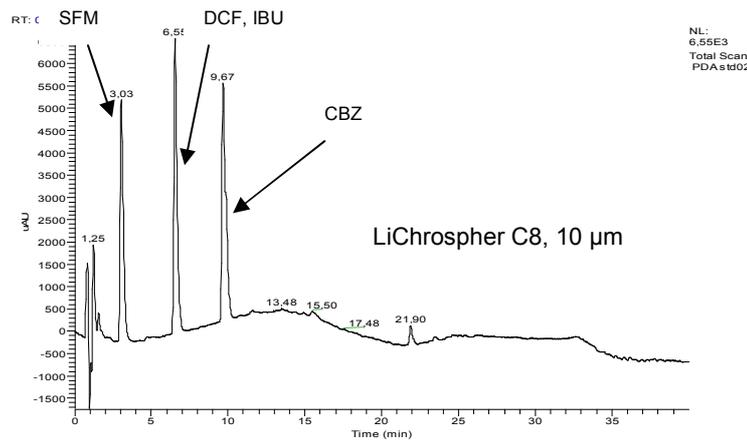
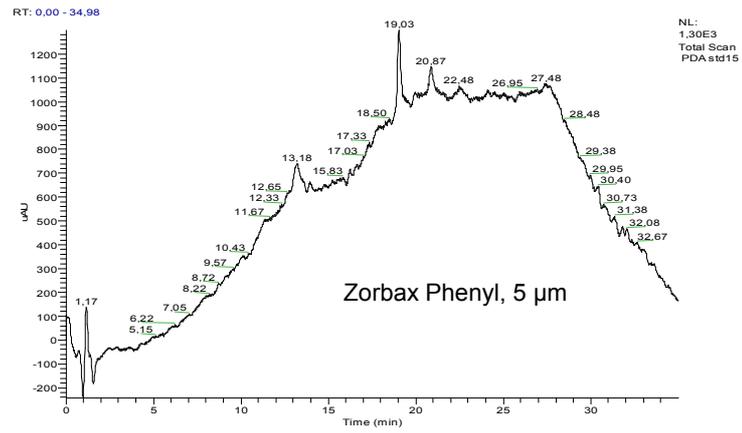
**Abb. 39:** Optimierung des Gradientenverlaufes (5 mg/L je Arzneiwirkstoff in Wasser, mobile Phase A: 10 mmol/L Ammoniumacetat in Wasser, mobile Phase B: 10 mmol/L Ammoniumacetat in CH<sub>3</sub>CN)

### 5.5.3 Auswahl der Trennsäule

Bei der Optimierung der Chromatographie wurden auch verschiedene Säulenmaterialien getestet, um eine saubere und möglichst stabile Trennung der vier Arzneiwirkstoffe zu erreichen.

In der Abb. 40 sind Chromatogramme zusammengestellt, die mit den vier erprobten Säulen erhalten wurden. Die LiChrospher-C18-Säule „endcapped“ mit den unpolaren Octadecyl-Ketten ermöglichte die beste Basislinientrennung und dadurch Selektivität. Die LiChrospher C8-Säule mit den Octyl-Ketten ermöglichte kürzere Retentionszeiten, allerdings konnten IBU- und DCF-Peaks nicht getrennt werden. Dagegen wurden mit der LiChrospher C18-Säule die Peaks zwar getrennt, aber die Peakform war nicht symmetrisch und es wurde eine Basislinien-Drift beobachtet. Die Zorbax-Säule mit den Phenyl-Endgruppen zeigte keine Trennung und konnte für die Anwendung ausgeschlossen werden.

Aus diesen Ergebnissen wurde beschlossen für die Trennung der vier Arzneistoffe die C-18-Säule „endcapped“ einzusetzen.



**Abb. 40:** Einfluss unterschiedlicher analytischer Säulen auf die HPLC-UV-Chromatogramme (5 mg/L je Arzneiwirkstoff in Wasser)

#### 5.5.4 Optimierung der massenspektrometrischen Detektion

##### LC-MS-System

Das verwendete LC-MS-System „LCQ-Advantage“ arbeitet mit der Ionisierungstechnik ESI „Elektrospray-Ionisation“ und mit einem „Ionenfallen (Ion Trap)-Analysator“ als Massenanalysator.

##### Massenspektrometrische Detektion – Scan Modes

Es gibt im verwendeten LC-MS-System den *MS*- und den *MS/MS-Scan-Mode*. Im *MS-Scan-Mode* werden nur Precursor-Ionen erfasst ohne Fragmentierung. Der *MS-Scan-Mode* kann entweder als *Full Scan* oder als *Selective Ion Monitoring (SIM)* ausgeführt werden.

Im *MS/MS-Scan-Mode* sind zwei Schritte der Massenanalyse notwendig. Der *MS/MS-Scan-Mode* kann entweder ein *Full Scan* oder eine *Selective Reaction Monitoring SRM* sein. *SRM* bietet eine selektivere Bestimmung, wobei die Precursor-Ionen zuerst in der Ionenfalle isoliert werden. Mittels Kollision mit einem Inertgas entstehen durch die Fragmentierung Product-Ionen, die erneut isoliert werden. Die *SRM*-Experimente bieten die Möglichkeit, charakteristische Fragmentionen zu bestimmen, welche über die Struktur der Analyten besondere Hinweise bieten.

Um für die Arzneistoff-Bestimmungen in dieser Arbeit die optimalen MS-Bedingungen zu ermitteln, wurden Standardlösungen der vier Arzneiwirkstoffe in bidest. Wasser hergestellt und die Peakintensitäten in zwei unterschiedlichen Detektionsmethoden verglichen. Dabei wurde die Detektionsmethode *SRM (Selective Reaction Monitoring)* angewendet. Die Einstellungen des Massenspektrometers wurde im experimentellen Teil ausführlich beschrieben (s. Kap. 7.7.5).

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben darüber, in welchem Mode die Arzneiwirkstoffe detektiert werden können [57, 69, 70, 76, 79, 88-92]. Die Ionenausbeute ist für *CBZ* und *SFM* im positiven Mode ist höher als im negativen Mode. Die beiden Carbonsäuren *DCF* und *IBU* ließen sich nur im negativen Mode detektieren.

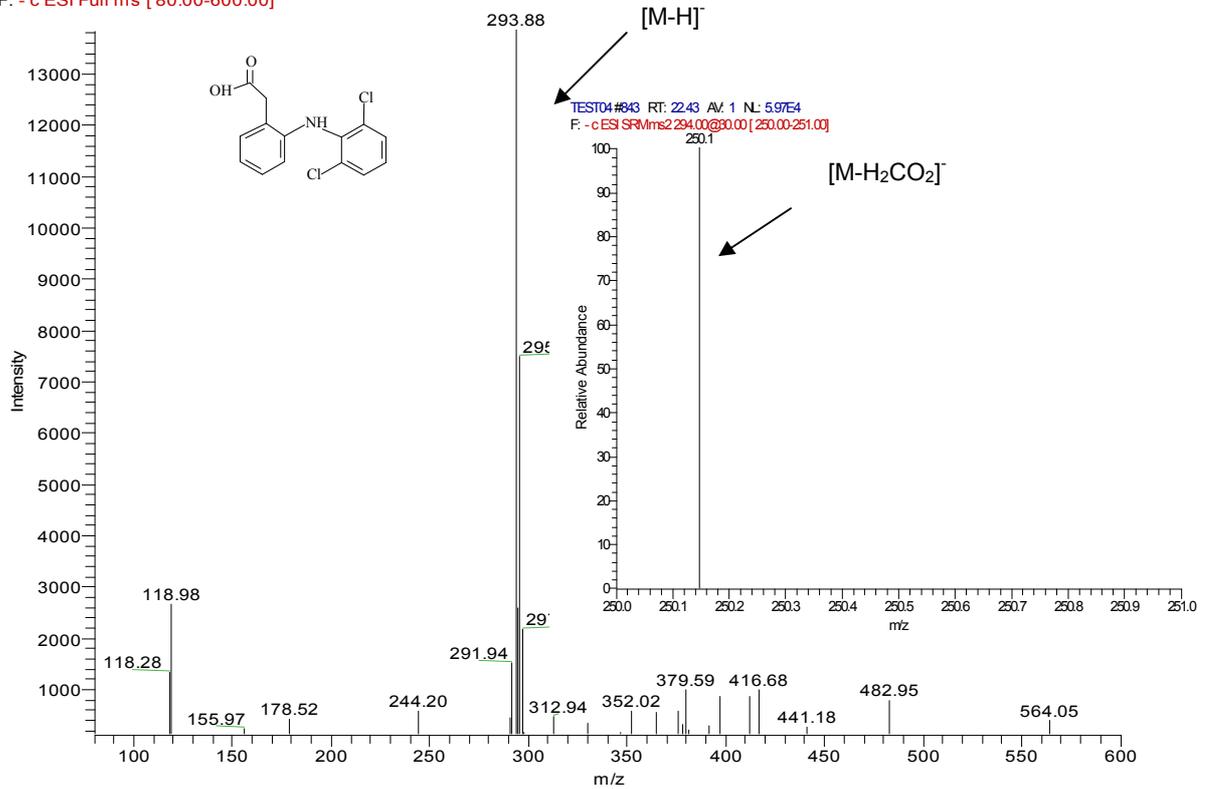
##### Fragmentierungsverhalten

Das Fragmentierungsverhalten der einzelnen Arzneiwirkstoffe ist zwar bekannt, jedoch sind in jedem Ionisierungssystem einige Unterschiede zu beobachten [57, 69, 70, 76, 79, 88-92].

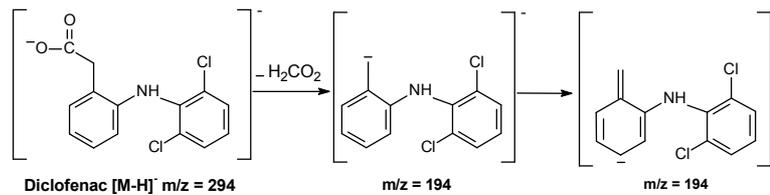
Es wurden Standardlösungen hergestellt und *MS<sup>n</sup>* Experimente durchgeführt. Die ermittelte, optimale Kollisionsenergie, die für eine vollständige Fragmentierung erforderlich ist, ist für

SFM: 46 %, für CBZ: 39 %, für DCF: 30 % und für IBU: 30 %. In den Abbildungen 41-44 sind die wichtigsten Fragmentierungsreaktionen und die dazu gehörigen Spektren von den Arzneiwirkstoffen zu sehen.

st301 #821-836 RT: 21.79-22.10 AV: 3 NL: 1.38E4  
F: -c ESI Full ms [80.00-600.00]



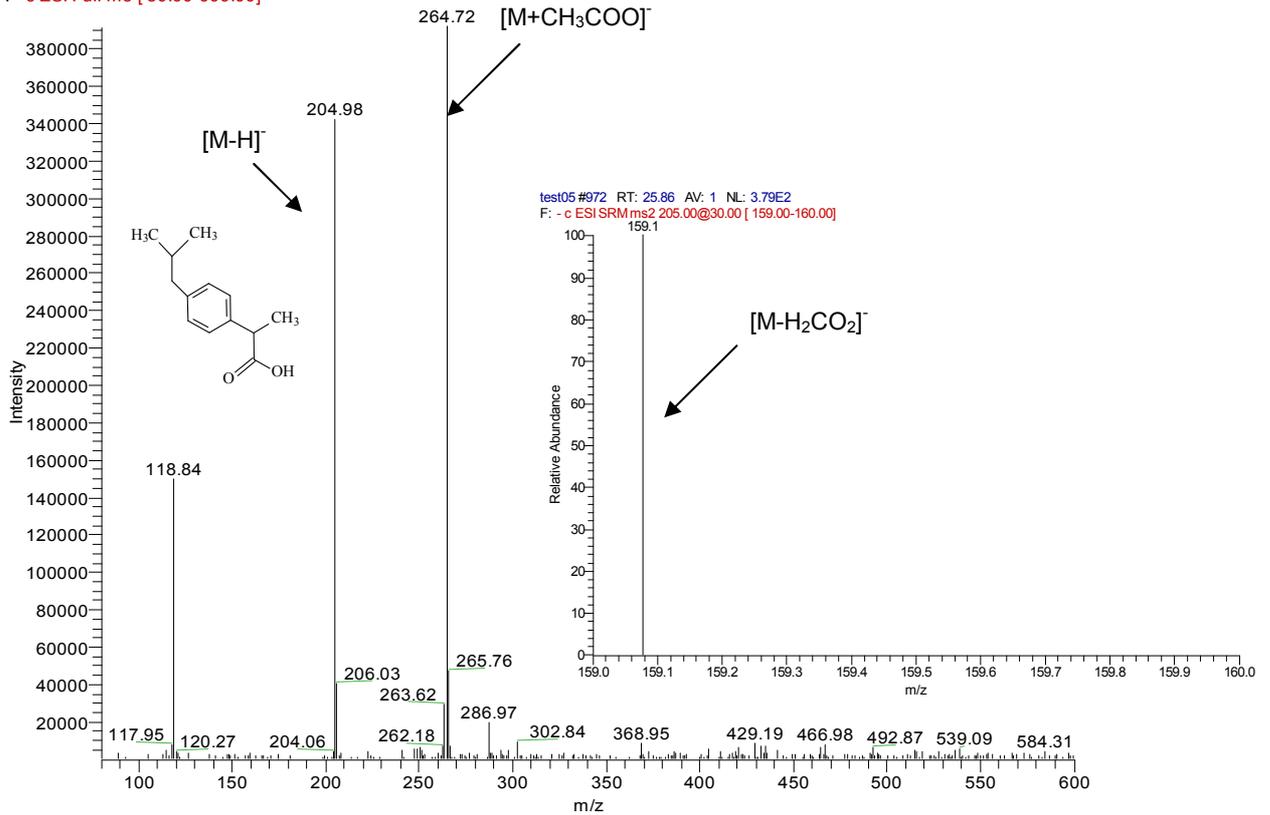
a)



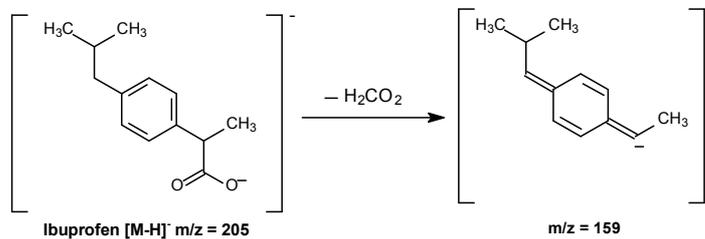
b)

**Abb. 41: a)** Massenspektrum und **b)** Fragmentierung von DCF im negativen Mode, (5 mg/L DCF in Wasser)

s110 #956-966 RT: 25.52-25.68 AV: 2 NL: 3.91E5  
 F: - c ESI Full ms [ 80.00-600.00]



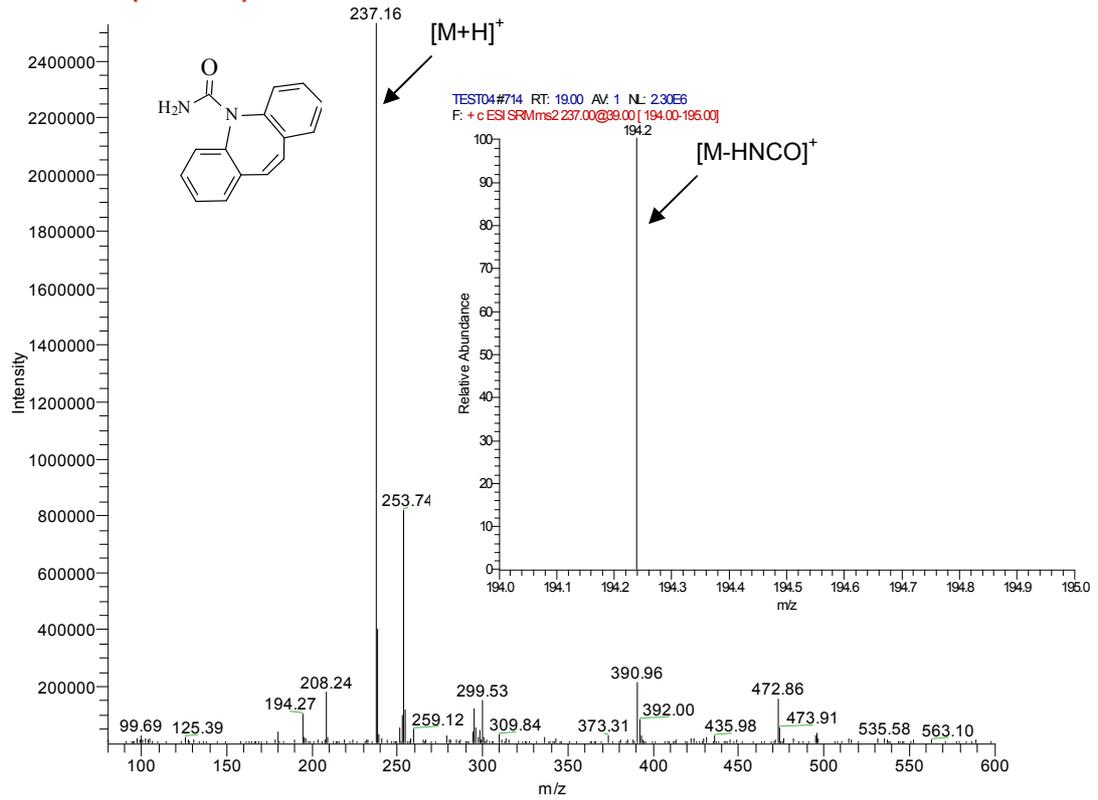
a)



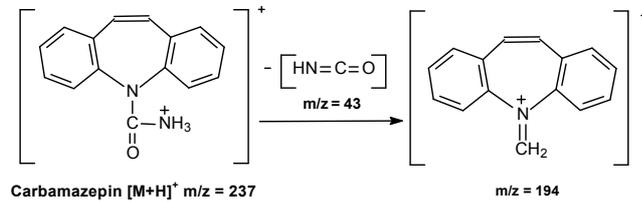
b)

**Abb. 42:** a) Massenspektrum und b) Fragmentierung von IBU im negativen Mode, (5 mg/L IBU in Wasser)

s110 #699-712 RT: 18.70-18.85 AV: 2 NL: 2.53E6  
 F: + c ESI Full ms [80.00-600.00]

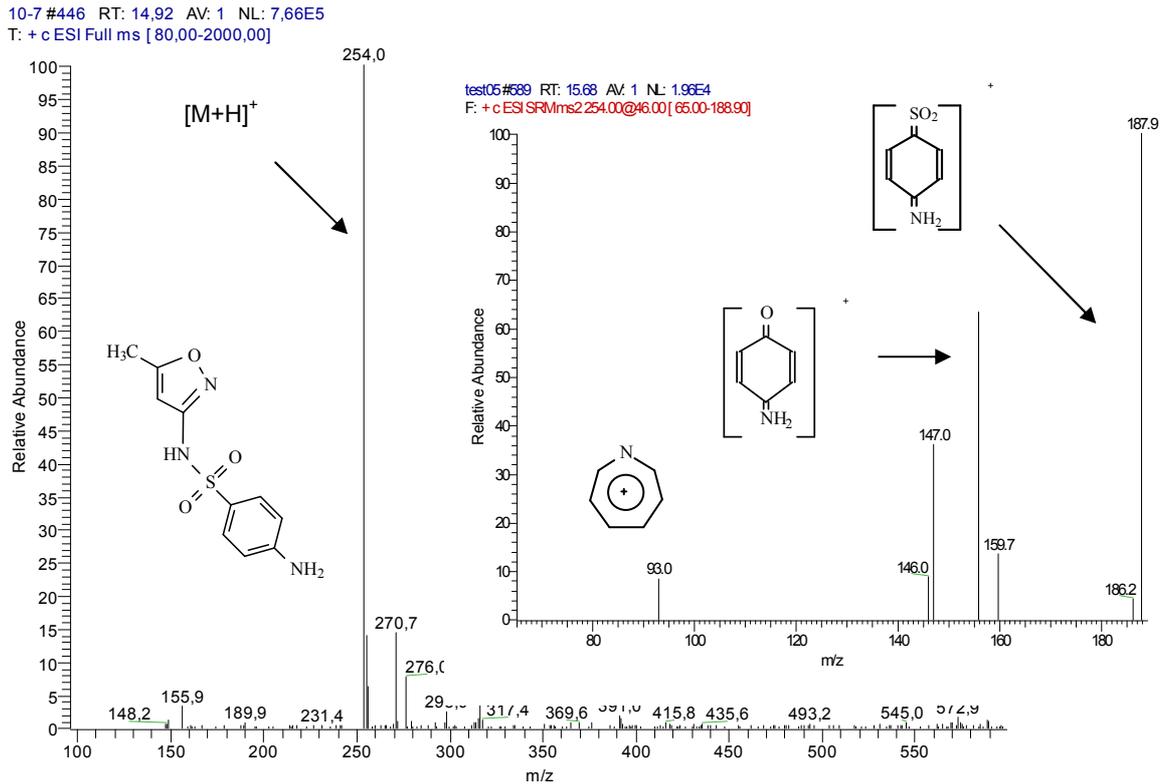


a)

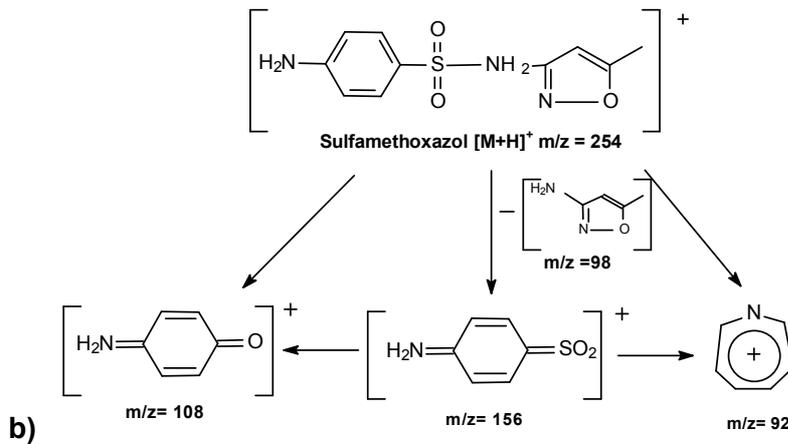


b)

**Abb. 43:** a) Massenspektrum und b) Fragmentierung von CBZ im positiven Mode, (5 mg/L CBZ in Wasser)



a)



b)

**Abb. 44:** a) Massenspektrum und b) Fragmentierung von SFM im positiven Mode, (5 mg/L SFM in Wasser)

In der Tabelle 18 wurden die ermittelten Fragmentationen, die optimalen Kollisionsenergien, sowie die Retentionszeiten der vier Arzneiwirkstoffe ausgeführt worden.

**Tabelle 18:** Fragmentierungsprodukte der Arzneiwirkstoffe mittels MS<sup>2</sup>-Experimenten, sowie die Molmasse ( $M_r$ ), optimierte Kollisionsenergie und die Retentionszeit (RT).

