

**Enantioselektive Analyse  
von chiralen Arzneistoffen, *personal care*-Produkten  
und deren jeweiligen Transformationsprodukten  
in der aquatischen Umwelt**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
am Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Stephanie Selke**

**Universität Hamburg**

**2010**



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2004 bis Juni 2009 unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Hühnerfuß am Institut für Organische Chemie des Department Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Hühnerfuß

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Tag der Disputation: 25. Juni 2010



# Inhalt

<b>1. Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Universum anthropogener Umweltschadstoffe</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Pharmazeutika und „personal care“-Produkte als Umweltkontaminanten</b>	<b>2</b>
1.2.1. Hintergrund	2
1.2.2. Gefahren für die Umwelt	4
1.2.3. Der Aspekt der Chiralität	5
1.2.4. Metabolismus und Transformationsprozesse	7
<b>1.3. Enantioselektive Analyse</b>	<b>11</b>
1.3.1. Chromatographische Trennung von Enantiomeren	11
1.3.2. Analyse von Enantiomeren in der aquatischen Umwelt	13
<b>1.4. Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>2. Methodenetablierung zur enantioselektiven Bestimmung von PPCP in aquatischen Systemen</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Auswahl der zu untersuchenden Substanzen</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Methodenziele</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Derivatisierungen der Referenzsubstanzen</b>	<b>20</b>
2.3.1. Derivatisierung der Betablocker	21
2.3.2. Derivatisierung der Betablocker-Metaboliten	24
2.3.3. Derivatisierung der sauren PPCP	27
<b>2.4. Enantioselektive chromatographische Trennung</b>	<b>29</b>
2.4.1. Trennung der Betablocker-Enantiomeren	31
2.4.2. Trennung der Enantiomeren der Betablocker-Metaboliten	32
2.4.3. Enantioselektive Trennung der Analgetika	36
2.4.4. Enantioselektive Trennung von Bayrepel und seines Transformationsprodukts	37
2.4.5. Enantioselektive Trennung der UV-Filter	38
2.4.6. Zusammenfassung	40
<b>2.5. Analyse von PPCP in wässriger Matrix</b>	<b>40</b>
2.5.1. Probenahme	41
2.5.2. Probenaufarbeitung	42
2.5.3. Instrumentelle Bestimmung	43
<b>2.6. Methodenvalidierung</b>	<b>45</b>
2.6.1. Normierung	45
2.6.2. Ermittlung der Kenndaten	46

2.6.3.	Hintergrundbelastung	49
<b>3.</b>	<b><i>Das Vorkommen chiraler PPCP in aquatischen Systemen</i></b>	<b>50</b>
<b>3.1.</b>	<b>Probenahmestellen</b>	<b>50</b>
<b>3.2.</b>	<b>Betablocker und ihre Metaboliten</b>	<b>51</b>
3.2.1.	Vorkommen und Verteilung	51
3.2.2.	Enantioselektive Analyse	61
<b>3.3.</b>	<b>Saure PPCP</b>	<b>68</b>
3.3.1.	Vorkommen und Verteilung	68
3.3.2.	Enantioselektive Analyse	73
<b>3.4.</b>	<b>UV-Filter</b>	<b>85</b>
<b>4.</b>	<b><i>Das Schicksal chiraler PPCP in der aquatischen Umwelt</i></b>	<b>90</b>
<b>4.1.</b>	<b>Untersuchung der Transformationen</b>	<b>90</b>
<b>4.2.</b>	<b>Transformationen von Metoprolol</b>	<b>91</b>
4.2.1.	Enantioselektive Analyse von Metoprolol	91
4.2.2.	Identifizierung von Transformationsprodukten	93
4.2.3.	Enantioselektive Analyse der Transformationsprodukte von Metoprolol	98
<b>4.3.</b>	<b>Transformationen von Propranolol</b>	<b>103</b>
4.3.1.	Enantioselektive Analyse von Propranolol	103
4.3.2.	Identifizierung von Transformationsprodukten	105
4.3.3.	Enantioselektive Analyse von NLA	107
<b>4.4.</b>	<b>Transformationen von Bayrepel und Bayrepel-Säure</b>	<b>109</b>
4.4.1.	Abbau und Bildung	109
4.4.2.	Stereoselektive Analyse	112
<b>4.5.</b>	<b>Transformationen von Naproxen</b>	<b>115</b>
4.5.1.	Abbau und Bildung	115
4.5.2.	Enantioselektive Analyse von Naproxen	118
<b>5.</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b><i>Summary</i></b>	<b>123</b>
<b>7.</b>	<b><i>Experimenteller Teil</i></b>	<b>126</b>
<b>7.1.</b>	<b>Darstellung der Referenzverbindungen</b>	<b>126</b>
7.1.1.	Darstellung von ( <i>rac</i> )-Naproxen	126
7.1.2.	Darstellung von Metoprolol-Säure	128
7.1.3.	Darstellung von $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol	129
7.1.4.	Darstellung von Desmethyl-Metoprolol	132

7.1.5.	Darstellung von Naphthoxymilchsäure _____	133
7.1.6.	Darstellung von 4'-Hydroxypropranolol _____	135
7.1.7.	Bayrepel und Bayrepel-Säure _____	139
<b>7.2.</b>	<b>Instrumentelles _____</b>	<b>141</b>
7.2.1.	Verwendete Geräte _____	141
7.2.2.	Verwendete Trennsäulen und Chromatographiebedingungen _____	142
<b>7.3.</b>	<b>Derivatisierungen _____</b>	<b>143</b>
7.3.1.	Trifluoracetylierung der Betablocker _____	143
7.3.2.	Trimethylsilylierung/Trifluoracetylierung der Betablocker _____	143
7.3.3.	Reaktion mit Chlormethyldimethylsilylchlorid _____	144
7.3.4.	Reaktion mit Methylchlormethanoat (MCM) _____	144
7.3.5.	Säurekatalysierte Methylierung _____	144
<b>7.4.</b>	<b>Probenaufarbeitung _____</b>	<b>145</b>
7.4.1.	Probenvorbereitung _____	145
7.4.2.	Vorbereitung der Extraktionskartuschen _____	145
7.4.3.	Extraktion und Trocknen der Festphase _____	145
7.4.4.	Elution _____	146
<b>7.5.</b>	<b>Transformationsexperimente _____</b>	<b>147</b>
7.5.1.	Analyse von Metoprolol und Propranolol _____	147
7.5.2.	Analyse von Bayrepel und Bayrepel-Säure _____	147
7.5.3.	Analyse von Naproxen _____	148
<b>7.6.</b>	<b>Verwendete Chemikalien _____</b>	<b>149</b>
<b>7.7.</b>	<b>Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen, Kat. I und II _____</b>	<b>153</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur _____</b>	<b>154</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang _____</b>	<b>169</b>





## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Bay	Bayrepel
BayCOOH	Bayrepel-Säure
Biso	Bisoprolol
bs	breites Singulett
c	Konzentration
CMDMCS	Chlormethyldimethylchlorsilan
d	Dublett, Tag(e)
dd	doppeltes Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEA	Diethylamin
DEET	Diethyltoluylamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMMeto	Desmethyl-Metoprolol
DMNPX	Desmethyl-Naproxen
DMS	Dimethylsilamorpholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dq	doppeltes Quartett
E	Enantiomer
ECM	Ethylchlormethanoat
EF	Enantiomerenfraktion
EHMC	Ethylhexylmethoxycinnamat
EI	Electron impact
ER	Enantiomerenverhältnis
Et	Ethyl-
EtOAc	Ethylacetat
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
HCH	Hexachlorcyclohexan
HPLC	High performance liquid chromatography

Ibu	Ibuprofen
IbuCOOH	Hydroxy-Ibuprofen
IbuOH	Carboxy-Ibuprofen
ID	Innendurchmesser
Kap.	Kapitel
KdL	König der Löwen
KW	Klärwerk
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
m	Multipllett
m/z	Masse/Ladung
MBC	Methylbenzylidencampher
MBTFA	<i>N</i> -Methyl-bis(trifluoracetamid)
MCM	Methylchlormethanoat
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
Meto	Metoprolol
MetoCOOH	Metoprolol-Säure
MetoK	Keto-Metoprolol
MetoOH	Hydroxy-Metoprolol
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoracetamid
n	Anzahl an Bestimmungen
n. a.	nicht analysiert
n. aw.	nicht auswertbar
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht detektiert
NAA	Naphthoxyacetic acid
NLA	Naphthoxymilchsäure
NPX	Naproxen
OCR	Octocrylene
OHPL	Hydroxy-Propranolol
OTC	Over the counter
PCB	Polychlorierte Biphenyle
POP	persistant organic pollutants
PPCP	Pharmazeutika und personal care-Produkte
PrOH	Propanol

Prop	Propranolol
q	Quartett
quin	Quintett
rel.	relativ
Rf	Retentionsfaktor
RT	Retentionszeit
s	Singulett
sept	Septett
s/n	Signal-Rausch-Verhältnis
STP	sewage treatment plant
t	Triplett
T	Trennqualität
Tab.	Tabelle
TBDM	<i>tert</i> -Butyl-dimethylsilyl-
TFA	Trifluoracetyl-
TFAA	Trifluoracetanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl-
UV	Ultraviolett
WfR	Wiederfindungsrate

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Eintragspfade von PPCP in die Umwelt	3
Abb. 2:	Enantiomere des Thalidomids	6
Abb. 3:	Metabolismusprozesse	7
Abb. 4:	Hauptwege des Metoprolol-Metabolismus	8
Abb. 5:	Drei-Punkt-Regel der chiralen Erkennung	11
Abb. 6:	Strukturen von Metoprolol und Propranolol sowie ihrer Metaboliten	16
Abb. 7:	Strukturen von Naproxen und Ibuprofen sowie ihrer ausgewählten Metaboliten	17
Abb. 8:	Strukturen der chiralen UV-Filter	19
Abb. 9:	Strukturen des Insektenrepellants Bayrepel und seines Oxidationsproduktes	20
Abb. 10:	Derivatisierungen der Betablocker	22
Abb. 11:	EI-Massenspektren der TMS-TFA-Derivate und DMS-Derivate von MetoOH und OHPL	25
Abb. 12:	Zweitstufige Derivatisierung von MetoCOOH	26
Abb. 13:	EI-Massenspektrum des methylierten DMS-Derivats von MetoCOOH	26
Abb. 14:	Derivatisierung der sauren PPCP mit MCM am Beispiel von NLA	27
Abb. 15:	EI-Massenspektren von NLA- und DMNPX-Derivaten	28
Abb. 16:	Getrennte Enantiomere von Metoprolol und Propranolol an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM	31
Abb. 17:	Getrennte Enantiomere von Metoprolol-Säure an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM	32
Abb. 18:	Enantioselektive Trennung von $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol an Kromasil-CC	34
Abb. 19:	Enantioselektive Trennung von Naphthoxymilchsäure	35
Abb. 20:	Enantioselektive Trennung von Ibuprofen und seines Metaboliten Hydroxy-Ibuprofen an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM	36
Abb. 21:	Getrennte Enantiomere von Naproxen an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM	36
Abb. 22:	Enantioselektive Trennung von a) Bayrepel und b) Bayrepel-Säure an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM	37
Abb. 23:	Enantioselektive Trennung von 4-Methylbenzylidencampher	38
Abb. 24:	Enantioselektive Trennung von Octocrylene an Kromasil-CC	39
Abb. 25:	Grundlegende Schritte der Analyse von Wasserproben	41
Abb. 26:	Arbeitsschritte der enantioselektiven Bestimmung	44
Abb. 27:	Probenahmestellen an der Elbe und der Alster in Hamburg	51
Abb. 28:	Struktur des Betablockers Bisoprolol	53
Abb. 29:	EI-Massenspektren von Bisoprolol	54

Abb. 30:	Struktur des Transformationsprodukts $\alpha$ -Keto-Metoprolol	55
Abb. 31:	EI-Massenspektren von MetoK	55
Abb. 32:	Chromatogramme zweier Standardmessungen und einiger Umweltproben aus den kälteren Monaten	56
Abb. 33:	Chromatogramme von einer Standardmessung von MetoCOOH sowie von Umweltproben vom Herbst und Winter 2008/2009	57
Abb. 34:	relative Konzentrationsverhältnisse der Betablocker und der gefundenen Metaboliten im Klärwerksablauf von 2009	59
Abb. 35:	Propranolol und Bisoprolol im Klärwerksablauf von 2004 und 2009	60
Abb. 36:	Enantiomere von Metoprolol in verschiedenen Umweltproben	62
Abb. 37:	Enantiomere von Propranolol in verschiedenen Umweltproben	63
Abb. 38:	Getrennte Enantiomere eines Standards von MetoK an Kromasil-CC	65
Abb. 39:	Enantiomere von MetoCOOH im Klärwerksablauf	65
Abb. 40:	relative Konzentrationsverhältnisse der MetoOH-Stereoisomeren im Klärwerksablauf	66
Abb. 41:	relative Konzentrationsverhältnisse der MetoOH-Stereoisomeren bei der menschlichen Ausscheidung	66
Abb. 42:	Anzahl der Positivbefunde der sauren PPCP in den Umweltproben	68
Abb. 43:	relative Anteile der sauren PPCP zu unterschiedlichen Jahreszeiten	70
Abb. 44:	GC-MS-Chromatogramme von einer Naproxen- und Desmethylnaproxen-Standardmessung sowie von zwei Proben	71
Abb. 45:	Enantiomere von Ibuprofen in verschiedenen Umweltproben	73
Abb. 46:	Getrennte Enantiomere von IbuOH in verschiedenen Umweltproben	74
Abb. 47:	Enantiomere von Ibuprofen in Umweltproben aus Karachi, Pakistan	76
Abb. 48:	Enantiomere von Hydroxy-Ibuprofen in Umweltproben aus Karachi, Pakistan	76
Abb. 49:	Enantiomere von Naproxen in verschiedenen Umweltproben	78
Abb. 50:	Enantioselektive Analyse von Naproxen in Umweltproben aus Karachi, Pakistan	79
Abb. 51:	Enantiomere von Desmethylnaproxen in Proben	80
Abb. 52:	Enantiomere von BayCOOH in verschiedenen Proben von der Elbe	82
Abb. 53:	Enantiomere von BayCOOH in verschiedenen Proben der Alster	83
Abb. 54:	GC-MS-Chromatogramme der UV-Filter	86
Abb. 55:	GC-MS-Chromatogramme der UV-Filter vom Klärwerksablauf im Vergleich zu einem entsprechenden Standard	87
Abb. 56:	EI-Massenspektren von MBC und OCR: Referenzspektren sowie Spektren aus Umweltproben	88

Abb. 57:	EI-Massenspektren von EHMC	89
Abb. 58:	Enantiomere von Metoprolol in dotiertem Elbe-Wasser	91
Abb. 59:	Enantiomere von Metoprolol in angereichertem Wasser von der Alster	92
Abb. 60:	Auftreten und Verschwinden von Transformationsprodukten von Metoprolol in angereichertem Elbe-Wasser	93
Abb. 61:	Bildung von MetoCOOH in dotiertem Wasser von der Elbe	94
Abb. 62:	EI-Massenspektrum der Verbindungen 3 und 4	95
Abb. 63:	Strukturen der Transformationsprodukte 1 und 4 sowie die mögliche Struktur der Verbindung 3	95
Abb. 64:	Bildung von MetoK und MetoOH in der Umwelt	96
Abb. 65:	Relative Anteile der Stereoisomeren von MetoOH in angereichertem Wasser der Elbe	100
Abb. 66:	Enantiomere von MetoCOOH in angereichertem Wasser der Elbe	101
Abb. 67:	Enantiomere von $\beta$ -Carbonyl-Metoprolol in angereichertem Wasser der Elbe	102
Abb. 68:	Enantiomere von Propranolol in angereichertem Wasser der Elbe im November	103
Abb. 69:	Enantiomere von Propranolol in angereichertem Wasser der Elbe im Juli	104
Abb. 70:	Bildung von NLA in angereichertem Wasser der Elbe	105
Abb. 71:	Auftreten eines weiteren Transformationsprodukts in angereichertem Wasser der Elbe	106
Abb. 72:	EI-Massenspektrum des Transformationsproduktes bei 8.3 min	106
Abb. 73:	Peakflächenvergleich von NLA und NAA nach 19 Tagen in angereichertem Wasser	106
Abb. 74:	Transformation von Propranolol in der Umwelt	107
Abb. 75:	Abnahme von Bayrepel und Bildung von BayCOOH in mit Bayrepel angereichertem Wasser von der Alster bei Raumtemperatur	110
Abb. 76:	Abnahme von Bayrepel und Bildung von BayCOOH in mit Bayrepel angereichertem Wasser von der Alster bei 1-7 °C	111
Abb. 77:	Stereoisomere von Bayrepel zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dotierung	112
Abb. 78:	Stereoisomere von Bayrepel-Säure in den mit Bayrepel angereicherten Ansätzen	113
Abb. 79:	Stereoisomere von Bayrepel-Säure in mit Bayrepel-Säure angereichertem Wasser	114
Abb. 80:	Abnahme von Naproxen und Bildung von Transformationsprodukten in angereichertem Wasser der Elbe	116

Abb. 81:	EI-Massenspektren der Transformationsprodukte 1 und 2	117
Abb. 82:	Referenzspektrum von 2-Acetyl-6-Methoxynaphthalin	118
Abb. 83:	Enantiomere von Naproxen in dotiertem Wasser der Alster und der Elbe	119
Abb. 84:	Chromatogramme der Derivate von MetoOH und OHPL	169
Abb. 85:	Karte des Großraums Karachi/Pakistan	173
Abb. 86:	Chromatogramme der Transformationsexperimente mit dotiertem Wasser der Alster	174
Abb. 87:	Konzentration von Naproxen in den dotierten Alsterwasser-Ansätzen an verschiedenen Tagen	175

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über einige Pharmazeutika- Metaboliten	9
Tab. 2:	EI-Fragmente verschiedenen Betablocker-Derivate	23
Tab. 2:	Angewendete Derivatisierungen für die enantioselektive Analyse	42
Tab. 4:	Verwendete Ionenspuren zur Identifizierung der Verbindungen	44
Tab. 5:	Linearität, Wiederfindungsraten einschließlich Standardabweichungen für Oasis HLB und Detektionsgrenzen	47
Tab. 6:	Linearität, Wiederfindungsraten einschließlich Standardabweichungen für SDB-1 und Oasis sowie Detektionsgrenzen für die UV-Filter	47
Tab. 7:	Übersicht über die gefundenen Betablocker und ihrer Metaboliten in den verschiedenen Umweltproben	52
Tab. 8:	EF-Werte von Metoprolol und Propranolol in den Umweltproben	63
Tab. 9:	EF-Werte der Metoprolol-Metaboliten im Ablauf des Klärwerks	65
Tab. 10:	Übersicht über die beprobten Stationen	68
Tab. 11:	Enantiomerenfraktionen von Ibu und IbuOH in den Umweltproben	75
Tab. 12:	EF-Werte von Ibu und IbuOH in ausgewählten Pakistan-Proben	77
Tab. 13:	Enantiomerenfraktionen von Naproxen in verschiedenen Umweltproben	78
Tab. 14:	Enantiomerenfraktionen des erst- und zweitluierenden Enantiomerenpaares von BayCOOH in verschiedenen Umweltproben der Elbe	82
Tab. 15:	Enantiomerenfraktionen des erst- und zweitluierenden Enantiomerenpaares von BayCOOH in verschiedenen Umweltproben der Alster	84
Tab. 16:	Übersicht über die auf UV-Filter hin untersuchten Proben	85
Tab. 17:	EF-Werte von Metoprolol in angereichertem Oberflächenwasser	92
Tab. 18:	Abgeschätzte Konzentrationen der Haupttransformationsprodukte von Metoprolol	97
Tab. 19:	Enantiomerenfraktionen von MetoK in verschiedenen Ansätzen	98
Tab. 20:	Enantiomerenfraktionen von MetoOH in angereichertem Wasser der Elbe	99
Tab. 21:	Enantiomerenfraktionen von Propranolol in verschiedenen Ansätzen angereichertem Wassers der Elbe	104
Tab. 22:	Enantiomerenfraktionen von NLA in den verschiedenen Ansätzen	107
Tab. 23:	Abgeschätzte Konzentrationen von Bayrepel und Bayrepel-Säure zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dotierung mit Bayrepel	111
Tab. 24:	Abgeschätzte Konzentrationen von Bayrepel-Säure zu verschiedenen Zeitpunkten in mit Bayrepel-Säure angereichertem Wasser	112
Tab. 25:	Metoprolol-Ansätze	147
Tab. 26:	Propranolol-Ansätze	147



Tab. 27:	Naproxen-Ansätze	148
Tab. 28:	Verwendete KMR-Substanzen	153
Tab. 29:	Verwendete Wiederfindungsraten für die Abschätzung der Konzentrationen der sauren PPCP	169
Tab. 30:	Durchschnittliche Konzentrationen von Metoprolol in den Oberflächengewässerproben	172
Tab. 31:	Konzentrationen der Betablocker und Metaboliten im Klärwerksablauf im Feb. 2009	172
Tab. 32:	Abgeschätzte Konzentrationen der sauren PPCP in Proben	172



# 1. Einführung

## 1.1. Das Universum anthropogener Umweltschadstoffe

Chemikalien sind im täglichen Leben allgegenwärtig, da sie dazu beitragen, die Lebensqualität zu verbessern und die Gesundheit zu erhalten. Die Bandbreite reicht davon von Alltagschemikalien, die z. B. in Textilien, in Wasch- und Reinigungsmitteln, in Spielzeug oder in Medikamenten enthalten sind, bis zu Agro- und Industriechemikalien, die in der Schädlingsbekämpfung und bei der Entwicklung neuer Produkte und Technologien Anwendung finden. Der Großteil dieser anthropogenen Substanzen gelangt letztlich in die aquatische Umwelt, von wo aus sie sich weiter ausbreiten und verteilen können. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die große Belastung der Arktis durch Dioxine, obwohl die dort heimische Bevölkerung so gut wie keine Industriechemikalien verwendet oder produziert <sup>[1]</sup>. Zu den Substanzen, die in den 1960er und 1970er Jahren im Fokus der Rückstandsanalytik standen, gehören vor allem die in früheren Jahrzehnten in großen Mengen eingesetzten Pestizide und Industriechemikalien wie die Insektizide DDT, Chlordan, Heptachlor oder Aldrin, ferner PCB, die als Kühl- und Isolierflüssigkeit insbesondere in Transformatoren Anwendung fanden, sowie Dioxine und Furane, die bei der Produktion in der chemischen Industrie anfallen <sup>[2, 3]</sup>. All diese Verbindungen zeichnen sich durch eine besonders hohe Persistenz (*persistent organic pollutants*, POPs) aus, was sie extrem langlebig macht, zudem besitzen sie akut karzinogene oder mutagene Eigenschaften. Über ein Dutzend dieser Substanzen ist aus diesen Gründen in den Industrieländern seit langem verboten, in Entwicklungsländern hingegen dürfen sie nach wie vor produziert und eingesetzt werden. Sie zählen zu den so genannten klassischen anthropogenen Schadstoffen. Zu den „neueren“ Substanzen (*emerging pollutants*), deren Bedeutung als Umweltschadstoffe erst ab den 1980er Jahren erkannt wurde, zählen bromierte Flammschutzmittel, die u. a. in Computern oder Möbeln eingesetzt werden, Phthalate, die als Weichmacher in Kunststoffen verwendet werden oder Alltagschemikalien wie Arzneistoffe und Körperpflegemittel. Zu letzteren gehören u. a. Moschusduftstoffe, die in einer Vielzahl von Kosmetika sowie Wasch- und Reinigungsmitteln breite Anwendung finden. Aufgrund ihrer bioakkumulativen und toxischen Eigenschaften sind dabei Nitromoschusverbindungen mittlerweile größtenteils durch polycyclische Verbindungen (Galaxolid und Tonalid) ersetzt worden. Durch ihren intensiven Einsatz sind diese Verbindungen in der Umwelt jedoch längst ubiquitär verbreitet <sup>[4]</sup>. Das jüngste Beispiel aus dem Bereich der anthropogenen Umweltschadstoffe sind Nanopartikel, die ebenfalls in Wasch- und Körperpflegemitteln, in Lebensmitteln und anderen Alltagsgegenständen eingesetzt werden. Sie sind derzeit schon in über 800 Produkten zu finden, und erste Studien berichten bereits über ihr Auftreten in der Umwelt <sup>[5, 6]</sup>.

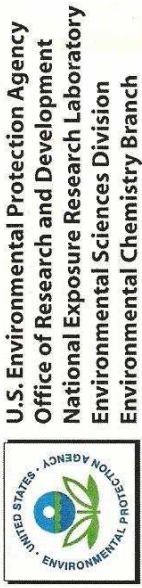
## 1.2. Pharmazeutika und „*personal care*“-Produkte als Umweltkontaminanten

### 1.2.1. Hintergrund

Über das Vorkommen von Arzneistoffen in der aquatischen Umwelt wurde erstmals 1984 berichtet <sup>[7]</sup>. Die beiden Antibiotika Erythromycin und Tetracyclin sowie Clofibrin-Säure, der aktive Metabolit eines lipidregulierenden Mittels, wurden in Oberflächengewässern in Großbritannien qualitativ bestimmt. Der heutzutage verwendete Begriff PPCP (Pharmazeutika und *personal care*-Produkte) umfasst neben den verschreibungspflichtigen und -freien Medikamenten in der Human- und Veterinärmedizin und den aktiven Inhaltsstoffen von Körperpflege-, Wasch- und Reinigungsmitteln wie Duftstoffe oder Sonnenschutzmittel ebenfalls Diagnostika (z. B. Röntgenkontrastmittel), Freizeitdrogen sowie Nahrungsergänzungsmittel und Diätzusatzstoffe. Zu den Pharmazeutika in der Human- und Veterinärmedizin gehören dabei u. a. schmerz- und entzündungshemmende Mittel, Betablocker, Antibiotika, Lipidregulierer und synthetische Östrogene. Die verwendeten Mengen bewegen sich dabei durchaus in der gleichen Größenordnung wie die einiger Agrochemikalien. So wurden beispielsweise im Jahr 2000 allein in Deutschland etwa 150 t des Schmerzmittels Ibuprofen verschrieben <sup>[8]</sup>. Berücksichtigt man zusätzlich die nicht-verschreibungspflichtigen Anteile, liegt die Menge noch um ein Vielfaches höher. Im Gegensatz zu den Pharmazeutika werden als Körperpflegemittel alle chemischen Substanzen oder deren Zubereitungen bezeichnet, die zum direkten Gebrauch durch den Endverbraucher am eigenen Körper eingesetzt, jedoch nicht oral aufgenommen werden <sup>[9]</sup>. Der Eintrag von PPCP in die Umwelt unterscheidet sich von dem der klassischen Schadstoffe in der Hinsicht, dass sie überall dort, wo menschliche Zivilisation existiert, kontinuierlich über kommunale oder private Abwässer in die Umwelt gelangen (Abb. 1). Agro- und Industriechemikalien werden punktueller eingetragen, da sie regional verschieden und teils nur saisonal eingesetzt und produziert werden. Hinzu kommt, dass pharmazeutische Substanzen in der Regel sehr viel polarer als die herkömmlichen organischen Schadstoffe sind, wodurch sie insbesondere in der aquatischen Umwelt eine hohe Mobilität besitzen. Einige Pharmazeutika sind deshalb bereits ebenfalls ubiquitär verbreitet <sup>[10, 11]</sup>. Die Vielfalt der freigesetzten Stoffe ist ebenfalls sehr viel breiter als die der klassischen Schadstoffe aufgrund permanenter Neuentwicklungen, was zu einer immer komplexeren Zusammensetzung in der Umwelt führt. Der permanente Einsatz von Pharmazeutika im humanmedizinischen Bereich führt nach der Ausscheidung und Klärwerkspassage dieser Stoffe nachweislich zu einer Belastung der aquatischen Umwelt bis in den µg/L-Bereich. In den letzten Jahren wurde über das Vorkommen einer Vielzahl von Wirkstoffen aus verschiedenen Indikationsgruppen in Klärwerksabläufen, Fließgewässern, im marinen Bereich und sogar im Grundwasser in Deutschland und anderen Ländern berichtet <sup>[11-29]</sup>.

# Origins and Fate of PPCPs† in the Environment

†Pharmaceuticals and Personal Care Products



Legende

- 1 Usage by individuals (1a) and pets (1b)  
Disposal of euthanised/medicated animal carcasses serving as food for scavengers (1c)
- 2 Release of treated/untreated hospital wastes to domestic sewage systems
- 3 Release of untreated/treated sewage waters into surface waters and groundwater (3a and b)
- 4 Transfer of sewage solids ("biosolids") to land
- 5 Direct release to open waters via washing/bathing/swimming
- 6 Discharge of regulated industrial manufacturing waste streams
- 7 Disposal to landfills
- 8 Release to open waters from aquaculture
- 9 Release of drugs that serve as double duty as pest control agents
- 10 Ultimate environmental transport/fate

Abb. 1: Eintragspfade von PPCP in die Umwelt [30]

### 1.2.2. Gefahren für die Umwelt

Die Präsenz von pharmazeutischen Substanzen in der aquatischen Umwelt ist mit Risiken für das Ökosystem sowie den Menschen verbunden. Aus den folgenden Gründen ist der Eintrag von PPCP in die Umwelt bedenklich:

- a) Pharmazeutische Wirkstoffe werden mit der Absicht entwickelt, im menschlichen Körper gezielt auf Enzyme und Rezeptoren zu wirken. Viele dieser Rezeptoren befinden sich jedoch auch in anderen Säugern, Wirbeltieren und auch einigen Wirbellosen. Somit kann einerseits erwartet werden, dass ein Wirkstoff auch spezifisch in solchen Organismen wirkt, die ihm in unbeabsichtigter Weise ausgesetzt sind. Beispiele hierfür sind Beta-blocker, die im menschlichen Körper an Beta-Adreno-Rezeptoren binden und u. a. zur Senkung der Herzfrequenz führen. Einige dieser Rezeptoren kommen auch in Fischen und Wirbellosen wie *Daphnia magna* vor, und Betablocker bewirken in ihnen den gleichen Effekt <sup>[31]</sup>. Andererseits ist es möglich, dass ein Wirkstoff nicht-spezifische Effekte auslöst, die in keiner Beziehung zu den eigentlichen therapeutischen Zielen stehen. Aus solchen Interaktionen rühren in erster Linie toxische Wirkungen her <sup>[32]</sup>.
- b) Aufgrund ihres kontinuierlichen Eintrags können Pharmazeutika in der Umwelt, selbst wenn sie nur eine geringe Persistenz und dadurch eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, quasi konstante Konzentrationsniveaus erreichen. Auf diese Weise werden sie dennoch zu persistenten Verbindungen (Pseudo-Persistenz <sup>[33]</sup>), denen im Wasser lebende Organismen so über ganze Populationsgenerationen hinweg permanent ausgesetzt sind.
- c) Um eine vorzeitige Deaktivierung des Wirkstoffes im Körper zu vermeiden, bevor er die Zielstelle, an der er wirken soll, erreicht hat, oder um seine Verweilzeit im Körper zu verlängern, wird dieser oft funktionalisiert. Dadurch ist der Großteil der Wirkstoffe unempfindlich gegenüber Hydrolyse in der aquatischen Umwelt <sup>[30]</sup>. Zudem besitzen einige Stoffe dadurch eine erhöhte Lipophilie, um z. B. Zellmembranen passieren zu können, und weisen deshalb ein beträchtliches Potential zur Bioakkumulation auf <sup>[34]</sup>. Bei einigen synthetischen Östrogenen ist dies z. B. der Fall.

Durch die zum Teil erhöhte Spezifität und Wirksamkeit der Präparate sind die Konzentrationen der Einzelstoffe in der Umwelt bisweilen zwar gering, aber sie können dennoch eine große Wirkung entfalten. Insbesondere die Wirkung der Gesamtheit all dieser niedrigkonzentrierten Substanzen über einen kontinuierlichen Expositionszeitraum kann zu signifikanten Folgen führen. Synergistische Effekte spielen in diesem Zusammenhang eine große Rolle. Im Gegensatz zu Agro- und anderen Industriechemikalien, die nachgewiesene akut toxische und karzinogene Wirkungen besitzen, dürften die Folgen in diesen Fällen jedoch eher chronischer und schleichender Natur sein <sup>[35]</sup>. Zu den Hauptgefahren gehören dabei zum einem mutagene bzw. genotoxische Effekte und zum anderen endokrine

Wirkungen. Die Belastung von Gewässern durch natürliche und synthetische Östrogene führt beispielsweise zu einer Reihe von reproduktions- und entwicklungsverändernden Effekten wie der Verweiblichung aquatischer Lebensformen oder verminderte Fruchtbarkeit <sup>[36, 37]</sup>. Diese Effekte werden dabei bereits in einem Konzentrationsbereich von wenigen Nanogramm pro Liter beobachtet. Ein drittes Risiko besteht in der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen. Dabei ist besonders die Resistenz einzelner Bakterienstämme gegenüber mehreren Substanzen besorgniserregend. Es gibt Berichte über das verstärkte Vorkommen antibiotikaresistenter Mikroorganismen im Bereich von Kläranlagen <sup>[38-40]</sup>, in marinen Sedimenten <sup>[41]</sup> und Fischen <sup>[42]</sup>.

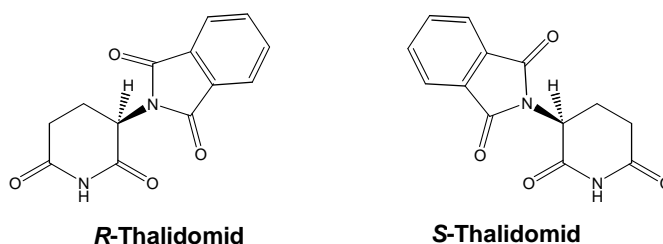
Anders als bei Agro- und Industriechemikalien hat man erst in jüngerer Vergangenheit die Notwendigkeit erkannt, eine Risikoabschätzung für PPCP in der Umwelt vorzunehmen. Mittlerweile unterliegen aber neben den Veterinärpharmazeutika auch Pharmazeutika aus dem Humanbereich vor ihrer Zulassung einer Überprüfung ihrer ökotoxikologischen Eigenschaften <sup>[43, 44]</sup>. Dabei kann allerdings nur bei Veterinärpharmazeutika eine Zulassung aufgrund möglicher Umweltauswirkungen verweigert werden, denn bei Substanzen im humanmedizinischen Bereich ist, insbesondere wenn es um die Therapie lebensbedrohlicher Krankheiten geht, eine Vermeidung oder ein Ersatz der Substanzen undenkbar. Unter die Richtlinien fallen allerdings nur neu zuzulassende Arzneimittel, vorher in Umlauf gebrachte Wirkstoffe müssen diesbezüglich nicht nachträglich geprüft werden. Anfang der 2000er Jahre gab es einige Projekte, die auf EU-Ebene Ansätze entwickelt haben, um die Pharmazeutika-Belastung in Gewässern zu reduzieren. So wurden z. B. im Rahmen des EU-Forschungsvorhabens Poseidon Methoden entwickelt, pharmazeutische Substanzen in Kläranlagen und Wasserwerken effizient zu eliminieren <sup>[45, 46]</sup>.

### **1.2.3. Der Aspekt der Chiralität**

Verhalten sich zwei asymmetrische Gegenstände zueinander wie Bild und Spiegelbild, so lassen sie sich niemals zur Deckung bringen, d. h. sie sind chiral. Das beste Beispiel dafür sind die linke und die rechte Hand oder ein Paar Schuhe. Eine chirales Molekül und sein Spiegelbild werden als Enantiomere bezeichnet. Sie gehören zu den Stereoisomeren, die sich nur in ihrer Konfiguration, also der räumlichen Anordnung der Substituenten, voneinander unterscheiden. Fast alle Biomoleküle, die für die Entwicklung und den Erhalt des Lebens von Bedeutung sind, sind chiral und bestehen nur aus einem der beiden möglichen Enantiomere. So sind beispielsweise Proteine und Enzyme der Säugetiere aus 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, die, bis auf eine Ausnahme, alle zur L-Reihe gehören. Dadurch bedingt, ist die Interaktion eines biologischen Wirt- oder Rezeptormoleküls mit jedem Enantiomer eines chiralen Substrats natürlich verschieden, da in der Regel nur

eines der beiden Enantiomere die „richtige“ Konfiguration aufweist, um mit dem Rezeptormolekül ideal in Wechselwirkung zu treten. Daraus resultieren unterschiedliche physiologische Wirkungen und Wahrnehmungen. So hat z. B. das *R*-Enantiomer des Limonens einen zitrusartigen Geruch, das *S*-Enantiomer hingegen einen terpentinartigen Geruch nach Nadeln. Ein anderes Beispiel ist Carvon, dessen *S*-Enantiomer in der Minze vorkommt, während die *R*-Form für den Geruch von Kümmelöl verantwortlich ist.

Solche konfigurationsabhängigen Substrat-Rezeptor-Interaktionen sind auch für die unterschiedliche Aktivität von stereoisomeren pharmazeutischen Wirkstoffen verantwortlich. In einigen Fällen besitzt nur das eine Enantiomer die gewünschte Aktivität, während das andere gar keine Wirkung zeigt. In anderen Fällen haben die beiden Enantiomere eines Wirkstoffes eine nahezu identische Wirkung oder sie unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer Kinetik bei gleicher Dosierung. Beispiele hierfür sind das Schmerzmittel Ibuprofen oder der Betablocker Propranolol, dessen *S*-Enantiomer eine etwa 100mal stärkere Wirkung als die *R*-Form hat <sup>[47]</sup>. Im dritten Fall besitzen beide Enantiomere absolut unterschiedliche Wirkungen. Während das eine die gewünschten pharmakologischen Effekte hervorruft, wirkt das andere toxisch. Das Schlafmittel Thalidomid, das in Deutschland unter dem Handelsnamen Contergan<sup>®</sup> vermarktet wurde, ist das bekannteste Beispiel dafür (Abb. 2).



**Abb. 2: Enantiomere des Thalidomids**

Die teratogene Wirkung des *S*-Enantiomers führte Ende der 50er Jahre dazu, dass weltweit Kinder mit Missbildungen an der Wirbelsäule und den Gliedmaßen geboren wurden. Das *R*-Enantiomer soll selbst bei hohen Dosierungen undenklich sein, wird jedoch vom Körper in die toxische *S*-Form umgewandelt <sup>[48]</sup>. Dieses Beispiel zeigt sehr deutlich, wie gravierend sich die Enantiomere hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden können, und es wird klar, dass es trotz zahlloser Tests schwierig ist, das Verhalten und die Wirkungen der beiden Enantiomere mit Sicherheit einzuschätzen, da Metabolismvorgänge sehr komplex sind und unterschiedlich zwischen den Spezies sein können. Chemische und pharmazeutische Unternehmen sind deshalb gesetzlich verpflichtet, die Unterschiede der einzelnen Enantiomere von chiralen Wirkstoffen und anderen bioaktiven Verbindungen in Bezug auf ihre pharmakologischen, metabolischen und toxikologischen Eigenschaften zu untersuchen und aufzuklären. Die Hälfte der eingesetzten Pharmazeutika ist chiral, 80 %



davon werden als Racemat und nur 20 % als reines Enantiomer verabreicht <sup>[49]</sup>. Der Trend geht allerdings dahin, in allen Fällen ausschließlich das reine, therapeutisch aktive Enantiomer einzusetzen. Auf diese Weise werden nicht nur Nebenwirkungen minimiert, auch die zu verabreichende Dosis kann in dem Fall um die Hälfte reduziert werden.

#### 1.2.4. Metabolismus und Transformationsprozesse

Nach der Aufnahme einer pharmazeutischen Substanz über den Körper unterliegt sie einem spezifischen Metabolismus (Abb. 3), welcher häufig in zwei Phasen verläuft <sup>[50]</sup>. Im ersten Schritt wird durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse ein so genannter Phase-I-Metabolit gebildet. Dieser wird dann im zweiten Schritt durch Konjugation, z. B. mit einer Glucuronsäure, zu einem Phase-II-Metaboliten umgesetzt. Enthält ein Wirkstoff bereits Hydroxy- oder Carboxylgruppen, kann die Konjugation gemäß Phase II auch direkt ablaufen. Die Umwandlung zu Phase-I- und Phase-II-Verbindungen machen die Mutterverbindung wasserlöslicher, wodurch ihre Ausscheidung beschleunigt wird. Während Phase-I-Metaboliten auch eine pharmakologische Wirkung besitzen können, die oftmals höher als die der Mutterverbindung selbst ist <sup>[51]</sup>, sind Phase-II-Metaboliten in der Regel inaktiv. Die enzymatische oder chemische Spaltung eines solchen Phase-II-Konjugats in der Umwelt setzt dann den ursprünglichen Wirkstoff oder den Phase-I-Metaboliten wieder frei.

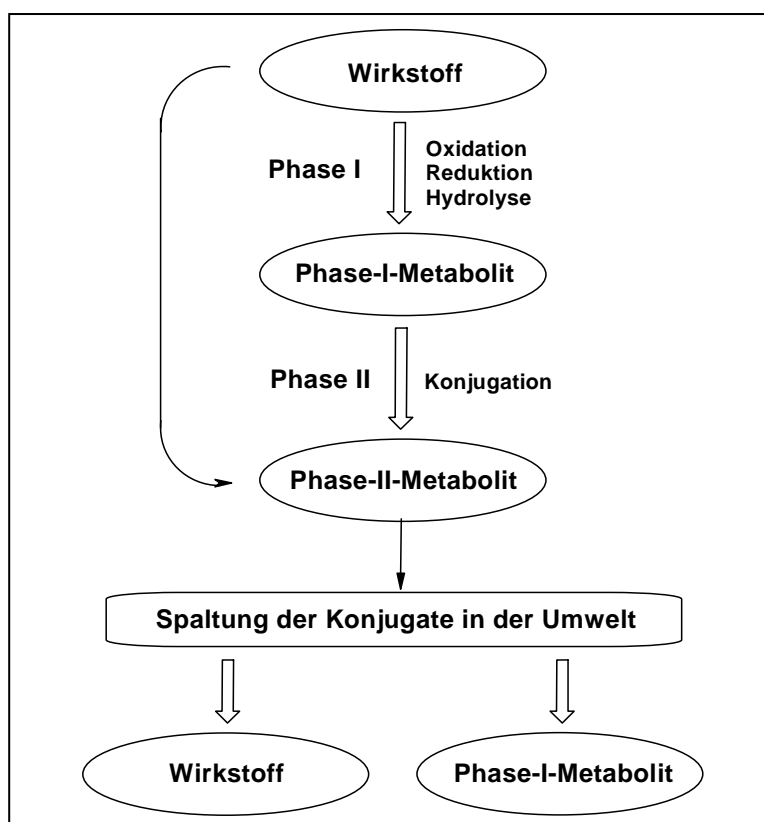


Abb. 3: Metabolismusprozesse

Abb. 4 zeigt den Metabolismus des Betablockers Metoprolol, welcher klinisch bei Bluthochdruck und Herzkrankheiten eingesetzt wird. Er wird hauptsächlich in der Leber über einen oxidativen Metabolismus abgebaut <sup>[52]</sup>. Im menschlichen Körper verlaufen die Hauptabbauwege dabei über eine O-Demethylierung, eine  $\alpha$ -Hydroxylierung und eine oxidative Desaminierung. Über 85 % einer verabreichten Dosis Metoprolol wird über den Urin in Form von Phase-I-Metaboliten ausgeschieden. Dabei ist der Hauptmetabolit die Metoprolol-Säure, welche durch weitere Oxidation des O-demethylierten Produkts entsteht. 65 % einer Dosis der Mutterverbindung werden auf diese Weise eliminiert. Die  $\alpha$ -Hydroxylierung und oxidative Desaminierung finden jeweils nur zu ca. 10 % statt. Der bei ersterem entstehende Metabolit  $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol ist ebenfalls pharmakologisch aktiv, er besitzt 1/10 der Potenz der Mutterverbindung bezüglich der Herabsetzung der Herzfrequenz.

Metoprolol weist an der 2-Position der Propanolaminseitenkette ein asymmetrisch substituiertes Kohlenstoffatom auf. Der Wirkstoff wird in Form des Racemats verabreicht, die Affinität des Beta-Adreno-Rezeptors ist jedoch für die S-Form 25fach höher als für das R-Enantiomer <sup>[53]</sup>. Dies hat eine höhere Plasmakonzentration des ersteren und eine schnellere Ausscheidung der R-Form zur Folge <sup>[54]</sup>. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bildung der Metaboliten stereoselektiv verläuft. So wird z. B. von der Metoprolol-Säure die R-Form bevorzugt gebildet <sup>[55-58]</sup>. Mit der  $\alpha$ -Hydroxylierung entsteht ferner ein zweites Stereozentrum an der Methoxyseitenkette. Dabei wird das R-Isomer bezüglich des neu generierten Stereozentrums dreimal stärker gebildet als dessen Antipode <sup>[55, 59]</sup>.

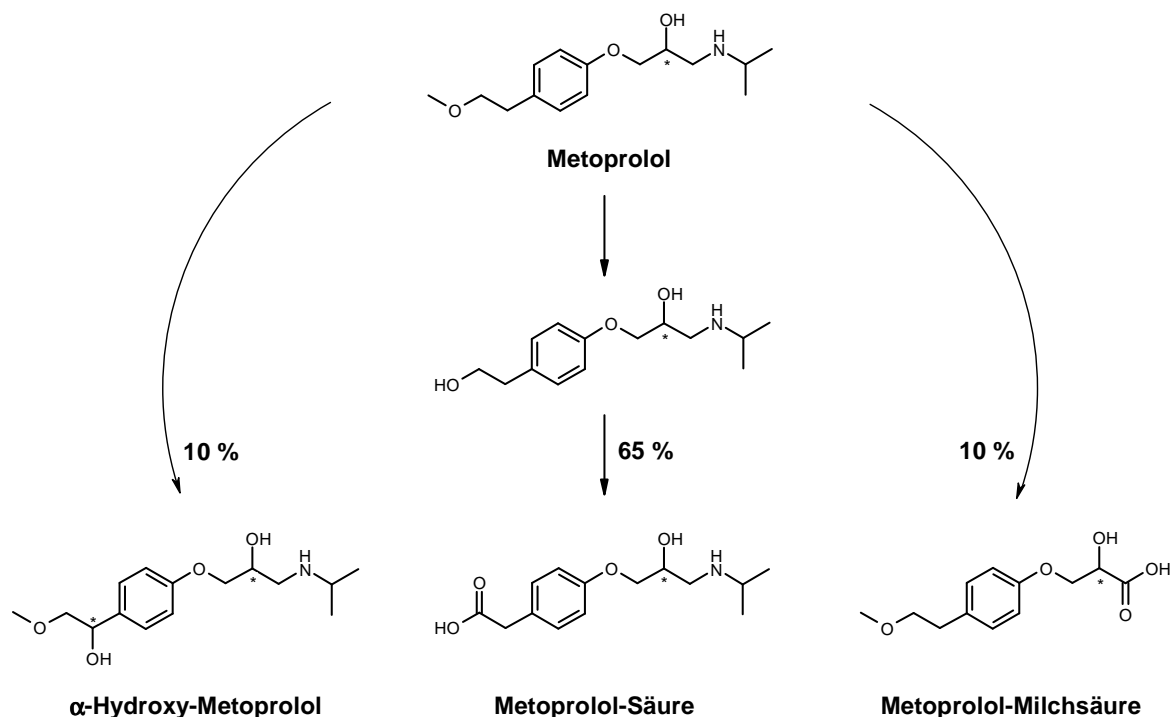


Abb. 4: Hauptwege des Metoprolol-Metabolismus (nach [52])

Wie Metoprolol werden viele weitere Wirkstoffe nach der Aufnahme im Organismus zu hohen Anteilen in ihre Metaboliten überführt und als solche ausgeschieden, während nur ein kleiner Anteil der Mutterverbindung unverändert den Körper verlässt. In einigen Fällen ist der aktive Bestandteil eines Pharmazeutikums erst ein Metabolit selbst. Beispiele hierfür sind die Metaboliten Clofibrinsäure und Fenofibrinsäure, beides lipidregulierende Mittel, die in Form von inaktiven Mutterverbindungen verabreicht werden. Deshalb sind insbesondere Pharmazeutika-Metaboliten bedeutend, und zur Bewertung der Umweltrelevanz ist ihre Erfassung unbedingt notwendig. Tabelle 1 zeigt die prozentualen Ausscheidungsanteile einiger Pharmazeutika und ihrer Hauptmetaboliten.

**Tab. 1: Übersicht über einige Pharmazeutika- Metaboliten** <sup>[60-63]</sup>

Mutterverbindung	Anteil *	Metaboliten	Anteil *
Ibuprofen	15 %	Hydroxy-Ibuprofen	26 %
		Carboxy-Ibuprofen	43 %
Naproxen	44 %	Desmethyl-Naproxen	33 %
Propranolol	17 %	4'-Hydroxy-Propranolol	34 %
		Naphthoxymilchsäure	21 %
Diclofenac	15 %	4'-Hydroxy-Diclofenac	42 %
		5'-Hydroxy-Diclofenac	12 %

(\* einschließlich Phase-II-Konjugate)

Gelangt eine Verbindung nach der Ausscheidung zunächst in die Klärwerke und dann in die Umwelt, unterliegt sie dort weiteren Veränderungen, sogenannten Transformationen <sup>[64]</sup>. Zu solchen Prozessen gehört einerseits die Mineralisierung der Verbindung, also ihr vollständiger Abbau zu Kohlendioxid und Wasser, zum anderen die Umwandlung in weitere Transformationsprodukte. Solche Verbindungen können z. B. dem menschlichen Metabolismus analoge und nichtanaloge Oxidations- oder Hydrolyseprodukte sein. Ebenfalls zu den Transformationen zählen Isomerisierungen, Racemisierungen chiraler Verbindungen oder die gerichtete Umwandlung eines Enantiomers in das andere (Enantiomerisierung). Transformationsprozesse können abiotischer oder biotischer Natur sein. Abiotische Transformationen sind u. a. bedingt durch photochemische Prozesse. Sie verlaufen nicht enantioselektiv, wie es in der unbelebten Umwelt zu erwarten ist. Biotische Prozesse beinhalten einerseits mikrobiologische Transformationen und andererseits enzymatische Transformationen durch Biota. Biotische Prozesse verlaufen meist enantioselektiv. Durch

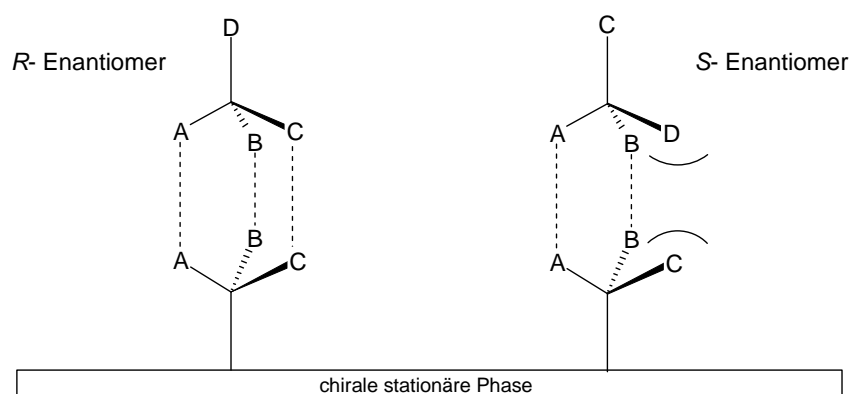
verschiedenartige Mikroorganismen und Biota können sich je nach Ökosystem die biotischen Prozesse voneinander unterscheiden. Durch diese diversen Prozesse können in der Umwelt also zusätzlich neue Verbindungen entstehen, die ihrerseits den gleichen Prozessen ausgesetzt sind, so dass die Zahl der Folgeverbindungen die der Ausgangsverbindungen nicht selten übersteigt. Ein Beispiel hierfür sind Tetracycline, die in der Tiermedizin und -haltung breite Anwendung finden. Durch die Arbeiten von Halling-Sorensen *et al.* <sup>[65]</sup> wurde gezeigt, dass u. a. in Abhängigkeit vom pH-Wert und von Licht eine Reihe von Transformationsprodukten entsteht, die die gleichen Wirkungsweisen wie die Mutterverbindungen besitzen. Die Transformation einer Mutterverbindung führt also nicht zwangsläufig zur vollständigen Eliminierung ihrer ökologischen und ökotoxikologischen Auswirkungen und einzig ihr Verschwinden kann diesbezüglich nicht als Indikation herangezogen werden. Um die Umweltrelevanz von pharmazeutischen Substanzen demnach zu vollständig zu bewerten, müssen neben den menschlichen Metaboliten auch Transformationsprodukte, die durch mikrobiologische Transformationen oder durch abiotische Prozesse entstehen, berücksichtigt werden.

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Arbeiten, die sich mit der weiteren Transformation von pharmazeutischen Substanzen, insbesondere mit der Identifizierung von Transformationsprodukten, in der Umwelt befasst haben <sup>[66, 67]</sup>. Die Studien beinhalten dabei sowohl Untersuchungen im Labormaßstab und Feldstudien als auch computergestützte Berechnungen. Buser *et al.* <sup>[68]</sup> zeigten beispielsweise, dass Diclofenac größtenteils durch photochemischen Abbau eliminiert wird, wobei nur im Laborexperiment einige Photoprodukte identifiziert werden konnten. Weitere PPCP wie Acetaminophen, Coffein, Sulfamethoxazol oder Naproxen werden ebenfalls durch Photolyse abgebaut, wobei von den beiden letzten ebenfalls Photoprodukte identifiziert wurden <sup>[69, 70]</sup>. Für Verbindungen wie Ibuprofen und Paracetamol sind hingegen biotische Prozesse die dominierenden Faktoren, sie werden beide größtenteils mineralisiert <sup>[71]</sup>. Durch eigene Arbeiten wurde gezeigt, dass Ibuprofen stereoselektiven Prozessen unterliegt <sup>[72]</sup>. In Experimenten unter Verwendung von dotiertem Grabenwasser wurde das *R*-Enantiomer bevorzugt abgebaut, außerdem konnte die Bildung von Hydroxy-Ibuprofen, ebenfalls enantioselektiv, beobachtet werden. Ein interessantes Beispiel für die Transformation eines Wirkstoffes ist das insektenabwehrende Mittel Autan®. Der frühere Wirkstoff DEET wurde 1999 durch Bayrepel ersetzt. Während der Klärwerkspassage unterliegt dieser einer schnellen aeroben Umwandlung, wobei die entsprechende stabilere Bayrepel-Säure entsteht <sup>[73]</sup>.

### 1.3. Enantioselektive Analyse

#### 1.3.1. Chromatographische Trennung von Enantiomeren

Es gibt mehrere Möglichkeiten, eine chromatographische Trennung von Enantiomeren zu erreichen. Beispielsweise können die zu trennenden Enantiomere durch Derivatisierung mit einem chiralen, enantiomerenreinen Reagenz in Diastereomere überführt werden, die sich dann an einer achiralen stationären Phase trennen lassen. Zum anderen kann man eine chirale, nicht-racemische stationäre Phase verwenden, welche die Enantiomere direkt trennt. In dem Fall spricht man von enantioselektiver Chromatographie. Die Trennung ist aufgrund der Bildung von energetisch unterschiedlichen Diastereomeren-Komplexen möglich, die aus den zu trennenden Enantiomeren und der chiralen stationären Phase resultieren. Durch das so genannte Drei-Punkt-Modell wird dabei in vereinfachter Weise das Prinzip der asymmetrischen Erkennung beschrieben <sup>[74]</sup>. Dieses geht davon aus, dass es mindestens drei Wechselwirkungen zwischen der chiralen stationären Phase und dem Enantiomer gibt, von denen mindestens eine von der Stereochemie des Gastmoleküls abhängig ist, wodurch die Trennung der Enantiomere bewirkt wird. In Abb. 5 ist der linke Komplex stabiler, da drei intermolekulare Wechselwirkungen existieren, während beim rechten Komplex nur zwei Wechselwirkungen möglich sind.



**Abb. 5: Drei-Punkt-Regel der chiralen Erkennung**

In der enantioselektiven Gaschromatographie haben drei Klassen chiraler Stationärphasen herausragende Bedeutung erlangt:

- Aminosäurederivate
- Metallkomplexe
- Kohlenhydratderivate wie Cyclodextrine

Aminosäurederivate, wie z. B. kommerziell verfügbares Chirasil-Val und XE-60-L-Val(*R*)-

$\alpha$ -phenylethylamid, bilden Wasserstoffbrücken zu den zu trennenden Enantiomeren aus, wodurch ihre Differenzierung erreicht wird <sup>[75-77]</sup>. Durch optisch aktive Organometallkomplexe hingegen wird die chirale Erkennung durch die Koordination der zu trennenden Verbindung an das Metallzentrum ermöglicht. Deshalb spricht man in dem Fall auch von Komplexierungsgaschromatographie <sup>[78, 79]</sup>. Im Gegensatz zu den anderen chiralen Stationärphasen sind Cyclodextrine zur Enantiomerentrennung durch Hochauflösungskapillargaschromatographie erst in den letzten zwei Jahrzehnten in die Praxis eingeführt worden. Es handelt sich dabei um eine homologe Reihe nichtreduzierender, cyclischer Oligosaccharide aus mindestens sechs  $\alpha$ -D-Glucopyranoseeinheiten in  $\alpha$ -1,4'-glycosidischer Verknüpfung. Bisher sind  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin mit sechs bis acht Glucoseeinheiten kommerziell erhältlich. Cyclodextrine können als leere molekulare Kapseln betrachtet werden, weshalb sie die Fähigkeit aufweisen, Gastmoleküle durch Inklusion zu komplexieren <sup>[80]</sup>, wobei unterschiedlich stabile Komplexe eines jeden Enantiomers mit der Cyclodextrinphase entstehen. Es findet dabei jedoch keine vollständige Inklusion des Gastmoleküls statt. Es ist ausreichend, wenn das Gastmolekül in den Hohlraum mit nur einem Substituenten (im Falle einer tetraedischen Anordnung der Substituenten um das chirale Zentrum) eindringt. Die anderen Substituenten können zusätzlich mit dem chiralen äußeren Teil des Cyclodextrins interagieren, was bedeutet, dass dieser Teil mit an der chiralen Diskriminierung beteiligt ist <sup>[81]</sup>. In der Regel werden modifizierte Cyclodextrine verwendet, die durch Alkylierung, Acylierung oder auch Silylierung der Hydroxygruppen erhalten werden.

In der Flüssigchromatographie (HPLC) werden neben Cyclodextrinen vor allem modifizierte Cellulosen eingesetzt. Meist handelt es sich dabei um Triester, wie das Tri-O-Acetylderivat, Amide oder Carbamate. Der Trennmechanismus basiert einerseits auf ihrer helikalen Struktur und der Anwesenheit von chiralen Höhlungen, wodurch Gastmoleküle durch Inklusion retardiert werden können <sup>[82]</sup>. Je nach Modifizierung der Cellulose spielen aber ebenso anziehende Wechselwirkungen wie Dipol-Dipol-Interaktionen, Wasserstoffbrücken oder  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu Beginn des Diskriminierungsprozesses eine Rolle <sup>[83]</sup>.

Die enantioselektive Chromatographie hat die Analyse von vielen chiralen Verbindungen ohne spezielle funktionelle Gruppen, die derivatisiert werden könnten, überhaupt erst möglich gemacht. Auf diese Weise konnten insbesondere im Bereich der Naturstoffe Erkenntnisse über die Rolle der einzelnen Enantiomere gewonnen werden. Die Vielfalt der chiralen stationären Phasen ist in den letzten Jahren erheblich breiter geworden, so dass mittlerweile eine große Anzahl von Substanzen direkt getrennt werden kann. Jedoch gibt es immer wieder Trennprobleme, vor allem bei neu entwickelten Verbindungen, wie im Bereich der Pharmazeutika oder der Geschmacks- und Riechstoffe, da sich kaum Vorhersagen

bezüglich der Trennung der Enantiomeren an einer chiralen Phase treffen lassen. So kann z. B. bei strukturell ähnlichen Verbindungen oder innerhalb einer homologen Reihe die Enantiodifferenzierung unterschiedlich sein, und es lässt sich oft nur durch Ausprobieren herausfinden, welche Phase für welche Substanz geeignet ist. Unglücklicherweise existieren auch keine Berichte über erfolglose Trennungen.

### 1.3.2. Analyse von Enantiomeren in der aquatischen Umwelt

Vor dem Hintergrund, dass etwa die Hälfte der Pharmazeutika chiral ist, spielt der Aspekt der Erfassung der Enantiomeren von PPCP in der Umwelt eine wichtige Rolle. Zum einem kann so eine mögliche Umweltrelevanz einzelner Enantiomere, was z. B. ihre Ökotoxizität betrifft, aufgeklärt werden. Zum anderen ist es dadurch möglich, Aufschluss über die Vorgänge im Ökosystem zu bekommen und insbesondere Unterschiede zwischen Ökosystemen aufzuzeigen, da Einblicke in die Art der Abbaupfade bzw. der weiteren Umwandlungen der Verbindungen erhalten werden. So unterscheiden sich beispielsweise die Enantiomerenverhältnisse des Pestizids  $\alpha$ -HCH in den verschiedenen Regionen der Nordsee deutlich voneinander <sup>[84]</sup>. Während im östlichen Teil, einschließlich der deutschen Bucht und des Skagerraks, das (-)-Enantiomer dominiert, ist an der Westküste Großbritanniens das (+)-Enantiomer verstärkt vertreten. Für den Abbau von  $\alpha$ -HCH sind demnach verschiedene mikrobiologische Wege verantwortlich, wobei es regional Vorzüge jeweils eines Enantiomers gibt. Ferner können durch die Analyse einzelner Enantiomere aber auch Erkenntnisse über Eintragspfade und Ausbreitungswege einer Verbindung gewonnen werden. So wurde 2005 der chirale Betablocker Propranolol als sog. Tracer verwendet, um in US-Flüssen und Seen zwischen ungeklärten und geklärten Abwässereinträgen unterscheiden zu können. Dies war möglich aufgrund verschiedener Enantiomerenverhältnisse in beiden Fällen <sup>[85]</sup>. Die Analyse der Enantiomeren erfolgte dabei auf indirektem Weg, indem sie durch Derivatisierung mit einem enantiomerenreinen Reagenz in die entsprechenden Diastereomere überführt wurden. Das Wissen über das Vorkommen und Verhalten einzelner Enantiomere von PPCP in Ökosystemen ist insgesamt jedoch noch sehr limitiert, und nur wenige Erkenntnisse wurden bisher mit Hilfe direkter enantioselektiver chromatographischer, besonders gaschromatographischer, Methoden gewonnen. Als einer der ersten auf diesem Gebiet bestimmten Buser *et al.* so die Enantiomerenverhältnisse des Schmerzmittels Ibuprofen in Klärwerkszu- und -abläufen sowie einigen Oberflächen-gewässern <sup>[86]</sup>. Durch eigene Arbeiten wurde ergänzend gezeigt, dass sich die Enantiomerenverhältnisse von Ibuprofen in geklärten Abwässern mit und ohne Belebtschlammbehandlung deutlich unterscheiden <sup>[72]</sup>. Zusätzlich konnte einer der Hauptmetaboliten von Ibuprofen enantioselektiv in Klärwerks- und Umweltproben analysiert werden.

#### 1.4. Zielsetzung

In den letzten Jahren wurden über viele PPCP zahlreiche Erkenntnisse über ihr Vorkommen und ihre Verteilung in der aquatischen Umwelt gewonnen. So gibt es mittlerweile für eine Vielzahl von Substanzen aus den unterschiedlichsten Medikamentenklassen eine große Anzahl an Methoden, die hinreichend empfindlich genug sind, auch sehr geringe Konzentrationen in wässrigen Systemen zu bestimmen. Was die Analyse von einzelnen Enantiomeren betrifft, existiert jedoch, wie beschrieben, nur für einige exemplarische chirale Verbindungen ein guter Überblick in Bezug auf ihre Verteilung in verschiedenen wässrigen Ökosystemen, vor allem in Oberflächengewässern. Dabei konzentriert man sich allerdings fast ausschließlich immer auf die Mutterverbindung. Für einige relevante chirale Metaboliten gibt es, bis auf ein paar Ausnahmen, diesbezüglich kaum Erkenntnisse. Das gleiche gilt für die weiteren Transformationsvorgänge in der Umwelt, einschließlich der Bildung von Folgeprodukten.

