

Bestimmung von sauren und neutralen Arzneimittelwirkstoffen in Wasserproben

Norbert Breidenich, Staatliches Umweltamt Aachen, Franzstr.49, 52064 Aachen

Email-Adresse: norbert.breidenich@stua-ac.nrw.de

Vortragsskript Umweltanalytiktag NRW vom 19. bis 21.06.2000

.

1. Zusammenfassung

Berichte über Arzneimittelfunde in Abwässern kommunaler Kläranlagen, Oberflächengewässern und Grundwässern waren 1998 Anlass, im Labor des Staatlichen Umweltamtes Aachen Methoden für die Bestimmung von Arzneimitteln und deren Rückständen zu entwickeln [Lit.-Liste]. Die ausgearbeiteten Analysemethoden wurden im Zuge mehrerer Messprogramme an Realproben erprobt und entsprechend der gesammelten Erfahrungen weiterentwickelt.

Folgende Ergebnisse liegen vor:

- ☞ Es wurden zwei Analysemethoden zur Bestimmung neutraler und saurer Pharmaka aus Grund-, Oberflächen- und Abwasserproben entwickelt und eingearbeitet.
- ☞ Proben von Kläranlagenabläufen, Gewässern und Rohwässern wurden auf Pharmaka untersucht.
- ☞ In vielen Proben wurden Arzneimittel bzw. Metabolite qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Aktuelle Ergebnisse sind als Anlagen beigefügt.
- ☞ Es wird versucht die Bestimmungsgrenzen für die neutralen Arzneimittel weiter abzusenken.
- ☞ Es wird weiterer Untersuchungsbedarf gesehen.
- ☞ Das lfd. Kläranlagenmessprogramm wird fortgeführt um statistische Auswertungen zu ermöglichen.
- ☞ Die Analysemethoden werden durch Teilnahme am BLAC-Ringversuch erprobt.

2. Literaturstudien

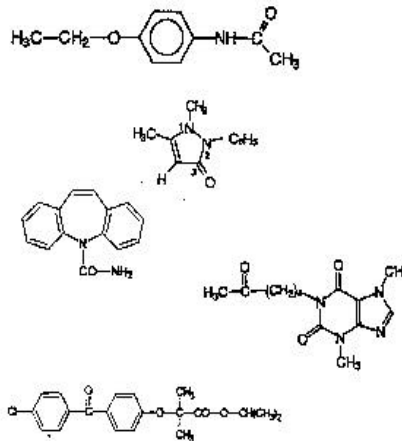
Die Literaturrecherche erfolgte gezielt im Hinblick auf die analytische Bestimmung von Arzneimitteln/Arzneimittelrückständen in Oberflächen-, Trink-, Grund- und Abwasser mittels GC und GC-MS.

Ergebnis der Literaturrecherche war, dass die Extraktion der Arzneimittel mittels Festphasenanreicherung die höchsten Wiederfindungsraten bei Wasserproben ergab. Basierend auf der Literaturstelle von F.Sacher, E.Lochow, D.Bethmann und H.J.Brauch „Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern“, Zeitschrift Vom

Wasser, 90, 233-243 (1998) Lit.1.1? wurde je eine Analysenmethode für folgende Einzelwirkstoffe erarbeitet:

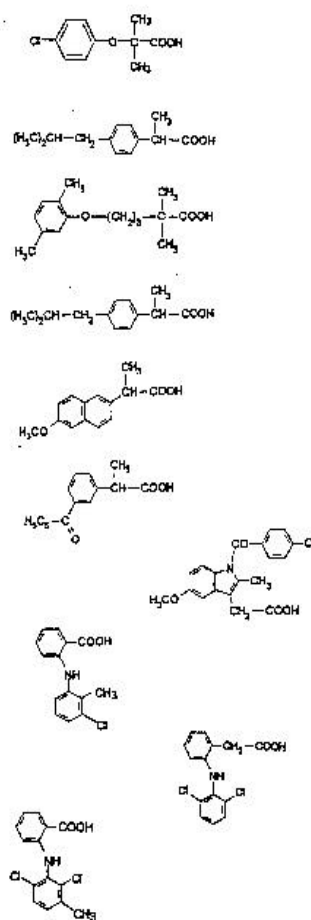
neutrale Pharmaka

| Wirkstoff | Verabreichung |
|---------------|----------------|
| Phenacetin | Analgetika |
| Phenazon | Analgetika |
| Carbamazepin | Antiepileptika |
| Pentoxifyllin | Vasodilator |
| Fenofibrate | Lipidsenker |



saure Pharmaka

| | |
|-------------------|--------------------------|
| Clofibrinsäure | Metabolit von Fenofibrat |
| Ibuprofen | Antirheumatika |
| Gemfibrozil | Lipidsenker |
| Fenoprofen | Antirheumatika |
| Naproxen | Antiphlogistika |
| Ketoprofen | Antirheumatika |
| Indomecatin | Antiphlogistika |
| Tolfenaminsäure | Antiphlogistika |
| Diclofenac | Antirheumatika |
| Meclofenaminsäure | Antiphlogistika |



3. Analysenmethode

3.1 Probenahme und Probenvorbereitung

Für die Probenahme werden mit Aceton und dest. Wasser gespülte Glasgerätschaften verwendet. Für eine Doppelbestimmung werden jeweils 4 x 1 l Wasserprobe in Braunglas-Steilbrustflaschen blasenfrei abgefüllt. Die Proben werden gekühlt ins Labor transportiert.