	$M_r$ (g·mol <sup>-1</sup> )	Precursor-Ion [M+H] <sup>+</sup> oder [M+H] <sup>-</sup> mit m/z	Product-Ion [M+H] <sup>+</sup> oder [M+H] <sup>-</sup> mit m/z	Kollisions- Energie [%]	RT (min)
<b>SFM</b>	253,3	(+) 254	(+) 188, 156, 108	46	9,27
<b>CBZ</b>	236,3	(+) 237	(+) 194	39	18,6
<b>DCF</b>	296,1	(-) 294	(-) 250	30	21,4
<b>IBU</b>	206,3	(-) 205	(-) 159	30	24,8

#### 5.5.4.1 Einfluss der Probenmatrix auf die Analyt-Stabilität und chromatographische Trennung

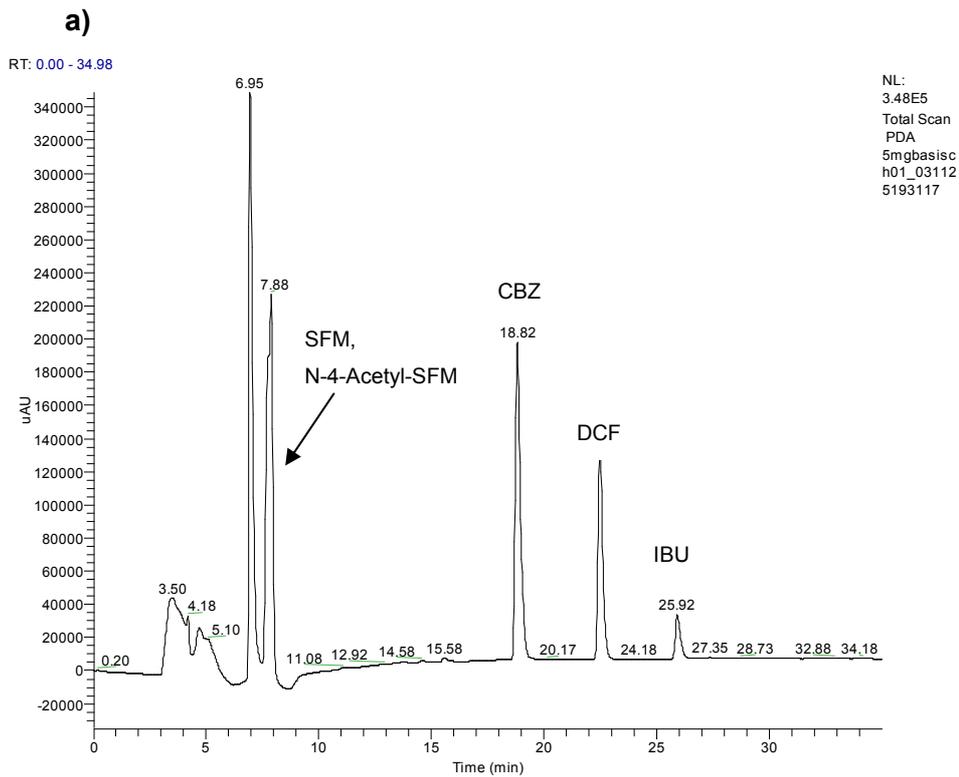
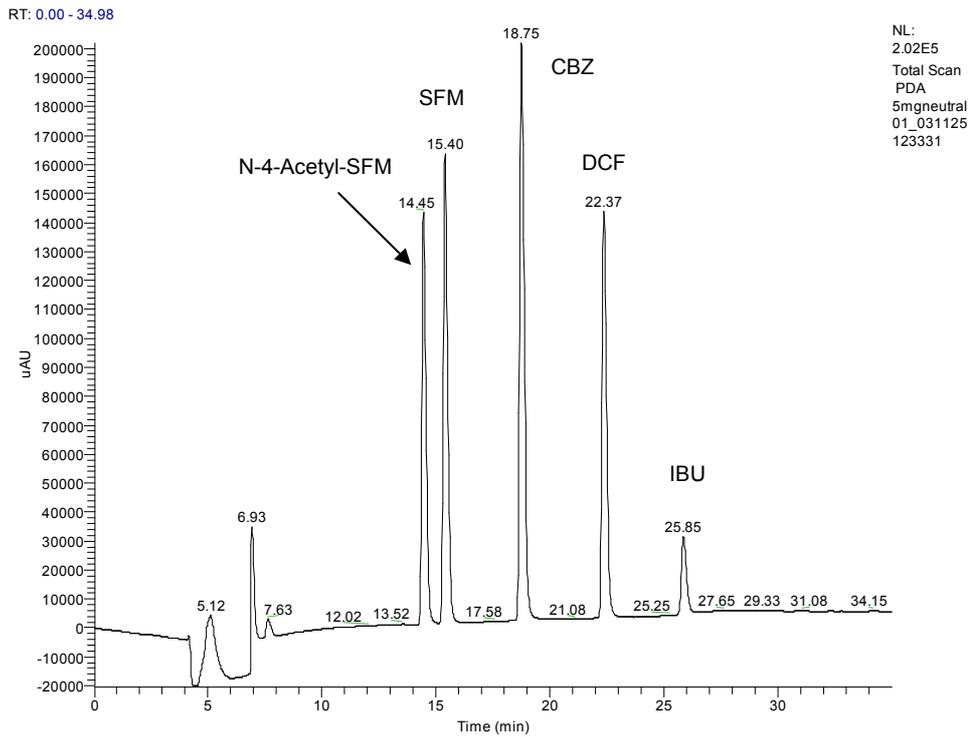
##### *Einfluss des pH-Wertes auf die Selektivität*

Anhand des Trennverhaltens und der Retentionszeiten der Wirkstoffe wurde erkannt, dass sich die Wechselwirkungen der Analyte mit der Festphase durch den pH-Wert der Messprobe ändern.

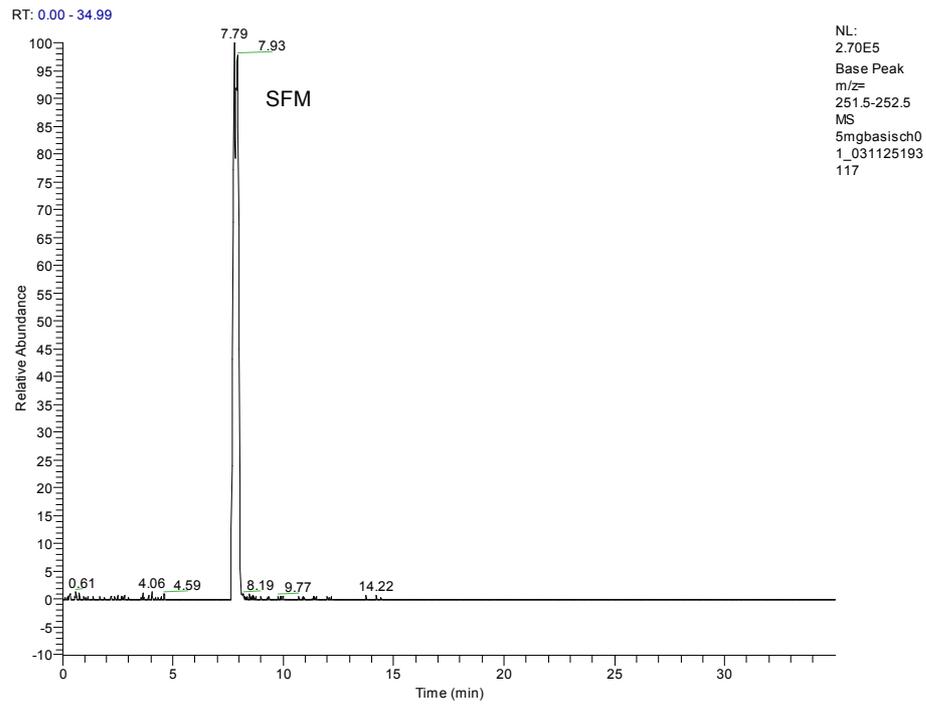
Zur Untersuchung des pH-Einflusses wurden Standardproben, die jeweils 5 mg/L N<sub>4</sub>-Acetyl-SFM, SFM, CBZ, DCF und IBU enthalten, in bidest. H<sub>2</sub>O, 0,1 mol/L HCl und 0,1 mol/L NaOH hergestellt und chromatographiert. In der neutralen und sauren Lösung sind die Retentionszeiten von allen fünf Analyten relativ unverändert geblieben.

In dem basischen Medium dagegen geht die Selektivität für die beiden Sulfonamide, SFM und N-4-Acetyl-SFM verloren, da beide Komponenten bei 7,88 min coeluierten (s. Abb. 45). Die Peakverschiebung und Analytzuordnung wurden durch MS-Detektion bestätigt (s. Abb. 46).

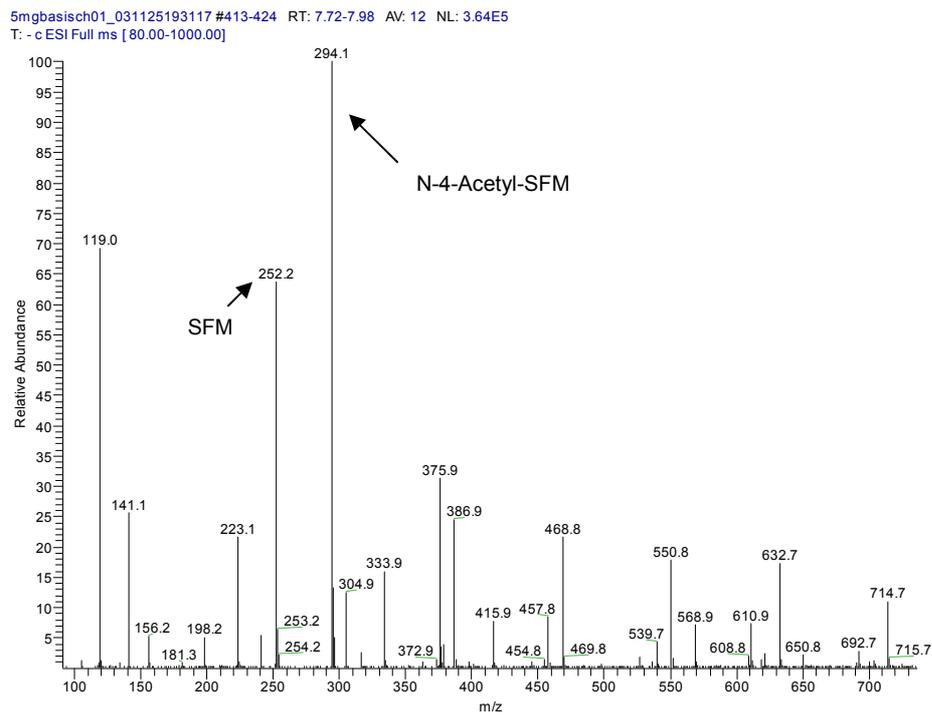
Um die chromatographischen Bedingungen bei allen weiteren Messungen zu stabilisieren, wurden die Messlösungen der Standards im neutralen Medium vorbereitet und saure oder basische Extraktionsproben vor der Injektion in das HPLC-System neutralisiert.



**Abb. 45:** Einfluss des pH-Wertes der Arzneistoff-Lösung auf das HPLC-UV-Chromatogramm  
**a)** neutral, **b)** basische Bedingungen (pH 13)



a)



b)

**Abb. 46:** Bestätigung der coeluierenden SFM- und N-4-Acetyl-SFM-Peaks durch LC-MS/MS (Messprobe basisch, pH 13), a) LC-MS/MS-SIM-Chromatogramm, Base Peak: SFM, b) Massenspektrum bei 7,7-7,98 min

### 5.5.5 Zusammenfassung der Methodenentwicklung

Zur Entwicklung einer neuen HPLC-UV-MS/MS-Methode wurden zuerst die UV-Spektren von SFM, CBZ, DCF und IBU aufgenommen und daraus die Absorptionsmaxima ermittelt. Zur Optimierung der mobilen Phase wurden vier unterschiedliche Gradienten erprobt, wobei 10 mmol/L Ammoniumacetat-Lösung in Wasser als mobile Phase A und 10 mmol/L Ammoniumacetat-Lösung in CH<sub>3</sub>CN als mobile Phase B eingesetzt wurden. Als Festphase wurden vier verschiedene Säulenmaterialien in unterschiedlichen Partikelgrößen und Säulendimensionen getestet. Die beste chromatographische Trennung der Wirkstoffe wurde mittels einer C18-Säule „endcapped“ (LiChrospher C18 ec, 5 µm) erreicht.

Für die Detektion mit dem Massenspektrometer wurden zuerst die Massenspektren der Wirkstoffe ermittelt und festgestellt, dass die Ionen-Ausbeute von SFM im positiven Mode höher war als im negativen, während DCF und IBU sich im negativen Mode und CBZ sich im positiven Mode detektieren ließen. Als nächster Schritt wurde die Fragmentierung der Wirkstoffe untersucht und die Kollisionsenergie für die optimale Fragmentierung ermittelt. Aus den CBZ, DCF und IBU-Precursor-Ionen entstand jeweils nur ein Produkt-Ion (CBZ-Product-Ion: m/z 194; DCF-Product-Ion: m/z 250; IBU-Product-Ion: m/z 159), wobei im MS/MS-Spektrum von SFM drei Produkt-Ionen (m/z 93, m/z 156, m/z 188) erschienen, welche für Sulfonamide typisch sind.

Zuletzt wurde der Einfluss des pH-Wertes der Messprobe auf die chromatographische Trennung untersucht und festgestellt, dass alkalische Lösungen die Selektivität beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurden bei den Extraktionsversuchen mit den Flüssig-Membransystemen die alkalischen Strip-Lösungen vor der Bestimmung mit der HPLC (UV- und MS-Detektion) neutralisiert.

## 5.6 Validierung des HPLC-UV- und des LC-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung der Leitsubstanzen

Das entwickelte HPLC-UV- und LC-MS-Verfahren (s. Kap. 5.4) zur simultanen Bestimmung der Pharmaka SFM, CBZ, DCF und IBU wurde einer Validierung unterworfen, um seine Zuverlässigkeit zu beurteilen. In der Literatur sind zahlreiche Arbeiten zur Bestimmung von SFM, CBZ, DCF und IBU vorhanden, allerdings über eine simultane Bestimmung, die besonders bei der MS/MS-Detektion problematisch sein kann, sind keine Daten vorhanden [10, 11, 16, 26, 28, 29, 32, 76, 90, 91].

In der Literatur tauchen je nach dem Anwendungsbereich unterschiedliche Definitionen der Validierung auf. In der Analytik bedeutet Validierung die Frage zu beantworten, ob eine Methode für die Erfüllung einer ganz bestimmten Aufgabe geeignet ist [232]. Zudem noch einige Definitionsbeispiele zur Validierung:

- DIN ISO /IES 17025  
"Die Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen, beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden" [232].
- ISO 2382-1 (1984) Computer  
„Prüfen der Daten auf Richtigkeit oder Übereinstimmung mit anwendbaren Standards, Regeln und Konventionen. Im Zusammenhang mit Geräten, mehr noch bei Daten, schließt Validierung die Prüfung auf korrekte Leistung etc. ein“ [232].
- FDA, (1986) Produktion  
„Validierung ist der dokumentierte Nachweis, dass ein bestimmter Prozess mit einem hohen Grad an Sicherheit kontinuierlich ein Produkt erzeugt, das vorher definierte Spezifikationen und Qualitätsmerkmalen erfüllt“ [232].

Bei analytischen Verfahren steht die Erkennung und Vermeidung systematischer Fehler (Richtigkeit) und die Präzision der Messergebnisse (Ergebnisunsicherheiten) im Vordergrund. Zusätzlich sind Aussagen über die Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen und die Querempfindlichkeit bedingt durch Matrixstörungen sowie den Einfluss verschiedener Anwender (Wiederhol- und Vergleichspräzision) erforderlich. Die Validierung muss somit den Nachweis erbringen, dass mit einem Verfahren die vorgegebene, spezifische Aufgabe zu erfüllen ist.

Zur Validierung gehören in erster Linie:

- Der geprüfte Arbeitsbereich

- Die Koeffizienten der Kalibrierfunktion:
  - Im Fall der linearen Kalibrierfunktion 1. Grades ( $y = a + bx$ ): Achsenabschnitt  $a$  und Steigung  $b$ , wobei  $b$  die Empfindlichkeit des Analysenverfahrens darstellt.
  - Im Fall der Kalibrierfunktion 2. Grades ( $y = a + bx + cx^2$ ): Achsenabschnitt  $a$ , Koeffizient  $b$  des linearen Gliedes sowie der Koeffizient  $c$  des quadratischen Gliedes; die aus der Funktion abgeleitete Empfindlichkeit  $E$  des Analysenverfahrens.
- Die Verfahrensstandardabweichung  $s_{xo}$  als absolutes Präzisionsmaß der Kalibrierung
- Der Verfahrensvariationskoeffizient  $V_{xo}$  als relatives Präzisionsmaß.

Für eine allgemeine Beurteilung des Analysenverfahrens werden auch die Kenndaten

- Nachweisgrenze
- Bestimmungsgrenze
- Prüfgröße (Absicherung der unteren Arbeitsbereichsgrenze mit dem Prüfwert  $x_p$  ermittelt).

Anschließend wurde die Methodenpräzision für die gesamte Analysenmethode, kombiniert mit der Flüssigmembran-Extraktion, bestimmt.

## 5.6.1 Validierung des HPLC-UV-Verfahrens

### 5.6.1.1 Wahl des Arbeitsbereiches

Standardlösungen, die SFM, CBZ, DCF, IBU in Wasser enthalten, wurden in dreizehn unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 0,025 mg/L – 5,00 mg/L hergestellt, zehnmal injiziert, wie empfohlen von DIN 38402 mit HPLC-UV-MS/MS chromatographiert. Anschließend wurden die relativen Standardabweichungen der Peakflächen für jeden Analyten ermittelt (s. Anhang 1, Tab. 1.1-1.4). Die Gleichungen 1.1 und 1.2 zur Berechnung der Standardabweichungen sind in Anhang 1 aufgeführt.

Als nächstes wurde durch den Ausreißer-Test nach Grubbs geprüft und festgestellt, dass keine Ausreißer in den Messwerten liegen (Gl. 1.3 zur Berechnung der Prüfgröße). Der Wert gilt als Ausreißer, wenn die berechnete Größe  $Q$  größer als der entsprechende Tabellenwert bei einem Signifikanzniveau  $P = 0,99$  ist (bei zehnfachen Messungen der gleichen Konzentration ist der Tabellenwert nach Grubbs = 2,4) [232].

Nach diesen Ergebnissen wurde der vorläufige Arbeitsbereich für SFM, CBZ und DCF von 0,025 mg/L bis 5 mg/L gesetzt, wobei bei IBU der Bereich wegen der hohen relativen Standardabweichung erst ab 0,075 mg/L bis 5 mg/L gewählt wurde. Weiterhin wurden in diesen Konzentrationsbereichen die Kalibrierfunktionen ermittelt und ihre Linearität überprüft.

### 5.6.1.2 Ermittlung der Kalibrierfunktion

Bei der Ermittlung der Kalibrierfunktion müssen die folgenden Punkte beachtet werden. Es sollte möglichst mit einer linearen Kalibrierfunktion gearbeitet werden. Zur Überprüfung der Linearität sind mehrere Möglichkeiten vorhanden:

- Visueller Linearitätstest, um eine grobe Abweichung von der Linearität zu erkennen.
- Eine Vielzahl der Geraden wird durch alle gemessenen Punkte gelegt. Anschließend werden die Reste oder Residuen addiert. Das ist der jeweilige Abstand eines gemessenen Punktes von der errechneten Gerade. Die Gerade mit der kleinsten Summe wird als die beste auserkoren. Beim direkten Vergleich der Reststandardabweichungen bekommt man eine qualitative Aussage über die Linearität.
- Als nächstes wird die Linearität rechnerisch überprüft (DIN 38402, Anpassungstest nach Mandel) [233].
- Bei der Residualanalyse wird nach der Verteilung der Residuen um die X-Achse festgestellt, ob die Kalibrierfunktion in dem gewählten Arbeitsbereich linear ist.

Nach zehnfacher Messung der jeweiligen Standardlösungen wurden Kalibrierfunktionen ersten Grades und Verfahrenskenndaten (Koeffizienten a und b) der Kalibrierfunktionen ermittelt (s. Anhang 2, Gl. 2.1-2.4).

Die Reststandardabweichung ( $s_y$ ) zeigt die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade an (s. Anhang 2, Gl. 2.5).

Es wurden für SFM, CBZ, DCF und IBU die Gleichung der Kalibrierfunktion 1. Grades und die Reststandardabweichung wie folgt ermittelt (s. Tab. 19).

**Tabelle 19:** Verfahrenskenndaten für die Kalibrierfunktionen des ersten Grades (HPLC-UV)

	Kalibrierfunktion 1. Grades	a	b	R <sup>2</sup>	s <sub>y</sub>
<b>SFM</b>	2653400 x +207841	207841	2653400	0,9966	231645
<b>CBZ</b>	4558100 x + 39399	39399	4558100	0,9993	117179
<b>DCF</b>	3222700 x - 3676	- 3676	3222700	0,9988	108415
<b>IBU</b>	1994500 x – 82904	– 82904	1994500	0,9982	84816,5

Die Funktionsgleichungen und die berechneten Werte für die Kalibrierfunktionen 2. Grades von allen vier Substanzen sind in der Tabelle 20 aufgeführt. Die Gleichungen zur Berechnung der Kalibrierfunktionen und Verfahrenskenndaten sind in Anhang 2 aufgeführt (s. Gl. 2.6-2.13).

**Tabelle 20:** Verfahrenskennndaten für die Kalibrierfunktionen des zweiten Grades (HPLC-UV)

	Kalibrierfunktion 2. Grades	a	b	c	R <sup>2</sup>	s <sub>y</sub>
<b>SFM</b>	$-7888,4x^2 + 3079100x - 182770$	-182770	3079100	-7888,4	0,999	822319
<b>CBZ</b>	$81492x^2 + 4295100x + 186180$	186180	4295100	81492	0,999	990294
<b>DCF</b>	$64287x^2 + 3015200x + 112110$	112110	3015200	64287	0,999	103864
<b>IBU</b>	$71442x^2 + 1763900x + 45773$	45773	1763900	71442	0,999	69141

### 5.6.1.3 Empfindlichkeit

Empfindlichkeit ist die Fähigkeit einer Methode, zwischen zwei kleinen Konzentrationen zu unterscheiden. Liegt für das Analysenverfahren eine lineare Kalibrierfunktion vor, so ist die Empfindlichkeit im gesamten Arbeitsbereich konstant und entspricht dem Regressionskoeffizienten b.

Mit Hilfe der Empfindlichkeit kann die **Verfahrensstandardabweichung** ( $s_{xo}$ ) und der **Verfahrensvariationskoeffizient** ( $V_{xo}$ ) (relative Verfahrensstandardabweichung) ermittelt werden. Die Gleichungen sind im Anhang 3 aufgeführt und die ermittelten  $s_{xo}$ - und  $V_{xo}$ -Werte für SFM, CBZ, DCF und IBU sind aus **Tab. 21** zu entnehmen.

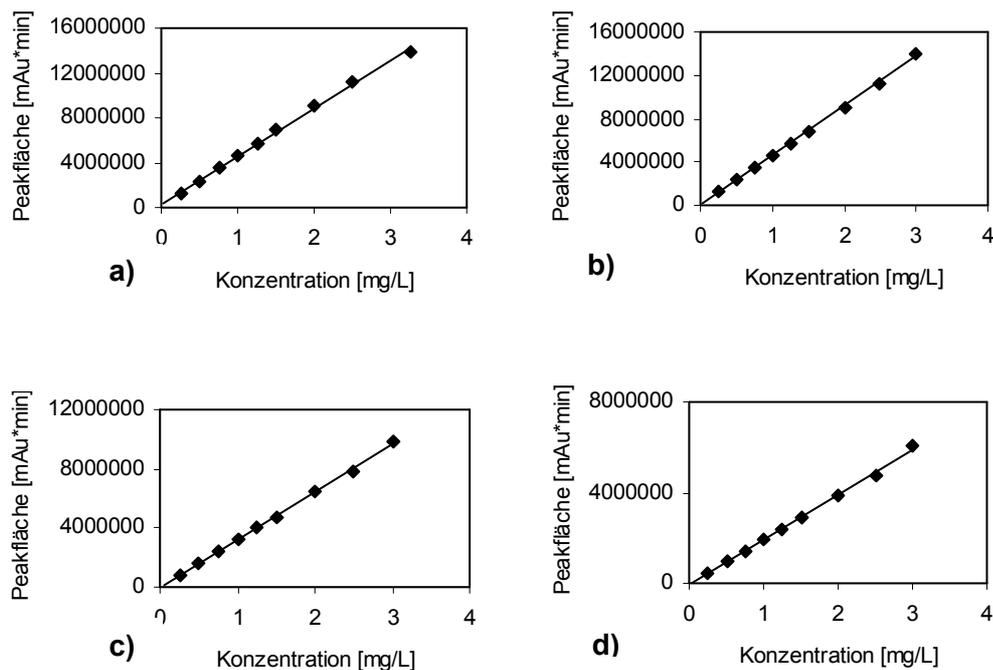
**Tabelle 21:** Ermittelte absolute und relative Verfahrenstandardabweichungen (HPLC-UV)

	SFM	CBZ	DCF	IBU
$s_{xo}$	0,087	0,025	0,034	0,042
$V_{xo}$ [%]	4,5	1,82	2,55	3,01

### 5.6.1.4 Überprüfung der Linearität

Es sollte nach Möglichkeit mit einer linearen Kalibrierfunktion gearbeitet werden. Um die Linearität der Kalibrierfunktion zu überprüfen, wurden die folgenden Linearitätsteste angewendet und die Ergebnisse diskutiert.

Die Ermittlung des Kalibrierfunktionstyps erfolgt im einfachsten Fall durch die graphische Darstellung der Kalibrierdaten, einschließlich Kalibriergeraden und eine subjektive Beurteilung. Ergibt sich dabei eine offensichtliche Unlinearität mit hoher Präzision der Messwerte, so kann auf einen gesonderten statistischen Linearitätstest verzichtet werden. Wie in den Abb. 47 zu sehen ist, sind alle vier Kalibrierkurven aus der visuellen Betrachtung als linear zu bezeichnen.



**Abb. 47:** Visueller Linearitätstest nach FUNK für a) SFM, b) CBZ, c) DCF und d) IBU (n=10)

Zur rechnerischen Überprüfung der Linearität wird der **Anpassungstest nach MANDEL** verwendet [232-234]. Hierzu werden die Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 1. Grades  $s_{y1}$  und die Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 2. Grades  $s_{y2}$  verwendet, Prüfgrößen,  $DS^2$  und  $PW$  berechnet und mit dem Tabellenwert  $F$  verglichen. Die Durchführung des Anpassungstests und die Gleichungen dazu wurden im Anhang 4 beschrieben.

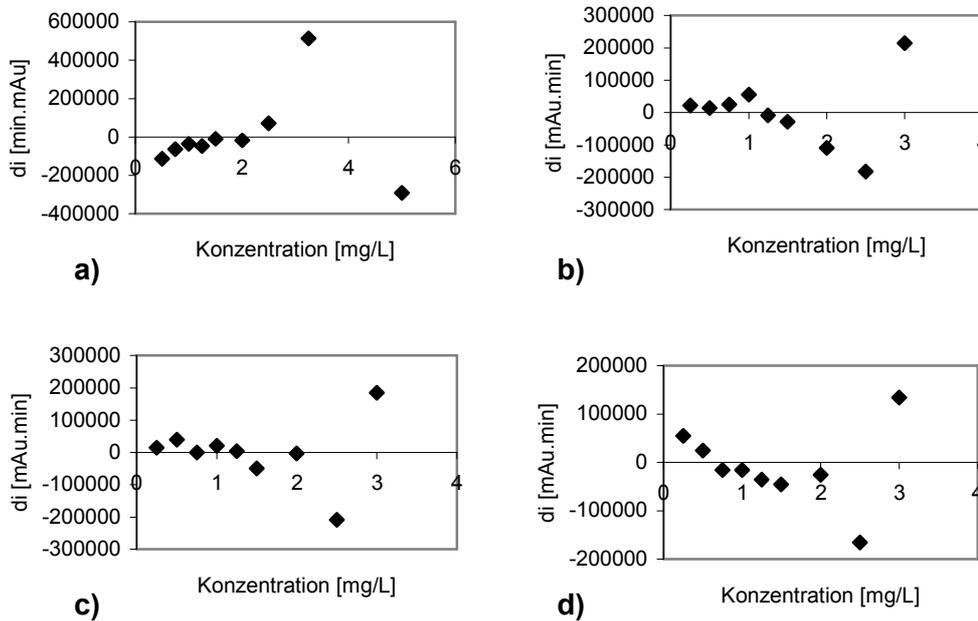
Wie in der Tab. 22 zu sehen ist, liegen die berechneten Prüfwerte ( $PW$ ) unter den Werten der F-Tabelle. Bei SFM und CBZ ist der  $PW$  sogar negativ, weil die Abweichung des zweiten Grades größer ist als die des ersten Grades. Für diesen Fall reicht auch die vereinfachte qualitative Aussage.