Ziel der Arbeit war es daher, einen Überblick über das Vorkommen und das Schicksal der Enantiomeren von ausgewählten PPCP in der aquatischen Umwelt zu bekommen. Dazu wurden chirale Verbindungen berücksichtigt, die in der aquatischen Umwelt relativ weit verbreitet sind. Ebenfalls wurden einige der neueren Substanzen, die in Umlauf gebracht wurden, einbezogen, da es nur wenige Einblicke in ihre Ausbreitung gibt. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die bekannten chiralen Metaboliten geworfen. Die zu analysierenden Proben wurden in der lokalen Umgebung, sprich im Hamburger Raum, genommen, welcher durch eine Vielzahl verschiedener und untereinander verbundener Fließgewässer, die auch Klärwerkseinträgen unterliegen, geprägt ist. Ihre Analytik erfolgte mithilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und die Trennung der Enantiomeren sollte dabei direkt, d. h. unter Verwendung von chiralen stationären Phasen, erfolgen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die Arbeit in folgende Schritte gegliedert:

- Die enantioselektive chromatographische Trennung einiger ausgewählter PPCP an geeigneten chiralen stationären Phasen im Rahmen einer Methodenentwicklung zur Bestimmung dieser Substanzen in aquatischen Proben
- Die Analyse von aquatischen Umweltproben, um Einblicke in die Verteilung der chiralen PPCP zu erhalten und um die Enantiomerenverhältnisse in den verschiedenen Proben zu vergleichen
- Die Untersuchung der weiteren Transformationsprozesse von einigen der ausgewählten Substanzen einschließlich der Identifizierung von eventuellen Transformationsprodukten

Die Arbeit beinhaltete ferner die Synthese von Metaboliten, da diese als Referenzmaterialien größtenteils nicht kommerziell erhältlich waren.



## 2. Methodenetablierung zur enantioselektiven Bestimmung von PPCP in aquatischen Systemen

In diesem Kapitel wird auf die einzelnen Arbeitsschritte eingegangen, die die Grundlage bildeten, um die oben genannten Ziele zu erreichen. Zunächst werden die zu untersuchenden Substanzen sowie die Methodenziele vorgestellt. In den darauf folgenden Abschnitten werden dann unterschiedliche Derivatisierungsstrategien für diese Substanzen erörtert und ihre enantioselektive chromatographische Trennung behandelt, die den Schwerpunkt dieses Kapitels darstellt. In Abschnitt 2.5. und 2.6. wird auf die Methodik, um die ausgewählten Verbindungen in wässrigen Proben erfassen zu können, sowie auf die Validierung der Methoden eingegangen.

### 2.1. Auswahl der zu untersuchenden Substanzen

Die grundsätzliche Voraussetzung für die Auswahl der Substanzen war ihre Erfassung mittels Gaschromatographie. Somit konnten einige Substanzklassen, wie z. B. iodierete Röntgenkontrastmittel, von vornherein ausgeschlossen werden. Es standen Substanzen im Vordergrund, über deren Enantiomeren es bisher keine oder nur wenige Erkenntnisse in aquatischen Systemen gibt. Dazu wurden solche ausgewählt, deren Vorkommen in der aquatischen Umwelt bereits in der Literatur dokumentiert ist und von denen bekannt ist, dass sie in einer Vielzahl von Fließgewässern auftreten und es deshalb davon ausgegangen werden konnte, sie auch im Hamburger Raum zu detektieren. Ebenso wurden Substanzen einbezogen, deren Vorkommen in der Umwelt nur vereinzelt beschrieben wurde und es sich somit erst im Laufe der Arbeiten zeigen sollte, ob sie weiter verfolgt würden. Im Folgenden werden diese Substanzen vorgestellt.

Eine der großen Gruppen der in der Umwelt detektierten Pharmazeutika sind die sog. Betablocker. Alle zu dieser Gruppe gehörenden Substanzen verfügen über die gleiche strukturelle Seitenkette, eine *N*-2-Propyl-2-propanolamin-Einheit, in der sich das stereogene Zentrum befindet. Über ihr Vorkommen wurde erstmalig in den 1990er Jahren berichtet <sup>[15]</sup>. In Klärwerken, einigen Fließgewässern und selbst im Grundwasser in Deutschland wurden u. a. Betaxolol, Bisoprolol, Metoprolol, Propranolol und Sotalol nachgewiesen, wobei Metoprolol und Propranolol am häufigsten auftraten. Für Metoprolol wurden dabei maximale Konzentrationen bis zu 2.3 µg/L und für Propranolol bis zu 590 ng/L gefunden. Deshalb wurde ein besonderes Gewicht auf diese beiden Betablocker gelegt. Abb. 6 zeigt die Strukturen beider Verbindungen. Im Verlauf dieser Arbeit erschienen zwei Berichte, die sich mit der enantioselektiven Analyse von Betablockern, u. a. den beiden ausgewählten, in US-Klärwerkszu- und -abläufen <sup>[87, 88]</sup> befasst haben. Ferner wurde von Fono *et al.* 2006 über die

Änderung der Enantiomerenverhältnisse von Metoprolol mit zunehmender Distanz von der Eintragsquelle in der Dallas-Region berichtet <sup>[89]</sup>. Über die Verhältnisse der Enantiomeren beider Verbindungen im europäischen Raum ist nichts bekannt. Metoprolol und Propranolol werden im menschlichen Körper größtenteils in ihre Metaboliten umgewandelt und als diese ausgeschieden. Deshalb erschienen die Metaboliten beider Verbindungen ebenfalls interessant. Von den drei Metaboliten des Metoprolols, die im vorherigen Kapitel schon beschrieben worden sind, wurden der Hauptmetabolit, die Metoprolol-Säure (MetoCOOH), sowie  $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol (MetoOH) ausgewählt. Letzteres erschien aufgrund seiner zwei Stereozentren, woraus vier Stereoisomere resultieren, von besonderem Interesse. Die Hauptmetaboliten von Propranolol sind 4'-Hydroxy-Propranolol (OHPL) und Naphthoxymilchsäure (NLA), die beide auch chiral sind (Abb. 6) <sup>[90]</sup>. Über 50 % einer Propranolol-Dosis wird in diese beiden Verbindungen umgewandelt. OHPL besitzt dabei eine ähnliche Wirkung wie die Muttersubstanz. Es gibt bisher keine Berichte über das Vorkommen der Metaboliten von beiden Verbindungen in Klärwerken oder Fließgewässern. Das ist jedoch primär dadurch bedingt, dass diese Verbindungen bisher nicht als Referenzmaterialien kommerziell verfügbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese vier Verbindungen deshalb synthetisiert.

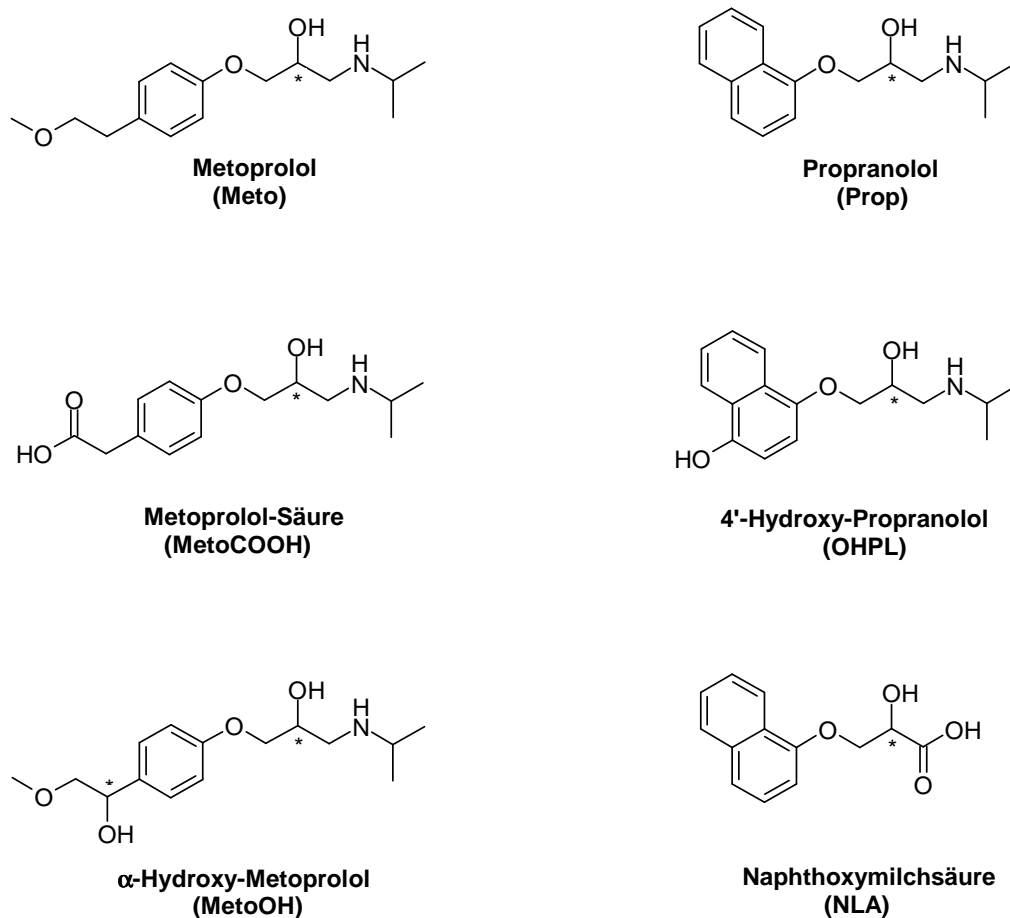
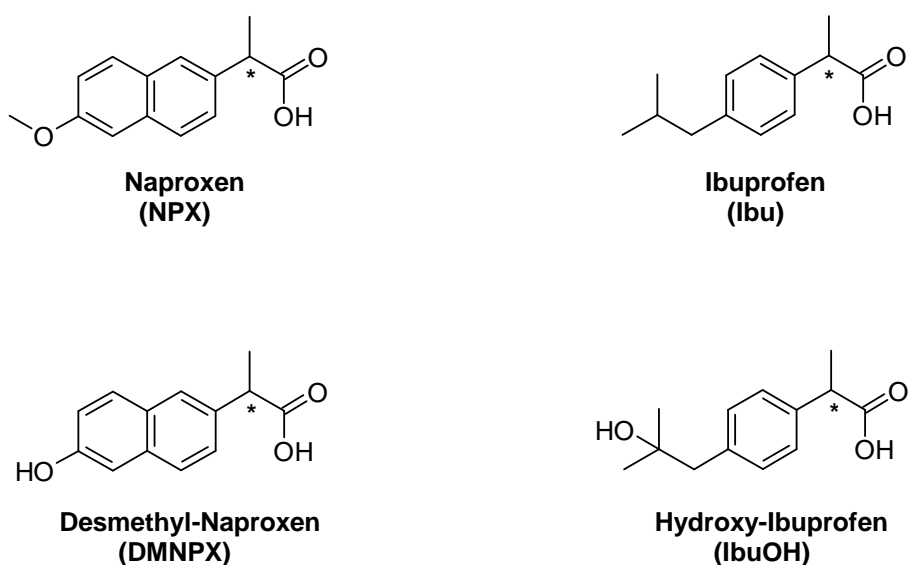


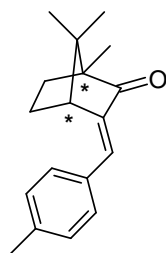
Abb. 6: Strukturen von Metoprolol und Propranolol sowie ihrer Metaboliten

Des Weiteren wurden einige schmerzstillende und entzündungshemmende Mittel, die sog. Antiphlogistika und Analgetika, einbezogen. Diese gehören zu den am meisten konsumierten, größtenteils nicht verschreibungspflichtigen, pharmazeutischen Substanzen. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde bereits die stereoselektive Analyse von Ibuprofen und seinen beiden Metaboliten Hydroxy- und Carboxy-Ibuprofen behandelt, die alle drei in Klärwerksabläufen bzw. Fließgewässern nachweisbar sind <sup>[91-93]</sup>. Weitere chirale Verbindungen aus dieser Pharmazeutika-Klasse, über deren Vorkommen in der Umwelt bereits berichtet wurde, sind Naproxen, Ketoprofen und Fenoprofen. Die Arbeiten von Kuhlmann <sup>[92]</sup> zeigten allerdings, dass nur ersteres auch in den Gewässern des Hamburger Raumes detektierbar ist, weshalb nur dieser Vertreter mit untersucht wurde. Die erhaltenen Konzentrationen lagen dabei allerdings nahe der Bestimmungsgrenze im unteren ng/L-Bereich. Naproxen gehört zu den 2-Arylpropionsäuren, wird aber im Gegensatz zu den anderen Verbindungen aus dieser Gruppe als enantiomerenreine S-Form verabreicht, da der Antipode toxische Eigenschaften besitzt <sup>[94]</sup>. Aus diesem Grund ist ausschließlich das S-Enantiomer käuflich erhältlich und im Rahmen der Arbeit wurde deshalb das Racemat als Referenz dargestellt. Gut ein Drittel einer Naproxen-Dosis wird demethyliert und in dieser Form ausgeschieden, so dass bei der Analyse der Metabolit Desmethyl-Naproxen ebenfalls berücksichtigt wurde. Es wurde bisher nicht über das Vorkommen dieser Verbindung in Klärwerken oder Fließgewässern berichtet. Ibuprofen (Ibu) und Hydroxy-Ibuprofen (IbuOH) wurden in diese Arbeit weiterhin mit einbezogen, um weitere Einblicke in die Verteilung der jeweiligen Enantiomeren in aquatischen Proben zu erhalten. Die Strukturen der ausgewählten schmerzstillenden Substanzen sind in Abb. 7 dargestellt.

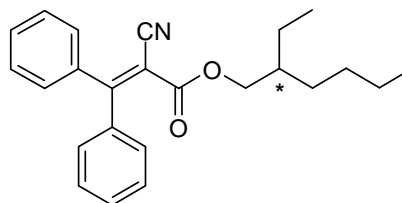


**Abb. 7: Strukturen von Naproxen und Ibuprofen sowie ihrer ausgewählten Metaboliten**

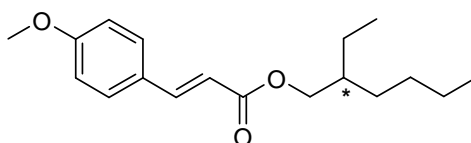
Aus dem Bereich der *personal care*-Produkte wurden einige chirale UV-Filter ausgewählt. Diese Substanzen schützen die menschliche Haut vor schädlicher UV-Strahlung, indem sie diese absorbieren. UV-Filter werden nicht nur in Sonnenlotionen, sondern auch in vielen anderen Kosmetikprodukten, wie Cremes, Haarpflegemitteln und Lippenstiften, oder in Lederpflegemitteln eingesetzt. Ferner werden sie als Additive in Verpackungen benutzt. In der EU sind über zwanzig verschiedene Substanzen registriert, und in der Regel werden in den Produkten mehrere Substanzen verwendet<sup>[95]</sup>. Der Eintrag dieser Verbindungen in die Umwelt erfolgt nicht nur indirekt über Klärwerke, sondern auch direkt, durch z. B. Bade- oder Schwimmaktivitäten in Seen oder Flüssen. Der Nachweis der UV-Filtersubstanz 4-Methylbenzylidencampher in Fischen und im Wasser von fünf Seen aus Rheinland-Pfalz und Hessen wurde bereits 1993 von Ternes in seiner Dissertation beschrieben<sup>[96]</sup>. Über das Vorkommen dieser und weiterer UV-Substanzen im aquatischen Ökosystem wurde dann aber erst Anfang der 2000er Jahre berichtet, wobei sich diese Untersuchungen jedoch ausschließlich auf Gewässer in der Schweiz begrenzten<sup>[97-99]</sup>. Die höchsten Konzentrationen traten dabei erwartungsgemäß in den Sommermonaten auf. Beunruhigend ist, dass einige der UV-Filter im Verdacht stehen, endokrine Wirkungen zu besitzen<sup>[100]</sup>. Ferner gibt es Berichte über das Auftreten dieser Substanzen in Fischen, was zeigt, dass sie potentiell bioakkumulativ sind<sup>[101-102]</sup>. Mittlerweile es gibt wenige weitere Artikel, die über das Auftreten von UV-Filtern in anderen europäischen Ländern und in China berichten<sup>[103-105]</sup>. Zu den am häufigsten gefundenen chiralen UV-Filtern gehören 4-Methylbenzylidencampher (MBC), Octocrylene (OCR) und Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC), die deshalb ausgewählt wurden. Die entsprechenden Strukturen sowie die kommerziell verwendeten Namen sind in Abb. 8 dargestellt. Die Verbindungen EHMC und MBC werden als *E*-Isomere in den Produkten eingesetzt, isomerisieren jedoch nach der Einwirkung von direktem Sonnenlicht in relativ kurzer Zeit. MBC besitzt an Position 1 und 4 Stereozentren. Aufgrund des bicyclischen Systems sind diese aber nicht voneinander unabhängig und verhalten sich nur wie ein chirales Element, so dass lediglich ein Enantiomerenpaar existiert. 2005 wurde von Buser *et al.* über die Stereoisomerenzusammensetzung von MBC in schweizer Klärwerks- und Oberflächengewässern sowie in einigen Fischarten berichtet<sup>[106]</sup>. Über das Auftreten der ausgewählten Substanzen in deutschen Fließgewässern, insbesondere im Hamburger Raum, ist bisher nichts bekannt. Somit sollte sich erst im Verlauf der Arbeit zeigen, inwiefern die Untersuchungen von Relevanz sein würden.



**4-Methylbenzylidencampher  
(MBC)  
Eusolex 6300**



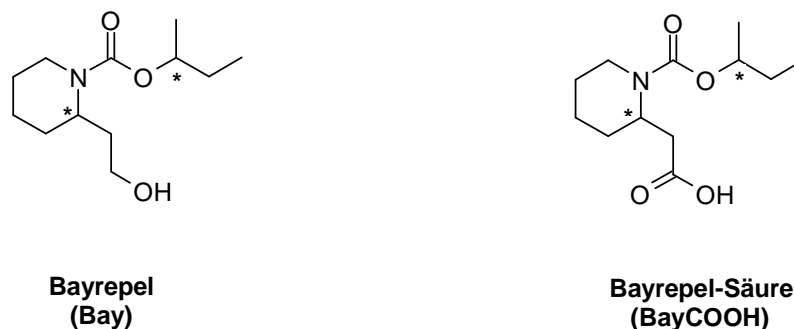
**Octocrylene  
(OCR)  
Eusolex OCR**



**Ethylhexylmethoxycinnamat  
(EHMC)  
Eusolex 2292**

**Abb. 8: Strukturen der chiralen UV-Filter**

Aus dem Bereich der *personal care*-Produkte erschien des Weiteren der Autan<sup>®</sup>-Wirkstoff Bayrepel von Interesse. Diese Verbindung gehört zu den sogenannten Repellentien, die nach dem Auftragen auf die Haut stechende, beißende und saugende Insekten, Zecken und Milben durch ihren Geruch abwehren sollen. Der früher eingesetzte Wirkstoff DEET galt als ubiquitär verbreitet, er wurde sowohl in Kläranlagen mit bis zu 1.2 µg/L als auch in Oberflächengewässern mit 500 ng/L nachgewiesen <sup>[107]</sup>. DEET stand jedoch im Verdacht, unerwünschte Wirkungen beim Menschen hervorzurufen, so dass er vor zehn Jahren durch Bayrepel substituiert wurde. Wie bereits erwähnt, ist insbesondere dessen Transformationsprodukt von Bedeutung, da der Wirkstoff einer schnellen Oxidation unterliegt. In Klärwerkszuläufen ist die Mutterverbindung noch detektierbar <sup>[69]</sup>, in Klärwerksabläufen und Oberflächengewässern hingegen ist nur das Transformationsprodukt nachweisbar <sup>[28, 92]</sup>. Beide Verbindungen gehören zu den neueren Problemstoffen, und über ihre Ausbreitung in Oberflächengewässern ist bisher nur relativ wenig bekannt, so dass nicht gesagt werden kann, ob sie, ähnlich wie DEET, bereits ubiquitär verbreitet sind. Bei den Verbindungen handelt es sich um Piperidincarboxylate mit zwei Stereozentren, so dass je vier stereoisomere Formen auftreten. Die Strukturen beider Verbindungen sind im Folgenden dargestellt.



**Abb. 9: Strukturen des Insektenrepellants Bayrepel und seines Oxidationsproduktes**

## 2.2. Methodenziele

Um eine adäquate enantioselektive Betrachtung der ausgewählten Verbindungen in wässrigen Proben zu ermöglichen, sollten im Verlauf der Methodenentwicklung folgende Ziele erreicht werden:

- Eine geeignete Derivatisierung für diejenigen Verbindungen, die entsprechende funktionelle Gruppen tragen
- Die möglichst vollständige Trennung der jeweiligen Enantiomeren an geeigneten chiralen stationären Phasen
- Bestehende Methoden zur Probenaufarbeitung auf die ausgewählten Verbindungen zu übertragen und so anzupassen, dass diese in wässriger Matrix erfasst und möglichst empfindlich detektiert werden konnten
- Die Überprüfung der Methoden, inwiefern sie für diesen Zweck geeignet sind, indem einige Kenndaten bestimmt wurden

## 2.3. Derivatisierungen der Referenzsubstanzen

Die Mehrzahl der ausgewählten Verbindungen zeichnet sich durch eine oder mehrere polare funktionelle Gruppen aus, so dass vor ihrer gaschromatographischen Analyse eine Derivatisierung notwendig war. Dadurch wurden nicht nur die Flüchtigkeit der Verbindungen erhöht und die chromatographischen Eigenschaften verbessert, es konnte vor allem auch die enantioselektive Trennung beeinflusst werden. Da die Detektion der Verbindungen mittels Massenspektrometrie erfolgte, konnte die Derivatisierung ferner dazu beitragen, dass die Verbindungen gerade in stark matrixhaltigen Umweltproben sicher identifiziert werden konnten. Dies war gegeben, wenn die derivatisierten Verbindungen ein Fragmentierungsmuster aufwiesen, bei dem neben dem Basis-Ion mindestens ein weiteres intensiveres Ion zur Bestätigung existierte. Aus der Vielzahl der heutzutage angebotenen

Derivatisierungsreagenzien eignen sich jedoch längst nicht alle für die Analyse von Umweltproben, da an diese der Anspruch gestellt wird, dass die Reaktionen bei Kleinstansätzen und in Anwesenheit von natürlicher Matrix quantitativ und reproduzierbar verlaufen. Des Weiteren sollte der zeitliche Rahmen nicht zu aufwendig sein.

Es wurden mit den ausgewählten Substanzen verschiedenartige Derivatisierungen durchgeführt. Die Derivate wurden zunächst mittels nicht-enantioselektiver GC-MS auf ihre chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften geprüft, ehe sie anschließend auf ihre enantioselektive Trennbarkeit getestet wurden. Die enantioselektive chromatographische Trennung wird in Abschnitt 2.4. behandelt.

### 2.3.1. Derivatisierung der Betablocker

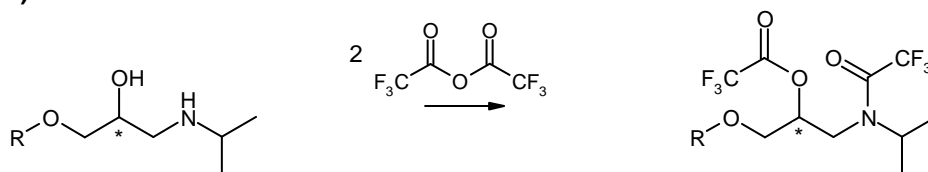
Metoprolol und Propranolol besitzen eine sekundäre Aminogruppe und eine sekundäre Hydroxyfunktion, an der sich das stereogene Zentrum befindet. In der Literatur findet man eine Reihe von unterschiedlichen Derivatisierungsstrategien, mit denen beide funktionelle Gruppen entweder durch ein einziges Reagenz erfasst und funktionalisiert werden oder sie durch zwei hintereinander durchgeführte Reaktionen unterschiedlich funktionalisiert werden. Ferner sind Derivatisierungen nur für die eine oder die andere Gruppe beschrieben. Beide funktionellen Gruppen können z. B. in einer Acetylierungsreaktion in einem Schritt umgesetzt werden <sup>[108-110]</sup>. Gängige Reagenzien hierfür sind *N*-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA), Trifluoracetanhydrid, Pentafluorpropansäureanhydrid oder Heptafluorbutansäureanhydrid. Ebenfalls ist es durch den Einsatz von Phosgen möglich, beide funktionellen Gruppen in einem Schritt zu erfassen, indem sie beide in einen entsprechenden Oxazolidinon-Ring eingegliedert werden <sup>[111]</sup>. Ein drittes Beispiel für eine einzige Umsetzung ist die Reaktion Chlormethyldimethylchlorsilan (CMDMCS), bei der ebenfalls ein cyclisches Derivat entsteht. Kommt eine zweistufige Derivatisierung zum Einsatz, wird zunächst die Hydroxygruppe funktionalisiert. So gibt es einige Silylierungsreagenzien, mit denen verschieden substituierte Silylether dargestellt werden können. Je nach der Stärke des eingesetzten Silylierungs-Reagenzes kann die Aminogruppe auch reagieren, jedoch ist meistens die entstehende N-Si-Bindung zu labil, so dass eine zweite Reaktion durchgeführt wird, um die Aminogruppe zu funktionalisieren. In der Regel wird dies durch eine Acetylierung erreicht. Derivatisierungen, bei denen nur die sekundäre Aminogruppe funktionalisiert wird, werden durch die Verwendung von Chlorformaten erzielt <sup>[112, 113]</sup>.

In Bezug auf die enantioselektive Analyse ist es bei den Derivatisierungen sehr wichtig gewesen, dass die Reaktion an der Hydroxygruppe nicht zur Veränderung der Konfiguration am stereogenen Zentrum führt. Es wurden für die Betablocker verschiedene Derivatisierungen durchgeführt, für die eine Anwendung im analytischen Bereich in der

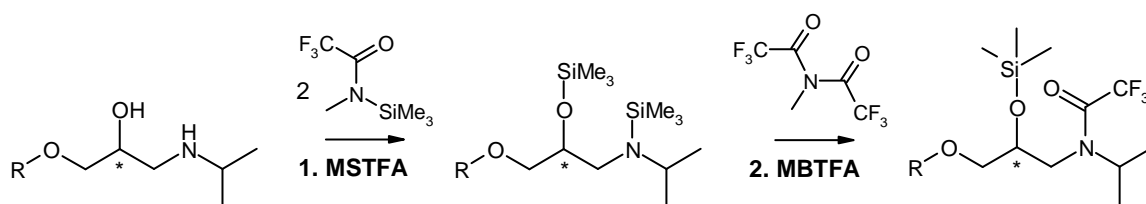
Literatur beschrieben ist, so dass im Voraus sichergestellt war, dass die Reaktionen letztlich im Mikromaßstab durchführbar sind.

Es wurde zum einen eine Acetylierungsreaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) durchgeführt, mit der sowohl die Hydroxy- als auch die Aminofunktion derivatisiert werden. Zum anderen wurde eine zweistufige Umsetzung mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoressigsäureamid (MSTFA) und MBTFA, bei der die Hydroxygruppe trimethylsilyliert und die Aminofunktion trifluoressigacyliert wird, angewendet (TMS-TFA-Derivate). Beide Reaktionen wurden nach der von Leroux *et al.* beschriebenen Weise durchgeführt <sup>[109]</sup>, wobei im ersten Fall die Aufarbeitung leicht modifiziert wurde. Des Weiteren wurde die Reaktion mit CMDMCS durchgeführt, bei der ein cyclisches 2-(Dimethyl)silamorpholin-Derivat entsteht (DMS-Derivat). Über diese Art der Derivatisierung wurde zuerst von Hammar berichtet <sup>[114]</sup>. Später wurde von Dumasia und Hughton eine modifizierte Durchführung beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde <sup>[115]</sup>. Die Reaktionsgleichungen der drei Derivatisierungen sind in Abb. 10 dargestellt.

#### a) Reaktion mit TFAA



#### b) Reaktion mit MSTFA und MBTFA



#### c) Reaktion mit CMDMCS

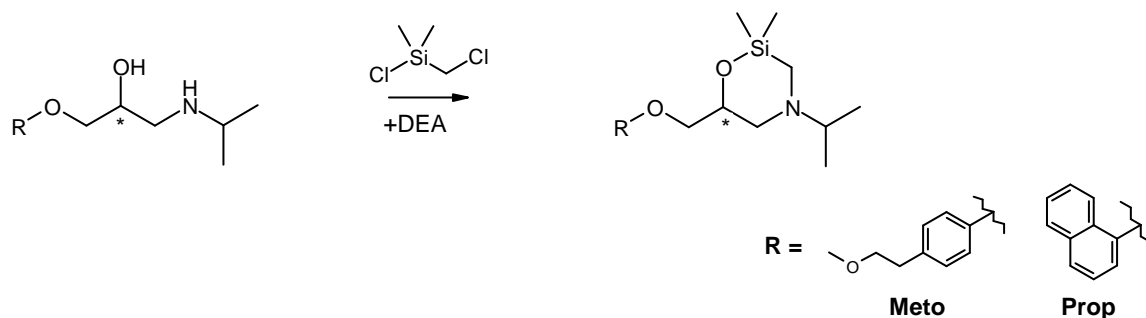


Abb. 10: Derivatisierungen der Betablocker



Bei den durchgeführten Derivatisierungen wird die Konfiguration am stereogenen Zentrum nicht beeinflusst, da in allen drei Fällen das Sauerstoffatom der sekundären Hydroxygruppe als angreifendes Nucleophil fungiert, welches mit dem jeweiligen Reagenz in einer Substitutionsreaktion reagiert. Bei allen drei Reaktionen wurden für beide Verbindungen im Konzentrationsbereich von ca. 1 µg/mL vergleichbar intensive Signale erhalten. Auch im unteren Konzentrationsbereich von etwa 50 ng/mL wurden keine gravierenden Unterschiede in der Signalintensität festgestellt. Auf der verwendeten Säule wiesen die DMS-Derivate dabei die beste Peakform auf, weil das Peaktailing nur sehr gering ausgeprägt war. Die TFAA-Derivate hingegen besaßen ein recht ausgeprägtes Tailing. Die Massenspektren der Derivate enthalten neben dem Basis-Peak ein bzw. zwei weitere Ionen-Peaks mittlerer bis stärkerer Intensität, was zur Identifizierung bzw. Bestätigung der Verbindungen von Vorteil war. Insbesondere das Fragmentierungsmuster der DMS-Derivate erschien günstig, da neben dem Basis-Ion ( $m/z = 186$ ) das Molekül-Ion sowie [M-15]- und [M-43]-Fragmente entstehen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Ionen-Fragmente und deren relative Intensitäten von den drei verschiedenen Derivaten.

**Tab. 2: EI-Fragmente ( $m/z$ ) der verschiedenen Betablocker-Derivate (die relativen Intensitäten bzgl. des Basis-Ions sind in Klammern angegeben)**

Derivate	Molekül-Ion	Basis-Ion	2. Ion	3. Ion
TFAA-Derivate	459 <sub>(Meto)</sub> (03)	267 <sub>(Meto, Prop)</sub>	308 <sub>(Meto, Prop)</sub> (86)	152 <sub>(Meto, Prop)</sub> (30)
	451 <sub>(Prop)</sub> (03)			
TMS-TFA-Derivate	-	284 <sub>(Meto, Prop)</sub>	129 <sub>(Meto, Prop)</sub> (50)	-
DMS-Derivate	337 <sub>(Meto)</sub> (06)	186 <sub>(Meto, Prop)</sub>	322 <sub>(Meto)</sub> (70)	294 <sub>(Meto)</sub> (35)
	329 <sub>(Prop)</sub> (08)		314 <sub>(Prop)</sub> (33)	286 <sub>(Prop)</sub> (18)

Die Durchführung aller drei Reaktionen war problemlos, da nach beendeter Reaktion das überschüssige Reagenz durch Abblasen im Stickstoffstrom einfach entfernt werden konnte. Es musste nur darauf geachtet werden, dass die zu derivatisierenden Proben vor der Reaktion wasserfrei sind, da Restwassergehalt zur Verminderung der Umsetzung führen kann und diese unter Umständen nicht mehr quantitativ verläuft. Ebenso war der zeitliche Rahmen für alle drei Reaktionen von 15 min bis maximal 45 min recht kurz. Die Derivate waren alle stabil, sofern sie in Lösung im Kühlschrank bei ca. 4 °C gelagert wurden. Leroux *et al.* berichteten, dass für einige andere Betablocker wie Sotalol oder Nadolol im Fall der Trifluoracetylierung Nebenprodukte entstanden sind, so dass diese Art der Derivatisierung als Screening-Methode deshalb nicht unbedingt geeignet ist.

Es wurde ferner versucht, nur die Aminogruppe durch Behandlung mit Chlorformaten zu derivatisieren. Diese Art der Derivatisierung für Betablocker und für einige verwandte Ver-

bindungen mit der 2-Propanolamin-Seitenkette wurde von Schmitthener *et al.* und Ahnoff *et al.* mit verschiedensten Chlorformaten beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Reaktionen mit Methylchlormethanoat und Ethylchlormethanoat auf die jeweilig dokumentierten Arten sowie in modifizierter Weise durchgeführt, ohne dass jedoch Derivate detektiert werden konnten. Da die in der Literatur beschriebene Analyse flüssigchromatographisch erfolgte, ist davon auszugehen, dass die Derivate thermisch nicht stabil sind. Es wurden deshalb keine weiteren Versuche diesbezüglich durchgeführt.

### 2.3.2. Derivatisierung der Betablocker-Metaboliten

Die Betablocker-Metaboliten sollten nach Möglichkeit mit derselben Derivatisierung wie die Mutterverbindungen erfasst werden. Da sie jedoch zusätzliche bzw. andere funktionelle Gruppen besitzen, war zu erwarten, dass die Derivatisierungen nicht in jedem Fall anwendbar sind. In der Literatur sind für MetoOH, NLA und OHPL vereinzelt Derivatisierungen beschrieben, um diese Verbindungen in menschlichen Plasma- und Urinproben bestimmen zu können. Ersteres wurde z. B. neben der Mutterverbindung mittels MBTFA sowie in einer zweistufigen Reaktion mit Phosgen und anschließender Trimethylsilylierung erfasst<sup>[108, 111]</sup>. Für NLA ist eine ebenfalls zweistufige Derivatisierung mit Diazomethan und Heptafluorbutansäureanhydrid dokumentiert<sup>[116]</sup>. OHPL wurde zusammen mit der Mutterverbindung mit TFAA derivatisiert, wobei Spuren von Säureresten die Stabilität des Derivates des Metaboliten allerdings stark herabsetzten<sup>[117]</sup>. Die Metaboliten MetoOH, MetoCOOH und OHPL besitzen alle auch die 2-Propanolamin-Seitenkette, weshalb mit ihnen die Reaktionen mit MSTFA/MBTFA und CMDMCS durchgeführt wurden. In der Literatur ist keine der beiden Derivatisierungen auf die Metaboliten angewendet worden. Der Propranolol-Metabolit NLA besitzt nur eine Carboxy- und eine dazu  $\alpha$ -ständige Hydroxygruppe. Die beiden Reaktionen sind in dem Fall nicht anwendbar, da keine stabilen Derivate entstehen würden. Seine Derivatisierung wird deshalb in Abschnitt 2.3.3. behandelt.

MetoOH und OHPL wurden erwartungsgemäß durch beide Derivatisierungen erfasst, wobei Signale vergleichbarer Intensität und mit jeweils leichtem Peak-Tailing erhalten wurden. Auffällig ist die längere Retentionszeit der DMS-Derivate (Anhang I), bedingt durch den starken Massenzuwachs durch den Chlorsubstituenten. Die Massenspektren der vier Derivate sind in Abb. 11 dargestellt. Die Fragmentierungsmuster sind analog der der Mutterverbindungen. Es stellte sich heraus, dass die Derivate von OHPL nur eine kurze Stabilität hatten, selbst bei Lagerung im Kühlschrank. Vor allem wenn geringere Konzentrationen als ca. 50 ng/mL verwendet wurden, konnte schon am nächsten Tag kein Derivat mehr detektiert werden. Da bei beiden Derivatisierungen keine sauren Bedingungen herrschen, spielen also noch weitere Faktoren für die Instabilität eine Rolle, was aber nicht weiter untersucht wurde.

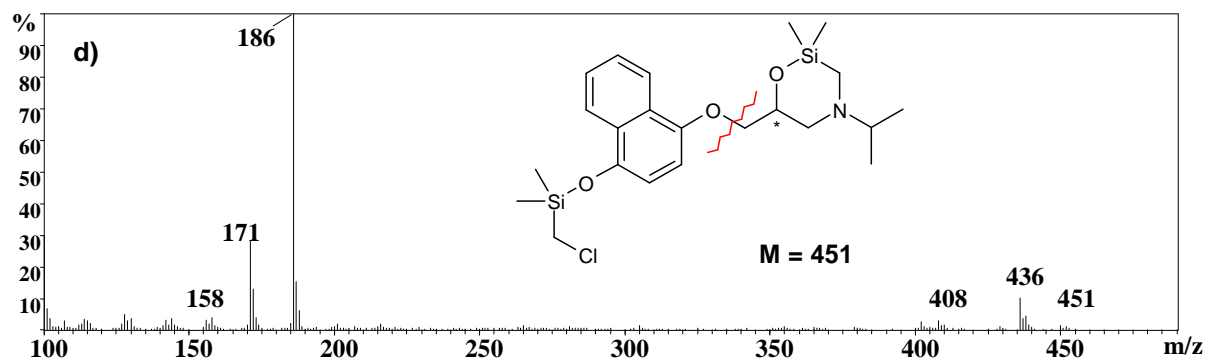
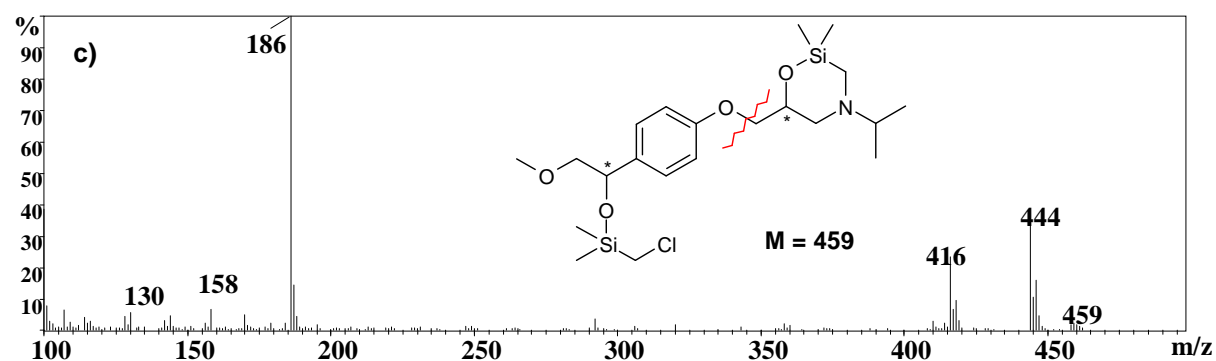
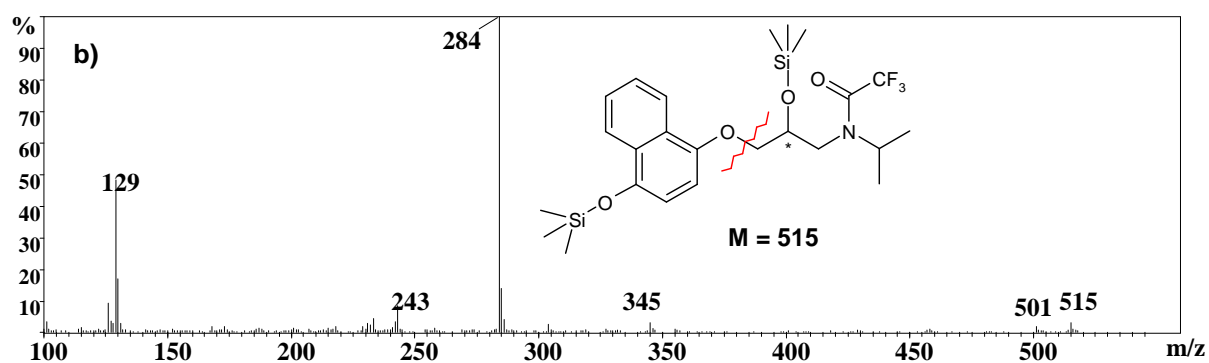
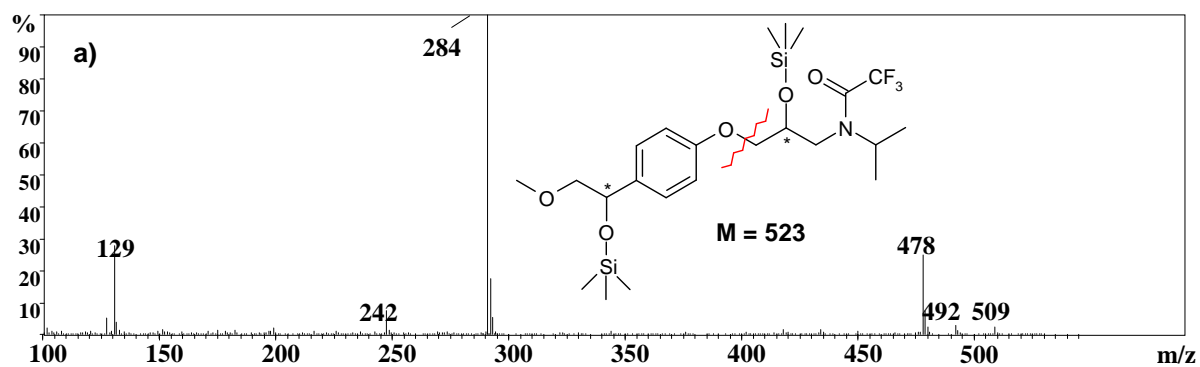


Abb. 11: EI-Massenspektren der TMS-TFA-Derivate (a, b) und DMS-Derivate (c, d) von MethOH und OHPL

Die zusätzliche Carboxyfunktion von MetoCOOH stellte hinsichtlich der beiden Derivatisierungen ein Problem dar, da die in beiden Fällen entstehende Trimethylsilylester-Gruppe labil bzw. hydrolyseempfindlich ist. So konnte bei der Umsetzung mit CMDMCS kein Derivat detektiert werden. Bei der Reaktion mit MSTFA und MBTFA wurde im oberen Konzentrationsbereich von ca. 10 µg/mL noch ein Derivat nachgewiesen, bei kleineren Konzentrationen jedoch auch nicht mehr. Deshalb musste die Carboxygruppe durch eine zweite Reaktion auf eine andere Art derivatisiert werden. Es wurde eine vorgeschaltete Reaktion durchgeführt, in der die Carboxygruppe in einen Alkylester überführt wurde. Als Reagenzien hierfür kamen entweder Diazomethan oder ein kurzkettiger Alkohol in Betracht. Auf Diazomethan wurde aufgrund der Carzinogenität und der schlechten Handhabung des Reagenzes verzichtet. Die säurekatalysierte Alkylierung wurde nach gängigen Vorschriften mit Methanol sowie Ethanol im Mikromaßstab durchgeführt. Das stereogene Zentrum wird dabei durch die Reaktionsbedingungen nicht beeinflusst. Auf diese Weise konnte MetoCOOH im relevanten Konzentrationsbereich erfasst werden. Durch die extractive Aufarbeitung nach der durchgeführten Reaktion wurde gleichzeitig ein Reinigungsschritt integriert. In Abb. 12 sind die Methylierung sowie die nachfolgende Reaktion mit CMDMCS dargestellt. Abb. 13 zeigt das entsprechende Massenspektrum des methylierten DMS-Derivates von MetoCOOH.

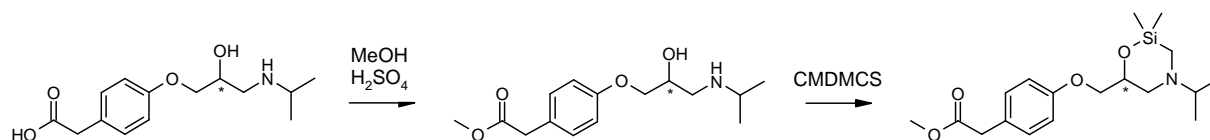


Abb. 12: Zweitstufige Derivatisierung von MetoCOOH

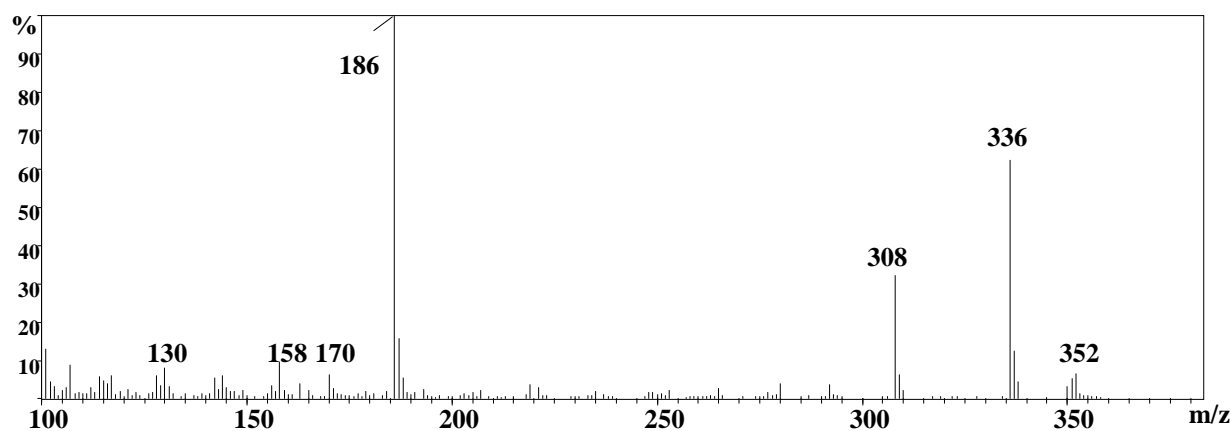
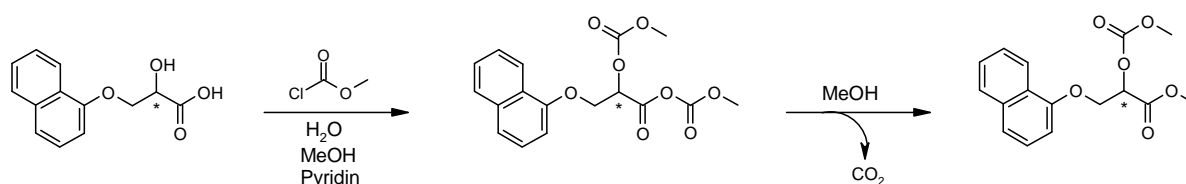


Abb. 13: EI-Massenspektrum des methylierten DMS-Derivats von MetoCOOH

### 2.3.3. Derivatisierung der sauren PPCP

Zu den Verbindungen, die eine Carboxygruppe tragen, gehören die Schmerzstiller Ibuprofen und Naproxen sowie ihre Metaboliten, der Propranolol-Metabolit NLA und die Bayrepel-Säure. Die Derivatisierung dieser Verbindungen erfolgte mit Methylchlormethanoat (MCM) nach Kuhlmann<sup>[92]</sup>. Bei dieser Reaktion entsteht zunächst intermediär ein gemischtes Anhydrid, welches dann durch Decarboxylierung vollständig in den Alkylester umgewandelt wird. Je nach Wahl des eingesetzten Alkohols als Lösungsmittel entstehen auf diese Weise unterschiedliche Ester. Ebenfalls werden phenolische Gruppen und aliphatische Hydroxygruppen, wenn sie ausreichend acid sind, mit diesem Reagenz erfasst<sup>[118]</sup>. In beiden Fällen entstehen dabei Carbonatdiesterfunktionen. In Abb. 14 ist die Derivatisierung mit MCM beispielhaft für NLA dargestellt. Dessen  $\alpha$ -Hydroxygruppe ist dabei ausreichend acid, um auch umgesetzt zu werden, wobei das stereogene Zentrum an dieser Position nicht verändert wird, da die Hydroxygruppe als angreifendes Agens fungiert.



**Abb. 14: Derivatisierung der sauren PPCP mit MCM am Beispiel von NLA**

Die Derivatisierung ist bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten durchführbar und bietet den Vorteil, dass durch die extraktive Aufarbeitung ein Teil der Matrix abgereichert werden kann. Ebenso beeinflussen Spuren von Wasser die Umsetzung nicht. In Abb. 15a und 15b sind die Massenspektren zweier Derivate von NLA, die sich aus der Umsetzung mit MCM in Methanol und in Trifluorethanol ergeben, dargestellt. Ebenso ist das Derivat von Desmethyl-Naproxen wiedergegeben (Abb. 15d), an dessen Phenolgruppe die entsprechende Carbonatfunktion entsteht, so dass es durch diese Art der Derivatisierung gemeinsam mit der Mutterverbindung in Proben erfasst werden kann.

Es wurden des Weiteren verschiedene Ester von NLA dargestellt, bei denen die  $\alpha$ -Hydroxygruppe unverändert ist. Dies wurde wieder durch eine säurekatalysierte Umsetzung mit einigen Alkoholen erzielt. Verglichen mit den MCM-Derivaten, zeichnen sich diese aufgrund der freien Hydroxygruppe durch ein stärkeres Peak-Tailing, bei jedoch ähnlicher Retentionszeit, aus. Die Massenspektren dieser Derivate weisen dafür recht intensive Molekülionen auf (Abb. 15c), welche bei den MCM-Derivaten eher schwach sind.

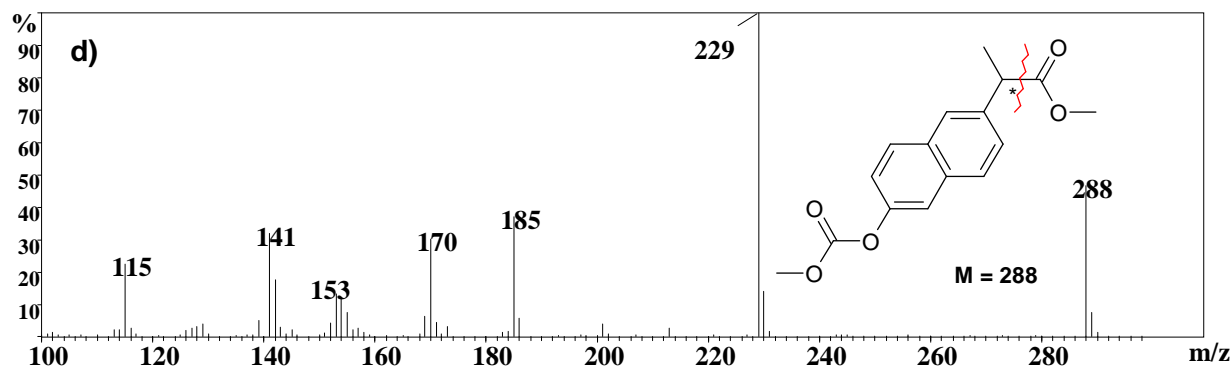
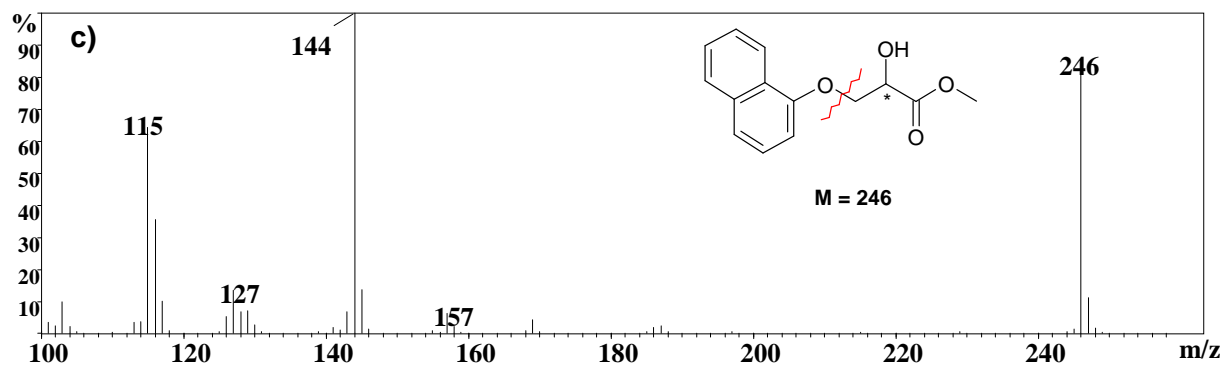
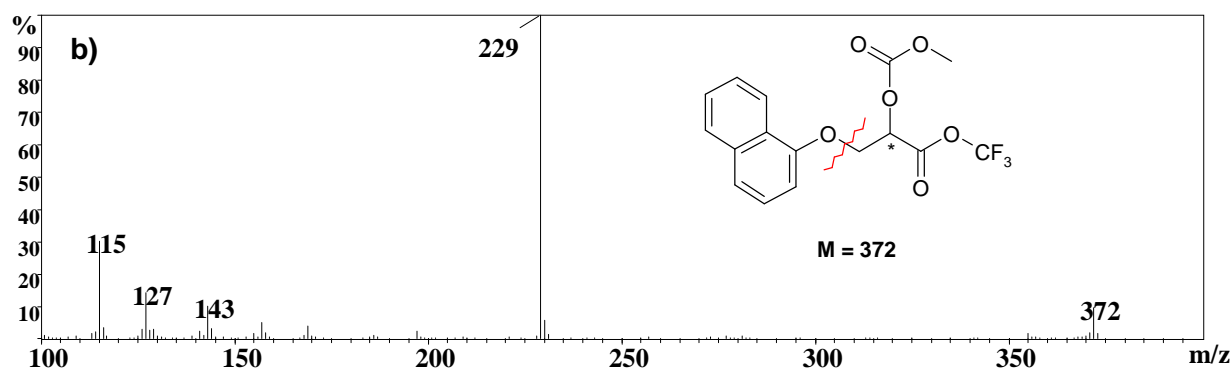
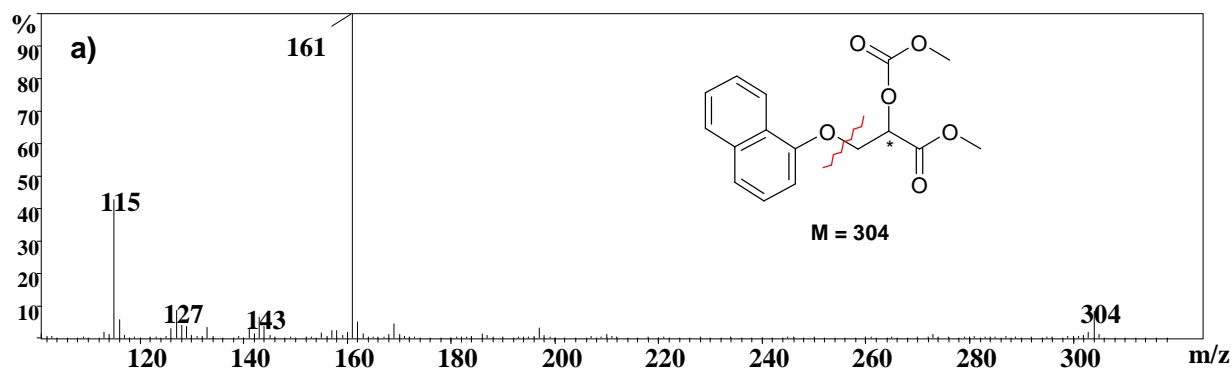


Abb. 15: EI-Massenspektren von NLA-Derivaten, die sich aus der Umsetzung mit a) MCM in Methanol, b) MCM in Trifluorethanol und c) Methanol ( $+H_2SO_4$  kat.) ergeben sowie von DMNPX, umgesetzt mit MCM in Methanol (d)

## 2.4. Enantioselektive chromatographische Trennung

Die verschiedenen Derivate der Substanzen wurden an verschiedenen chiralen stationären Phasen auf ihre enantioselektive Trennbarkeit getestet, so dass sich an dieser Stelle erst entschied, welche Art der Derivatisierung letztlich für die Analyse der Umweltproben in Frage kam.

Zwei Komponenten gelten als voneinander getrennt, wenn sich ihre Nettoretentionszeiten ( $t_s$ ), die ein Maß für die Verweilzeit in der stationären Phase sind, voneinander unterscheiden, was durch den so genannten Trennfaktor  $\alpha$  angegeben wird, der  $> 1$  sein muss:

$$\alpha = \frac{t_{s2}}{t_{s1}}$$

Dabei sagt ein großer Trennfaktor allerdings nichts über die Qualität der Trennung aus, da Peakbreite und -form nicht berücksichtigt werden. Auskunft darüber gibt vielmehr die Trennqualität  $T$ , die sich aus der folgenden Formel ergibt:

$$T = \left(1 - \left(\frac{h_{\min}}{h_{\max}}\right)\right) \cdot 100$$

Dabei ist  $h_{\max}$  die maximale Peakhöhe des ersteluirenden Peaks und  $h_{\min}$  die minimale Höhe zwischen den beiden Peaks. Im folgenden Abschnitt wird deshalb ausschließlich die Trennqualität, deren Angabe in Prozent erfolgt, verwendet. Um verlässliche Aussagen über die Zusammensetzung der Enantiomeren in Proben treffen zu können, sollte ihre Trennung mindestens bei 80 % liegen. Es zeigte sich, dass die Trennung der Enantiomeren in den Umweltproben dabei in der Regel besser war als die der verwendeten Referenzsubstanzen, da die Konzentration der Verbindungen in den Umweltproben meist niedriger war als die der Referenzverbindungen, mit denen die Phasen getestet wurden. Eine weitere Voraussetzung für eine spätere Anwendung auf Umweltproben war eine Retentionszeit von maximal 2.5 h, da die Signale ansonsten zu breit und somit zu wenig intensiv wären. Für die enantioselektive chromatographische Trennung der ausgewählten Substanzen standen sowohl für die GC als auch für die HPLC chirale stationäre Phasen zur Verfügung. Vorzugsweise sollte eine enantioselektive Trennung mittels GC erreicht werden, da die Empfindlichkeit des HPLC-Systems nicht ausreichend war (HPLC-UV/VIS), die Verbindungen in Umweltproben zu detektieren. Im Fall einer erfolgreichen enantioselektiven Trennung an ausschließlich einer der HPLC-Phasen hatte das zur Folge, dass jedes Enantiomer fraktionierend gesammelt und anschließend die Konzentrationen mittels nicht-enantioselektiver GC-MS bestimmt werden musste. Die Trennung der Enantiomeren musste in diesen Fällen somit fast vollständig sein.

Im Rahmen der enantioselektiven GC wurde mit folgenden chiralen stationären Phasen gearbeitet:

- Hydrodex- $\beta$ -6TBDM, 25 m (Macherey-Nagel)
- Chirasil-Dex, 25 m (Varian)

Beide Phasen besitzen modifizierte  $\beta$ -Cyclodextrine als chirale Selektoren, die in einem stationären Träger eingebettet sind. Da der chirale Selektor der Hydrodex- $\beta$ -6TBDM-Phase nicht kovalent an den stationären Träger gebunden ist, war das Säulenbluten, insbesondere kurz nach der Installation der Säule höher im Vergleich zu gängigen MS-Säulen. Es zeigte sich jedoch, dass das in Hinblick auf die Empfindlichkeit keinen allzu großen Nachteil darstellte. Ferner ergab sich, dass die Installation über einen längeren Zeitraum im Gerät mit kontinuierlichen Messungen die Enantioselektivität kaum beeinflusste. Als problematisch stellte sich allerdings ein längeres Lagern der Säule nach einer Messperiode und ihre erneute Installation heraus, denn dies führte recht schnell zu einer Abnahme der Enantiodifferenzierung. Die zu Beginn der Arbeiten benutzte Säule besaß eine maximale Arbeitstemperatur von 180 °C aufgrund der nicht kovalenten Bindung des Selektors an den Träger. Eine später erworbene Phase konnte dann bei einer isothermen Temperatur von 230 °C bzw. bei einer kurzzeitigen Maximaltemperatur von 250 °C betrieben werden.

Ferner standen die folgenden chiralen HPLC-Phasen zur Verfügung:

- Nucleodex- $\beta$ -PM, 250 mm (Macherey-Nagel)
- Nucleodex- $\beta$ -PM \*, 250 mm (Macherey-Nagel)
- Kromasil-Cellucoat, 250 mm (Akzo Nobel)
- Chirex 3005 ((*R*)-NGly und DNB), 46 mm (Phenomenex)
- Chirex 3010 ((*S*)-Val und DNAn), 46 mm (Phenomenex)

Bei den letzten beiden Säulen handelte es sich um kurze Testsäulen, mit deren Hilfe überprüft wurde, ob die chiralen Selektoren prinzipiell für eine enantioselektive Trennung der Substanzen in Frage kamen. Wären Substanzen erfolgreich angetrennt worden, wären längere Säulen erworben worden, um eine vollständige Trennung zu ermöglichen. Die Enantiodifferenzierung an diesen drei Phasen wird durch Aminosäurederivate als Selektoren ermöglicht. Bei den obigen zuerst genannten Phasen hingegen handelt es sich um modifizierte  $\beta$ -Cyclodextrinphasen. Bei der zweiten sind dabei von Herstellerseite Fehler bei der Modifizierung entstanden, so dass die Phase keine einheitliche Derivatisierung der Hydroxygruppen aufwies. In früheren Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe erwies sich aber gerade dieses uneinheitliche Muster als günstig für bestimmte enantioselektive Trennungen, so dass auf diese Phase ebenfalls zurückgegriffen wurde<sup>[119]</sup>. Die Enantiomerentrennung an Kromasil-Cellucoat (Kromasil-CC) wird durch ein Cellulosederivat, *tris*-(3,5-Dimethylphenyl)carbamoyl-Cellulose, ermöglicht.



### 2.4.1. Trennung der Betablocker-Enantiomeren

Von den drei verschiedenen Derivaten von Metoprolol und Propranolol wurden nur die DMS-Derivate erfolgreich enantioselektiv getrennt. Die Trennung gelang dabei an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM, an der die Enantiomere beider Verbindungen zu über 90 % voneinander getrennt werden konnten (Abb. 16), was für die spätere Analyse der Umweltproben ausreichend war. Diese wurde bei einem Temperaturgradienten mit einer Maximaltemperatur von 180 °C erreicht, eine Erhöhung der Maximaltemperatur auf 220 °C führte zu einer deutlich schlechteren Trennung der Enantiomeren. Die Retentionszeiten mit ca. 113 min für Metoprolol und 128 min für Propranolol liegen in einem vertretbaren Rahmen, denn die Peaks beider Verbindungen sind nicht allzu breit. Durch Messung der einzelnen Enantiomeren konnte bestimmt werden, dass von beiden Verbindungen die S(-)-Form das zuerst eluierende Enantiomer ist. Die anderen beiden dargestellten Derivate der Verbindungen eluierten selbst bei einer isothermen Temperatur von 180 °C nicht von der Säule.

In der Literatur sind bisher keine enantioselektiven gaschromatographischen Trennungen für Metoprolol und Propranolol beschrieben. Es existieren nur einige enantioselektive Trennungen mittels HPLC, welche im Rahmen der bereits zitierten Analyse dieser Verbindungen in Klärwerksproben angewendet wurden (MacLeod, 2007), sowie weitere Trennungen mit Anwendungen im pharmazeutischen Bereich. U. a. lassen sich die Enantiomere beider Verbindungen z. B. auch an Kromasil-CC trennen <sup>[120]</sup>, was im Rahmen

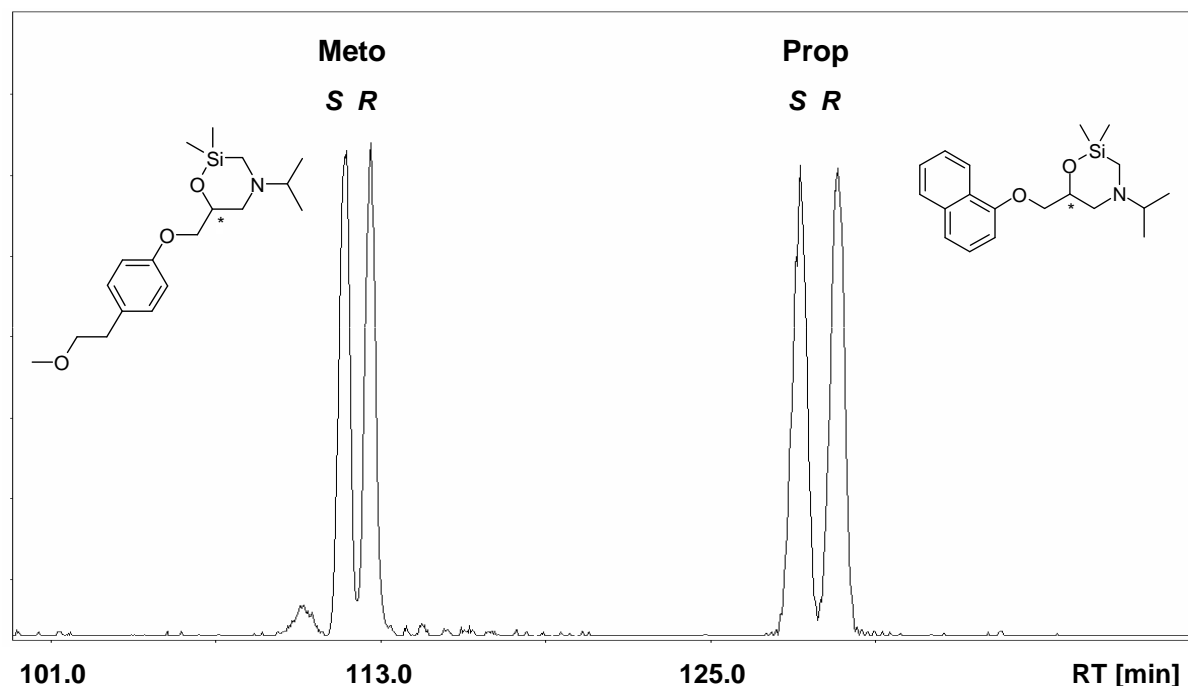


Abb. 16: Getrennte Enantiomere von Metoprolol und Propranolol an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (60 °C (15 min), 5 °C/min, 180 °C; 55 kPa)

einer präparativen Trennung im Verlauf dieser Arbeit auch angewendet wurde. Im Gegensatz zur Hydrodex- $\beta$ -6TBDM-Phase ist an dieser Phase die *R*-Form beider Verbindungen das zuerst eluierende Enantiomer.