3.2 Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde Leitungswasser mit je 0,5 und 1,0 µg/l der einzelnen Wirkstoffe aufgestockt und nach der im folgenden beschriebenen Methode analysiert.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde versucht saure und neutrale Arzneimittel gemeinsam bei pH 3 anzureichern. Hierbei wurde festgestellt, dass:

- a.) die sauren Arzneimittel zufriedenstellende Wiederfindungsraten aufwiesen.
- b.) die neutralen Wirkstoffe, insbesondere Phenazon und Phenacetin deutlich geringere und weniger reproduzierbare Wiederfindungsraten ergaben.

Deshalb wurde in Folge die getrennte Anreicherung der Wirkstoffgruppen durchgeführt.

Tabelle 1 pH-Wert-Abhängigkeit der Wiederfindungsraten neutrale Arzneimittel

| Wirkstoff | Wiederfindung in % pH 3 | Wiederfindung in % pH 7 |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| Phenacetin | 10 - 40 | 60 - 65 |
| Phenazon | 10 - 35 | 41 - 47 |
| Carbamazepin | 70 - 92 | 95 - 100 |
| Fenofibrat | 75 - 88 | 88 - 95 |
| Pentoxifyllin | 67 - 85 | 85 - 92 |

Zur Bestimmung der sauren Arzneimittel werden die Wasserproben mit 16 molarer Ameisensäure auf den pH-Wert 3 eingestellt. Danach werden 10 µl einer 2,3-Dichlorphenoxyessigsäure-Stammlösung in *i*-Propanol (c = 0,1 mg/ml) als interner Standard zugesetzt.

Die Wasserproben aus denen die neutralen Pharmaka bestimmt werden sollen werden mit 10 µl einer Methyl-Pentadecanoat-Stammlösung in *i*-Propanol (c = 0,1 mg/ml) als interner Standard aufdotiert.

3.2 Festphasenanreicherung

Getrübte Proben werden vor der Anreicherung über Membranfilter (Cellulose Acetat, 0,45 µm) filtriert.

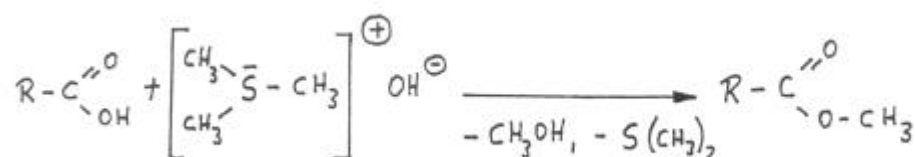
Die Anreicherung der o.g. Pharmawirkstoffe erfolgt auf RP-C18-Fertigsäulen der Fa. Baker. Das Füllvolumen beträgt 1000 µl. Die Säulen werden mit 4 ml iso-Propanol und anschließend mit 4 ml dest. Wasser konditioniert. Ein Trockenfallen der Säulen muss wegen der Bildung von Fließkanälen vermieden werden! Anschließend wird 1 l Wasserprobe mit einem Fluss von 5 ml/min über die Säulen gesaugt. Hierfür wird ein leichtes Vakuum an die Anreicherungseinheit angelegt.

Nach erfolgter Anreicherung werden die Säulen bei -18 °C tiefgefroren und danach mindestens 2h gefriergetrocknet. Die Trocknung kann auch mit Stickstoff erfolgen. Die Fertigsäulen werden bis zur Elution im Exsikator aufbewahrt.

Die angereicherten Arzneimittel werden durch portionsweise Zugabe von 5 ml iso-Propanol eluiert. Der Isopropanolextrakt wird mittels Rotationsverdampfer auf 0,1 ml (neutrale Arzneimittel) , bzw. 1 ml (saure Arzneimittel) eingengt. In Ermangelung von auf 0,1 ml kalibrierten Spitzgläsern wird der Extrakt bis fast zur Trockene eingengt und mittels 100 µl-Spritze aufgenommen (70 – 80 µl). Die teilgefüllte Spritze wird anschließend mit Isopropanol bis zur 100 µl-Marke aufgezogen . Die 100 µl werden in mit Mikroeinsätzen versehenen Autosamplern überführt.

3.3 Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

TMSH wird in der Literatur als gutes Methylierungsmittel zur gaschromatographischen Erfassung von Carbonsäuren in kleinsten Mengen beschrieben. Die Derivatisierungsreaktion läuft entsprechend folgender Reaktionsgleichung ab:



Eine Entfernung des Reagenzienüberschusses wird lt. Lit. nicht für erforderlich gehalten, da im Injektor des Gaschromatographen ab 250 °C nur eine Pyrolyse des TMSH zu leicht flüchtigem Methanol und Disulfid erfolge [Lit.1.9].

Zur GC-MS-Bestimmung der sauren Arzneimittelwirkstoffe wird jeweils ein Extraktaliquot mit 30 µl einer 0,2 M methanolischen TMSH-Lösung versetzt. Die Autosamplernfläschchen werden nach Zugabe des Derivatisierungsreagenzes leicht geschüttelt. Die Einspritzung in das GC-MS-Gerät sollte bis spätestens 24 h nach TMSH-Zugabe erfolgen. Ein Vorteil der TMSH-Derivatisierung ist, dass die Derivatisierungsreaktion im heißen Injektor (275 °C) erfolgt.

Im Zuge der durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch festgestellt:

- a.) dass die Nachweisempfindlichkeit der neutralen Arzneimittel nach größeren Analysenserien der sauren Arzneimittel gravierend schlechter wurde.

- b.) dass gleichzeitig bei der Bestimmung der neutralen Verbindungen eine deutliche Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wurde, die sich in Peakverbreiterung und –tailing äußerte.