**Tabelle 22:** Ergebnisse aus dem Anpassungstest nach MANDEL der HPLC-UV-Methode, N:

	Anzahl der Konzentrationen			
	SFM (N = 9)	CBZ (N = 9)	DCF (N = 9)	IBU (N = 9)
$DS^2$	$-3,68 \cdot 10^{12}$	$-5,784 \cdot 10^{12}$	$1,75 \cdot 10^{10}$	$2,175 \cdot 10^{10}$
$PW$	-5,44	-5,89	1,626	4,53
$F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99\%)$	13,75	13,75	13,75	13,75

Nach den Ergebnissen des Linearitätstests nach MANDEL wurde festgestellt, dass die Kalibrierfunktion 1. Grades für alle Wirkstoffe linear ist. Als Alternative zum Anpassungstest

nach Mandel kann auch die **Residualanalyse** zur Überprüfung der Linearität herangezogen werden [235-236]. Die Durchführung der Residualanalyse ist im Anhang 5 aufgeführt.



**Abb. 48:** Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von der a) SFM-, b) CBZ-, c) DCF- und d) IBU-Konzentration (n=10)

In Abb. 48 sind die Residuen für SFM, CBZ, DCF und IBU in Abhängigkeit von den Konzentrationen graphisch dargestellt. Die Summe der Residuen sollte sich dem Wert Null nähern. Diese Voraussetzung ist für alle vier Analyten erfüllt und es ist auch visuell zu erkennen, dass die Residuen um die Nulllinie normal verteilt sind. Aus der Residualanalyse resultierte also, dass alle Kalibrierfunktionen 1. Grades zu verwenden sind.

Eine weitere Überprüfungsmöglichkeit der Linearität ist der Varianzhomogenitätstest. Die beschriebene lineare Regressionsgleichung geht von einer konstanten (homogenen) Unpräzision (Varianz der Messwerte) über den Arbeitsbereich aus. Varianzeninhomogenität führt nicht nur zu einer höheren Unpräzision, sondern durch mögliche Veränderung der Geradensteigung auch zu einer höheren Ungenauigkeit [232-233]. Der Varianzhomogenitäts-Test wurde, wie im Anhang 6 beschrieben, durchgeführt; die Ergebnisse und die Tabellenwerte zum Vergleich in Tabelle 23 aufgeführt. Die berechneten Prüfwerte mit den Gl. 6.1 und 6.2 (s. Anhang 6) für SFM liegt oberhalb des Tabellenwertes, wobei sie für CBZ, DCF und IBU relativ nah zu dem Tabellenwert liegen. Trotz der Einengung des Arbeitsbereiches für SFM um die Varianzhomogenität zu erreichen, konnte diese Voraussetzung nicht erfüllt werden.

Varianzhomogenität wird in allen aktuellen Regelwerken als Voraussetzung zur Kalibrierung und deren Auswertung gefordert. In der praktischen Analytik sind heute Kalibrationen über mehrere Dekaden erlaubt. In vielen Fällen ist die Forderung nach

Varianzenhomogenität problematisch. Die Ursache hierbei liegt daran, dass bei der Berechnung nicht die relativen Standardabweichungen, sondern die absoluten Reststandardabweichungen verwendet werden. Bei den höheren Konzentrationen ist die absolute Standardabweichung meistens viel größer als bei den niedrigen Konzentrationen, während für die relative Standardabweichung das Gegenteil gilt. Bei der höchsten Konzentration ist die relative Standardabweichung für die analysierten Wirkstoffe kleiner, während die absolute Standardabweichung mit zunehmender Konzentration größer wurde. Aus diesem Grund wurden die Varianzeninhomogenitäten nicht berücksichtigt und der Arbeitsbereich nicht eingengt.

**Tabelle 23:** Ermittelte Ergebnisse des Varianzenhomogenitätstest (HPLC-UV), N= 9

	SFM	CBZ	DCF	IBU
$s_1^2$	$1,3 \cdot 10^8$	$8,22 \cdot 10^8$	$1,132 \cdot 10^8$	$1,82 \cdot 10^8$
$s_N^2$	$1,68 \cdot 10^{10}$	$2,09 \cdot 10^{10}$	$1,871 \cdot 10^9$	$1,16 \cdot 10^9$
PW	128	25,42	16,52	6,37
Tabellenwert	5,35	5,35	5,35	5,35

Nach diesen Schritten wurde festgestellt, dass SFM in dem Konzentrationsbereich von 0,5 mg/L - 5 g/L sowie CBZ, DCF und IBU von 0,25 mg/L - 3 mg/L ein lineares Verhalten zeigen.

#### 5.6.1.5 Absicherung der unteren Arbeitsgrenze

Eine Kalibrierfunktion ist nur dann für quantitative Analysen anwendbar, wenn sich alle später mit ihr berechneten Analyseergebnisse signifikant von Null unterscheiden. Die untere Arbeitsgrenze muss, um sich mit einer vorgegebenen Präzision signifikant von Null zu unterscheiden, über der Bestimmungsgrenze liegen [232, 234]. Die Gleichungen 7.1 und 7.2 zur Berechnung der unteren Arbeitsgrenze sind im Anhang 7 aufgeführt. Anhand der Ergebnisse in der Tabelle 24 zeigt sich, dass die Voraussetzung für die Absicherung der unteren Arbeitsgrenze  $x_p < x_1$  für alle vier Analyten erfüllt ist.

**Tabelle 24:** Abgesicherte untere Arbeitsgrenze ( $x_p$ ) im Vergleich zur kleinsten Konzentration ( $x_1$ ) (HPLC-UV), N: 9

	SFM	CBZ	DCF	IBU
$x_p$	0,446	0,132	0,172	0,22
$x_1$	0,5	0,25	0,25	0,25
Absicherung	+	+	+	+
$x_p < x_1$				

### 5.6.1.6 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ( $X_{NG}$ ) ist der geringste nachweisbare Gehalt (Irrtum 50 %). Er gilt als nachgewiesen, wenn das Signal des Analyten sich signifikant vom Leerwert unterscheidet. Für viele instrumentelle Analysenverfahren wird die Nachweisgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis von unterschiedlichen Analytenkonzentrationen bestimmt. Das Verhältnis des Analyten-Peaks zum Grundrauschen des Detektors muss 3:1 betragen, damit man von einem eindeutig erkennbaren Peak sprechen kann [237-239].

Die Bestimmungsgrenze ( $X_{BG}$ ) ist der geringste Gehalt, der mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit quantitativ erfasst werden kann, in der Regel die dreifache Nachweisgrenze. Der Wert der Bestimmungsgrenze ist daher abhängig vom größten zufälligen Fehler, der bei der Angabe von Ergebnissen noch toleriert werden kann. In vielen analytischen Methoden wird sie über das Signal/Rausch-Verhältnis von 9:1 bestimmt.

In DIN 32645 ist auch die Erfassungsgrenze ( $X_{EG}$ ) definiert als der kleinste Gehalt einer gegebenen Probe, bei dem mit der Wahrscheinlichkeit  $100-\beta$  ( $50 < \beta < 100$ ) ein Nachweis möglich ist. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei 50 % liegt, dann ist die Erfassungsgrenze gleich der Nachweisgrenze; in der Regel wird jedoch als Erfassungsgrenze die zweifache Nachweisgrenze angenommen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Analyten wurden wie im Anhang 8 beschrieben, mit den Gleichungen 8.1 und 8.2 berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 aufgeführt.

**Tabelle 25:** Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die HPLC-UV-Methode, N: 9

	SFM	CBZ	DCF	IBU
$X_{NG}$ [mg/L]	0,11	0,03	0,04	0,05
$X_{BG}$ [mg/L]	0,30	0,09	0,12	0,16

## 5.6.2 Validierung des entwickelten LC-MS/MS-Verfahrens

### 5.6.2.1 Wahl des Arbeitsbereiches und Kalibrierung

Dreizehn Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen, die alle vier Arzneistoffe enthielten, wurden simultan mit der UV-Detektion auch mit dem Massenspektrometer detektiert. Nach der zehnfachen Injektion aller Standardlösungen wurden die absoluten und relativen Standardabweichungen der Peakflächen für jeden Analyten ermittelt und in den Tabellen 1.5, 1.6 und 1.7 im Anhang 1 aufgeführt. Als nächstes wurde durch den **Ausreißer-Test** nach **Grubbs** geprüft und festgestellt, dass in den Messwerten keine Ausreißer liegen (s. Anhang 1, Gl. 1.3).

Die ermittelten Peakflächen zeigen viel höhere relative Standardabweichungen im Vergleich zu der UV-Detektion. Besonders bei IBU ist eine quantitative Auswertung wegen mangelnder

Reproduzierbarkeit nicht möglich. Deshalb wurde die Methode mit der MS/MS-Detektion nur für SFM, CBZ und DCF validiert. Wegen sehr hohen Standardabweichungen sind die Arbeitsbereiche für alle drei Analyten sehr eingengt und die Kalibrierung für SFM in dem Bereich von 1,25 mg/L – 5 mg/L, für CBZ von 0,5 mg/L – 3 mg/L und für DCF von 0,75 mg/L – 3 mg/L durchgeführt (s. Tab. 1.5-1.7, Anhang 1).

Aus den Messwerten, die in den Tabellen 1.5-1.7 aufgeführt sind (s. Anhang 1), wurden die Kalibrierfunktionen des ersten und zweiten Grades ermittelt und die Verfahrenskenndaten in der Tabelle 26 aufgeführt. Die Berechnung der Verfahrenskenndaten und Kalibrierfunktionen erfolgte wie im Anhang. 2 beschrieben.

**Tabelle 26:** Verfahrenskenndaten für die Kalibrierfunktionen des ersten und zweiten Grades für die Bestimmung mit der LC-MS/MS-Methode

	<b>Kalibrierfunktion 1. Grades</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>s<sub>y</sub></b>
<b>SFM</b>	976580 x + 359670	359670	976580	-	0,967	422425
<b>CBZ</b>	55071000 x - 16082000	-16082000	55071000	-	0,994	4000384
<b>DCF</b>	1652000 x + 345580	345580	1652000	-	0,993	126496
	<b>Kalibrierfunktion 2. Grades</b>					
<b>SFM</b>	-155550x <sup>2</sup> + 2016400 x - 1429000	-1429000	2016400	-155550	0,991	174155
<b>CBZ</b>	5279900 x <sup>2</sup> + 34918000 x - 2564400	- 2564400	34918000	5279900	0,999	2979272
<b>DCF</b>	43730x <sup>2</sup> + 1488500 x + 472120	472120	1488500	43730	0,993	138777

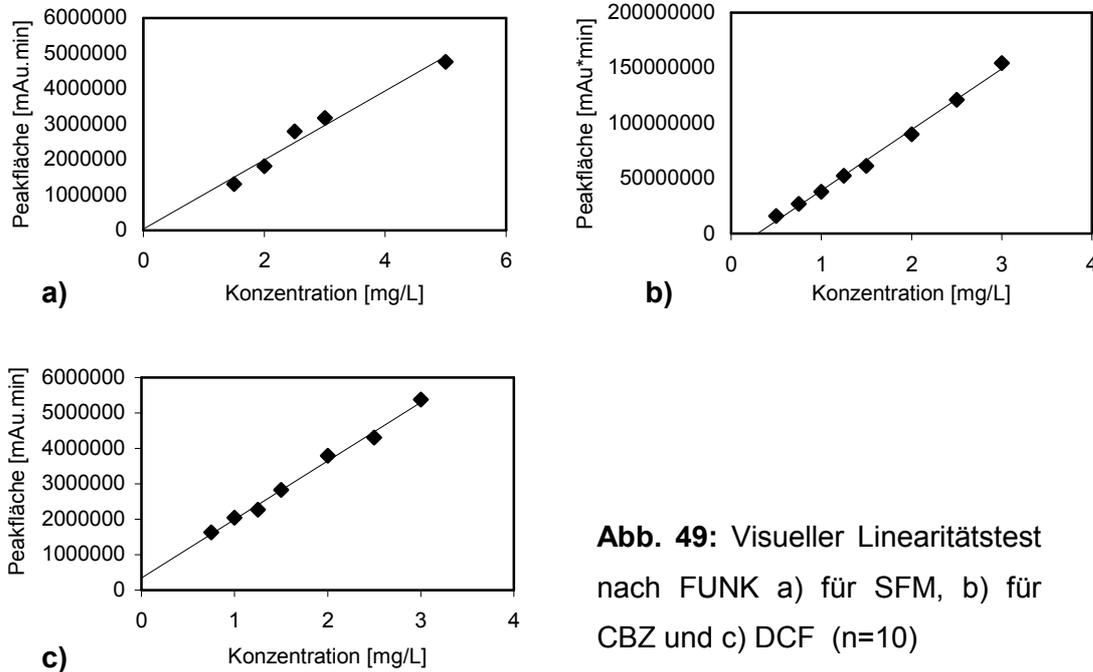
Als nächstes sind die absoluten und relativen Verfahrensstandardabweichungen für SFM, CBZ und DCF berechnet worden, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

**Tabelle 27:** Ermittelte absolute und relative Verfahrenstandardabweichungen für die LC-MS/MS-Methode

	<b>SFM</b>	<b>CBZ</b>	<b>DCF</b>
<i>s<sub>xo</sub></i>	0,087	0,072	0,076
<i>V<sub>xo</sub></i> [%]	4,5	4,65	4,46

Die Verfahren zur Überprüfung der Linearität der Regressionsgrade wurden in den Kapitel 5.5.1.4 ausführlich beschrieben (s. auch Anhang 2). Hier wurde genauso vorgegangen und schrittweise die Linearität überprüft. Zuerst erfolgte der von Funk empfohlene visuelle Linearitätstest. Aus den Abb. 49 ist zu erkennen, dass die CBZ- und DCF-Kalibrierkurven linear sind. Obwohl bei der SFM-Kalibrierkurve die relativ große Abweichung von der

Regressionsgrade leicht zu erkennen ist, wurden die weiteren Prüfverfahren auch durchgeführt, um die Unlinearität für SFM zu bestätigen.



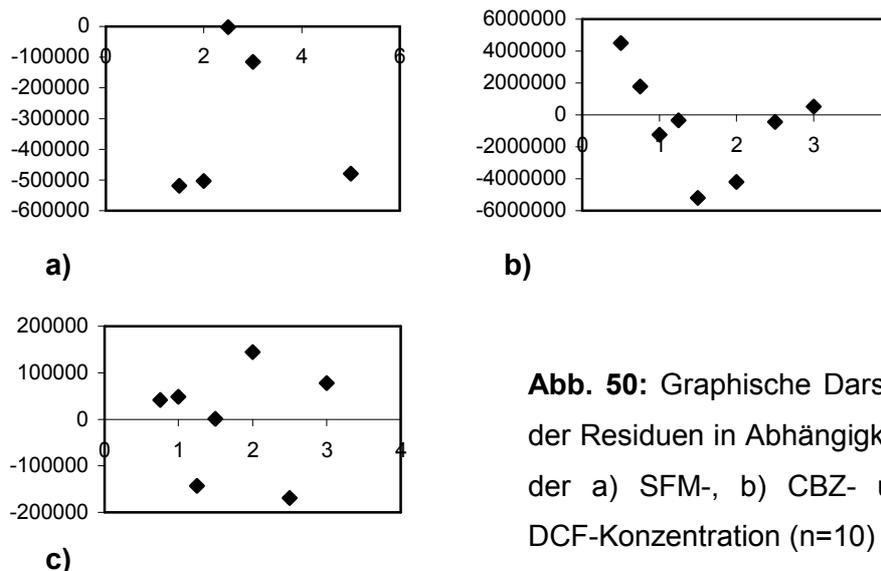
**Abb. 49:** Visueller Linearitätstest nach FUNK a) für SFM, b) für CBZ und c) DCF (n=10)

Die genauere rechnerische Überprüfung erfolgte durch den **Anpassungstest** nach **Mandel**. Hierzu wurden die Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 1. Grades  $s_{y1}$  und die Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 2. Grades  $s_{y2}$  verwendet und mit Hilfe der Gl. 4.1 im Anhang 4 die Differenz der Varianzen  $DS^2$  berechnet. Die mit der Gl. 4.2 berechneten Prüfwerte wurden mit dem Tabellenwert  $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99\%)$  verglichen und festgestellt, dass die ermittelten Kalibrierfunktionen linear sind und durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine verbesserte Anpassung erreicht wird (s. Tabelle 28) (s. Anhang 4).

**Tabelle 28:** Ergebnisse von der Anpassungstest nach MANDEL für die LC-MS/MS-Methode, N: Anzahl der Konzentrationen

	SFM (N = 5)	CBZ (N = 8)	DCF (N = 7)
$DS^2$	$4,6 \cdot 10^{11}$	$5,17 \cdot 10^{13}$	$7,29 \cdot 10^{10}$
PW	15,63	5,82	3,78
$F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99\%)$	98,50	16,26	21,20

Als Alternative zum Anpassungstest wurde auch die **Residualanalyse** zur Überprüfung der Linearität herangezogen, die die Normalverteilung der Residuen um das Null-Niveau überprüft. Die Residuen  $d_i = y_i - \hat{y}_i$  wurden durch die Gl. 5.1 in Anhang 5 berechnet und gegen die Konzentrationen aufgetragen.



**Abb. 50:** Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von der a) SFM-, b) CBZ- und c) DCF-Konzentration (n=10)

Die Linearität konnte durch die Residualanalyse verifiziert werden, da die Residuen keinen Trend aufwiesen (s. Abb. 50). Nach diesen Verfahren wurden die Kalibrierkurven ersten Grades für die weitere Untersuchung eingesetzt.

Anschließend wurde die **Varianzhomogenität** überprüft und die ermittelten Varianzen in der Tab. 29 aufgeführt. Die Varianz für CBZ und DCF liegen oberhalb des Tabellenwertes, während sie bei SFM einen kleineren Wert als der Tabellenwert beträgt. Der Grund hierfür ist, dass bei der SFM-Bestimmung der Arbeitsbereich wegen der Unlinearität der Kalibrierkurve sehr eingengt werden musste und deshalb nur zwischen 1,25 mg/L – 5 mg/L liegt. In der Praxis ist es sehr aufwendig immer solche kleine Arbeitsreie zu wählen. Deshalb liefert der Varianzenhomogenitätstest meistens die nicht erfolgreichen Ergebnisse, deren Grund daran liegt, dass bei der Berechnung nicht die relativen Standardabweichungen, sondern die absoluten Reststandardabweichungen verwendet werden. Aus diesem Grund wurde die Varianz für CBZ und DCF nicht berücksichtigt und der Arbeitsbereich nicht weiter eingengt.

**Tabelle 29:** Ermittelte Ergebnisse des Varianzenhomogenitätstest (LC-MS/MS)

	SFM (N = 5)	CBZ (N = 8)	DCF (N = 7)
$s_1^2$	$2,55 \cdot 10^{10}$	$5,49 \cdot 10^{11}$	$2,64 \cdot 10^{12}$
$s_N^2$	$6,06 \cdot 10^{10}$	$1,35 \cdot 10^{14}$	$2,89 \cdot 10^{13}$
PW	2,37	245	10,94
Tabellenwert	5,35	5,35	5,35

### 5.6.2.2 Absicherung der unteren Arbeitsgrenze

Bei der Absicherung der unteren Arbeitsgrenze wurde festgestellt, dass für SFM der Prüfwert  $x_p$  größer als die kleinste Konzentration ist. Der Arbeitsbereich von SFM wurde bereits mehrmals eingeschränkt, um die Linearität zu erreichen. Aus den Abb. 49 und 50 ist zu erkennen, dass die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade bei SFM im Vergleich zu den anderen Analyten deutlicher ist. Die hohe Reststandardabweichung, die bei der Berechnung sich direkt proportional zu der unteren Arbeitsgrenze verhält (s. Tab. 30, Kapitel 5.5.2.1), führte zu einer höheren abgesicherten Arbeitsgrenze. Im Gegensatz zu SFM konnte für CBZ und DCF die untere Arbeitsgrenze abgesichert werden.

**Tabelle 30:** Abgesicherte untere Arbeitsgrenze im Vergleich der kleinsten Konzentration für die LC-MS/MS-Methode

	SFM (N = 5)	CBZ (N = 8)	DCF (N = 7)
$x_p$ [mg/L]	3,79	0,40	0,51
$x_1$ [mg/L]	1,25	0,50	0,75
Absicherung ( $x_p < x_1$ )	-	+	+

### 5.6.2.3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Analog zur Validierung der ersten Methode mit der UV-Detektion wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 rechnerisch bestimmt und in der Tabelle 31 aufgelistet (Gl 8.1. und 8.2, s. Anhang 8).

**Tabelle 31:** Ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die LC-MS/MS-Methode

	SFM (N = 5)	CBZ (N = 8)	DCF (N = 7)
$X_{NG}$	0,11	0,14	0,19
$X_{BG}$	0,30	0,35	0,44

### 5.6.3 Abschließende Beurteilung der Validierungsergebnisse

Bei der Validierung des entwickelten **HPLC-UV-Verfahrens** wurde zuerst der vorgewählte Arbeitsbereich überprüft. Es wurden die absoluten und relativen Standardabweichungen in dreizehn unterschiedlichen Konzentrationen nach der zehnfachen Injektion für alle vier Analyten ermittelt. Bei der Überprüfung der Messwerte nach den Ausreißern und der Normalverteilung der Messwerte wurde festgestellt, dass die Messwerte normalverteilt sind und keine Ausreißer vorliegen.

Nach der Überprüfung der Linearität wurde festgestellt, dass SFM in dem Konzentrationsbereich von 0,5 mg/L - 5 mg/L, CBZ, DCF und IBU 0,25 mg/L - 3 mg/L ein

lineares Verhalten zeigen. Nach dem Anpassungstest nach MANDEL war die Voraussetzung der Linearität für alle Wirkstoffe erfüllt. Die Residualanalyse zeigte, dass die Kalibrierfunktionen 1. Grades für alle vier Substanzen keinen residualen Trend aufweisen und daher als linear anzunehmen sind. Als nächstes wurden aus den Kalibrierfunktionen untere Grenzen des Arbeitsbereiches ermittelt. Die Werte liegen für alle Wirkstoffe kleiner als die erste Konzentration des Kalibrierbereichs. Anschließend wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aus den Kalibrierfunktionen berechnet.

Bei der Validierung des entwickelten **LC-MS/MS-Verfahrens** wurden zuerst aus den ermittelten Peakflächen die Mittelwerte, absolute und relative Standardabweichungen berechnet. Der vorgewählte Arbeitsbereich für die Kalibrierung ist kleiner als bei der UV-Detektion, weil die Peakflächen bei kleineren Konzentrationen große Standardabweichung zeigten, mussten die Arbeitsbereiche stark eingeeengt werden. Bei Ibuprofen waren die Abweichungen relativ groß, so dass in dem Bereich überhaupt keine Kalibrierung möglich war. Aus diesem Grund wurde in diesem Kapitel die Bestimmungsmethode nur für SFM, CBZ und DCF validiert. Als nächstes wurden die Peakflächen nach den Ausreißern und der Normalverteilung geprüft und festgestellt, dass die Messwerte normalverteilt sind und keine Ausreißer vorliegen. Nach der Überprüfung der Linearität wurde festgestellt, dass SFM in dem Konzentrationsbereich von 1,50 mg/L - 5 mg/L, CBZ von 0,5 mg/L - 3 mg/L und DCF 0,75 mg/L - 3 mg/L ein lineares Verhalten zeigen. Der Anpassungstest nach MANDEL zeigte, dass die Voraussetzung der Linearität für alle Wirkstoffe erfüllt war. Die Residualanalyse zeigte, dass die Kalibrierfunktionen 1. Grades für alle CBZ und DCF keinen residualen Trend aufweisen und daher als linear anzunehmen sind, jedoch für SFM kein lineares Verhalten vorliegt. Die untere Grenze des Arbeitsbereichs lag für CBZ und DCF unterhalb der ersten Konzentration des Kalibrierbereichs. Bei SFM lag die untere Grenze oberhalb der ersten Kalibrierkonzentration. Da der Arbeitsbereich schon sehr eng war, wurde der Bereich nicht weiter eingeeengt und angenommen, dass die Funktion ab der unteren Grenze gültig sei. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden aus den Kalibrierfunktionen berechnet, die Nachweisgrenzen liegen für SFM bei 0,11 mg/L, für CBZ bei 0,14 mg/L und für DCF bei 0,193 mg/L. Bestimmungsgrenzen liegen für SFM bei 0,3 mg/L, für CBZ bei 0,35 mg/L und für DCF bei 0,44 mg/L.