#### 2.4.2. Trennung der Enantiomeren der Betablocker-Metaboliten

Aufgrund der erfolgreichen enantioselektiven Trennung der DMS-Derivate der Mutterverbindungen an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM erschien die Trennung der entsprechenden DMS-Derivate der Metaboliten aussichtsreich. Es konnte jedoch nur MetoCOOH erfolgreich enantioselektiv in einer akzeptablen Retentionszeit getrennt werden (Abb. 17). Die Trennung der Enantiomeren ist etwas schlechter als die der Mutterverbindung, sie liegt aber trotzdem bei knapp 90 %.

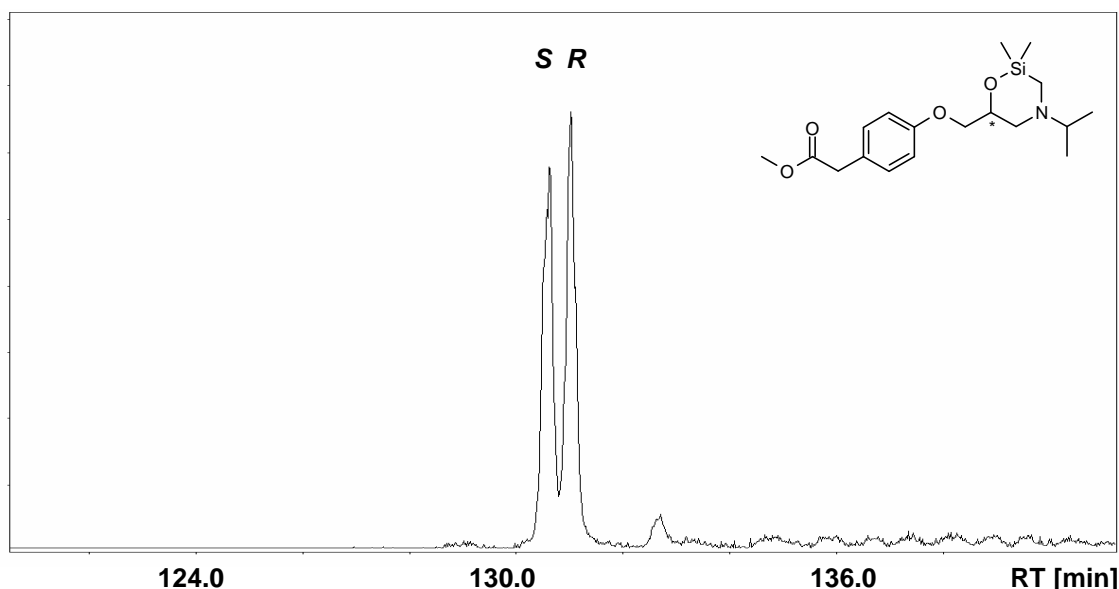


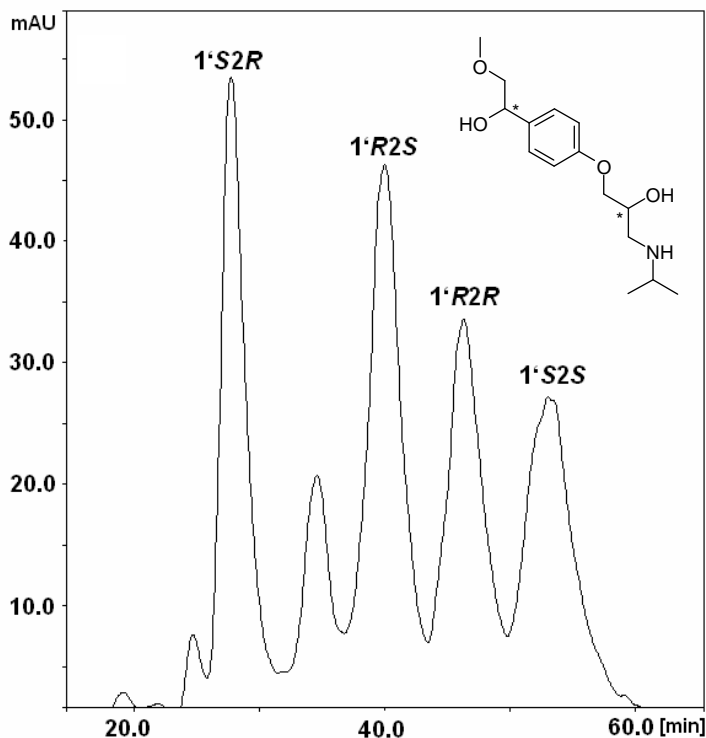
Abb. 17: Getrennte Enantiomere von Metoprolol-Säure an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (60 °C (15 min), 5 °C/min, 180 °C (80 min), 10 °C/min, 220 °C; 55 kPa)

In der Literatur finden sich für MetoCOOH zwei enantioselektive Trennungen mittels HPLC, die angewendet wurden, um diese Verbindung in Plasma und Urin zu bestimmen. Mistry *et al.* gelang die Trennung dabei mithilfe einer Chirobiotic T-Säule<sup>[121]</sup> und Cerqueira *et al.* an einer Chiralcel OD-H-Phase<sup>[54]</sup>. Letztere ist mit dem gleichen Cellulosederivat belegt, welches auch in Kromasil-CC als chiraler Selektor eingesetzt wird. Die Trennung der Enantiomeren auf Chiralcel OD-H erfolgte in Form des Methylesters (MetoCOOH-Me). Die Elutionsreihenfolge, die von Cerqueira *et al.* mittels Zirkulardichroismus bestimmt wurde, ist dabei die gleiche wie die der Mutterverbindung. Diese Zuordnung wurde von ihnen unter der

Annahme getroffen, dass bei diesen Messungen das erst- und zweit-eluierende MetoCOOH-Enantiomer das gleiche Vorzeichen wie das erst- und zweit-eluierende Enantiomer von Metoprolol aufweisen. Da sich beide Verbindungen nur geringfügig voneinander unterscheiden, MetoCOOH-Me besitzt nur ein zusätzliches Carbonylsauerstoffatom in der  $\beta'$ -Stellung der Seitenkette, ist diese Argumentation zulässig. Unter Voraussetzung dieser Annahme wurde daher ermittelt, dass die Elutionsreihenfolge von MetoCOOH an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM genau umgekehrt ist wie an Kromasil-CC und somit an jener Phase auch der von Metoprolol entspricht (*S*, *R*).

Die Enantiomere von MetoOH und von OHPL eluierten beide nicht von der Hydrodex- $\beta$ -6TBDM-Phase, ebenso wenig wie von der Chirasil-Dex-Phase. Auch konnten die TMS-TFA-Derivate beider Verbindungen nicht an diesen beiden Phasen getrennt werden, sie eluierten ebenfalls nicht bei einer isothermen Temperatur von 180 °C von den Säulen.

An den stationären HPLC-Phasen wurden zunächst die underivatisierten Verbindungen getestet. Die vier Stereoisomeren von MetoOH konnten auf diese Weise erfolgreich an Kromasil-CC getrennt werden (Abb. 18). Die beste Trennung wurde bei einer Lösungsmittelzusammensetzung von 98/02/0.1 *n*-Hexan/2-Propanol/Diethylamin mit einer Flussrate von 0.7 mL/min erzielt. Auch zeigte sich, dass die Absenkung der Säulentemperatur auf nur 5 °C die Trennung positiv beeinflusste. Die ersten beiden Stereoisomere sind basisliniengetreunt, und es liegen mehrere Minuten Differenz zwischen ihnen. Zwischen dem zweit- und dritt-eluierenden und dem dritt- und viert-eluierenden Enantiomer besteht ebenfalls eine Basislinientrennung, sie eluieren jedoch unmittelbar nacheinander. Über die Trennung der Stereoisomeren von MetoOH unter Verwendung des gleichen chiralen Selektors eines anderen Herstellers wurde erstmalig von Balmer *et al.* berichtet <sup>[122]</sup>. Unter etwas anderen Bedingungen mit vergleichbarer Retentionszeit wurde auch eine Basislinientrennung der ersten beiden Isomere erreicht, das dritt- und viert-eluierende Isomer wurden jedoch nur zu etwa 80 % getrennt. Kim *et al.* ordneten die entsprechenden Konfigurationen den vier Signalen zu <sup>[123]</sup>, die auch in Abb. 18 vermerkt sind. So bilden die ersten beiden Stereoisomere und das dritte und vierte Stereoisomer je ein Paar von Enantiomeren. Eine enantioselektive Trennung von OHPL konnte auch an keiner der HPLC-Phasen weder in nativer noch in derivatisierter Form erreicht werden.



**Abb. 18: Enantioselective Trennung von  $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol an Kromasil-CC (98/02/0.1 *n*-Hexan/2-Propanol/Diethylamin, 5 °C, 0.7 mL/min)**

Von den verschiedenen Ester-Derivaten von NLA wurde an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM eine Trennung des Methylesters mit freier  $\alpha$ -Hydroxygruppe (NLA-Me) erreicht. Diese betrug jedoch nur 40 %, was für die spätere Analyse nicht ausreichend war (Abb. 19a). Erfolgreicher war die flüssigchromatographische Trennung an Kromasil-CC; hier wurde eine Basislinientrennung der Enantiomere mit mehreren Minuten Differenz in der Retentionszeit erreicht (Abb. 19b und c). Es wurden sowohl die underivatisierte Verbindung als auch der Methylester (NLA-Me) getrennt. Für die enantioselective Trennung der nativen Verbindung wurde eine Lösungsmittelzusammensetzung von *n*-Hexan/2-Propanol/Methansäure (90/10/0.1), eine Temperatur von 20 °C und eine Flussrate von 1.0 mL/min verwendet. Die Retentionszeiten lagen dabei bei 15 und 22 min. Trotz der Zugabe von Ameisensäure wiesen die Peaks ein recht starkes Tailing auf. Die Enantiomere in Form des Methylesters eluierten bei einer Lösungsmittelzusammensetzung von *n*-Hexan/2-Propanol (90/10) und einer Flussrate von 1.5 mL/min nach 11 und 20 min. Durch die Bestimmung der optischen Drehung der getrennten Enantiomeren des Methylesters von NLA wurde festgestellt, dass das (-)-Enantiomer die zuerst eluierende Form an Kromasil-CC ist. Die Elutionsreihenfolge an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM hingegen ist genau umgekehrt. Die Elution der NLA-Me-Enantiomeren erfolgt an beiden Phasen somit genau in umgekehrter Reihenfolge wie die Mutterverbindung Propranolol, wenn das Vorzeichen der optischen Drehungen beider

Verbindungen als gemeinsamer Bezug gewählt wird. Die zugehörigen absoluten Konfigurationen der NLA-Enantiomeren sind allerdings in der Literatur nicht bekannt, da die Verbindung bisher noch nicht stereoselektiv untersucht wurde.

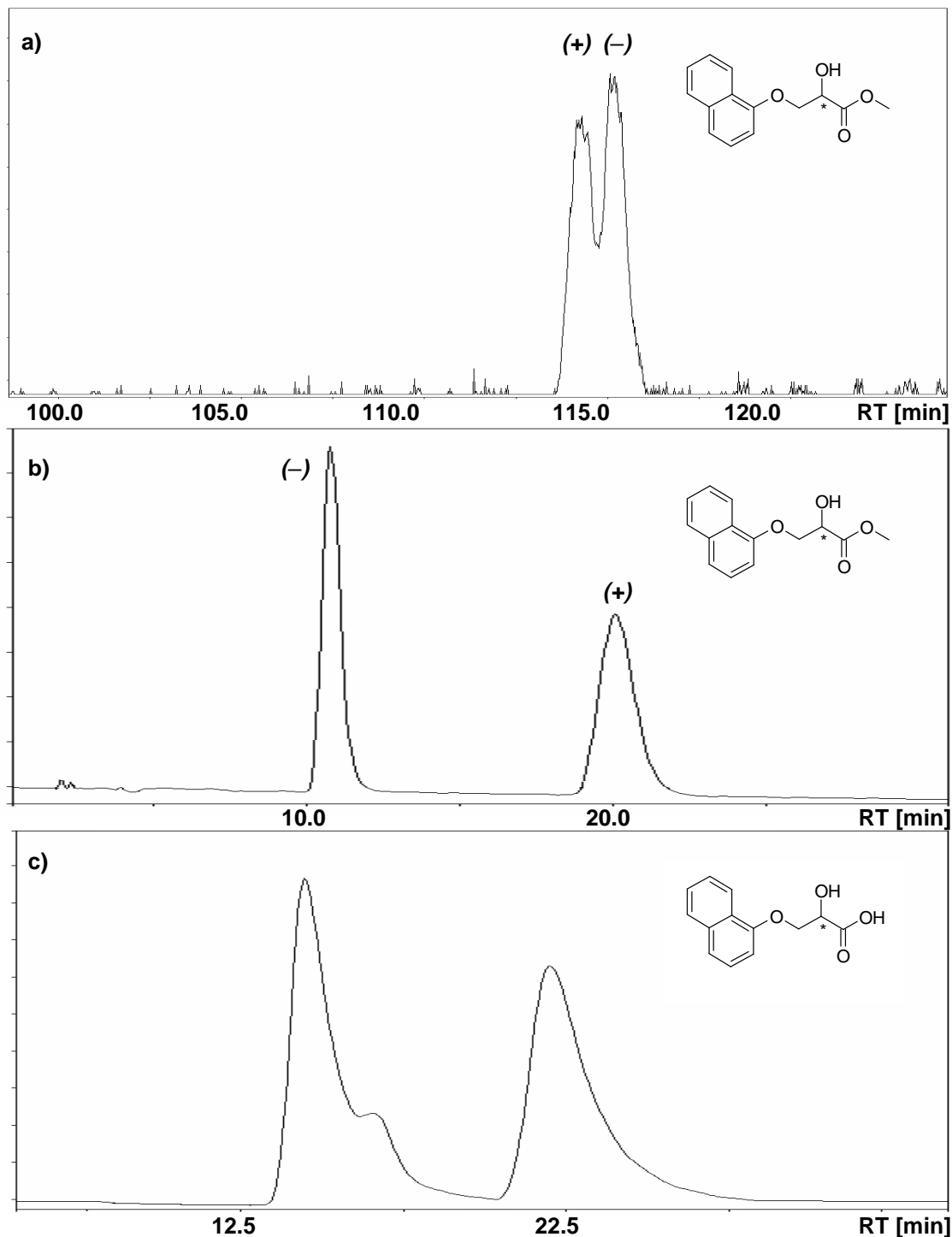


Abb. 19: Enantioselektive Trennung von Naphthoxymilchsäure an a) Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (70 °C (15 min), 5 °C/min, 180 °C ; 100 kPa), b) Kr omasil-CC (90/10 *n*-Hexan/2-Propanol, 20 °C, 1.5 mL/min), c) Kromasil-CC (90/10/0.1 *n*-Hexan/2-Propanol/Methansäure, 20 °C, 1.0 mL/min)

### 2.4.3. Enantioselektive Trennung der Analgetika

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden Ibuprofen und sein Hauptmetabolit IbuOH erfolgreich enantioselektiv an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM getrennt. Die Trennung gelang dabei unter Verwendung einer nur 12 m langen Säule, an der die Enantiomere beider Verbindungen in Form ihrer Methylester nahezu basisliniengetrennt wurden.

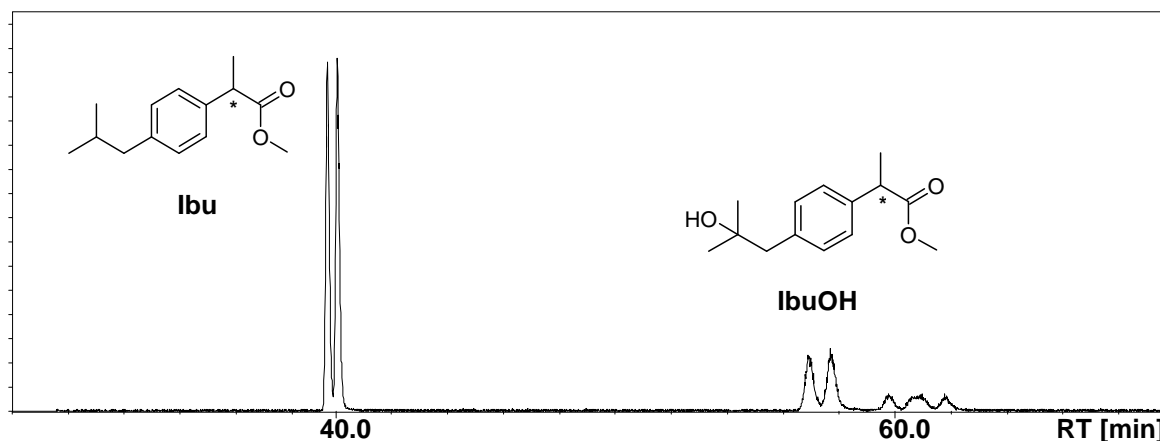


Abb. 20: Enantioselektive Trennung von Ibuprofen und seines Metaboliten Hydroxy-Ibuprofen an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (12 m; 60 °C (5 min), 2.5 °C/min, 150 °C ; 3 5 kPa)

Die Trennung der Naproxen-Enantiomeren in Form des Methylesters gelang an dieser Phase ebenfalls, wie es vom Hersteller auch bekannt war <sup>[124]</sup>. Die beste Trennung wurde allerdings mit einem Temperaturgradienten erzielt und nicht, wie von Herstellerseite empfohlen, bei einer isothermen Temperatur von 130 °C. Die Enantiomere wurden auf diese Weise zu etwa 98 % voneinander getrennt (Abb. 21). Die Elutionsreihenfolge ist die gleiche wie die von Ibuprofen; das S-Enantiomer ist die zuerst eluierende Form.

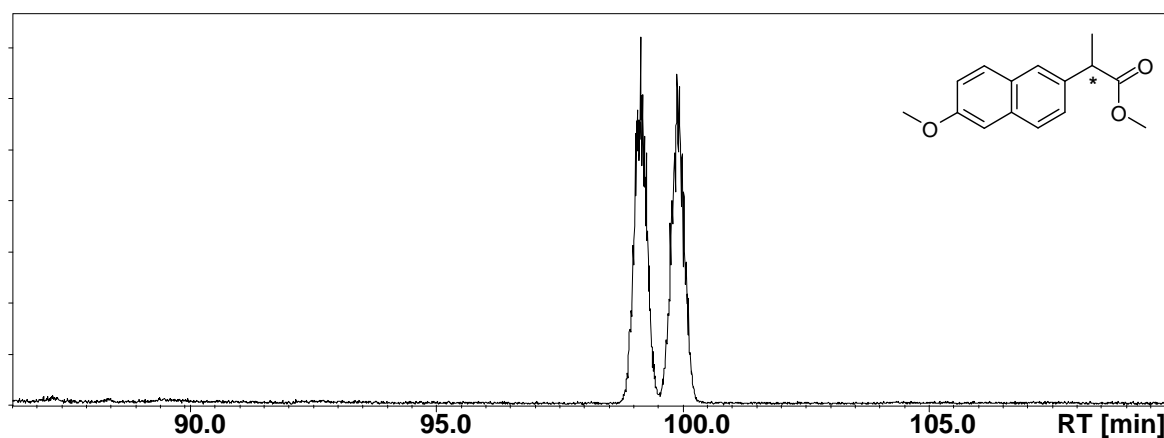


Abb. 21: Getrennte Enantiomere von Naproxen an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (70 °C (15 min), 2 °C/min, 180 °C ; 83 kPa)

#### 2.4.4. Enantioselektive Trennung von Bayrepel und seines Transformationsprodukts

Bayrepel gehörte zu den Verbindungen, bei der keine vorherige Derivatisierung notwendig war. Sie und ihr Transformationsprodukt, die Bayrepel-Säure in Form des Methylesters, konnten erfolgreich enantioselektiv an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM getrennt werden (Abb. 22). Beide Verbindungen treten in vier stereoisomeren Formen auf, die jeweils alle voneinander getrennt werden konnten. Für Bayrepel wurde dabei ein Temperaturprogramm mit einem schnellen Temperaturanstieg von 10 °C/min verwendet, wodurch die Stereoisomere in weniger als 20 min voneinander getrennt wurden. Sie sind dabei alle basisliniengetrennt. Um die Trennung der Stereoisomere des Transformationsprodukts zu erreichen, wurde hingegen ein langsamerer Temperaturanstieg von 2 °C/min verwendet. Die ersten beiden Stereoisomere wurden so zu 85 % voneinander getrennt, die übrigen sind alle ebenfalls basisliniengetrennt. Eine Zuordnung der Konfigurationen war nicht möglich, da keines der Stereoisomere einzeln vorlag oder isoliert werden konnte. So kann nicht gesagt werden, ob es sich bei den ersten beiden Stereoisomeren jeder Verbindung um ein Paar von Enantiomeren handelt oder ob das erst- und dritt-eluierende bzw. das erst- und viert-eluierende Stereoisomer ein Enantiomerenpaar bilden.

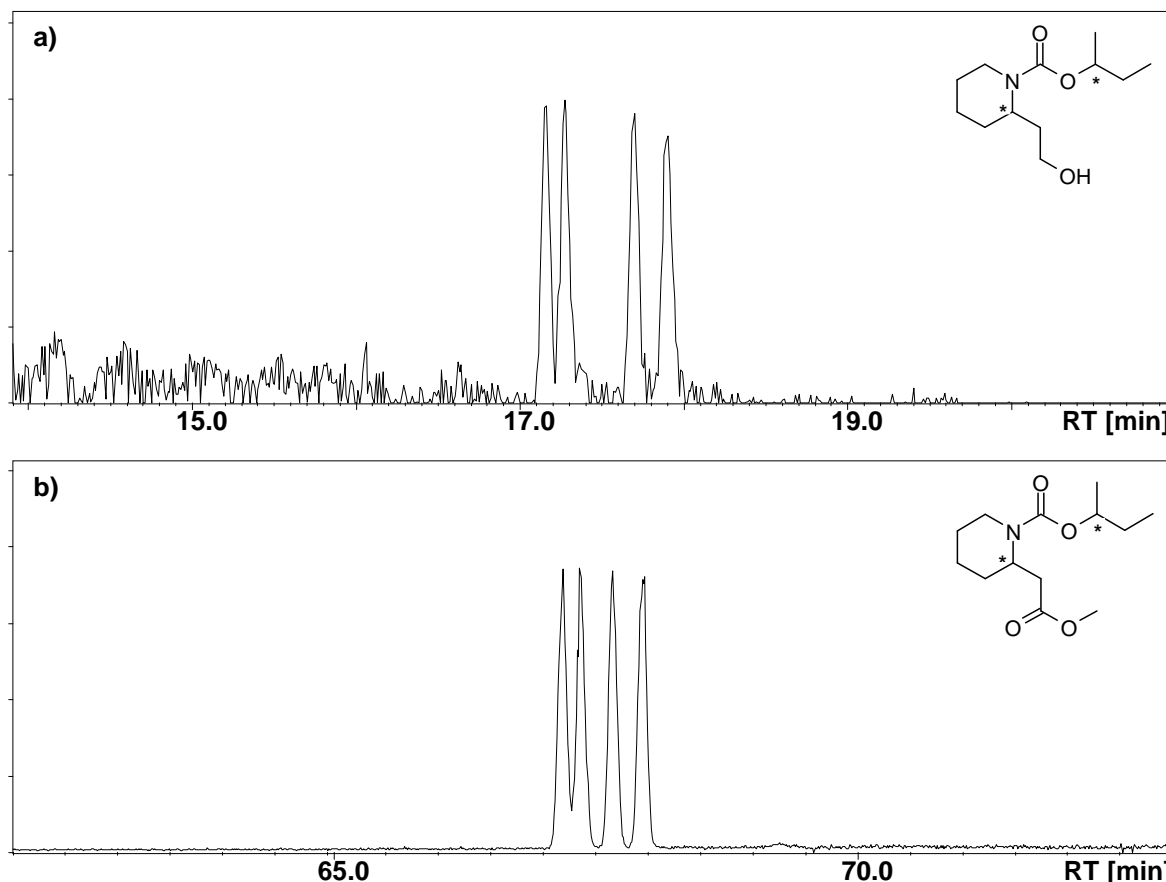


Abb. 22: Enantioselektive Trennung von a) Bayrepel und b) Bayrepel-Säure an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (a) 70 °C (2 min), 10 °C/min, 180 °C; 83 kPa; b) 70 °C (15 min), 2 °C/min, 180 °C, 83 kPa)

### 2.4.5. Enantioselektive Trennung der UV-Filter

Von den drei UV-Filtersubstanzen, bei denen keine vorherige Derivatisierung notwendig war, konnte nur MBC enantioselektiv gaschromatographisch an beiden Phasen getrennt werden. Die Trennung der Enantiomere betrug allerdings in beiden Fällen nicht mehr als 40 % (Abb. 23a und b). Erfolgreicher war die flüssigchromatographische Trennung an Kromasil-CC, hier wurde eine vollständige Trennung der Enantiomeren erreicht (Abb. 23c). Diese wurde bei einer Verwendung von 100 % *n*-Hexan, einer Säulentemperatur von 10 °C und einer Flussrate von 0.5 mL/min erhalten. Die Retentionszeiten betrugen dabei 24 min und 32 min für die beiden Stereoisomere. Ferner konnten die Enantiomere von OCR teilweise an dieser Phase getrennt werden. Die Trennqualität lag bei Verwendung einer Mischung von *n*-Hexan/Ethanol (95/5), einer Temperatur von 5 °C und einer Flussrate von 0.5 mL/min bei 50 %. Die Temperatur hatte dabei großen Einfluss auf die Trennung; bei 20 °C aber ansonsten gleichen Parametern wurden beide Enantiomere nur angetrennt (Abb. 24a und b).

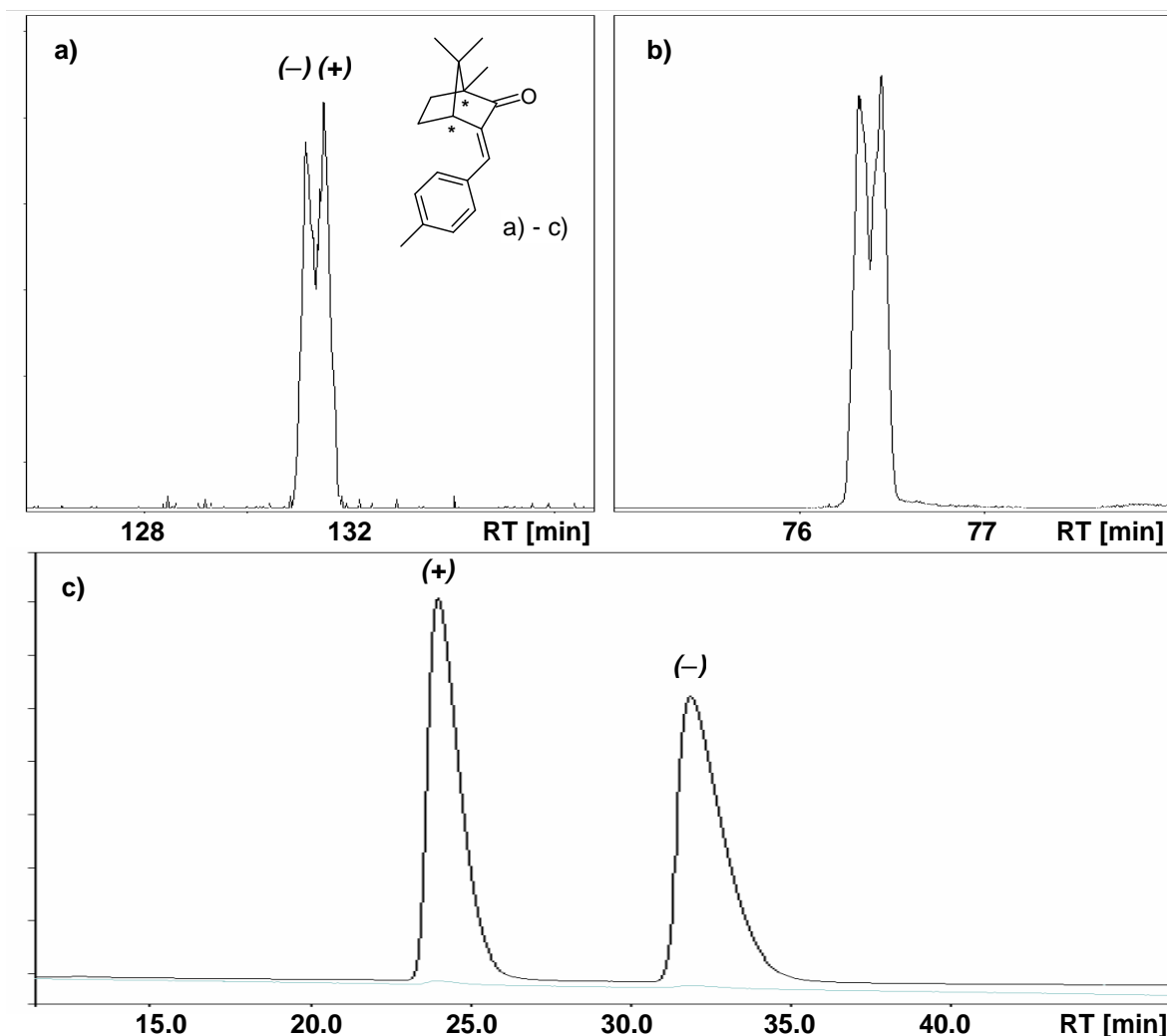
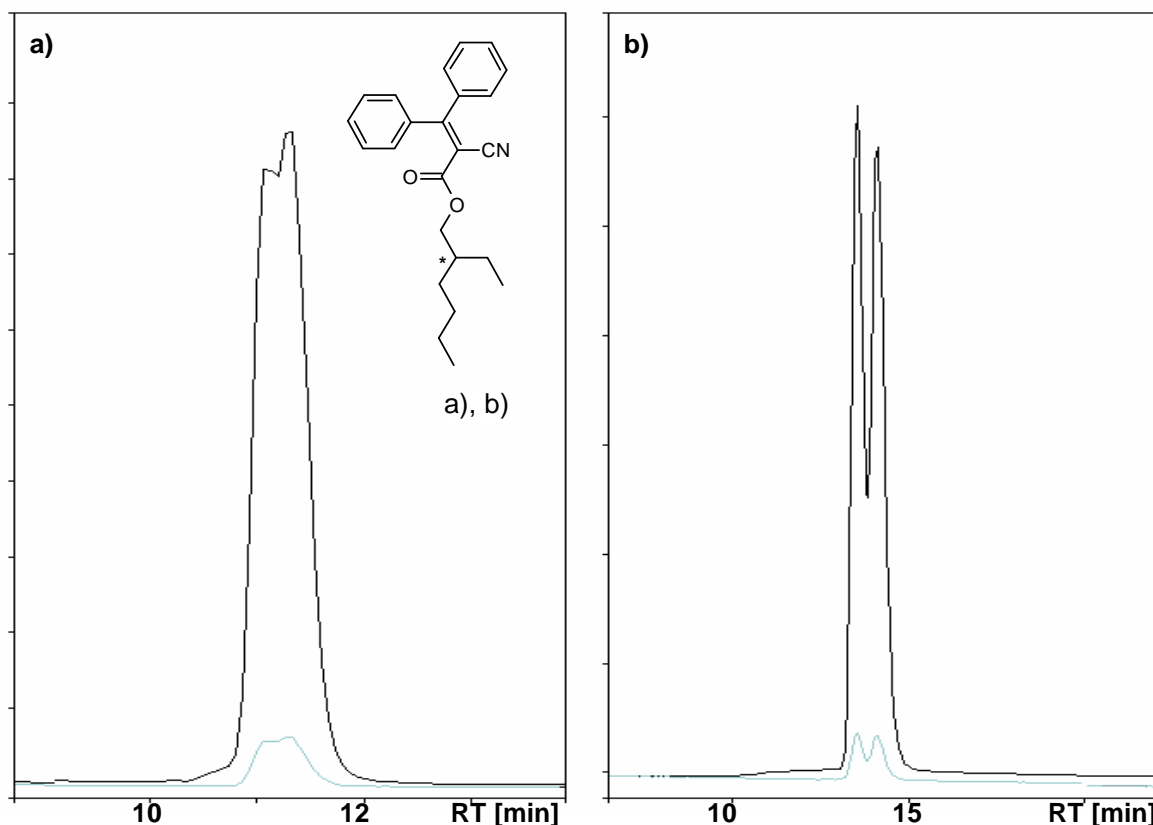


Abb. 23: Enantioselektive Trennung von 4-Methylbenzylidencampher an a) Hydrodex- $\beta$ -6TBDM, b) Chirasil-Dex, c) Kromasil-CC





**Abb. 24: Enantioselektive Trennung von Octocrylene an Kromasil-CC bei a) 20 °C, b) 5 °C**

Es zeigte sich allerdings, dass die Trennqualität an dieser Phase für MBC und OCR nach einer Vielzahl von Messungen bei unterschiedlichsten Parametern im Verlauf der Arbeit abnahm. So wurde für MBC zwar noch eine Basislinientrennung erreicht, jedoch eluierten die Enantiomere nun unmittelbar nacheinander. Für OCR wurde nur noch eine Trennung von nicht mehr als 30 % erreicht. Bei allen anderen Substanzen, die erfolgreich an dieser Phase getrennt wurden, wurde hingegen keine Verschlechterung der Trennqualität beobachtet. Der UV-Filter EHMC konnte an keiner der zur Verfügung stehenden Phasen getrennt oder angetrennt werden.

Die bereits erwähnte enantioselektive Analyse von MBC in Gewässern und Fischen, die von Buser *et al.* publiziert wurde, erfolgte gaschromatographisch unter Verwendung eines modifizierten  $\gamma$ -Cyclodextrins (2.6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\gamma$ -cyclodextrin) <sup>[106]</sup>. Das (+)-Enantiomer (1*R*, 4*S*) ist dabei die zuerst eluierende Form und die Elutionsreihenfolge entspricht somit der an Kromasil-CC bestimmten bzw. ist umgekehrt zu der an Hydrodex- $\beta$ -6TBDM. Es sind ansonsten keine weiteren enantioselektiven Trennungen für MBC oder die anderen beiden UV-Filter im gas- oder flüssigchromatographischen Bereich in der Literatur bekannt.

#### 2.4.6. Zusammenfassung

Es konnten alle ausgewählten Substanzen, bis auf OHPL und EHMC, enantioselektiv getrennt werden. Dabei war die Trennung bei allen Substanzen außer OCR vollständig bzw. nahezu vollständig, so dass eine Bestimmung der Enantiomeren in Umweltproben möglich war. Die enantioselektive Trennung von NLA, MetoOH und MBC gelang dabei nur mittels HPLC, so dass die Stereoisomeren in Umweltproben in dem Fall erst nach ihrer fraktionierenden Trennung mittels nicht-enantioselektiver GC-MS bestimmt werden konnten. Es wurden erstmalig enantioselektive chromatographische Trennungen für Bayrepel und die entsprechende Säure sowie für NLA erreicht. Darüber hinaus wurden die Betablocker Metoprolol und Propranolol und der Metabolit MetoCOOH erstmalig mittels enantioselektiver Gaschromatographie getrennt, und zwar in Form ihrer DMS-Derivate bzw. ihres DMS-Methyl-Derivats. Die enantioselektiven gaschromatographischen Trennungen wurden alle unter Verwendung der Hydrodex- $\beta$ -6TBDM-Phase erreicht, während die enantioselektiven HPLC-Trennungen an Kromasil-CC erfolgreich waren.

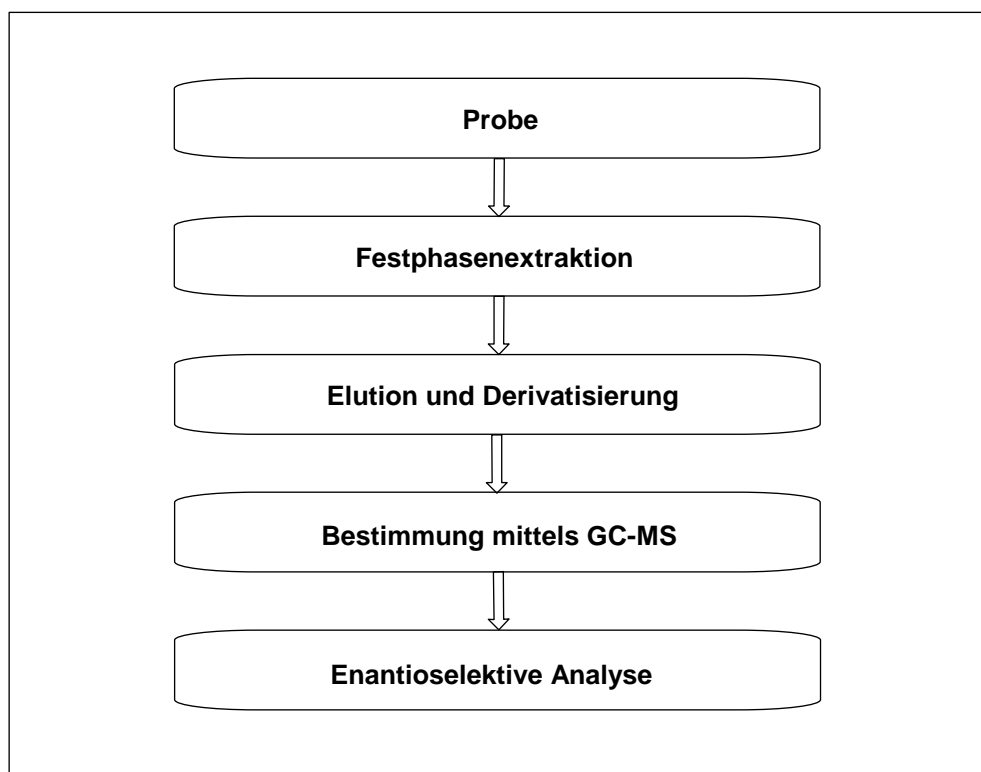
#### 2.5. Analyse von PPCP in wässriger Matrix

In diesem Abschnitt wird der vollständige Weg beschrieben, wie die ausgewählten Verbindungen in wässrigen Proben erfasst wurden. Das beinhaltet neben der Probennahme, die Isolierung der Substanzen aus der Wassermatrix, ihre weitere Aufarbeitung und schließlich ihre Bestimmung mittels GC-MS. Es konnte dabei auf die Arbeiten von Weigel und Kuhlmann zurückgegriffen werden, die im Bereich der Probenaufarbeitung und Bestimmung mit einigen der ausgewählten Substanzen, wie den Analgetika, bereits gearbeitet haben, so dass etablierte Methoden zu finden sind <sup>[91, 92]</sup>. Diese konnten somit entweder direkt übernommen werden oder wurden entsprechend modifiziert, wobei eine Optimierung einzelner Methodenschritte für die jeweiligen Verbindungen allerdings nicht allzu intensiv untersucht wurde. Für die Bestimmung der Verbindungen in wässrigen Proben wurden diese zunächst in verschiedenen Gruppen zusammengefasst, die sich aus der Natur der Verbindung und aus der Derivatisierung, mit der sie erfasst werden sollten, ergaben:

- Gruppe 1: Naproxen, Ibuprofen, IbuOH, Desmethyl-Naproxen, Bayrepel, Bayrepel-Säure, NLA
- Gruppe 2: Metoprolol, Propranolol, MetoOH, OHPL, MetoCOOH
- Gruppe 3: UV-Filter

Für diese drei Gruppen wurden jeweils unterschiedliche Methodenbedingungen angewendet, um sie in Proben zu erfassen. In Abb. 25 ist ein allgemeines Methodenschema, das die grundsätzlichen Arbeitsschritte zeigt, dargestellt. In den folgenden Abschnitten werden diese

Schritte kurz erörtert, eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Vorgehensweisen findet sich in Kapitel 7.



**Abb. 25: Grundlegende Schritte der Analyse von Wasserproben**

### 2.5.1. Probenahme

Das Volumen einer wässrigen Probe richtet sich nach der Konzentration der interessierenden Verbindungen an dem jeweiligen Ort der Probennahme. Die zu erwartenden Konzentrationen der ausgewählten Substanzen sollten alle etwa im ng/L-Bereich liegen und aus der Erfahrung früherer Mitarbeiter des Arbeitskreises war bekannt, dass für Proben aus dem Hamburger Raum deshalb eine Probengröße von 2-3 L in der Regel ausreichte. Zu diesem Zweck gab es im Arbeitskreis einen von Kuhlmann entwickelten Probenschöpfer, mit dem die Proben genommen wurden <sup>[92]</sup>. Dieser bestand aus rostfreiem Stahl, und es wurden handelsübliche Braunglasflaschen als Probengefäß eingesetzt. Der Probenschöpfer war so konzipiert, dass er erst unter Wasser geöffnet werden konnte, um ihn zu befüllen. Auf diese Weise wurde vermieden, dass Oberflächenfilme beim Herablassen bzw. beim Hochziehen in die Probe gelangten, und es wurde erreicht, dass nur der eigentliche Wasserkörper beprobt wurde. Bei Verwendung der Braunglasflaschen, bei denen es sich um ehemalige Lösungsmittelflaschen handelte, war darauf zu achten, dass diese kontaminationsfrei waren. Sie wurden deshalb nach jeder Probennahme sorgfältig gereinigt, ausgeheizt und versiegelt aufbewahrt. Gleiches galt für den Probennehmer selbst. Aufgrund der

Einteilung der Substanzen in Gruppen, wurden für jede der drei Gruppen Proben genommen. Diese wurden im Verlauf der Arbeit regelmäßig an ausgewählten Orten im Hamburger Raum gesammelt, wobei pro Probenahmestelle in der Regel drei Proben für jede Gruppe genommen wurden. Die Proben wurden meist sofort bzw. in den Tagen darauf aufgearbeitet, ein zu langes Lagern wurde nach Möglichkeit vermieden. Wenn sie aber doch einige Zeit aufbewahrt wurden, wurden sie im Kühlschrank bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### 2.5.2. Probenaufarbeitung

Die Isolierung der Verbindungen aus der wässrigen Matrix erfolgte durch Festphasenextraktion. Diese Art der Extraktion ist optimal für die ausgewählten Verbindungen, da es sich größtenteils um polare Substanzen handelt, deren effiziente Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion nur ungenügend sein dürfte. Es gibt eine große Anzahl an unterschiedlichen Sorbentien für die Festphasenextraktion, so dass ein breites Spektrum an organischen Kontaminanten in wässrigen Proben erfasst werden kann. Von Weigel wurden verschiedene Festphasenmaterialien in Bezug auf ihre Anwendbarkeit auf Pharmazeutika und auf andere polare organische Kontaminanten getestet <sup>[91]</sup>. Dabei erwiesen sich besonders zwei Sorbentien als geeignet, die später auch von Kuhlmann routinemäßig eingesetzt wurden. Das waren zum einen das Copolymer SDB-1, welches für unpolare und polare Verbindungen gleichermaßen anwendbar ist, zum anderen Oasis HLB, das insbesondere für polare Verbindungen mit sauren oder basischen Gruppen geeignet ist. Beide Sorbentien wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eingesetzt. Sie waren zunächst beide als loses *bulk*-Material verfügbar, im Verlauf der Arbeit konnte Oasis HLB dann aber nur noch in Form von fertig gepackten Extraktionskartuschen bezogen werden. Zu den weiteren Schritten der Aufarbeitung gehörten die Trocknung der Festphasen im Stickstoffstrom, die Elution der Verbindungen von der Festphase, die Einengung der Eluate und schließlich die Derivatisierung. Tabelle 3 zeigt im Überblick die Derivatisierungen, mit denen die Verbindungen umgesetzt wurden, um ihre enantioselektive Analyse zu ermöglichen:

**Tab. 3: Angewendete Derivatisierungen für die enantioselektive Analyse**

Verbindung	Art des Derivats
Betablocker	DMS
MetOH	nativ
MetCOOH	Methyl-DMS
NLA	Methyl
Ibu, NPX, IbuOH, BayCOOH	MCM

Um die Verbindungen der Gruppe 2 enantioselektiv zu analysieren, wurden sie im erhaltenen Probenextrakt zunächst mittels HPLC fraktionierend voneinander getrennt, was gleichzeitig als Aufreinigungsschritt diente. Metoprolol und Propranolol wurden mit CMDMCS umgesetzt und MetoCOOH wurde nach vorheriger Methylierung ebenfalls mit CMDMCS derivatisiert. Die MetoOH-Stereoisomere wurden in underivatisierter Form voneinander getrennt. Die vier nun einzeln vorliegenden Stereoisomere wurden im Anschluss ebenfalls mit CMDMCS derivatisiert, um ihre Konzentration zu bestimmen. Die sauren Verbindungen (Gruppe 1) wurden mit MCM in Methanol umgesetzt, wobei Bayrepel, das ebenfalls mit in diese Gruppe einbezogen wurde, unverändert aus der Derivatisierung hervorging. Ein zweites Aliquot wurde in einer säurekatalysierten Methylierung umgesetzt, um die enantioselektive Analyse von NLA zu ermöglichen.

### 2.5.3. Instrumentelle Bestimmung

Für die Identifizierung der Substanzen in den Proben mittels GC-MS wurden mehrere Ionenspuren verwendet (Tab. 4), wobei das Basis-Ion zur Auswertung verwendet wurde und das zweite bzw. dritte Ion der Bestätigung diente. Es wurden dabei nur Massenfragmente ( $m/z$ )  $> 100$  berücksichtigt. Das erfolgte aus dem Grund, dass es im Bereich  $< 100$  vor allem in Umweltproben zu allzu vielen Interferenzen, bedingt durch den Einfluss natürlicher Matrix, kommt und somit keine Zuverlässigkeit mehr gewährleistet ist. Die Entscheidung, ob eine Substanz in der Probe mit Sicherheit enthalten ist, ergab sich durch das Signal-Rausch-Verhältnis ( $s/n$ ), das mindestens bei 3 liegen muss (Detektionsgrenze, LOD). Eine Quantifizierung wurde ab einem Signal-Rausch-Verhältnis von  $\geq 9$  vorgenommen (Quantifizierungsgrenze, LOQ). Die Analyse der Proben erfolgte zunächst durch nicht-enantioselektive GC-MS-Messungen, welche der Identifizierung und Quantifizierung der Verbindungen dienten. Nur ausgewählte Proben, in denen die jeweiligen Substanzen nachgewiesen wurden, wurden dann für die enantioselektive Analyse verwendet. Das geschah unter dem Gesichtspunkt, dass die enantioselektiven GC-Messungen mit Messzeiten von teilweise 2 h recht lang waren. Da ferner einige Substanzen enantioselektiv mittels HPLC getrennt wurden (jeweils als Zweifach- oder Dreifachbestimmung), was somit einen längeren Arbeitsaufwand darstellte, sollte das nicht umsonst erfolgen. Des Weiteren wurde auf diese Weise vermieden, dass die chiralen Phasen nicht unnötigerweise matrixhaltigen Proben ausgesetzt waren, was zu längeren Lebenszeiten der Phasen führte. Abb. 26 zeigt schematisch den Gang der enantioselektiven Bestimmung für die verschiedenen Substanzen in Proben.

Tab. 4: Verwendete Ionenspurens zur Identifizierung der Verbindungen

Verbindung	1. Ion (Basis-Ion)	2. Ion	3. Ion
Metoprolol	186	322	294
Propranolol	186	314	286
MetoOH	186	444	416
MetoCOOH	186	336	308
OHPL	186	436	451
NLA	161	115	304
Naproxen	185	244	170
Desmethyl-Naproxen	229	185	288
Ibuprofen	161	220	177
IbuOH	118	178	161
Bayrepel	128	184	-
Bayrepel-Säure	156	128	184
MBC	254	169	211
OCR	250	361	233
EHMC	178	161	290

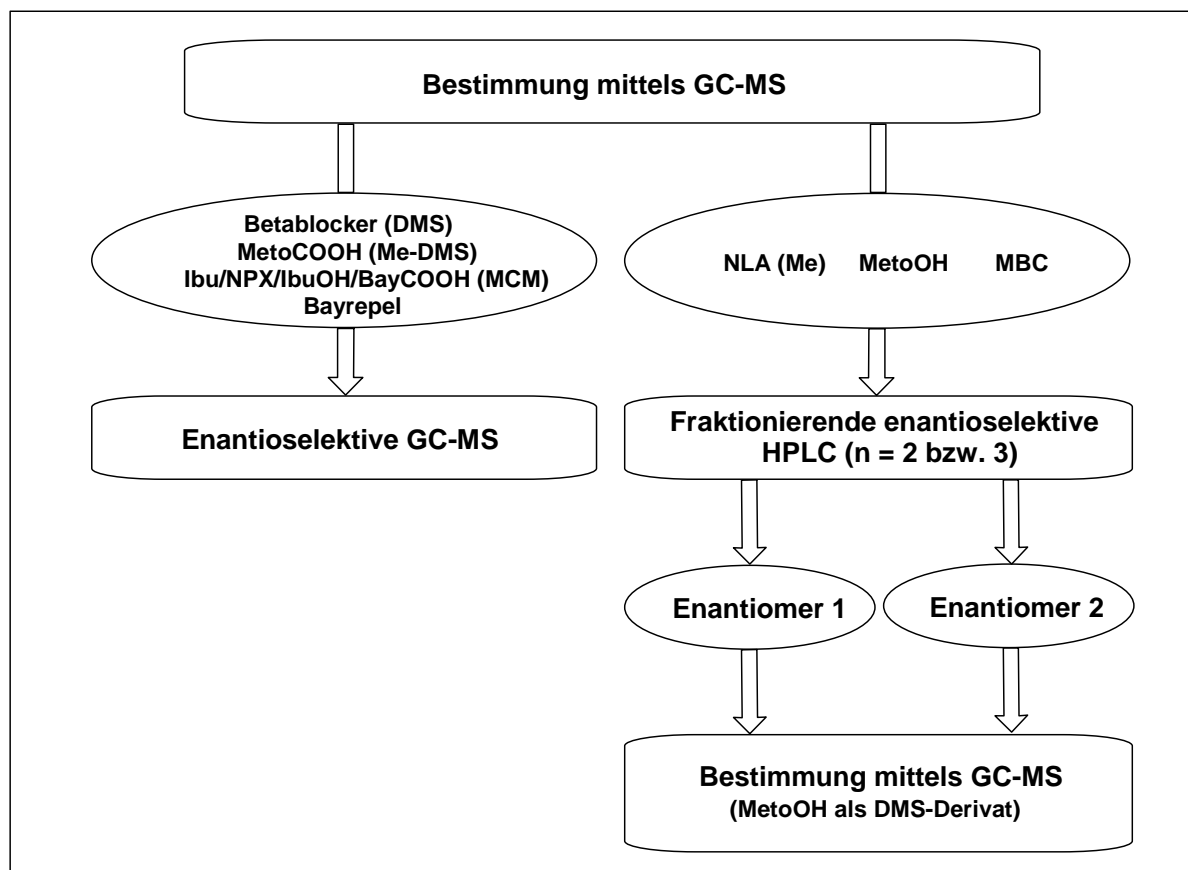


Abb. 26: Arbeitsschritte der enantioselektiven Bestimmung

## 2.6. Methodenvalidierung

Die Validierung einer Methode ist ein allgemein notwendiger Bestandteil einer umfassenden Qualitätssicherung in der Analytik, da sie sicherstellen soll, dass eine Methode für einen bestimmten Analysezweck geeignet ist (*fit for purpose*). Dies geschieht durch Ermittlung ihrer Leistungsfähigkeit, ausgedrückt in sog. analytischen Leistungsdaten, die gleichbedeutend mit einer Abschätzung der Messunsicherheit ist. Zu den Leistungsdaten einer Analysenmethode gehören: Anwendbarkeit, Genauigkeit (Präzision und Richtigkeit), Empfindlichkeit, Linearität, Arbeitsbereich, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen, Selektivität, Spezifität und Robustheit <sup>[125]</sup>. Es gibt eine Reihe von Protokollen und Leitfäden für die Methodenvalidierung, in denen die Prinzipien und einzelnen Bestandteile sowie Definitionen der analytischen Begriffe zu finden sind <sup>[126, 127]</sup>. Die Ansprüche an die analytische Forschung an Universitäten sind zwar weniger streng als die in staatlichen und kommerziellen Analyzelaboren oder Institutionen, dennoch sind wesentliche Aspekte der Qualitätssicherung zu beachten, um eine Überprüfung der angewendeten Methoden zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit ging es in erster Linie darum, zu demonstrieren, inwiefern die verwendeten Methoden geeignet waren, die ausgewählten Verbindungen in wässriger Matrix zu erfassen, weshalb Untersuchungen zu Anwendbarkeit und Genauigkeit, Arbeitsbereich, Linearität, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen sowie Robustheit durchgeführt wurden. Eine spätere Quantifizierung der Verbindungen in den Proben selbst stand dabei nicht unmittelbar im Vordergrund, jedoch sollten die einzelnen Verbindungen in verschiedenen Proben miteinander verglichen werden können.

### 2.6.1. Normierung

Vor den Messungen wurde jede Probe bzw. jede Standardlösung in einem definierten Volumen eines externen Standards aufgenommen. Dadurch sollten Schwankungen am Gerät, wie Detektorunregelmäßigkeiten, Änderungen in den Einstellungen oder eine eventuelle Verdunstung des Lösungsmittels ausgeglichen werden. Da alle erhaltenen Peakflächen der Substanzen immer durch die Peakfläche dieses so genannten Volumenstandards dividiert und somit normiert wurden, waren die erhaltenen Werte verschiedener Proben erst untereinander vergleichbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde MecopropmethylsterD<sub>3</sub> verwendet, das die allgemeinen Anforderungen, wie chemische Stabilität, kein Auftreten in den untersuchten Proben und ein gut auswertbares Signal, erfüllte. Der Standard wurde in einer Konzentration von 1 µg/mL hinzugeben und auf den Ionenspuren 187 und 231 ausgewertet, die nicht durch ähnliche Fragmentierungsmuster beeinflusst wurden. Von den ausgewählten Verbindungen wurde für die Normierung jeweils das Basis-Ion verwendet (vgl. Tab. 4). Im Fall der enantioselektiven GC-Analyse war eine

Normierung der Peakflächen der beiden (bzw. vier) Enantiomeren einer Verbindung auf den Volumenstandard nicht nötig, da diese jeweils bei gleicher Konzentration dieselbe Detektorsignalstärke (*response*) hervorriefen und nur diese für die Auswertung zueinander in Relation gesetzt wurden.

### 2.6.2. Ermittlung der Kenndaten

Für einige der Verbindungen wurden Anwendbarkeit und Linearität überprüft, indem Kalibrierungen für den entsprechenden Konzentrationsbereich erstellt und Wiederfindungsraten bestimmt wurden, so dass auf diese Weise die Eignung der Gesamtmethode überprüft werden konnte. Ebenfalls wurden einige Untersuchungen zur Robustheit gemacht. Zu diesen Verbindungen gehörten Metoprolol, Propranolol, MetoOH, NLA, OHPL, MBC, OCR und EHMC. Für Ibuprofen, Naproxen, IbuOH, Bayrepel und Bayrepel-Säure wurden diesbezüglich keine neuen Untersuchungen durchgeführt, da sie durch die von Weigel und Kuhlmann etablierten sowie optimierten und hier angewendeten Methoden hinreichend abgesichert waren. Es wurde auf die von ihnen ermittelten Kenndaten zurückgegriffen (Anhang II), so dass auf diese Weise semi-quantitative Abschätzungen für diese Verbindungen in den Proben vorgenommen werden konnten.

Die Linearität wurde überprüft, indem für die Verbindungen 5-Punkt-Kalibriergeraden erstellt wurden, die den relevanten Konzentrationsbereich von 5 - 500 ng/L abdeckten. Dies wurde jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  gibt dabei Aufschluss über die Linearität. Die Wiederfindungsrate (WfR), die Aussagen über die Anwendbarkeit und Präzision einer Methode erlaubt, wurde bestimmt, indem die gesamte Methode in Dreifachbestimmung mit dotiertem Leitungswasser ( $c = 50 - 100$  ng/L) durchgeführt wurde. Die Standardabweichungen, die ein Maß für die Wiederholbarkeit (*repeatability*) sind, spiegeln in diesem Zusammenhang die Präzision der Methode wider. Die Detektionsgrenzen (LOD) wurden aus den Bestimmungen zur Wiederfindung ermittelt. Auf diese Weise wurde der Einfluss von Matrix mit berücksichtigt, jedoch variierten die angegebenen Grenzen natürlich, je nach Matrixbelastung, in unterschiedlichen Umweltproben. Die angegebenen Detektionsgrenzen beziehen sich in dem Fall auf die nicht-enantioselektiven GC-MS-Bestimmungen. In den Tab. 5 und 6 sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten Parameter für die Verbindungen wiedergegeben.



Tab. 5: Linearität ( $R^2$ , <sup>a</sup> als DMS-Derivate, <sup>b</sup> als MCM-Derivat, <sup>c</sup> 4-Punkt-Kalibrierung von 5 - 100 ng/L), Wiederfindungsraten einschließlich Standardabweichungen (WfR,  $n = 3$ , Extraktion von 2 L Leitungswasser) für Oasis HLB und Detektionsgrenzen (LOD,  $s/n = 3$ , <sup>d</sup> ohne HPLC-Fraktionierung), n. b.: nicht bestimmt

Verbindung	$R^2$	WfR [%] <sub>Oasis HLB</sub>	LOD [ng/L]
Metoprolol <sup>a</sup>	0.998 <sup>c</sup>	95 ± 1	7.99 <sup>d</sup>
Propranolol <sup>a</sup>	0.998 <sup>c</sup>	88 ± 1	5.80 <sup>d</sup>
MetoCOOH	n. b.	n. b.	-
MetoOH <sup>a</sup>	n. b.	85 ± 7	4.76 <sup>d</sup>
OHPL <sup>a</sup>	0.999	-	4.85 <sup>d</sup>
NLA <sup>b</sup>	0.999	68 ± 6	0.65
Desmethyl-Naproxen	n. b.	n. b.	-

Tab. 6: Linearität ( $R^2$ ), Wiederfindungsraten einschließlich Standardabweichungen (WfR,  $n = 3$ ) für SDB-1 (Extraktion von 1 L Leitungswasser) und Oasis HLB (Extraktion von 2 L Leitungswasser) sowie Detektionsgrenzen (LOD,  $s/n = 3$ ) für die UV-Filter

Verbindung	$R^2$	WfR [%] <sub>SDB-1</sub>	WfR [%] <sub>Oasis HLB</sub>	LOD [ng/L]
MBC	0.9997	69 ± 3	60 ± 5	0.45
OCR	0.9987	46 ± 6	55 ± 14	0.65
EHMC	0.9994	50 ± 6	43 ± 2	0.09

Alle Verbindungen zeigten ein sehr gutes lineares Verhalten über den gesamten Konzentrationsbereich ( $R^2 \geq 0.998$ , Anhang III). Da die Betablocker und OHPL in Form der DMS-Derivate und NLA in Form des MCM-Derivats erfasst wurden, wurde an dieser Stelle gleichzeitig demonstriert, dass die Derivatisierungen über den ganzen Bereich zuverlässig arbeiten und auch keine größeren Schwankungen aufweisen. So lagen die Standardabweichungen bei den jeweils einzelnen Konzentrationen ( $n = 3$ ) bei max. 13 %. Der Einfluss von natürlicher Matrix auf die Derivatisierung wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Bei OHPL stellte sich heraus, dass die angesetzten methanolischen Stammlösungen nicht allzu beständig waren, was besonders im unteren Konzentrationsbereich ins Gewicht fiel. Wurde mit einer am Vortag angesetzten Stammlösung eine Derivatisierung durchgeführt, gab es schon signifikante Abweichungen zu den am Vortag vermessenen Werten. Hinzu kam, dass, wie erwähnt, die Derivate selbst auch nicht allzu stabil waren. Es wurde deshalb darauf geachtet, dass für die Bestimmungen immer frisch angesetzte Lösungen verwendet wurden und alle erforderlichen Arbeiten am gleichen Tag durchgeführt wurden. Walle *et al.* berichteten diesbezüglich von ähnlichen

Problemen <sup>[117]</sup>. Die ermittelten Wiederfindungsraten der Betablocker, 95 % für Metoprolol und 88 % für Propranolol, zeigen, dass Oasis HLB für ihre Erfassung in wässriger Matrix geeignet ist. Anfangs wurde die Extraktion der Betablocker bei basischen Bedingungen durchgeführt, im Verlauf der Arbeit dann bei neutralen Bedingungen, was auf die Wiederfindungsraten aber keinen Einfluss hatte. Ebenso wenig spielten die Geschwindigkeit der Extraktion oder die Trocknungszeit der Kartuschen im Stickstoffstrom eine Rolle. Die Wiederfindung von MetoOH mit 85 %, die etwas niedriger als die der Mutterverbindung ist, wurde unter neutralen Extraktionsbedingungen ermittelt und ist lediglich semi-quantitativ, da keine Kalibriergerade erstellt wurde. Die ermittelte Wiederfindungsrate wurde in dem Fall nur zur verwendeten Konzentration in Relation gesetzt. Als problematisch stellt sich OHPL heraus, welches mittels der verwendeten Extraktionsmethode nicht erfasst werden konnte. Dabei wurden die Extraktionen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, um zumindest eine der funktionellen Gruppen in ihrer neutralen Form vorliegen zu haben, was aber zu keiner Verbesserung führte. Durch die Verwendung von Essigsäure als zusätzlichen Eluenten konnte diese Verbindung dann zwar minimal wiedergefunden werden (WfR ~ 1 %), das zeigt aber, dass primär die Retardierung durch das Sorbens ungenügend ist. Mit SDB-1 wurden ebenso unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Die Wiederfindungsrate von 68 % für NLA wurde nur unter stark sauren Bedingungen (pH ~ 2) erreicht und verschlechterte sich bei neutralen Extraktionsbedingungen. Eine weitere Verbesserung der Wiederfindung durch Verwendung von stärkeren Eluenten wie Essigsäure konnte allerdings nicht erreicht werden. NLA wurde ferner unter Verwendung von SDB-1 extrahiert, jedoch zeigte sich, dass es hier so gut wie zu keiner Retardierung der Verbindung kam (WfR ~ 2 %). Für die UV-Filter wurden sowohl mit SDB-1 als auch mit Oasis HLB vergleichbare Wiederfindungsraten erzielt. In beiden Fällen lagen diese allerdings für alle drei Verbindungen nur zwischen 46 und maximal 70 %, wobei diese Werte in erster Linie auf unvollständige Retardierung durch das Sorbens bedingt sind. Es wurden unterschiedliche Lösungsmittelvariationen von unpolar bis polar zur Elution getestet, aber in keinem Fall konnten quantitative Wiederfindungen erzielt werden. Ferner zeigte sich, dass die Geschwindigkeit der Extraktion einen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindung hatte, was in anfänglichen Experimenten deshalb zu relativ geringen Werten mit großen Schwankungen führte. Aus diesem Grund wurde die Extraktion in der Folge nur etwa mit einer Flussrate von 10 mL/min durchgeführt. Für die Analyse von Umweltproben wurde SDB-1 als Extraktionsmaterial gewählt aufgrund der etwas besseren Wiederfindungsraten für MBC und EHMC. Die Wiederfindungsrate für OCR ist für beide Materialien etwa vergleichbar, wenn man die große Standardabweichung bei Oasis HLB berücksichtigt. Die Standardabweichungen der übrigen Verbindungen lagen bei maximal 6 %. Die ermittelten Detektionsgrenzen für die Betablocker, MetoOH und OHPL, die zwischen 4 – 8 ng/L liegen, sind vergleichsweise hoch, was in erster Linie aber auf die

Derivatisierung selbst zurückzuführen ist, da diese keinen Aufreinigungsschritt enthält, durch den Matrix abgereichert werden könnte. Die Detektionsgrenze von MetoOH ist dabei wiederum als semi-quantitativ zu betrachten. Die Detektionsgrenzen der übrigen Verbindungen liegen alle außerhalb des Bereichs, für den die Linearitätsuntersuchungen durchgeführt wurden, so dass diese Werte eher als Näherung zu betrachten sind. In Bezug auf die enantioselektive GC-Analyse lässt sich sagen, dass die Detektionsgrenzen allgemein geringfügig höher waren, sie aber insbesondere vom Zustand der aktuell verwendeten chiralen Phase abhängen.