Vermutlich verbleiben nach der Einspritzung der mit TMSH-versetzten Extrakte noch TMSH-Reste im Injektorinsert bzw. auf der Säule, die zu einer zumindest teilweisen Zersetzung der neutralen Arzneimittel und einer Veränderung der Trennsäule führen.

Zur Problemlösung wurde dazu übergegangen die Bestimmung der beiden Wirkstoffgruppen auf zwei unterschiedlichen Säulen durchzuführen.

Der Säulenwechsel kann neuerdings ohne zeitaufwendiges Herunterfahren der Ionenfalle durchgeführt werden und dauert ca. 30 min.. Hierbei wird nach Lösen der Analysensäule von der Transferline ein Blindstopfen eingeschraubt, sodass das Vakuum in der Falle erhalten bleibt. Der Säulenwechsel wird auch für den routinemäßig erforderlichen Wechsel von Injektorinsert und Septum genutzt.

3. Geräte-Bedingungen

Gaschromatograph: Varian 3400 C_X

Injektor: Varian 1078 Split/Splitlos-Injektor

Injektor-Insert: Glasinsert offen, deaktiviert, 3,4 mm ID

Injektor-Temperatur: 275 °C

Kapillartrennsäulen :

Neutrale Arzneimittel: DB 5 MS, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm FD (Fa. J&W)

Saure Arzneimittel: Optima ?3, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm FD (Fa. Macherey & Nagel)

Temperaturprogramm: 70 °C, 1 min

70 - 280 °C, 15 °C/min

280 - 300 °C, 5 °C/min

300 °C, 10 min

Autosampler: Varian 8200 C_x

Injektionsvolumen: 2 µl

Injektionsrate: 5 µl/sek.

Massenspektrometer: Varian Saturn 3 mit MS-MS-Option

4. Spektrenbibliothek und Ergebnisse MS

Für die massenspektrometrische Identifizierung der Arzneimittelwirkstoffe und Metabolite wurden für die neutralen und sauren Verbindungen je eine Massenspektrenbibliothek angelegt. Einige Musterspektren sind als Anlage beigefügt. Die Retentionsfolgen der verschiedenen Wirkstoffe sind zwei beiliegenden Kapillargaschromatogrammen zu entnehmen.

Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit konnte mittels Einsatz der MS-MS erreicht werden. Hier wurde im sog. SIM-Modus gearbeitet. Je nach Substanz können Bestimmungsgrenzen von 0,01 bis 0,1 µg/l erreicht werden.

Tabelle 2 – GC-MS-Bedingungen neutrale Arzneimittel

| Wirkstoff | Ret.Zeit (min.) | Ion für SIM |
|-------------------------------|-----------------|-------------|
| Phenacetin | 23.71 | 179 |
| Phenazon | 28.08 | 188 |
| Carbamazepin | 29.85 | 193 |
| Fenofibrat | 40.06 | 221 |
| Pentoxifyllin | 40.53 | 121 |
| Methylpentadecanoat (Int.St.) | 26.11 | 143 |

Tabelle 3 – GC-MS-Bedingungen saure Arzneimittel

| Wirkstoff | Ret.Zeit (min.) | Ion für SIM |
|--|-----------------|-------------|
| Clofibrinsäure | 19.48 | 128 |
| Ibuprofen | 20.36 | 161 |
| Gemfibrozil | 27.63 | 143 |
| Fenoprofen | 29.79 | 197 |
| Naproxen | 32.41 | 244 |
| Ketoprofen | 34.84 | 193 |
| Indomecatin | 35.15 | 188 |
| Tolfenaminsäure | 35.43 | 208 |
| Diclofenac | 36.21 | 214 |
| Meclofenaminsäure | 37.85 | 243 |
| 2,3-Dichlorphenoxyessigsäure (Int.St.) | 24.78 | 199 |

5. Bearbeitung von Realproben

Im Rahmen verschiedener Messprogramme wurden Kläranlagenabläufe, Rohwässer und Fließgewässerproben untersucht. Die untersuchten kommunalen Kläranlagen sind den Größenklassen II bis V zuzuordnen. Es handelt sich überwiegend um mechanisch-biologische Kläranlagen mit Filtrationsstufe. Eine Kläranlage arbeitet mittels Membrantechnologie. Um den Einfluss von arzneimittelrelevanten Indirekteinleitern zu überprüfen, wurden Kläranlagen mit und ohne angeschlossene Krankenhäuser und Kurkliniken untersucht.

Die untersuchten Rohwässer stammen von verschiedenen Wasserwerken, die Talsperren- und oberflächennah anstehendes Grundwasser aufbereiten.

6. Untersuchungsergebnisse Kläranlagen

Die bisher fünfmalige Untersuchung von 11 Kläranlagen zeigte, dass in den Abläufen von fast allen Kläranlagen 6-7 Einzelwirkstoffe oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenzen nachgewiesen wurden. Die höchsten Messwerte wurden für das Schmerzmittel und Antiepileptikum Carbamazepin (3,1 µg/l) und für das Rheumamittel Diclofenac (1,1 µg/l) gefunden. In drei Kläranlagenabläufen wurden im Vergleich zu den übrigen Probenahmestellen deutlich erhöhte Naproxengehalte (0,16 – 2,3 µg/l) festgestellt. Der Einfluss von arzneimittelrelevanten Indirekteinleitern ist bei Kläranlagen mit niedrigen Einwohnergleichwerten erkennbar, während bei größeren Kläranlagen dsbzgl. derzeit keine eindeutige Aussage möglich ist.