## **5.7 Anwendung der SLM-Beutelmole - Analyse von Oberflächenwasser mittels SLM-Extraktion und HPLC-UV-MS/MS**

In Kapitel 5.3 wurde die Entwicklung einer neuen Probenvorbereitungsmethode zur Anreicherung der Arzneiwirkstoffe mit den hergestellten PP-Beutel-Modulen aufgeführt. Zur Analyse der Arzneistoffe wurde ein HPLC-UV-MS/MS-Verfahren entwickelt und das Gesamtverfahren wurde validiert. In Kap. 5.3, Tab. 12 und 13 sind die Standardabweichungen des gesamten Verfahrens aufgeführt. Standardabweichungen betragen von 1 % bis 9 %. Dieses Verfahren wurde zu einer Oberflächenwasseranalytik eingesetzt und bestand aus folgenden Schritten:

- Probenahme und Probenvorbereitung mit den SLM-Beutelmole (Abtrennung der Probenmatrix und Anreicherung der Wirkstoffe)
- Analyse mit der HPLC-UV-MS/MS

### **5.7.1 Probenahme und Probenvorbereitung (SLM-Extraktion)**

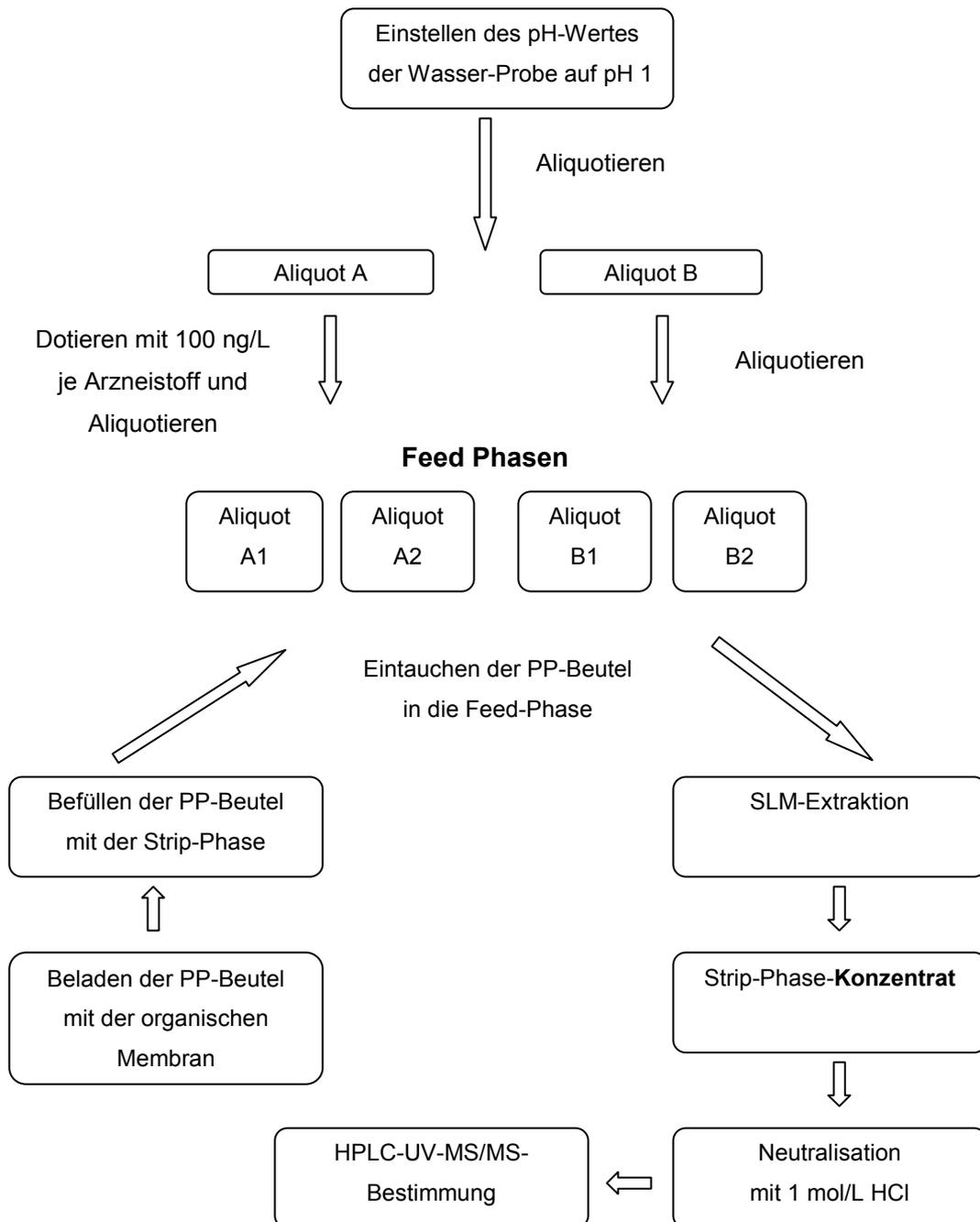
Die Oberflächenwasser-Proben wurden unterhalb des Abflusses der Kläranlage, welcher in den Ruhr fließt, nach dem DIN 38402-A12-Verfahren entnommen. Sie wurden in einer Braunglasflasche bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Innerhalb von zwei Tagen wurde die SLM-Extraktion und anschließende HPLC-UV-MS/MS-Bestimmung durchgeführt.

Ziel der Probenvorbereitung war, die in realen Wasserproben enthaltenen Matrixbestandteile abzutrennen und die Arzneistoffe anzureichern, deren Konzentrationen in Oberflächenwässern im ng/L-Bereich zu erwarten sind.

Wasserproben enthalten in hohen Konzentrationen Huminstoffe, die den größten Matrixbestandteil darstellen. Aus den Untersuchungen mit Flüssigmembranen (Bulk- und trägergestützte Flüssigmembrane) war es bekannt, dass die Huminstoffe durch die Flüssigmembrane erfolgreich abgetrennt wurden (s. Kap. 5.1.4.4.4 und 5.2.2). Deshalb wurde die entwickelte Anreicherungsmethode mit den SLM-Beutelmole auf die Bestimmung von DCF und IBU in kläranlagenbeeinflusstem Oberflächenwasser - mit und ohne Wirkstoff-Dotierung – angewendet.

Der Ablauf der Probenvorbereitung wurde in Abb. 51 schematisch dargestellt. Als Flüssigmembran wurde OcSA/DHE-Mischung eingesetzt. Die Eintauchzeit der PP-Beuteln in der Flüssigmembran betrug zwei Stunden, anschließend wurden die PP-Beuteln mit 300 µL 0,1 mol/l NaOH befüllt und in die 500 mL Wasserprobe eingetaucht. Alle vier SLM-Extraktionen von Aliquoten A1, A2, B1 und B2 wurden unter gleichen Bedingungen für vier Stunden durchgeführt.

Nach der SLM-Extraktion wurden die Strip-Proben entnommen und neutralisiert. Anschließend erfolgte die HPLC-UV-MS/MS-Bestimmung.



**Abb. 51:** Schematische Darstellung der Probenvorbereitung mit SLM-Beuteln zur Bestimmung von Arzneiwirkstoffen in Oberflächenwasser

### 5.7.2 Analyse mit der HPLC-UV-MS/MS

Zur Analyse der mit SLM-Extraktion angereicherten Proben wurde das entwickelte HPLC-UV-MS/MS-Verfahren eingesetzt. Zur chromatographischen Trennung wurde das C18-Material „endcapped“ als Festphase und Ammoniumacetat-Lösungen als mobile Phase

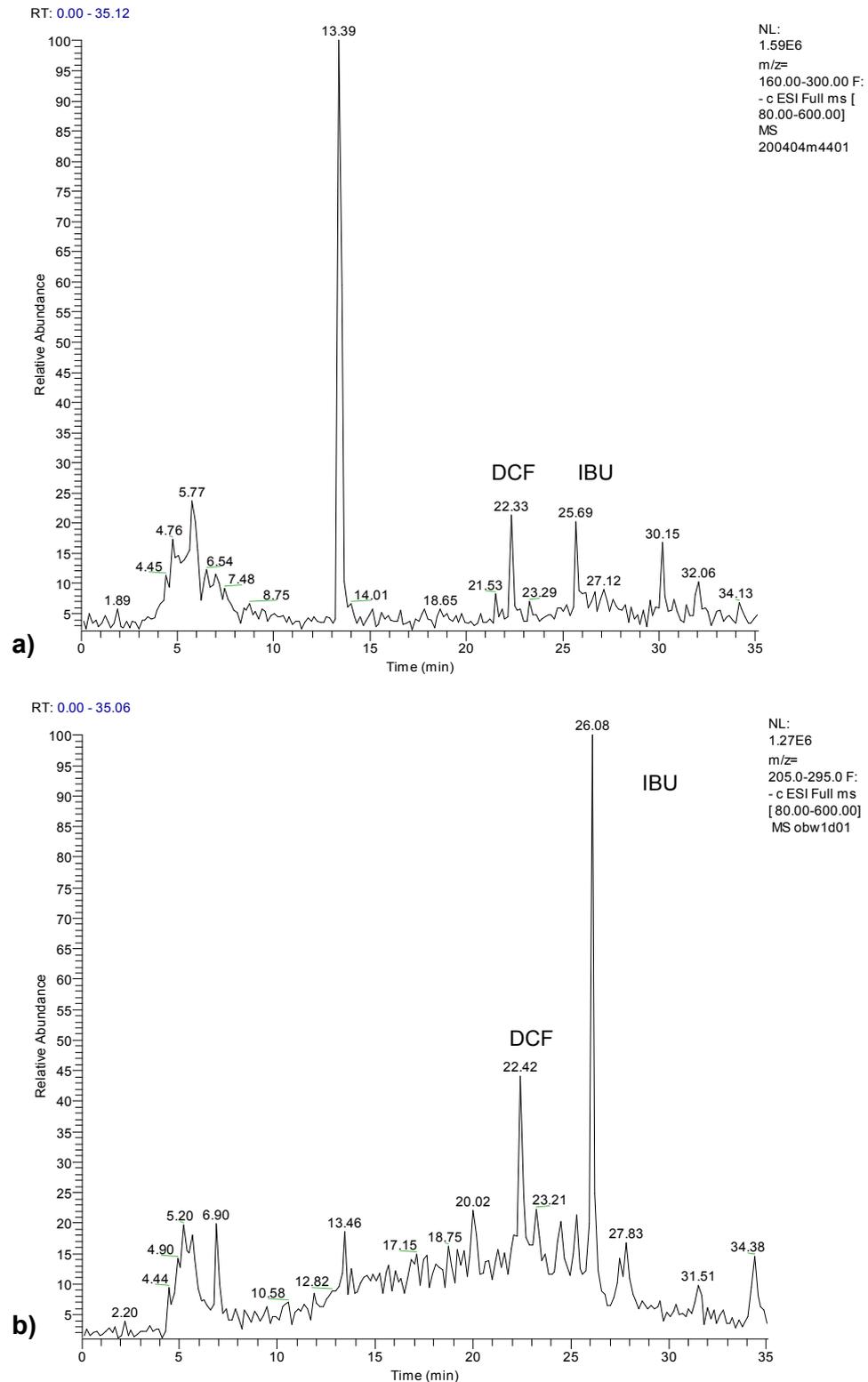
(Ammoniumacetat in Wasser als mobile Phase A, Ammoniumacetat in CH<sub>3</sub>CN als mobile Phase B) eingesetzt. Der Gradientenverlauf wurde eingesetzt, wie in Kap. 5.4.2. beschrieben (s. Tab. 17, G1). IBU und DCF wurden über die UV-Chromatogramme quantifiziert, wobei die MS/MS-Spektren zur Identifizierung über die Fragmentierung der Wirkstoffe verwendet wurden. Da die Flüssigmembrane sehr selektive Extraktions- und Anreicherungsmöglichkeiten bieten, ist in den Chromatogrammen keine Vielzahl von Peaks, sondern eine übersichtliche Struktur erschienen. Zur Überprüfung der Selektivität der gewählten chromatographischen Bedingungen wurden die Chromatogramme aus den Standardproben und Oberflächenwasserproben verglichen. Sowohl in den mit SLM-Extraktion angereicherten Standardproben als auch in den Oberflächenwasserproben sind DCF- und IBU-Peaks in den Chromatogrammen leicht anzuordnen. In der Abb. 52 sind Chromatogramme aus den Extraktionsproben von Standards (Abb. 52a) und von Oberflächenwasserproben (Abb. 52b) zu sehen. Dabei bietet die Massenspektrometrie auch einen eindeutigen Hinweis über die Molmasse und Struktur durch die Fragmentierung der Analyten. Durch die Massenspektrometrie konnte auch der Peak bei 13,4 min als OcSA identifiziert werden.

Grundsätzlich belegte der Vergleich der gemessenen Konzentrationen in den jeweiligen Strip-Lösungen bzw. Messproben (mg/L-Bereich) mit der berechneten Konzentration in den Wasserproben (ng/L-Bereich) das besonders hohe Anreicherungspotential der verwendeten SLM-Beutelmole (Tab. 32). Die Anreicherungsfaktoren lagen um 1500. Durch die Anreicherung mittels SLM-Extraktion konnten DCF und IBU-Konzentrationen (im ng/L-Bereich) in der Wasserprobe auf mg/L-Bereich (im PP-Beutel, bzw. in der Strip-Phase) erhöht werden. Die Dotierung erhöhte die Konzentration in der Strip-Phase um ca. 0,150 mg/L. Die Wiederfindung bei IBU war durchschnittlich 97 % und bei DCF ca. 150 %.

**Tabelle 32:** Bestimmung der Arzneistoffe in Oberflächenwasser mit SLM-Beutelmole

	<b>Dotierte Wasserproben: mit 100 ng/L je Arzneistoff</b>				<b>Undotierte Wasserproben</b>				<b>Wiederfindung [%]</b>
	<b>Messprobe (Strip-Phase) [mg/L]</b>		<b>Wasserprobe (Feed-Phase) [ng/L]</b>		<b>Messprobe (Strip-Phase) [mg/L]</b>		<b>Wasserprobe (Feed-Phase) [ng/L]</b>		
<b>Probe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
DCF	0,581	0,619	383	408	0,266	0,337	222	176	150
IBU	0,496	0,522	327	345	0,428	0,322	282	213	97

Die Ergebnisse in der Tab. 32 zeigen, dass die SLM-Beutelmole für die Spurenanalyse in Wässern eine neue Alternative zu der Festphasenextraktion bieten.



**Abb. 52:** HPLC-MS/MS-Chromatogramme zur Bestimmung von DCF und IBU, angereichert mittels SLM-Extraktion (PP-Beuteln) **a)** aus der 100 ng/L Standardprobe **b)** aus der dotierten Oberflächenwasserprobe.

Um den Vergleich der SLM-Beutelmole mit der üblichen Festphasenextraktion vergleichen zu können, wurden die gleichen Oberflächenwasser-Proben auch mittels SPE angereichert. Es handelte sich bei dieser Untersuchung um den Vergleich der Wiederfindungsraten. Die Wasser-Probe wurde mit DCF und IBU dotiert. Nach der Festphasenextraktion an einem Festphasenmaterial Oasis HLB 200mg (für den Ablauf der SPE, s. Abb. 37) betrugen die Wiederfindungsraten für DCF zu 45 % und für IBU 34 %.

Im Vergleich zu der Festphasenextraktion bieten die SLM-Beutelmole eine sehr leistungsfähige und kostengünstige Probenvorbereitungsmethode. Als Nachteil kann zwar die Selektivität der Membrane angesehen werden, aber sicherlich sind auch andere ökotoxikologisch relevante Wasserinhaltsstoffe mit vergleichbaren Polaritäts- und Aciditätseigenschaften mittels der Flüssigmembranmethode effektiv anzureichern.

### **5.7.3 Zusammenfassung und abschließende Bewertung**

Neu entwickelte trägergestützte Flüssigmembranextraktion (SLM) wurde als Probenvorbereitungsmethode zur Anreicherung von DCF und IBU aus Oberflächenwasser eingesetzt. Anschließend wurden die Extraktionsproben mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-UV-MS/MS-Verfahren analysiert. DCF und IBU konnten im Oberflächenwasser in ng/L-Konzentrationen nachgewiesen werden. Parallel dazu wurden die Wasserproben mit jeweils 100 ng/L DCF und IBU dotiert und Wiederfindungsraten ermittelt (für IBU: 97 % und für DCF: 150 %).

Durch die Selektivität der SLM-Extraktion mit den PP-Beuteln konnten DCF und IBU-Peak in den Chromatogrammen leicht eingeordnet werden, wobei die Identifizierung der Wirkstoffe durch die massenspektrometrische Detektion gesichert werden konnte. Ein wichtiger Vorteil der SLM-Methode war, dass die Huminstoffe sich durch die SLM-Extraktion erfolgreich abtrennen ließen.

Die ermittelten Ergebnisse wurden mit anderen Ergebnissen verglichen, die aus einer Messreihe stammen, bei der die Wirkstoffe durch die übliche Festphasenextraktion angereichert wurden. Es war festzustellen, dass die trägergestützte Flüssigmembranextraktion mit PP-Beuteln sich in vielen Hinsichten als vorteilhaft gegenüber Festphasenextraktion erwies, wie z.B. Anreicherungsfaktor, Kosten, Selektivität und Zeit.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Arzneiwirkstoffe und deren Metabolite gelangen durch menschliche Ausscheidungen in kommunale Kläranlagen, wo sie nicht vollständig eliminiert werden und sie sind daher, wenn auch nur in Spurengehalten, in aquatischen Umwelt-Kompartimenten nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine neue, effektive Probenvorbereitungsmethode mit Flüssigmembranen entwickelt werden, um in Verbindung mit chromatographischen Methoden (HPLC-UV, LC-MS) Arzneistoffspuren in Wässern zu bestimmen.

Dazu wurde folgendes Untersuchungsprogramm durchgeführt:

- Erprobung unterschiedlicher Bulk-Flüssigmembrane mit und ohne Carrier zur Extraktion der ausgewählten vier Arzneiwirkstoffe Sulfamethoxazol, Carbamazepin, Diclofenac und Ibuprofen (Leitstoffe).
- Übertragung optimaler Bulk-Flüssigmembran-Bedingungen auf trägergestützte Flüssigmembran (SLM)-Systeme (Flachmembrane und Beutelmole).
- Entwicklung einer effektiven Probenvorbereitungsmethode mit trägergestützten Flüssigmembranen zur Abtrennung und Anreicherung der Arzneiwirkstoffe.
- Entwicklung und Validierung einer HPLC-UV-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Arzneiwirkstoffe.
- Anwendung der entwickelten Probenvorbereitungsmethode mittels SLM-Extraktion und anschließender HPLC-UV-MS/MS-Bestimmung auf die Analyse von Arzneistoffspuren in Wasserproben.

Im ersten Schritt der Arbeit wurden Carrier-freie und Carrier-modifizierte Dreiphasen-Bulk-Flüssigmembransysteme zur Trennung der Arzneistoffe aus wässrigen Lösungen erprobt. Sulfamethoxazol und Carbamazepin mit höherer Polarität ließen sich am besten mit dem polarerer Decanol extrahieren. Durch einen Zusatz von Kupferethylhexanoat wurde eine über 30 % ige Rückextraktion von der Membran in die wässrige Strip-Phase erreicht. Decanol und Dihexylether, beladen mit Octansulfonsäure, zeigten sich am effektivsten zur Extraktion der Leitstoffe. Von diesen Membran-Kombinationen wurde ausgegangen und die Zusammensetzung der Drei-Phasen optimiert: Zusammensetzung der Strip-Phase (HCl, NaCl; NaOH, pH-Gradient zwischen Feed- und Strip-Phase). Ebenso wurden Betriebsparameter variiert, wie Extraktionsdauer, Rührgeschwindigkeit und Zellgröße.

- Bei der Extraktion des polaren Arzneiwirkstoffes Sulfamethoxazol mit Decanol zeigte sich 1 mol/L HCl als das beste Mittel zur Rückextraktion (19,2 %), während bei der Extraktion der beiden Carbonsäuren Diclofenac und Ibuprofen mit einer 0,1 mol/L NaOH-Lösung in der Strip-Phase der beste Strip-Effekt erzielt wurde (Ibuprofen: 59

%, Diclofenac: 50 %). Carbamazepin wurde am effektivsten mit 0,01 mol/L NaOH gestrippt (~ 20 %).

- Mit einer höheren Rührgeschwindigkeit wurden bessere Extraktionseffektivitäten erreicht.
- Die große Zelle (75 mL Feed-Phase, 50 mL Strip-Phase, 35 mL Membran) ermöglichte im Vergleich zur kleineren Zelle (32 mL Feed-Phase, 25 mL Strip-Phase, 20 mL Membran) eine Erhöhung der Extraktionsausbeute.
- Durch die Verlängerung der Extraktionszeit von 4 h auf 12 h wurde keine signifikante Verbesserung der Extraktionsgrade erreicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, Decanol und Dihexylether mit Octansulfonsäure als Carrier in trägergestützten Flüssigmembransysteme (SLM) einzusetzen. Decanol, welches sich als bestes Extraktionsmittel für Carbamazepin und Sulfamethoxazol erwiesen hatte, konnte aber nicht in SLM-Systeme angewandt werden. Es übt auf das Polypropylen-Gewebe der Trägermembran keinen genügend hohen Benetzungsdruck aus. Daher löst sich die Flüssigmembranphase vom Trägermaterial. Dagegen ist das Dihexylether/Octansulfonsäure-Gemisch problemlos als SLM einsetzbar.

Bei Extraktionsversuchen mit SLM-Modulen wurde das Trägermaterial mit der organischen Phase getränkt und zwischen Feed- und Strip-Phase platziert. Zuerst wurde ein Zwei-Kammersystem mit Flachmembran und gleich großen Feed- und Strip-Volumina verwendet. Danach wurden weitere Kammer-Systeme mit steigenden Volumenverhältnissen (300:1) zwischen Feed- und Strip-Phase für Anreicherungsversuche eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass dadurch hohe Anreicherungsfaktoren zu erreichen sind.

Neben Flachmembranmodulen wurde erstmalig eine „Beutel-Geometrie“ für die Trägermembranen entwickelt. Um die Extraktionseffektivität der PP-Beutel zur Anwendung auf Wasserproben mit zu erwartenden Arzneistoffgehalten im ng - µg/L-Bereich zu maximieren, wurde die Membrangeometrie bei gleichzeitiger Erhöhung des Volumenverhältnisses zwischen Feed- und Strip-Phase weiter miniaturisiert.

Dazu wurde im Verlauf mehrerer Versuchsserien eine Herstellungstechnik entwickelt, die zu PP-Trägermodulen mit reproduzierbaren Maßen und Eigenschaften führt. Das optimale Aufnahmevolumen für Strip-Lösung liegt im Bereich von 200 – 500 µL.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Anwendung der Flüssigmembrane zur Anreicherung und Analytik der in Wasserproben in Spuren (ng/L bis µg/L) enthaltenen Arzneistoffe. Dafür wurden die hergestellten, mit der Flüssigmembran getränkten Beutel-Module zur Anreicherung der beiden Carbonsäuren Diclofenac und Ibuprofen eingesetzt.

Extraktionsparameter, wie z.B. die Extraktionsdauer, die Eintauchzeit des PP-Beutels in der Flüssigmembran und das Volumen der Strip-Phase wurden variiert. Eine Eintauchzeit von einer Stunde genügte für eine nahezu vollständige Extraktion. Durch die Verkleinerung der Strip-Volumina wurde eine erhebliche Erhöhung des Anreicherungsfaktors erreicht (von ~1100 auf ~1600).

Zuletzt wurde diese Anreicherungsmethode mit SLM-Beutelmodulen in Verbindung mit vorher entwickelten und validierten HPLC-UV und LC-MS/MS-Verfahren auf die Bestimmung von Diclofenac und Ibuprofen in kläranlagenbeeinflusstem Oberflächenwasser angewendet. Die Wirkstoffe wurden in Konzentrationen von 170 ng/L - 280 ng/L nachgewiesen. Die Anreicherungsfaktoren lagen um 1600, die Wiederfindung bei 97 % (Ibuprofen) und bis zu ca. 150 % (Diclofenac). Vergleichsanalysen mit kommerziellen Festphasen (Oasis-HLB) ergaben deutlich niedrigere Wiederfindungen (für Diclofenac: 45 % und für Ibuprofen: 34 %). Es ist festzustellen, dass die SLM-Extraktion mit PP-Beuteln deutliche Vorteile gegenüber der klassischen Festphasenextraktion bietet: Höhere Anreicherungsfaktoren, clean-up-Effekt, niedrige Verbrauchskosten und geringerer Zeitaufwand. Als Nachteil kann zwar die Selektivität der Membrane angesehen werden, aber sicherlich sind auch andere ökotoxikologisch relevante Wasserinhaltsstoffe mit vergleichbaren Polaritäts- und Aciditätseigenschaften mit der Flüssigmembranmethode effektiv anzureichern.