### **2.6.3. Hintergrundsbelastung**

Um sicherzustellen, dass durch eventuelle Kontamination die Ergebnisse nicht verfälscht wurden, wurden Blindwerte ermittelt. Dazu wurden einerseits Geräte, Lösungsmittel und Reagenzien überprüft, andererseits wurde jeder Methodenschritt systematisch kontrolliert. Parallel zu den Bestimmungen der Wiederfindungsraten oder während der Aufarbeitung von Proben wurden Blindproben unter Verwendung von Reinstwasser mit aufgearbeitet und bestimmt. Anders als bei leichtflüchtigen Substanzen, wie z. B. Moschusduftstoffen, war die Anfälligkeit gegenüber Kontamination bei den meisten Schritten, wie das Einengen am Rotationsverdampfer oder im Stickstoffstrom, allerdings relativ gering. Im Verlauf der Arbeit traten somit auch kaum Kontaminationsprobleme auf. Einzig Probleme gab es anfänglich mit EHMC, das in Lösungsmittel-Blindwert-Proben (vor allem Ethylacetat) und selbst bei der Extraktion von Leitungswasser gefunden wurde. Da diese Verbindung, ähnlich wie Moschusduftstoffe, in einer Vielzahl von Pflege- und Kosmetikprodukten enthalten ist, war darin in erster Linie der Ursprung für die Kontamination zu suchen. In der Folge wurde deshalb insbesondere darauf geachtet, dass beim Arbeiten mit dieser Verbindung nur Lösungsmittel aus fest verschlossenen Originalgebinden verwendet wurden und Glasgeräte, soweit sie schon einige Zeit gelagert wurden, erneut ausgeheizt wurden. Ferner wurden bei den Arbeiten immer Handschuhe getragen.

### 3. Das Vorkommen chiraler PPCP in aquatischen Systemen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Analyse der Umweltproben vorgestellt und diskutiert. Dazu werden die verschiedenen Substanzgruppen jeweils in einzelnen Abschnitten behandelt. Es werden dabei zunächst ihr Vorkommen und ihre Verteilung in der Umwelt und dann ihre enantioselektive Analyse in den Umweltproben erörtert.

#### 3.1. Probenahmestellen

Das Hamburger Gebiet ist vor allem durch die beiden Gewässer Elbe und Alster geprägt. Die Elbe mit ihrem intensiven Schiffsverkehr teilt sich im Osten des Stadtgebiets in zwei Arme, die Norder- und die Süderelbe, die in relativ zentraler Lage aber wieder zusammenfließen. Aufgrund der Nähe zum Meer unterliegt die Elbe im Hamburger Raum den Gezeiten, deren Tidenhub etwa 4 m beträgt. Bei der Alster handelt es sich um einen Nebenfluss der Elbe mit Ursprung in Schleswig-Holstein, welcher durch Stauung im Zentrum der Stadt aber vielmehr als See aufgefasst wird und unter anderen als Erholungsgebiet dient. Sie teilt sich in die Außen- und die Binnenalster und mündet direkt im Hamburger Hafen in die Elbe. Zahlreiche Kanäle zweigen vom nördlichen Teil der Außenalster ab, die in früheren Zeiten als Transportwege der Versorgung der Bevölkerung dienten.

Abb. 27 zeigt eine Karte des Hamburger Gebiets, die Orte der Probenahme sind dabei markiert. Zu den Probenahmestellen an der Elbe gehörten in der Norderelbe am nördlichen Ufer die Fähranleger in Övelgönne (Nr. 4) und am Fischmarkt (Nr. 3), am südlichen Ufer der Anleger beim Theatermusical „König der Löwen“ (KdL, Nr. 2). Des Weiteren wurden im Köhlbrand, dem letzten Teil der Süderelbe, am Anleger Waltersshof (Nr. 1) Proben genommen. Diese Stelle wurde ausgewählt, weil sie sich in der Nähe stromabwärts von der Stelle, an der das Klärwerk die gereinigten Wässer in die Elbe entlässt, befindet. An der Alster wurden Proben am südlichen Westufer der Außenalster (Nr. 5) und weiter nördlich am Fluss selbst (beim Anleger Winterhuder Fährhaus, Nr. 6) genommen. Der Isebekkanal wurde während einer Kampagne ebenfalls beprobt (Nr. 7). Des Weiteren wurden im städtischen Klärwerk Proben vom Ablauf genommen.

Die Probenahmekampagnen wurden im Zeitraum von 2006 bis 2009 unternommen. Dabei wurden allerdings nicht immer an jedem einzelnen Ort für alle drei zu untersuchenden Gruppen Proben genommen. In den folgenden Abschnitten wird deshalb jeweils zu Beginn eine Übersicht über die jeweiligen Probenstationen mit den entsprechenden Zeitpunkten gegeben werden.

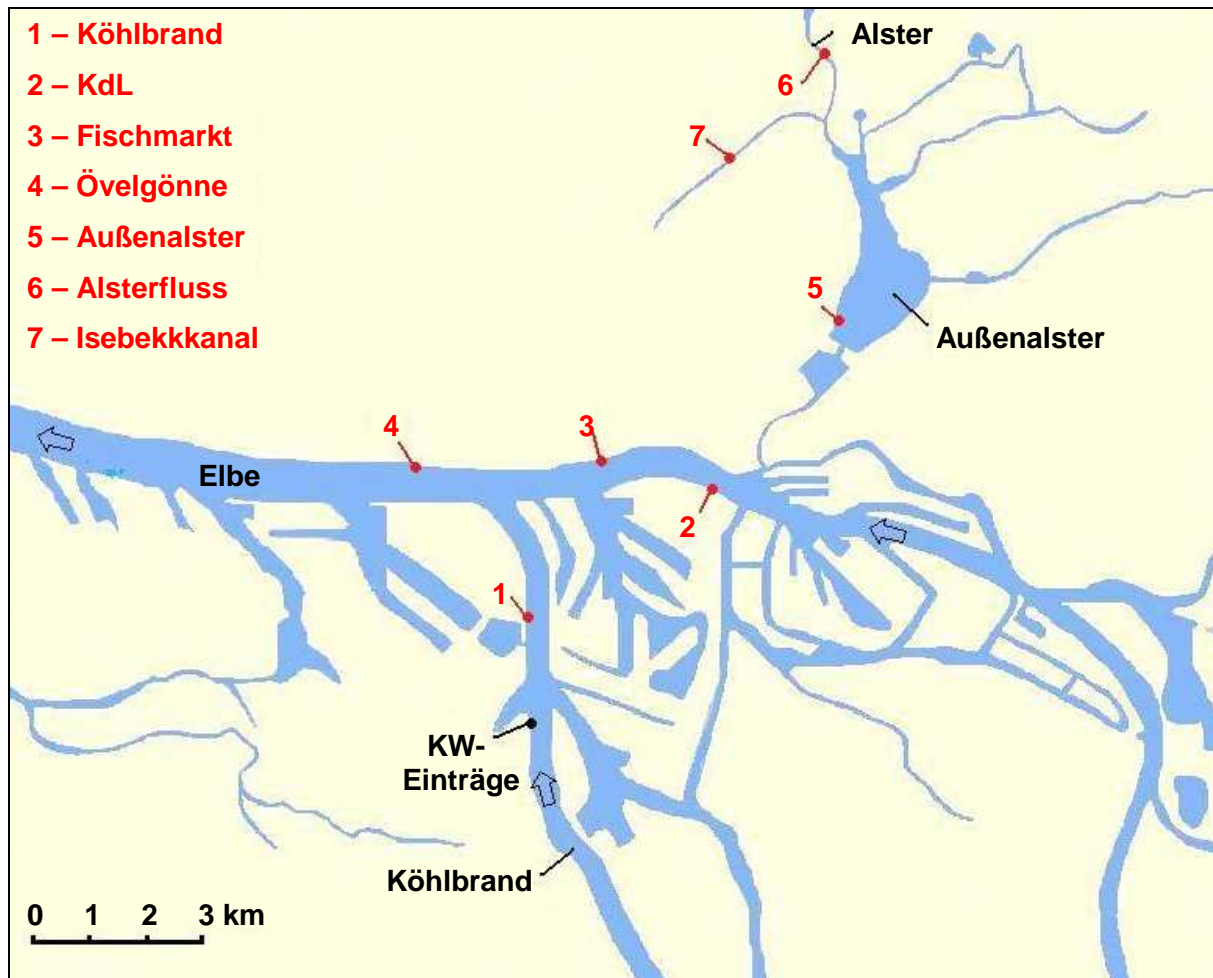


Abb. 27: Probenahmestellen an der Elbe und der Alster in Hamburg

## 3.2. Betablocker und ihre Metaboliten

### 3.2.1. Vorkommen und Verteilung

Im Verlauf der Arbeit wurden insgesamt 47 Proben auf das Vorhandensein der Betablocker Metoprolol und Propranolol sowie der Metaboliten MetoOH, OHPL und NLA untersucht. Dabei waren die Methoden für ihren Nachweis bei den zu Beginn der Arbeit genommenen Proben allerdings noch nicht vollständig so etabliert, wie in Abschnitt 2.5. und 2.6. beschrieben. Aus diesem Grund wurden auch nur die zum Ende der Arbeit genommenen Proben auf das Vorkommen von MetoCOOH untersucht. Aus den Arbeiten zur Diplomarbeit existierten ferner noch zwei Extrakte von Proben vom Klärwerksablauf, die im Jahr 2004 genommen und aufgearbeitet, aber nicht derivatisiert wurden. Diese wurden ebenfalls auf das Vorhandensein der Betablocker und ihrer Metaboliten überprüft. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die gefundenen Verbindungen in den Proben.

**Tab. 7: Übersicht über die gefundenen Betablocker und ihrer Metaboliten in den verschiedenen Umweltproben (+: Konzentration  $\geq$  LOD, ++: Konzentration  $\geq$  LOQ, n. b. = nicht bestimmt)**

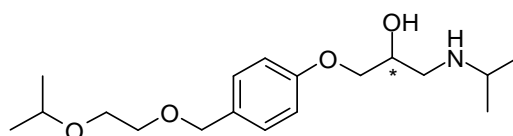
Probe	Meto	Prop	MetoOH	MetoCOOH	OHPL	NLA
<b>Januar 2004</b>						
Klärwerk *	++	++	++	n. b.	-	n. b.
<b>Juli 2006</b>						
Övelgönne	+	+	-	n. b.	-	-
Außenalster	+	+	-	n. b.	-	-
<b>Juli 2007</b>						
Övelgönne	+	+	-	n. b.	-	-
<b>Februar 2008</b>						
Övelgönne	++	-	-	n. b.	-	-
Köhlbrand	++	-	+	n. b.	-	-
KdL	++	-	-	n. b.	-	-
Alsterfluss	++	-	+	n. b.	-	-
Außenalster	++	-	+	n. b.	-	-
Isebekkanal	+	-	-	n. b.	-	-
<b>Juli/August 2008</b>						
Fischmarkt	+	-	-	n. b.	-	-
Köhlbrand	+	-	-	n. b.	-	-
Alsterfluss	+	-	-	n. b.	-	-
Außenalster	+	-	-	n. b.	-	-
<b>November 2008</b>						
Övelgönne	++	-	-	+	-	-
<b>Februar 2009</b>						
Köhlbrand	++	-	+	+	-	-
Klärwerk	++	++	++	++	-	-

(\* Extrakte von Proben, die 2004 genommen und aufgearbeitet wurden)

Metoprolol wurde in allen untersuchten Proben nachgewiesen, Propranolol hingegen nur in einem Viertel der Proben. MetoOH wurde in einem Drittel der Proben und MetoCOOH wurde in allen auf diese Verbindung untersuchten Proben detektiert. Die Propranolol-Metaboliten OHPL und NLA konnten hingegen in keiner Probe detektiert werden. Ein Vergleich der verschiedenen Proben zeigt, dass es deutliche Konzentrationsunterschiede für Metoprolol in den Proben aus den Sommermonaten und denen, die aus kälteren Monaten stammten, gab. So lagen die Konzentrationen in den Proben von den verschiedenen

Stationen der Elbe und der Alster vom Sommer 2008 allesamt unter der Bestimmungsgrenze. In den Proben vom Februar 2008 von den gleichen Orten wurden hingegen Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze gefunden, die mit 50 - 100 ng/L bestimmt wurden (Anhang V). Lediglich im Isebekkanal zum gleichen Zeitpunkt wurden für Metoprolol Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze gefunden. Der Metabolit MetoOH wurde nur in Proben, die aus dem Herbst und dem Winter stammten, nachgewiesen. Dabei wurde die Verbindung an den beiden Stationen der Alster, in der Elbe jedoch nur im Köhlbrand detektiert. Die Konzentrationen lagen in allen Fällen ausschließlich unterhalb der Bestimmungsgrenze. MetoCOOH wurde im Köhlbrand und in Övelgönne detektiert, wobei die Proben im November und im Februar genommen wurden. Die Konzentrationen bewegten sich dabei ebenfalls unter der Bestimmungsgrenze. Propranolol wurde in den Proben von 2006 und 2007 sowie im Klärwerksablauf im Jahr 2004 und 2009 detektiert. Dabei waren die Konzentrationen aber sehr viel niedriger als die von Metoprolol in den gleichen Proben. In den Oberflächengewässerproben bewegten sich die Konzentrationen nahe der Detektionsgrenze. Ab 2008 konnte Propranolol weder in der Elbe noch in der Alster nachgewiesen werden. Dass der Propranolol-Metabolit OHPL in keiner Probe detektiert wurde, ist primär darauf zurückzuführen, dass die Versuche, für diese Verbindung eine Methode zur Probenaufarbeitung zu etablieren, zu keinen zufrieden stellenden Ergebnissen führte.

Des Weiteren wurde der Betablocker Bisoprolol in 18 der 47 Proben identifiziert. Wie Metoprolol und Propranolol besitzt Bisoprolol die 2-Propranolamin-Seitenkette (Abb. 28), so dass die Verbindung als entsprechendes DMS-Derivat auf der Ionenspur 186 identifiziert werden konnte. Abb. 29 zeigt die Massenspektren dieser Verbindung von zwei Umweltproben sowie das entsprechende Referenzspektrum von einer Vergleichsmessung. Bisoprolol wurde in den Klärwerksabläufen beider Jahre detektiert sowie in der Elbe und der Alster, wobei sich das Vorkommen jedoch wiederum auf die kälteren Monate beschränkte. Es wurde dabei an allen Probestationen, außer dem Isebekkanal, detektiert (vgl. Abb. 32). Die Konzentrationen waren in allen Fällen aber auch nur gering (< LOQ). Bisoprolol gehört zu den Betablockern, über deren Vorkommen in der aquatischen Umwelt in Deutschland bereits berichtet wurde <sup>[15, 19]</sup>. Dabei waren sowohl die Häufigkeit, mit der die Verbindung in Gewässern detektiert wurde, als auch die bestimmte Konzentration allerdings geringer als die von Metoprolol und Propranolol. So lagen z. B. zwischen 1996 und 1997 in



**Abb. 28: Struktur des Betablockers Bisoprolol (Biso)**

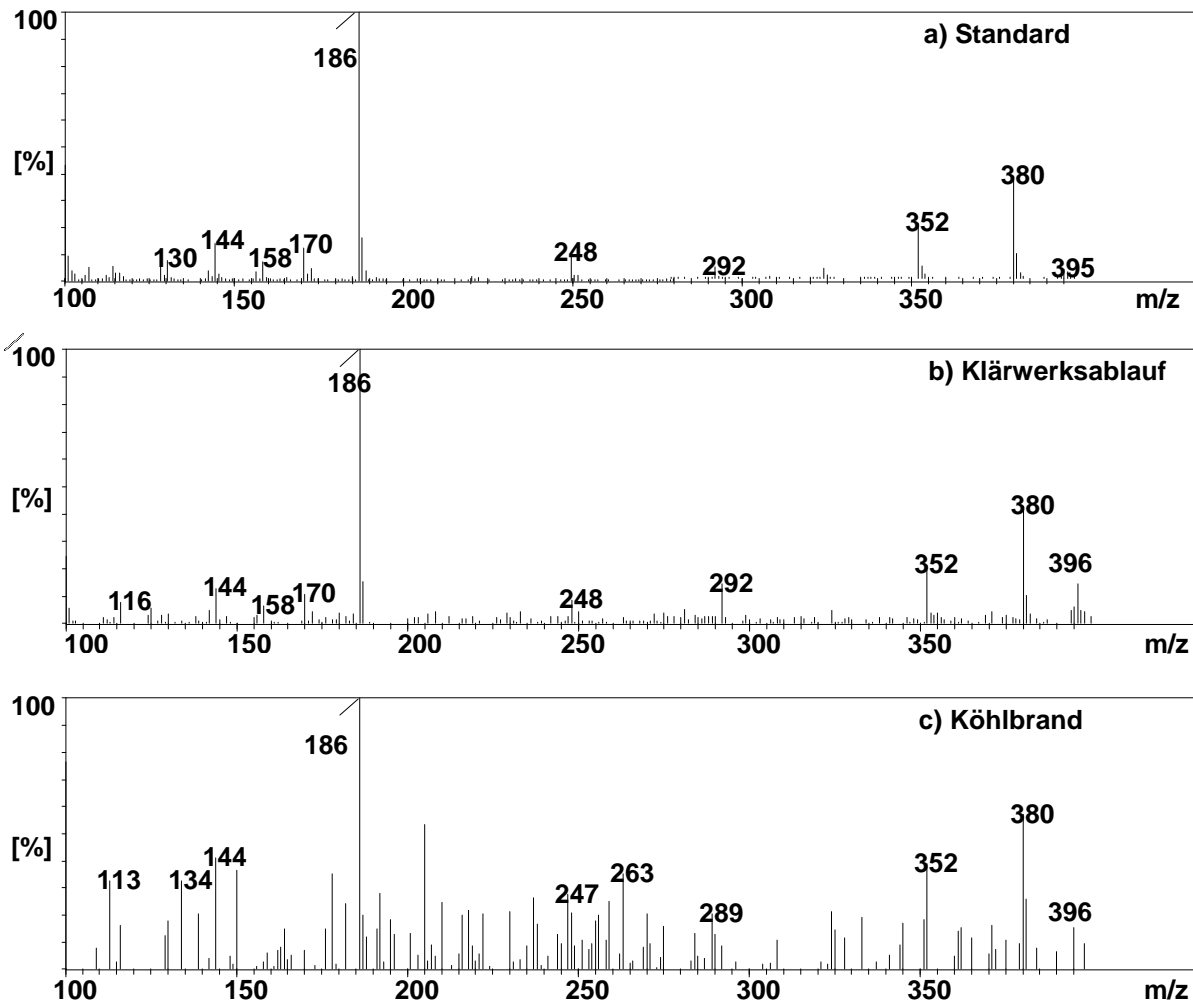


Abb. 29: EI-Massenspektren von Bisoprolol (als DMS-Derivat)

Klärwerksabläufen die mittleren Konzentrationen bei 57 ng/L. Da es jedoch keine aktuelleren Berichte aus Deutschland gibt, kann nicht gesagt werden, ob es seitdem Veränderungen in den Trends gegeben hat.

Ferner wurde in einem Großteil der Proben eine weitere Verbindung detektiert, deren Massenspektrum ebenfalls auf ein 2-Propanolamin-Motiv schließen ließ. Diese Verbindung wurde als eine von Metoprolol abgeleitete Verbindung, die an der  $\alpha$ -Position der 1'-Seitenkette eine Carbonylfunktion besitzt, identifiziert, weshalb sie als so genanntes  $\alpha$ -Keto-Metoprolol (MetoK) bezeichnet wird (Abb. 30). Die Struktur wurde dabei durch Darstellung der entsprechenden Referenzverbindung verifiziert. Da diese Verbindung im humanen oder tierischen Metabolismus nicht auftritt, kann sie als ein im aquatischen System gebildetes Transformationsprodukt von Metoprolol aufgefasst werden. In über einem Drittel der untersuchten Proben wurde  $\alpha$ -Keto-Metoprolol detektiert. In der Literatur wurde bisher nicht über das Vorkommen dieser Verbindung in der Umwelt berichtet. In Abb. 31 sind die Massenspektren zweier Proben und das Referenzspektrum von einer Vergleichsmessung



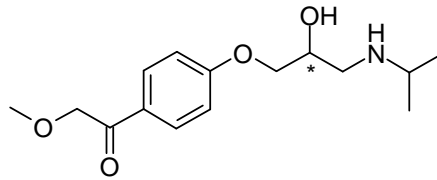
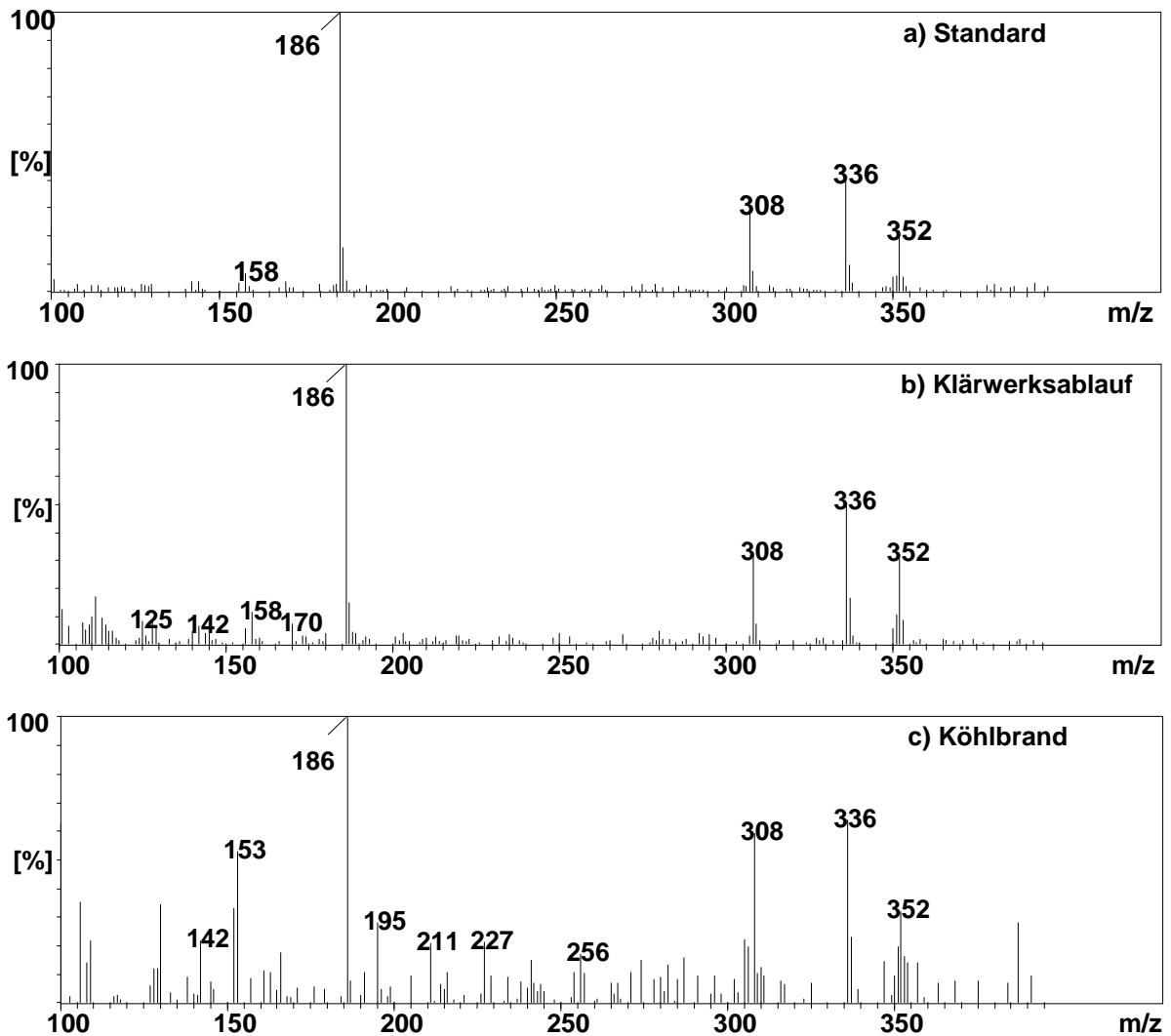
Abb. 30: Struktur des Transformationsprodukts  $\alpha$ -Keto-Metoprolol (MetoK)

Abb. 31: EI-Massenspektren von MetoK (DMS-Derivat)

dieser Verbindung dargestellt. MetoK wurde ebenfalls nur während der kälteren Monate detektiert, war aber im Gegensatz zu MetoOH in allen Proben der verschiedenen Stationen der Elbe und der Alster (außer dem Isebekkanal) nachweisbar. Die Konzentration im Köhlbrand im Januar 2009 lag dabei sogar über der Bestimmungsgrenze. Ferner wurde es im Klärwerksablauf detektiert.

Die Abb. 32 und 33 zeigen beispielhaft die Chromatogramme einiger Proben und der entsprechenden Referenzmessungen, ergänzend dazu sind einige entsprechende Massen-

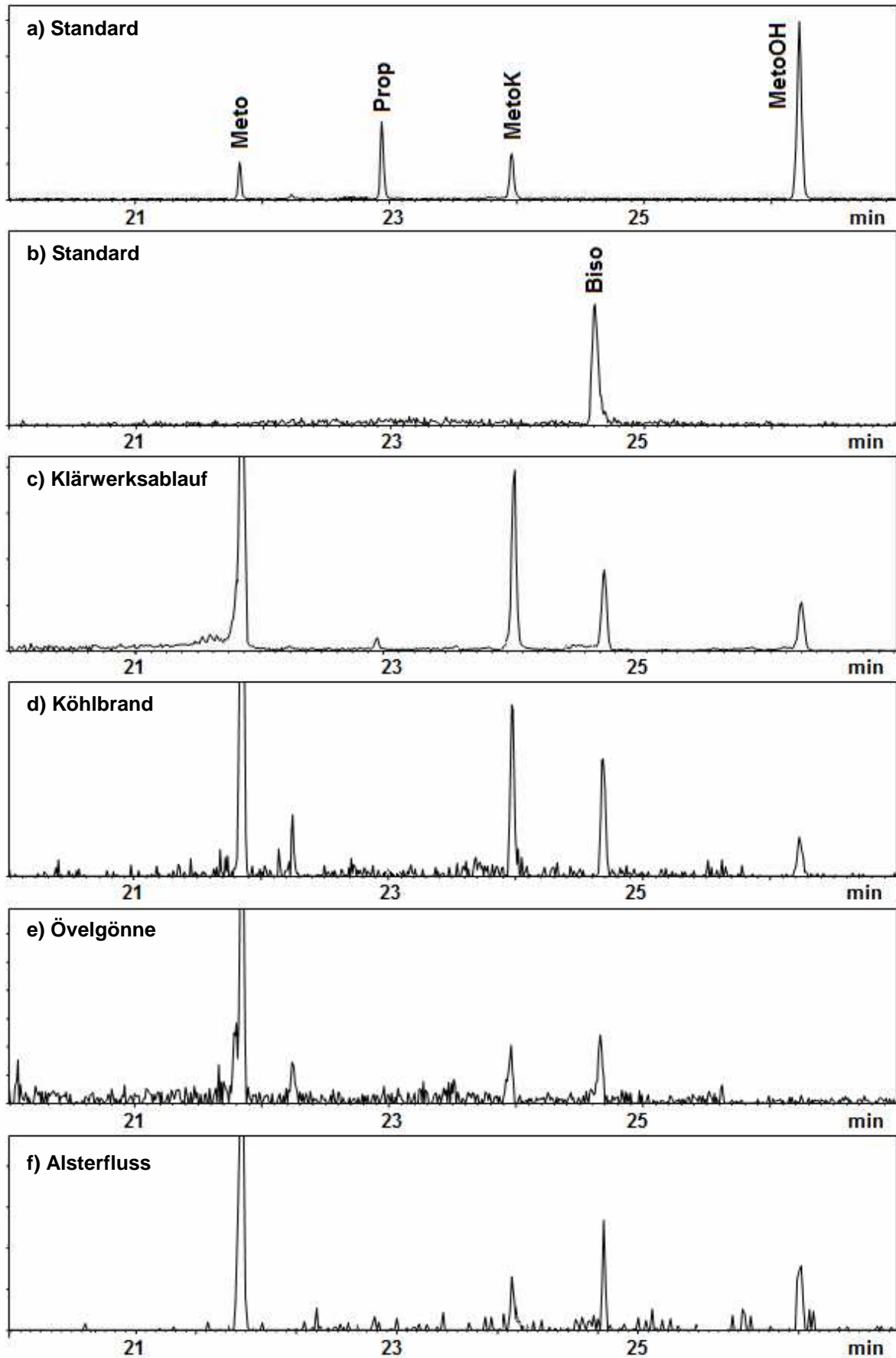


Abb. 32: Chromatogramme zweier Standardmessungen und einiger Umweltproben aus den kälteren Monaten (Ionenspur 186, Säule VF-5ms, 30 m)

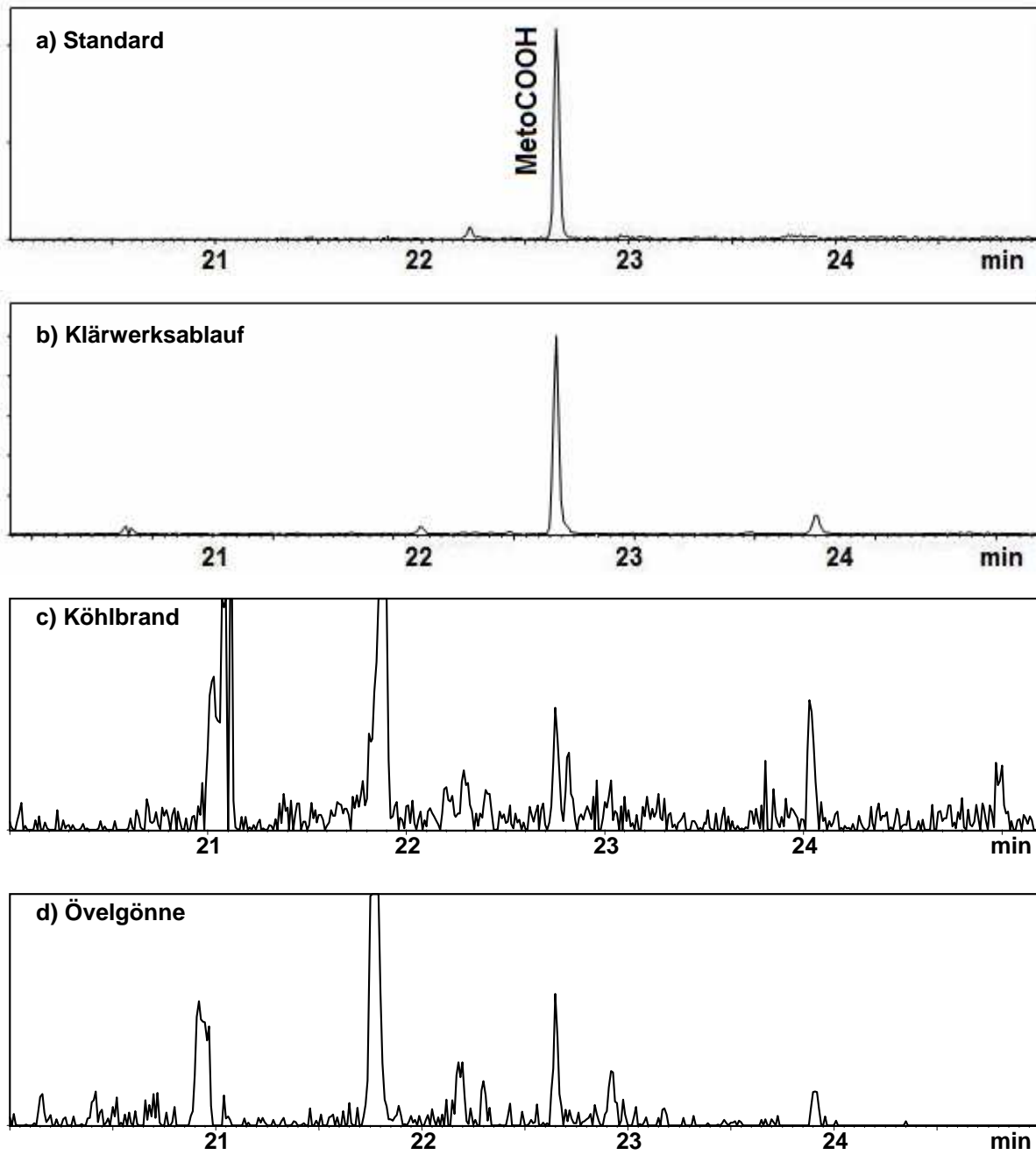
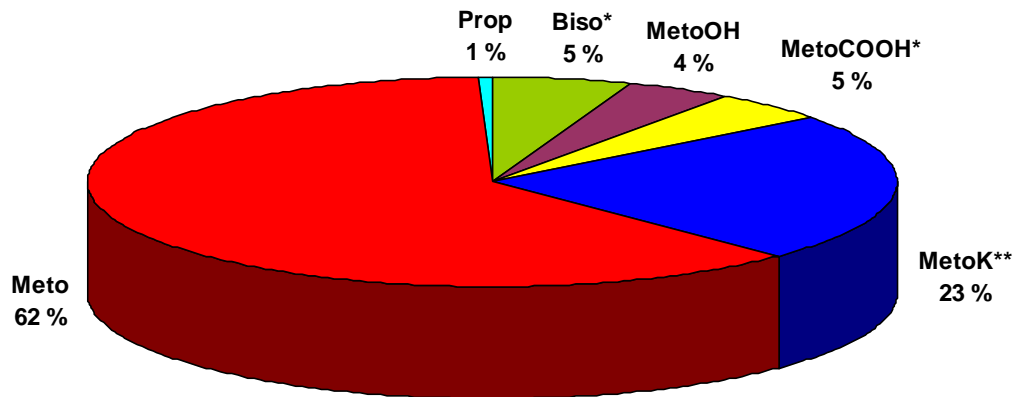


Abb. 33: Chromatogramme von einer Standardmessung von MetoCOOH sowie von Umweltproben vom Herbst und Winter 2008/2009 (Ionenspur 186, Säule: VF-5ms, 30 m)

spektren in Anhang IV zu finden. Die großen Konzentrationsunterschiede von Metoprolol zwischen den kälteren Monaten und den Sommermonaten lassen sich zum einen durch die erhöhte biologische Aktivität, zum anderen durch die längere Lichteinstrahlung in diesen Monaten erklären. Aus den gleichen Gründen dürften die Metaboliten MetoOH, MetoCOOH, das Transformationsprodukt MetoK und der Betablocker Bisoprolol ebenfalls nur während der kälteren Monate nachweisbar gewesen sein. Die Zusammensetzung, in der MetoK, Bisoprolol und MetoOH im Klärwerksablauf zu finden waren, spiegelte sich im Köhlbrand noch wider (Abb. 32c und d). Weiter stromabwärts mit zunehmender Entfernung von der Eintragsquelle änderte sich dieses Muster jedoch infolge Verdünnung und eventuellem Abbau der Verbindungen (Abb. 32e). Am deutlichsten war diese Änderung bei MetoOH zu erkennen, das in der Elbe nämlich nur im Köhlbrand detektiert wurde. Interessant ist jedoch in diesem Zusammenhang, dass MetoOH auch in der Alster, sowohl im Fluss als auch in der Außenalster, nachgewiesen wurde. Das lässt auf weitere Eintragspfade in diesen Gebieten schließen. Einen Hinweis darauf gibt auch die Konzentration von Metoprolol, die im Alsterfluss vergleichbar mit der im Köhlbrand war. Die sehr viel geringere Konzentration von Metoprolol im Isebekkanal ist damit zu erklären, dass die Fließgeschwindigkeit und der Wasseraustausch insgesamt dort nur gering sind, da dieser einzig durch die Alster gespeist wird. Propranolol war die einzige Verbindung, die ebenfalls im Sommer, bis 2007, in den Oberflächengewässern detektiert werden konnte. Da im Zeitraum bis 2007 keine Proben im Herbst oder Winter genommen wurden, fehlt jedoch der Vergleich, um sagen zu können, ob der Trend zu höheren Konzentrationen in diesen Jahreszeiten, ähnlich wie bei den anderen Verbindungen, ebenfalls bestand.

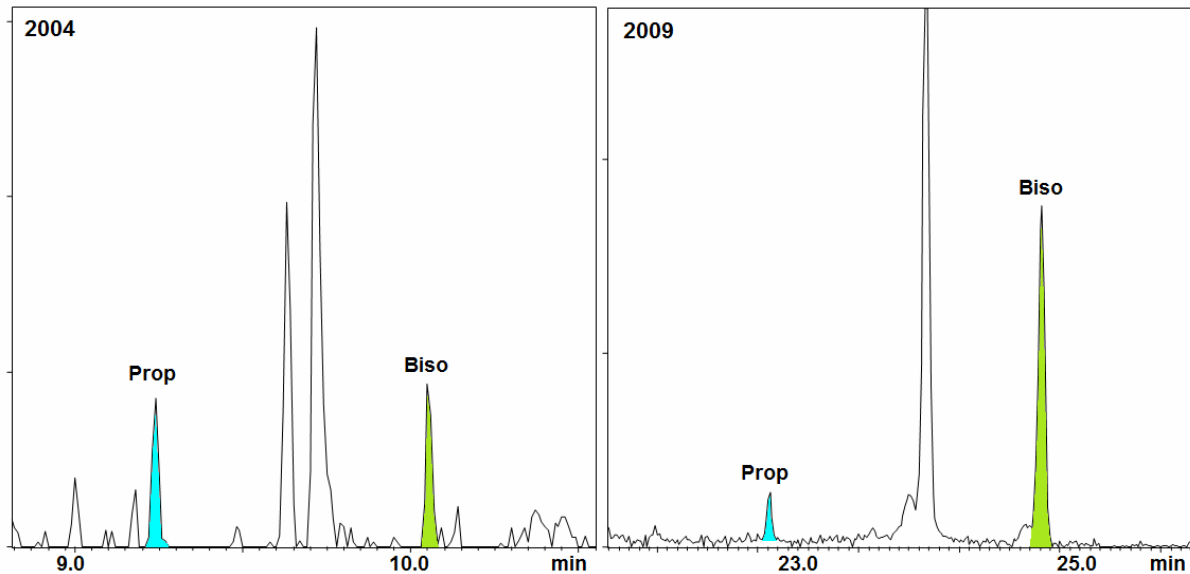
Im Klärwerksablauf, der sozusagen einen Ursprung darstellt, wurden die Verbindungen in wesentlich höheren Konzentrationen gefunden, die im Jahr 2009 alle, bis auf die von Propranolol, im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich lagen (Anhang V). Abb. 34 veranschaulicht graphisch die relative Zusammensetzung des Klärwerksablaufes von 2009. Wie in den untersuchten Oberflächengewässern war Metoprolol die dominierende Verbindung, dessen durchschnittliche Konzentration mit  $16 \mu\text{g/L}$ , was einem relativen Anteil von 62 % entspricht, um ein Vielfaches höher lag, als es bisher aus der Literatur bekannt war <sup>[19]</sup>. Das Transformationsprodukt MetoK war mit etwa einem Drittel dieser Konzentration die zweitdominierende Verbindung. Die Metaboliten MetoOH und MetoCOOH waren mit 4 bzw. 5 % hingegen nur in geringeren relativen Anteilen enthalten. Die Konzentration von MetoCOOH ist dabei allerdings nicht um die Wiederfindungsrate korrigiert, so dass der Wert nur als Näherung aufgefasst werden kann. Da die Wiederfindungsraten der übrigen Verbindungen aber alle in einer ähnlichen Größenordnung liegen (zwischen 85 – 95 %), ist davon auszugehen, dass sich diejenige von MetoCOOH ebenfalls in dieser Größenordnung bewegen dürfte. Die angegebenen relativen Anteile würden sich als Folge nicht signifikant verändern.



**Abb. 34: relative Konzentrationsverhältnisse der Betablocker und der gefundenen Metaboliten im Klärwerksablauf von 2009 (\* Werte nicht um die Wiederfindungsrate korrigiert, \*\* WfR = 86 %)**

Die relativen Konzentrationsverhältnisse dieser drei Verbindungen im Klärwerksablauf unterscheiden sich somit gänzlich von denen der Humanexkretion, bei der MetoCOOH mit ca. 65 % den größten Anteil darstellt <sup>[52]</sup>. MetoOH kommt dabei mit etwa 10 % in ähnlichen Anteilen wie die Mutterverbindung vor. Geht man davon aus, dass bei Eintritt ins Klärwerk eine vergleichbare Zusammensetzung wie bei der Humanexkretion vorherrscht, deutet das darauf hin, dass MetoOH und MetoCOOH während der Klärwerkspassage sehr viel effizienter eliminiert werden als Metoprolol. Einige Literaturstellen berichten von Eliminierungsraten für Metoprolol von nur etwa 9 % während des Klärprozesses, was diese Vermutung unterstützt <sup>[128]</sup>. Die Metaboliten besitzen unter den gegebenen Umständen folglich eine geringere Persistenz als die Mutterverbindung. Da MetoK nicht im menschlichen Metabolismus aus Metoprolol gebildet wird, muss es vor oder während der Klärwerkspassage entstehen. Betrachtet man die Anteile, zu denen es im Ablauf vorliegt, und nimmt man eine geringe Eliminierungsrate für Metoprolol an, wird ersichtlich, dass es größtenteils schon vor Eintritt ins Klärwerk entstehen muss, wenn man davon ausgeht, dass es aus der Mutterverbindung gebildet wird. Eine andere Möglichkeit wäre allerdings die Bildung aus MetoOH, wenn dieses während des Klärungsprozesses oxidiert werden würde.

Die beiden anderen Betablocker Propranolol und Bisoprolol sind im Vergleich zu Metoprolol auch nur in kleineren Anteilen im Ablauf enthalten. Für Bisoprolol wurde dabei auch keine Wiederfindungsrate bestimmt. Interessant ist in dem Zusammenhang ein Vergleich zwischen Propranolol und Bisoprolol. Während sich 2009 die relativen Konzentrationsverhältnisse der beiden Verbindungen deutlich voneinander unterschieden,



**Abb. 35: Propranolol und Bisoprolol im Klärwerksablauf von 2004 und 2009**

waren diese im Jahr 2004 noch vergleichbar (Abb. 35). Da die Proben von 2004 etwas anders aufgearbeitet wurden <sup>[93]</sup>, war eine Bestimmung der genauen Konzentrationen der beiden Verbindungen in diesen Proben nicht möglich. Durch Abschätzung lässt sich aber mit Sicherheit sagen, dass zum einem die relative Konzentration von Propranolol in den Proben von 2009 deutlich zurückgegangen ist und dass zum anderen die relative Konzentration von Bisoprolol in den Proben von 2009 erhöht war gegenüber der von 2004. Die Tatsache, dass Propranolol ab 2008 nicht mehr in Oberflächengewässern detektiert wurde, unterstreicht den Konzentrationsrückgang von Propranolol zwischen 2004 und 2009. Der Propranolol-Metabolit NLA, der in geringfügig höheren Anteilen als die Mutterverbindung vom menschlichen Körper ausgeschieden wird, konnte im Ablauf nicht detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass die Verbindung während der Klärwerkspassage effizient eliminiert wird, wenn man wiederum davon ausgeht, dass beim Eintritt ins Klärwerk eine ähnliche Zusammensetzung herrscht wie bei der Humanexkretion.

### 3.2.2. Enantioselektive Analyse

Um die Konzentrationen der Enantiomeren einer Verbindung zueinander zu verdeutlichen, werden diese in Beziehung gesetzt. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten - zum einem kann das Enantiomerenverhältnis (ER) angegeben werden, das sich aus der direkten Division der Peakflächen der einzelnen Enantiomeren ergibt:

$$ER = \frac{[R]}{[S]} \quad \text{bzw.} \quad ER = \frac{[E1]}{[E2]}$$

wobei E1 und E2 die Konzentrationen des erst- bzw. zweit-eluierenden Enantiomers sind, wenn die Elutionsreihenfolge nicht bekannt ist. Zum anderen kann die Peakfläche eines der Enantiomere in Beziehung zur Summe der Peakflächen beider Enantiomeren gesetzt werden; man spricht in dem Fall von Enantiomerenfraktion (EF) <sup>[129]</sup>:

$$EF = \frac{(+)}{(+)+(-)} \quad \text{bzw.} \quad EF = \frac{[E1]}{([E1]+[E2])}$$

(+) und (-) sind dabei die jeweiligen Konzentrationen des (+)- und des (-)-Enantiomers, wenn die Elutionsreihenfolge bekannt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich die Enantiomerenfraktion angegeben werden, da diese den Vorteil bietet, dass sich die erhaltenen Werte nur zwischen 0 und 1 bewegen. Zudem ist der Verlauf der Werte im Gegensatz zu denen des Enantiomerenverhältnisses linear, was ihren Vergleich sehr viel einfacher macht. Ferner gibt es keine undefinierten Werte, wie es der Fall ist, wenn das Enantiomerenverhältnis verwendet wird. So kann beispielsweise die alleinige Anwesenheit von nur einem der Enantiomere korrekt wiedergegeben werden.

Die Abb. 36 und 37 zeigen die Enantiomere von Metoprolol und Propranolol in verschiedenen Umweltproben, die entsprechenden EF-Werte dazu sind in Tab. 8 wiedergegeben. Während Metoprolol im Ablauf des Klärwerks nahezu racemisch (EF = 0.49) vorlag, war an den drei verschiedenen Stationen der Elbe das S-(-)-Enantiomer etwas stärker präsent. Die EF-Werte im Köhlbrand und im Hauptstrom in Övelgönne sowie beim KdL-Anleger lagen dabei bei 0.44-0.45. Im Alsterfluss und in der Außenalster waren hingegen wieder nahezu racemische Mischungen zu finden. Es waren dabei keine jahreszeitlichen Unterschiede in den EF-Werten zu beobachten. Ein gänzlich anderes Bild bot sich bei Propranolol. Im Klärwerksablauf war das S-(-)-Enantiomer die stärker vorherrschende Form mit einem EF-Wert von 0.41. In den Oberflächengewässern, sowohl in

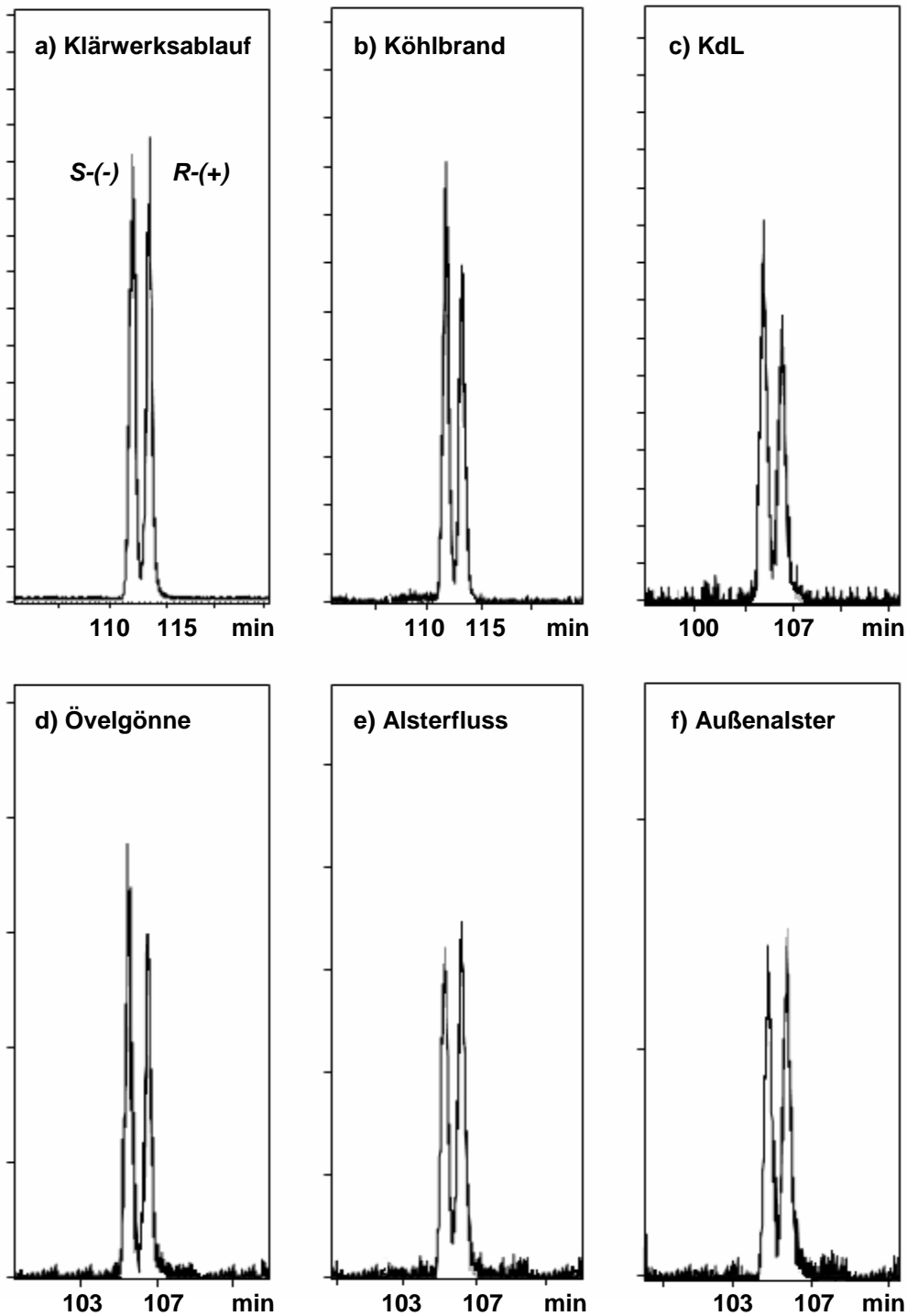


Abb. 36: Enantiomere von Metoprolol in verschiedenen Umweltproben

der Elbe bei Övelgönne als auch in der Außenalster, war jedoch die *R*-Form stärker präsent (EF = 0.54-0.62). Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass beide Verbindungen in aquatischen Systemen unterschiedlichen biotischen Vorgängen ausgesetzt sind, obwohl sie zur gleichen pharmazeutischen Wirkungsgruppe gehören. Während in der Elbe von Metoprolol das *R*-Enantiomer bevorzugt abgebaut bzw. umgewandelt wird, gibt es bei Propranolol diesbezüglich eine Bevorzugung der *S*-Form. Vergleicht man die EF-Werte



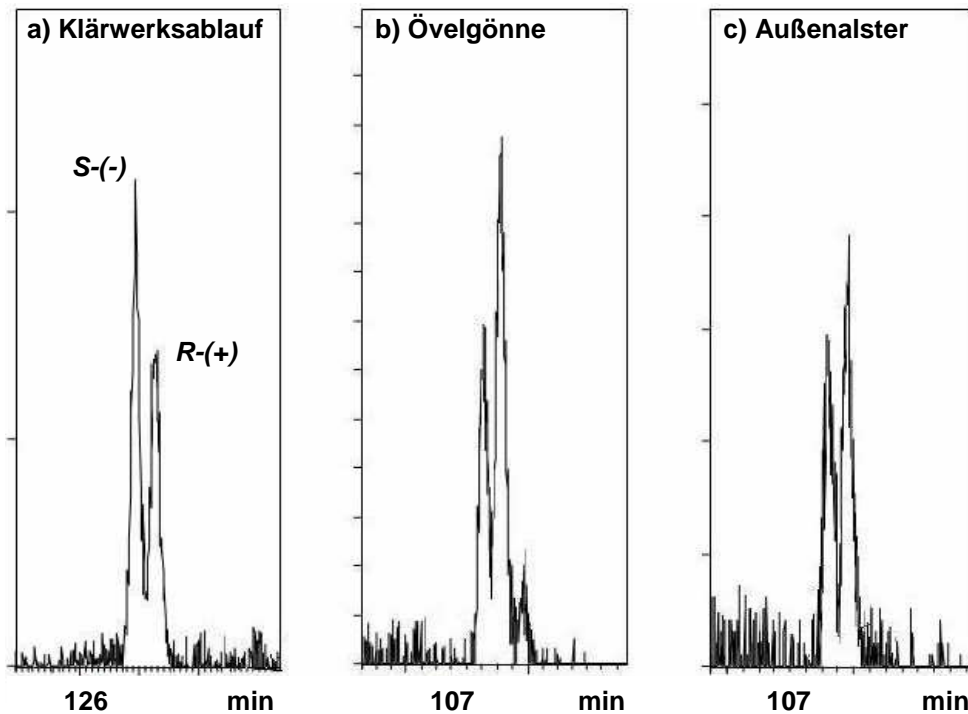


Abb. 37: Enantiomere von Propranolol in verschiedenen Umweltproben

Tab. 8: Enantiomerenfraktionen (EF) von Metoprolol und Propranolol in den Umweltproben ( $\sigma \pm 0.01$ )

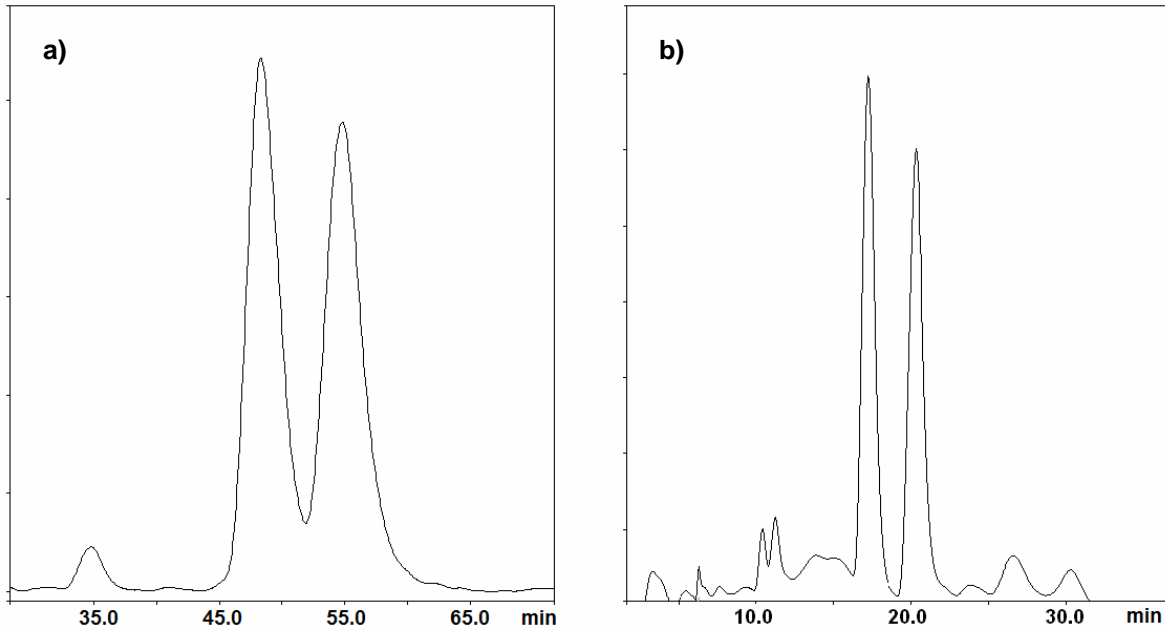
	KW	Köhlbrand	KdL	Övelgönne	Alsterfluss	Außenalster
<b>Meto</b>	0.49	0.44	0.45	0.42 - 0.44	0.52	0.51
<b>Prop</b>	0.41	-	-	0.62	-	0.54

zwischen Klärwerksablauf und Elbe von jeder Verbindung, lässt sich schlussfolgern, dass entweder ein stärkerer Abbau der jeweils weniger vorhandenen Form oder aber eine Enantiomerisierung, durch die *R*-Metoprolol und *S*-Propranolol jeweils in ihren Antipoden umgewandelt werden, für die beobachteten Verhältnisse in der Elbe verantwortlich sind. Die enantioselektive Transformation von Metoprolol scheint dabei mit einer recht geringen Geschwindigkeit abzulaufen. Das kann zum einem daran festgemacht werden, dass keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Enantiomere mit zunehmender Distanz vom Eintragsort festzustellen waren (vgl. Köhlbrand und Övelgönne bzw. Fischmarkt). Zum anderen gab es keine Unterschiede in den EF-Werten im Sommer und im Winter, obwohl sich die absoluten Konzentrationen zu beiden Jahreszeiten beträchtlich voneinander unterschieden. Interessant ist das Bild in der Alster für beide Verbindungen. Während Propranolol hier den gleichen Vorgängen wie in der Elbe zu unterliegen scheint, ist bei Metoprolol ein deutlicher Unterschied zur Elbe festzustellen, wobei keines der Enantiomere bevorzugt abgebaut oder umgewandelt zu werden scheint. Da die Zusammensetzung von

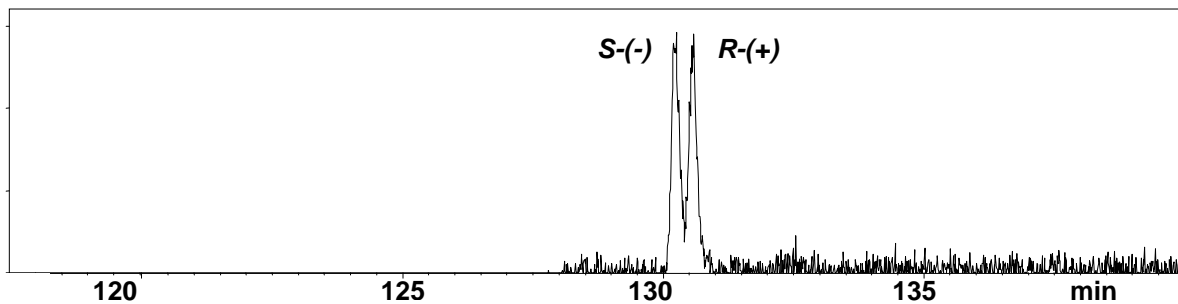
Metoprolol in diesen Gewässern fast dieselbe wie die im Ablauf des Klärwerks ist, lässt sich schließen, dass es entweder andere Präferenzen als in der Elbe gibt oder aber die Geschwindigkeit der enantioselektiven Transformation eine andere als in der Elbe ist. Das zeigt, dass beide Arten von Gewässern eine unterschiedliche mikrobiologische Fauna beherbergen. Die EF-Werte für beide Verbindungen im Ablauf des Klärwerks stimmen gut mit den Ergebnissen überein, die Wong *et al.* und Fono und Sedlak in Klärwerken mit biologischer Behandlungsstufe bestimmt haben<sup>[85, 87-88]</sup>. Ebenfalls stehen die EF-Werte für Metoprolol in der Elbe in Einklang mit Untersuchungen, in denen die Enantiomerenzusammensetzung mit zunehmender Distanz von der Eintragsquelle verfolgt wurde, wobei ein Trend zu kleiner werdenden EF-Werten feststellbar war<sup>[89]</sup>. Untersuchungen von Fono und Sedlak zum Verhalten von Propranolol in Oberflächengewässern ergaben hingegen, dass enantioselektive Vorgänge keine Rolle spielen in den von ihnen untersuchten Gewässern und es deshalb die gleichen Zusammensetzungen der Enantiomere wie in den eingetragenen Abwässern gefunden wurden, so dass eindeutig zwischen geklärten und ungeklärten Einträgen unterschieden werden konnte<sup>[85]</sup>. Ihr Befund steht somit gänzlich im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, was somit einmal mehr als deutlich zeigt, dass biotische Vorgänge sich regional unterscheiden können und dass kaum allgemeine Vorhersagen bezüglich des Verhaltens einer Verbindung in einem Ökosystem gemacht werden können.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der enantioselektiven Analyse von MetoOH, MetoCOOH und MetoK wiedergegeben. Das Transformationsprodukt MetoK wurde dabei enantioselektiv in Form seines DMS-Derivats an Kromasil-CC bestimmt. Die Enantiomere wurden dabei basisliniengetreunt, die Trennung war damit besser als die der nativen Verbindung, welche nur bei 92 % lag (Abb. 38). Die Elutionsreihenfolge wurde nicht bestimmt, da keine ausreichenden Mengen für eine Bestimmung der optischen Drehwerte vorhanden waren. Da sich aber die Elutionsreihenfolgen von Verbindungen mit der gleichen Seitenkette, wie Metoprolol, Propranolol und MetoOH, an Kromasil-CC nicht unterscheiden, kann man mit einiger Sicherheit für MetoK in seiner underivatisierten Form auf die gleiche Reihenfolge schließen. Beim DMS-Derivat hingegen ist die direkte räumliche Umgebung des stereogenen Zentrums durch die Funktionalisierung verändert, so dass nicht mehr mit Sicherheit auf die gleiche Elutionsreihenfolge geschlossen werden kann.

Die enantioselektive Analyse des Klärwerksablaufes zeigte, dass MetoCOOH mit einem EF-Wert von 0.5 als Racemat vorlag (Abb. 39). Von der diastereomeren Verbindung MetoOH lag das erste Paar (*1'S2R/1'R2S*) ebenfalls racemisch vor, während für das zweite Paar ein EF-Wert von 0.44 bestimmt wurde (Tab. 9). Das Enantiomer mit der *1'S2S*-Konfiguration war in letzterem Fall also in leicht höheren Konzentration präsent als der Antipode. Um auch



**Abb. 38: Getrennte Enantiomere eines Standards von MetoK an Kromasil-CC**  
 a) unterivatisiert (98/2/0.1 *n*Hexan/2-Propanol/Diethylamin, 5 °C, 0.5 mL/min)  
 b) DMS-Derivat (99/1/0.1 *n*Hexan/2-Propanol/Diethylamin, 5 °C, 0.5 mL/min)



**Abb. 39: Enantiomere von MetoCOOH im Klärwerksablauf**

**Tab. 9: EF-Werte der Metoprolol-Metaboliten im Ablauf des Klärwerks ( $\sigma \pm 0.01$ , \* Wert bezieht sich auf das erst-eluierende Enantiomer)**

MetoCOOH	MetoOH (1'S2R/1'R2S)	MetoOH (1'R2R/1'S2S)	MetoK *
0.50	0.50	0.44	0.36

die Beziehung der Diastereomeren von MetoOH zu verdeutlichen, sind in Abb. 40 die relativen Konzentrationen aller vier Stereoisomeren zueinander dargestellt. So wird ersichtlich, dass das erste Enantiomerenpaar etwa doppelt so stark präsent war wie das zweite Paar. Beim Transformationsprodukt MetoK gab es deutliche Unterschiede in der Konzentration beider Enantiomeren (Tab. 9). Der EF-Wert von 0.36 impliziert, dass das zweit-eluierende Enantiomer im Ablauf knapp doppelt so stark präsent war wie das erst-

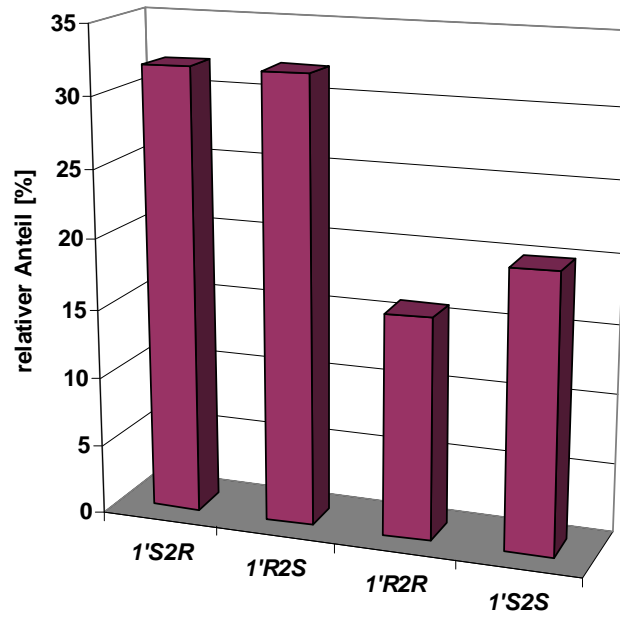


Abb. 40: relative Konzentrationsverhältnisse der MetoOH-Stereoisomeren im Klärwerksablauf

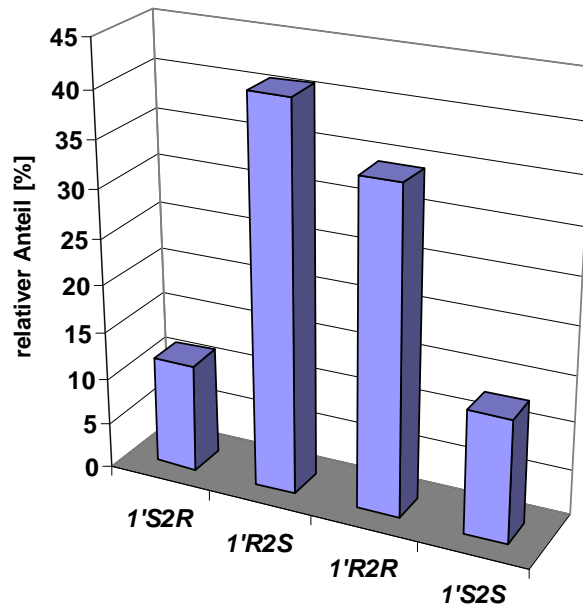


Abb. 41: relative Konzentrationsverhältnisse der MetoOH-Stereoisomeren bei der menschlichen Ausscheidung (nach [55])

eluiierende Enantiomer. Eine enantioselektive Analyse der Verbindungen in den Oberflächengewässern war nicht möglich, da die Konzentrationen aller drei Verbindungen zu gering waren.