Das lfd. Kläranlagenmessprogramm wird weiter fortgeführt um statistische Auswertungen zu ermöglichen.

In den 15 untersuchten Rohwasserproben wurden keine Arzneimittel in Konzentrationen oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenzen nachgewiesen.

Bei zukünftigen Untersuchungen wird der Steigerung der Nachweisempfindlichkeit bei den neutralen Arzneimittelwirkstoffen Phenacetin, Phenazon und Pentoxyfillin eine hohe Bedeutung beigemessen.

Anhang

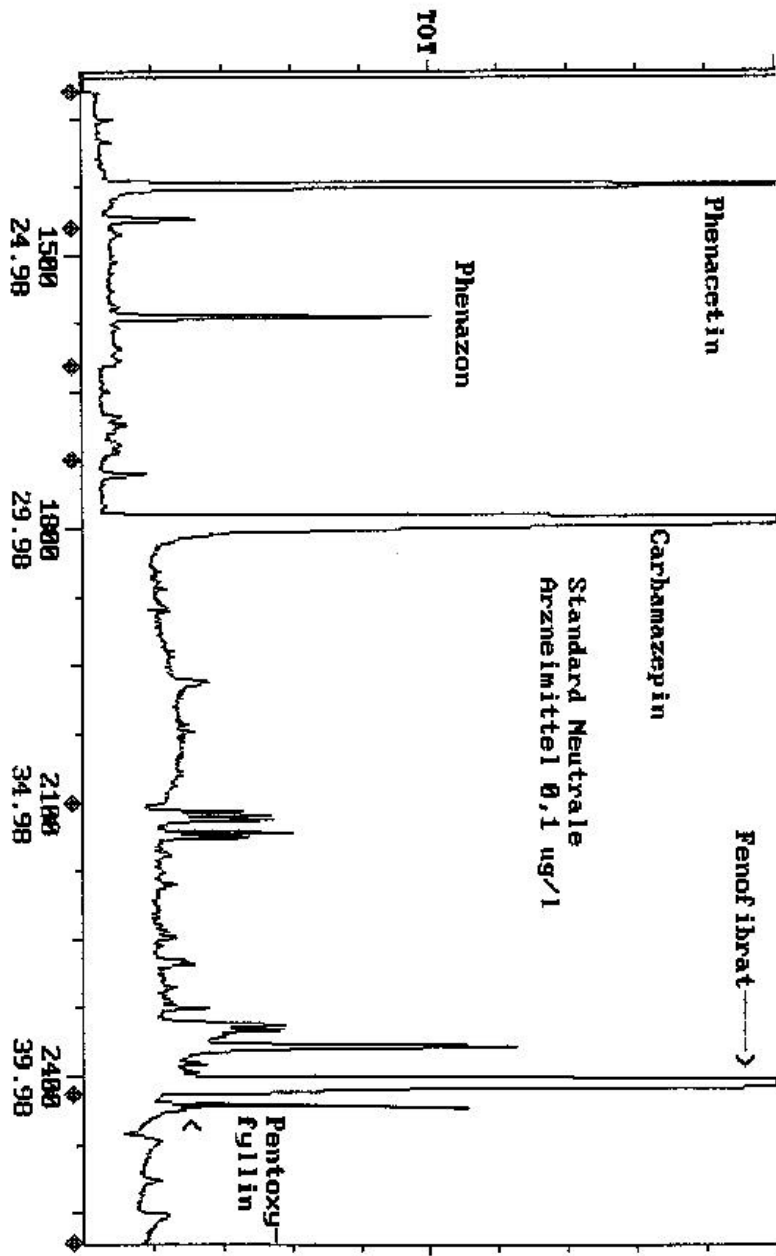
1. Literatur zur Analytik

- 1.1 Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern, F.Sacher, E.Lochow, D.Bethmann, H.J. Brauch - Vom Wasser, 90, 233-243, (1998)
- 1.2 Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern, M.Stumpf, T.Ternes, K.Haberer, P.Seel, W.Baumann - Vom Wasser, 86, 291-303, (1996)
- 1.3 Simultane Bestimmung von Antiseptika und sauren Pharmaka in Abwasser und Fließgewässern, T.Ternes, M.Stumpf, B.Schuppert, K.Haberer - Vom Wasser, 90, 295-309, (1998)
- 1.4 Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern, M.Stumpf, T.Ternes, K.Haberer, W.Baumann - Vom Wasser, 87, 251-261, (1996)
- 1.5 Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers, T.Ternes, Wat.Res. Vol.32, No.11, pp.3245-3260, 1998
- 1.6 Bestimmung von Steroidhormonen in Trink- und Oberflächenwässern, K.Schlett, B.Pfeifer, Vom Wasser, 87, 327-333 (1996)
- 1.7 Bestimmung von Arzneimittelrückständen im Grund- und Oberflächenwasser, T.Heberer, Vortragsmanuscript INCOM 1997
- 1.8 GC/MS/MS zur strukturspezifischen Detektion, H.J.Hübschmann , Sonderdruck aus Laborpraxis mit Massenspektren der Antidepressiva Cyclobenzaprin, Amitryptilin und Doxepin
- 1.9 Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik, M.Syhre, G.Hanschmann, R.Heber, GIT Fachz.Lab. 11/96, 1121-1128
- 1.10 Neue autoselektive GC-Phase im mittelpolaren Bereich für die Umweltanalytik, W.Röder, D.Lennartz, GIT Fachz.Lab. 3/99, 226-229