Damit zeigen sich Perspektiven auf, SL-Membranen als Drei- oder auch als Zweiphasensysteme für hochpolare Komponenten – auch in Gegenwart natürlicher Oligomere und Polymere (Huminstoffe) – zur selektiven Anreicherung einzusetzen.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Verwendete Chemikalien

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt:

Acetonitril (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt)

Ammoniumacetat (p.a. Merck, Darmstadt)

Calcium(II)-2-ethylhexanoat (> 98 %, Aldrich, USA)

Carbamazepin (> 98 %, Sigma, Deisenhofen)

Decan (> 98 %, Fluka)

1-Decanol (> 97 %, Fluka)

Dihexylether (> 97 %, Fluka)

Essigsäure (Eisessig, 100%, Merck, Darmstadt)

Ibuprofen (> 98 %, Sigma, Deisenhofen)

Kupfer(II)-2-ethylhexanoat (> 98 %, Aldrich, USA)

Methanol (für HPLC, Merck, Darmstadt)

Natrium-Diclofenac (> 98 %, Sigma, Deisenhofen)

Natriumhydroxid (Trizma-Puffer Lösung, Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid (p.a, Merck, Darmstadt)

Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz (> 99 %, Merck, Darmstadt)

Salzsäure (Trizma-Puffer Lösung, Merck, Darmstadt)

Salzsäure, 37 % (w/w) (Merck, Darmstadt)

Sulfamethoxazol (> 98 %, Sigma, Deisenhofen)

Trioctylamin (> 93 %, Merck, Schuchardt)

Wasser (bidestilliert mit Destanat, Heraeus/Hanau)

### 7.2 Geräte

#### LC-UV-MS-Kopplung

Degasser: SCM 1000 Vakuum Membrane Degasser (Spectra System, Thermo Separation Product, USA)

Pumpe: P 4000 Gradient Pumpe (Spectra System, Thermo Separation Product, USA)

Injektionsautomat: AS 3000, Autosampler (gekühlt, 4 °C) mit integriertem Säulenofen (temperiert: 30 °C) (Spectra System, Thermo Separation Product, USA)

Trennsäule: LiChrospher 100 RP, 18 ec, 5 µ, 250 x 4,6 mm (Merck, Darmstadt)

---

PDA-Detektor:	UV 6000 LP, DHA (190 - 800 nm) (Spectra System, Thermo Separation Product, USA)
MS-Detektor:	LCQ-Advantage Ion-Trap (Thermo Finnigan, Egelsbach): Ionisierungsmethode: Electrospray Ionisation (ESI, negative-Mode)
Auswertung:	Xcalibur™, Version 1.3, Thermo Finnigan, Egelsbach 1998-2001

### **DCP-Emissionsspektrometer**

Die Cu-Gehalte (s. Kap. 7.4.6.3.1) wurden mit einem Beckmann Instruments DCP-Emissionsspektrometer SpectraSpan IIIb bestimmt.

### **UV-Spektrometer**

Die UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Perkin-Elmer Lambda 11 UV/VIS-Spektrophotometer mit der PC-Unterstützung durch die Software PECSS durchgeführt.

### **pH-Meter**

Es wurde ein Digital-pH-Meter 766 Calimatic der Firma Knick/Berlin unter Verwendung einer Ingold Elektrode 402-M6-S7, nach vorheriger Kalibrierung mit 2 Pufferlösungen (pH-Werte 1 und 7), eingesetzt. Während der Messung wurde die jeweilige Lösung gerührt.

### **Vortex-Mixer**

Die Extraktionsproben wurden mit einem Vortex-Mixer VXR basic der Firma IKA VIBRAX gemischt.

### **Mehrfachmagnetrührer**

Die mehrfache gleichzeitige Extraktion mit den SLM-Beuteln wurden mit dem Variomag Mehrfachmagnetrührer der Firma H+P Labortechnik AG durchgeführt.

### **Bügeleisen**

Zum Verschweißen der SLM-Module wurde der Bügeleisen Slider Special der Firma Siemens verwendet (1830-2200 Watt max., 220-240 V~50-60 Hz).

## **7.3 Chromatographische Bedingungen**

Flussrate:	0,5 mL/min
Injektionsvolumen:	50 µL
Säulentemperatur:	30 °C
Mobile Phase A:	10 mmol/L Ammoniumacetat in bidest. H <sub>2</sub> O

Mobile Phase B: 10 mmol/L Ammoniumacetat in CH<sub>3</sub>CN

**Tabelle 33:** Gradientenverlauf

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	A [%]	B [%]
0	0,5	80	20
20	0,5	20	80
30	0,5	20	80
40	0,5	80	20

## 7.4 Untersuchungen mit Flüssigmembransystemen

### 7.4.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

#### 7.4.1.1 Herstellung der mobilen Phase

##### Herstellung der Stammlösung, 500 mmol/L Ammoniumacetat:

9,635 g Ammoniumacetat wurde in 250 mL bidest. H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit Eisessig auf pH=5 eingestellt, wobei der pH-Wert mit der pH-Elektrode kontrolliert wurde. (Anfangswert:6,8)

Aus dieser Stammlösung wurden mobile Phase A und B hergestellt.

**Mobile Phase A:** 20 mL von der Stammlösung wurde entnommen, in ein 1 L Messkolben überführt und mit bidest. H<sub>2</sub>O wird auf ein Liter aufgefüllt.

**Mobile Phase B:** 20 mL von der Stammlösung wurde entnommen, in ein 1 L Messkolben überführt und mit Acetonitril (Gradient grade) wird auf ein Liter aufgefüllt.

#### 7.4.1.2 Herstellung der Arzneiwirkstoff-Stammlösungen

0,01 g SFM, CBZ, DCF und IBU wurden einzeln jeweils in einem 10 mL Messkolben in Methanol gelöst und geschüttelt. Die Konzentration betrug 1 mg/mL. Die Stammlösungen wurden bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

#### 7.4.1.3 Herstellung der Feed-Phase

##### Feed Phase 1: 10 mg/L SFM, CBZ, DCF, IBU in bidest. H<sub>2</sub>O

Von jeder Stammlösung wurde 1 mL entnommen, in einen 100 mL Messkolben gegeben und mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 mL aufgefüllt.

**Feed Phase 2: 10 mg/L SFM, CBZ, DCF, IBU in 0,1 mol/L HCl**

Von jeder Stammlösung wurden 1 mL entnommen, in einen 100 mL Messkolben gegeben und mit 0,1 mol/L HCl auf 100 mL aufgefüllt.

**Feed Phase 4: 1 mg/L SFM, CBZ, DCF, IBU in 0,1 mol/L HCl**

Von jeder Stammlösung wurden 100 µL entnommen, in einen 100 mL Messkolben gegeben und mit 0,1 mol/L HCl auf 100 mL aufgefüllt.

**Feed Phase 5: 1 mg/L SFM, CBZ, DCF, IBU in bidest. H<sub>2</sub>O**

Von jeder Stammlösung wurde 100 µL entnommen, in einen 100 mL Messkolben gegeben und mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 mL aufgefüllt.

**7.4.1.4 Herstellung der flüssigen Membran-Phasen****0,025 g/L Octansulfonsäure-Lösung in Dihexylether**

0,0025 g Octansulfonsäure-Na-Salz wurde in 100 mL Dihexylether gelöst. Da die Substanz in Dihexylether sehr schwerlöslich ist, wurde die Mischung über 1 Stunde ins Ultraschallbad gestellt bis die Substanz vollständig gelöst ist.

**0,025 g/L Trioctylamin-Lösung in Decan: Decanol (8:2, v/v)**

0,0025 g Trioctylamin wurde in 100 mL Decan: Decanol (8:2, v/v) gelöst.

**0,1 g/L Kupfer(II)-2-ethylhexanoat in Decanol**

0,01 g Kupfer(II)-2-ethylhexanoat wurde in 100 mL Decanol gelöst.

**0,1 g/L Calcium(II)-2-ethylhexanoat**

0,01 g Calcium(II)-2-ethylhexanoat wurde in 100 mL Decanol gelöst.

**7.4.2 Extraktionsversuche**

Die Bulk-Flüssigmembranextraktionen wurden mit der Drei-Phasen-Rührzelle durchgeführt (s. Kap. 5.2.1, Abb. 10). Die Zellen wurden im äußeren Bereich mit der Feed-Lösung und im inneren Bereich mit der Strip Lösung gefüllt. Beide Phasen wurden vorsichtig mit der Membranphase, die aus einem Carrier und einem organischen Solvent besteht, überschichtet. Dieser Zeitpunkt stellte den Beginn des Versuchs dar. Die Einstellung der richtigen Rührdrehzahl erfolgte so, dass eine gute Durchmischung jeder Phase, jedoch keine Verwirbelungen der Phasen untereinander auftraten. In der Tab. 34 sind die optimalen Volumina der Phasen und die Rührgeschwindigkeiten eingeführt.

**Tab. 34:** Betriebsdaten der Bulk-Membran-Zellen

	Volumen, mL			Rührblattgeschwindigkeit, min <sup>-1</sup>
	(Feed Phase)	(Strip Phase)	(Membran)	
Grosse Zelle 1	70	55	45	80
Grosse Zelle 2	70	50	35	
Kleine Zelle	32	25	20	60

### 7.4.3 Probenahme

Die Proben wurden in bestimmten Zeitabständen (Tab. 35) mit Einmalkanülen (Sterican, Braun/Melsungen A.G.) und -spritzen (1mL Omnifix-F, Braun/Melsungen A.G.) entnommen. Das Probenvolumen betrug jeweils 0,5 mL. Für jede Phase und jeden Extraktionsversuch wurden neue Spritzen und Kanülen benutzt.

**Tab. 35:** Probenahmezeit

Extraktionszeit	Probenahmezeit
Kurzzeitextraktion [min]	nach 5, 15, 30, 60, 120, 240
Langzeitextraktion [h]	nach 4, 6, 8, 10, 12

In der Tab. 36 sind die Volumenverhältnisse der Feed- und Strip-Phase und Änderungen der Volumina nach jeder Probenahme in den beiden Phasen eingegeben. Bei der Berechnung der Extraktions- und Rückextraktionsrate ist es mit zu berücksichtigen.

**Tab. 36:** Volumenverhältnisse der Feed- und Strip-Phasen

Extraktionszeit [min]	Volumen der Feed-Phase [mL]	Volumen der Strip-Phase [mL]	S/ F
5	32,0	25,0	0,7812
15	31,5	24,5	0,7656
30	31,0	24,0	0,7500
60	30,5	23,5	0,7343
120	30,0	23,0	0,7187
240	29,5	22,5	0,7031

F: Volumen der Feed-Phase am Ausgangspunkt (32 mL)

S: Volumen der Strip-Phase am Ausgangspunkt (25 mL)

### 7.4.4 Neutralisation

Feed- und Strip-Proben lagen, je nachdem wie Phasen eingestellt sind, im salzsauren oder alkalischen Medium vor. Die Proben, die in 0,1 mol/L HCl vorlagen, wurden mit 0,1 mol/L NaOH neutralisiert, ähnlicherweise wurden die in 0,1 mol/L NaOH vorliegende Proben mit 0,1 mol/L HCl neutralisiert. Die Neutralisation erfolgte in einem Eppendorf-Probengefäß. Es wurden 0,5 mL Volumina von der Probe entnommen und mit 0,5 mL 0,1 mol/L Salzsäure

oder Natronlauge in dem Eppendorf-Probengefäß mit dem Vortex-Mixer 1 min. lang gemischt.

#### **7.4.5 Carrier-freie Systeme**

Bei diesem Versuch wurden Decanol und Decan-Decanol-Mischung (8:2, v/v) als Membran eingesetzt. Decanol konnte direkt als Membran verwendet werden. Bei der zweiten Membran wurde zuerst 80 mL Decan mit 20 mL Decanol vermischt. Um einen direkten Kontakt der Strip-Phase mit der Feed-Phase zu vermeiden, wurde beim Einfüllen der Drei-Phasen zuerst die Strip-Phase 25 mL 0,1 mol/L HCl eingefüllt und über die Strip-Phase die Membran zugegeben. Zuletzt wurde die Feed-Phase (s. Kap. 7.4.1.3, Feed-Phase 1) hinzugegeben und die Extraktion unter kontinuierlichem Rühren (60 U/min) gestartet. Probenahmen erfolgten wie in Kap. 7.4.3. Die Neutralisation wurde nach dem Kap. 7.4.4 durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit der HPLC-UV-Methode vermessen.

##### **7.4.5.1 Optimierung der Zusammensetzung der Strip-Phase**

###### **7.4.5.1.1 Einfluss der HCl-Konzentration in der Strip-Phase**

Diese Versuchsreihe wurde, wie in Kap. 7.4.5 beschrieben, durchgeführt, allerdings nur mit Decanol als Membran. Die Feed-Phase enthielt 10 mg/L alle vier Arzneistoffe in bidest. Wasser. Drei unterschiedlich konzentrierte Salzsäure-Lösungen (1 mol/L, 0,1 mol/L und 0,01 mol/L) wurden als Strip-Phase getestet. Einfüllen der Drei-Phasen erfolgte wie in Kap. 7.4.5 beschrieben. Probenahmen erfolgten wie in Kap. 7.4.3. und die Proben wurden mit der HPLC-UV-Methode vermessen.

Die Neutralisation der Proben wurde analog dem Kap. 7.4.4 durchgeführt. Die Strip-Proben in 0,01 mol/l HCl wurden mit 0,01 mol/L NaOH und die Proben in 1 mol/l HCl mit 1 mol/L NaOH neutralisiert.

###### **7.4.5.1.2 NaCl-Lösung als Strip-Phase**

Diese Versuchsreihe wurde, wie in Kap. 7.4.5 beschrieben, durchgeführt, allerdings nur mit Decanol als Membran. Die Feed-Phase enthielt 10 mg/L alle vier Arzneistoffe in bidest. Wasser. Zwei unterschiedliche Lösungen (0,1 mol/L NaCl und, 0,1 mol/L HCl) wurden als Strip-Phase eingesetzt. Die Extraktionen wurden unter sonst gleichen Betriebsbedingungen, wie in Kap. 7.4.5, durchgeführt.

#### **7.4.5.1.3 Langzeitextraktion**

Dieser Versuch wurde analog Kap. 7.4.5 durchgeführt. Die Extraktionszeit wurde auf 12 Stunden verlängert, die Probenahme erfolgte in der Reihe bei 4, 6, 8, 10, 12 Stunden. Die Proben wurden mit der HPLC-UV-Methode vermessen.

#### **7.4.5.1.4 Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport**

Zwei Flüssigmembranversuche wurden unter den gleichen Extraktionsbedingungen, wie in Kap. 7.4.5 beschrieben, durchgeführt, wobei die Rührgeschwindigkeit des KPG-Rührers auf 100 U/min umgestellt wurde.

#### **7.4.5.1.5 Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen**

Eine Flüssigmembranextraktion mit Decanol wurde, wie in Kap. 7.4.5 beschrieben, durchgeführt, wobei statt der kleinere die größere Drei-Phasen-Rührzelle eingesetzt wurde. Die Zell-Dimensionen und die Volumenverhältnisse der Drei-Phasen sind in Tab. 34 und 36 aufgeführt.

### **7.4.6 Carrier-modifizierte Membransysteme**

#### **7.4.6.1 Basischer Carrier**

Triöctylamin in Decan-Decanol (8:2, v/v)-Mischung wurde hergestellt (s. Kap. 7.4.1.4) und als Membran-Phase eingesetzt. Zum Vergleich wurde der Versuch ohne Triöctylamin-Zusatz in der Membran, unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Feed-Phase enthielt alle 10 mg/L Arzneistoffe in bidest. Wasser (s. Kap. 7.3.1.3, Feed-Phase 1). Strip-Phase bestand aus 0,1 mol/L HCl.

#### **7.4.6.2 Saurer Carrier**

0,025 g/L Octansulfonsäure-Lösung in Dihexylether wurde hergestellt (s. Kap. 7.4.1.4) und als Membran-Phase eingesetzt. Zum Vergleich wurde der Versuch ohne Octansulfonsäure-Zusatz in der Membran, unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt.

#### **7.4.6.3 Metallchelate-Carrier**

0,1 g/L Kupfer(II)-2-ethylhexanoat-Lösung wurde in Decanol hergestellt (s. Kap. 7.4.1.4) und als Membran-Phase eingesetzt. Zum Vergleich wurde der Versuch auch ohne Kupfer(II)-2-ethylhexanoat-Zusatz in der Membran unter sonst gleichen Bedingungen (s. Kap. 7.4.5),

durchgeführt. Die Extraktionen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, weil die Kupfer-Verbindung lichtempfindlich war.

Um den Transport der Kupfer-Ionen zu verfolgen, wurde eine Blindextraktion durchgeführt und die Proben zusätzlich auch mit dem DCP-System vermessen.

### **Analyse mit der DCP**

#### ***Extraktion mit Arzneistoffen in der Feed-Phase:***

Feed: 10 mg/L SFM, CBZ, DCF und IBU in bidest. Wasser

Membran: 0,1 g/L Kupfer(II)-2-ethylhexanoat in Decanol

Strip: 0,1 mol/L HCl

#### ***Blindextraktion***

Feed: bidest. Wasser

Membran: 0,1 g/L Kupfer(II)-2-ethylhexanoat in Decanol

Strip: 0,1 mol/L HCl

#### ***Sättigung von bidest. Wasser/Decanol***

In einem 250 mL Scheidetrichter wurden 100 mL bidest. Wasser und 20 mL Decanol für 4 Stunden auf einer Schüttelmaschine äquilibriert.

#### ***Sättigung von 0,1 mol/L HCl /Decanol***

In einem 250 mL Scheidetrichter wurden 100 mL 0,1 mol/L HCl und 20 mL Decanol für 4 Stunden auf einer Schüttelmaschine äquilibriert.

In diesen beiden mit Decanol gesättigten wässrigen Phasen wurde 0,1 g/L Cu(II)EHEX gelöst und zur Kalibrierung des DCP-Plasmaemissionsspektrometers verwendet.

Anschließend wurden die Feed- und Strip-Proben aus den beiden Extraktionsversuchen auf den Cu(II)-Gehalt mit dem DCP analysiert.

## **7.4.7 Optimierung der Versuchsparameter**

### **7.4.7.1 Einfluss des pH-Gradienten**

0,025 g/L Octansulfonsäure-Lösung in Dihexylether wurde hergestellt (s. Kap. 7.4.1.4) und als Membran-Phase eingesetzt. Zum Vergleich wurden zwei Feed-Phasen hergestellt, einmal neutrale Lösung und eine saure Lösung (pH- Gradient). Strip-Phase war 0,1 mol/L NaOH. Mit diesen zwei unterschiedlichen Feed-Phasen wurden Extraktionsversuche unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt.

### 7.4.7.2 Optimierung der Zusammensetzung der Strip-Phase

#### 7.4.7.2.1 Einfluss der NaOH-Konzentration in der Strip-Phase

Diese Versuchsreihe erfolgte wie in Kap. 7.4.7.1 beschrieben. Die Feed-Phase enthielt 10 mg/L alle vier Arzneistoffe in 0,1 mol/L HCl. Drei unterschiedlich konzentrierte Natronlauge-Lösungen (1 mol/L, 0,1 mol/L und 0,01 mol/L) wurden als Strip-Phase eingesetzt. Die Strip-Proben in 0,01 mol/l HCl mit 0,01 mol/L NaOH und die Strip-Proben in 0,1 mol/l HCl mit 0,1 mol/L NaOH neutralisiert.

#### 7.4.7.2.2 NaCl-Lösung als Strip-Phase

Diese Versuchsreihe erfolgte wie in Kap. 7.4.7.1 beschrieben, wobei als Strip-Phase statt 0,1 mol/L NaOH, 0,1 mol/L NaCl eingesetzt wurde.

#### 7.4.7.3 Einfluss von Huminstoffen

Um den Effekt der Huminstoffe auf das Extraktionsverhalten der Arzneistoffe zu untersuchen, wurde angereicherte HUS-Standard Hohlsee 13 der wässrigen Feed-Phase zugesetzt. Huminstoff-Stammlösung, deren Konzentration 3,6 mg/mL betrug, wurde mit dem bidest. Wasser 200 fach verdünnt. 500 µL von dieser Lösung wurde einem 100 mL Kolben gegeben und jeweils 1 mL von jeder Arzneiwirkstoff-Stammlösung dazugegeben, anschließend wurde die Lösung auf 100 mL aufgefüllt. Die Endkonzentration der Huminstoffe in der Lösung betrug 18 mg/L.

Mit dieser Lösung wurden unter bereits erprobten, effektiven Membran-Bedingungen (s. Kap. 7.4.7.1) Versuche durchgeführt und die Ergebnisse mit einer Huminstoff-freien Feed-Phase verglichen. Durch den Huminstoff-Zusatz hatte die Feed Phase eine leicht-gelbliche Färbung angenommen. Diese blieb während der vierstündigen Extraktionszeit visuell unverändert, während sowohl Membran- als auch Strip-Phase keine Färbung annahmen. Dieser Eindruck wurde durch Photometrie bestätigt, wozu das UV-Vis-photometrische Verfahren nach DIN (C1 / C3-Bestimmung bei 254 und 434 nm) angewendet wurde.

#### **Photometrische Bestimmung der Huminstoffe**

Um zu Überprüfen, ob die Huminstoffe während der Flüssigmembranextraktion in die Membran-Phase extrahiert wurden, wurden zwei Blindversuche ohne Arzneistoff-Zusatz in der Feld-Phase durchgeführt. Die Drei-Phasen wurden wie im Folgenden vorbereitet:

##### **Blind 1**

Feed-Phase:            0,1 mol/L HCl.

Membrane Phase: 0,025g/L Octansulfonsäure in Dihexylether.

Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH.

### **Blind 2**

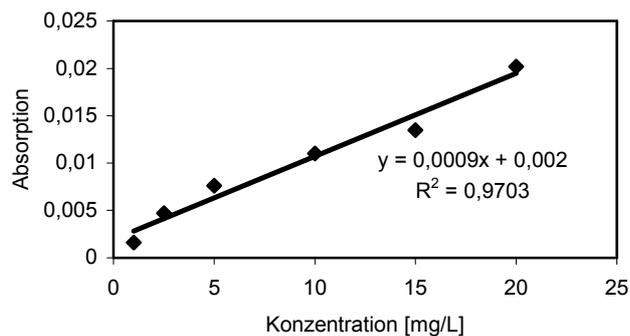
Feed Phase: 18 mg/L Huminstoffe in 0,1 mol/L HCl.

Membrane Phase: 0,025g/L Octansulfonsäure in Dihexylether.

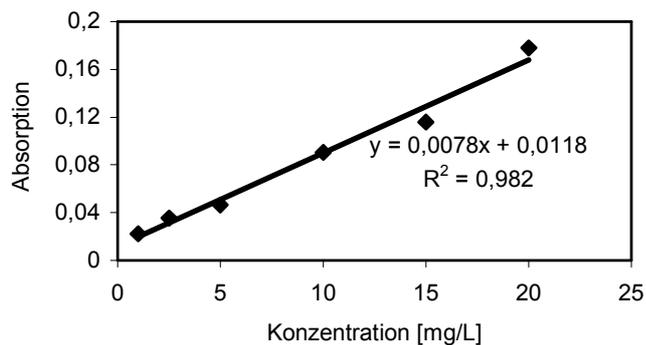
Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH.

Vor der Messung der Extraktionsproben wurden sechs Proben mit unterschiedlichen Huminstoff-Gehalten hergestellt. Mit dem UV-Spektrometer wurden nach dem DIN-Verfahren zur Farbe-Bestimmung bei 254 nm und 436 nm die Absorptionen gemessen und Kalibrierfunktionen erstellt. Anschließend wurde die Absorption der Membran-Phase von den beiden Blindextraktionen bei 254 und 438 nm gemessen und verglichen.

Huminstoff-Absorption bei 436 nm



Huminstoff-Absorption bei 254 nm



#### **7.4.7.3.1 Einfluss von Ca(II)EHX**

Calcium(II)-2-ethylhexanoat-Lösung in Decanol wurde hergestellt (s. Kap. 7.4.1.4) und als Membran-Phase eingesetzt. Die Extraktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie in Kap. 7.4.5 beschrieben.

#### **7.4.7.4 Langzeitextraktion**

Dieser Versuch wurde analog Kap. 7.4.7.1 durchgeführt. Die Extraktionszeit wurde auf 12 Stunden verlängert, die Probenahmen erfolgten in der Reihe bei 4, 6, 8, 10, 12 Stunden und die Proben wurden mit der HPLC-UV-Methode vermessen.

#### **7.4.7.5 Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf den Membran-Transport**

Dieser Versuch wurde analog Kap. 7.4.7.1 durchgeführt. Die Rührgeschwindigkeit des KPG-Rührers wurde auf 100 U/min umgestellt und die Extraktionen unter sonst gleichen Bedingungen mit der Drei-Phasen-Rührzelle durchgeführt.

#### **7.4.7.6 Einfluss der Zellgröße - Volumenverhältnisse der Drei-Phasen**

Dieser Versuch wurde analog Kap. 7.4.7.1 durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde statt der kleinere die größere Drei-Phasen-Rührzelle eingesetzt. Die Zell-Dimensionen und die Volumenverhältnisse der Drei-Phasen sind in Kap. 7.4.2 aufgeführt.

### **7.5 Untersuchungen mit trägergestützten Membranen**

#### **7.5.1 Octansulfonsäure in DHE als SL-Membran**

Als Flüssigmembran wurde 0,025 g/L Octansulfonsäure in Dihexylether eingesetzt. Die Herstellung der Membran erfolgte wie in Kap. 7.4.1.4 beschrieben. Für die Extraktion wurde das poröse Polypropylen-Material (Polypropylen Enka 2E-PP) mit der Flüssigmembran für 24 Stunden beladen und zwischen den beiden PTFE-Kammern befestigt. Für diese Extraktion wurde die in der Abb. 29 gezeichnete PTFE-Kammer (**Kammer 1**) verwendet. 150 mL Feed-Phase (10 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl) und 150 mL Strip-Phase (0,1 mol/L NaOH) wurden in den beiden Kammern gegeben und durch ein Magnetrührstäbchen gerührt. Die Extraktion dauerte vier Stunden und Probenahmen erfolgten bei 1, 2, 3 und 4 Stunden.