Für MetoCOOH wird im Ablauf das gleiche Bild wie für die Mutterverbindung widergespiegelt. Da bei der menschlichen Ausscheidung von MetoCOOH ein leichter Überschuss des *R*-(+)-Enantiomers vorliegt ( $EF = 0.53-0.55$ )<sup>[57, 58]</sup>, zeigt dies, dass vor oder während der Klärwerkspassage die Racemisierung der Verbindung erfolgt. In Abb. 41 ist die Zusammensetzung der MetoOH-Stereoisomeren im menschlichen Urin, wie es von Murthy *et al.* und Cerqueira *et al.* bestimmt wurde, wiedergegeben<sup>[55, 59]</sup>. Auf diese Weise wird ersichtlich, dass es signifikante Unterschiede zum Klärwerksablauf gibt. Am auffälligsten ist dabei, dass im Urin von beiden Enantiomerenpaaren dasjenige Stereoisomer mit der *R*-Konfiguration an der 1'-Position noch mehr als dreimal stärker enthalten ist als der entsprechende Antipode. Der zweite wesentliche Unterschied besteht darin, dass im Urin die Diastereomerenpaare mit der 1'*S*- sowie 1'*R*-Konfiguration jeweils noch recht ähnliche Konzentrationen aufweisen im Gegensatz zum Ablauf. Vor bzw. während der Klärwerkspassage kommt es demnach zu einem bevorzugten Abbau bzw. der bevorzugten Umwandlung des Stereoisomers mit der 1'*R*2*R*-Konfiguration. Das erste Enantiomerenpaar (1'*R*2*S* und 1'*S*2*R*) racemisiert hingegen sehr wahrscheinlich. Für das Vorkommen von MetoK im Ablauf wurde im vorherigen Abschnitt vermutet, dass seine Bildung entweder aus der Mutterverbindung oder durch Oxidation aus MetoOH vor oder während der Klärwerkspassage erfolgt. Metoprolol erfährt auf dem Weg von der Ausscheidung bis zum Klärwerksaustritt keine allzu signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung seiner Enantiomere ( $EF_{\text{Urin}} = 0.42$ ,  $EF_{\text{KW-Zulauf}} = 0.50-0.52$ )<sup>[57, 87-88]</sup>, so dass sich die beobachteten Verhältnisse der MetoK-Stereoisomeren im Ablauf nicht allein durch die Bildung aus Metoprolol erklären ließen. Es müsste in dem Fall ein gleichzeitiger oder nachfolgender Abbau der Enantiomeren von MetoK stattfinden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich an dieser Stelle deshalb keine klare Aussage treffen. Gleiches gilt auch für eine mögliche Bildung von MetoK aus MetoOH.

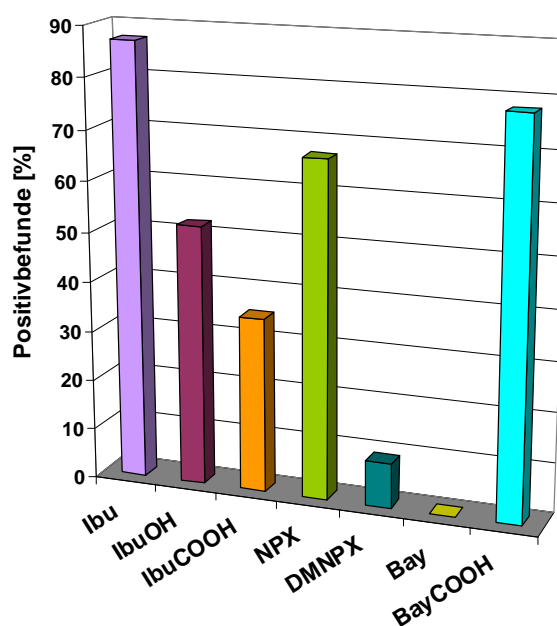
### 3.3. Saure PPCP

#### 3.3.1. Vorkommen und Verteilung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für die schmerz- und entzündungshemmenden Mittel Ibuprofen und Naproxen sowie ihre Metaboliten und für das Insektenrepellent Bayrepel und sein Transformationsprodukt vorgestellt. Im Laufe der Arbeit wurden insgesamt knapp 50 Proben auf diese Verbindungen hin untersucht (Tab. 10). Abb. 42 zeigt die prozentuale Anzahl der Positivbefunde der Verbindungen in allen untersuchten Proben. Ibuprofen wurde in allen Proben, bis auf diejenigen vom Isebekkanal, detektiert. Der

**Tab. 10: Übersicht über die beprobten Stationen**

Station	Zeitpunkt der Probenahme
Klärwerksablauf	Jan. 2004, Feb. 2009
Köhlbrand	Feb./Juli 2008, Feb. 2009
Övelgönne	Juli 2006/2007, Feb./Okt. 2008
KdL	Feb. 2008
Fischmarkt	Juli 2008
Außenalster	Juli/Okt. 2006, Feb./Aug. 2008
Alsterfluss	Feb./Aug. 2008
Isebekkanal	Feb. 2008



**Abb. 42: Anzahl der Positivbefunde der sauren PPCP in den Umweltproben**

Metabolit IbuOH wurde dagegen in gut der Hälfte der untersuchten Proben gefunden. Der zweite Hauptmetabolit, Carboxy-Ibuprofen (IbuCOOH), wurde ebenfalls in über einem Drittel der analysierten Proben nachgewiesen, weshalb er hier und im Folgenden mit einbezogen wird. Naproxen war in 67 % der Proben präsent, während der Metabolit DMNPX in nur 4 Proben (9 %) detektiert wurde. Bayreperel wurde erwartungsgemäß in keiner Probe gefunden, das Transformationsprodukt BayCOOH war hingegen in über Dreiviertel der analysierten Proben nachweisbar. Die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen lagen in der Regel immer über der Bestimmungsgrenze (Anhang V). Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie sich die einzelnen Verbindungen in der Elbe und der Alster verteilen, insbesondere unter dem jahreszeitlichem Aspekt, sind in Abb. 43 die relativen Konzentrationen, ausgedrückt in prozentualen Anteilen, an den Probestationen dargestellt. Dabei ist zum einen die Verteilung im Köhlbrand und im Klärwerksablauf (KW) (Abb. 43a), zum anderen die Verteilung im Hauptstrom der Norderelbe, der die Stationen in Övelgönne, am Fischmarkt und beim KdL-Anleger umfasst (Abb. 43b), wiedergegeben. Drittens ist die Verteilung in der Außenalster und im Alsterfluss dargestellt (Abb. 43c).

Betrachtet man zunächst die Verhältnisse im Klärwerksablauf und im Köhlbrand, fällt auf, dass der Naproxen-Metabolit DMNPX nur im Ablauf in quantifizierbaren Konzentrationen präsent war. Diese lag dabei in der gleichen Größenordnung wie die Konzentration der Mutterverbindung (~ 200 ng/L). Im Köhlbrand im Februar wurde DMNPX zwar auch detektiert, die Konzentration bewegte sich allerdings nur knapp oberhalb des Detektionslimits, weshalb die Verbindung in der zweiten Säule in Abb. 43a nicht mit aufgeführt wird. In Abb. 44 sind die Chromatogramme einer Probe vom Klärwerksablauf und vom Köhlbrand dargestellt, um diese Konzentrationsunterschiede zu verdeutlichen. Der Grund für das sehr geringe Vorkommen in der Elbe liegt wahrscheinlich darin, dass die Verbindung dort sehr schnell abgebaut bzw. umgewandelt wird. Des Weiteren ist auffällig, dass die Ibuprofen-Metaboliten IbuOH und IbuCOOH nur in den kälteren Monaten zu finden waren, wobei ihre Konzentrationen dabei sehr viel höher als die der Mutterverbindung waren. Im Hauptstrom der Elbe und in der Alster war dies ebenfalls der Fall. Dieser Befund zeigt sehr deutlich, dass das Vorkommen beider Verbindungen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, die wahrscheinlich dadurch bedingt sind, dass sie unter den im Sommer infolge erhöhter biologischer und photolytischer Aktivität sehr viel weniger stabil sind als beispielsweise ihre Mutterverbindung Ibuprofen. Die relativen Konzentrationsverhältnisse für Ibuprofen und seine beiden Metaboliten im Februar stimmen gut mit denen von Kuhlmann und Weigel überein, deren Proben ebenfalls aus den Wintermonaten stammten <sup>[91-92]</sup>. IbuCOOH selbst war im Klärwerksablauf nicht nachweisbar, da es während der Klärwerkspassage vollständig eliminiert wird <sup>[91]</sup>. Sein Vorkommen im Oberflächenwasser ist darauf zurückzuführen, dass es aus der Mutterverbindung nachgebildet wird <sup>[92]</sup>.

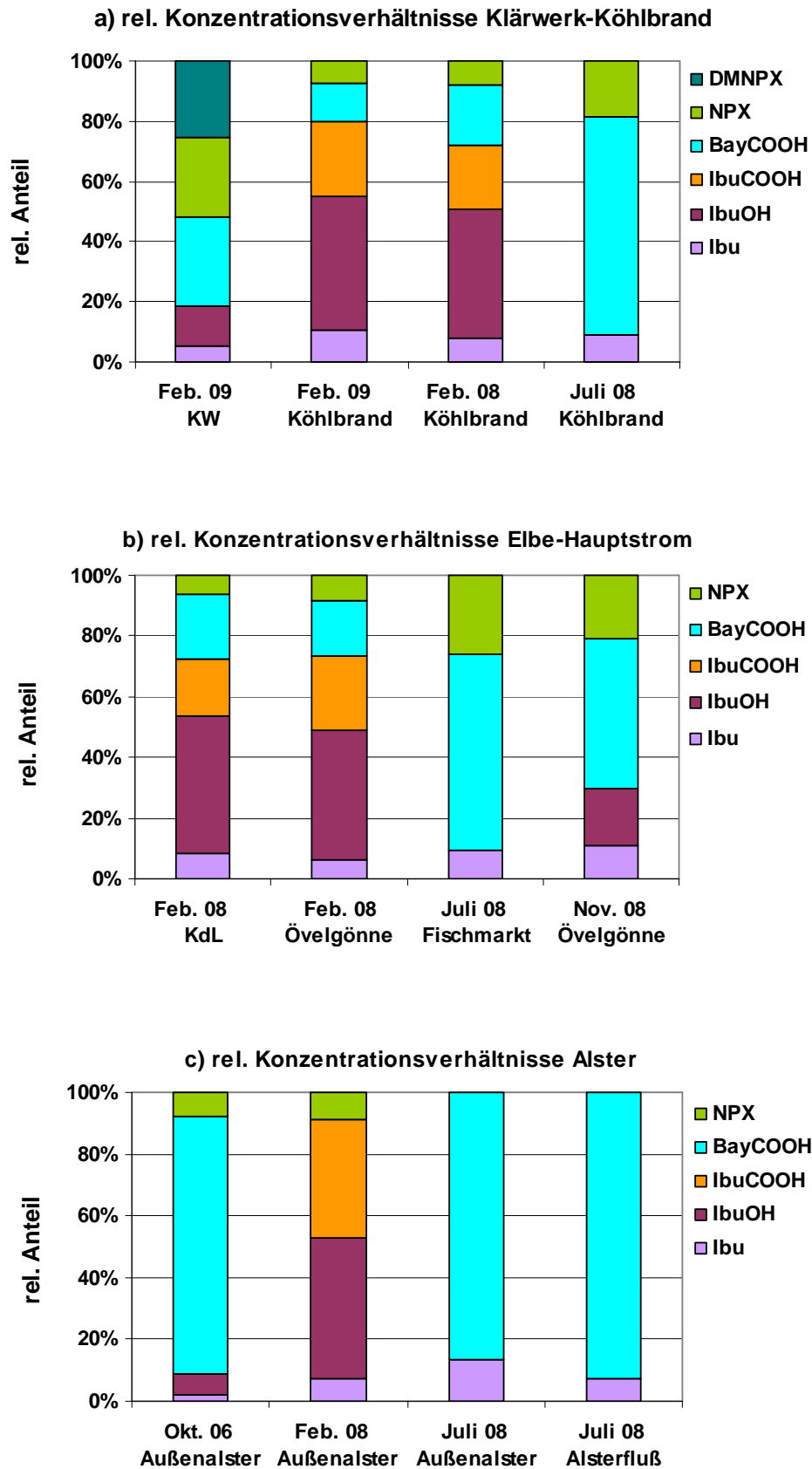
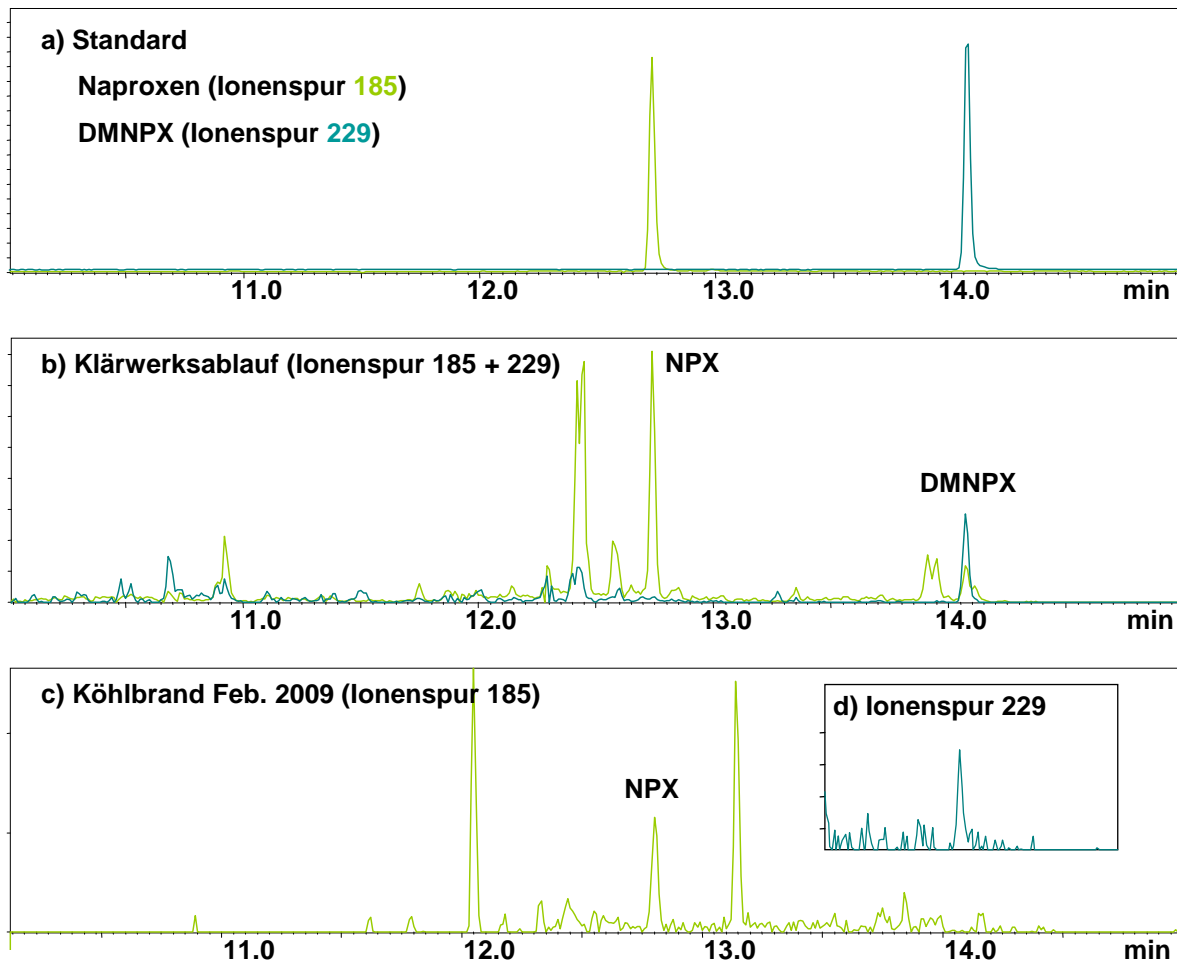


Abb. 43: relative Anteile der sauren PPCP zu unterschiedlichen Jahreszeiten a) im Köhlbrand-Klärwerksablauf, b) im Hauptstrom Elbe, c) in der Alster





**Abb. 44:** GC-MS-Chromatogramme von einer Naproxen- und Desmethyl-Naproxen-Standardmessung sowie von zwei Proben (Säule: VF-5ms, 30 m, der Maßstab von 44d ist 100fach vergrößert), entsprechende Massenspektren von DMNPX befinden sich in Anhang VI

Das Transformationsprodukt BayCOOH war im Klärwerksablauf von den untersuchten Verbindungen anteilmäßig am stärksten präsent, obwohl die Proben im Februar genommen wurden, also zu einer Jahreszeit, in der normalerweise keine Mücken o. ä. auftreten. Vergleicht man die Konzentrationen von BayCOOH im Februar und im Juli an allen Stationen, waren sehr signifikante Unterschiede festzustellen, die eben genau darauf zurückgehen, dass das Produkt Autan<sup>®</sup> verstärkt in den warmen Monaten verwendet wird. Generell bleibt festzuhalten, dass die Konzentrationsverhältnisse im Hauptstrom der Elbe für die einzelnen Verbindungen an den verschiedenen Stationen im Februar und im Juli das gleiche Bild widerspiegeln, welches im Köhlbrand zu finden ist (Abb. 43b). Interessant ist in dem Zusammenhang die Situation, die im November vorzufinden war. Der Metabolit IbuOH war zu diesem Zeitpunkt schon wieder präsent, während IbuCOOH noch nicht detektierbar war. Der relative Anteil war, verglichen mit dem im Winter, allerdings noch deutlich geringer. In der Alster fand man gegen Ende Oktober ebenfalls diese Situation vor (Abb. 43c). In den Monaten Februar und Juli bot sich in der Alster, sowohl der Außenalster als auch im

Alsterfluss, ansonsten ein etwas anders Bild als in der Elbe. So war im Februar kein BayCOOH detektierbar und im Sommer wurde kein Naproxen nachgewiesen. Letzteres ist interessant, wenn man die Anteile von Ibuprofen und Naproxen an allen verschiedenen Stationen zueinander genauer betrachtet. Während im Februar die relativen Anteile und somit die Konzentrationen beider Verbindungen etwa gleich waren, war die Konzentration von Naproxen im Juli in der Elbe (Köhlbrand und Fischmarkt, vgl. Abb. 43a und b) mindestens zweimal höher als die von Ibuprofen. Das deutet darauf hin, dass Naproxen unter den Bedingungen im Sommer in der Alster weniger stabil ist als Ibuprofen. Im Gegensatz zum Betablocker Metoprolol konnte keiner der sauren PPCP im Isekanal detektiert werden.

Durch parallel ablaufende Arbeiten im Arbeitskreis war es möglich, Proben aus dem Großraum Karachi in Pakistan zu einem Vergleich heranzuziehen. Diese stammten dabei aus den beiden Hauptflüssen, die durch das Karachi-Gebiet fließen, aus offenen Kanalisationssystemen, in die Haushalts- und Industrieabwässer eingeleitet werden und aus einer sich im Hafengebiet befindlichen Mangroven-Lagune, die durch eine hohe biologische Aktivität geprägt ist (Karte s. Anhang VII). Der prinzipielle Unterschied zu den Hamburger Proben bestand darin, dass die Pharmazeutika Ibuprofen und Naproxen in erheblich höheren Konzentrationen vorhanden waren (unterer  $\mu\text{g/L}$ -Bereich). Das ist dadurch bedingt, dass keine Abwasserklärung stattfindet. Am augenfälligsten war jedoch der Befund, dass der Metabolit DMNPX in allen Proben, in denen auch die Mutterverbindung Naproxen vorhanden war, detektiert werden konnte. Die Konzentrationen lagen dabei in allen Fällen deutlich im quantifizierbaren Bereich, waren aber, verglichen zu denen der Mutterverbindung, erheblich geringer<sup>[130]</sup>. So wurden in den beiden Hauptflüssen Malir und Lyari sowie in den Kanälen im Schnitt 20fach geringere Konzentrationen für DMNPX bestimmt. Nur in der Hafenlagune war die Konzentration mit etwa einem Viertel der Konzentration von Naproxen vergleichsweise höher.

### 3.3.2. Enantioselektive Analyse

Die Abb. 45 und 46 zeigen im Überblick die Enantiomere von Ibuprofen und IbuOH in den verschiedenen Umweltproben. In Tabelle 11 sind die dazugehörigen Enantiomerenfraktionen wiedergegeben. Die Elutionsreihenfolge von IbuOH wurde nicht bestimmt, es kann aber davon ausgegangen werden, dass sie dieselbe wie die von Ibuprofen ist bezüglich der absoluten Konfiguration <sup>[93]</sup>. Da die entsprechenden Vorzeichen der optischen Drehung von IbuOH nicht bekannt sind, beziehen sich die angegebenen EF-Werte für IbuOH in dem Fall ausnahmsweise auf die absolute Konfiguration des erst-eluierenden Enantiomers. Auf diese Weise können die Werte beider Verbindungen miteinander verglichen werden.

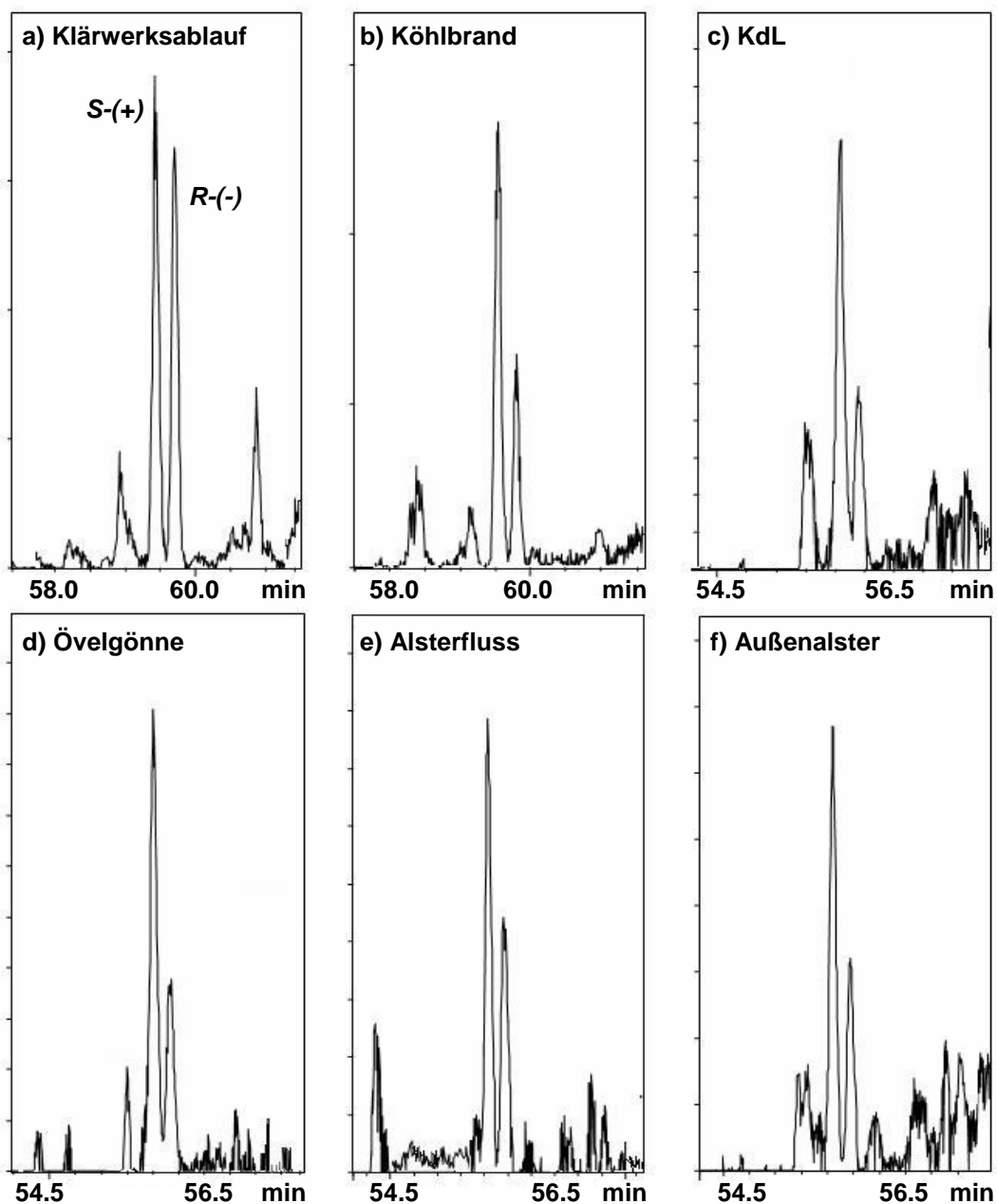


Abb. 45: Enantiomere von Ibuprofen in verschiedenen Umweltproben

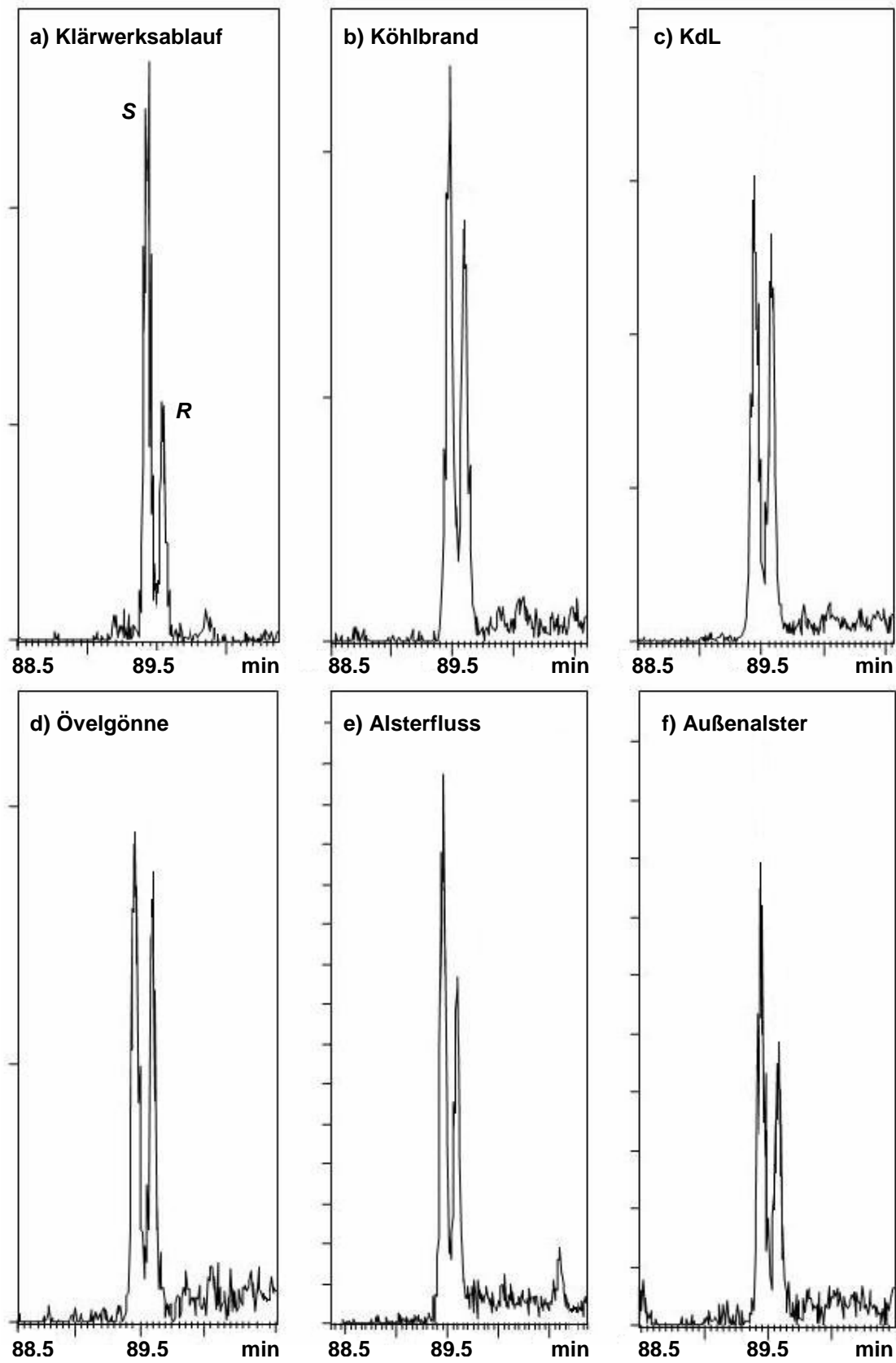


Abb. 46: Getrennte Enantiomere von IbuOH in verschiedenen Umweltproben

Tab. 11: Enantiomerenfraktionen von Ibu und IbuOH in den Umweltproben (\* Proben von mehreren Zeitpunkten, \*\* Werte von 2004 <sup>[93]</sup>,  $\sigma \pm 0.02$ )

	KW-Zulauf	KW-Ablauf	Köhlbrand	KdL	Övelgönne	Alsterfluss	Außenalster
<b>Ibu</b>	0.86 **	0.46 - 0.53 *	0.64 - 0.69 *	0.69	0.71	0.64	0.67
<b>IbuOH</b>	0.85 **	0.68 - 0.71 *	0.57	0.55	0.50 - 0.63 *	0.62	0.60

Die EF-Werte für Ibuprofen im Klärwerksablauf, die sich in den Jahren 2004 und 2009 bei 0.46-0.53 bewegten, zeigen, dass es keinen großen Überschuss eines der Enantiomere gibt. In der Elbe überwog dann aber deutlich das erst-eluierende Enantiomer, die S-Form, mit EF-Werten von 0.64-0.72. Dabei lagen die EF-Werte im Köhlbrand tendenziell etwas über denen in Övelgönne und beim KdL-Anleger. In der Alster überwog ebenfalls das S-Enantiomer. Mit EF-Werten von 0.64 im Alsterfluss und 0.67 in der Außenalster lagen diese dabei in derselben Größenordnung wie im Köhlbrand. In allen Fällen wurden keine jahreszeitlich bedingten Schwankungen festgestellt. Die Situation von IbuOH in den verschiedenen Proben unterschied sich stark von der des Ibuprofens. Während im Klärwerksablauf ein Enantiomerenüberschuss des erst-eluierenden Enantiomers zu finden war (EF = 0.68-0.71), sanken die EF-Werte in der Elbe. Im Köhlbrand lagen sie bei 0.57, im Hauptstrom bei Övelgönne und beim KdL-Anleger ging der Trend weiter zu noch kleineren Werten, die im Jahr 2008 mit 0.50-0.55 bestimmt wurden. Die racemischen Verhältnisse wurden dabei im Herbst (November) beobachtet. Im Jahr 2004 waren die Werte für IbuOH in Övelgönne hingegen etwas höher (EF = 0.63). In der Alster überwog ebenfalls das erst-eluierende Enantiomer; die EF-Werte, die 2008 zwischen 0.60-0.62 lagen, zeigen, dass das S-Enantiomer allerdings stärker präsent war als in der Elbe zum gleichen Zeitpunkt.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde bereits erörtert, dass die beobachteten EF-Werte von Ibuprofen und IbuOH im Klärwerksablauf durch unterschiedliche Kinetiken im enantioselektiven Abbau bedingt sind <sup>[93]</sup>. Bei beiden Verbindungen wird dabei das S-Enantiomer schneller abgebaut als der Antipode, welches in beiden Fällen im Zulauf die vorherrschende Form ist (EF = 0.85 bzw. 0.86). Zusätzlich kommt bei IbuOH wahrscheinlich die Spaltung von Konjugaten während der Klärwerkspassage hinzu. Die Schwankungen in den Werten zu verschiedenen Probenahmezeiten lassen sich mit einer unterschiedlich langen Verweildauer im Klärwerk erklären, die abhängig ist von der Menge und somit der Fließgeschwindigkeit des zu klärenden Abwassers. Die kleiner werdenden Werte für Ibuprofen in der Elbe mit zunehmender Entfernung vom Eintragsort zeigen deutlich, dass das R-Enantiomer bevorzugt abgebaut oder umgewandelt wird. Die kleineren EF-Werte von IbuOH in der Elbe gegenüber dem Ablauf sind hingegen wahrscheinlich dadurch bedingt,

dass das *S*-Enantiomer bevorzugt abgebaut wird. Des Weiteren ist denkbar, dass die *R*-Form enantioselektiv aus der Mutterverbindung nachgebildet wird. Dies konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden <sup>[93]</sup>. Berücksichtigt man die relativen Konzentrationen von Ibuprofen und IbuOH im Winter, wird ersichtlich, dass letzteres allerdings nicht ausschließlich allein für die beobachteten EF-Werte von IbuOH verantwortlich sein kann. Die Zusammensetzung beider Verbindungen in der Alster ähnelt der im Köhlbrand, was darauf hindeutet, dass es entweder zusätzliche Eintragsquellen in der näheren Umgebung gibt oder die Geschwindigkeit, mit der die Transformationen ablaufen, eine andere ist.

In den Abb. 47 und 48 sind die Enantiomere von Ibuprofen und IbuOH in drei

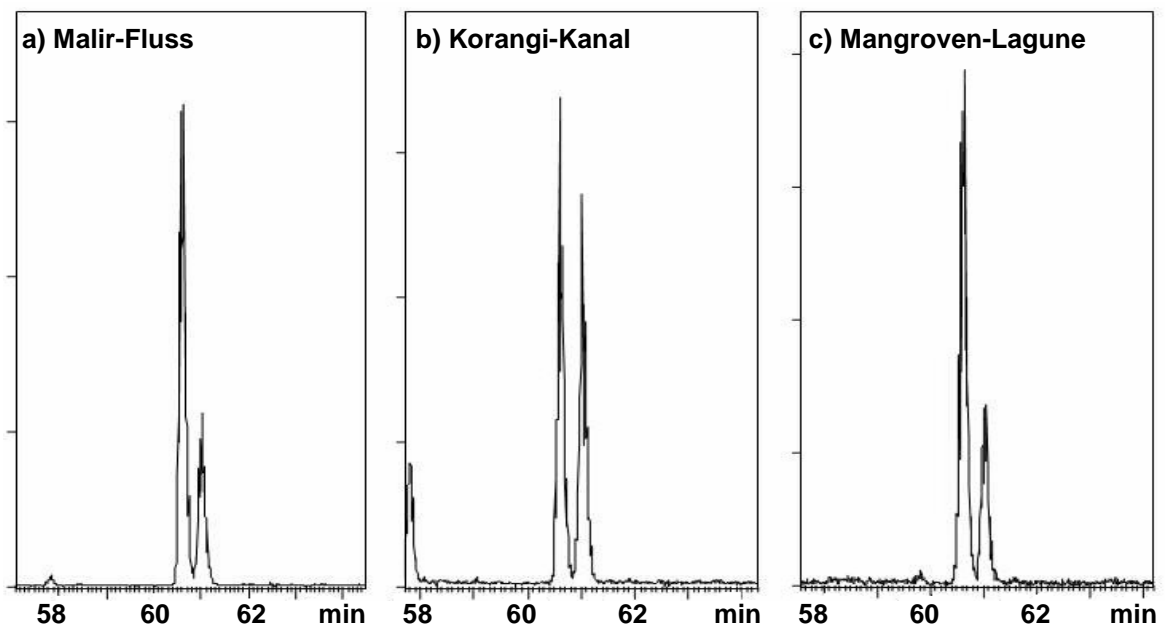


Abb. 47: Enantiomere von Ibuprofen in Umweltproben aus Karachi, Pakistan

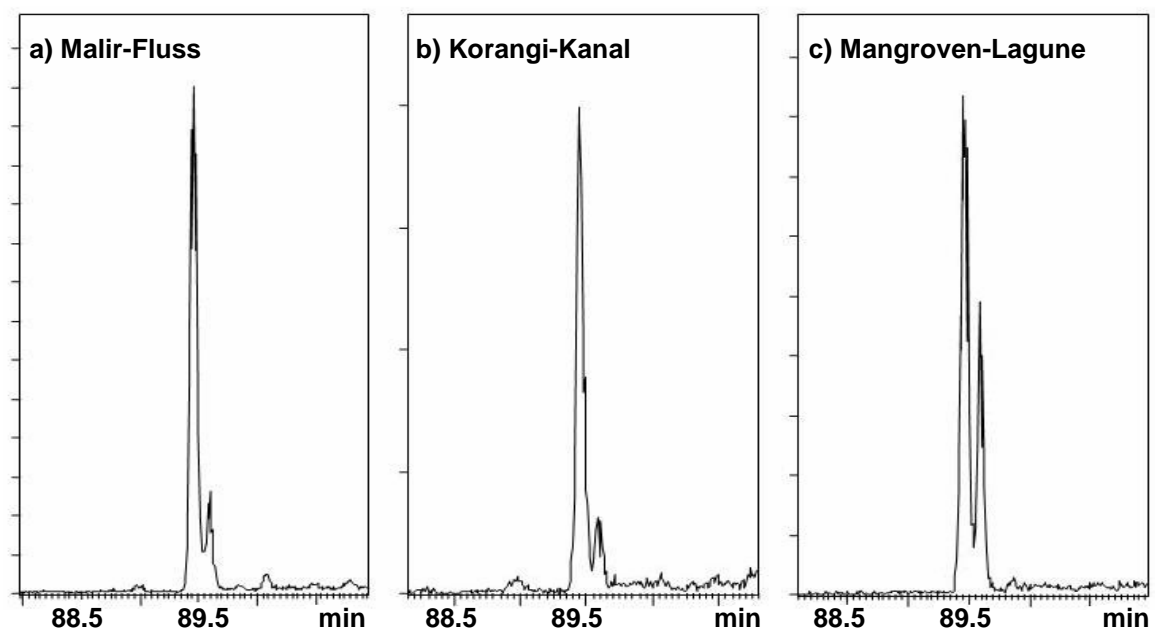


Abb. 48: Enantiomere von Hydroxy-Ibuprofen in Umweltproben aus Karachi, Pakistan

**Tab. 12: EF-Werte von Ibu und IbuOH in ausgewählten Pakistan-Proben (Stationen entlang des Korangi-Kanals s. Karte in Anhang V, n. aw. = nicht auswertbar,  $\sigma \pm 0.02$ )**

	Malir-Fluss	Lyari-Fluss	Korangi-Kanal:			Mangroven-Lagune
			6	5	4	
<b>Ibu</b>	0.73	0.77	0.72	0.57	0.54	0.72
<b>IbuOH</b>	0.84	0.85	0.83	n. aw.	0.86	0.69

unterschiedlichen Proben aus dem Raum Karachi dargestellt. Die dazugehörenden EF-Werte befinden sich in Tab. 12. In den beiden Hauptflüssen Malir und Lyari sowie in der Hafens-Lagune war von Ibuprofen das S-Enantiomer die vorherrschende Form. Die EF-Werte zwischen 0.72 und 0.77 deuteten dabei auf eine etwas größere Präsenz dieses Enantiomers hin als in der Elbe. Im Korangi-System wurde in Fließrichtung eine Abnahme der EF-Werte beobachtet, die am Ende des Kanalsystems mit 0.54 denen im Ablauf des Hamburger Klärwerks ähneln. Von IbuOH war in den Flüssen ein großer Überschuss des erst-eluierenden Enantiomers zu finden (EF = 0.85), ebenso wie im Korangi-Kanal. In der Hafens-Lagune war der Unterschied zwischen beiden Enantiomeren kleiner, der EF-Wert lag hier bei 0.69. Die Zusammensetzung von IbuOH in den Flüssen und im Ablaufkanal ist charakteristisch für die von ungeklärten Abwässern, wie sie im Zulauf des Hamburger Klärwerks oder in Abläufen von Klärwerken ohne biologische Reinigungsstufe ebenfalls zu finden ist <sup>[93]</sup>. Dieser Befund zeigt deutlich, dass die Hauptflüsse Karachis ebenso wie der Kanal stark durch den Eintrag von Haushaltsabwässern geprägt sind. Ungewöhnlich ist dabei zunächst nur, dass die Zusammensetzung von Ibuprofen in beiden Arten von Gewässern überhaupt nicht diesem Bild entspricht. Denn wie von IbuOH ist auch von Ibuprofen das S-Enantiomer das vorherrschende Enantiomer in ungeklärten Abwässern <sup>[86, 93]</sup>. Durch zusätzliche Einträge aus Pharmazeutika produzierenden Firmen, die ihre Abwässer ebenfalls ungeklärt einleiten, lassen sich diese beobachteten Zusammensetzungen jedoch erklären. Denn Ibuprofen wird als Racemat hergestellt, wodurch der hohe Überschuss des S-Enantiomers, wie er in privaten Abwässern vorherrscht, reduziert wird und als Folge geringere EF-Werte resultieren. Entlang des Korangi-Systems spielen demzufolge zunehmend pharmazeutisch-industrielle Einträge eine Rolle, wodurch sich die kleiner werdenden EF-Werte erklären lassen. Im Malir- und im Lyari-Fluss dürften diese Einträge geringer sein, da die EF-Werte von Ibuprofen sehr viel größer als im Kanal waren. In der Hafens-Lagune, in die Abwässer aus zentralen Teilen der Stadt über Kanalsysteme eingetragen werden und die ferner mit dem Meer verbunden ist, war das R-Enantiomer von IbuOH in erheblich größeren Anteilen als im Kanal und in den Flüssen präsent. Auch bei Ibuprofen gab es in der Enantiomerenzusammensetzung deutliche

Unterschiede zum Korangi-Kanal. Die Lagune stellt sozusagen einen Endpunkt der Einträge aus der Region dar, was zur Folge hat, dass die Konzentrationen dort insgesamt geringer waren und deshalb Transformationsprozesse eher ins Gewicht fallen als im Kanal-System oder den Flüssen selbst, was zu deutlich veränderten Enantiomerenzusammensetzungen führt.

Die Ergebnisse der enantioselektiven Analyse von Naproxen in den Umweltproben sind im Folgenden dargestellt (Abb. 49, Tab. 13). In allen Fällen war das erst-eluiierende Enantiomer, die *S*-(+)-Form, das eindeutig vorherrschende Enantiomer. Während im Klärwerksablauf noch deutliche Anteile von dem Antipoden vorhanden waren, der *R*-(-) lag bei 0.8, waren in der Umwelt geringere Anteile der *R*-Form zu finden. So lagen die EF-Werte in der Elbe an den verschiedenen Stationen zwischen 0.83-0.89. In der Alster, sowohl im Fluss als in der Außenalster, waren nur noch sehr kleine Konzentrationen der *R*-Form vorhanden, die EF-Werte bewegten sich hier in der Größenordnung von 0.95. Im Gegensatz

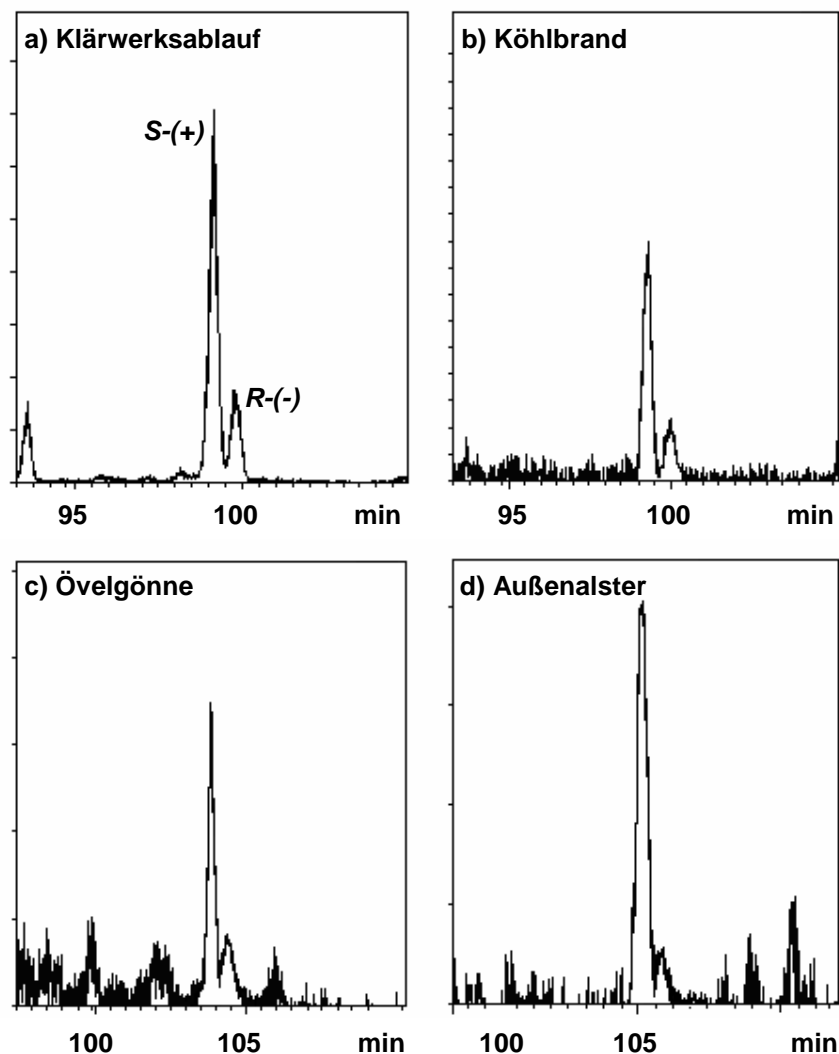


Abb. 49: Enantiomere von Naproxen in verschiedenen Umweltproben



Tab. 13: Enantiomerenfraktionen von Naproxen in verschiedenen Umweltproben ( $\sigma \pm 0.01$ )

	Klärwerksablauf	Köhlbrand	Övelgönne	Alster
<b>NPX</b>	0.80	0.83 - 0.89	0.86	$\geq 0.95$

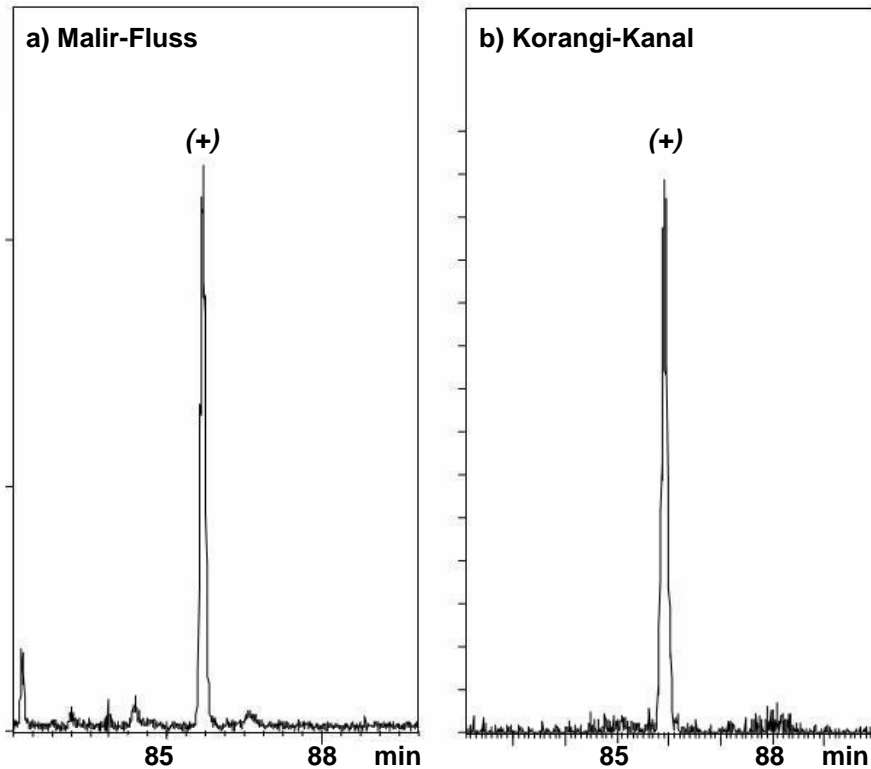


Abb. 50: Enantioselektive Analyse von Naproxen in Umweltproben aus Karachi, Pakistan

dazu war in den Proben aus dem Raum Karachi in allen Fällen ausschließlich das *S*-Enantiomer vorhanden (EF = 1). Die Abb. 50 zeigt beispielhaft die Chromatogramme der enantioselektiven Analyse zweier Proben aus diesem Gebiet.

Die Enantiomerenzusammensetzung im Ablauf des Hamburger Klärwerks mit der Anwesenheit des *R*-Enantiomers von 20 % ist in guter Übereinstimmung mit den jüngst publizierten Ergebnissen von Matamoros *et al.* <sup>[131]</sup>. Demnach variieren die Zusammensetzungen im Ablauf und im Zulauf nur leicht, die EF-Werte im Zulauf liegen bei 0.88-0.9, da sich, anders als im Falle des Ibuprofens, die Kinetiken des Abbaus der beiden Enantiomere während des Klärprozesses nur geringfügig voneinander unterscheiden. Die größeren EF-Werte in den Oberflächengewässern Elbe und Alster deuten darauf hin, dass das *R*-Enantiomer schneller bzw. bevorzugt abgebaut oder umgewandelt wird. Es gibt folglich die gleichen Präferenzen wie bei Ibuprofen. In ökotoxikologischer Hinsicht kann das Vorhandensein von *R*-Naproxen relevant sein, denn dieses Enantiomer ist nicht nur für den

Menschen sondern auch für Tiere toxisch <sup>[94]</sup>. Die Abwesenheit des *R*-Enantiomers in den Proben aus Karachi kann zum einem durch die fehlende Klärung der Haushaltsabwässer erklärt werden, zum anderen durch die Einträge der Pharmazeutika produzierenden Unternehmen. Naproxen wird als reine *S*-Form produziert und verabreicht und in dieser Form vom Körper größtenteils auch wieder ausgeschieden <sup>[132]</sup>. Das ausschließliche Vorhandensein des *S*-Enantiomers in diesen Proben zeigt, dass Transformationen wie Racemisierung oder Enantiomerisierung in diesem Zusammenhang somit keine Rolle spielen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der enantioselektiven Analyse des Naproxen-Metaboliten Desmethylnaproxen wiedergegeben. Die Trennung der Enantiomere gelang an derselben Phase, die auch für die Mutterverbindung benutzt wurde (Hydrodex- $\beta$ -6TBDM) und unter Verwendung desselben Temperaturgradienten. Da nur das *S*-(+)-Enantiomer als Referenzverbindung zur Verfügung stand, konnte die Trennqualität erst anhand der Umweltproben überprüft werden. Die Trennung der Enantiomeren war etwas schlechter als die der Mutterverbindung, aber ausreichend, um Trends zu erkennen. Ein längeres Temperaturprogramm führte nur zu einer Verbreiterung der Peaks, ohne die Trennung wesentlich zu verbessern. Abb. 51 zeigt zum einem die Enantiomere von DMNPX im Ablauf des Klärwerks und zum anderen in zwei Umweltproben aus Pakistan. Im Klärwerksablauf war das *R*-Enantiomer etwa zu 20 % vorhanden, was somit der Zusammensetzung der Mutterverbindung im Klärwerksablauf entspricht. In den Pakistan-Proben war nur das *S*-Enantiomer präsent und es wird somit ebenfalls das gleiche Bild wie das von Naproxen widergespiegelt.

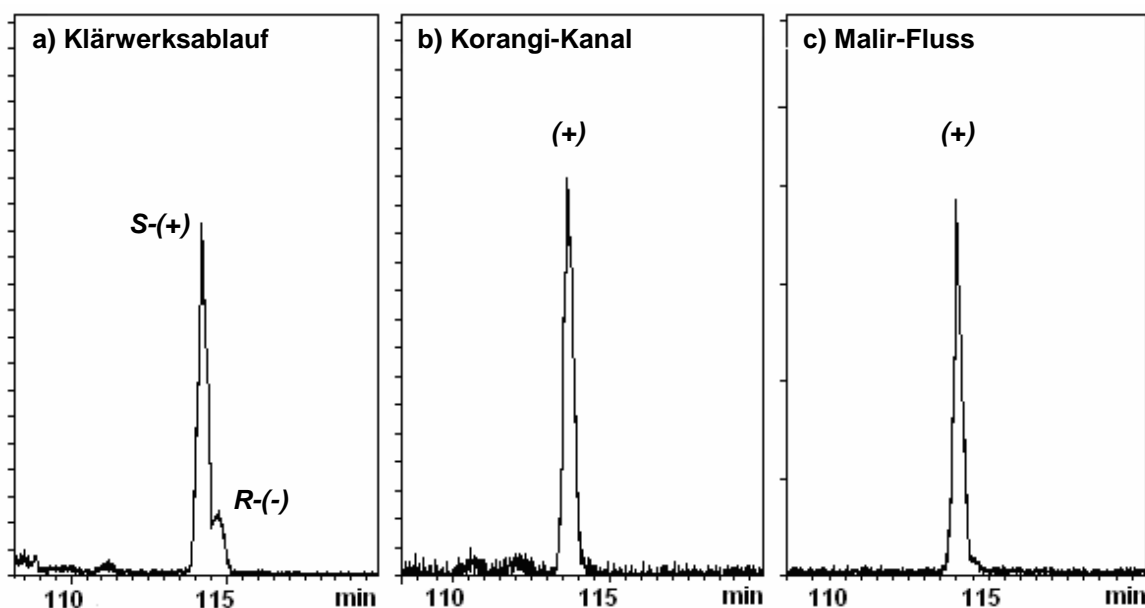


Abb. 51: Enantiomere von Desmethyl-Naproxen in Proben aus a) Hamburg, b) und c) Karachi

Die Zusammensetzung im Ablauf des Klärwerks lässt sich damit begründen, dass DMNPX während der Klärwerkspassage nicht-enantioselektiv aus der Mutterverbindung durch Demethylierung nachgebildet wird. Quintana *et al.* konnten durch ihre Arbeit zeigen, dass DMNPX in Experimenten mit aktivem Klärwerksschlamm und unter Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle mikrobiell aus der Mutterverbindung gebildet wird und dass es unter diesen Bedingungen gleichzeitig recht schnell weiter mineralisiert wird <sup>[133]</sup>. Die Konzentration von DMNPX sowie die ermittelte Zusammensetzung der Enantiomeren im Klärwerksablauf ist also eine Folge dieser beiden gegenläufigen Vorgänge. Eine zusätzliche abiotische Bildung durch direkte photolytische Reaktion kann ausgeschlossen werden, da DMNPX nicht zu den Photoprodukten von Naproxen gehört <sup>[70]</sup>. Ebenso spielt die indirekte Photolyse kaum eine Rolle <sup>[67]</sup>. Das ausschließliche Vorhandensein des S-Enantiomers von DMNPX in den Pakistan-Proben spiegelt erwartungsgemäß die Zusammensetzung wider, die bei fehlender Abwasserklärung zu erwarten ist. Denn wie Naproxen wird auch DMNPX vom Körper überwiegend als S-Form ausgeschieden <sup>[132]</sup>. Erwähnenswert ist die Situation in der Hafenlagune, in der einerseits die Konzentrationen von Naproxen und von DMNPX insgesamt zwar geringer als z.B. in den Hauptflüssen und im Korangi-System sind, aber andererseits das Verhältnis von DMNPX zu Naproxen erheblich höher ist als in den übrigen Gewässern <sup>[130]</sup>. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in diesem Gebiet die Bildung des Metaboliten aus der Mutterverbindung durchaus eine Rolle spielt und DMNPX somit nicht nur in Systemen mit speziellen Mikroorganismen wie im Klärwerk sondern auch in aquatischen Ökosystemen mit lokaler mikrobieller Fauna gebildet wird. Die ausschließliche Anwesenheit des S-Enantiomers deutet dabei an, dass weitere Transformationsprozesse wie Racemisierung aber ebenfalls keine Rolle spielen.

In Abb. 52 sind die Stereoisomere von BayCOOH in verschiedenen Proben von der Elbe dargestellt. Ergänzend sind die EF-Werte für das erst- und das zweit-eluierende Paar von Stereoisomeren in Tab. 14 aufgeführt. An dieser Stelle sei aber nochmals deutlich gesagt, dass nicht bekannt ist, ob es sich bei diesen beiden Paaren auch um Enantiomere handelt. Diese Einteilung dient nur der nachfolgenden besseren Argumentation.

Im Klärwerksablauf waren die Konzentrationen aller vier Stereoisomeren noch annähernd gleich, mit EF-Werten von 0.46-0.49 für das erste Paar und 0.48 für das zweite Paar waren das zweite und vierte Stereoisomer nur geringfügig stärker präsent. In der Elbe waren hingegen deutliche Konzentrationsunterschiede feststellbar. Das dritt-eluierende Stereoisomer war dabei dasjenige, das an allen Probeorten am stärksten vorhanden ist. Im Köhlbrand war seine Konzentration im Juli etwa anderthalbmal so groß wie die des viert-eluierenden Stereoisomers (EF = 0.59), im November waren die Unterschiede zwischen dem dritten und vierten Stereoisomer mit einem EF-Wert von 0.63 noch etwas ausgeprägter. Am

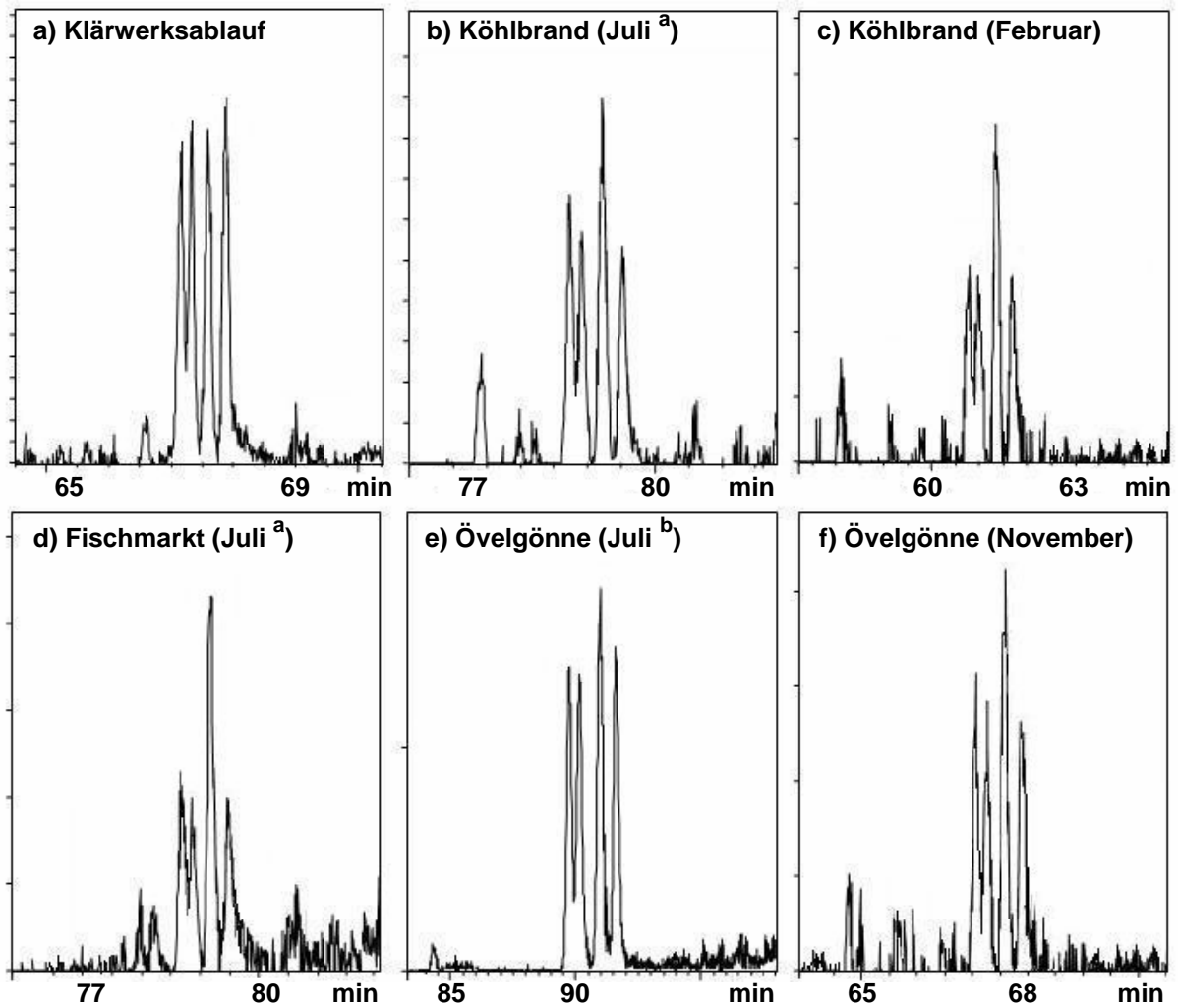


Abb. 52: Stereoisomere von BayCOOH in verschiedenen Proben von der Elbe (<sup>a</sup> Proben von 2008, <sup>b</sup> Proben von 2006)

Tab. 14: Enantiomerenfraktionen des erst- und zweit-eluierenden Stereoisomerenpaares von BayCOOH in verschiedenen Umweltproben der Elbe ( $\sigma \pm 0.02$ )

Ort	EF <sub>(E1, E2)</sub>	EF <sub>(E3, E4)</sub>
Klärwerksablauf	0.46 – 0.49	0.48
Köhlbrand	0.50 – 0.52	0.59 - 0.63
Fischmarkt	0.52	0.71
Övelgönne	0.50 - 0.53	0.56 - 0.60

Fischmarkt waren im Juli noch größere Unterschiede feststellbar (EF-Wert = 0.71). In Övelgönne hingegen dominierte das dritte Stereoisomer im Juli allerdings weniger stark über das vierte (EF = 0.56), im November war der Unterschied zwischen diesen beiden Stereoisomeren aber auch ausgeprägter (EF = 0.60). Von den ersten beiden Stereoisomeren war an allen Probeorten das erst-eluierende Stereoisomer geringfügig stärker vorhanden als

das zweite ( $EF = 0.5 - 0.53$ ), und ihre Konzentrationen waren mit der des viert-eluierenden Isomers vergleichbar. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Bildung von BayCOOH im Klärwerk, welche durch eine schnelle aerobe mikrobielle Umwandlung der Mutterverbindung erfolgt <sup>[73]</sup>, ohne stereoselektive Vorzüge verläuft, da alle vier Stereoisomere in nahezu gleichen Konzentrationen vorlagen. Die geringfügig höheren Konzentrationen des zweit- und viert-eluierenden Isomers sind dabei wahrscheinlich dadurch bedingt, dass entweder gleichzeitig ein Abbau von BayCOOH stattfindet oder aber die Mutterverbindung Bayrepel bei Eintritt ins Klärwerk schon diese Zusammensetzung besitzt. Beim Abbau bzw. der weiteren Transformation von BayCOOH in der Elbe gibt es hingegen eindeutige stereoselektive Vorzüge. Vergleicht man die Zusammensetzung im Köhlbrand im Juli mit der am Fischmarkt (die Proben wurden am selben Tag genommen), sieht man sehr gut, wie der Abbau/ die Umwandlung fortschreitet und der Unterschied in der Konzentration zwischen dem dritt-eluierenden Stereoisomer und den übrigen drei Stereoisomeren ausgeprägter wird mit zunehmender Entfernung vom Haupteintragspfad. Nicht ganz in dieses Bild passt allerdings die Situation in Övelgönne im Juli, in der die Konzentrationsunterschiede nicht sehr stark ausgeprägt waren. Im November fand man dort hingegen wieder dieselbe Zusammensetzung wie im Köhlbrand. Da die Proben aus Övelgönne vom Juli allerdings aus einem anderen Jahr stammen als die vom Köhlbrand und vom Fischmarkt und da es sich bei den Proben immer nur um Stichproben handelte, liegt die Vermutung nahe, dass evtl. zusätzliche punktuelle direkte Einträge ebenfalls eine Rolle spielen. Der Anleger in Övelgönne befindet sich in unmittelbarer Nähe zu einem Badestrand, so dass Bayrepel durch Abwaschen von der Haut direkt ins Wasser gelangt sein kann, wo es weiter zur entsprechenden Säure oxidiert wurde.