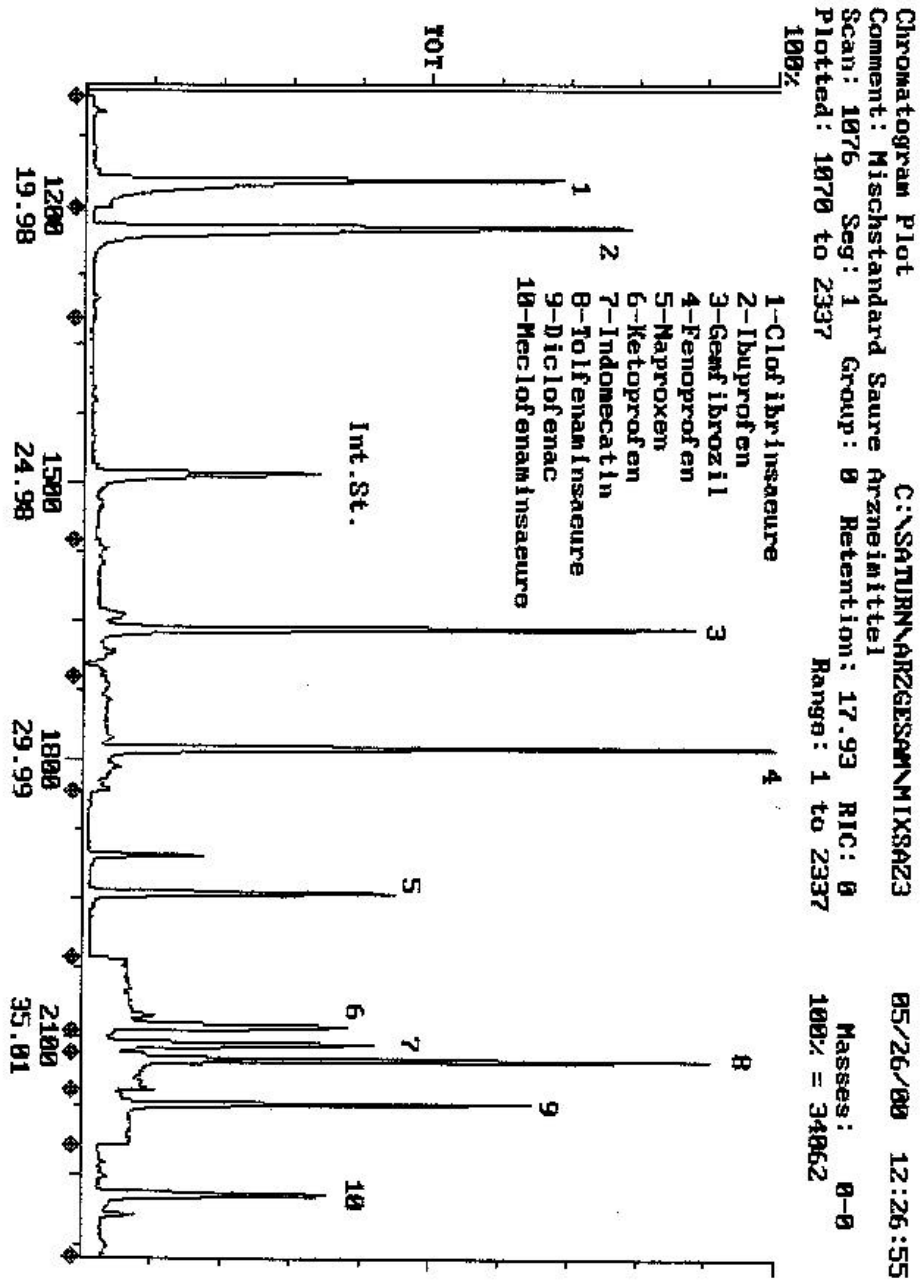
2. Literatur allgemein

- 2.1 Arzneimittel in Gewässern - Risiko für Mensch, Tier und Umwelt ?, Tagungsband Hessische Landesanstalt für Umwelt, 4.6.1998
- 2.2 Endokrin wirksame Stoffe in Oberflächengewässern, Dr.K.Vogt, Kompaktkurs 16.-18.2.1998 Ruhr Uni Bochum
- 2.3 Endokrin wirkende Substanzen - Auswirkungen auf Gewässer und Boden, S.Thaler, Korrespondenz Abwasser 1998 (45) Nr.3
- 2.4 Angriff auf die Männlichkeit, Geo-Heft Nr.12, 1994, S.120-132
- 2.5 Erster BUA-Sachstandsbericht zu hormonähnlich wirkenden Stoffen in der Umwelt, 1997

- 2.6 Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt - Einführung und Sachstand, H.Greim, GDCh-Presseseminar am 21.11.1997
- 2.7 Auswirkungen von Arzneimiteleinträgen auf die Umwelt und die Trinkwasserversorgung Umwelt Nr.1/1999
- 2.8 ATV-Schriftenreihe 15 - Endokrine Stoffe
- 2.9 BLAC - Auswirkungen der Anwendung von Clofibrinsäure und anderer Arzneimittel auf die Umwelt und Trinkwasserversorgung
- 2.10 Endokrin wirkende Stoffe in kommunalen Klärschlämmen - Beispiel zinnorganischer Verbindungen, Wasser & Boden, 50/9, 30-32 (1998)
- 2.11 Noch mehr Gift im Klärschlamm?, Korrespondenz Abwasser 1998 (45) Nr.5
- 2.12 „Endokrin-aktive Stoffe im Bodensee“, 2.Statuskolloquium im Neuen Schloß Meersburg gwf Wasser Abwasser 139 (1998) Nr.8, S. 515-516
- 2.13 Ausgewählte Aspekte zu Krankenhausabwasser, Korrespondenz Abwasser 1998 (45) Nr.12, S. 2225-2230
- 2.14 Umweltprobleme durch Arzneimittel - Literaturstudie, UBA-Texte 60/96
- 2.15 Verschiedene Texte zu einzelnen Arzneimittelwirkstoffen aus Römpf-Chemielexikon
- 2.16 Ergebnis DABAWAS-Abfrage zu Nonylphenol vom 14.04.1994
- 2.17 Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, 20. Kapitel - Hormone, S. 316-344
- 2.18 AOX im Krankenhausabwasser - Eine Studie zu Herkunft, Menge und Substitution, gwf Wasser Abwasser, 140 (1999) Nr.1, S. 20-26
- 2.19 Wirksamkeit der Uferfiltration für die Entfernung von polaren organischen Spurenstoffen gwf Wasser Abwasser, 141 (2000) Nr.4, S. 226-234