#### **7.5.2 Einfluss der Huminstoffe auf SLM-Extraktion**

Dieser Versuch wurde analog Kap. 7.4.7.3 mit der trägergestützten Membran-Kammer durchgeführt. Analysiert wurde nur die Strip-Phase mit der HPLC-UV-MS/MS-Methode.

### **7.5.3 Anreicherungsversuche mit SLM-Systemen**

#### **7.5.3.1 Kammer-Module**

Der Versuch wurde analog Kap. 7.5.1 durchgeführt. Zwei unterschiedliche Kammern wurden getestet. Bei der Kammer-2 (s. Abb. 31) betrug das Volumen der Feed-Phase 250 mL, das Volumen der Strip-Phase 30 mL und die Phasenkombinationen waren die gleichen wie in Kap. 7.5.1. Die Konzentrationen der Arzneiwirkstoffe in der Feed-Phase betragen 100 µg/L. Das Volumen der Strip-Phase war 30 mL. Die Probenahmen erfolgten bei 15, 30, 60, 120 und 240 min.

Bei der zweiten Anreicherungskammer (Kammer-3, s. Abb. 33) sind die Volumenverhältnisse der beiden Phasen wie im Folgenden eingesetzt: Feed: 500 mL, Strip: 1,6 mL. Während der Extraktion mit den beiden Anreicherungskammern wurde nur die Feed-Phase durch einen Magnetrührstäbchen gerührt. Es wurde nach 4 Stunden einmalige Probe entnommen, wie in Kap. 7.3.4 beschrieben, neutralisiert und anschließend mit der LC-UV-MS/MS-Methode vermessen.

#### **7.5.3.2 SL-PP-Beutel-Module**

Das Polypropylen-Material (Enka 2E-PP) wurde mit einem Folienverschweißgerät in Beuteln verschweißt. Anschließend wurden die entstandenen PP-Beuteln mit Methanol und bidest. Wasser gewaschen. Nach 4 Stunden Trocknen können die Beutel zur SLM-Extraktion eingesetzt werden. Die Drei-Phasen-Kombinationen waren wie in Kap. 7.5.1 beschrieben. Der PP-Beutel wurde für 24 Stunden in der Membran-Lösung eingetränkt und anschließend mit unterschiedlichen Strip-Volumen eingefüllt. Das Volumen der Feed-Phase war 400 mL und sie enthielt 10 µg/L je Arzneiwirkstoffe. Einer von den unterschiedlich großen Beuteln wurden mit 2 mL Strip-Phase eingefüllt und der andere mit 0,6 mL Strip-Phase. Die PP-Beuteln wurden in die getrennten Feed-Phasen eingetaucht und mit einem Deckel befestigt. Mit den beiden Beuteln wurden zwei getrennte Extraktionen unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach 4 Stunden Extraktion wurden die Strip-Phasen aus den Beuteln entnommen, mit der gleichen Volumina 0,1 mol/L NaOH neutralisiert und anschließend mit LC-PDA-MS/MS-Methode vermessen.

#### **7.5.3.3 Wiederholversuche mit dem gleichen PP-Beutel**

Der gleiche Vorgang wie in Kap. 7.5.3.2 wurde dreimal wiederholt. Nach jeder Extraktion wurde der PP-Beutel mit Methanol und bidest. Wasser gewaschen und in der Luft für 4 Stunden getrocknet.

## **7.6 Entwicklung einer Probenvorbereitungsmethode mit SL-Membranen**

### **7.6.1 Doppelkamm-Schichtpressmodule – Herstellung der PP-Module**

Die Herstellung der PP-Module wurde in Kap. 5.4.1 ausführlich beschrieben. Hierbei soll ein Bügeleisen mit hoher Leistung (hier 2200 Watt) verwendet werden.

### **7.6.2 Einfluss der Eintauchzeit**

Bei dieser Versuchsreihe werden insgesamt zwölf Extraktionen durchgeführt. Sechs von den PP-Beuteln wurden für zwei Stunden in der organischen Membran-Lösung (0,025 g/L Octansulfonsäure in Dihexylether) imprägniert, die anderen sechs für eine Stunde. Die Beuteln wurden anschließend mit der Strip-Phase befüllt (400 µL 0,1 mol/L HCl). Jede PP-Beutel wurde in ein 600 mL Becherglas eingetaucht, der 500 mL Feed-Phase enthielt (Konzentration: 1 µg/L je Arzneiwirkstoff) und an einem Arretierstab fixiert, der mit der Abdeckung für das Probeaufnahmegefäß verbunden ist. Es wurden zwei Extraktionsreihen durchgeführt, wobei die PP-Beuteln mit der gleichen Eintauchzeit durch einen Mehrfachrührgerät (370 U/min) gerührt wurden. Ein zugesetzter Magnetührstab in der Strip-Phase sorgte dafür, dass die PP-Beutel in die wässrige Phase eintauchen und nicht auf der Wasseroberfläche schwimmen. Nach 4 Stunden Extraktion wurden die Strip-Phasen aus den Beuteln entnommen, mit der gleichen Volumina 0,1 mol/L NaOH neutralisiert und anschließend mit LC-PDA-MS/MS-Methode vermessen.

### **7.6.3 Einfluss der Extraktionszeit**

Die in Kap. 7.6.2 beschriebene Membran-Zusammensetzung, Feed- und Strip-Phasen wurden für diese Versuchsreihen verwendet. Die PP-Beuteln wurden eine Stunde in der Membran konditioniert. Bei der ersten Versuchsreihe (sechs PP-Beutel, gleichzeitige Extraktion mit der Mehrfachrührgerät (370 U/min), s. Kap. 7.6.2) wurden die Extraktionen nach einer Stunde gestoppt und bei der zweiten Reihe erfolgte die Extraktion für vier Stunden. Die Strip-Phasen wurden entnommen und wie in Kap. 7.6.2 beschrieben neutralisiert und vermessen.

### **7.6.4 Einfluss der Strip-Volumina**

Die Extraktionen wurden analog Kap. 7.6.2 durchgeführt. Nach einer Stunde Eintauchzeit wurden die PP-Beuteln bei der ersten Extraktionsreihe mit 300 µL Strip-Phase, bei der zweiten mit der 400 µL Strip-Phase gefüllt und die Extraktionen wurden unter sonst gleichen

Bedingungen durchgeführt. Nach 4 Stunden Extraktion wurden Strip-Phase entnommen und wie in Kap. 7.6.2 beschrieben neutralisiert und vermessen.

## 7.7 Bestimmung der Arzneiwirkstoffe mit der LC-UV-MS/MS-Methode

### 7.7.1 Aufnahme der UV-Spektren und Ermittlung der Absorptionsmaxima

5 mg/L Arzneiwirkstoff-Lösung wurde an einer RP-8-Säule ec chromatographiert. Die Stoffe wurden mit dem UV-Detektor, der in **Kap. 7.2** beschrieben wurde, detektiert und UV-Spektren aufgenommen. Aus den Spektren wurden die Absorptionsmaxima ermittelt. Die Wirkstoffe wurden weiterhin über ihre Absorptionsmaxima detektiert und analysiert.

### 7.7.2 Ermittlung der mobilen Phase - Optimierung des Gradienten

Bei der Optimierung der mobilen Phase wurden unterschiedliche Gradienten erprobt, die in der Tabelle 17 aufgeführt worden sind (s. Kap. 5.5.2). Die Herstellung der mobilen Phasen erfolgte wie in Kap. 7.4.1.1 beschrieben. Eine 5 mg/L Arzneiwirkstoff-Lösung wurde an einer endcappeden RP-8-Säule unter diesen Gradienten-Bedingungen chromatographiert und die Trennung der Wirkstoffe wurden verglichen.

### 7.7.3 Auswahl der Trennsäule

Zur Optimierung der Trennung wurden in der Tab. 37 aufgeführten Säulen getestet. Eine 5 mg/L Arzneistoff-Lösung wurde an den unterschiedlichen Säulen-Materialien chromatographiert und die Trennung der Wirkstoffe wurde verglichen.

**Tab. 37:** Eigenschaften der eingesetzten Trennsäulen

Säule	Dimension	Material	Partikelgröße	Hersteller
LiChrospher 100 RP,18 ec	250 x 4,6	C18, endcapped	5 µm	Merck
Nucleosil C8 ec	125 x 2,0	C8, endcapped	5 µm	Macherey/ Nagel
LiChrosorb C18	250 x 4,6	C18	10 µm	Merck
Zorbax	150 x 2,0	Phenyl	5 µm	Phenomenex

### 7.7.4 Einfluss der Probenmatrix auf die Analyt-Stabilität und Chromatographie

Standardproben mit der Konzentration 5 mg/L je Arzneiwirkstoff wurden in drei unterschiedlichen Medien (in bidest. Wasser, in 0,1 mol/L HCl und in 0,1 mol/L NaOH) hergestellt und mit der HPLC-PDA-MS/MS-Methode vermessen.

### 7.7.5 Optimierung der massenspektrometrischen Detektion

#### Detektionsvergleich von zwei unterschiedlichen Detektionsmethoden

Zwei unterschiedliche Instrument-Methoden wurden erstellt, wobei die chromatographischen und Detektionsbedingungen bestimmt werden. Bei der ersten Methode wurde der chromatographische Verlauf in fünf Segmenten geteilt und in jedem Segment ein anderes Tune-File aktiviert (MSMS05). Die Segmenten und dazugehörige Tune-Files wurden im Folgenden aufgeführt:

**Segment 1:** 0-12,00 min: Acetat (-)

**Segment 2:** 12.00-16.50 min: SFM

**Segment 3:** 16.50-19.50 min: CBZ

**Segment 4:** 19.50-22.50 min: DCF

**Segment 5:** 22.50-35.00 min: IBU

Bei der zweiten Methode (MSMS07) wurde während der gesamten Chromatographiezeit ein Tune-File aktiviert. Dafür wurden fünf unterschiedliche Detektionsfenster, bzw. Scans eingestellt. Diese Scans ermöglichen, dass ein Ion mit bestimmter m/z selektiert und mit Kollisionsenergie fragmentiert wird. In der **Tabelle 38** sind die Einstellungen und Parameter der Tune-Files aufgeführt.

**Tabelle 38:** Tune-Bedingungen bei der Detektion mittels Massenspektrometer

	<b>SFM</b>	<b>CBZ</b>	<b>DCF</b>	<b>IBU</b>	<b>Acetat(-)</b>	<b>Acetat(+)</b>
<b>Capillary Temperature: [°C]</b>	250.00	250.00	250.00	250.00	280.00	280.00
<b>Sheat Gas Flow Rate: [arb]</b>	47.00	47.00	47.00	47.00	60.00	60.00
<b>Auxillary Gas Flow Rate: [arb]</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00
<b>Polarity</b>	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv
<b>Source Voltage (kV)</b>	5.00	5.00	4.50	4.50	4.50	5.00
<b>Source Current (uA)</b>	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
<b>Capillary Voltage (V)</b>	21.00	17.00	-4.00	-4.00	-14.00	44.00
<b>Tube Lens Offset (V)</b>	25.00	35.00	-5.00	-10.00	-20.00	50.00
<b>Multipole 1 Offset (V)</b>	-2.00	-2.50	1.25	5.25	1.25	-2.75
<b>Multipole 2 Offset: [V]</b>	-5.00	-5.50	7.00	9.00	6.50	-6.00
<b>InterMultip. Lens Voltage (V)</b>	-16.00	-16.00	14.00	14.00	14.00	-16.00

Zuletzt wurden Standardlösungen mit 5 mg/L je Arzneistoff hergestellt und mit zwei unterschiedlichen Detektionsmethoden vermessen. Anschließend wurden die Peakflächen und Signalhöhen in den Chromatogrammen verglichen.

## **7.8 Validierung des entwickelten LC-UV-MS/MS-Verfahrens**

### **7.8.1 Validierung des entwickelten HPLC-UV-Verfahrens**

#### **7.8.1.1 Wahl des Arbeitsbereiches- Ermittlung der Kalibrierfunktion**

Zur Bestimmung des linearen Bereiches wurden Arzneiwirkstoff-Standard-Lösungen der Konzentrationen 0,025 mg/L; 0,050 mg/L; 0,075 mg/L; 0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 0,75 mg/L; 1,00 mg/L; 1,25 mg/L; 1,50 mg/L; 2,00 mg/L; 2,50 mg/L; 3,00 mg/L und 5 mg/L in bidest. Wasser hergestellt und jeweils eine Zehnfach-Bestimmung durchgeführt. Nach Festlegung des Arbeitsbereiches für SFM, CBZ und DCF von 0,25 bis 5 mg/L und für IBU von 0,50 bis 5 mg/L wurden zur Ermittlung der Kalibrierfunktion zehn gleichmäßig über diesen Bereich verteilte Konzentrationen (0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 0,75 mg/L; 1,00 mg/L; 1,25 mg/L; 1,50 mg/L; 2,00 mg/L; 2,50 mg/L; 3,00 mg/L und 5 mg/L) jeweils zehnfach mit der HPLC-UV-Methode vermessen.

### **7.8.2 Validierung des entwickelten LC-MS/MS-Verfahrens**

#### **7.8.2.1 Wahl des Arbeitsbereiches und Kalibrierung**

Die gleichen Standardproben, wie in Kap. 7.8.1.1, wurden auch simultan mit einem Massenspektrometer detektiert. Die Ermittlung der Kalibrierfunktionen wurde analog dem Kap. 7.8.1.1 durchgeführt.

## **7.9 Anwendung der SLM-Beutelmodule - Analyse von Oberflächenwasser**

Zwei Liter Oberflächenwasserprobe wurde mit der konzentrierten Salzsäure (37 % (w/w)) auf pH 1 eingestellt. Danach wurde die Probe in zwei Aliquote geteilt. Ein Aliquot wurde jeweils mit 100 µL von jeder Arzneiwirkstoff-Stammlösung eindotiert, damit wurde die Konzentration der Arzneiwirkstoffe in der Wasserprobe um 100 ng/L erhöht. Die beiden Aliquoten wurden erneut in zwei Aliquoten (500 mL) geteilt und in 600 mL Becherglas eingefüllt. Die PP-Beuteln wurden für zwei Stunden mit der 0,25 g/L Octansulfonsäure in Dihexylether beladen und an den Deckeln der Bechergläser wie in Kap. 7.4.3.3 beschrieben befestigt. Die PP-Beuteln wurden mit der Strip-Phase gefüllt (300 µL 0,1 mol/L HCl). Ein zugesetzter Mikro-Magnetrührstab in der Strip-Phase sorgte dafür, dass die PP-Beutel in die wässrige Phase eintauchen und nicht auf der Wasseroberfläche schwimmen. Die Wasserproben wurden während der Extraktion mit einem PTFE-Magnetstab durch einen Mehrfachrührgerät (370 U/min) gerührt. Nach 4 Stunden Extraktion wurden die Strip-Phasen aus den Beuteln entnommen, mit der gleichen Volumina 0,1 mol/L NaOH neutralisiert und anschließend mit HPLC-PDA-MS/MS-Methode vermessen.

## 8 Literatur

- [1] Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC), *Arzneimittel in der Umwelt – Auswertung der Untersuchungsergebnisse*, Hrsg.: Umweltbehörde Hamburg, Juni **2003**.
- [2] *Rückstände von Arzneimittel in Wasserproben – Befunde und deren Bewertung aus Sicht der Trinkwasserversorgung*; Hrsg.: DWGV Bonn **1999**.
- [3] *Untersuchungen zu wasserwerks- und trinkwasserrelevanten Pharmaka als Grundlage für deren toxikologische Bewertung*, Abschlussbericht W 13/97 DVGW, Oktober **2000**.
- [4] B. Halling-Sorensen, S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützheft, S. E. Jorgensen, *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review*, Chemosphere, Vol. 36, No. 2, (**1998**) 357-393.
- [5] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz, *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*, Sci. Total Environ. Vol. 225, Issues 1-2 (**1999**) 109-118.
- [6] S. D. Richardson, *Water analysis: Emerging contaminants and current issues*, Anal. Chem. 75 (**2003**) 2831-2857.
- [7] M. L. Richardson, J. M. Bowron, *The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment*, J. Pharm. Pharmacol. 37 (**1985**) 1-12.
- [8] K. Kümmerer, *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospital in relation to other sources – a review*. Chemosphere 45 (**2001**) 957-969.
- [9] European Commission Directorate-General Health and Consumer Protection, Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE), *Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use*, expressed at the 24th CSTEE plenary meeting, Brussels, 12 June **2001**.
- [10] F. Sacher, E. Lochow, D. Bethmann, H.-J. Brauch, *Vorkommen von Arzneiwirkstoffen in Oberflächenwässern*, Vom Wasser 90 (**1998**) 233-243.
- [11] M. Stumpf, T. A. Ternes, K. Haberer, P. Seel, W. Baumann, *Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern*, Vom Wasser 86 (**1996**) 291-303.
- [12] T. Haberer, H.-J. Stan, *Vorkommen von polaren organischen Kontaminanten in Berliner Trinkwasser*, Vom Wasser 86 (**1996**) 19-31.
- [13] H.-J. Stan, T. Haberer, M. Linkerhänger, *Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System – Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser?*, Vom Wasser 83 (**1994**) 57-68.
- [14] S. Franke, S. Hildebrandt, J. Schwarzbauer, M. Link, W. Francke, *Organic compounds as contaminants of the Elbe River and its tributaries*, Fresenius J. Anal. Chem. 353 (**1995**) 39-49.
- [15] **Editorial**, *Drugs in the environment*, Chemosphere 40 (**2000**) 691-699.
- [16] U. Jux, R. M. Baginski, H.-G. Arnold, M. Krönke, P. N. Seng, *Detection of pharmaceutical contaminants of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings*, Int. J. Hyg. Environ. Health 205 (**2002**) 393-398.
- [17] H.-R. Buser, T. Poiger, M. D. Müller, *Occurrence and environmental behaviour of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater*, Environ. Sci. Technol. 33 (**1999**) 2529-2535.
- [18] H.-R. Buser, T. Poiger, M. D. Müller, *Occurrence and fate of the pharmaceutical drug Diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake*, Environ. Sci. Technol. 32 (**1998**) 3449-3456.
- [19] D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber, H. T. Buxton, *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance*, Environ. Sci. Technol. 36 (**2002**) 1202-1211.
- [20] C. G. Daughton, T. A. Ternes, *Pharmaceuticals and PPCPs in the environment: agents of subtle change?*, Environ. Health Perspect. 107 (**1999**) 907-938.
- [21] I. H. Rogers, I. K. Birtwell, G. M. Kruzynski, *Organic extractables in municipal wastewater Vancouver*, British Columbia, Water Poll. Res. J. Canada Vol. 21, No. 2 (**1986**) 187-204.
- [22] T. Poiger, H.-R. Buser, M. D. Müller, *Occurrence and fate of selected anti-inflammatory agent in surface waters*, Endocrine Disruptors and Pharmaceutical Active Compounds in Drinking Water Workshop, April 19-21, **2000**.
- [23] A. A. M. Stolker, W. Niesing, E. A. Hogendoorn, J. F. M. Versteegh, R. Fuchs, U. A. Th. Brinkman, *Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water*, Anal. Bioanal. Chem. 378 (**2004**) 955-963.

- [24] C. Zwiener, F. H. Frimmel, *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review, Part I*, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 851-861.
- [25] C. Zwiener, F. H. Frimmel, *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review, Part II*, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 862-874.
- [26] T. Heberer, U. Dünnebier, C. Reilich, H.-J. Stan, *Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant*, Fresenius Environ. Bull. 6 (1997) 438-443.
- [27] T. Heberer, H.-J. Stan, *Polare Umweltkontaminanten im aquatischen System*, GIT Fachz. Lab. 8 (1995) 718-720.
- [28] T. A. Ternes, M. Stumpf, B. Schuppert, K. Haberer, *Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water*, Vom Wasser 90 (1998) 295-309.
- [29] S. Öllers, H. P. Singer, P. Fässler, S. R. Müller, *Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/L level in surface and waste water*, J. Chromatogr. A 911 (2001) 225-234.
- [30] E. Möhle, S. Horvarth, W. Merz, J. W. Metzger, *Bestimmung von schwer abbaubaren organischen Verbindungen im Abwasser-Identifizierung von Arzneimittelrückständen*, Vom Wasser 92 (1999) 107-223.
- [31] M. Meisenheimer, T. A. Ternes, *Verfahren zur Bestimmung der Antiepileptika Carbamazepin und Primidon in Wasser mittels GC/MS nach Derivatisierung*, Vom Wasser, 94 (2000) 203-212.
- [32] F. Werres, J. Stien, P. Balsaa, A. Schneider, P. Winterhalter, H. Overath, *Automatisierte Bestimmung polarer Arzneimittelrückstände in Wässern mittels Festphasenmicroextraktion (SPME) und Derivatisierung*, Vom Wasser 94 (2000) 135-147.
- [33] M. Stumpf, T. A. Ternes, K. Haberer, W. Baumann, *Isolierung von Ibuprofen-Metaboliten und deren Bedeutung als Kontaminanten der aquatischen Umwelt*, Vom Wasser 91 (1998) 291-303.
- [34] N. Breidenich, *Bestimmung von sauren und neutralen Arzneiwirkstoffen in Wasserproben*, Manuscript Umweltanalytiktag NRW vom 19. bis 21.06.2000.
- [35] H. M. Kuch, K. Ballschmiter, *Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level*, Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 392-395.
- [36] M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo, *Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters*, Fresenius J. Anal. Chem. 371 (2001) 437-447.
- [37] U. Brückner-Nieder, F. H. Frimmel, J. Hüttig, K. Kümmerer, *Verhalten von Arzneimitteln in der Wasseraufbereitung: Untersuchungen zur Elimination von Fluorchinolonen und platinhaltigen Zytostatika*, Vom Wasser 100 (2003) 155-168.
- [38] D. L. Sedlak, J. L. Gray, K. E. Pinkston, *Understanding Microcontaminants in recycled water*, Environ. Sci. Technol. Vol. 34, Issue 23 (2000) 508-515.
- [39] D. L. Sedlak, *Challenges associated with quantitation of trace concentrations of pharmaceuticals in a complex matrix*, Endocrine Disruptors and Pharmaceutical Active Compounds in Drinking Water Workshop, April 19-21, 2000. SLM-Membrane - Probenvorbereitung
- [40] J.A. Jönsson, L. Mathiasson, L. Mathiasson, *Membrane-based techniques for sample enrichment*, J. Chromatogr. A 902 (2000) 205-225.
- [41] J.A. Jönsson and L. Mathiasson, *Membrane Extraction Techniques for Sample Preparation*, Advantages in Chromatography New York 41 (2001) 53-92.
- [42] J.A. Jönsson and L. Mathiasson, *Membrane extraction in analytical chemistry*, Anal. Chem. 24 (2001) 495-507.
- [43] J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Membrane extraction for sample preparation*, LC.GC Europe, October 2003, 683-690.
- [44] J. Pawlyszyn, *Sampling and sample preparation for field and laboratory*, Elsevier-Verlag, Amsterdam (2002).
- [45] J. Namiesnik, T. Gorecki, *Passive Sampling in Environmental Analysis*, LC.GC Europe September 2000, 678-683.
- [46] R. Andreatti, R. Marotta, G. Pinto, A. Pollio, *Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity*, Water Res. 36 (2002) 2869-2877.
- [47] T. A. Ternes, M. Meisenheimer, D. McDowell, F. Sacher, H.-J. Brauch, B. Haist-Gulde, G. Preuss, U. Wilme, N. Zulei-Seibert, *Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment*, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 3855-3863.
- [48] Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 256. Auflage, bearb. Von C. Zink, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1990.