In Abb. 53 sind die Stereoisomere von BayCOOH in den Alsterproben dargestellt, die zugehörigen EF-Werte finden sich in Tab. 15. Die Trends, die in der Elbe vorherrschten,

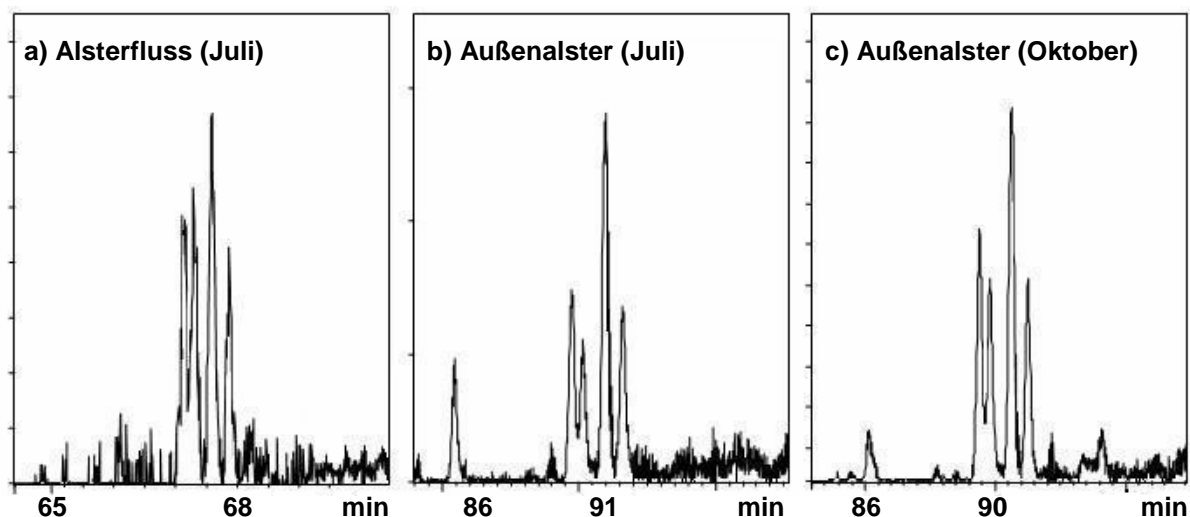


Abb. 53: Stereoisomere von BayCOOH in verschiedenen Proben der Alster

**Tab. 15: Enantiomerenfraktionen des erst- und zweitluierenden Stereoisomerenpaares von BayCOOH in verschiedenen Umweltproben der Alster ( $\sigma \pm 0.02$ )**

Ort	EF <sub>(E1, E2)</sub>	EF <sub>(E3, E4)</sub>
Alsterfluss	0.50	0.62
Außenalster	0.56 - 0.59	0.68

waren in der Außenalster und im Alsterfluss ebenfalls zu finden. An beiden Orten war das dritte Stereoisomer ebenfalls das eindeutig dominierende. Die EF-Werte des zweiten Stereoisomerenpaares lagen dabei zwischen 0.62 im Alsterfluss und 0.68 in der Außenalster im Juli und im November. Das erste Paar war im Alsterfluss mit einem EF-Wert von 0.5 racemisch, und die Konzentrationen dieser beiden Stereoisomere waren dabei etwas höher als die des vierten Isomers. In der Außenalster hingegen fand man für die beiden ersten Stereoisomere unterschiedliche Konzentrationen, das erste Stereoisomer war dabei dasjenige, das stärker präsent war. Der EF-Wert war mit 0.59 im Juli dabei größer als der im Herbst, der bei 0.56 lag. Die Konzentration des zweiten Stereoisomers war im Vergleich zu der des vierten Stereoisomers im Juli zudem etwas geringer als im Oktober, als beide vergleichbare Konzentrationen aufwiesen. Die Transformation der ersten beiden Stereoisomere war in der Außenalster im Juli folglich etwas weiter fortgeschritten als in der Elbe, wo dieser Trend ja auch zu erkennen war. Im Oktober waren die Konzentrationsunterschiede infolge verringerter biologischer Aktivität nicht ganz so ausgeprägt. Die Tatsache, dass im Alsterfluss das erste Paar racemisch vorlag und dass die Konzentration des dritten Stereoisomers sich nicht so deutlich von der der anderen drei, wie es in der Außenalster der Fall ist, unterschied, deutet ebenfalls wieder darauf hin, dass in der Umgebung Eintragspfade existieren.

### 3.4. UV-Filter

Tab. 16 gibt eine Übersicht über die detektierten UV-Filter in verschiedenen Umweltproben. Die Proben wurden überwiegend während der Sommermonate genommen, da erwartet wurde, dass die Verbindungen vor allem in dieser Zeit auftreten würden. Die Methoden zur Aufarbeitung waren dabei erst ab 2008 so etabliert, wie es in Kapitel 2 beschrieben wurde.

In den Jahren 2006 und 2007 wurden die drei Verbindungen sowohl in der Alster als auch in der Elbe bei Övelgönne detektiert. OCR wurde dabei in allen Proben an beiden Stationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen, wobei die Konzentration in der Außenalster im Oktober erheblich höher als im Juli war (Abb. 54b-d). MBC wurde nur 2006 in Övelgönne und im Oktober in der Außenalster detektiert (Abb. 54b). Die Konzentrationen waren dabei in beiden Fällen allerdings nur gering ( $< \text{LOQ}$ ). EHMC wurde nur in der Alster sicher identifiziert, wobei die Konzentration im Oktober deutlich höher lag als im Juli. Neben dem *E*-Isomer war auch das entsprechende *Z*-Isomer in geringeren Anteilen präsent (Abb. 54c-d). Das Verhältnis der beiden Isomeren zueinander spiegelt dabei allerdings nicht unbedingt die reale Zusammensetzung in der Umwelt wider, da die Isomerisierung auch während der Aufarbeitung erfolgt sein kann. In den Proben aus

**Tab: 16: Übersicht über die auf UV-Filter hin untersuchten Proben**

Probe	MBC	EHMC	OCR
<b>Juli 2006</b>			
Övelgönne	+	(+)	+
Außenalster	-	++	+
<b>Oktober 2006</b>			
Außenalster	+	++	+
<b>Juli 2007</b>			
Övelgönne	-	(+)	+
<b>Juli 2008</b>			
Köhlbrand	-	-	-
Fischmarkt	-	-	-
<b>Februar 2009</b>			
Klärwerk *	++	-	++

(\* nur eine einzelne Probe, +: Konzentration  $\geq \text{LOD}$ , ++: Konzentration  $\geq \text{LOQ}$ )

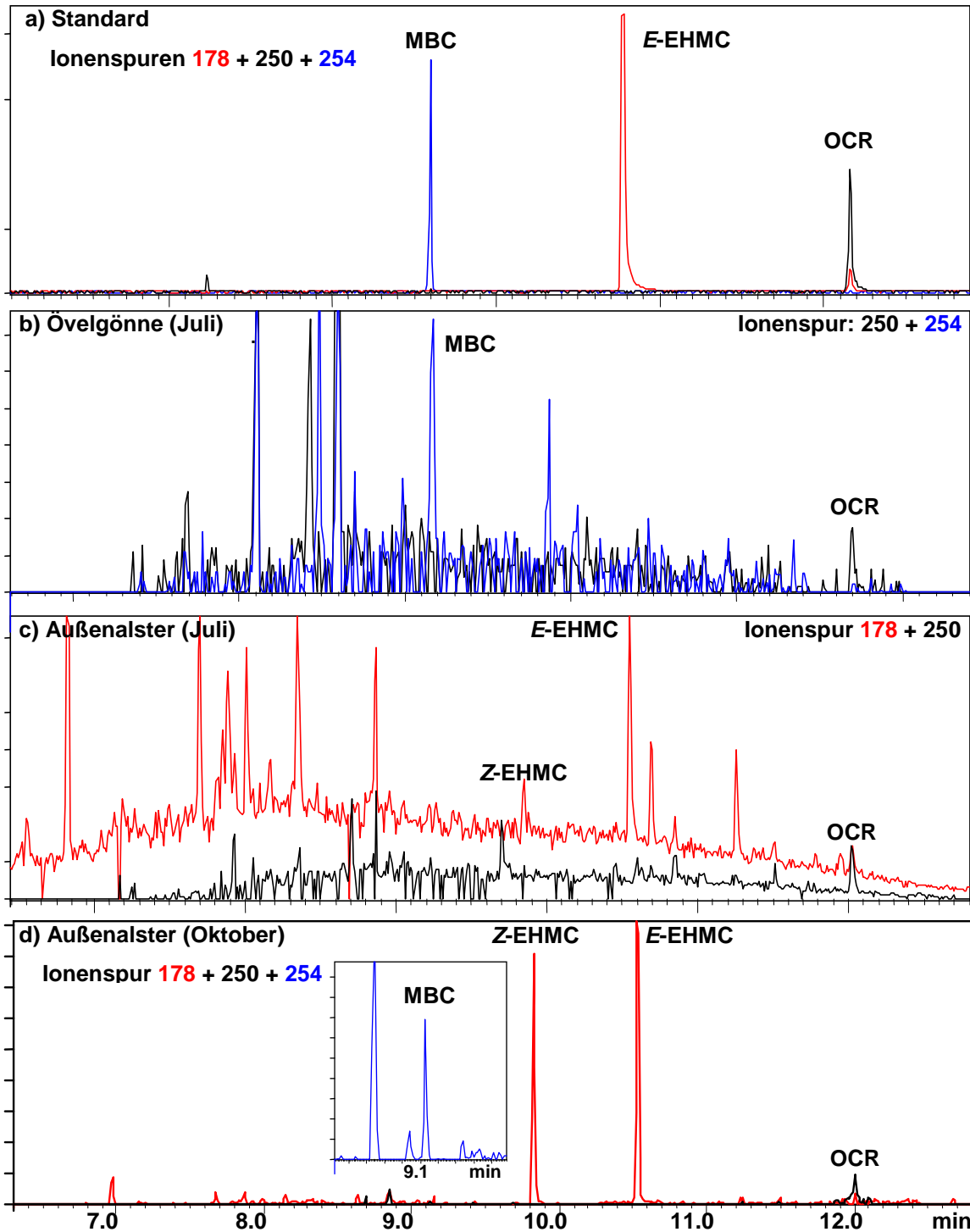
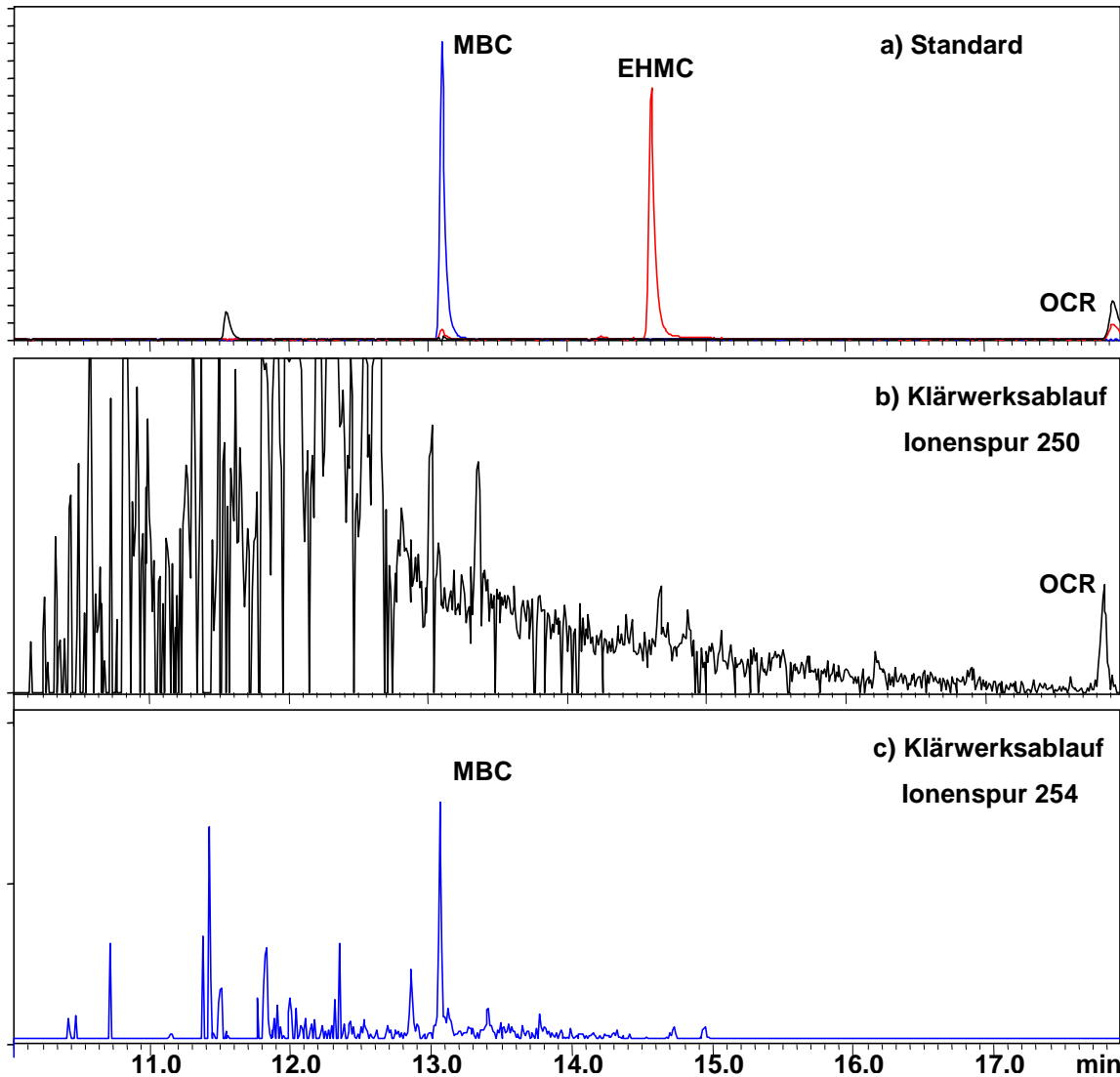


Abb 54: GC-MS-Chromatogramme der UV-Filter (a Standard, b Elbe, c und d Außenalster, Säule: DB-5ms, 15 m, der Ausschnitt der Ionenspur 254 in 55d ist ca. 100fach vergrößert)

Övelgönne wurde EHMC auch nachgewiesen, die entsprechenden Leitungswasser- bzw. Reinstwasser-Blanks, die kurz vorher bzw. danach aufgearbeitet wurden, enthielten jedoch ebenfalls EHMC. Die Konzentrationen lagen dabei in derselben Größenordnung wie in den Umweltproben der Elbe, so dass Kontamination nicht ausgeschlossen werden konnte. Im Sommer 2008 konnte keine der Verbindungen nachgewiesen werden, weder im Köhlbrand





**Abb. 55: GC-MS-Chromatogramme der UV-Filter vom Klärwerksablauf (b und c) im Vergleich zu einem entsprechenden Standard (a) (Säule VF-5ms, 30 m)**

noch am Fischmarkt. Im Februar 2009 wurden MBC und OCR im Ablauf des Klärwerks detektiert. Ihre Konzentrationen lagen dabei mit 48 ng/L für MBC und 15 ng/L für OCR oberhalb der Bestimmungsgrenze (Abb. 55). Da jedoch nur eine einzige Probe auf die UV-Filter hin analysiert wurde, kann ihre Anwesenheit vielmehr als Hinweis denn als abgesichert angesehen werden. Die Abb. 56 und 57 zeigen beispielhaft die Massenspektren aus einigen Umweltproben sowie die entsprechenden Referenzspektren.

Die Ergebnisse belegen, dass die Konzentrationen der UV-Filter entgegen der Vermutung in den untersuchten Gewässern selbst im Sommer nur gering waren. OCR war dabei diejenige Verbindung, die am häufigsten auftrat. Die insgesamt höheren Konzentrationen in der Außenalster gegenüber der Elbe 2006 waren wahrscheinlich dadurch bedingt, dass direkte Einträge, die von Bade- oder Schwimmaktivitäten herrühren, dort eine größere Rolle spielen als in der Elbe. Der Befund, dass im Oktober 2006 dort die Konzentrationen von

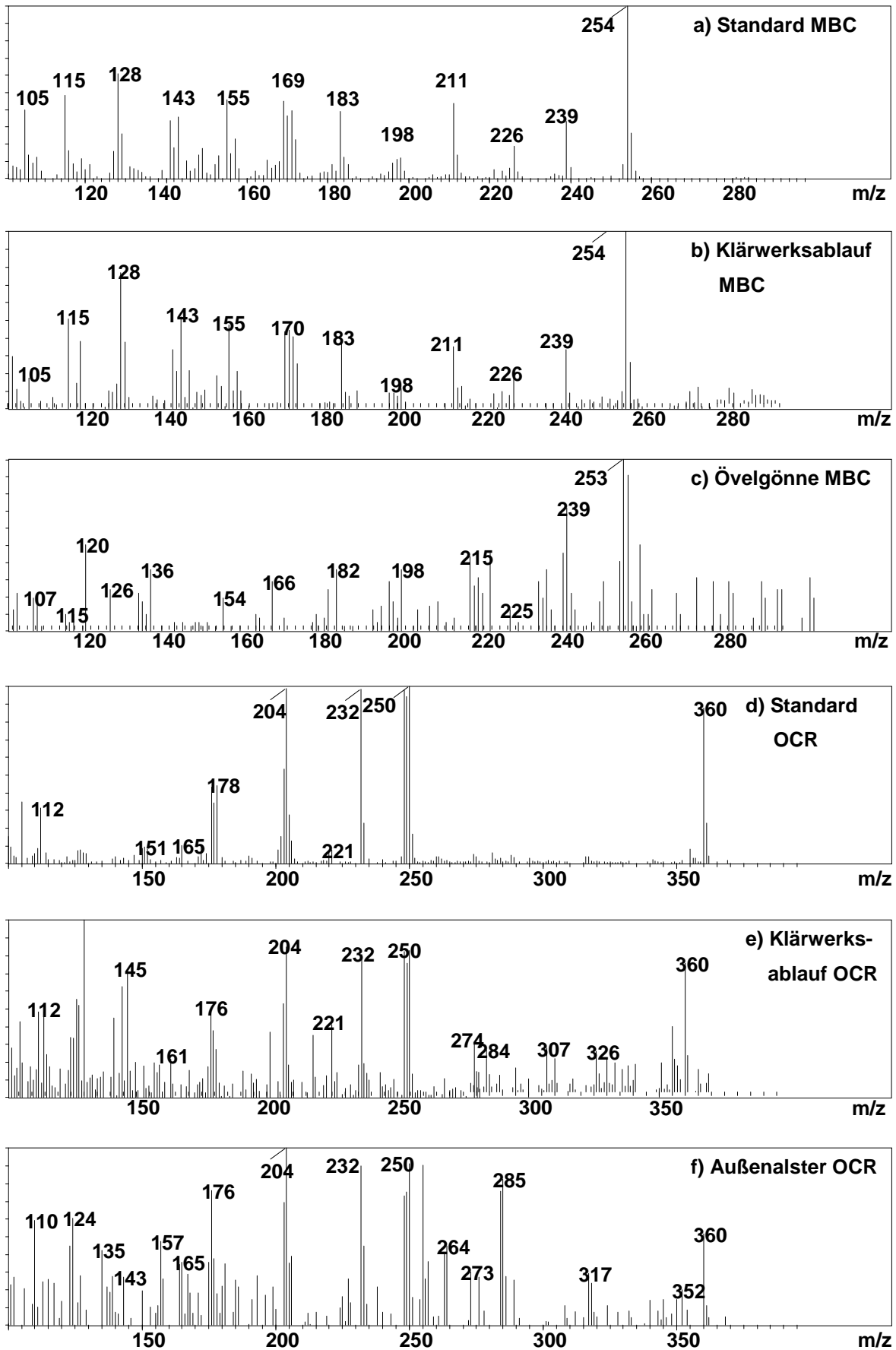


Abb. 56: EI-Massenspektren von MBC (a-c) und OCR (d-f): Referenzspektren sowie Spektren aus Umweltproben

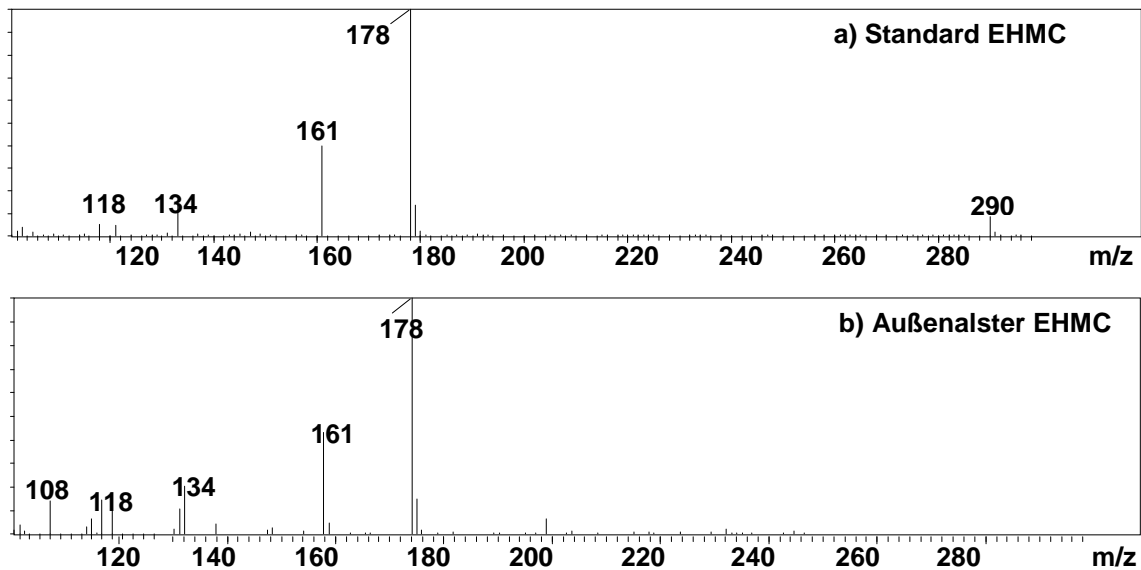


Abb. 57: EI-Massenspektren von EHMC (Standard und Umweltprobe)

EHMC und OCR deutlich höher als im Juli waren und ferner MBC nur in diesem Monat nachweisbar war, lässt sich damit erklären, dass es in diesem Jahr bis Ende Oktober sehr warm war und zu diesem Zeitpunkt folglich noch verstärkt Sonnenschutzmittel verwendet wurden. Infolge bereits verminderter biologischer und photolytischer Aktivität im Wasser dürfte es deshalb zu einem Anstieg der Konzentration gekommen sein. Allerdings fehlt ein direkter Vergleich zur Elbe aus diesem Monat, um diese Vermutung zu bestätigen.

Die enantioselektive Analyse von MBC im Ablauf des Klärwerks zeigte, dass beide Enantiomere präsent waren und das (-)-Enantiomer dabei in nur geringfügig höheren Konzentrationen enthalten war ( $EF = 0.47 \pm 0.01$ ). Diese Zusammensetzung ähnelt somit denen, die von Buser *et al.* in einigen Schweizer Klärwerksabläufen bestimmt wurden und deutet darauf hin, dass es keine besonders ausgeprägte Bevorzugung eines der Enantiomere gibt <sup>[106]</sup>. Eine Analyse der Enantiomeren in der Elbe war aufgrund der sehr geringen Konzentrationen nicht möglich. Die Analyse der OCR-Stereoisomeren war wegen der unvollständigen Trennung an Kromasil-CC ebenso wenig möglich.

## 4. Das Schicksal chiraler PPCP in der aquatischen Umwelt

Nachdem Einblicke in die Zusammensetzung der Enantiomeren der ausgesuchten PPCP in der Elbe und der Alster gewonnen werden konnten, stellte sich als nächstes die Frage nach den Transformationsprozessen, denen sie in den jeweiligen Gewässern unterliegen und die somit das weitere Schicksal der Verbindungen darstellen. Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, konnte in den untersuchten Oberflächengewässern in allen Fällen die Bevorzugung eines der beiden (bzw. vier) Stereoisomere beobachtet werden, so dass deshalb besonders die biotischen Vorgänge von Interesse waren. Im Wesentlichen sollten dabei zwei Aspekte verfolgt werden:

- Die enantioselektive Analyse der Mutterverbindungen
- Die Entstehung von Transformationsprodukten;  
es sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit ihre Bildung biotischer Natur ist, zudem sollte die Art ihres weiteren Abbaus näher beleuchtet werden. Bei diesen Untersuchungen galt das Augenmerk besonders den Metaboliten, die vom menschlichen Stoffwechsel bekannt sind.

Die Mineralisierung der Verbindungen, die ebenso durch mikrobielle Prozesse bedingt sein kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

### 4.1. Untersuchung der Transformationen

Um die Transformationen zu verfolgen, wurden Untersuchungen im Labor unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Im Folgenden wird kurz der prinzipielle Gang erörtert, in den jeweiligen Abschnitten sowie in Kap. 7 sind dann detailliertere Beschreibungen der Experimente zu den einzelnen Verbindungen zu finden. Es wurde natürliches Wasser von der Elbe bzw. von der Alster verwendet (in der Regel 5 L), welches entweder in klare oder braune Glasbinde gefüllt und mit den zu untersuchenden Verbindungen angereichert wurde. Um die Transformationen gut verfolgen zu können und um keine Beeinflussung durch die vorhandene Kontamination des Wassers mit den Verbindungen selbst zu riskieren, wurde eine Dotierung im mittleren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich gewählt. Die Ansätze wurden offen bei Raumtemperatur und unter Einwirkung von natürlichem Tageslicht stehen gelassen und mehrmals am Tag umgerührt, um eine Durchmischung und Luftzufuhr zu gewährleisten. Unmittelbar nach der Zugabe der Verbindungen und anschließend in definierten Zeitabständen wurden Aliquote entnommen und aufgearbeitet. Parallel dazu wurden undotierte Ansätze (Blanks) aufbewahrt und zu den entsprechenden Zeitpunkten jeweils ebenfalls mit aufgearbeitet.

## 4.2. Transformationen von Metoprolol

Metoprolol wurde in sieben verschiedenen Ansätzen in Wasser von der Elbe und von der Alster, sowohl im Winter als auch im Sommer, untersucht. Die Transformationen wurden dabei über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen verfolgt. Um möglichst die gleichen Einflüsse wie in der natürlichen Umgebung zu simulieren, wurden für die Versuche klare Glasgebinde verwendet, so dass auch Lichteinstrahlungen berücksichtigt wurden.

### 4.2.1. Enantioselektive Analyse von Metoprolol

In Abb. 58 ist die Zusammensetzung der Enantiomere von Metoprolol in angereichertem Wasser, das von der Elbe stammte, dargestellt. In allen Ansätzen war ein bevorzugter Abbau des zweit-eluierenden Enantiomers, der *R*-Form, zu beobachten (Tab. 17). Ein merklicher Unterschied in ihrer Zusammensetzung war dabei jeweils erst nach etwa 14 bis 20 Tagen feststellbar, wobei es allerdings keine Unterschiede zwischen dem Wasser, welches im Sommer bzw. im Winter genommen wurde, gab. In Abb. 59 sind zum Vergleich die

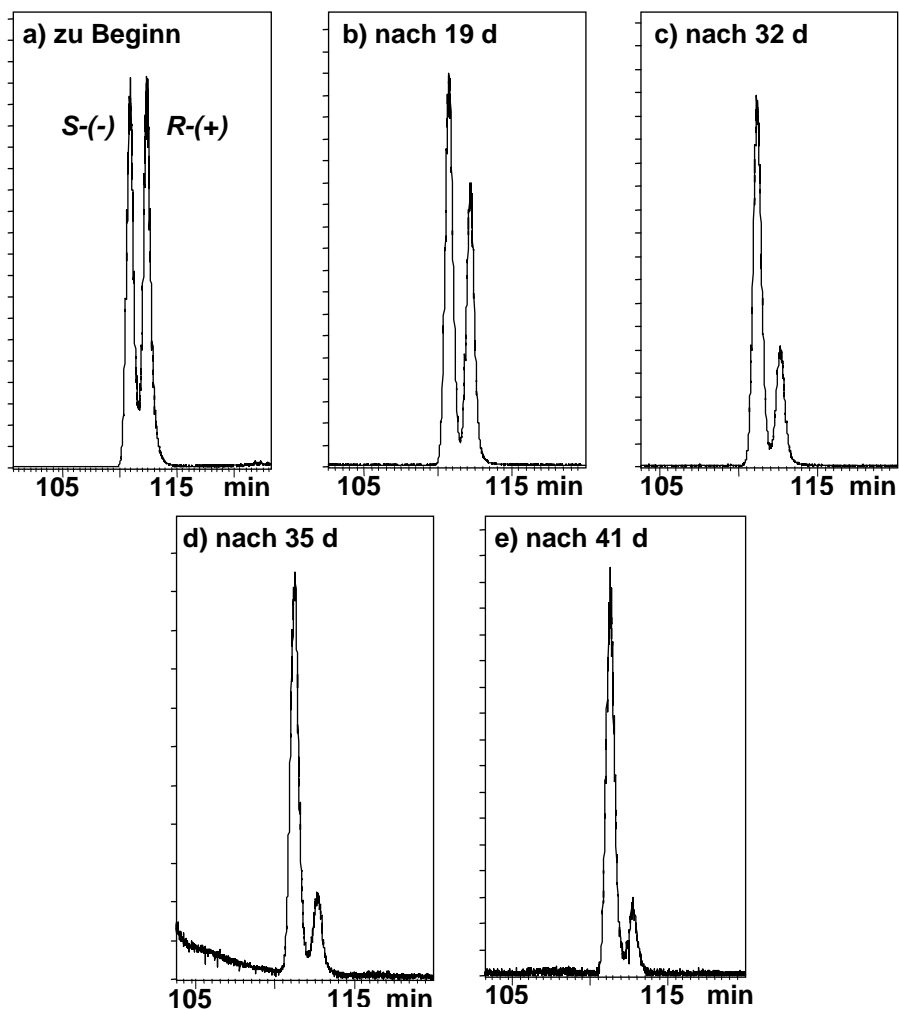


Abb. 58: Enantiomere von Metoprolol in dotiertem Elbe-Wasser

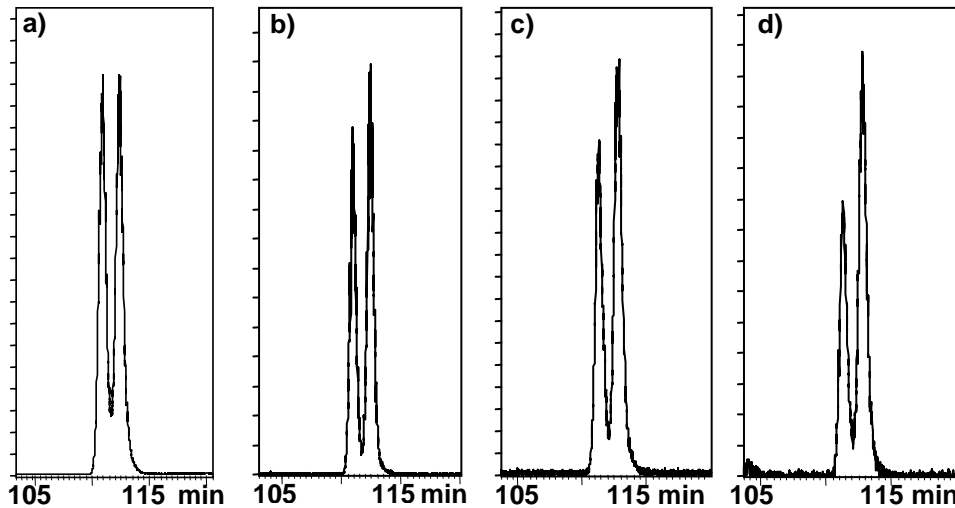


Abb. 59: Enantiomere von Metoprolol in angereichertem Wasser von der Alster (7. Ansatz): a) zu Beginn, b) nach 16 d, c) nach 21 d, d) nach 26 d

Tab. 17: Enantiomerenfraktionen von Metoprolol in angereichertem Oberflächenwasser ( $\sigma \pm 0.01$ , n. d. nicht mehr detektiert, \* Tag 21)

	Tag 8	Tag 16	Tag 19	Tag 26	Tag 32	Tag 35	Tag 41
<b>Elbe</b>							
(1) 15.02. - 25.03.08	0.50	-	0.40	-	-	< LOQ	n. d.
(2) 15.02. - 25.03.08	0.50	-	0.22	-	-	< LOQ	n. d.
(3) 30.06. - 09.08.08	-	-	0.41	-	0.25	0.19	0.16
(4) 30.06. - 09.08.08	-	-	0.50	-	0.48	0.36	0.29
(5) 13.11. - 15.12.08	0.50	0.49	0.49 *	0.43	0.44	-	-
<b>Alster</b>							
(6) 06.08. - 01.09.08	0.50	0.50	0.51 *	0.55	-	-	-
(7) 06.08. - 01.09.08	0.50	0.54	0.57 *	0.61	-	-	-

Enantiomerenzusammensetzungen von Metoprolol in angereichertem Wasser von der Alster dargestellt. Im Gegensatz zur Elbe war in diesen Fällen ein bevorzugter Abbau des ersteluirenden Enantiomers, der S-Form, beobachtbar (Tab. 17). Merkliehe Unterschiede waren dabei ebenfalls erst nach etwa 14 Tagen feststellbar. In allen Ansätzen der Elbe und Alster waren am Ende des untersuchten Zeitraums in der Regel nur noch sehr geringe Konzentrationen von Metoprolol nachweisbar.

Der bevorzugte Abbau des R-Enantiomers in der Elbe spiegelt sich in der Zusammensetzung, die in den nicht angereicherten Umweltproben bestimmt wurde (Kap. 3), wider. In der Alster hingegen war in den nicht angereicherten Umweltproben die Bevorzugung des S-Enantiomers nicht erkennbar. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin,

dass die kontinuierlichen Einträge von Metoprolol, das annähernd racemisch vorliegt, mit größerer Geschwindigkeit erfolgen als der enantioselektive Abbau der Verbindung in diesem Gewässer. Der Unterschied in den Enantioselektivitäten zwischen Elbe und Alster unterstreicht letztlich erneut die Existenz verschiedener mikrobieller Muster in beiden Gewässern.

#### 4.2.2. Identifizierung von Transformationsprodukten

Die Abb. 60 und 61 zeigen im Überblick, dass über einen Zeitraum von 40 Tagen in angereichertem Flusswasser sechs Transformationsprodukte von Metoprolol auftraten. Dazu gehörten einerseits die vom humanen Metabolismus bekannten Verbindungen MetoOH

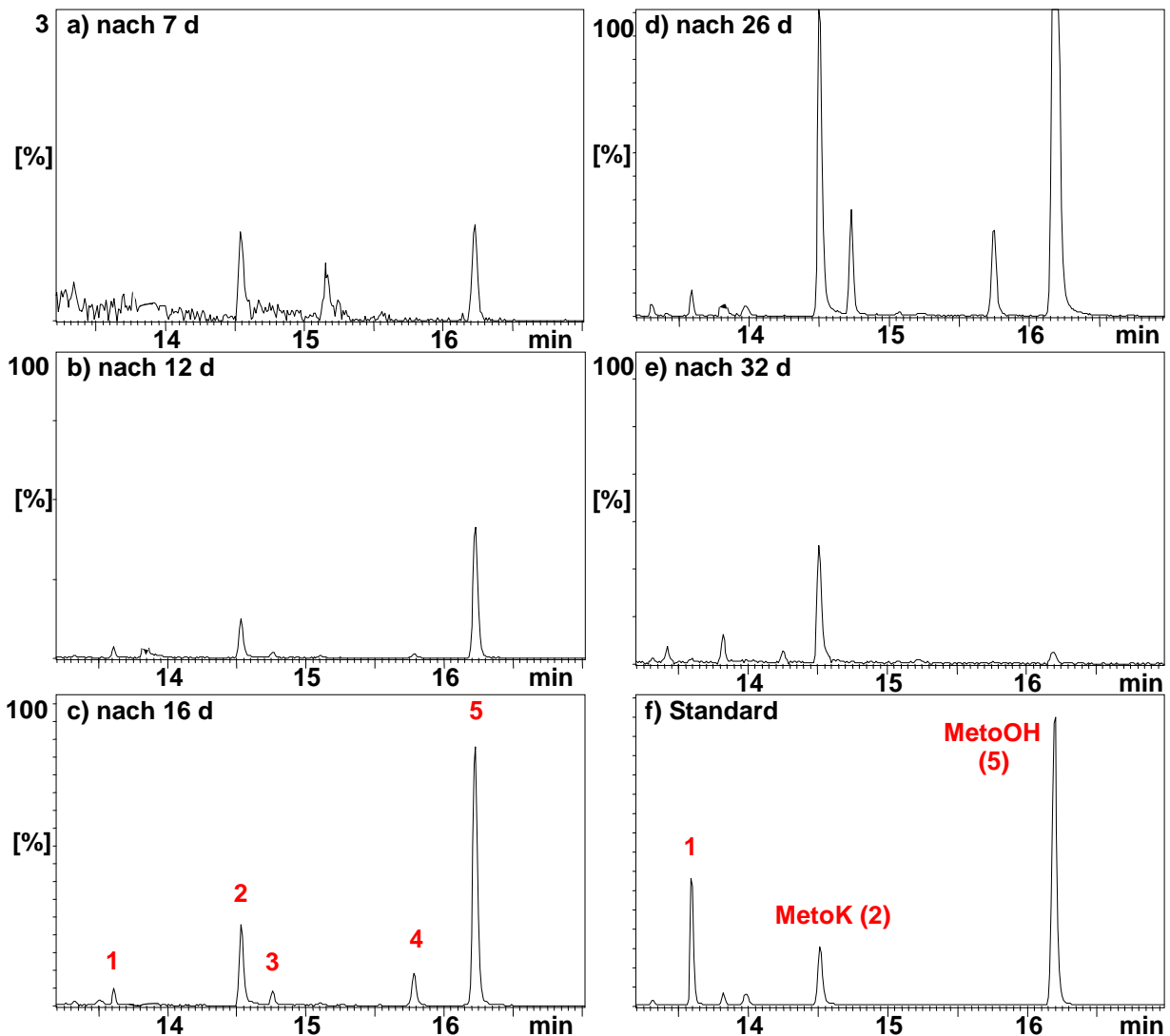
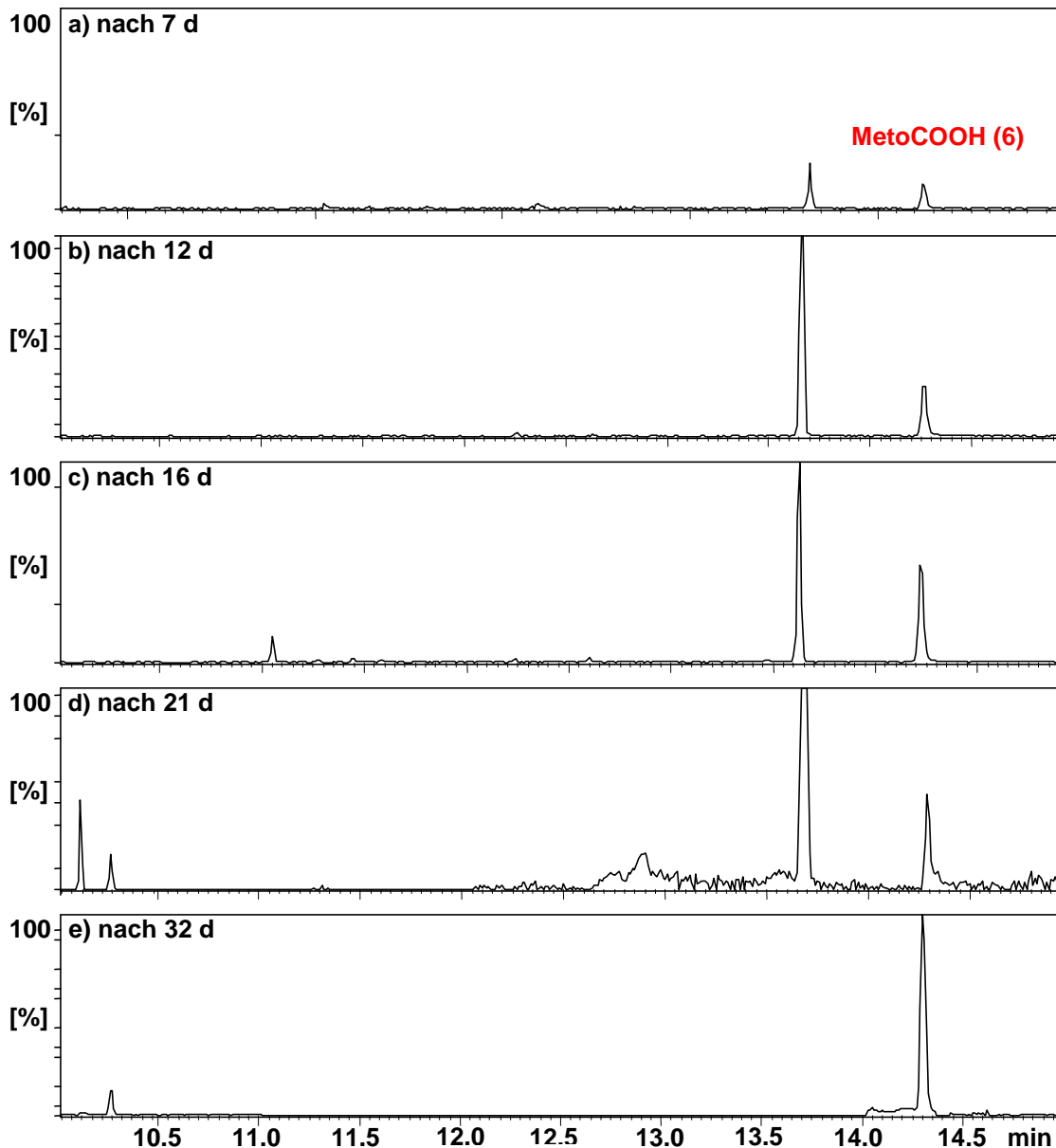


Abb. 60: Auftreten und Verschwinden von Transformationsprodukten von Metoprolol in angereichertem Elbe-Wasser (DMS-Derivate, Säule: VF5-ms, 30 m, Ionenspur 186, die Peakhöhen in a-e wurden relativ zu der Höhe des Volumenstandards korrigiert, die höchste Konzentration  $[c_{\max}]$  von MetoK wurde dabei gleich 100 % gesetzt, f:  $c_{1, 2, 5} = 100 \text{ ng/L}$ )



**Abb. 61: Bildung von MetoCOOH in dotiertem Wasser von der Elbe (Me-DMS-Derivat, Säule: VF-5ms, 30 m, die Peakhöhe von MetoCOOH wurde relativ zu der Höhe des Volumenstandards korrigiert, wobei  $c_{\max}$  [MetoCOOH] = 100 %)**

(Abb. 60, Nr. 5) und MetoCOOH (Abb. 61, Nr. 6) sowie das Transformationsprodukt MetoK (Abb. 60, Nr. 2). Die Bildung dieser drei Verbindungen war dabei schon nach wenigen Tagen sowohl in Wasser von der Elbe als auch von der Alster beobachtbar. Die Konzentrationen von MetoOH und MetoK erreichten in allen Elbe-Ansätzen zwischen 19 und 26 Tagen ein Maximum. Nach etwa 40 Tagen waren von beiden Verbindungen nur noch geringe Mengen nachweisbar. In den Alster-Ansätzen wurden die höchsten Konzentrationen nach etwa 16 Tagen festgestellt (Chromatogramme s. Anhang VI). MetoCOOH wurde deutlich langsamer gebildet, seine Konzentration nahm dabei bis zum Ende des Untersuchungszeitraums stetig zu. Ferner traten drei weitere Transformationsprodukte (Nr. 1, 3 und 4) auf, die in jedoch



vergleichsweise geringeren Konzentrationen gebildet wurden. Bedingt durch die DMS-Derivatisierung handelte es sich bei diesen Verbindungen ebenfalls um solche mit der 2-Propanolamin-Seitenkette. Die Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.6 min (Nr.1) besaß ein identisches Massenspektrum zu MetoK, so dass sie eine dazu isomere Struktur aufweisen sollte. Mit der Carbonylgruppe in  $\beta$ -Stellung der 1'-Seitenkette wurde sie als sog.  $\beta$ -Carbonyl-Metoprolol identifiziert und verifiziert (Abb. 63). Die anderen beiden Verbindungen (Nr. 3 und 4) mit Retentionszeiten von 14.7 und 15.7 min wiesen zueinander auch identische Massenspektren auf (Abb. 62). Die Verbindung Nr. 4 wurde dabei als Desmethyl-Metoprolol (DMMeto) identifiziert, dessen Struktur durch Darstellung der Referenzverbindung ebenfalls verifiziert wurde (Abb. 63). Desmethyl-Metoprolol ist vom humanen Metabolismus bekannt, in welchem es die Vorstufe des Hauptmetaboliten Metoprolol-Säure darstellt<sup>[52]</sup>. Aufgrund des identischen Massenspektrums kam für die Verbindung Nr. 3 eine Struktur in Frage, bei der

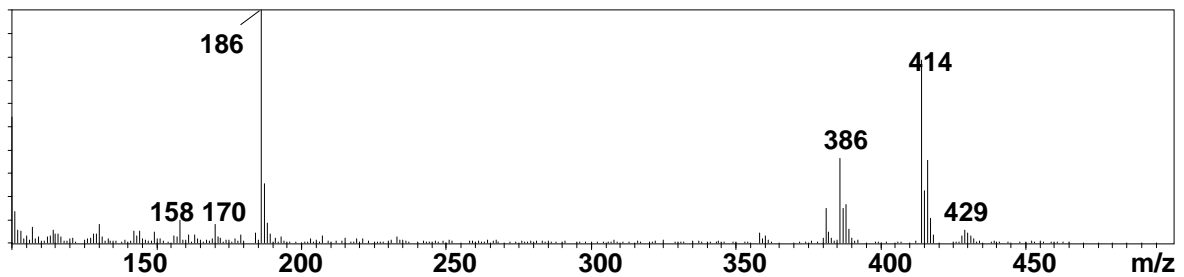
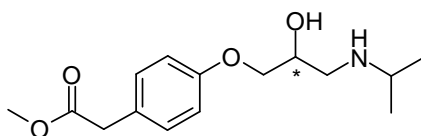
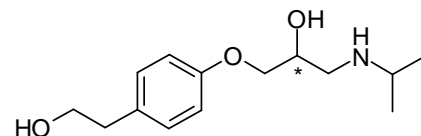


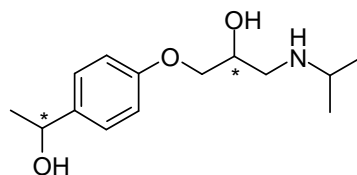
Abb. 62: EI-Massenspektrum der Verbindungen 3 und 4



$\beta$ -Carbonyl-Metoprolol (1)



Desmethyl-Metoprolol (4)  
(DMMeto)



Transformationsprodukt Nr. 3

Abb. 63: Strukturen der Transformationsprodukte 1 und 4 sowie die mögliche Struktur der Verbindung 3

sich die Hydroxygruppe der 1'-Seitenkette in  $\alpha$ -Stellung befindet (Abb. 63), was allerdings nicht weiter verifiziert wurde.  $\beta$ -Carbonyl-Metoprolol und die Verbindung Nr. 3 treten im Gegensatz zu DMMeto nicht im menschlichen oder tierischen Metabolismus auf. Alle drei Verbindungen erreichten in beiden Arten von Gewässern ein Konzentrationsmaximum in etwa dem gleichen Zeitraum wie MetoK und MetoOH (zwischen 16 und 26 Tagen) und waren am Ende des Untersuchungszeitraums nicht mehr nachweisbar.

Aufgrund des relativ gleichzeitigen Auftretens aller Transformationsprodukte lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob einige der Verbindungen nur Zwischenprodukte darstellen, die weiter umgewandelt werden. So ist z. B. die Bildung von MetoCOOH durch Oxidation von DMMeto oder durch Hydrolyse von  $\beta$ -Carbonyl-Metoprolol denkbar. Die Konzentration von MetoCOOH erreichte erst später ein Maximum als die der beiden erstgenannten Verbindungen, was diese Vermutung unterstützt. Die Bildung von MetoK ist hingegen wahrscheinlich keine Folge einer Oxidation von MetoOH, beide Verbindungen werden vielmehr unabhängig voneinander durch Oxidation der Mutterverbindung gebildet (Abb. 64). Darauf deutet der Befund hin, dass beide Verbindungen zu Beginn der Untersuchungen gleichermaßen auftraten (Alsteransätze s. Anhang IIX). Das Transformationsprodukt Nr. 3 ist vermutlich ein Folgeprodukt von MetoOH, indem dessen Methoxygruppe abgespalten wird.

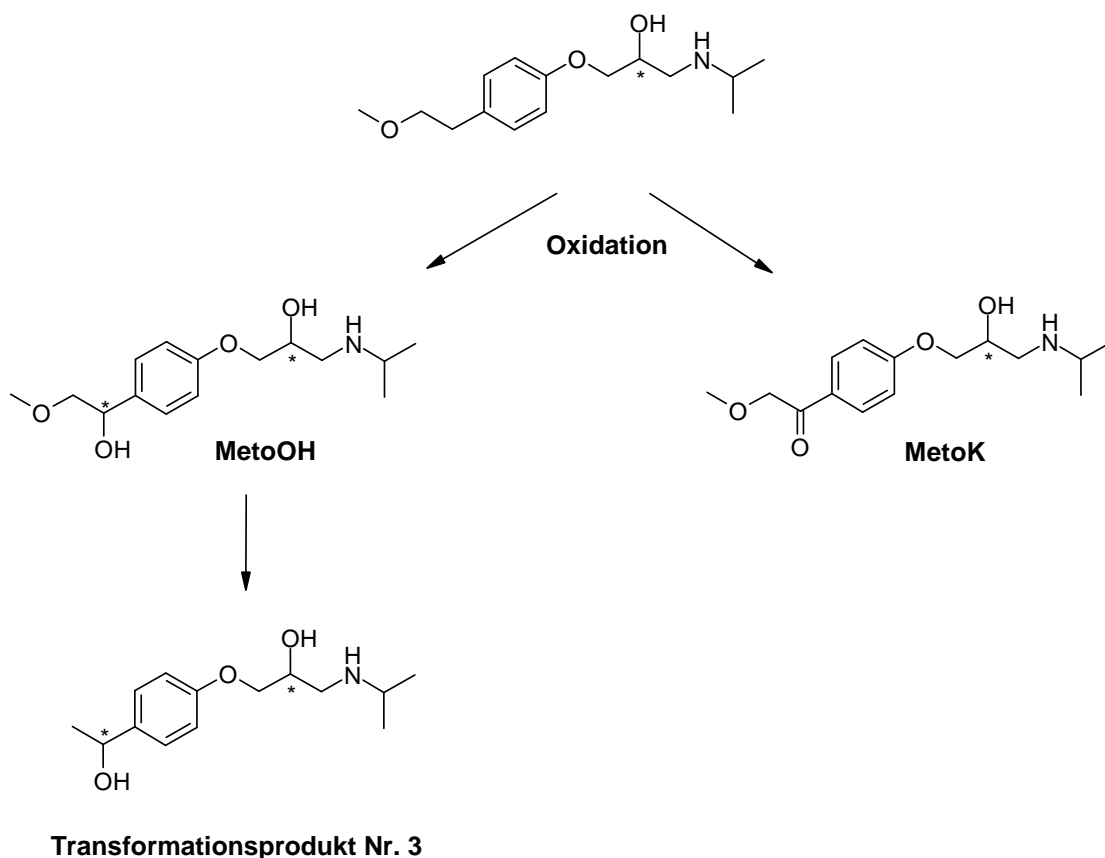


Abb. 64: Bildung von MetoK und MetoOH in der Umwelt

Zu den Zeitpunkten als die Transformationsprodukte in den verschiedenen Ansätzen maximale Konzentrationen aufwiesen, bewegten sich diese von MetoK, MetoOH und MetoCOOH im unteren µg/L-Bereich (Tab. 18). Verglichen mit der eingesetzten Konzentration von Metoprolol ist das lediglich ein Prozentsatz in einer Größenordnung von etwa 4 %. Neben der Bildung der Transformationsprodukte muss zwar auch ihr Abbau berücksichtigt werden, der parallel abzulaufen beginnt, so dass dieser Prozentsatz insgesamt noch etwas größer sein dürfte. Das zeigt aber deutlich, dass die Bildung dieser Transformationsprodukte nicht die Haupteliminierung von Metoprolol unter den herrschenden Bedingungen darstellt und Mineralisierung wahrscheinlich eine beträchtliche Rolle spielt. Das Auftreten weiterer Transformationsprodukte, vor allem solcher, die eine Veränderung an der 2'-Seitenkette aufweisen, wurde nicht weiter untersucht, da dafür die Analyse mittels GC-MS nicht die geeignete Methode war.

**Tab. 18: Abgeschätzte Konzentrationen der Haupttransformationsprodukte von Metoprolol (5. Ansatz, Dotierungslevel [Meto]: 500 µg/L, \* nach 26 d, \*\* nach 32 d, \*\*\* mindeste Konzentration, da WfR nicht bestimmt wurde)**

<b>MetoK *</b>	<b>MetoOH *</b>	<b>MetoCOOH **</b>
4.4 µg/L	1.2 µg/L	≥ 11.0 µg/L ***

### 4.2.3. Enantioselektive Analyse der Transformationsprodukte von Metoprolol

Um zu klären, ob das Auftreten und der Abbau der Transformationsprodukte durch biotische oder abiotische Prozesse bedingt sind, wurden ihre jeweiligen Enantiomere untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der enantioselektiven Analyse von MetoK, MetoOH und MetoCOOH in den angereicherten Proben vorgestellt.

In Tab. 19 sind zunächst die EF-Werte von MetoK aus verschiedenen Ansätzen wiedergegeben. Ergänzend dazu ist dargestellt, ob die Konzentration der Verbindung als solches in dem untersuchten Zeitraum zunahm bzw. abnahm. In den Elbe-Ansätzen war ein Trend zu größer werdenden Enantiomerenfraktionen beobachtbar, die mit Werten von 0.61 bzw. 0.55-0.56 nach 32 bis 35 Tagen einen Überschuss des erst-eluierenden Enantiomers andeuteten. Im fünften Ansatz wurden zu Beginn der Untersuchungen (nach 7 Tagen) dabei racemische Zusammensetzungen gefunden. Im dritten Ansatz wurde die Zusammensetzung erstmalig nach 19 Tagen analysiert, der EF-Wert von 0.52 zu diesem Zeitpunkt lässt aber vermuten, dass vorher ebenfalls racemische Verhältnisse herrschten. Im Wasser der Alster wurde hingegen der umgekehrte Trend festgestellt. Hier deuteten EF-Werte von 0.78 und 0.69 nach nur 16 Tagen einen großen Überschuss des erst-eluierenden Enantiomers an. Innerhalb von 11 Tagen sanken die Werte dann auf 0.44 bzw. 0.64.

Die racemischen Zusammensetzungen von MetoK in der Elbe zu Beginn ihres Auftretens spiegeln die Zusammensetzung der Mutterverbindung zu diesem Zeitpunkt wider, so dass eine abiotische Bildung nicht ausgeschlossen werden kann. Die größer werdenden Werte mit zunehmender Verweildauer im Wasser lassen sich mit einem beginnenden Abbau der Verbindung erklären, bei dem das zweit-eluierende Enantiomer bevorzugt ist. Dies wird vor allem im dritten Ansatz deutlich, bei dem die Konzentration von MetoK zwischen dem 19. und dem 35. Tag signifikant abnahm. Im fünften Ansatz war bereits nach 16 Tagen eine

**Tab 19: Enantiomerenfraktionen von MetoK in verschiedenen Ansätzen (die Werte beziehen sich auf das erst-eluierende Enantiomer,  $\sigma \pm 0.02$ , \* Tag 19, \*\* Tag 5, grüne Felder: Konzentrationszunahme gegenüber vorherigem Extraktionstag, gelbe Felder: Konzentrationsabnahme gegenüber vorherigem Extraktionstag, n. d. nicht detektiert)**

	Tag 7	Tag 12	Tag 16	Tag 21	Tag 26	Tag 32	Tag 35
<b>Elbe</b>							
(3) 30.06. - 09.08.08	-	-	-	0.52 *	-	0.56	0.55
(5) 13.11. - 15.12.08	0.50	0.50	0.53	-	0.58	0.61	-
<b>Alster</b>							
(6) 06.08. - 01.09.08	n. d. **	-	0.78	0.66	0.44	-	-
(7) 06.08. - 01.09.08	n. d. **	-	0.69	0.64	0.64	-	-

Zunahme der EF-Werte feststellbar; da zu diesem Zeitpunkt die Konzentration von MetoK insgesamt noch sehr stark zunahm, zeigt dies zudem, dass Bildung und Abbau von MetoK wahrscheinlich gleichzeitig ablaufen. Dass in diesem Fall die größer werdenden EF-Werte eine Folge der bereits unterschiedlichen Konzentrationen der Enantiomere der Mutterverbindung zu diesem Zeitpunkt sind, kann ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 17). Ein Vergleich der EF-Werte von Metoprolol und MetoK zwischen dem 16. und dem 26. Tag zeigt nämlich, dass der Konzentrationsunterschied der Metoprolol-Enantiomeren erst weniger ausgeprägt ist als der der Enantiomeren von MetoK.

Der große Überschuss des erst-eluierenden Enantiomers im Wasser der Alster relativ zu Beginn zeigt, dass die Bildung von MetoK in diesem Fall eindeutig biotisch bedingt ist. Da die Konzentration von MetoK insgesamt nach 16 Tagen in beiden Ansätzen, verglichen zu der der Mutterverbindung, erst minimal war ( $< 1\%$ ), hat dies auf die EF-Werte von Metoprolol kaum einen Einfluss. Dessen Verhältnisse im ersten Alsterwasser-Ansatz sind zu diesem Zeitpunkt nämlich noch racemisch (vgl. Tab. 17). Mit abnehmender Konzentration von MetoK ab dem 16. Tag wurden kleiner werdende EF-Werte beobachtet. Das deutet eine Verringerung des erst-eluierenden Enantiomers an, bedingt dadurch, dass dieses verstärkt abgebaut wurde. In der Alster ist somit eine Bevorzugung des erst-eluierenden Enantiomers bezüglich seiner Bildung als auch seines Abbaus feststellbar.

In Tab. 20 sind die Enantiomerenfraktionen der beiden Enantiomerenpaare von MetoOH beispielhaft vom 5. Elbewasser-Ansatz wiedergegeben. Abb. 65 zeigt ergänzend dazu die relativen Anteile der vier Stereoisomeren von MetoOH in graphischer Form. Im Zeitraum von 32 Tagen waren deutliche Unterschiede zwischen den vier Stereoisomeren feststellbar. So war das erste Enantiomer ( $1'S2R$ ) am stärksten präsent und das entsprechende Diastereomer mit der *R*-Konfiguration in der 1'-Kette war am wenigsten vorhanden. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Isomeren wurden dabei mit fortschreitender Verweildauer im Wasser bis zum 26. Tag ausgeprägter. Des Weiteren verringerte sich der Überschuss des erst-eluierenden Enantiomers, bedingt durch eine Annäherung der

**Tab. 20: Enantiomerenfraktionen von MetoOH in angereichertem Wasser der Elbe (5. Ansatz,  $\sigma \pm 0.02$ , grüne Felder: Konzentrationszunahme gegenüber vorherigem Extraktionstag, gelbe Felder: Konzentrationsabnahme gegenüber vorherigem Extraktionstag)**

	EF <sub>(E1, E2)</sub>	EF <sub>(E3, E4)</sub>
nach 7 Tagen	0.60	0.43
nach 16 Tagen	0.55	0.36
nach 26 Tagen	0.56	0.37
nach 32 Tagen	0.52	0.40

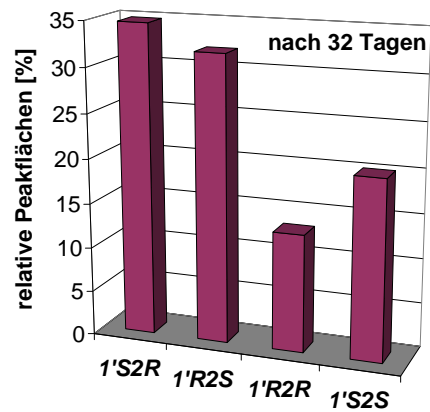
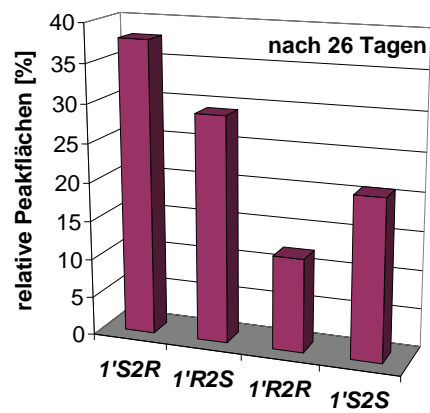
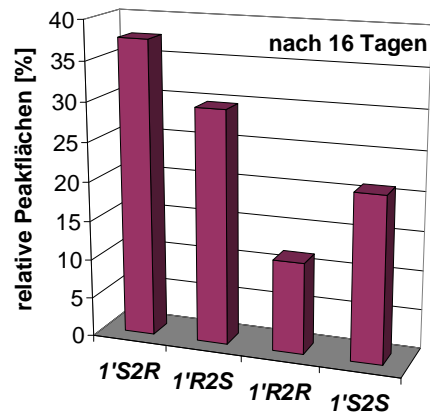
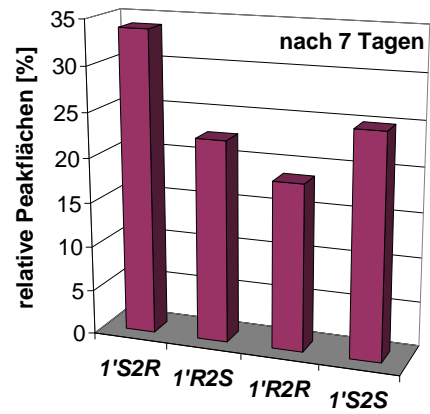


Abb. 65: Relative Anteile der Stereoisomeren von MetoOH in angereichertem Wasser der Elbe (5. Ansatz)

Konzentrationen der ersten beiden Enantiomeren ( $1'S2R$  und  $1'R2S$ ). Zu Beginn wurde für dieses Paar noch ein EF-Wert von 0.60 ermittelt, nach 32 Tagen lag dieser bei 0.52, was auf ein nur noch geringfügig stärkeres Vorhandensein des ersteren hindeutete. Für das zweite Enantiomerenpaar war über den ganzen Zeitraum zunächst eine Abnahme der EF-Werte, zwischen 26 und 32 Tagen dann jedoch wieder eine leichte Zunahme beobachtbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass MetoOH eindeutig durch biotische Prozesse gebildet wird, wobei die  $1'S2R$ -Konfiguration bevorzugt ist. Die Tatsache, dass sich die Konzentrationen der beiden ersten Enantiomere annäherten, lässt ferner darauf schließen, dass möglicherweise die Racemisierung dieses Paares erfolgt. Berücksichtigt man einen solchen Aspekt, kann man bezüglich der Entstehung des zweiten stereogenen Zentrums in der  $1'$ -Seitenkette sagen, dass, anders als im humanen Metabolismus, die S-Konfiguration dabei bevorzugt ist (vgl. Tag 7). Zwischen dem 26. und dem 32. Tag nahm die Konzentration von MetoOH insgesamt stark ab, es war aber keine signifikante Veränderung in der Zusammensetzung der vier Stereoisomeren zu beobachten, so dass für den Abbau der Verbindung auch abiotische Prozesse verantwortlich sein könnten.