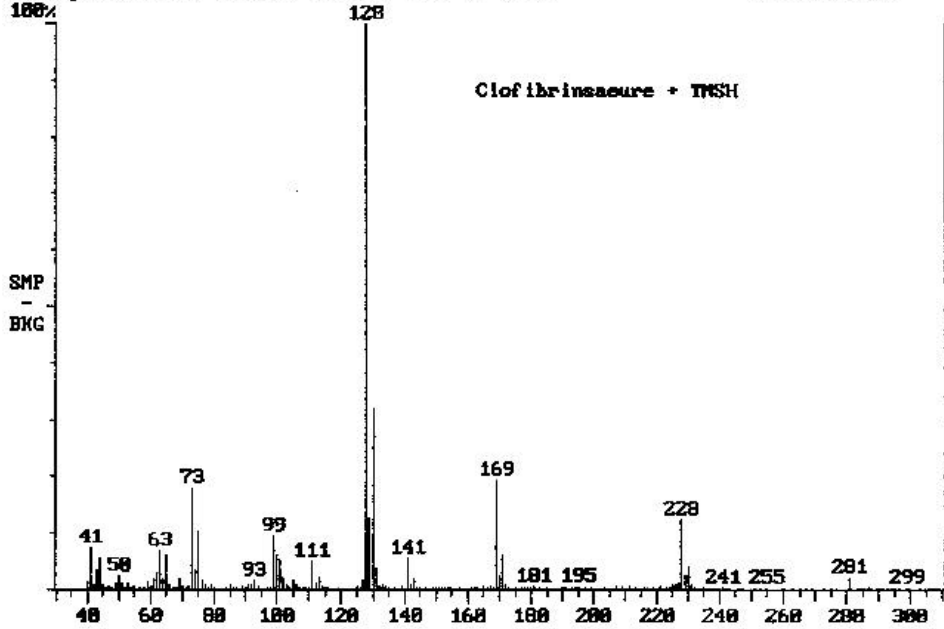


GC-MS-Chromatogramm 1 - Standard neutrale Arzneimittel, 0,1 µg/ml absolut

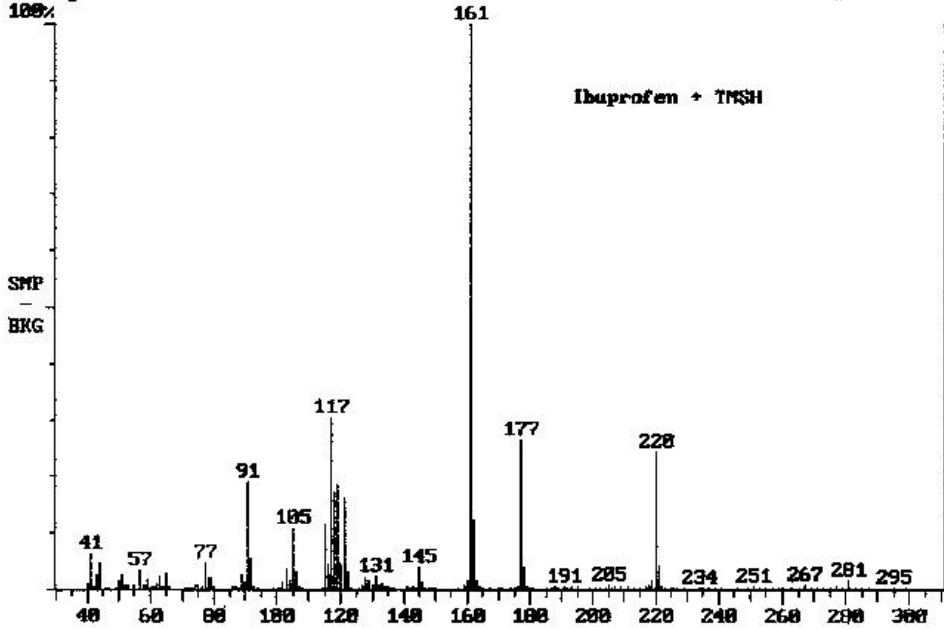


GC-MS-Chromatogramm 2 - Standard saure Arzneimittel, 0,1 µg/ml absolut

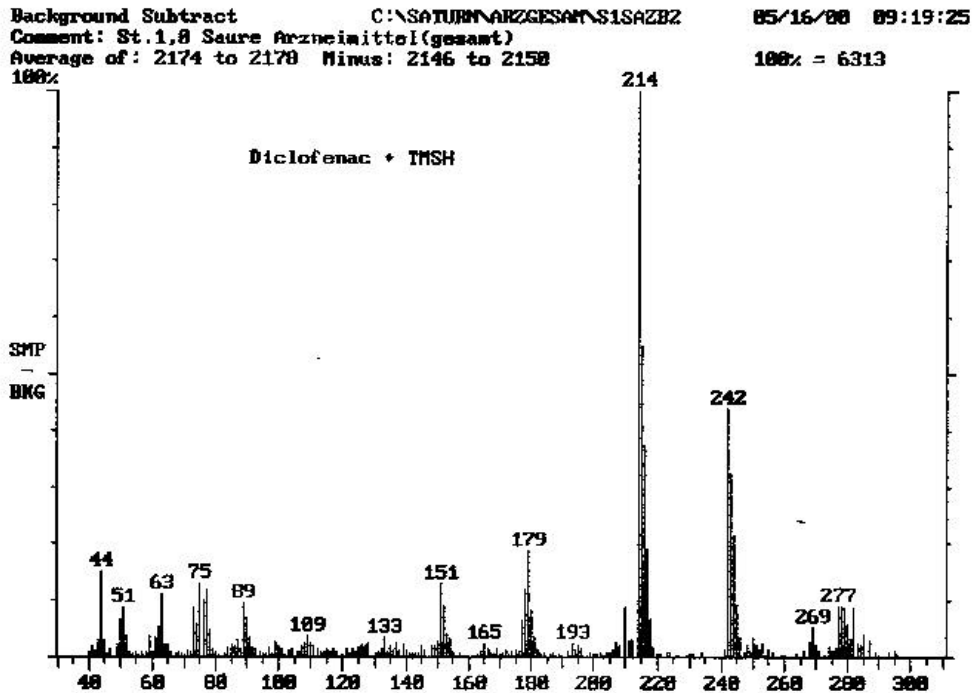
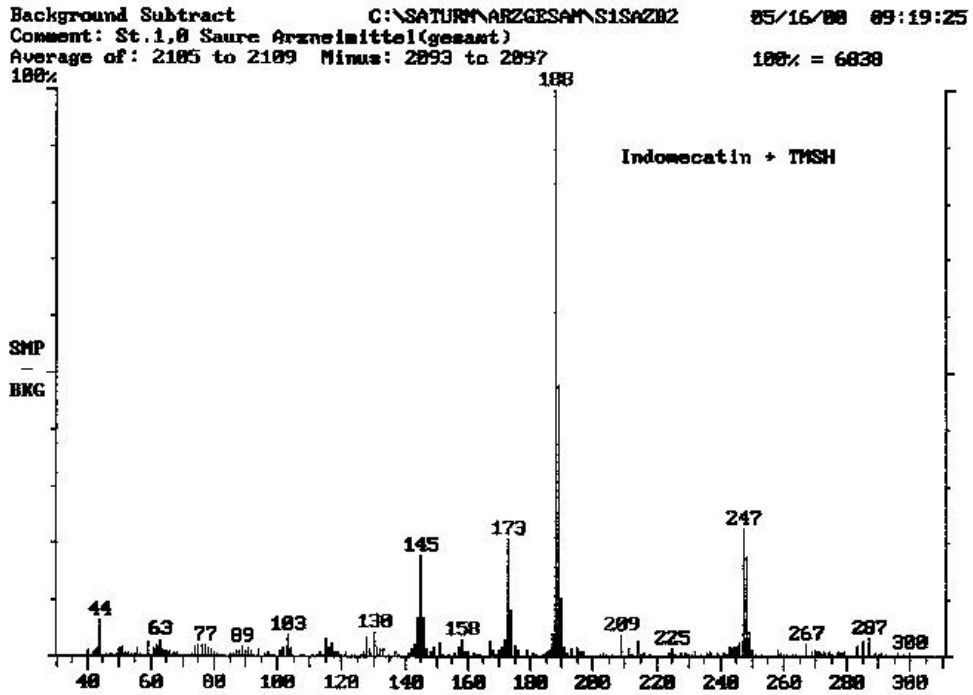
Background Subtract C:\SATURN\ARZGESAM\S1SAZB2 05/16/00 09:19:25
 Comment: St.1,8 Saure Arzneimittel(gesamt)
 Average of: 1168 to 1172 Minus: 1148 to 1152 100% = 17848



Background Subtract C:\SATURN\ARZGESAM\S1SAZB2 05/16/00 09:19:25
 Comment: St.1,8 Saure Arzneimittel(gesamt)
 Average of: 1221 to 1225 Minus: 1234 to 1238 100% = 24445