- [49] C. Zwiener, F. H. Frimmel, *Short-time tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibrac acid, ibuprofen, and diclofenac*, *Sci. Total Environ.* 309 (2003) 201-211.
- [50] C. Zwiener, F. H. Frimmel, *Oxidative treatment of pharmaceuticals in water*, *Wat. Res.* Vol. 34, No. 6 (2000), 1881-1885.
- [51] M. M. Huber, S. Canonica, G.-Y. Park, U. von Gunten, *Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes*, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1016-1024.
- [52] T. Poiger, H.-R. Buser, M. D. Müller, *Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modelling*, *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 20, No. 2 (2001) 256-263.
- [53] C. Zwiener, S. Seeger, T. Glauner, F. H. Frimmel, *Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments*, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 569-575.
- [54] Ebel, S. (Hrsg.), *Lexikon der Pharmazie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1987.
- [55] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag, *Investigation on the fate of antibiotics used in pig farming in food chain and environment (Part I)*, *Fresenius Environ. Bull.* Februar, 2004 (in press).
- [56] L. A. Saris, G. J. F. Brekelmans, G. J. Van der Linden, R. V. Rademaker, P. M. Edelbroek, *High-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and metabolites in human hair*, *J. Chromatogr. B*, 691 (1997) 409-415.
- [57] X.-S. Miao, C. D. Metcalfe, *Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*, *Anal. Chem.* 29, April (2003).
- [58] J. Martens, P. Banditt, *Validation of the analysis of carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite by high-performance liquid chromatography from plasma: comparison with gas chromatography and the enzyme-multiplied immunoassay technique*, *J. Chromatogr.* 620 (1993) 169-173.
- [59] R. Shimoyama, T. Ohkubo, K. Sugawara, *Monitoring of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in breast milk and plasma by high-performance liquid chromatography*, *Ann. Clin. Biochem.* 37 (2000) 210-215.
- [60] M. Pieniak, M. Kowalczyk, *Determination by SPE-HPLC of ionized and non-ionized fractions of free carbamazepine and its metabolites carbamazepine-10,11-epoxide and 10,11-trans-dihydroxycarbamazepine*, *Acta Chromatogr.* No. 8 (1998) 108-112.
- [61] R. D. Chelberg, S. Gunawan, D. M. Treiman, *Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and its principal metabolites in human plasma and urine*, *Therapeutic Drug Monitoring* 10 (1988) 188-193.
- [62] L. A. Romanyshyn, J. K. Wichmann, N. Kucharczyk, R. C. Shumaker, D. Ward, R. D. Sofia, *Simultaneous determination of felbamate, primidone, phenobarbital, carbamazepine, two carbamazepine metabolites, phenytoin, and one phenytoin metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography*, *Therapeutic Drug Monitoring* 16 (1994) 90-99.
- [63] D. Chollet, E. Castella, P. Combe, V. Arnera, *High-speed liquid chromatographic method for the monitoring of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine-10,11-epoxide, in human plasma*, *J. Chromatogr. B* 683 (1996) 237-243.
- [64] P. Pienimäki, S. Fuchs, J. Isojärvi, K. Vähäkangas, *Improved detection and determination of carbamazepine and oxycarbamazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. B* 673 (1995) 97-105.
- [65] R. B. Miller, M. Vrandeć, *A validated HPLC method for the determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma*, *J. Liq. Chromatogr.* 16(6) (1993) 1249-1261.
- [66] R. D. Scheyer, M. J. Doring, J. A. Cramer, B. R. Toftness, J. M. Hochholzer, R. H. Mattson, *Simultaneous HPLC analysis of carbamazepine and carbamazepine epoxide in human brain microdialysate*, *J. Liq. Chromatogr.* 17(7) (1994) 1567-1576.
- [67] P. L. Morselli, A. Frigerio, *Metabolism and pharmacokinetics of carbamazepine*, *Drug Met. Rev.* 4(1) (1975) 97-113.
- [68] G. Schmitz, H. Lepper, C.-J. Estler, *High-performance liquid chromatographic method for the routine determination of diclofenac and its hydroxy and methoxy metabolites from in vitro systems*, *J. Chromatogr.* 620 (1993) 158-163.
- [69] O. Corcoran, J. K. Nicholson, E. M. Lenz, F. Abou-Shakra, J. Castro-Perez, A.B. Sage, I. D. Wilson, *Directly coupled liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry for the identification of drug metabolites in urine: application to diclofenac using chlorine and sulfur detection*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 2377-2384.

- [70] E. Clayton, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *The Application of HPLC, coupled to NMR spectroscopy and mass spectrometry (HPLC-NMR-MS), to the characterisation of ibuprofen metabolites from human urine*, *Chromatographia* Vol. 47, No.5/6 (1998) 264-270.
- [71] T. W. Hermann, E. Flig, *Determination of ibuprofen and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography*, *Chem. Anal.* 40 (1995) 543-548.
- [72] J. Hardt, *Ibuprofen interference in the determination of 3-phenoxybenzoic acid in urine*, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 787-790.
- [73] T. B. Vree, A. J. A. M. van der Ven, P. Koopmans, E. W. J. van Ewijk-Beneken Kolmer, C. P. W. G. M. Verwey van Wissen, *Pharmacokinetics of sulfamethoxazole with its hydroxy-metabolites and N4-acetyl-, N1-glucuronide conjugates in healthy human volunteers*, *Clin. Drug Invest.* 9(1) (1995) 44-53.
- [74] T. Okamura, S. Hirano, W. Sugitara, T. Sakai, *Simultaneous determination of sulfamethoxazole and its metabolite N4-acetyl-sulfamethoxazole in human urine using solid-phase extraction technique*, *Chemistry Express* Vol.7, No.5 (1992) 373-376.
- [75] M. Cleuvers, *Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel*, *Umweltchem. Ökotox.* 14(2) (2002) 85-89.
- [76] M. la Farre, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barcelo, *Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with vibrio fishery*, *J. Chromatogr. A* 978 (2001) 187-197.
- [77] M. Cleuvers, *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*, *Toxicology Letters* Vol. 142, Issue 3 (2003) 185-194.
- [78] B. Ferrari, N. Paxeus, R. L. Giudice, A. Pollio, J. Garric, *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55 (2003) 359-370.
- [79] W.B. Saunders Co., *Medical Dictionary*, 27. Edition, Dorland's Illustrated, Philadelphia, 1988.
- [80] G. P. Neill, N. W. Davies, S. McLean, *Automated screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry for identification of drugs after their extraction from biological samples*, *J. Chromatogr.* 565 (1991) 207-224.
- [81] I. M. Kapetanovic, *Analysis of antiepileptic drugs*, *J. Chromatogr.* 531 (1990) 421-457.
- [82] G. Berner, R. Staab, H. H. Wagener, *Determination of ibuprofen in plasma, synovial fluid and tissue by HPLC and electrochemical detection in the lower ng-range*, *J. Anal. Chem.* 336 (1990) 238.
- [83] F. K. Glowka, *HPLC methodology for determination of ibuprofen enantiomers to be used in pharmacokinetic*, *Chem. Anal.* 43 (1998) 79-84.
- [84] W. Naidong, J. W. Lee, *Development and validation of a liquid chromatographic method for the quantitation of ibuprofen enantiomers in human plasma*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* Vol. 12, No. 4 (1994) 551-556.
- [85] S. H. Kang, S.-Y. Chang, K. -C. Do, S.-C. Chi, D. S. Chung, *High-performance liquid chromatography with a column-switching system and capillary electrophoresis for the determination of ibuprofen in plasma*, *J. Chromatogr. B*, 712 (1998) 153-160.
- [86] Y. Y. Lau, *Determination of ibuprofen enantiomers in human plasma by derivatization and high performance liquid chromatography with fluorescence detection*, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19(13) (1996) 2143-2153.
- [87] R. Canaparo, E. Muntoni, G. P. Zara, C. D. Pepa, E. Berno, M. Costa, M. Eandi, *Determination of ibuprofen in human plasma by high performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study*, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 219-226.
- [88] A. Bakkali, E. Corta, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vincente, *Study of the solid-phase extraction of diclofenac-sodium and phenylbutazone for their analysis in human urine by liquid chromatography*, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 139-145.
- [89] J. Zhu, D. D. Snow, D. A. Cassada, S. J. Monson, R. F. Spalding, *Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, Vol. 928, Issue 2 (2001) 177-186.
- [90] T. Christian, R. J. Schneider, H. A. Färber, D. Skultarek, M. T. Meyer, H. R. Goldbach, *Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters*, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31/1 (2003) 36-44.
- [91] C. Hartig, T. Strom, M. Jekel, *Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 84 (1999) 163-173.

- [92] R. Hirsch, T. A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.-L. Kratz, *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 815 (1998) 213-223.
- [93] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 910 (2001) 69-78.
- [94] X.-S. Miao, B. G. König, C. D. Metcalfe, *Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 952 (2002) 139-147.
- [95] M. E. Lindsey, M. Meyer, E. M. Thurman, *Analysis of trace levels of sulphonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*, Anal. Chem. 73 (2001) 4640-4646.
- [96] D. Loudon, A. Handley, S. Taylor, E. Lenz, S. Miller, I. D. Wilson, A. Sage, *Flow injection spectroscopic analysis of model drugs using on-line UV-diode array, FT-infrared and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy and time-of-flight mass spectrometry*, Analyst 125 (2000) 927-931
- [97] S. S. Zarapkar, U. P. Halkar, N. P. Bhandari, *Reverse phase high performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, paracetamol and methocarbamol in tablets*, Indian Drugs 36(11) (1999) 710-713.
- [98] M. E. Abdel-Hamid, L. Novontny, H. Hamza, *Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS*, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 587-594.
- [99] M. E. Abdel-Hamid, *Comparative LC-MS and HPLC analysis of selected antiepileptics and beta-blocking drugs*, Farmako II 55 (2000) 136-145.
- [100] J. E. Renew, C.-H. Huang, *Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulphonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid-chromatography-electrospray mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, on-line publiziert (2004) 113-121.
- [101] F. Mandel, *LC/MS/MS-Kopplung*, LABO Trend 2001, 40-46.
- [102] T. Reemtsma, A. Kornmüller, *Anwendung der LC-MS in der Wasseranalytik*, Schriftenreihe: Biologische Abwasserreinigung, Kolloquium an der TU Berlin, 7.-8. Juni 1999, TU Berlin Publikationen, Berlin 1999.
- [103] T. Reemtsma, T. Knepper, *Das Potential der HPLC-MS in der Wasseranalytik*, Nach. Chem. Tech. Lab. 47 No. 10 (1999) 1250-1252.
- [104] M. Thurman, I. Ferrer, D. Barcelo, *Choosing between atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides*, Anal. Chem. 73 (22) (2001) 5441-5449.
- [105] C. Zwiener, F. H. Frimmel, *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review, part I: instrumentation and general aspects of analysis and detection*, Anal. Bioanal. Chem. 29. November 2003.
- [106] C. Zwiener, F. H. Frimmel, *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review, part II: applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids*, Bioanal. Anal. Chem. 13 Dezember 2003.
- [107] G. M. Kienhuis, R. B. Geerdink, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation, I: ionisation*, Trends Anal. Chem. Vol. 19, No. 4 (2000) 249-259.
- [108] G.M. Kienhuis, R. B. Geerdink, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation, II: applications*, Trends Anal. Chem. Vol. 19, No. 7 (2000) 460-474.
- [109] W. M. A. Niessen, *Advances in instrumentation in liquid-chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques*, J. Chromatogr. A 794 (1998) 407-435.
- [110] B. Hauser, P. Popp, *Abwasseranalytik leicht gemacht*, Gerstel Aktuell 29, Messe-Spezial, August 2002, 4-7.
- [111] S. Schlosser, E. Sabolova, R. Kertesz, L. Kubisova, *Factors influencing transport through liquid membranes and membrane based solvent extraction*, J. Sep. Sci 24 (2001) 509-518.
- [112] Y. Shen, L. Grönberg, J. A. Jönsson, *Experimental studies on the enrichment of carboxylic acids with tri-n-octylphosphine oxide as extractant in a supported liquid membrane*, Anal. Chim. Acta 292 (1994) 31-39.
- [113] J. Norberg, D. Tiruye, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *Supported liquid membrane extraction of urinary trans, trans-muconic acid, a biomarker for benzene exposure*, J. Sep. Sci. 25 (2002) 351-355.

- [114] J. A. Jönsson, L. Mathiasson, *Supported liquid membrane techniques for sample preparation and enrichment in environmental and biological analysis*, Trends in Analytical Chemistry Vol. 11, No. 3 (1992) 106-114.
- [115] A. Kot, B. Zabiegala, J. Namiesnik, *Passive sampling for long-term monitoring of organic pollutants in water*, Trends in Analytical Chemistry Vol.19, No.9 (2000) 446-459.
- [116] L. Mathiasson, M. Knutsson, G. Bremle, L. Martensson, *Chemical environment in animal buildings*, Swedish J. Agric. Res. 21 (1991) 147-155.
- [117] L. Chimuka, N. Magersa, J. Norberg, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *Incomplete trapping in supported liquid membrane extraction with a stagnant acceptor for weak bases*, Anal. Chem. 70 (1998) 3906-3911.
- [118] B. Lindegard, H. Björk, J. A. Jönsson, L. Mathiasson, A.-M. Olsson, *Automated column liquid chromatographic determination of a basic drug in blood plasma using the supported liquid membrane technique for sample pretreatment*, Anal. Chem. 66 (1994) 4490-4497.
- [119] J. Trocewicz, *Urine sample preparation of tricyclic antidepressant by means of a supported liquid membrane technique for high-performance liquid chromatographic analysis*, J. Chromatogr. B 801 (2004) 213-220.
- [120] S. Palmarsdottir, B. Lindegard, P. Deininger, L.-E. Edholm, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *Supported liquid membrane technique for selective sample workup of basic drugs in plasma prior to capillary zone electrophoresis*, J. Cap. Elec. 002: 4 (1995) 185-189.
- [121] S. Palmarsdottir, E. Thordarson, L.-E. Edholm, J. A. Jönsson, L. Mathiasson, *Miniaturized supported liquid membrane device for selective on-line enrichment of basic drugs in plasma combined with capillary zone electrophoresis*, Anal. Chem. 69 (1997) 1732-1737.
- [122] M. C. Wijers, M. Wessling, H. Strathmann, *Limitations of the lifetime stabilization of supported liquid membrane by polyamides layers*, Separation and Purification Technology 17 (1999) 147-157.
- [123] M. Teramoto, Y. Sakaida, S. Sheng Fu, N. Ohniskhi, H. Matsuyama, T. Maki, T. Fukui, K. Arai, *An attempt for the stabilization of supported liquid membrane*, 21 (2000) 137-144
- [124] W.S. Winston Ho, B. Wang, T.E. Neumuller, J. Roller, *Supported liquid membranes for removal and recovery of metals from Waste waters and Process Streams*, Environmental Progress 20 (2) (2001) 117-121.
- [125] F. Valenzuela, M.A. Vega, M.F. Yanez, C. Basualto, *Application of a mathematical model for copper permeation from a Chilean mine water through a hollow fiber-type supported liquid membrane*, J. Membr. Sci. 204 (2002) 385-400.
- [126] C. Mendiguchia, C. Moreno, M. Garcia-Vargas, *Separation of heavy metals in seawater by liquid membranes: preconcentration of copper*, Sep. Sci. Technol. 37 (10) (2002), 2337.
- [127] S. Sriram, V.K. Manchanda, *Transported of metal ions across a supported liquid membrane (SLM) using dimethyldibutyl-tetradecyl-1,3-malonamide (DMDBTDMA) as the carrier*, Solv. Ext. Ion. Exch. 20 (1) (2002) 97-114.
- [128] L. Chimuka, R. Majors, *Speciation studies of metal ions in environmental and biological media*, LC·GC Europe, 17(7) (2004) 396-401.
- [129] T. Trtic-Petrovic, J. A. Jönsson, *Application of SLM extraction for investigation of metal-humic acid bindings*, Desalination 148 (2002) 247-251.
- [130] K. Ndung, N.-K. Djane, F. Malcus, L. Mathiasson, *Ultrasonic extraction of hexavalent chromium in solid samples followed by automated analysis using a combination of supported liquid membrane extraction and UV detection in a flow system*, Analyst 124 (1999) 1367-1372.
- [131] F. Malcus, N.-K. Djane, L. Mathiasson, G. Johansson, *Automated trace enrichment and determination of metals using a combination of supported liquid membrane for sample pretreatment and graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination*, Anal. Chim. Acta 327 (1996) 295-300.
- [132] M. Teramoto, N. Ohnishi, H. Matsuyama, *Effect of recycling of feed solution on the efficiency of supported liquid membrane module*, Sep. Sci. Tech. 29(13) (1994) 1749-1755.
- [133] P. Dzygiel, P. Wieczorek, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Enrichment of amino acids by supported liquid membrane extraction using aliquat 336 as a carrier*, Analytical Letters 31(7) (1998) 1261-1274.
- [134] R. Molinari, L. De Bartolo, E. Drioli, *Coupled transport of amino acids through a supported liquid membrane*, J. Membrane. Sci. 73 (1992), 203-215.
- [135] L. Mutihac, H.-J. Buschmann, R. Mutihac, *Relationship between extraction properties and transport through liquid membrane of amino acids by calixarene derivatives*, Indian Journal of Chemistry Vol. 42 A (2003) 2978-2981.
- [136] P. Dzygiel, P. Wieczorek, J.A. Jönsson, M. Milewska, P. Kafarski, *Separation of amino acid enantiomers using supported liquid membrane extraction with chiral phosphates and phosphonates*, Tetrahedron 55 (1999) 9923-9932.

- [137] M. M. Hossain, G. Fenton, *Extraction equilibria of amino acids and dipeptides in various organic solutions*, J. Chem. Eng. Data 44 (1999) 1279-1285.
- [138] M. M. Hossain, *Extraction of amino sugars, amino acids and dipeptides by liquid membrane technology*, Food Australia 54 (10) (2002) 463-466.
- [139] M. M. Hossain, R. A. Stanley, *Selective transport of a peptide from its mixture with an amino acid using a supported liquid membrane process*, Sep. Sci. Tech. 30 (20) (1995) 3801-3819.
- [140] A. Drapala, P. Wieczorek, *Extraction of short peptides using supported liquid membranes*, Desalination 148 (2002) 235-239.
- [141] R. Ghosh, *Bioseparation using supported liquid membrane chromatography*, J. Membr. Sci. 192 (2001) 243-247.
- [142] A. Drapala, P. Dzygiel, J.A. Jönsson, P. Wieczorek, *Supported liquid membrane extraction of peptides*, Acta Biochimika Polonica 48 (4) (2001), 1113-1116.
- [143] M. Di Liccio, B.D. Smith, T. Kida, T. L. M: Alves, C.P: Borges, *Evaluation of flat sheer and hollow fiber supported liquid membranes for fructose pertraction from a mixture of sugars*, Desalination 148 (2002) 213-220.
- [144] S. J. Gardiner, B. D. Smith, P.J. Duggan, M.J. Karpa, G.J. Griffin, *Selective fructose transport supported liquid membranes containing diboronic acid or conjugated monoboronic acid quaternary ammonium carriers*, Tetrahedron 55 (1999) 2857-2864.
- [145] Khrolenko, P. Dzygiel, P. Wieczorek, *Combination of supported liquid membrane and solid-phase extraction for sample pre-treatment of triazine herbicides in juice prior to capillary electrophoresis determination*, J. Chromatogr. A 976 (2002) 219-227.
- [146] J. Chao, J.-F. Liu, M.-J. Wen, J.-M. Liu, Y.-Q. Cai, G.-B. Jiang, *Determination of sulfonyleurea herbicides by continuous flow liquid membrane extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 955 (2002), 183-189.
- [147] C. Rios, V. Salvado, M. Hidalgo, *Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid membrane*, J. Memb. Sci. 203 (2002) 201-208.
- [148] P. Dzygiel, P. Wieczorek, *Extraction of glyphosate by a supported liquid membrane technique*, J. Chromatogr. A 889 (2000) 93-98.
- [149] P. Dzygiel, P. Wieczorek, *Supported liquid membrane extraction of glyphosate metabolites*, J. Sep. Sci. 24 (2001) 561-566.
- [150] Rak, P. Dzygiel, P. Wieczorek, *Supported liquid membrane extraction of aromatic aminophosphonates*, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 227-236.
- [151] M. Sandahl, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Determination of thiophanate-methyl and its metabolites at trace level in spiked natural water using the supported liquid membrane extraction and the microporous membrane liquid-liquid extraction techniques combined on-line with high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. 893 (2000) 123-131.
- [152] J.-F. Liu, J.-B. Chao, G.-B. Jiang, *Continuous flow liquid membrane extraction: a novel automatic trace-enrichment technique based on continuous flow liquid-liquid extraction combined with supported liquid membrane*, Anal. Chim. Acta 455 (2002) 93-101.
- [153] M. Sandahl, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *On-line automated sample preparation for liquid chromatography using parallel supported liquid membrane extraction and microporous membrane liquid-liquid extraction*, J. Chromatogr. A 975 (2002) 211-217.
- [154] N. Magersa, J. A. Jönsson, *Trace enrichment and sample preparation of alkylthio-s-triazine herbicides in environmental waters using a supported liquid membrane technique in combination with high-performance liquid chromatography*, Analyst Vol. 123 (1998) 225-231.
- [155] L. Chimuka, M.M. Nindi, J.A. Jönsson, *supported liquid membrane enrichment studies of natural water sample applied to liquid chromatographic determination of triazine herbicides*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 69(4) (1997) 429-445.
- [156] J. Trocewicz, *Determination of herbicides in surface water by means of a supported liquid membrane technique and high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. 725 (1996) 121-127.
- [157] N. Magersa, T. Solomon, J. A. Jönsson, *Supported liquid membrane extraction for sample work-up and preconcentration of methoxy-s-triazine herbicides in a flow system*, J. Chromatogr. A 830 (1999) 203-210.
- [158] G. Nilve, M. Knutsson, J. A. Jönsson, *Liquid chromatographic determination of sulfonyleurea herbicides in natural waters after automated sample pre-treatment using supported liquid membranes*, J. Chromatogr A, 688 (1994) 75-82.
- [159] R. C. Martinez, E. R. Gonzalo, E. He. Fernandez, J. H. Mendez, *Membrane extraction-preconcentration cell coupled on-line to flow-injection and liquid chromatographic systems-Determination of triazines in oils*, Anal. Chim. Acta 304 (1995) 323-332.

- [160] V. Jung, L. Chimuka, J.A. Jönsson, N. Niedack, P. Bowens, B. Alsanius, *Supported liquid membrane extraction of phenolic compounds in the nutrient solution of closed hydroponic growing systems for tomato*, *Anal. Chim. Acta* 474 (2002) 49-57.
- [161] J. Norberg, J. Emneus, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, E. Burestedt, M. Knutsson, G. Marko-Varga, *On-line supported liquid membrane-liquid chromatography with a phenol oxidase-based biosensor as a selective detection unit for the determination of phenols in blood plasma*, *J. Chromatogr. B* 701 (1997) 39-46.
- [162] S. Wook Park, K.W. Kim, I. J. Sohn, C. F. Kaseger, *Facilitated transport of sodium phenolate through supported liquid membrane*, *Elsevier Science* 19 (2000) 43-54.
- [163] P. Harriott, S.V. Ho, *Mass transfer analysis of extraction with a supported polymeric liquid membrane*, *J. Memb. Sci.* 135 (1997) 55-63.
- [164] M. Knutsson, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *Supported liquid membrane work-up in combination with liquid chromatography and electrochemical detection for the determination of chlorinated phenols in natural water samples*, *Cromatographia* Vol. 42 No. 3/4 (1996) 165-170.
- [165] Q. T. H. Le, D. S. Ehler, T. M. McCleskey, R. C. dye, D. R. Pesiri, G. D. Jarvinen, N. N. Sauer, *Ultra-thin gates for the transport of phenol from supported liquid membranes to permanent surface modified membranes*, *J. Membr. Sci.* 205 (2002) 213-222.
- [166] R. Romero, J.A. Jönsson, D. Gazquez, M G. Bagur, M. Sanches-Vinsa, *Multivariate optimization of supported liquid membrane extraction of biogenic amine from wine samples prior to liquid chromatography determination as dabsyl derivatives*, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 584-592.
- [167] G.O. Yahaya, *Kinetic studies on organic acid extraction by a supported liquid membrane using functionalized polyorganosiloxanes as mobile and fixed-site carriers*, 36(16) (2001) 3563-3584.
- [168] J. Trocewicz, *Sample preparation of amphetamine and methamphetamine by means of supported liquid membrane technique for high-performance liquid chromatography analysis*, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 587-592.
- [169] J. Norberg, E. Thordarson, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Microporous membrane liquid-liquid extraction coupled on-line with normal-phase liquid chromatography for the determination of cationic surfactants in river and waste water*, *J. Chromatogr.* 869 (2000) 523-529.
- [170] R.-S. Juang, L.-J. Chen, *Transport of citric acid across a supported liquid membrane containing various salts of a tertiary amine*, *J. Memb. Sci.* 123 (1997) 81-87.
- [171] B. Lindegard, J. A. Jönsson, L. Mathiasson, *Liquid membrane work-up of blood plasma samples applied to gas chromatographic determination of aliphatic amines*, *J. Chromatogr.* 537 (1992) 191-200.
- [172] L. Chimuka, M. M. Nindi, M. E. M. ElNour, H. Frank, C. Velasco, *Temperature-dependence of supported liquid membrane extraction*, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (7) (1999) 417-420.
- [173] L. Chimuka, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Role of Octanol-water partition coefficient in extraction of ionisable organic compounds in a supported liquid membrane with a stagnant acceptor*, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 77-86.
- [174] L. Murtomäki, M.H. Barker, J.A. Manzanares, K. Kontturi, *Study of the effect of the membrane composition on ion transfer across a supported liquid membrane*, *J. Electroanal. Chem.* 560 (2003) 95-103.
- [175] M. H. Barker, L. Murtomaki, K. Kontturi, *Study of kinetics of charge transfer across a supported liquid membrane under transient conditions*, *J. Electroanal. Chem.* 497 (1995) 61-68.
- [176] T. Jimbo, P. Ramirez, A. Tanioka, S. Mafe, N. Minora, *Passive Transport of Ionic through Membranes with pH-Dependent Fixed Charges*, *J. Chromatogr. A* 225 (2000) 447-454.
- [177] J.-F. Liu, X. Liang, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, Y.-Q. Cai, Q.-X. Zhou, G.-G. Liu, *High-performance liquid chromatography determination of chlorphenols in waters samples after preconcentration by continuous flow liquid membrane extraction on-line coupled with a precolumn*, *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 129-135.
- [178] B. Zhang, G. Gozzelino, G. Baldi, *Membrane liquid loss of supported liquid membrane based on n-decanol*, *Colloids and Surfaces: Physicochem. Eng. Aspects* 193 (2001) 61-70.
- [179] N. Engelhardt, W. Frik, W. Warnken, *Integration of membrane filtration into the activated sludge process in municipal wastewater treatment*, *Wat. Sci. Tech.* Vol. 38, No. 4-5, 429-436.
- [180] V. Neitzel, U. Iske, *Abwasser: Technik und Kontrolle*, Hrsg.: J. Kwiatkowski, C. Bliefert, Wiley-WCH-Verlag, Weinheim (1998).
- [181] P. M. Kunz, *Behandlung von Abwasser*, Hrsg.: K. Sattler, Vogel Buchverlag, 4. überarb. Aufl. (1995).
- [182] B. Günder, K. Krauth, *Kläranlagen mit Membranfiltration – Konzeption, Bemessung und Betrieb*, WAP 1 (2000) 19-24.