In Abb. 66 sind die Enantiomere von MetoCOOH in dotiertem Wasser der Elbe an verschiedenen Tagen dargestellt. Zu Beginn lag die Verbindung noch racemisch vor, mit zunehmender Verweildauer war dann ein Trend zu leicht höheren Konzentrationen des erst-eluierenden Enantiomers, der S(-)-Form, beobachtbar. Im Zeitraum zwischen 21 und 32 Tagen waren dabei EF-Werte von 0.45-0.46 feststellbar. Die racemischen Verhältnisse zu Beginn zeigen, dass die Bildung von MetoCOOH folglich ohne stereoselektive Vorzüge verläuft, so dass ein abiotischer Vorgang nicht ausgeschlossen werden kann. Für die kleiner werdenden EF-Werte kommen in diesem Fall zwei Möglichkeiten in Betracht. Sie können

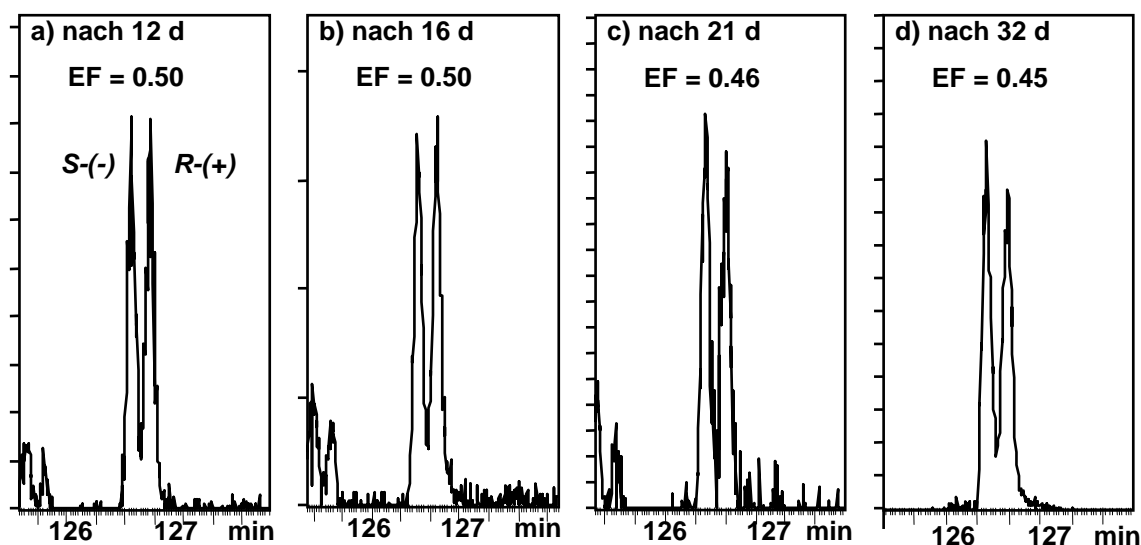


Abb. 66: Enantiomere von MetoCOOH in angereichertem Wasser der Elbe (5. Ansatz) mit Angabe der Enantiomerenfraktionen ( $\sigma \pm 0.01$ )

einerseits eine Folge der Konzentrationsunterschiede der Mutterverbindung sein, denn die EF-Werte von Metoprolol sind vergleichbar an den untersuchten Tagen (vgl. Tab. 17). Die Zunahme der Konzentration von MetoCOOH über den ganzen Zeitraum unterstreicht diese Möglichkeit dabei (vgl. Abb. 61). Als zweite Möglichkeit kommt in Betracht, dass ein beginnender Abbau von MetoCOOH einsetzt, bei dem das zweit-eluierende Enantiomer bevorzugt ist. Das würde auf die gleiche Präferenz wie bei der Mutterverbindung hindeuten. Für eine Bildung von MetoCOOH aus  $\beta$ -Carbonyl-Metoprolol gibt es hingegen keine deutlichen Anzeichen, wenn man dessen EF-Werte über den untersuchten Zeitraum betrachtet (Abb. 67). Nach anfangs racemischen Verhältnissen war nach 21 Tagen nämlich eine leichte Zunahme der Werte zu beobachten. Das erst-eluierende S-Enantiomer wurde mit fortschreitender Zeit folglich geringfügig stärker umgewandelt, was eher dafür spricht, dass die Verbindung ihrerseits anderen Transformationen unterliegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der humane Metabolit MetoOH auch als mikrobieller Metabolit betrachtet werden muss, denn seine Bildung geht in der Elbe eindeutig auf biotische Prozesse zurück. Für MetoCOOH kann hingegen nicht deutlich gesagt werden, durch welche Vorgänge seine Bildung in der Umwelt bedingt ist. Das Transformationsprodukt MetoK ist ebenfalls ein mikrobielles Transformationsprodukt, wie es die Ergebnisse der Alsterwasser-Experimente zeigen. Ob es in der Elbe auch durch biotische Prozesse gebildet wird, ist jedoch nicht eindeutig.

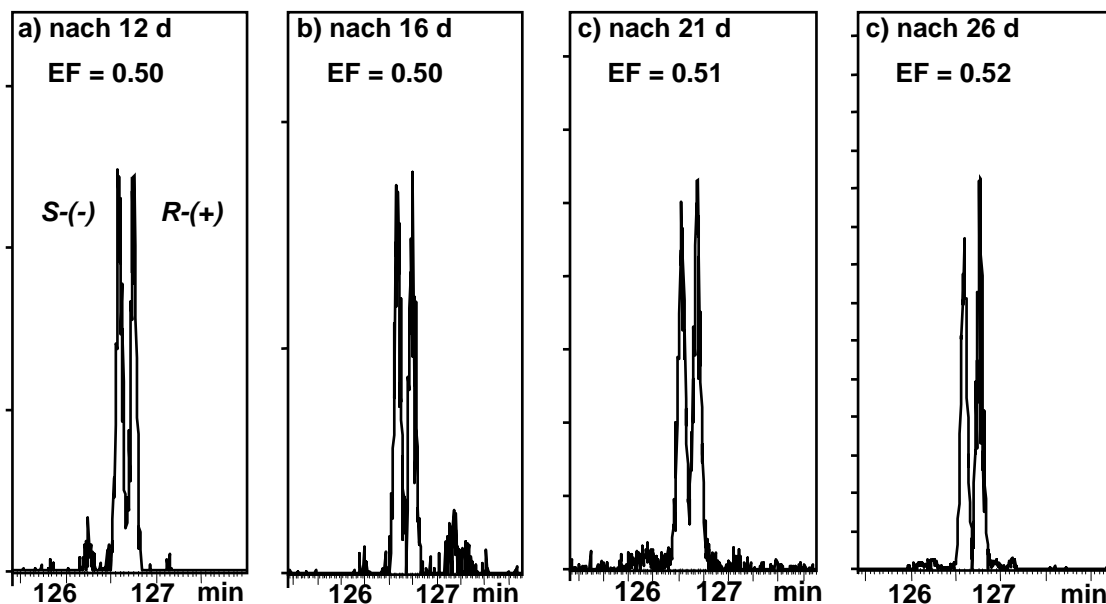


Abb. 67: Enantiomere von  $\beta$ -Carbonyl-Metoprolol\* in angereichertem Wasser der Elbe (5. Ansatz) mit Angabe der Enantiomerenfraktionen ( $\sigma \pm 0.01$ , \* als DMS-Derivat [chirale Phase und chromatographische Bedingungen sind analog denen von MetoCOOH])



### 4.3. Transformationen von Propranolol

#### 4.3.1. Enantioselektive Analyse von Propranolol

Die Transformationen von Propranolol wurden in fünf verschiedenen Ansätzen in Wasser der Elbe untersucht. Der Untersuchungszeitraum sowie die Versuchsbedingungen waren analog denen von Metoprolol (s. Abschn. 4.2.). Zwei der Ansätze wurden im Sommer, die übrigen im Zeitraum zwischen Dezember bis März durchgeführt. In einem Fall wurde für die Untersuchungen enantiomerenreines S(-)-Propranolol verwendet.

Die Abb. 68 und 69 zeigen die Enantiomere von Propranolol zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dotierung in Ansätzen aus der kälteren Jahreszeit sowie aus dem Sommer. In Tab. 21 sind ergänzend die Enantiomerenfraktionen aus allen Ansätzen wiedergegeben. In den Untersuchungen, die während der kälteren Monate durchgeführt wurden, war ein bevorzugter Abbau des zweit-eluierenden Stereoisomers, des R-Enantiomers, zu beobachten. Dieser setzte dabei merklich nach etwa 2 Wochen ein. Nach etwa 40-42 Tagen waren von der R-Form nur noch geringe Mengen vorhanden. So wurde beispielsweise im fünften Ansatz am Ende des Untersuchungszeitraumes ein EF-Wert von 0.06 bestimmt, was die fast alleinige Anwesenheit des S-Enantiomers anzeigt. Im Juli wurde hingegen das erst-eluierende Enantiomer bevorzugt abgebaut bzw. umgewandelt. Nach 19 Tagen wurde z. B. ein EF-Wert von 0.58 bestimmt, der einen knapp anderthalbfachen Überschuss des zweiten Enantiomers impliziert. Dieser Überschuss vergrößerte sich weiter, so war nach 42 Tagen ein EF-Wert von 0.65 feststellbar. Die Abnahme des erst-eluierenden Enantiomers war in dem Fall nicht so ausgeprägt wie die des zweit-eluierenden in den kälteren Monaten. Im 3. Ansatz, welcher nur mit dem S-Enantiomer angereichert wurde, war dieses über den ganzen Zeitraum ausschließlich nachweisbar (EF = 0). In allen fünf

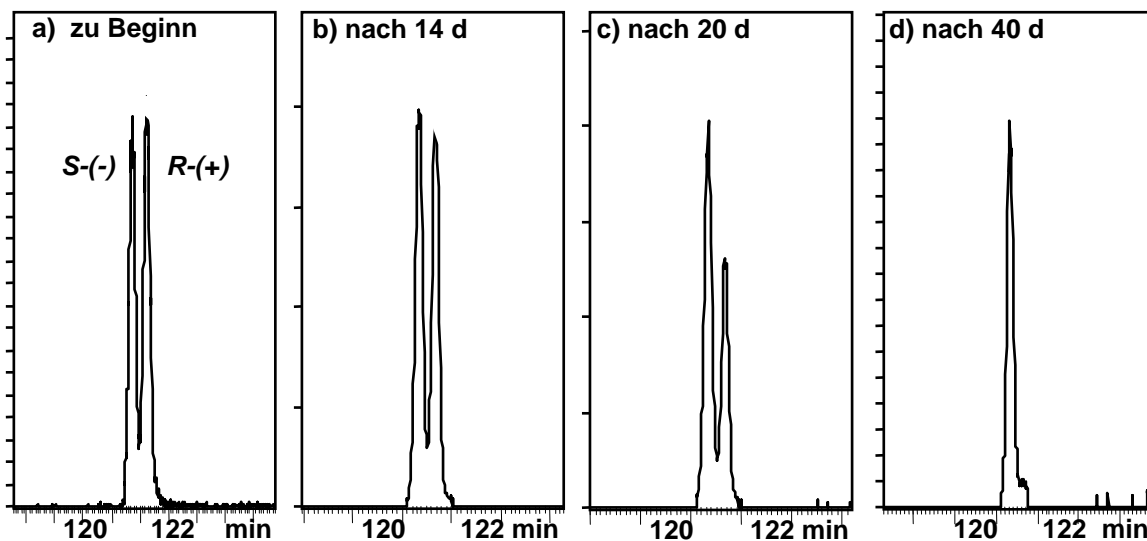


Abb. 68: Enantiomere von Propranolol in angereichertem Wasser der Elbe im November (5. Ansatz)

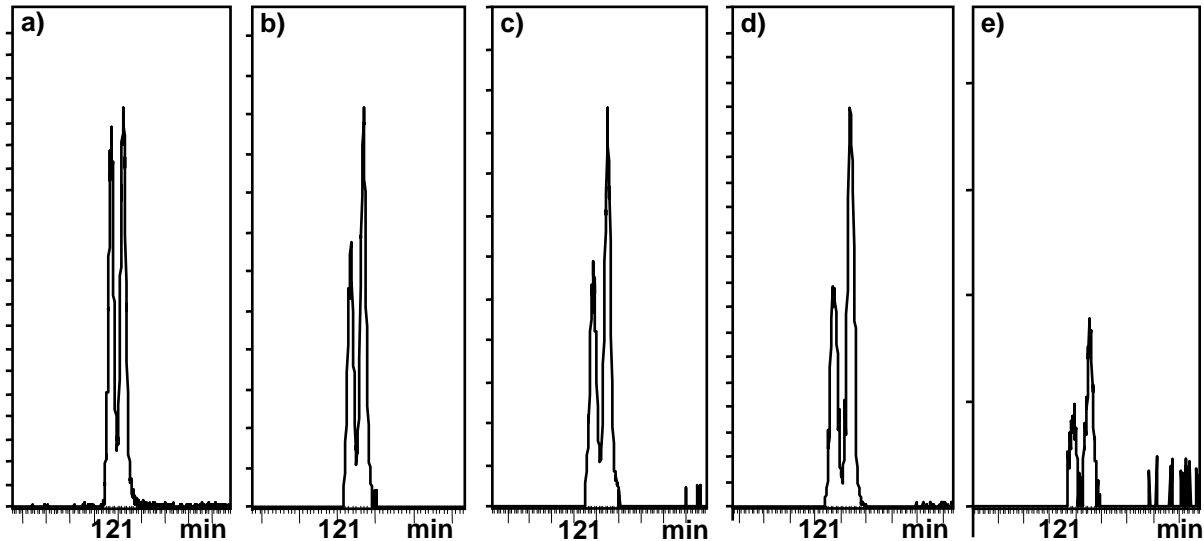


Abb. 69: Enantiomere von Propranolol in angereichertem Wasser der Elbe im Juli (4. Ansatz): a) zu Beginn, b) nach 19 d, c) nach 31 d, d) nach 36 d, e) nach 42 d

Tab. 21: Enantiomerenfraktionen von Propranolol in verschiedenen Ansätzen angereicherten Wassers der Elbe ( $\sigma \pm 0.01$ , <sup>a</sup> nur S-Prop, \* Tag 34, \*\* Tag 7, \*\*\* Tag 20)

	Tag 9	Tag 14	Tag 19	Tag 31	Tag 36	Tag 40	Tag 42
(1) 15.02. - 26.03.08	0.50	-	0.46	-	0.27 *	-	
(2) 15.02. - 26.03.08	0.50	-	0.46	-	0.30 *	-	
(3) 30.06. - 08.08.08 <sup>a</sup>	-	-	0	0	0	0	-
(4) 30.06. - 10.08.08	-	-	0.58	0.57	0.61	-	0.65
(5) 26.11. - 29.12.08	0.50 **	0.47	0.38 ***	-	-	0.06	-

Ansätzen waren am Ende des Untersuchungszeitraumes von etwa 42 Tagen, wie im Falle des Metoprolol, nur noch geringe Konzentrationen von Propranolol vorhanden.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der Elbe je nach Jahreszeit unterschiedliche biotische Vorgänge ablaufen, die durch verschieden aktive mikrobielle Fauna verursacht werden dürften. Die Abnahme des S-Enantiomers von Propranolol während der Sommermonate ist in Einklang mit den Befunden der nicht-angereicherten Umweltproben der Elbe (Kap. 3), in denen EF-Werte  $> 0.5$  bestimmt wurden. Die alleinige Anwesenheit des S-Enantiomers über den gesamten untersuchten Zeitraum im dritten Ansatz zeigt zudem, dass dieses nicht in seinen Antipoden umgewandelt wird (Enantiomerisierung) und für die beobachtete Abnahme somit dessen Abbau oder eine sonstige Umwandlung zu Transformationsprodukten verantwortlich ist. Ein entsprechender Vergleich von Propranolol in nicht angereicherten Proben vom Herbst oder Winter fehlt, da die Verbindung in keiner dieser Umweltproben mehr nachgewiesen werden konnte.

### 4.3.2. Identifizierung von Transformationsprodukten

Das Augenmerk der Untersuchungen von Propranolol lag auf den beiden Hauptmetaboliten NLA und OHPL. OHPL konnte in keinem Ansatz nachgewiesen werden, was angesichts der unzufriedenstellenden Ergebnisse für dessen Wiederfindungsraten aber nicht unerwartet war. NLA wurde in allen Ansätzen nachgewiesen (Abb. 70). Seine Bildung setzte bereits nach wenigen Tagen ein und maximale Konzentrationen wurden zwischen 14 und 21 Tagen beobachtet. Bis zum Ende des untersuchten Zeitraumes fiel diese dann rasch ab, so dass am Ende nur noch geringe Mengen nachweisbar waren. In dem Zeitraum, als die Konzentration von NLA am größten war, bewegte sich diese im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich, was verglichen mit der anfänglichen Dotierung von Propranolol etwa nur ca. 2 % sind. Des Weiteren trat in allen Ansätzen über die gesamte Zeit von rund 40 Tagen eine Verbindung auf, die ebenfalls eine Säurefunktion aufweisen musste, da sie wie NLA durch die Methylierungs-Derivatisierung erfasst wurde (Abb. 71). Die höchste Konzentration wurde dabei erst etwas später nach etwa 31 Tagen erreicht. In Abb. 72 ist das Massenspektrum dieser Verbindung dargestellt. Ein dazu identisches Massenspektrum besitzt (2-Naphthoxy)-essigsäure (als Methylester), wie der Vergleich mit einer Spektren-Bibliothek zeigte. Im humanen und tierischen Metabolismus tritt das entsprechende 1-Isomer auf, welches ein Folgemetabolit von NLA ist <sup>[134]</sup>. Ein Referenzspektrum dieses Methylesters existiert dazu in der Litera-

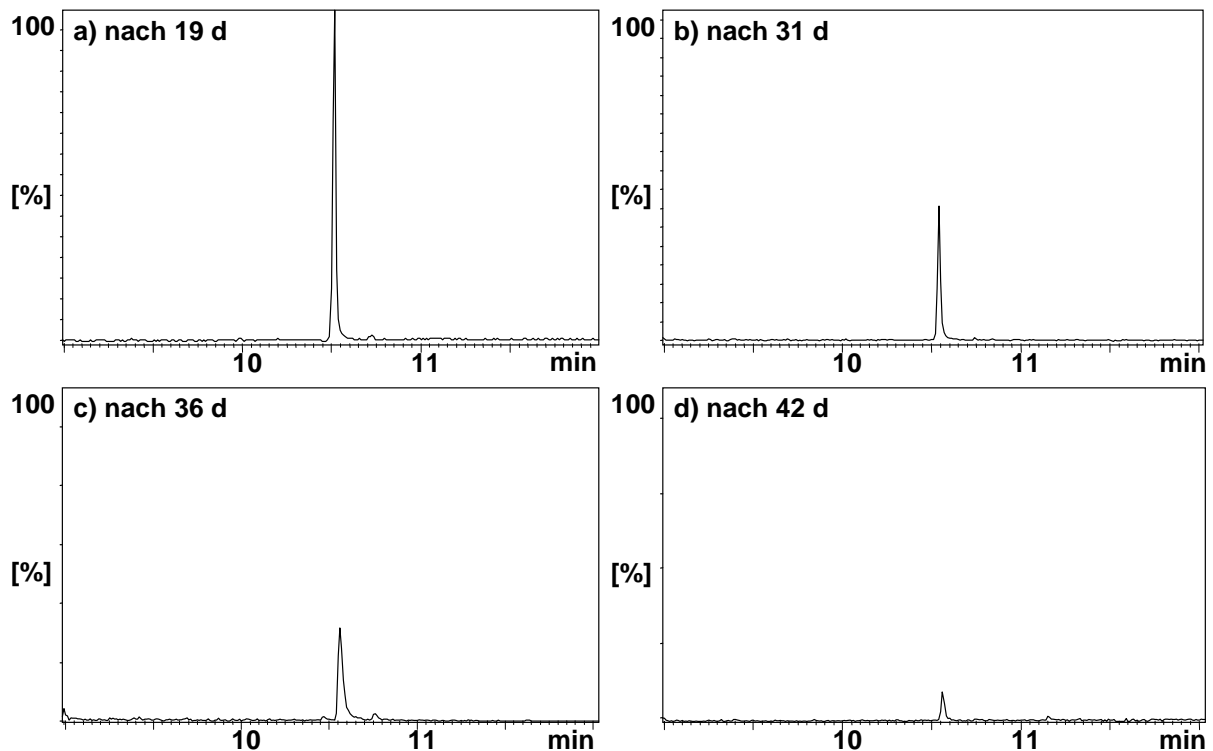


Abb. 70: Bildung von NLA in angereichertem Elbe-Wasser (3. Ansatz, als MCM-Derivat, Säule: VF-5ms, 15 m, Ionenspur: 161, die Peakhöhen wurden relativ zu der des Volumenstandards korrigiert, wobei  $c_{\text{max}} [\text{NLA}] = 100 \%$ )

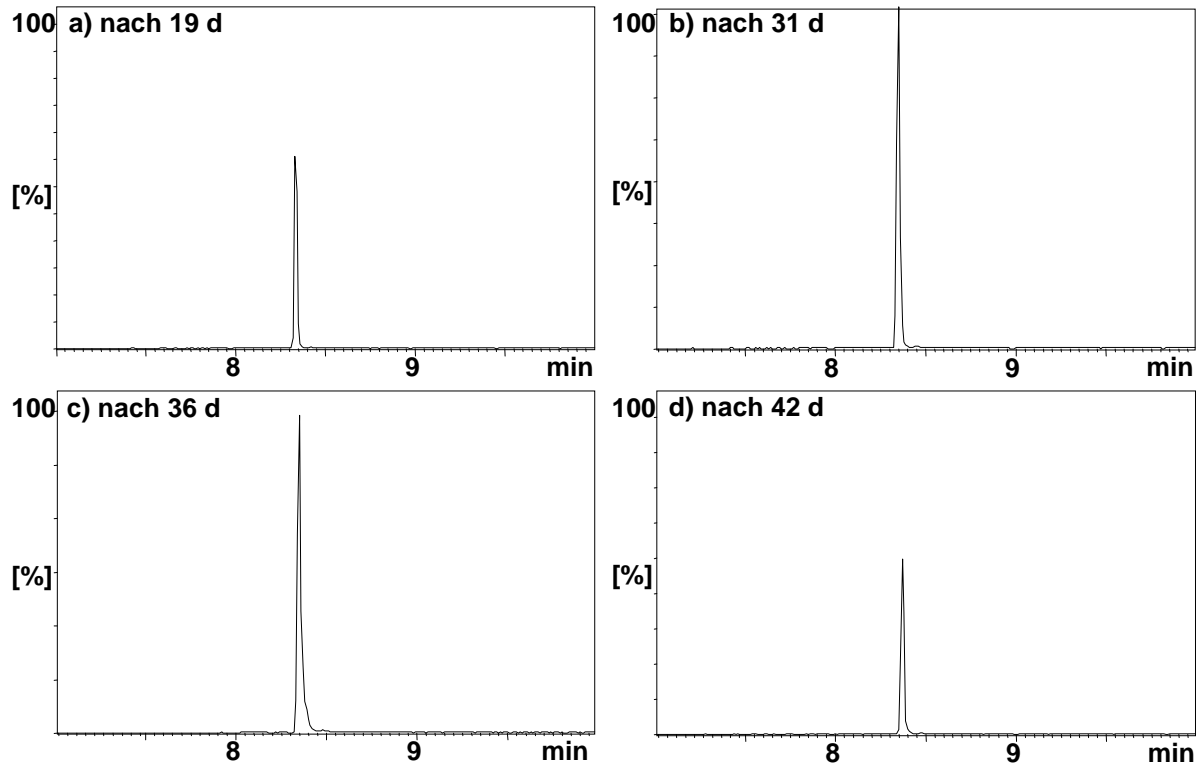


Abb. 71: Auftreten eines weiteren Transformationsprodukts in angereichertem Wasser der Elbe (3. Ansatz, derivatisiert mit MCM, Säule: VF-5ms, 15 m, Ionenspur: 216, die Peakhöhen wurden relativ zu der des Volumenstandards korrigiert, wobei  $c_{\max} = 100 \%$ )

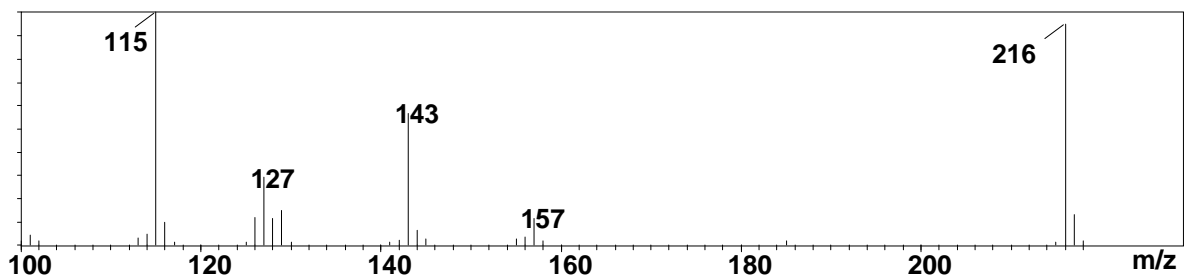


Abb. 72: EI-Massenspektrum des Transformationsproduktes bei 8.3 min

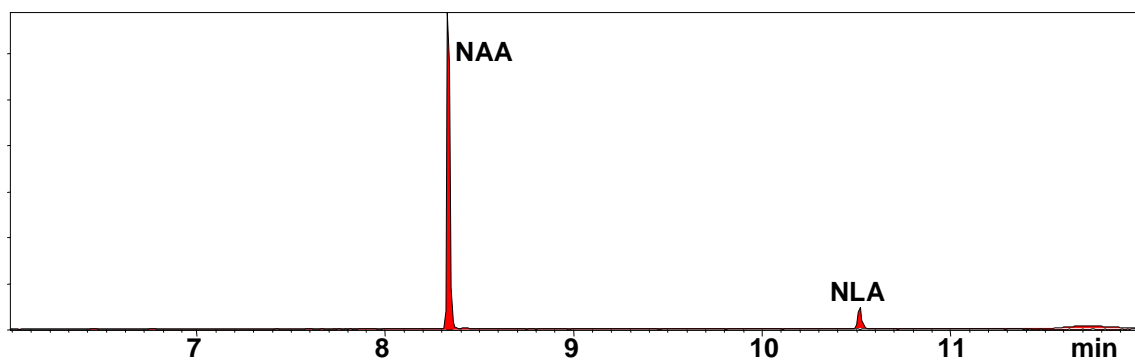
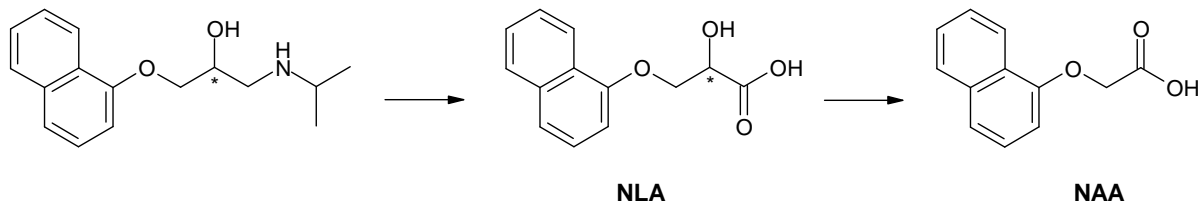


Abb. 73: relativer Peakflächenvergleich von NLA und NAA in angereichertem Wasser zur Verdeutlichung der Konzentrationsunterschiede nach 19 Tagen (Ionenspuren 216 und 161)



**Abb. 74: Transformation von Propranolol in der Umwelt**

tur nicht, als isomere Verbindung sollte (1-Naphthoxy)-essigsäure (NAA) aber ein identisches Massenspektrum aufweisen, wie es bei beiden nativen Verbindungen der Fall ist. Dies wurde jedoch nicht weiter verifiziert. Die Konzentration dieser Verbindung lag im gesamten untersuchten Zeitraum um ein Vielfaches höher als die von NLA, wie ein Vergleich der reinen Peakflächen zeigt unter der Annahme, dass beide Verbindungen bei gleicher Konzentration eine ähnliche Signalintensität besitzen (Abb. 73). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass wahrscheinlich ein noch erheblich größerer prozentualer Anteil von Propranolol zu NLA umgewandelt wurde, das dann aber rasch weiter zu NAA transformiert wurde (Abb. 74).

#### 4.3.3. Enantioselektive Analyse von NLA

In Tab. 22 sind die Enantiomerenfraktionen für das (+)-Enantiomer von NLA in den verschiedenen Ansätzen wiedergegeben. Ergänzend dazu ist angegeben, wie sich die Konzentration von NLA insgesamt über den untersuchten Zeitraum verhielt. Aus den Werten geht hervor, dass NLA im dritten Ansatz, welcher nur mit S-(-)-Propranolol angereichert war, nach 31 Tagen einen hohen Überschuss des (+)-Enantiomers aufwies. Dieser verringerte sich im Verlauf der nächsten 5 Tage, der EF-Wert von 0.69 nach 36 Tagen zeigte dabei aber immer noch einen doppelten Überschuss dieses Stereoisomers an. Im vierten Ansatz, der zur gleichen Zeit untersucht wurde, aber mit racemischen Propranolol versetzt gewesen ist, war ebenfalls eine Abnahme der EF-Werte von NLA mit fortschreitender Zeit zu beobachten.

**Tab. 22: Enantiomerenfraktionen von (+)-NLA in den verschiedenen Ansätzen (<sup>a</sup> dotiert mit S-Prop, <sup>b</sup>  $\sigma \pm 0.03$ , <sup>c</sup>  $\sigma \pm 0.01$ , <sup>d</sup>  $\sigma \pm 0.05$ , \* Tag 20, grüne Felder: Konzentrationszunahme gegenüber vorherigem Extraktionstag, gelbe Felder: Konzentrationsabnahme gegenüber vorherigem Extraktionstag, n. a.: Enantiomere nicht analysiert)**

	Tag 14	Tag 19	Tag 31	Tag 36	Tag 40
(3) 30.06. - 08.08.08 <sup>a, b</sup>	-	n. a.	0.76	0.69	n. a.
(4) 30.06. - 10.08.08 <sup>c</sup>	-	0.66	0.56	0.51	-
(5) 26.11. - 29.12.08 <sup>d</sup>	0.64	0.74 *	-	-	0.89

Die Werte waren insgesamt niedriger als die des dritten Ansatzes, so lag der EF-Wert nach 19 Tagen beispielsweise bei 0.66. Am Ende des Untersuchungszeitraumes wurden für NLA in diesem Ansatz dann annähernd racemische Verhältnisse gefunden, wie es der Wert von 0.51 impliziert. Im letzten Ansatz hingegen, der im November/Dezember untersucht wurde, war der umgekehrte Trend zu beobachten. Die EF-Werte stiegen dabei mit zunehmender Verweildauer von 0.64 nach 14 Tagen auf 0.89 nach 40 Tagen.

Der Überschuss des (+)-Enantiomers im dritten Ansatz am 31. Tag sowie dessen nachfolgende Abnahme deuten sehr stark darauf hin, dass NLA zu Beginn seiner Bildung wahrscheinlich gänzlich in Form des (+)-Stereoisomers vorhanden war. Dies wird durch die Anwesenheit von nur einem Enantiomer der Mutterverbindung in diesem Ansatz und der Tatsache, dass das stereogene Zentrum bei der Bildung von NLA aus Propranolol nicht involviert ist, untermauert. Daraus lässt sich ableiten, dass bezüglich der absoluten Konfiguration das (+)-Enantiomer von NLA dem (-)-Enantiomer von Propranolol entsprechen muss. Propranolol lag im dritten Ansatz über den ganzen Zeitraum als reines Enantiomer vor, weshalb die kleiner werdenden EF-Werte von NLA, die gleichzeitig für die zunehmende Anwesenheit dessen (-)-Form stehen, zudem zeigen, dass diese nur aus dem (+)-Enantiomer von NLA hervorgegangen sein kann. Da im vierten Ansatz, in dem der gleiche Trend zu beobachten war, am Ende racemische Verhältnisse zu finden waren, lässt sich bezüglich einer solchen parallel ablaufenden Umwandlung sagen, dass es sich wahrscheinlich eher um eine Racemisierung als um eine gerichtete Enantiomerisierung handelt. Da sich bei einem solchen Vorgang die Konzentration der Verbindung insgesamt allerdings nicht ändern würde, kann man deshalb in Hinblick auf ihre beobachtete Abnahme, die primär durch die Umwandlung zu NAA bedingt ist, mit einiger Vorsicht sagen, dass diese ohne stereoselektive Vorzüge abläuft. Der anfängliche doppelte Überschuss von (+)-NLA im vierten Ansatz, welcher mit racemischem Propranolol angereichert war, verdeutlicht des Weiteren, dass dieses Enantiomer verstärkt aus der Mutterverbindung gebildet wird, deren Wert zu diesem Zeitpunkt nämlich noch deutlich kleiner war (vgl. Tab. 21). Gleiches fand sich auch im fünften Ansatz, in dem ebenfalls ein etwa doppelter Überschuss von (+)-NLA relativ zu Beginn herrschte. In diesem Ansatz spiegelt ansonsten die mit fortschreitender Verweildauer zunehmende Präsenz des (+)-Enantiomers im deutlich den Trend wider, der auch für die Mutterverbindung zu finden war. Die größer werdenden EF-Werte sind in diesem Fall somit entweder unmittelbar eine Folge der verstärkten Anwesenheit des entsprechenden Enantiomers der Mutterverbindung über den gesamten Zeitraum, oder sie sind durch den bevorzugten Abbau von (-)-NLA bedingt. Letzteres wird dabei durch die Konzentrationsabnahme von NLA unterstrichen und würde zeigen, dass es eine Präferenz für dieselbe Konfiguration bei Metabolit und Mutterverbindung zu dieser Jahreszeit gibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NLA nicht nur einen Metaboliten sondern auch

ein Transformationsprodukt in der Umwelt darstellt, dessen Bildung auf biotische Vorgänge zurückgeht. Im Sommer wie im Winter entsteht dabei bevorzugt das (+)-Enantiomer aus der Mutterverbindung. Die weiteren Transformationen unterscheiden sich dann aber je nach Jahreszeit, wie es die Racemisierung der Verbindung in einem Fall zeigt, die nur im Sommer zu beobachten war.

#### **4.4. Transformationen von Bayrepel und Bayrepel-Säure**

Um die Transformationen beider Verbindungen zu untersuchen, wurde Wasser der Alster, welches im Oktober genommen wurde, verwendet und dieses entweder mit Bayrepel oder mit Bayrepel-Säure angereichert. Es wurden in diesem Fall Braunglasflaschen benutzt, um eventuelle Photoreaktionen möglichst in den Hintergrund zu drängen. Für jede Verbindung wurden vier parallele Ansätze vorgenommen. Um den Einfluss der Temperatur auf die biologische Aktivität zu verfolgen, wurden zwei davon im Freien zwischen 1-7 °C aufbewahrt. Diese wurden ca. 5 Monate lang verfolgt, während die bei Raumtemperatur aufbewahrten Ansätze nur etwa einen Monat lang untersucht wurden.

##### **4.4.1. Abbau und Bildung**

Die Abb. 75 und 76 zeigen zunächst die mit Bayrepel angereicherten Ansätze zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dotierung. Tab. 23 gibt ergänzend die dazugehörigen Konzentrationen wieder. In dem Ansatz bei Raumtemperatur war eine rasche Abnahme der Konzentration der Mutterverbindung zu beobachten. Nach nur einem Monat war weniger als 1 % des anfänglichen Dotierungslevels nachweisbar. Gleichzeitig war die Bildung des Transformationsprodukts Bayrepel-Säure zu beobachten, das bereits nach sechs Tagen in deutlichen Konzentrationen präsent war und nach einem Monat etwa ein Fünftel der Konzentration der Mutterverbindung aufwies. In den Ansätzen, die im Freien aufbewahrt wurden, war nach zehn Wochen (72 Tage) nur noch etwa 1 % der ursprünglichen Bayrepel-Konzentration vorhanden und nach fünf Monaten (152 Tage) gar kein Bayrepel mehr nachweisbar. Trotz der sehr geringen Temperaturen knapp oberhalb des Gefrierpunktes war die Abnahme der Bayrepel-Konzentration nicht in dem Maße verlangsamt, wie es vermutet wurde. Bayrepel-Säure war nach zehn Wochen mit einer Konzentration von knapp 40 % der ursprünglichen Konzentration der Mutterverbindung präsent, was ebenfalls darauf hinweist, dass die Vorgänge bei den kühleren Temperaturen nicht sehr viel langsamer abliefen. Nach etwa fünf Monaten war dann eine deutliche Verringerung dieser Konzentration feststellbar, die nur noch weniger als 5 % der Ausgangskonzentration betrug. Zu den Zeitpunkten, als die Mutterverbindung nur noch in sehr geringen Konzentrationen vorhanden war, war von dem

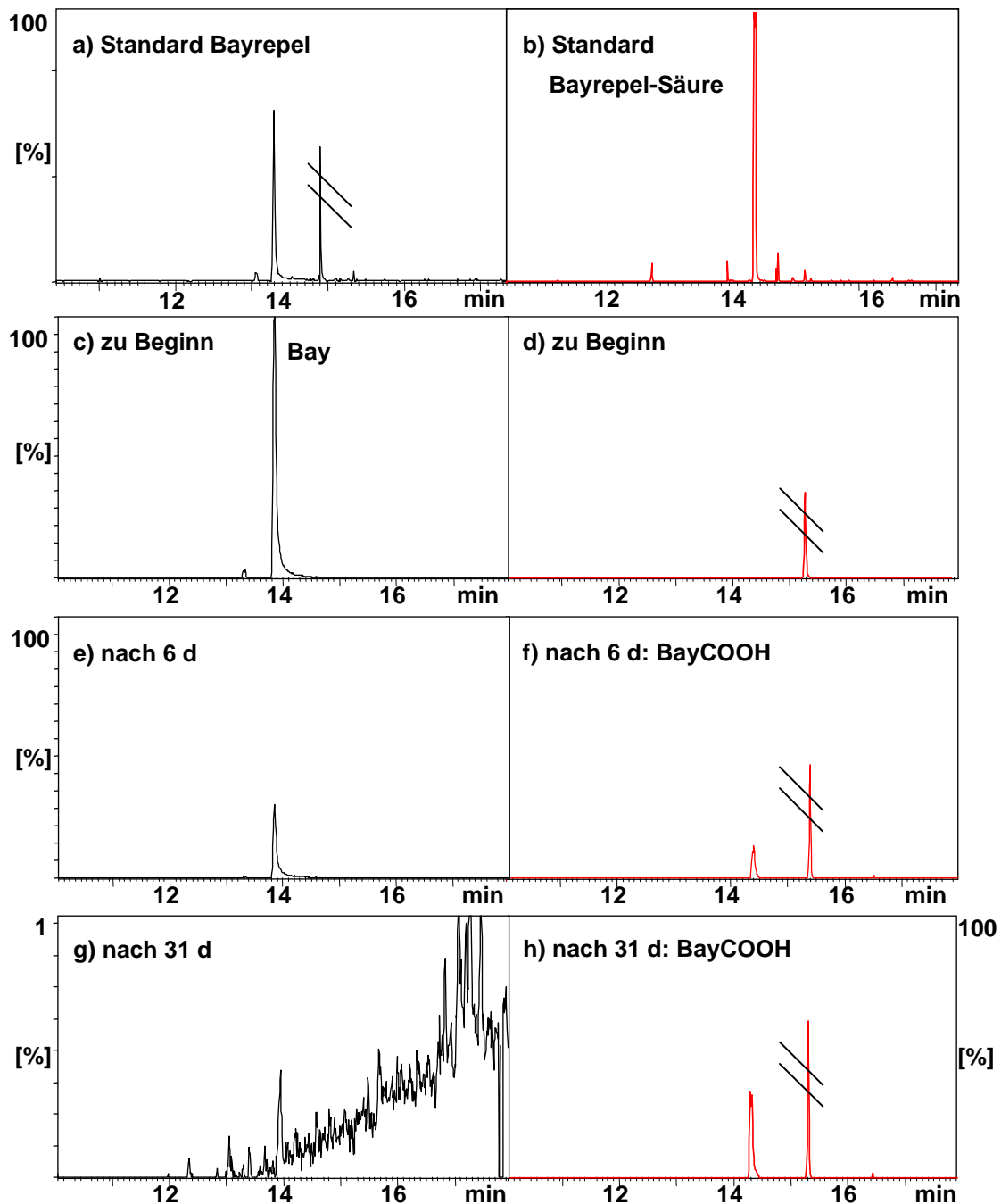


Abb. 75: Abnahme von Bayrepel (links c, e, g) und Bildung von BayCOOH (rechts d, f, h) in mit Bayrepel angereichertem Wasser von der Alster bei Raumtemperatur (Ionenspuren 128 [schwarz] und 156 [rot], Säule: DB5-ms, 15 m, die Peakhöhen beider Verbindungen in c-h wurden relativ zu der des Volumenstandards korrigiert, wobei  $c_{\max} [\text{Bay}] = 100\%$ , der Maßstab von Abb. 77g ist 100fach vergrößert)

Transformationsprodukt in keinem der Ansätze eine Konzentration in Höhe der Anfangskonzentration von Bayrepel vorzufinden. Das weist darauf hin, dass Bayrepel-Säure seinerseits ebenfalls einer weiteren raschen Umwandlung unterlag. Ersichtlich wird das, wenn man die Konzentrationen in den Ansätzen, die mit Bayrepel-Säure dotiert waren, betrachtet. Aus



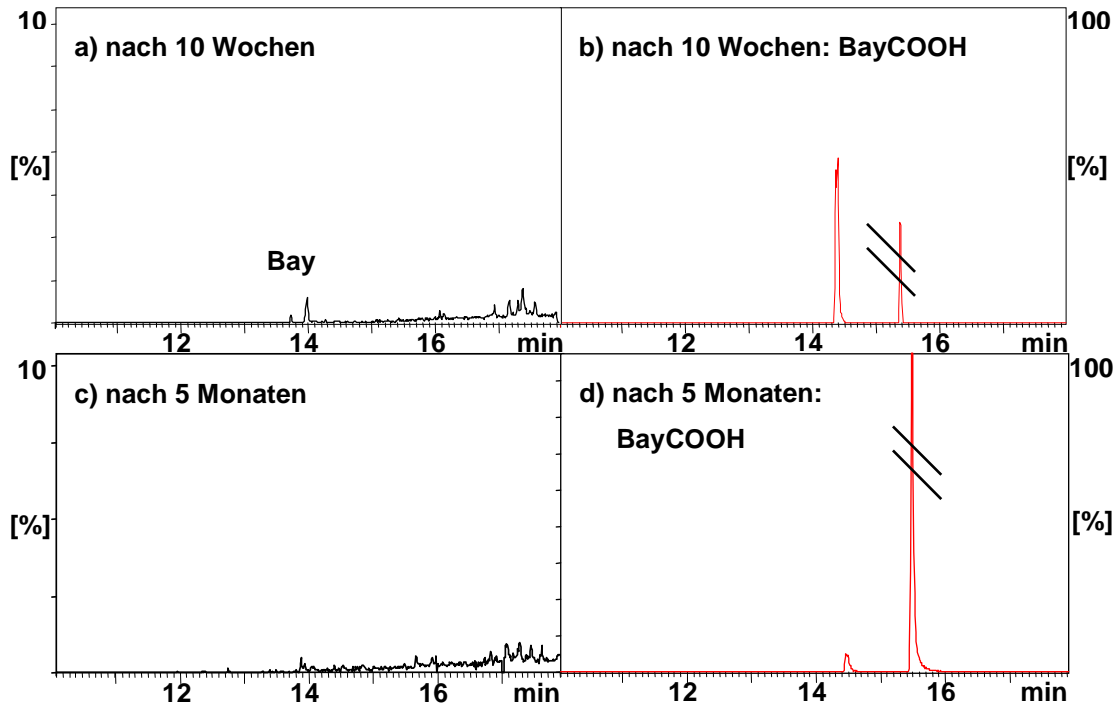


Abb. 76: Abnahme von Bayrepel (links a, c) und Bildung von BayCOOH (rechts b, d) in mit Bayrepel angereichertem Wasser von der Alster bei 1-7 °C (Ionen Spuren 128 [schwarz] und 156 [rot], Säule: DB5-ms, 15 m, die Peakhöhen beider Verbindungen wurden relativ zu der des Volumenstandards korrigiert, die Anfangssituation entspricht dabei der von Abb. 77c/d, der Maßstab der linken Chromatogramme ist 10fach vergrößert)

Tab. 23: Abgeschätzte Konzentrationen von Bayrepel und Bayrepel-Säure zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dotierung mit Bayrepel (in µg/L, \* bei 25 °C, \*\* bei 1-7 °C)

	c (Bayrepel)	c (Bayrepel-Säure)
zu Beginn	10.0	-
nach 6 Tagen *	2.61	0.78
nach 31 Tagen *	0.04	2.03
nach 72 Tagen **	0.08	3.75
nach 152 Tagen **	-	0.39

Tab. 24 geht hervor, dass es eine recht schnelle Verringerung der Konzentration gab. So war sie in den Ansätzen bei Raumtemperatur nach nur einer Woche bereits um ein Drittel reduziert, und nach einem Monat waren nur noch 40 % des ursprünglichen Levels nachweisbar. Bei den Ansätzen, die im Freien aufbewahrt wurden, verlief dieser Prozess etwas langsamer. Hier waren erst nach zehn Wochen nur noch rund 40 % der anfänglichen Konzentration vorhanden. Nach fünf Monaten war dann aber auch nur noch weniger als 1 % nachweisbar, was mit der Situation in den Bayrepel-Ansätzen in Einklang steht.

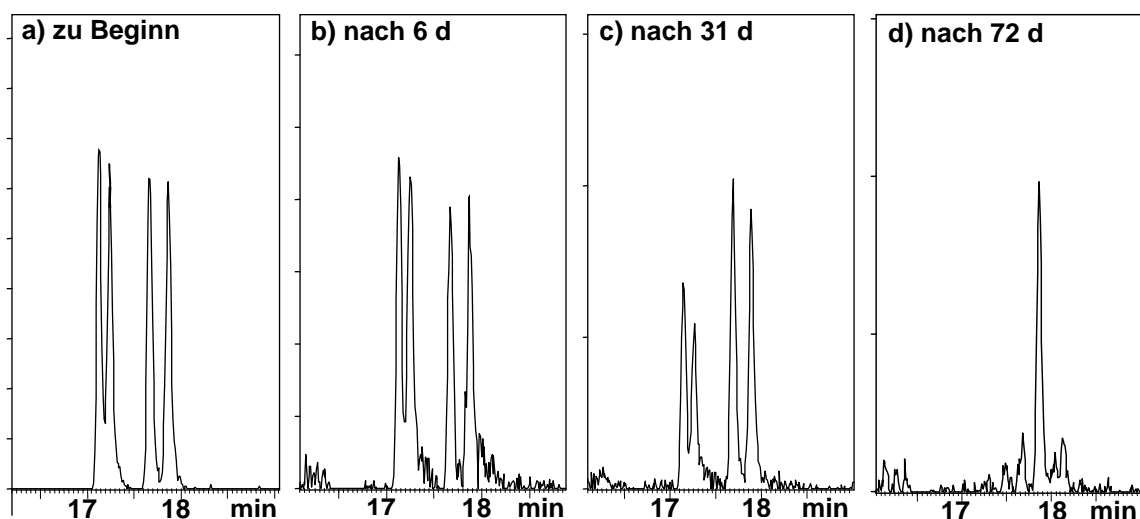
**Tab. 24: Abgeschätzte Konzentrationen von Bayrepel-Säure zu verschiedenen Zeitpunkten in mit Bayrepel-Säure angereichertem Wasser (in  $\mu\text{g/L}$ )**

	bei 25 °C	bei 1-7 °C
zu Beginn	10.0	10.0
nach 6 Tagen	7.0	-
nach 31 Tagen	4.1	-
nach 72 Tagen	-	4.2
nach 152 Tagen	-	0.05

#### 4.4.2. Stereoselektive Analyse

Die Stereoisomere von Bayrepel zu den verschiedenen Zeitpunkten nach seiner Dotierung sind in Abb. 77 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in den ersten Tagen kaum eine Veränderung der Zusammensetzung der vier Isomeren stattgefunden hat. Mit zunehmender Verweildauer änderte sich jedoch diese Zusammensetzung. So war nach einem Monat das erst-eluierende Stereoisomerenpaar nur noch knapp halb so stark präsent wie das zweite. Darüber hinaus war eine leichte Dominanz der erst-eluierenden Stereoisomere eines jeden Paares erkennbar. Nach zehn Wochen war in den im Freien aufbewahrten Ansätzen nur noch das dritt-eluierende Stereoisomer nachweisbar.

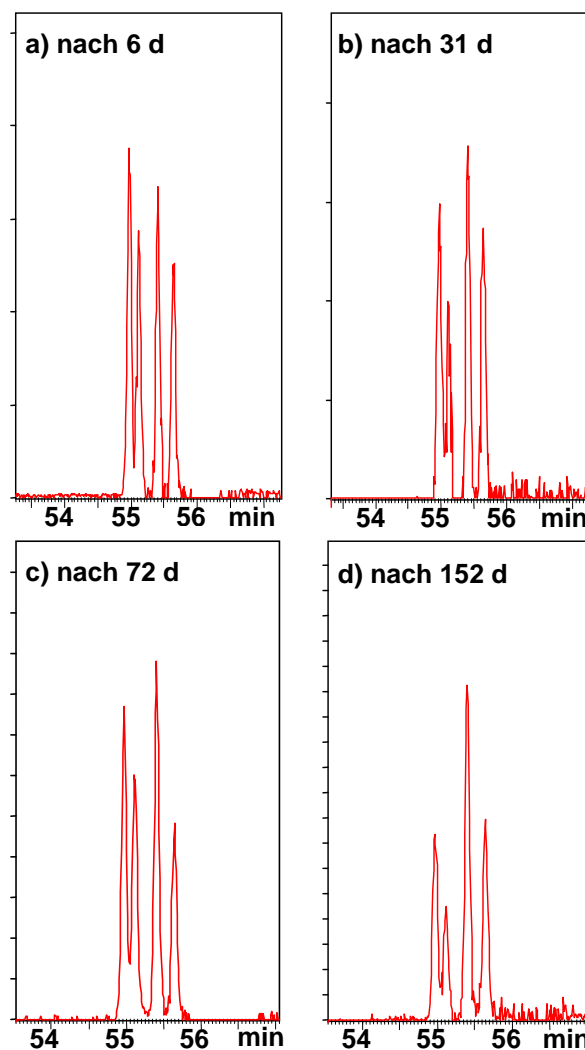
Da nach den ersten sechs Tagen die Konzentration der Verbindung insgesamt bereits stark vermindert war, zeigt das sehr deutlich, dass diese Abnahme ohne stereoselektive Vorzüge verläuft. Photochemische Prozesse können dabei allerdings ausgeschlossen



**Abb. 77: Stereoisomere von Bayrepel zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dotierung (b, c bei 25 °C, d bei 1-7 °C)**

werden. Die Umwandlung zu Bayrepel-Säure, auf dessen Bildung der Konzentrationsrückgang zurückzuführen ist, erfolgt in der Umwelt, in diesem Fall in der Alster, somit nicht anders als unter Klärwerksbedingungen (vgl. Kap. 3). Die mit fortschreitender Verweildauer im Wasser beobachtete Stereoselektivität zeigt aber, dass weitere biotische Prozesse stattgefunden haben müssen. Dabei kann es sich z. B. um die Mineralisierung von Bayrepel oder um die Umwandlung zu einem anderen Nebentransformationsprodukt handeln.

In Abb. 78 sind die entsprechenden Stereoisomere von Bayrepel-Säure in den mit Bayrepel angereicherten Proben bei 25 °C und bei 1-7 °C wiedergegeben. Es ist erkennbar, dass vom jedem Stereoisomerenpaar das erst-eluierende Stereoisomer in höheren Konzentrationen vorhanden war. Zudem zeigte sich mit zunehmender Verweilzeit im Wasser eine Dominanz des zweit-eluierenden Stereoisomerenpaares, ebenso wie es bei der Mutterverbindung der Fall war. Diese Unterschiede wurden dabei mit zunehmender Verweildauer ausgeprägter, wie es nach 31 Tagen und insbesondere 5 Monaten erkennbar war. Da letzterer Ansatz bei winterlichen Temperaturen aufbewahrt wurde, zeigt das



**Abb. 78: Stereoisomere von Bayrepel-Säure in den mit Bayrepel angereicherten Ansätzen (a, b: bei 25 °C, c, d: bei 1-7 °C)**

gleichzeitig, dass auch die stereoselektiven Prozesse nicht allzu sehr durch die Temperatur beeinflusst wurden.

Wie oben erörtert wurde, verläuft die Bildung von Bayrepel-Säure aus Bayrepel ohne stereoselektive Bevorzugung; da die Stereoisomere von Bayrepel-Säure jedoch aber nach bereits sechs Tagen in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen, zeigt das sehr deutlich, dass parallel zu seiner Bildung bereits dessen Abbau bzw. weitere Umwandlung ablaufen muss. Dieser Prozess wird ersichtlich, wenn man die Transformation von Bayrepel-Säure genauer betrachtet. In Abb. 79 sind dazu die Stereoisomere von Bayrepel-Säure zu den verschiedenen Zeitpunkten in den mit dieser Verbindung angereicherten Ansätzen bei 25 °C und bei den kalten Temperaturen dargestellt. Von der racemisch vorliegenden Verbindung wurde zunächst nur das viert-eluierende Stereoisomer bevorzugt umgewandelt, während die übrigen drei nahezu unverändert in ihrer Konzentration blieben. Diese Tendenz war nach sechs Tagen bei Raumtemperatur und ausgeprägter nach 72 Tagen bei 1-7 °C zu erkennen. Erst mit längerer Verweildauer im Wasser war dann die Abnahme der Konzentration des

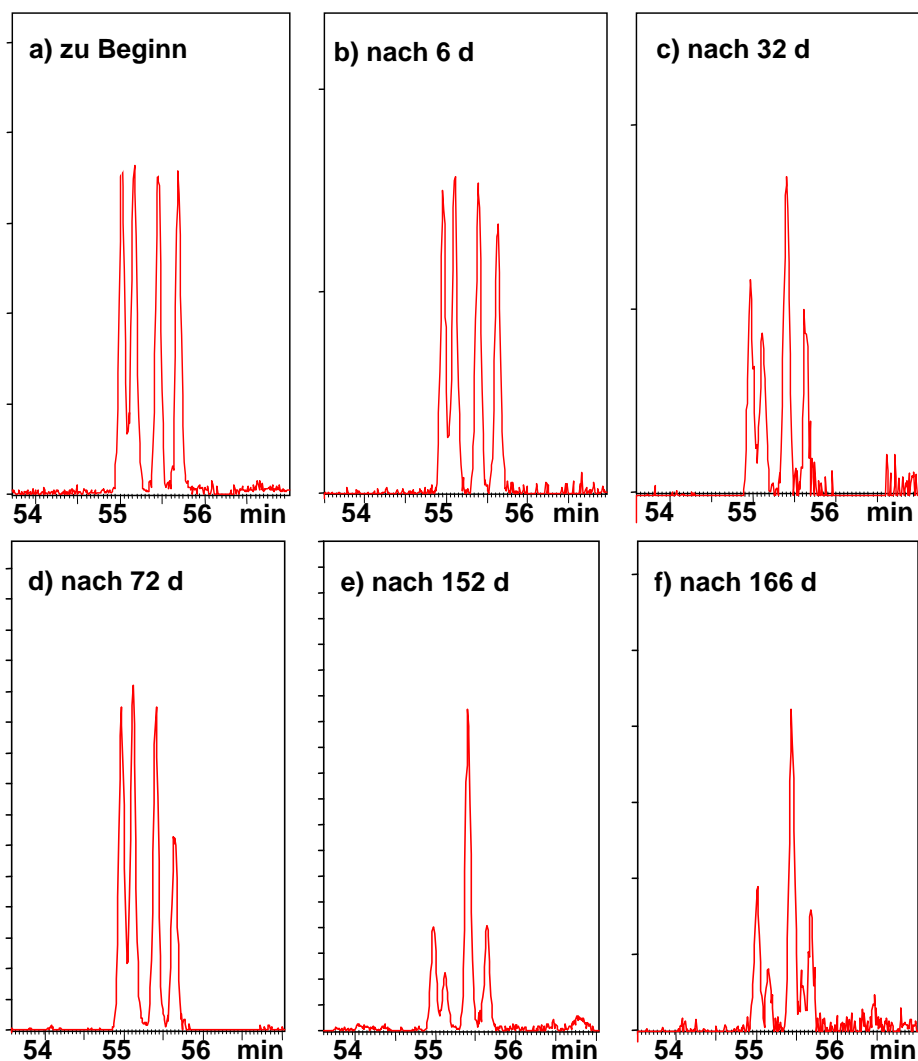


Abb. 79: Stereoisomere von Bayrepel-Säure in mit Bayrepel-Säure angereichertem Wasser (a-c: bei 25 °C, d-f: bei 1-7 °C)

ersten Stereoisomerenpaares und von diesem Paar zudem die des zweit-eluierenden Enantiomers zu beobachten. Diese Konzentrationsunterschiede wurden dabei mit fortschreitender Zeit sehr viel größer, wie es aus den Experimenten bei kalten Temperaturen hervorgeht. So lagen hier nach fünf Monaten die vier Stereoisomere etwa in einem Verhältnis von 1/0.5/3/1 vor.

Nimmt man an, dass beide Verbindungen dieselbe Elutionsreihenfolge aufweisen, lässt sich zusammenfassend sagen, dass sowohl Bayrepel als auch das Transformationsprodukt in der Alster denselben stereoselektiven Vorgängen unterliegen, von denen das dritt-eluierende Stereoisomer am wenigsten betroffen ist. Die Befunde für Bayrepel-Säure sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der nicht angereicherten Umweltproben der Alster. Die Zusammensetzung von Bayrepel-Säure, die nach längerer Verweildauer in den Experimenten zu finden war, spiegelt nämlich genau die Zusammensetzung wider, die auch in den nicht angereicherten Umweltproben der Außenalster zu finden war (vgl. Kap. 3). Dies unterstützt somit die Vermutung, dass in der Außenalster keine unmittelbaren Einträge existieren. Die Zusammensetzung im Alsterfluss entsprach hingegen eher derjenigen, die zu einem vergleichsweise frühen Zeitpunkt der Experimente herrschte, was ebenfalls die Vermutung unterstützt, dass sich in diesem Teil der Alster zusätzliche Eintragspfade befinden müssen. In der Elbe bei Övelgönne wurde einmalig im Sommer 2008 auch eine solche vergleichbare Zusammensetzung gefunden (vgl. Abb. 52). Es wurde vermutet, dass diese aufgrund von unmittelbaren Einträgen (durch Badeaktivitäten) entstanden sein musste, was somit an dieser Stelle ebenfalls bestätigt werden kann.

## **4.5. Transformationen von Naproxen**

Naproxen wurde sowohl im Wasser der Elbe als auch der Alster analysiert. Es wurden dazu je zwei Ansätze in Klarglasgebinden aufbewahrt und untersucht. Das Wasser der Alster wurde im August genommen, und die Ansätze wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Das Elbe-Wasser wurde im November genommen, und das Experiment wurde in diesem Fall über einen längeren Zeitraum von bis zu 69 Tagen analysiert. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf dem Metaboliten DMNPX.