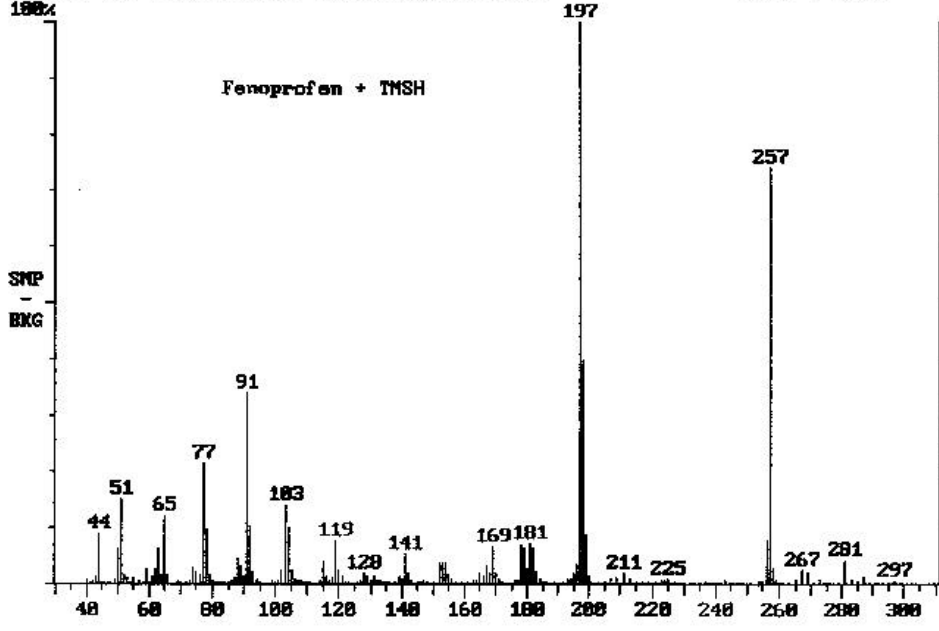


Massenspektren saure Arzneimittel nach Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

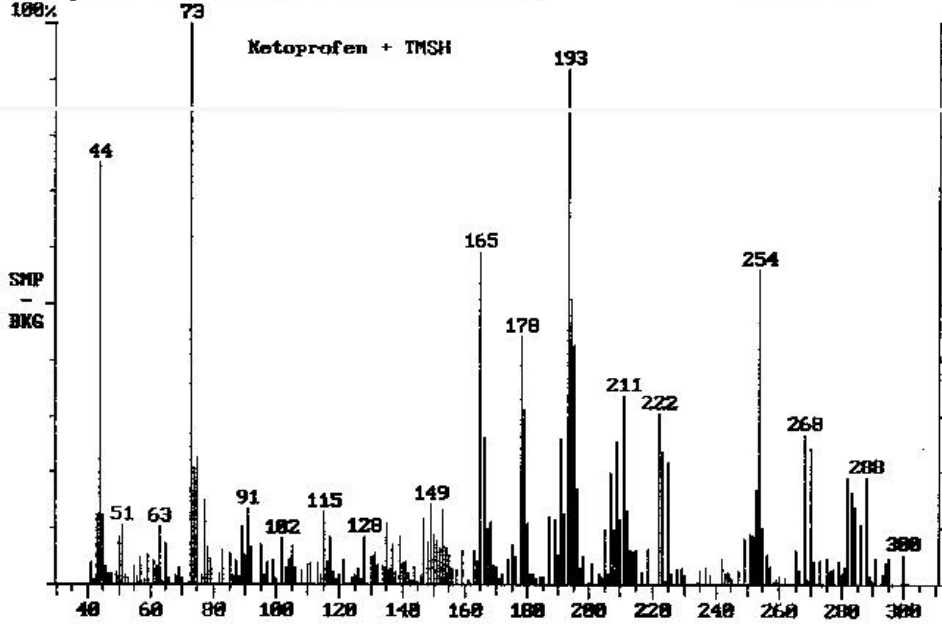


Massenspektren saure Arzneimittel nach Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

Background Subtract C:\SATURN\ARZGESAM\1SAZB2 05/16/00 09:19:25
 Comment: St.1,0 Saure Arzneimittel(gesamt)
 Average of: 1786 to 1798 Minus: 1758 to 1762
 100% = 16742

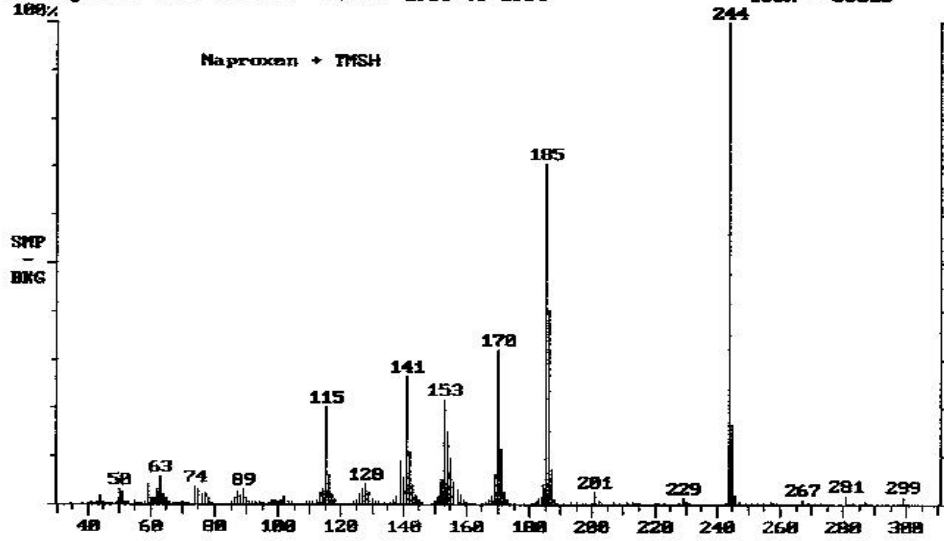


Background Subtract C:\SATURN\ARZGESAM\1SAZB2 05/16/00 09:19:25
 Comment: St.1,0 Saure Arzneimittel(gesamt)
 Average of: 2009 to 2093 Minus: 2062 to 2066
 100% = 750



Massenspektren saure Arzneimittel nach Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

Background Subtract C:\SATURN\ARZGESAM\NETNAPH1 05/16/00 13:28:46
Comment: Saure AZ - Methoxynaphtylpropionsaeure
Average of: 1943 to 1947 Minus: 1938 to 1934
100% = 58513



Massenspektren saure Arzneimittel nach Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)