- [183] P. Ohle, *Bemessung von Membranbioreaktoren*, WAP 4 (2000) 26-31.
- [184] B. Günder, *Das Membranbelebungsverfahren*, 74. Siedlungswasserwirtschaftliches Kolloquium, Oldenburg Verlag, München (1999) 73-95.
- [185] B. Günder, K. Krauth, *Neuer Ansatz zur Berechnung der Überschussschlammproduktion und des Sauerstoffverbrauchs beim (Membran-) Belebungsverfahren*, Wasser-Abwasser 140 Nr. 10 (1999) 693-703.
- [186] A. Heppe, *Elektrolytische Membranfiltration – Ein neuer Weg der weitergehenden Abwasserreinigung*, WLB 7-8 (2000) 25-26.
- [187] T. Melin, M. Dohmann, *Membrantechnik in der Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung*, Begleitbuch zur 3. Aachener Tagung (Siedlungswasserwirtschaft und Verfahrenstechnik) (2000) A 3-20.
- [188] *Die Entsalzung von Meerwasser*, WBL 6 (2000) 4-5.
- [189] J. Cho, G. Amy, J. Pellegrino, *Membrane filtration of natural organic matter: initial comparison of rejection and flux decline characteristics with ultrafiltration and nanofiltration membranes*, Wat. Res. Vol. 33, No. 11 (1999) 2517-2526.
- [190] L. Mutihac, H.-J. Buschmann, E. Diacu, R. Mutihac, *Membranes and membrane processes III; Applications of membrane processes in water treatment*, Rev. Roumaine de Chimie 46(9) (2001) 941-951.
- [191] D. Paul, *Stofftrennung mit Membranen*, GIT 10 (1997) 960-964.
- [192] K. Johansen, K. E. Rasmussen, *Automated on-line dialysis for sample preparation and HPLC analysis of antidepressant drugs in human plasma: Inhibition of interaction with the dialysis membrane*, J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1998) 1159-1169.
- [193] T. S. Ho, T. G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier mediated transport*, J. Chromatogr. A, 998 (2003) 61-72.
- [194] F. Negretti, P. Casetta, *Research on sterility and contamination controls of chemotherapeutic agents by membrane filtration method*, J. Pharm. Biomed. Vol. 9 No. 9 (1991) 773-776.
- [195] S. C. Lee, *Effect of volume ratio of internal aqueous phase to organic membrane phase (w/o) ratio of water-in-oil emulsion of penicillin G extraction by emulsion liquid membrane*, J. Memb. Sci. 163 (1999) 193-201.
- [196] S. C. Lee, S. M. Yeo, *Role of dilute polymer solution in penicillin G extraction by emulsion liquid membranes*, J. Ind. Eng. Chem. Vol. 8 No. 2 (2002) 114-119.
- [197] S. C. Lee, J. H. Chang, B. S. Ahn, W. K. Lee, *Mathematical modelling of penicillin G extraction in an emulsion liquid membrane system containing only a surfactant in the membrane phase*, J. Memb. Sci. 149 (1998) 39-49.
- [198] S. C. Lee, K. H. Lee, G. H. Hyun, W. K. Lee, *Continuous extraction of penicillin G by an emulsion liquid membrane in a counter current extraction column*, J. Memb. Sci. 124 (1997) 43-51.
- [199] R.-S. Juang, S.-H. Lee, R.-C. Shiau, *Carrier-facilitated liquid membrane extraction of penicillin G from aqueous streams*, J. Memb. Sci. 146 (1998) 95-104.
- [200] C.-J. Lee, H.-J. Yeh, W.-J. Yang, C.-R. Kan, *Extractive separation of penicillin G by facilitated transport via carrier supported liquid membrane*, Biotechnol. Bioeng. Vol. 42 (1993) 527-534.
- [201] C.-J. Lee, H.-J. Yeh, W.-J. Yang, C.-R. Kan, *Separation of penicillin G from phenylacetic acid in a supported liquid membrane system*, Biotechnol. Bioeng. Vol. 43 (1994) 309-313.
- [202] J. T. Rockman, E. Kehat, R. Lavie, *Thermally enhanced extraction of citric acid through supported liquid membrane*, AIChE Journal Vol. 43, No. 9 (1997) 2376-2380.
- [203] R.-S. Juang, L.-J. Chen, *Analysis of the transport rates of citric acid through a supported liquid membrane containing tri-n-octylamine*, Ind. Eng. Chem. Res. 35 (1996) 1673-1679.
- [204] D. T. Friesen, W. C. Babcock, D. J. Brose, A. R. Chambers, *Recovery of citric acid from fermentation beer using supported liquid membranes*, J. Membr. Sci. (1991) 127-141.
- [205] L.-K. Ju, A. Verma, *Characteristics of lactic acid transport in supported liquid membranes*, Sep. Sci. Tech. 29 (17) (1994) 2299-2315.
- [206] M. Matsumoto, T. Takagi, K. Kondo, *Separation of lactic acid using polymeric membrane containing a mobile carrier*, J. Ferment. Bioeng. Vol. 85 no. 5 (1998) 483-487.
- [207] M. Grote, B. Haciosmanoglu, J. Nolte, *Extraction of Drug Traces with Liquid Membrane Systems*, Proceedings of the International Solvent Extraction Conference, ISEC 2002, Cape Town, South Africa, März 17–21, 2002; K. Sole, C., Cole, M., Preston, J.S., Robinson, D.J., Eds.; Chris van Rensburg Publications (Pty) Ltd: Melville, South Africa; 2002; Vol. 1, 607 – 613.
- [208] M. Grote, B. Haciosmanoglu, J. Nolte, M. Bataineh, *Separation of drug traces from water with particular membrane systems*, Special Issue of the J. Environ. Sci. Health, Part A, Vol. A 39, No. 4 (2004) 1039-1053.

- [209] J. Nolte, M. Bataineh, B. Haciosmanoglu, M. Grote, *Membrane systems for the separation of pharmaceutical residues from water*, Proceedings of the International Conference IEX2004 "Ion Exchange Technology for Today and Tomorrow 2004", Cambridge, 4-8 Juli **2004**; Ed.: M. Cox.; Published by Society of Chemical Industry (SCI), London.
- [210] S. V. Ho, *A supported polymeric liquid membrane process for removal of carboxylic acids from a waste stream*, Environ. Progress. Vol. 18, No. 4 (**1999**) 273-279.
- [211] T. Sirman, L. Pyle, A. S. Grandison, *Extraction of organic acids using a supported liquid membrane*, Biochemical Society Transactions 19 (**1991**) 2745.
- [212] T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *Approaches for on-line coupling of extraction and chromatography*, Anal. Bioanal. Chem. 3. März **2004** (on-line publiziert).
- [213] E. Thordarson, S. Palmarsdottir, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography*, Anal. Chem. 68 (**1996**) 2559-2563.
- [214] S. Gong, J. Xing, X. Lu, Y. Chen, *Non-aqueous liquid membrane system*, J. Memb. Sci. 205 (**2002**) 265-272.
- [215] S. C. Lee, S. M. Yeo, *Role of dilute polymer solution in penicillin G extraction by emulsion liquid membranes*, J. Ind. Eng. Chem. Vol. 8, No. 2 (**2002**) 114-119.
- [216] N. Parthasarathy, M. Pelletier, J. Buffle, *Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis*, Anal. Chim. Acta 350 (**1997**) 183-195.
- [217] S. R. Wickramasinghe, M. J. Semmens, E. L. Cussler, *Mass transfer in various hollow fiber geometries*, J. Membr. Sci. 69 (**1992**) 235-250.
- [218] T. He, M. H. V. Mulder, H. Strathmann, M. Wessling, *Preparation of composite hollow fiber membranes: co-extrusion of hydrophilic coatings onto porous hydrophobic support structures*, J. Memb. Sci. 207 (**2002**) 143-156.
- [219] Y. Tong, M. Hirata, H. Takanashi, T. Hano, F. Kubota, M. Goto, F. Nakashio, M. Matsumoto, *Extraction of lactic acid from fermented broth with microporous hollow fiber membranes*, J. Memb. Sci. 143 (**1998**) 81-91.
- [220] K. Ye, S. Jin, K. Shimizu, *Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation*, J. Ferment. Bioeng. Vol. 81, No. 3 (**1996**) 240-246.
- [221] J. A. Jönsson, M. Andersson, C. Melander, J. Norberg, E. Thordarson, L. Mathiasson, *Automated liquid membrane extraction for high-performance liquid chromatography of Ropivacaine metabolites in urine*, J. Chromatogr. A, 870 (2000) 151-157.
- [222] Hansch, C., *Struktur-Wirkung-Denken in der Chemie*, Jastorff-Störmann-Wolche, Universitätsverlag Aschabach & Isensee, Bremen 2003.
- [223] R. Renner, *The  $K_{OW}$  controversy*, Environ. Sci. Tech. November **2002**, 411-413.
- [224] EPA (United States Environmental Protection Agency), Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7570, *Partition coefficient (n-octanol /water), estimation by liquid chromatography*, August **1996**.
- [225] M. G. Sanchez, *Extraktive Eigenschaften acider S-Decyl-Derivate des Dithizons und ihre Anwendbarkeit in Flüssig-Membranen*, Dissertation im Fach der Anorganischen und Analytischen Chemie der Universität Paderborn, Juni **1996**.
- [226] D. H. Yolcu, Diplomarbeit, *Untersuchungen zur Abtrennung von Arzneistoffen aus wässrigen Proben mit Flüssig-Membran-Systemen*, Universität Paderborn, **2002**.
- [227] Die Europäische Norm EN ISO 7887, *Wasserbeschaffenheit; Untersuchung und Bestimmung der Färbung*, Dezember **1994**.
- [228] L. A. Hütter, *Wasser und Wasseruntersuchung*, 6. Aufl., Salle Verlag, Frankfurt am Main, 1994.
- [229] G. Pickert, *Edelmetallabtrennung mit Dehydrodithizon- und Dithizon-Derivaten durch Solvent-Extraktion und Flüssigmembran-Permeation*, Dissertation im Fach der Anorganischen und Analytischen Chemie der Universität Paderborn, Dezember **1989**.
- [230] G. M. Barrow, *Physikalische Chemie III*, Verlag Vieweg, Braunschweig (**1974**).
- [231] K. Schneider, T. H. Rintelen, *Preprint Membranverfahren in der Umwelttechnik, Prozesse, Anwendungen und Betriebserfahrungen*, Eurogress Aachen, (1985) 139.
- [232] S. Kromidas, *Validierung in der Analytik*, Wiley-WCH-Verlag, Weinheim (**1999**).
- [233] Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 38402, *Allgemeine Angaben (Gruppe A), Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen, und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A 51)*, Mai **1986**.
- [234] W. Funk, V. Dammann, G. Donnewert, *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*, Wiley-WCH-Verlag, Weinheim (**1992**), überarbeitete Auflage.
- [235] Analytical Methods Committee, *Is my calibration linear?* Analyst Vol. 119 (**1994**).
- [236] W. Neitzgel, *Lineare Kalibrierfunktionen*, Chemie in Labor und Biotechnik, 53. Jahrgang, Heft 1 (**2002**).

- 
- [237] Deutsche Institut für Normung e. V., DIN 32645, *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung*, Mai **1994**.
- [238] S. Kromidas, R. Klinkner, R. Mertens, *Methodenvalidierung im analytischen Labor*, Nachr. Chem. Tech. La. 43 (No.6) (**1995**): Begriffe, Selektivität, Spezifität, Präzision, Methode und Messpräzision, Linearität, Nachweis und Bestimmungsgrenze.
- [239] S. Kromidas (Hrsg.), *Qualität im analytischen Labor*, VCH-Verlag, Weinheim (**1995**).

## **ANHANG**

### **Inhaltsverzeichnis**

<b>Anhang 1: Kalibrierdaten des HPLC-UV-MS/MS-Verfahren.....</b>	<b>A2</b>
<b>Anhang 2: Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktionen.....</b>	<b>A5</b>
<b>Anhang 3: Empfindlichkeit.....</b>	<b>A6</b>
<b>Anhang 4: Anpassungstest nach Mandel.....</b>	<b>A6</b>
<b>Anhang 5: Residualanalyse.....</b>	<b>A7</b>
<b>Anhang 6: Überprüfung der Varianzenhomogenität.....</b>	<b>A7</b>
<b>Anhang 7: Absicherung der unteren Arbeitsgrenze.....</b>	<b>A8</b>
<b>Anhang 8: Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....</b>	<b>A8</b>

## Anhang 1: Kalibrierdaten des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens

Die Standardabweichung einer Mehrfachbestimmung und die relative Standardabweichung werden durch die Gleichungen 1.1 und 1.2 ermittelt:

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{10} (y_{i,n} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}} \quad (1.1)$$

$$s_{rel} = \frac{s_i * 100}{\bar{y}_i} \quad (1.2)$$

### Ausreiser-Test nach Grubbs

Man bildet die Prüfgröße Q für den Grubbs-Test nach der Gleichung:

$$Q = \frac{|x_1 - x_2|}{R} \quad (1.3)$$

$x_1$ : Ausreißerverdächtiger Wert

$x_2$ : Benachbarter Wert

R: Spannweite und vergleiche diese mit einem Tabellenwert.

**Tabelle 1.1:** Relative Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) in Abhängigkeit von Konzentration für SFM-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-UV-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von SFM (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$s_{rel}$ (%)
0,025	62579	8,1
0,050	130625	6,1
0,075	198239	3,1
0,25	705914	0,99
0,50	1420560	0,80
0,75	2133617	0,42
1,00	2824705	0,32
1,25	3476227	0,33
1,50	4177502	0,29
2,00	5496598	0,40
2,50	6912361	0,64
3,00	8681505	1,33
5,00	13182099	0,98

**Tabelle 1.2:** Relative Standardabweichung ( $S_{rel}$ ) in Abhängigkeit von CBZ-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-UV-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von CBZ (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$S_{rel}$ (%)
0,025	108674	5,86
0,050	228257	2,36
0,075	343760	1,39
0,25	1200192	2,39
0,50	2332427	1,34
0,75	3482123	0,33
1,00	4652566	0,51
1,25	5728643	0,92
1,50	6848246	0,35
2,00	9045930	0,55
2,50	11252586	0,95
3,00	13927727	1,04
5,00	18787604	0,68

**Tabelle 1.3:** Relative Standardabweichung ( $S_{rel}$ ) in Abhängigkeit von DCF-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-UV-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von DCF (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$S_{rel}$ (%)
0,025	113521	9,85
0,050	198144	6,3
0,075	268803	3,1
0,25	816597	1,3
0,50	1646214	0,64
0,75	2412681	0,41
1,00	3238936	0,97
1,25	4028554	0,45
1,50	4781049	0,49
2,00	6438368	0,65
2,50	7844481	0,40
3,75	9849387	0,44
5,00	13966269	0,48

**Tabelle 1.4:** Relative Standardabweichung ( $S_{rel}$ ) in Abhängigkeit von IBU-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-UV-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von IBU (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$S_{rel}$ (%)
0,025	39207	34,00
0,050	96007	14,00
0,075	143349	6,10
0,25	471283	2,86
0,50	941020	2,00
0,75	1406348	0,88
1,00	1903425	1,00
1,25	2381528	0,70
1,50	2872222	0,70
2,00	3894983	0,90
2,50	4759288	0,47
3,75	6053589	0,56
5,00	9000670	0,52

**Tabelle 1.5:** Relative Standardabweichung ( $S_{rel}$ ) in Abhängigkeit von SFM-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-MS/MS-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von SFM (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$S_{rel}$ (%)
1,25	1101479	14,49
1,50	1305974	6,21
2,00	1809826	7,04
2,50	2798993	4,8
3,00	3173649	7,75
5,00	4763454	4,99

**Tabelle 1.6:** Relative Standardabweichung ( $S_{rel}$ ) in Abhängigkeit von CBZ-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-MS/MS-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von CBZ (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$S_{rel}$ (%)
0,025	733878	102
0,050	1401200	17,96
0,075	2258277	7,26
0,25	7904643	10
0,50	15958074	4,64
0,75	27009296	5,02
1,00	37749934	3,81
1,25	52409224	6,61
1,50	61330278	4,79
2,00	89867218	5,61
2,50	121164844	4,53
3,00	154242677	7,52
5,00	263723813	3,99

**Tabelle 1.7:** Relative Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) in Abhängigkeit von DCF-Konzentration für die Bestimmung mit der LC-MS/MS-Methode (Anzahl der Injektionen: n=10)

Konzentration von DCF (mg/L)	Mittelwert der Peakfläche (mAu.min)	$S_{rel}$ (%)
0,50	1041943	16
0,75	1625130	4,63
1,00	2045797	10,55
1,25	2267342	3,55
1,50	2824435	7,17
2,00	3793999	1,74
2,50	4306619	2,82
3,00	5379251	9,56
5,00	7413535	3,29

## Anhang 2: Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktionen

### Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktion ersten Grades

$b$  ist die Steigung der Kalibriergerade und ein Maß für die Empfindlichkeit und wird mit der Gleichung 2.1 berechnet. Die Mittelwerte der Konzentrationen ( $\bar{x}$ ) und der Peakflächen ( $\bar{y}$ ) wurden mit den Gleichungen 2.2 und 2.3, der Achsenabschnitt mit der Gl. 2.4 berechnet.

$$b = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.1)$$

Achsenabschnitt:  $a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (2.2)$

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x_i \quad (2.3)$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum y_i \quad (2.4)$$

Die Reststandardabweichung ( $s_y$ ) wurde mit der Gl. 2.5 berechnet:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad \text{mit} \quad \hat{y}_i = a + bx_i \quad (2.5)$$

### Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktion zweiten Grades

Die Regressionsanalyse liefert hier die Kalibrierfunktion 2. Grades mit ihren Verfahrenskenndaten. Die Funktionskoeffizienten  $a$ ,  $b$ ,  $c$  wurden mit den Gleichungen 2.6, 2.7 und 2.8 mit Hilfe der Gleichungen 2.9, 2.10, 2.11, 2.12 und 2.13 berechnet.

$$a = \frac{(\sum y_i - b \cdot \sum x_i - c \cdot \sum x_i^2)}{N} \quad (2.6)$$

$$b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}} \quad (2.7)$$

$$c = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{Q(x^3)^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}} \quad (2.8)$$

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \left( \frac{(\sum x_i)^2}{N} \right) \quad (2.9)$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i y_i) - \left( \frac{(\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{N} \right) \quad (2.10)$$

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left( \frac{(\sum x_i) \cdot (\sum x_i^2)}{N} \right) \quad (2.11)$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left( \frac{(\sum x_i^2)^2}{N} \right) \quad (2.12)$$

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \cdot y_i) - \left( \frac{(\sum y_i) \cdot (\sum x_i^2)}{N} \right) \quad (2.13)$$

Die Reststandardabweichung wurde mit der Gl. 2.14 berechnet:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}} \quad \text{mit } \hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2 \quad (2.14)$$

### Anhang 3: Empfindlichkeit

Durch die Empfindlichkeit  $b$  können die Verfahrensstandardabweichungen  $s_{xo}$  und Verfahrensstandardkoeffizienten  $V_{xo}$  berechnet werden.

$$s_{xo} = \frac{s_y}{b} \quad (3.1)$$

$$V_{xo} = \frac{s_{xo}}{\bar{x}} \cdot 100(\%) \quad (3.2)$$

### Anhang 4: Anpassungstest nach Mandel

Für die Überprüfung der Linearität werden die Reststandardabweichung der linearen und der quadratischen Kalibrierfunktion verglichen.

- Die vereinfachte qualitative Aussage ist, wenn die Reststandardabweichung der errechneten Funktion 1. Grades kleiner oder gleich der Reststandardabweichung der Funktion 2. Grades ist, ist die Kalibrierfunktion im untersuchten Arbeitsbereich linear. Dieses ist für Diclofenac der Fall, nämlich der Prüfwert, der aus der Differenz der Varianzen  $DS^2$  berechnet wird, ist negativ.

- Bei der rechnerischen Überprüfung (DIN 38402) wird mit Hilfe der Gl. 4.1 die Differenz der Varianzen  $DS^2$  berechnet.

$$DS^2 = (N - 2)s_{y_1}^2 - (N - 3)s_{y_2}^2 \quad \text{mit dem Freiheitsgrad } f = 1 \quad (4.1)$$

Für den F-Test wurde der Prüfwert PW berechnet:

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} \quad (4.2)$$

Der resultierende Wert für die Substanzen wurde mit dem Tabellenwert  $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99\%)$  verglichen. Es können zwei Fälle auftreten:

- Falls  $PW \leq F$  ist, wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht; die Kalibrierfunktion ist linear.
- Wenn  $PW > F$  ist, so sollten zunächst die Einzelschritte des Analysenverfahrens geprüft, falls möglich, verbessert werden. Ist danach keine Linearität zu erreichen, so sollte durch Einengung des Arbeitsbereiches versucht werden, eine ausreichende Linearität zu erreichen. Ansonsten bleibt als letzte Möglichkeit die künftige Auswertung der Messwerte mit der Kalibrierfunktion 2. Grades.

## Anhang 5: Residualanalyse

Eine weitere Möglichkeit zu prüfen, ob der gewählte Ansatz des Kalibriermodells die Messergebnisse hinreichend genau beschreibt, ist die Residualanalyse

Dazu wurden die Residuen  $d_i$  ermittelt.

$$d_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{für } i = 1, \dots, n \quad (5.1)$$

mit  $y_i$  = Messwert

und  $\hat{y}_i$  = zu  $y_i$  gehöriger Schätzwert

(aus der Regressionsfunktion)

Residuen sind die vertikalen Abstände der Messwerte von der Regressionskurve. Wenn die Residuen um das Nullniveau normal verteilt sind, ist der gewählte Modellansatz richtig. Falls sich herausstellt, dass die Residuen einen Trend aufweisen oder eine Funktion der zweiten Grades vorliegt, so muss der zugrunde gelegte Regressionsansatz überprüft werden also, soll der Arbeitsbereich eingengt oder eine Funktion 2. Grades zur Kalibrierung herangezogen werden.

## Anhang 6: Überprüfung der Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurden die Standardproben der niedrigsten ( $x_i$ ) sowie der höchsten ( $x_N$ ) Konzentration des vorläufigen Arbeitsbereiches jeweils zehnmal analysiert.

Es wurden  $2 \cdot n$  ( $n = 6$ ) Messwerte ( $y_{ij}$ ) aus diesen Messserien erhalten. Für beide Datensätze werden die Varianzen  $s_i^2$  und  $s_N^2$  mit der Gl. 6.1 berechnet:

$$s_i^2 = \frac{\sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{für } i = 1 \text{ und } i = N) \quad (6.1)$$

Die Varianzen der beiden Messwertserien wurden mittels F-Test auf Homogenität überprüft:

$$PW = \frac{s_N^2}{s_i^2} \quad (6.2)$$

Für den Fall, dass der F-Test einen signifikanten Unterschied der Varianzen anzeigt, d.h.  $PW > F$  ist, gibt es drei Möglichkeiten für die weitere Vorgehensweise:

- Wahl eines engeren Arbeitsbereiches und erneute Überprüfung der Varianzenhomogenität
- Anwendung der gewichteten Regression
- Multiple-Curve-Fitting

### Anhang 7: Absicherung der unteren Arbeitsgrenze

Zur Absicherung der unteren Arbeitsgrenze wird zunächst nach FUNK der Prüfwert  $x_p$  mit  $t$  ( $f = N-2$ ,  $P = 95\%$ ) berechnet. Für diesen gilt:

$$x_p = 2 \cdot s_{x_0} \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_p - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7.1)$$

mit:

$$y_p = a + s_{y_1} \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7.2)$$

Ist die Voraussetzung  $x_p \leq x_l$  gefüllt, so ist der gesamte gewählte Arbeitsbereich statistisch abgesichert, d.h. die untere Arbeitsgrenze unterscheidet sich signifikant von Null. Liegt  $x_p$  oberhalb von  $x_l$ , so ist der Arbeitsbereich erst für Konzentrationen größer als  $x_p$  statistisch abgesichert und für diesen Arbeitsbereich muss eine vollständige neue Kalibrierung erfolgen.

### Anhang 8: Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Nach DIN 32645 können die Nachweis- und Bestimmungsgrenze aus den Daten der Kalibrierfunktion anhand der Verfahrensstandardabweichung berechnet werden. Bei der Berechnung ist vorausgesetzt, dass die Messwerte voneinander unabhängig und normal verteilt sind, eine lineare Kalibrierfunktion und Varianzenhomogenität am oberen und unteren Ende des Arbeitsbereichs vorliegt.

Für die Nachweisgrenze gilt:

$$x_{NG} = s_{x0} t_{va} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8.1)$$

wobei  $s_{x0}$  Verfahrensstandardabweichung,  $t_{va}$  von der Irrtumswahrscheinlichkeit und der Anzahl der Freiheitsgrade (N-2) abhängiger t-Faktor, n Anzahl der Kalibrierproben und m Anzahl der Messungen pro Kalibrierprobe sind [235].

Zur Berechnung der Bestimmungsgrenze wird der Faktor k eingeführt, wobei 1/k die relative Ergebnisunsicherheit zur Charakterisierung der Bestimmungsgrenze darstellt. Empfohlen wird in der DIN 32645 ein Wert von 3, da dann die relative Ergebnisunsicherheit 33 % beträgt. Es ist nur wichtig, dass die Bestimmungsgrenze oberhalb der Erfassungsgrenze und unterhalb des kleinsten Kalibrierpunktes liegt [235, 238].

$$x_{BG} = k s_{x0} t_{va} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(k x_{NG} - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8.2)$$