### **4.5.1. Abbau und Bildung**

Die Ansätze mit angereichertem Wasser der Alster wurden im Abstand von jeweils fünf Tagen analysiert. Innerhalb des gesamten analysierten Zeitraumes wurden jedoch kaum Veränderungen festgestellt. So war zum einem in einem der beiden Ansätze beispielsweise keine starke Verringerung der Konzentration von Naproxen feststellbar (Anhang IX), zum

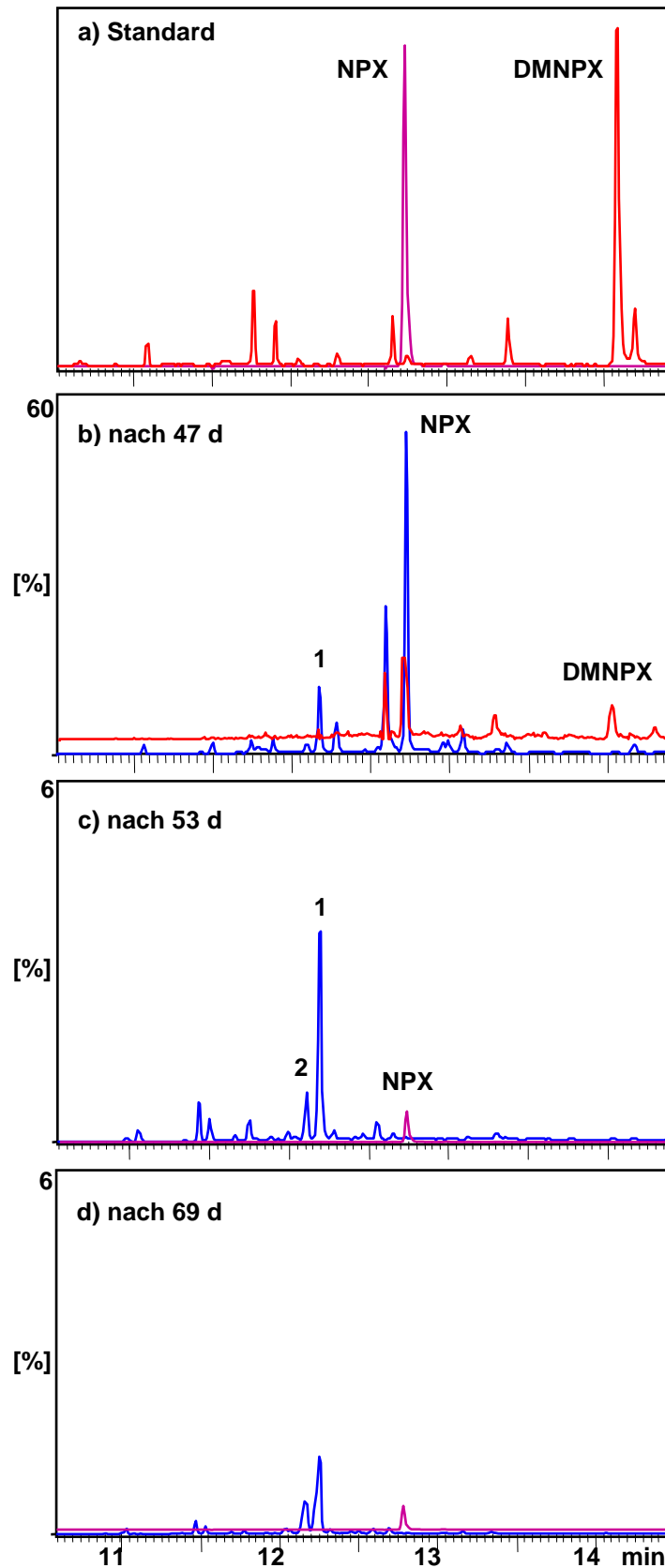


Abb. 80: Abnahme von Naproxen und Bildung von Transformationsprodukten in angereicher-tem Wasser der Elbe (Ionenspuren: 185 [violett], 229 [rot], TIC [blau], Säule: VF-5ms, 30 m, die Peakhöhen in b-d sind relativ zu der des Volumenstandards korrigiert, wobei  $c_{\text{NPX}}$  am Tag der Dotierung = 100 % [nicht dargestellt])

anderen wurde keine Bildung von Transformationsprodukten, vor allem nicht von DMNPX, beobachtet. Aus diesem Grund wurden die Ansätze mit dotiertem Elbe-Wasser über einem längeren Zeitraum verfolgt. Abb. 80 zeigt die entsprechenden Chromatogramme von verschiedenen Tagen nach der Anreicherung. Die Ansätze wurden dabei erstmalig nach 47 Tagen analysiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Konzentration von Naproxen bereits um mindestens die Hälfte reduziert, und sie nahm innerhalb der darauf folgenden 3 Wochen bis zum 69. Tag nach der Anreicherung weiterhin ab, so dass am Ende weniger als 1 % des anfänglichen Levels nachweisbar war. Darüber hinaus wurde DMNPX nachgewiesen, seine Konzentration war jedoch, verglichen zu der von Naproxen, niedriger (vgl. 80b). So wurden z. B. nach 53 bzw. 69 Tagen nur noch Mengen knapp oberhalb der Detektionsgrenze nachgewiesen. Dieser Befund deutet an, dass die Bildung von DMNPX aus Naproxen in den hier untersuchten Oberflächengewässern somit, anders als unter Klärwerksbedingungen, wahrscheinlich kaum eine Rolle spielt. Zieht man die Ergebnisse der nicht angereicherten Umwelt- und Klärwerksproben (Kap. 3) heran, lässt sich zudem schlussfolgern, dass DMNPX in der Elbe recht schnell abgebaut bzw. umgewandelt werden muss. Des Weiteren wurden jedoch zwei Verbindungen (Abb. 80, Nr. 1 und 2) in beträchtlichem Maße gebildet, die bis zum 69. Tag noch nachweisbar waren (Abb. 80d). Die Massenspektren dieser beiden Verbindungen sind in Abb. 81 dargestellt. Durch Vergleich mit einem Spektrum aus der Datenbank wurde das Transformationsprodukt 1 als 2-Acetyl-6-Methoxynaphthalin identifiziert (Abb. 82). Diese Verbindung ist eines der Hauptphotoproducte von Naproxen, welche bisher allerdings nur in Versuchen mit destilliertem bzw. Trinkwasser nachgewiesen wurde <sup>[70, 135]</sup>. Da in den Ansätzen mit Alsterwasser nach 21 Tagen das Transformationsprodukt 1 noch nicht nachgewiesen werden konnte, spricht das dafür, dass

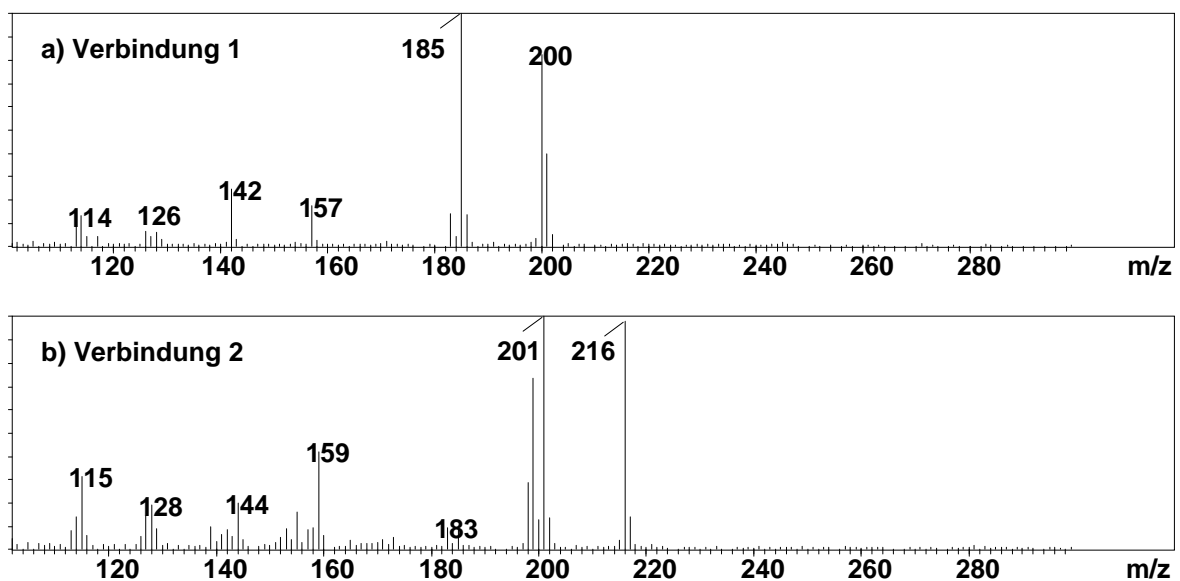
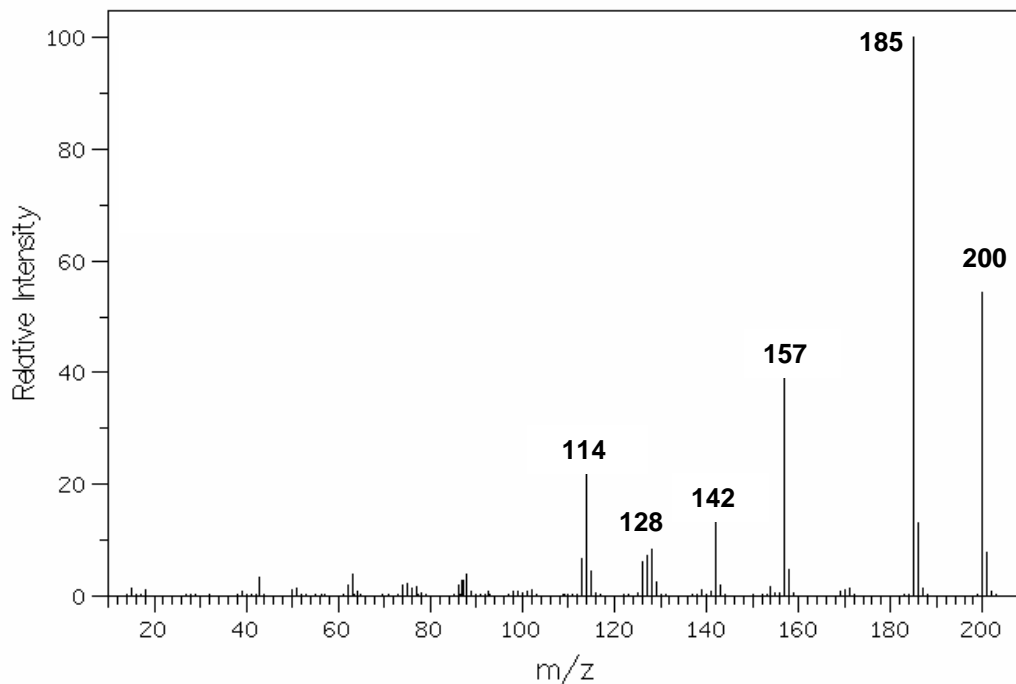


Abb. 81: EI-Massenspektren der Transformationsprodukte 1 und 2



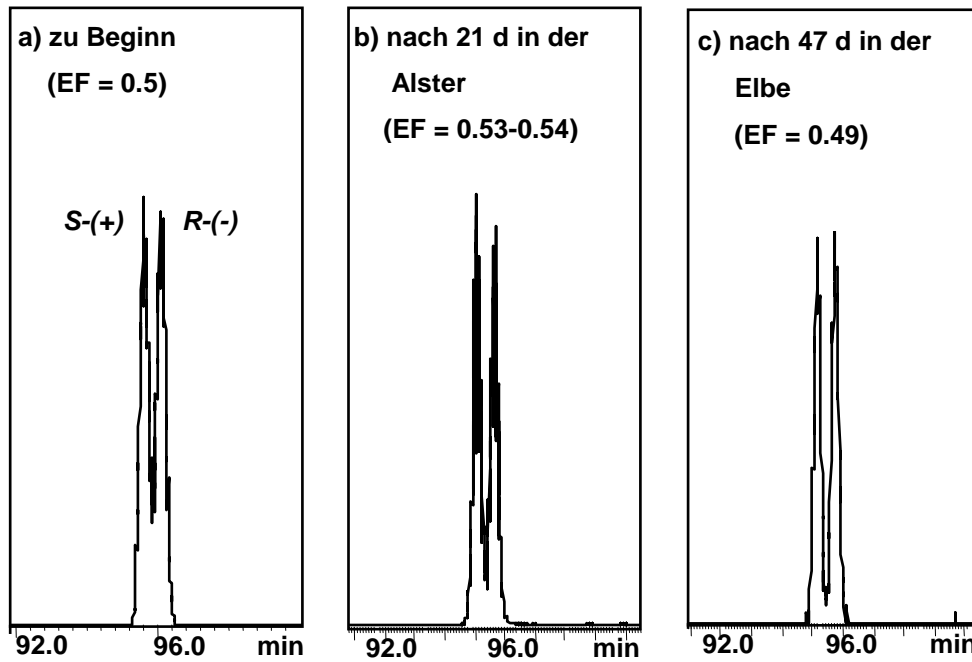
**Abb. 82: Referenzspektrum von 2-Acetyl-6-Methoxynaphthalin**

die photolytischen Prozesse unter den herrschenden Bedingungen vergleichsweise langsam abgelaufen sein müssen <sup>[70]</sup>. Für die Verbindung 2 wurde in der Datenbank kein entsprechendes Massenspektrum gefunden. Von Boscá *et al.* ist ein weiteres Photoprodukt beschrieben, das einige der entsprechenden Molekülfragmente von Verbindung 2 aufweist <sup>[135]</sup>. Die von ihnen identifizierte Verbindung, 2-(1-Methoxyethyl)-6-methoxynaphthalin, bildete sich allerdings nicht in photolytischen Untersuchungen mit Wasser, so dass sie an dieser Stelle ausgeschlossen werden kann. Da es sich beim Transformationsprodukt 2 aufgrund seiner geringeren molekularen Masse gegenüber Naproxen wahrscheinlich um ein nicht-chirales Abbauprodukt der Mutterverbindung handelt, wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.5.2. Enantioselektive Analyse von Naproxen

Es wurde für die Untersuchungen ausschließlich racemisches Naproxen verwendet. Das entspricht zwar nicht der Zusammensetzung, in der die Verbindung bei therapeutischen Zwecken verabreicht wird, aber wie in Kap. 3 gezeigt wurde, kommt das *R*-Enantiomer durchaus in der Umwelt vor. In diesem Zusammenhang war es deshalb von Interesse, zu untersuchen, ob es Unterschiede beim Abbau bzw. der Umwandlung beider Enantiomere gibt. Bisher ist über die biotischen Vorgänge in der Umwelt nichts bekannt, ein biologischer





**Abb. 83:** Enantiomere von Naproxen in dotiertem Wasser der Alster (b) und der Elbe (c) mit Angabe der Enantiomerenfraktionen ( $\sigma = 0.01$ )

Abbau muss dabei aber durchaus in Betracht gezogen werden <sup>[67]</sup>. In Abb. 83 sind die Enantiomere von Naproxen in angereichertem Wasser der Elbe und der Alster dargestellt. In Letzterem war nach 21 Tagen das erst-eluierende S-Enantiomer geringfügig stärker vorhanden als die R-Form. In der Elbe waren hingegen nach 47 Tagen keine Änderungen in der Zusammensetzung der Enantiomere zu finden. Da die Konzentration von Naproxen als solches im Wasser der Elbe zu diesem Zeitpunkt aber bereits deutlich verringert war, zeigt das, dass dessen Verschwinden wahrscheinlich durch abiotische Prozesse bedingt gewesen ist. Das Vorhandensein des Photoprodukts 2-Acetyl-6-Methoxynaphthalin unterstützt diese Vermutung. Ob die unveränderten Verhältnisse der Enantiomeren dadurch bedingt waren, dass das Wasser im November entnommen wurde und die biologische Aktivität zu diesem Zeitpunkt eventuell bereits stark vermindert war, kann dabei aber nicht ausgeschlossen werden. Denn im Sommer kamen biotische Vorgänge durchaus zum Tragen, wie es die Werte von 0.53-0.54 im Falle des Wassers der Alster zeigen. Es wurde hier aber kein längerer Zeitraum analysiert, so dass nicht klar ist, ob es mit längerer Verweildauer zu stärker ausgeprägten Unterschieden in der Konzentration der Enantiomeren gekommen wäre. Diese trotz der sommerlichen Jahreszeit nur geringen Unterschiede lassen aber vermuten, dass die stereoselektiven Prozesse nur vergleichsweise langsam abzulaufen schienen und somit tatsächlich nur eine untergeordnete Rolle spielen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einblicke in das Vorkommen und das Schicksal der Enantiomeren von chiralen PPCP und ihrer Metaboliten in der aquatischen Umwelt zu bekommen. Der Schwerpunkt bei den pharmazeutischen Substanzen lag dabei neben einigen schmerz- und entzündungshemmenden Verbindungen vor allem bei den Betablockern. Im Bereich der *personal care*-Produkte wurden einige UV-Filter sowie das Insektenrepellent Bayrepel und dessen Oxidationsprodukt ausgewählt.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf der enantioselektiven chromatographischen Trennung dieser Substanzen. Die sauren PPCP (Ibuprofen, Naproxen und ihre Metaboliten IbuOH und DMNPX sowie Bayrepel und die entsprechende Säure) und die Betablocker Metoprolol und Propranolol sowie der Metabolit MetoCOOH wurden dabei erfolgreich an der chiralen GC-Phase Hydrodex- $\beta$ -6TBDM getrennt. Letztere wurden dazu zuvor mit CMDMCS in ihre DMS-Derivate überführt. Die sauren Pharmazeutika wurden mit MCM zu Methyl- bzw. Carbonatestern derivatisiert. Der Metoprolol-Metabolit MetoOH sowie NLA, einer der beiden Hauptmetaboliten von Propranolol, wurden hingegen mittels enantioselektiver HPLC unter Verwendung einer modifizierten Cellulose getrennt. Auf diese Weise wurden ebenfalls die UV-Filter MBC gänzlich und OCR partiell getrennt. Der Propranolol-Metabolit OHPL und der UV-Filter EHMC konnten hingegen an keiner getesteten Phase enantioselektiv getrennt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Fließgewässer des Hamburger Raumes, die Elbe und die Alster, auf das Vorkommen und die Verteilung der obigen Substanzen analysiert. Zum Vergleich wurden ebenfalls Proben vom Ablauf des städtischen Klärwerks untersucht. Aus der Gruppe der Betablocker war Metoprolol in allen analysierten Proben die dominierende Verbindung. Mit Konzentrationen zwischen 50-100 ng/L lagen diese in den kälteren Monaten dabei deutlich höher als im Sommer. Im Klärwerk wurden erwartungsgemäß noch deutlich höhere Konzentrationen bestimmt, die mit bis zu > 10  $\mu\text{g/L}$  über den bisher in der Literatur berichteten Werten lagen. Die beiden Metaboliten MetoCOOH und MetoOH wurden in Konzentrationen knapp oberhalb des Detektionslimits in beinahe allen Proben der Elbe und Alster, allerdings nur während der kälteren Jahreszeit, nachgewiesen. In den Klärwerksablaufproben lagen diese mit Konzentrationen im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich aber auch deutlich höher. Zudem konnte ein weiteres Transformationsprodukt von Metoprolol identifiziert werden, das an der  $\alpha$ -Position der 1-Seitenkette eine Ketogruppe besaß. Diese bisher unbekannte Verbindung (MetoK) wurde ebenfalls in allen untersuchten Proben während der kälteren Monate sowie im Klärwerksablauf nachgewiesen. Der Betablocker Propranolol wurde in der Elbe und der Alster nur in Proben nachgewiesen, die

zu einem frühen Zeitpunkt der Arbeit genommen wurden. Die Konzentrationen lagen dabei allerdings nur knapp oberhalb des Detektionslimits. Ab 2008 konnte die Verbindung nur noch im Klärwerksablauf, jedoch nicht mehr in den Oberflächengewässern detektiert werden. Es wurde dafür der Betablocker Bisoprolol nachgewiesen, welcher in den früheren Oberflächengewässerproben nicht auftrat. Die enantioselektive Analyse von Metoprolol und Propranolol zeigte deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Enantiomeren zwischen beiden Verbindungen sowohl in den Oberflächengewässern als auch im Klärwerksablauf. Während Metoprolol im Ablauf annähernd racemisch vorlag, gab es bei Propranolol eine Bevorzugung des *S*-Enantiomers. In der Elbe war von Metoprolol das *S*-Enantiomer geringfügig stärker vorhanden, von Propranolol war hier ebenso wie in der Alster das *R*-Enantiomer stärker präsent. Von den Metoprolol-Metaboliten lag MetoCOOH im Klärwerksablauf als Racemat vor, von MetoK war hingegen das zweit-eluierende Enantiomer deutlich stärker präsent. Von der diastereomeren Verbindung MetoOH lag das erste Enantiomerenpaar in doppelt so hohen Anteilen wie das zweite vor, wobei das erste Paar selbst racemisch war und vom zweiten Paar das zweite Enantiomer geringfügig stärker vorhanden war. Von den sauren PPCP wurden erwartungsgemäß die Mutterverbindungen Ibuprofen und Naproxen sowie IbuOH und das Transformationsprodukt Bayrepel-Säure in nahezu allen untersuchten Proben in quantifizierbaren Konzentrationen nachgewiesen. Der Naproxen-Metabolit DMNPX wurde hingegen nur im Ablauf des Klärwerks nachgewiesen, mit Konzentrationen, die in der gleichen Größenordnung wie die der Mutterverbindung lagen. Im Gegensatz dazu wurde diese Verbindung im Großraum Karachi in Pakistan auch in Oberflächengewässern nachgewiesen. Die enantioselektive Analyse von Ibuprofen und IbuOH zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Hamburger Oberflächengewässern und denen Karachis, die in erster Linie auf die fehlende Abwasserklärung in Pakistan zurückzuführen sind. Unterschiede gab es ferner bei Naproxen und DMNPX. Während im Ablauf des Hamburger Klärwerks von beiden Verbindungen das *R*-Enantiomer mit bis zu 20 % vorhanden war und auch in der Elbe und Alster geringe Anteile von *R*-Naproxen nachweisbar waren, konnte in den Karachi-Proben von beiden Verbindungen ausschließlich das *S*-Enantiomer detektiert werden. Die enantioselektive Analyse der vier Stereoisomeren von Bayrepel-Säure enthüllte, dass im Ablauf des Klärwerks noch nahezu ausgeglichene Verhältnisse herrschten, während in der Elbe und der Alster das dritt-eluierende Isomer das eindeutig dominierende war. Die Unterschiede wurden dabei mit zunehmender Entfernung von Eintragspfaden umso deutlicher. Von den untersuchten UV-Filtern wurden selbst in den Sommermonaten nur geringe Konzentrationen bestimmt. OCR war dabei diejenige Verbindung, die am häufigsten nachgewiesen werden konnte. Im Klärwerksablauf wurden MBC und OCR in einer einzelnen Stichprobe detektiert, mit Konzentrationen im unteren ng/L-Bereich.

Der dritte Teil der Arbeit umfasste einige Experimente, die nähere Einblicke in das Schicksal der ausgewählten Substanzen gewähren sollten. Die Analyse von angereichertem Wasser der Elbe bzw. Alster enthüllte auf diese Weise, dass die Metaboliten von Metoprolol unter natürlichen Bedingungen aus der Mutterverbindung in geringem Maße gebildet wurden. MetoCOOH, MetoOH und MetoK waren dabei die hauptsächlichen Produkte. Die Bildung sowie ihre weitere Transformation waren dabei teils auf eindeutig biotische Prozesse zurückzuführen, so dass sie auch als mikrobielle Metaboliten betrachtet werden müssen. Neben den oben erwähnten Metaboliten wurden zudem weitere drei Transformationsprodukte identifiziert. Metoprolol selbst unterlag ebenfalls in beträchtlichem Maße stereoselektiven Prozessen, so war in der Elbe ein bevorzugter Abbau des *S*-Enantiomers, in der Alster hingegen der *R*-Form, zu beobachten. Die Analyse von Propranolol enthüllte, dass die Verbindung je nach Jahreszeit verschiedenen biotischen Prozessen ausgesetzt ist. Während es im Sommer einen bevorzugten Abbau des *R*-Enantiomers gab, war in den kälteren Monaten eine Bevorzugung für den Antipoden feststellbar. Von NLA, welches in geringem Umfang aus der Mutterverbindung gebildet wurde und das seinerseits rasch weiter in NAA umgewandelt wurde, wurde zu beiden Jahreszeiten das (+)-Enantiomer verstärkt gebildet. Untersuchungen von Bayrepel zeigten, dass die Verbindung in angereichertem Wasser der Alster zu einem großen Teil in ihr Oxidationsprodukt umgewandelt wurde, was dabei allerdings ohne stereoselektive Vorzüge stattfand. Der weitere Abbau von Bayrepel-Säure verlief dann aber eindeutig mit stereoselektiven Präferenzen, das dritt-eluierende Stereoisomer wurde dabei am wenigsten abgebaut und es wurden so die Ergebnisse der undotierten Umweltproben bestätigt. Die Analyse von mit Naproxen angereichertem Wasser enthüllte, dass der Metabolit DMNPX nur in sehr geringem Umfang aus der Mutterverbindung gebildet wurde. Es wurde vielmehr das Auftreten des aus der Literatur bekannten Photoprodukts 2-Acetyl-6-methoxynaphthalin über einen längeren Zeitraum beobachtet. Die enantioselektive Analyse zeigte zudem keine stark ausgeprägten Präferenzen für eines der Enantiomere, so dass davon ausgegangen werden kann, dass biotische Faktoren bei der weiteren Transformation von Naproxen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielen.

## 6. Summary

It was the aim of the present work to gain insights into the occurrence and the fate of the enantiomers of chiral PPCPs and their respective metabolites in the aquatic environment. In the field of the pharmaceutically active substances the focus was put, among some analgesic and antiplogistic compounds, particularly on betablocking agents. Among the personal care products some UV-filters as well as the insect repellent Bayrepel and its oxidation-product were chosen.

In the first part of the work the focus was laid on the enantioselective chromatographic separation of these compounds. The acidic PPCPs (ibuprofen and naproxen as well as their metabolites IbuOH and DMNPX, further bayrepel and its corresponding acid) and the betablockers metoprolol and propranolol and the metabolite MetoCOOH were successfully separated on the chiral GC-phase Hydrodex- $\beta$ -6TBDM, where the latter compounds had to be converted with CMDMCS into their DMS-derivatives. The acidic PPCPs were derivatised into their methyl- or carbonate-esters by MCM. In contrast, the metoprolol-metabolite MetoOH as well as NLA, one of the two main-metabolites of propranolol, were separated by enantioselective HPLC using a modified cellulose. Thus, the UV-filters MBC and OCR were also separated completely or at least partially. However, the propranolol-metabolite OHPL and the UV-filter EHMC could not be separated on any of the tested stationary phases.

In the second part of the work the rivers of the Hamburg area, the Elbe and the Alster, were analysed for the occurrence and the distribution of the substances mentioned above. Samples of the effluent of the municipal sewage treatment plant (STP) were also included for a comparison. In the group of the betablockers metoprolol was the dominating compound in all analysed samples. With concentrations between 50 – 100 ng/L this compound attained significantly higher values in the colder months than in the summer. As expected, in the sewage treatment plant effluent yet higher concentrations were determined which ranged with up to > 10  $\mu\text{g/L}$  above the values so far reported in literature. The two metabolites MetoCOOH and MetoOH were detected closely above the limits of detection in almost all samples of the Elbe and the Alster from the colder periods. In the STP-samples their concentrations in the low  $\mu\text{g/L}$ -range were also significantly higher. Additionally, a further transformation product of metoprolol could be identified which exhibited in the  $\alpha$ -position of the 1-sidechain a keto group. This so far unknown compound (MetoK) was also detected in all analysed samples during the cold period as well as in the STP-effluent. The betablocker propranolol was detected only in samples from the Elbe and the Alster which were taken at an early stage of the work exhibiting concentrations only slightly above the detection limit. In 2008 and thereafter, the compound could only be determined in the STP-effluent, but not in

the surface water samples any more. Instead, the betablocker bisoprolol was now prevailing, which had not been present in the early surface water samples. The enantioselective analysis of metoprolol and propranolol revealed significant differences in the composition of the enantiomers of these two compounds both in surface water and in the STP-effluent. While metoprolol was almost racemic in the effluent, propranolol exhibited a preference of the *S*-enantiomer. In the Elbe the *S*-enantiomer of metoprolol was slightly prevailing, while in case of propranolol the *R*-enantiomer was here as well as in the Alster more abundant. Among the metoprolol metabolites in the STP-effluent MetoCOOH was racemic while with regard to MetoK the second-eluting enantiomer was significantly dominating. In case of the diastereomeric compound MetoOH the first pair of enantiomers was dominating over the second one with almost a factor of two, where the first pair in turn was racemic, while in the second pair the second enantiomer was slightly more abundant in the STP-effluent. As expected for the acidic PPCPs, the mother compounds ibuprofen and naproxen as well as IbuOH and the transformation product bayrepel-acid were determined in quantifiable concentrations in almost all analysed samples. However, the naproxen metabolite DMNPX was detected in the effluent of the STP only with concentrations in the same range as those of the mother compound. In contrast, this compound was also detected in surface water of the region of Karachi in Pakistan. The enantioselective analysis of ibuprofen and IbuOH revealed clear differences between the Hamburg and the Karachi surface waters which is primarily attributed to the lack of waste water treatment in Pakistan. Differences were also found for naproxen and DMNPX. While both compounds exhibited the presence of the *R*-enantiomer of approximately 20 % in the effluent of the Hamburg STP and also small amounts of *R*-naproxen in the Elbe and the Alster, in the Karachi-samples exclusively the *S*-enantiomer of both compounds could be detected. The enantioselective analysis of the four stereoisomers of bayrepel-acid revealed that in the effluent of the STP almost racemic ratios existed, while in the Elbe and in the Alster the third-eluting isomer was clearly the dominating one. Furthermore, these differences became more significant with increasing distance from the input source. In case of the UV-filters analysed herein only small concentrations were determined even during the summer months, where OCR was the compound which was detected most often. In the STP-effluent MBC and OCR were found in one single sample with concentrations in the low ng/L-range.

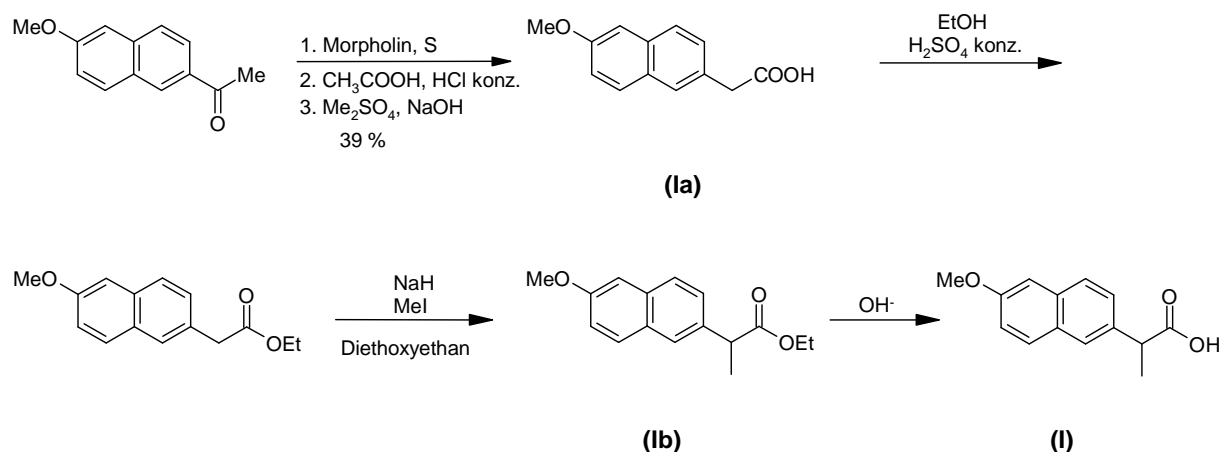
The third part of the work comprised some experiments to gain detailed insights into the fate of the selected compounds. The analyses of water from the Elbe and the Alster, respectively, that had been spiked with the present target compounds revealed that the metabolites of metoprolol were formed in minor amounts under natural conditions where MetoCOOH, MetoOH and MetoK were the major products. Their formation as well as their further transformation was unequivocally ascribed to biotic processes so that they have to be

regarded as microbial metabolites, too. In addition to the metabolites mentioned above three further transformation products were also identified. Metoprolol itself underlay also largely stereoselective processes; in the Elbe a preferential transformation of the *S*-enantiomer, while in the Alster of the *R*-form was observed. The analysis of propranolol revealed that this compound is subject to different biotic processes depending on the season. While a preferential transformation of the *R*-enantiomer occurred in the summer, a preference for the antipode was observed during the colder months. In case of NLA which was formed in small amounts from the mother compound and which in turn was rapidly further transformed to NAA a preferred formation of the (+)-enantiomer could be observed in both seasons. Investigations of bayrepel showed that this compound is extensively transformed into its oxidation product without any stereoselective preferences in spiked Alster water. But the further transformation of bayrepel-acid proceeded with clearly stereoselective preferences; the third-eluting stereoisomer was the least degradable one and the results of the original non-spiked water samples were thus confirmed. The analysis of water spiked with naproxen showed that the metabolite DMNPX was formed from the mother compound in very small amounts only. The appearance of 2-acetyl-6-naphthalene, a photoproduct known from literature, was rather observed over a longer period. Moreover, the enantioselective analysis revealed no distinct preferences for one of the enantiomers so that it can be concluded that biotic factors play just a minor role in the transformation of naproxen.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1. Darstellung der Referenzverbindungen

#### 7.1.1. Darstellung von (*rac*)-Naproxen (I) (nach [136])



#### • (6-Methoxy-2-naphthyl)ethansäure (Ia)

Es wurden 5.0 g (6-Methoxy-2-naphthyl)ethanon (25 mmol) mit 1.3 g Schwefel (41 mmol) und 5.4 mL Morpholin (41 mmol) für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Der noch heiße Reaktionsansatz wurde in heißes Ethanol gegeben und das entstandene Thiomorpholid in der Kälte auskristallisiert. Zur Aufarbeitung wurde das Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert. Das erhaltene Produkt wurde anschließend mit 10 g 50%-iger Kaliumhydroxidlösung und 18 mL Ethanol für 6 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillieren des Ethanols wurde soviel Wasser hinzugegeben, bis ein Niederschlag beobachtet wurde. Es wurde in der Kälte mit verdünnter Salzsäure angesäuert, der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol/Wasser umkristallisiert. Es wurden 2.6 g (6-Methoxy-2-naphthyl)ethansäure (12 mmol, 48 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/Aceton 3:1): R<sub>f</sub> = 0.69

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.25 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 5.6, Hz-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3.91 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.08 - 4.18 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.09-7.72 (m, 6H, ArH)



**• Ethyl-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propanoat (Ib)**

1.1 g **Ia** (5 mmol) wurden in 20 mL trockenem Ethanol gelöst und mit 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 17 h unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde mit Wasser versetzt und dann mit 80 mL Toluol extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abschließend bei vermindertem Druck abdestilliert. In einer Stickstoffatmosphäre wurden 98 mg Natriumhydrid (4.1 mmol) in 10 mL 1,2-Dimethoxyethan (abs.) suspendiert und eine Lösung von 1.0 g (6-Methoxy-2-naphthyl)ethansäureethylester und 0.26 mL Methyljodid (4.1 mmol) in 5 mL 1,2-Dimethoxyethan (abs.) über einen Zeitraum von 20 min langsam unter Rückfluss zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und zum Rückstand wurden bei 0 °C 7.5 mL Diethylether zugegeben. Nach Zutropfen von 5 mL Wasser wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit Wasser gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde die organische Phase eingeeengt und säulenchromatographisch getrennt (Laufmittel: Hexan/Aceton 2:1). Es wurden 0.42 g 2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propansäureethylester (**Ib**) (1.6 mmol) als gelbes Öl erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/Aceton 2:1): R<sub>f</sub> = 0.52

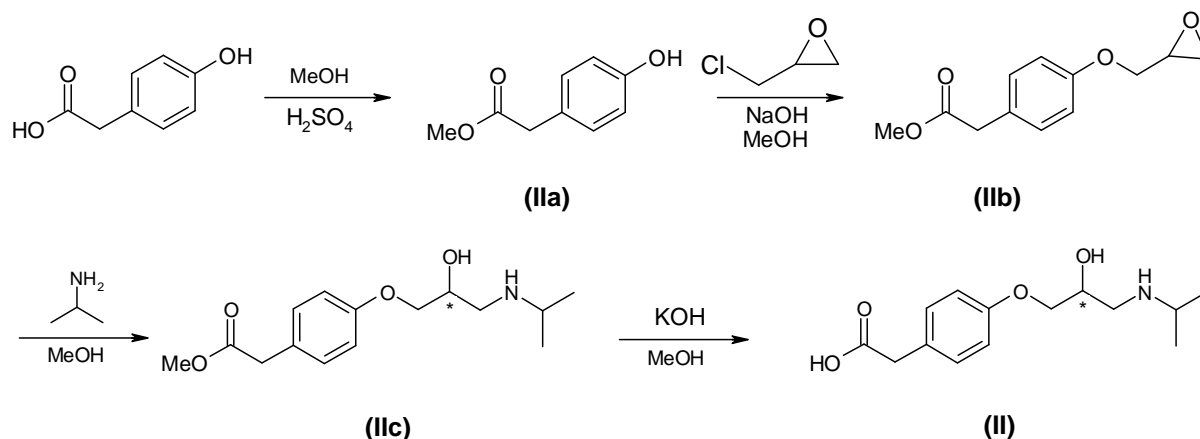
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.20 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 5.6 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 1.56 (d, 3H, -CHCH<sub>3</sub>), 3.83 (q, 1H, <sup>3</sup>J<sub>CH-CH<sub>3</sub></sub> = 5.6 Hz, -CH), 3.91 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.06-4.19 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.09-7.72 (m, 6H, ArH)

**• 2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propansäure (I) (Naproxen)**

**Ib** (0.42 g, 1.6 mmol) wurde in 20 mL 10%iger ethanolischer Kaliumhydroxidlösung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Ethanol wurde bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 mL Wasser aufgenommen. Es wurde mit Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend unter Kühlung mit halbkonzentrierter Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Zur Reinigung wurde das erhaltene Rohprodukt aus Aceton/*n*-Hexan umkristallisiert. Es wurden 360 mg (1.5 mmol) Naproxen erhalten.

MS (EI, 70 eV), (Methylester): m/z = 244 [M<sup>+</sup>], 185 [M<sup>+</sup> - COOCH<sub>3</sub>], 170 [M<sup>+</sup> - (COOCH<sub>3</sub>+CH<sub>3</sub>)], 153 [M<sup>+</sup> - (COOCH<sub>3</sub>+OCH<sub>3</sub>)], 141 [C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>]

## 7.1.2. Darstellung von Metoprolol-Säure (II) (nach [137])



## • Methyl-4-(2.3-epoxy)propoxyphenylethanoat (IIb)

Es wurden 5.0 g *o*-Hydroxyphenylethansäure (33 mmol) in 200 mL absolutem Methanol gelöst und 6 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Methanol wurde abdestilliert und der erhaltene Rückstand in Eiswasser gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, und die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Abschließend wurde der Rückstand im Vakuum destilliert, so dass 5.0 g Methyl-2-(4-Hydroxyphenyl)ethanoat (IIa) (30 mmol) erhalten wurden. Diese wurden in 30 mL Methanol gelöst, 1.2 g Natriumhydroxid (30 mmol) wurden hinzugefügt und die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur rühren gelassen. 2.4 mL Epichlorhydrin (30 mmol) wurden hinzugefügt und der Ansatz für 90 min unter Rückfluss erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt wurde, wurde der Rückstand mit Wasser verdünnt und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/ Methanol 20:1). Es wurden 4.3 g Methyl-2-[4-(2.3-epoxy)propoxyphenyl]ethanoat (IIb) (19 mmol) erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, DCM, MeOH): R<sub>f</sub> = 0.8

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 2.74 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>b</sub>-CH</sub> = 2.5 Hz, -OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 2.89 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>Ha-Hb</sub> = 4.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Ha-CH</sub> = 4.5 Hz, -OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.33 (m, 1H, -CH), 3.56 (s, 2H, ArCH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3.95 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>b</sub>-CH</sub> = 5.5 Hz, ArOH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 4.19 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>Ha-Hb</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Ha-CH</sub> = 3.0 Hz, ArOCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 6.87 (d, 2H, ArH-2, -6), 7.19 (d, 2H, ArH-3, -5)

• **4-[2-hydroxy-3-(1-methylethyl)amino]propoxyphenylethansäure (II) (MetoCOOH)**

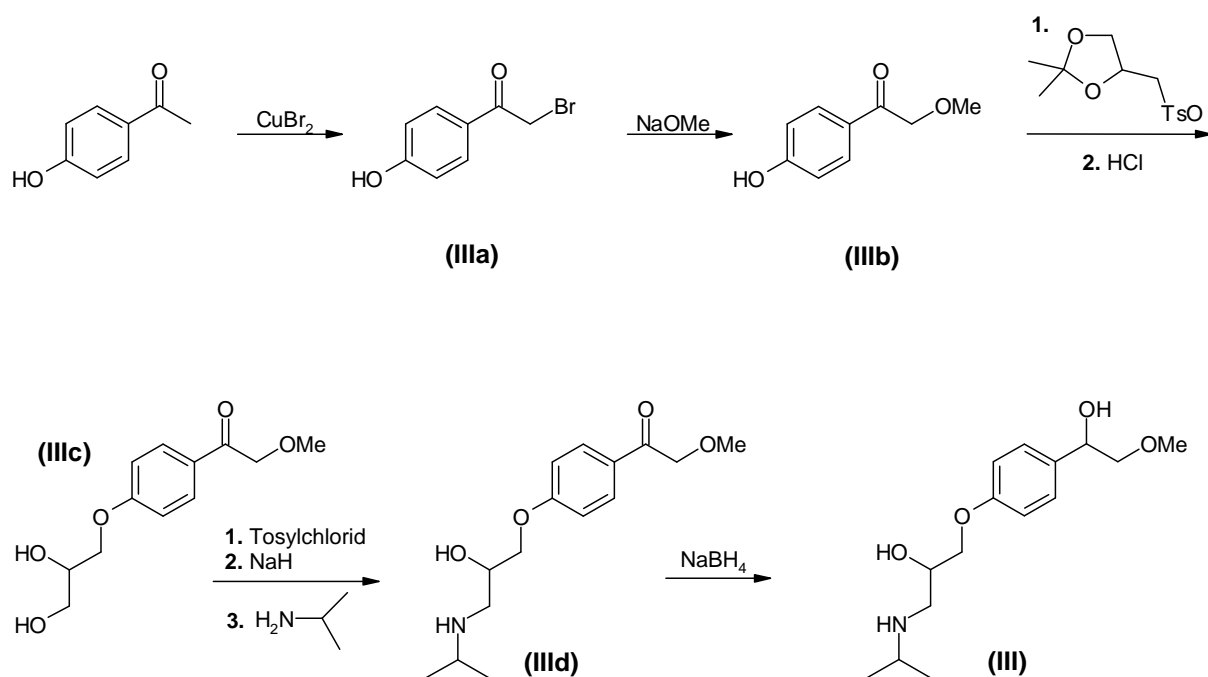
Zu einer Lösung von 4.3 g **IIb** (19 mmol) in 50 mL Methanol wurden 11.0 mL Isopropylamin (128 mmol) hinzugefügt und der Ansatz für 20 min bei 60-65 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Rückstand wurde dann säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM/ Methanol 20:1). Es wurden 1.1 g Methyl-4-[2-hydroxy-3-(1-methylethyl)aminopropoxy-phenyl]ethanoat (**β-Carbonyl-Metoprolol**, **IIc**) (3.9 mmol) als gelbliches Öl, welches langsam auskristallisierte, erhalten.

Davon wurden 919 mg (3.5 mmol) in 20 mL einer Methanol/Wasser-Mischung (1:1) gelöst und 179.5 mg Kaliumhydroxid (3.2 mmol) unter Rühren zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Methanol). Es wurden 850 mg des gewünschten Produktes (**II**) (3.1 mmol) in Form weißer Kristalle erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, Methanol): R<sub>f</sub> = 0.4

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1.36 (m, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.13 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>Ha-Hb</sub> = 12.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Hb-CH</sub> = 3.06 Hz, -NHCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.26 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Ha-CH</sub> = 9.6 Hz, -NHCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.47-3.41 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.50 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 4.05-3.95 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 4.24-4.18 (m, 1H, -CHOH), 6.90 (d, 2H, ArH-2, -6), 7.21 (d, 2H, ArH-3, -5)

**7.1.3. Darstellung von α-Hydroxy-Metoprolol (III) (nach [138, 139])**



**• 2'-Bromo-4-hydroxyacetophenon (IIIa)**

36.55 g (163.5 mmol) Kupferdibromid wurden in 80 mL Ethylacetat gelöst und unter Rückfluss erhitzt. 13.26 g (97.90 mmol) 4-Hydroxyacetophenon wurden in 50 mL heißem Chloroform gelöst und zu der CuBr<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Nach 45 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 16.0 g (74.4 mmol) eines schwarzen kristallinen Feststoffes, der nicht weiter gereinigt wurde, erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.55 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>), 6.86 (t, 2H, ArH-2, -6), 7.91 (d, 2H, ArH-3, -5, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub> = 8.8 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 31.9 (CH<sub>2</sub>), 116.5 (ArC-2, -6), 132.8 (ArC-3, -5)

**• 2'-Methoxy-4-hydroxyacetophenon (IIIb)**

16.0 g (74.4 mmol) **IIIa** wurden in 70 mL Methanol gelöst und langsam zu einer Lösung von 40.2 g (74.4 mmol) Natriummethanolat in 120 mL Methanol gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 30 min unter Rückfluss erhitzt, abgekühlt und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle entfärbt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Toluol umkristallisiert. Es wurden 5.50 g (33.0 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 3.50 (s, 3 H, -CH<sub>3</sub>), 4.65 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>), 6.89 (d, 2 H, ArH-2, -6), 7.91 (d, 2 H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub> = 8.8 Hz, ArH-3, -5)

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 75.5 (-CH<sub>2</sub>), 115.5 (ArC-2, -6), 130.9 (ArC-3, -5)

**• 3-(4-Methoxyacetyl)phenoxy-1.2-propandiol (IIIc)**

Eine Lösung von 5.50 g (33.10 mmol) **IIIb**, 9.55 g (33.30 mmol) 2.2-Dimethyl-4-tosyloxymethyl-1.3-dioxolan und 1.33 g (33.30 mmol) Natriumhydroxid in 80 mL DMF wurden 2 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in 80 mL Ethylacetat gelöst. Die Lösung wurde einmal mit 30 mL 5%iger Natronlauge und zweimal mit je 30 mL Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in einer Mischung von 40 mL Aceton und 15 mL 1N Salzsäure gelöst und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit festem Natriumcarbonat neutralisiert. 80 mL abs. Ethanol wurden hinzugegeben und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in 80 mL Ethylacetat aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde konzentriert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch getrennt (Laufmittel: Ethylacetat). Es wurden 0.71 g (2.94 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, EtOAc): Rf = 0.22

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 3.49 (s, 3 H, -CH<sub>3</sub>), 3.76 (dd, 1 H, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>a-CH<sub>2</sub>b</sub> = 11.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Ha-Hb</sub> = 5.0 Hz, -CH<sub>2</sub>bOH), 3.85 (dd, 1 H, <sup>3</sup>J<sub>CH-CH<sub>2</sub></sub> = 3.7 Hz, -CH<sub>2</sub>aOH), 4.09-4.14 (m, 3 H, ArOCH<sub>2</sub>, -CHOH), 4.64 (s, 2 H, -CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>), 6.95 (d, 2 H, ArH-2, -6), 7.91 (d, 2 H, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub></sub> = 9.0 Hz, ArH-3, -5),

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 59.4 (-OCH<sub>3</sub>), 63.4 (-CH<sub>2</sub>OH), 69.2 (ArOCH<sub>2</sub>), 70.2 (-CHOH), 75.2 ((CO)CH<sub>2</sub>O), 114.5 (ArC-2, -6), 128.3 (ArC-4), 130.1 (ArC-3, 5), 162.7 (ArC-1), 194.7 (C=O)

• **3-(4-Methoxyacetyl)phenoxy-1-(1-methylethylamino)-2-propanol (III d) (Metok)**

0.62 g (3.24 mmol) Tosylchlorid, gelöst in 20 mL Toluol, wurden langsam zu einer Lösung von 0.70 g (2.94 mmol) **III c** in 5 mL Pyridin bei 0 °C gegeben. Die Lösung wurde für 24 h gerührt, dann wurden weitere 0.25 g (1.30 mmol) Tosylchlorid hinzugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 3 Tage bei 0 °C gerührt. Es wurden 0.21 g (8.82 mmol) Natriumhydrid hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 90 min refluxiert. Nach dem Abkühlen wurden 1 mL Methanol und 50 mL Ethylacetat hinzugefügt. Die Lösung wurde viermal mit je 20 mL 1N Salzsäure gewaschen und die Säureextrakte wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in Isopropylamin gelöst und mit einem katalytischem Anteil Ammoniumchlorid für 24 h gerührt. Das überschüssige Isopropylamin wurde abdestilliert und der Rückstand für 30 min mit 20 mL 5 %iger Salzsäure gerührt. Die Mischung wurde mit 20 mL Diethylether gewaschen und die wässrige Phase wurde mittels Natriumhydroxidlösung auf einen basischen pH-Wert eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N, 95:5:0.5). Es wurden 52.5 mg (0.19 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N 95:5:0.5): Rf = 0.25

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.19 (d, 6 H, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>3</sub>-CH</sub> = 1.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 2.80-2.87 (m, 1 H, -CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>NH), 2.97-3.03 (m, 2 H, -CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>NH, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3.48 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 4.02-4.11 (m, 3 H, -OCH<sub>2</sub>CH), 4.63 (s, 2 H, -CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>), 6.95 (d, 2 H, ArH-2, -6), 7.91 (d, 2 H, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub></sub> = 8.9 Hz, ArH-3, -5)

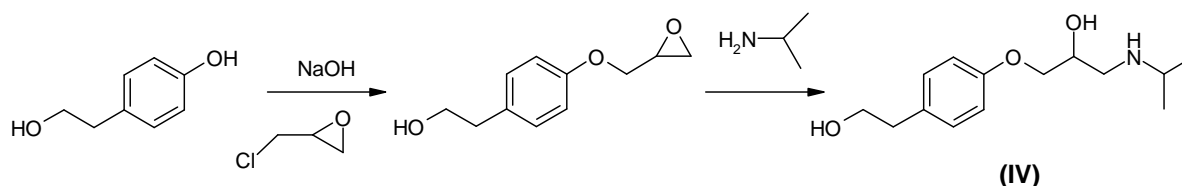
• **3-[4-(1-Hydroxy-2-methoxyethyl)]phenoxy-1-(1-methylethylamino)-2-propanol (III)**

**( $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol)**

Zu einer Lösung von 38.7 mg **III**d (0.14 mmol) in 2 mL Methanol, gekühlt auf 0 °C, wurden 27.0 mg Natriumborhydrid (710  $\mu$ mol) in kleinen Portionen gegeben und der Ansatz für 1.5 h gerührt. Das Lösemittel wurde abdestilliert, der Rückstand wurde mit 8 mL 1 %iger Natronlauge versetzt und mit 20 mL Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Kaliumchlorid gesättigt und erneut mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Es wurden 40 mg eines gelblich viskosen Öls (**III**) erhalten, das zu Teilen mittels präparativer HPLC aufgereinigt wurde.

MS (EI, 70 eV) (DMS-Derivat):  $m/z$  = 459 [ $M^+$ ], 444 [ $M^+ - CH_3$ ], 416 [ $M^+ - C_3H_7$ ], 186 [ $C_3H_5(OSi(CH_3)_2CH_2NC_3H_7)$ ]

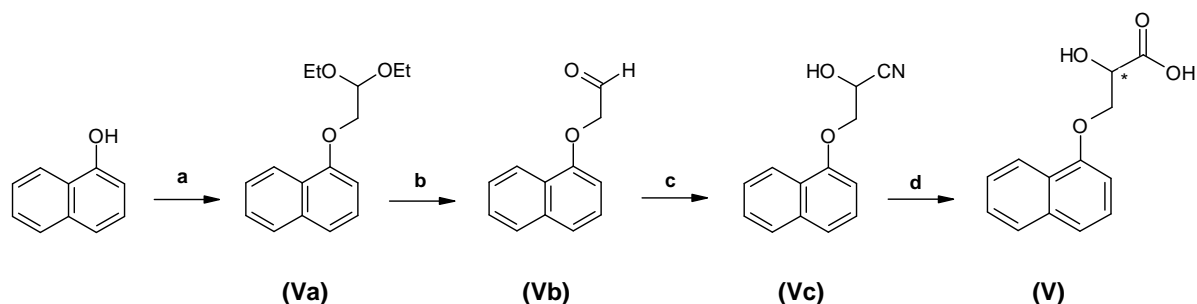
**7.1.4. Darstellung von Desmethyl-Metoprolol (IV) (nach [137])**



Es wurden 1.64 g (11.8 mmol) 4-(2-Hydroxyethyl)phenol in 15 mL Methanol gelöst und 486 mg (12.1 mmol) festes Natriumhydroxid hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur rühren gelassen. Dann wurde 1.0 mL (12.9 mmol) Epichlorhydrin hinzugefügt und die Lösung für 45 min bei 60-65 °C rühren gelassen. Der Ansatz wurde mit 60 mL Wasser verdünnt und dreimal mit je 50 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend in 15 mL Methanol gelöst, 5 mL Isopropylamin wurden zugefügt und der Ansatz wurde für 20 min bei 60-65 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde abschließend bei vermindertem Druck entfernt. Es wurden 3.2 g eines klaren viskosen Feststoffes (**IV**) erhalten, der nicht weiter aufgereinigt wurde.

MS (EI, 70 eV) (DMS-Derivat):  $m/z$  = 429 [ $M^+$ ], 414 [ $M^+ - CH_3$ ], 386 [ $M^+ - C_3H_7$ ], 186 [ $C_3H_5(OSi(CH_3)_2CH_2NC_3H_7)$ ]

## 7.1.5. Darstellung von Naphthoxymilchsäure (V) (NLA) (nach [140])



a:  $\text{BrCH}_2\text{CH}(\text{OEt})_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
 b:  $\text{HCl}$   
 c:  $\text{KCN}$ ,  $\text{NaHSO}_3$   
 d:  $\text{MeOH}/\text{HBr}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$

## • 2-(1-Naphthoxy)acetaldehyd-diethyl-acetal (Va)

5.01 g (34.8 mmol) 1-Naphthol wurden zu einer Lösung von 5.3 mL (34.2 mmol)  $\alpha$ -Bromacetaldehyddiethylacetal und 3.67 g (26.6 mmol) Kaliumcarbonat in 50 mL DMF gegeben und für 24 h bei 125 °C gerührt. Anschließend wurden 60 mL Wasser und 50 mL 8 %ige Natriumhydroxidlösung hinzugegeben und fünfmal mit jeweils 100 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde je zweimal mit jeweils 80 mL 4 %iger Natriumhydroxidlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Ölpumpenvakuum (195-210 °C) destilliert. Es wurden 6.00 g (23.1 mmol) eines braunen viskosen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.30 (t,  $^3J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2} = 7.0$  Hz, 6 H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.73 (dq,  $^2J_{\text{H}_a-\text{H}_b} = 9.2$  Hz, 2 H,  $-\text{OCH}_a\text{H}_b\text{CH}_3$ ), 3.85 (dq, 2 H,  $-\text{OCH}_a\text{H}_b\text{CH}_3$ ), 4.21 (d,  $^3J_{\text{CH}_2-\text{CH}} = 5.2$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 5.03 (t, 1 H,  $-\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 6.84 (m, 1 H, ArH-2), 7.45 (m, 4 H, ArH-3, -4, -6, -7), 7.82 (m, 1 H, ArH-5), 8.31 (m, 1 H, ArH-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 15.36 ( $-\text{CH}_3$ ), 62.68 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 68.89 ( $-\text{OCH}_2\text{CHOO}$ ), 100.64 ( $-\text{OCH}_2\text{CHOO}$ ), 104.90 (ArC-2), 120.55 (ArC-4), 121.99 (ArC-8), 125.14 (ArC-6), 125.64 (ArC-8a), 125.76 (ArC-3), 126.35 (ArC-4), 127.38 (Ar C-5), 134.48 (ArC-4a), 154.30 (ArC-1)

MS (EI, 70 eV),  $m/z = 260$  ( $\text{M}^+$ , 50), 215 (41,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OCH}_2\text{CHOEt}^+$ ), 157 (5,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OCH}_2^+$ ), 169 (83,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OCHCH}^+$ ), 143 (9,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}^+$ ), 127 (19,  $\text{C}_{10}\text{H}_7^+$ ), 115 (45,  $\text{C}_9\text{H}_7^+$ ), 103 (base peak,  $(\text{OEt})_2\text{CH}^+$ )

## • 2-(1-Naphthoxy)ethanal (Vb)

6.00 g (23.1 mmol) **Va** wurde zu einer Lösung aus 10.2 mL 2 N Salzsäure (20.1 mmol) und 35 mL Aceton gegeben. Diese Lösung wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend viermal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde

zweimal mit je 30 mL 5 %iger Kaliumcarbonatlösung und einmal mit 30 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Ölpumpenvakuum (200-220 °C) destilliert. Es wurde 3.11 g (16.7 mmol) eines braunen viskosen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.74 (s, 2 H,  $-\text{CH}_2$ ), 6.68 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH}2-\text{ArH}3} = 7.6$  Hz, ArH-2), 7.49 (m, 4 H, ArH-3, -4, -6, -7), 7.84 (m, 1 H, ArH-5), 8.37 (m, 1 H, ArH-8), 9.99 (s, 1 H,  $-\text{CHO}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 72.73 ( $-\text{OCH}_2\text{CHO}$ ), 104.99 (ArC-2), 121.66 (ArC-7), 121.79 (ArC-8), 125.37 (ArC-8a), 125.50 (ArC-6), 125.67 (ArC-3), 126.79 (ArC-4), 127.56 (ArC-5), 134.63 (ArC-4a), 153.34 (ArC-1), 199.56 ( $-\text{CHO}$ )

#### • 1-Cyano-2-(1-naphthoxy)ethanol (Vc)

Zu einer Lösung von 3.09 g (16.6 mmol) **Vb** in 50 mL Wasser wurden 2.41 g (28.7 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 1.45 g (22.3 mmol) Kaliumcyanid gegeben und bei Raumtemperatur für 6 h gerührt. Das gelbliche Öl wurde dreimal mit jeweils 30 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend dreimal mit 8 %iger Natriumhydroxidlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Es wurden 5.09 g eines braunen viskosen Öls erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt für die nächste Stufe eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.41 (dd, 2 H,  $^2J_{\text{Ha-Hb}} = 11.1$  Hz,  $^3J_{\text{Ha/Hb-CH}} = 9.7$  Hz,  $-\text{CH}_a\text{H}_b$ ), 4.94 (m, 1 H,  $-\text{CH}$ ), 6.82 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH}2-\text{ArH}3} = 7.5$  Hz, ArH-2), 7.45 (m, 4 H, ArH-3, -4, -6, -7), 7.83 (m, 1 H, ArH-5), 8.27 (m, 1 H, ArH-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 60.64 ( $-\text{CCN}$ ), 68.93 ( $-\text{OCH}_2\text{CCNOH}$ ), 105.45(ArC-2), 117.73 (CN), 121.55 (ArC-4), 121.89 (ArC-8), 125.24 (ArC-8a), 125.48 (ArC-6), 125.79 (ArC-3), 126.77 (ArC-4), 127.58 (ArC-5), 134.50 (ArC-4a), 153.14 (ArC-1)

#### • 2-Hydroxy-3-(1-naphthoxy)propionsäure (V) (NLA)

2.29 g (10.7 mmol) **Vc** wurden in 6 mL Methanol gelöst auf 0 °C gekühlt. Mittels Schwefelsäure und Natriumchlorid wurde HCl-Gas dargestellt, welches über eine Gasflasche über einen Zeitraum von 1.5 h in die Reaktionslösung geleitet wurde. Das entstehende braun-schwarze Imidoestersalz wurde mit 16 mL Wasser bei Raumtemperatur in 1.5 h zu dem Methylester umgesetzt. Diese Lösung wurde anschließend mit 45 mL 20 %iger Kaliumhydroxidlösung und 90 mL Ethanol versetzt und für weitere 20.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Ethanol wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit 200 mL Ethylacetat gewaschen. Nachdem mit konzentrierter Salzsäure pH 1 eingestellt wurde, wurde die Lösung dreimal mit jeweils 100 mL Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel abdestilliert. Der rötliche Feststoff wurde aus

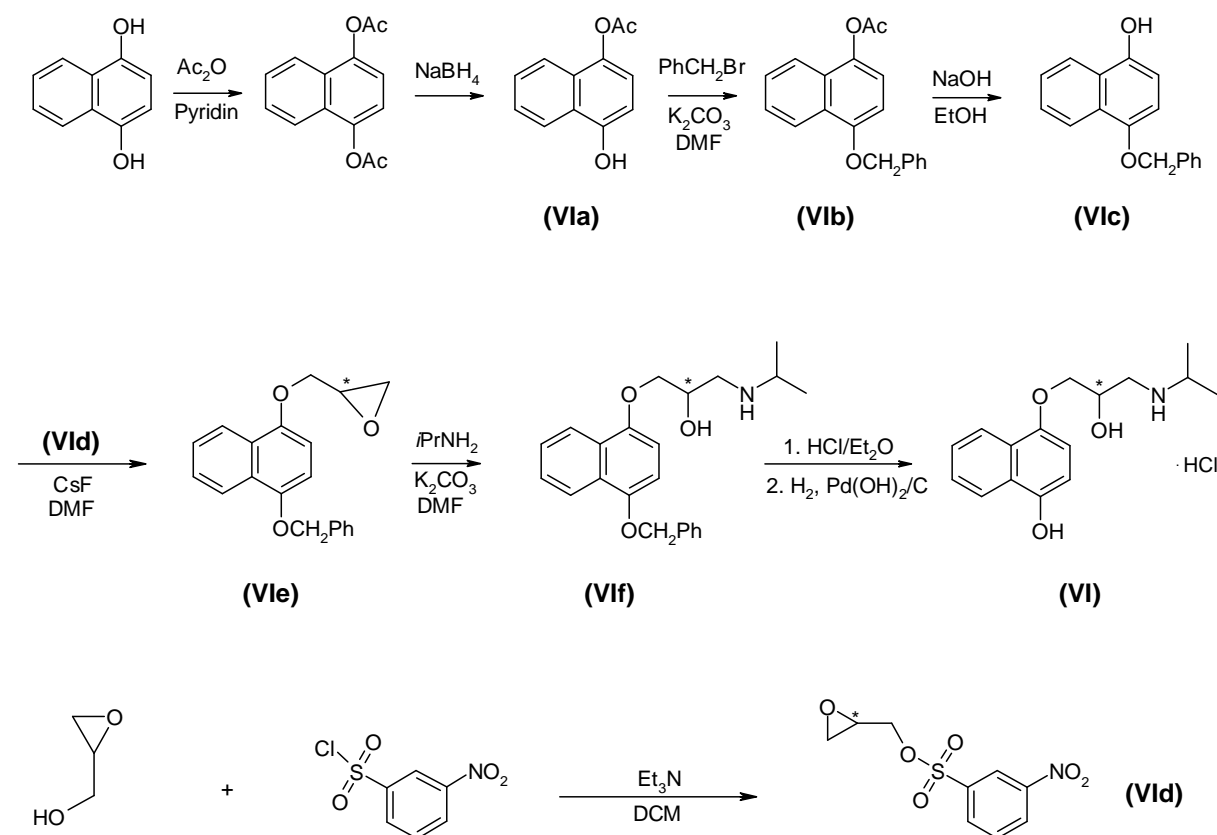


Methanol/Wasser umkristallisiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurde ein weiß-rötlicher Feststoff erhalten (1.35 g, 5.8 mmol).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.32 (d, 2 H,  $^3J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 4.4$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 4.49 (t, 1 H,  $^3J_{\text{CH}_2\text{-CH}}$ ,  $-\text{CH}$ ), 6.97 (m, 1 H, ArH-2), 7.46 (m, 4 H, ArH-3, -4, -6, -7), 7.86 (m, 1 H, ArH-5), 8.18 (m, 1 H, ArH-8).

MS (EI, 70 eV) (Methylester)  $m/z = 246$  ( $\text{M}^+$ , 80), 187 (3,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OCH}_2\text{CHOH}^+$ ), 169 (4), 157 (6,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OCH}_2^+$ ), 144 (base peak,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{OH}^+$ ), 127 (14,  $\text{C}_{10}\text{H}_7^+$ ), 115 (63,  $\text{C}_9\text{H}_7^+$ ), 103 (10).

### 7.1.6. Darstellung von 4'-Hydroxypropranolol (VI) (nach [141])



#### • 1-Acetoxy-4-hydroxynaphthalin (VIa)

4.02 g (25.1 mmol) 1,4-Dihydroxynaphthalin und 36 mL (380.8 mmol) Essigsäureanhydrid wurden in 40 mL Pyridin bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Anschließend wurden unter Kühlung 120 mL Wasser hinzugefügt und mit jeweils dreimal 200 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit 120 mL Wasser, jeweils viermal 120 mL gesättigter Kupfersulfatlösung, erneut mit jeweils zweimal 120 mL Wasser und schließlich mit 150 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der rotbraune Feststoff in Toluol umkristallisiert und im Ölpumpen-

vakuum getrocknet. Es wurden 4.13 g (16.9 mmol) eines braunen Feststoffes erhalten. Dieser wurde in 160 mL Ethanol gelöst, 0.30 g (8.1 mmol) Natriumborhydrid wurden zugefügt und der Ansatz für 1.5 h bei Raumtemperatur unter einem Stickstoffstrom gerührt. Anschließend wurden 80 mL Wasser zu der Lösung gegeben, mit 10 %iger Salzsäure unter Eiskühlung pH 3 eingestellt und die Lösung eingeengt. Es wurde mit jeweils dreimal 160 mL Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mit jeweils zweimal 160 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, mit je 160 mL Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und ohne weiteren Aufreinigungsschritt für die nächste Stufe eingesetzt. Es wurden 3.43 g eines braunen Öls erhalten.

#### • 1-Acetoxy-4-benzyloxynaphthalin (VIb)

Zu einer Suspension von 3.43 g (16.9 mmol) **VIa** und 3.06 g (22.2 mmol) Kaliumcarbonat in 50 mL DMF wurden 2.6 mL (21.9 mmol) Benzylbromid hinzugegeben und der Ansatz für 5.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 200 mL Wasser wurde die Lösung mit jeweils dreimal 150 mL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit jeweils fünfmal 100 mL Wasser und jeweils zweimal mit 100 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der bräunliche Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: *n*-Hexan/EtOAc, 10/1). Es wurden 3.27 g (11.2 mmol) eines bräunlichen Feststoffes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.44 (s, 3 H,  $-\text{COCH}_3$ ), 5.25 (s, 2 H,  $\text{PhCH}_2\text{O-}$ ), 6.84 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH3-ArH2}} = 8.3$  Hz, ArH-3), 7.12 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH2-ArH3}}$ , ArH-2), 7.39 (m, 3 H, ArH-3', -4', -5'), 7.52 (m, 4 H, ArH-6, -7, -2', -6'), 7.79 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH5-ArH6}} = 8.1$  Hz, ArH-5), 8.35 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH8-ArH7}} = 7.8$  Hz, ArH-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 20.95 ( $-\text{CH}_3$ ), 70.40 ( $\text{PhCH}_2\text{O-}$ ), 104.27 (ArC-2), 117.69, 120.89, 122.68, 125.81, 127.01, 127.40, 128.01, 128.62, 128.79, 129.02 (ArC-3, -5, -6, -7, -8, -2', -3', -4', -5', -6'), 126.45 (ArC-1'), 127.53 (ArC-4a), 136.93 (ArC-8a), 140.18 (ArC-4), 152.59 (ArC-1), 169.90 ( $\text{CH}_3\text{COOR}$ )

MS (EI, 70 eV):  $m/z = 292$  ( $\text{M}^+$ , 10), 250 (57,  $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{OCH}_2\text{PhOH}^+$ ), 233 (6), 159 (base peak,  $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{OHO}^+$ ), 131 (37), 115 (5), 105 (13)

#### • 4-Benzyloxy-1-hydroxynaphthalin (VIc)

Zu einer Lösung von 3.26 g (11.1 mmol) **VIb** in 65 mL Ethanol wurden 75 mL 8 %ige Natriumhydroxidlösung hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 10 %iger Salzsäure pH 3 eingestellt und dreimal mit jeweils 150 mL

Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit 150 mL Wasser und 150 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: *n*-Hexan/EtOAc 10:1). Es wurde ein gelblicher Feststoff erhalten (1.71 g, 6.8 mmol).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.99 (s, 1 H, -OH), 5.20 (s, 2 H,  $\text{PhCH}_2\text{O-}$ ), 6.72 (s, 2 H, ArH-2, -3), 7.36 (m, 1 H, ArH-4'), 7.42 (m, 2 H, ArH-3', -5'), 7.53 (m, 4 H, ArH-6, -7, -2', -6'), 8.14 (m, 1 H, ArH-8 oder H-5), 8.32 (m, 1 H, ArH-8 oder H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 70.53 ( $\text{PhCH}_2\text{O-}$ ), 105.14 (ArC-2), 107.84 (ArC-3) 121.39, 122.23, 125.84, 125.92, 127.36, 127.84, 128.54, 135.12, 135.73 (ArC-5, -6, -7, -8, -2', -3', -4', -5', -6'), 125.29 (ArC-1'), 126.60 (ArC-4a), 137.39 (ArC-8a), 145.26 (ArC-4), 148.85 (ArC-1)

#### • ( $\pm$ )-2.3-Epoxypropyl-3-nitrobenzylsulfonat (VId)

Zu einer Lösung von 1 mL (15.0 mmol) ( $\pm$ )-Glycidol und 2.2 mL (15.9 mmol) Triethylamin in 45 mL Dichlormethan wurde unter Eiskühlung eine Lösung aus 3.11 g (14.0 mmol) 3-Nitrobenzolsulfonylchlorid in 5.5 mL Dichlormethan zugegeben und der Ansatz bei 4 °C für 5.5 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 35 mL 5 %iger Schwefelsäure angesäuert und dreimal mit jeweils 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit 70 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 70 mL Wasser und 70 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: *n*-Hexan/EtOAc 3:1). Es wurde ein leicht gelblicher Feststoff erhalten (3.23 g, 12.5 mmol).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.61 (dd, 1 H,  $^2J_{\text{Ha3-Hb3}} = 4.7$  Hz,  $^3J_{\text{Ha3-H2}} = 2.5$  Hz,  $\text{H}_a$ -3), 2.83 (dd, 1 H,  $\text{H}_b$ -3), 3.21 (m, 1 H, H-2), 4.02 (dd, 1 H,  $^2J_{\text{Ha1-Hb1}} = 11.6$  Hz,  $^3J_{\text{Ha1-H2}} = 6.5$  Hz,  $\text{H}_a$ -1), 4.48 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{Hb1-H2}} = 2.8$  Hz,  $\text{H}_b$ -1), 7.82 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{ArH5'-ArH6'}} = 8.0$  Hz, ArH-5'), 8.25 (m, 1 H, ArH-4' oder H-6'), 8.51 (m, 1 H, ArH-4' oder H-6'), 8.74 (m, 1 H, ArH-2')

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 48.64 ( $\text{C}^*$ ), 60.31 ( $\text{COC}^*\text{CH}_2$ ), 71.69 ( $\text{CH}_2\text{OS}$ ), 123.16 (ArC-5), 128.38 (ArC-4), 130.81 (ArC-6), 133.32 (ArC-2), 137.94 (ArC-3), 148.21 (ArC-1)

#### • ( $\pm$ )-1-Benzoyloxy-4-oxiranylmethoxynaphthalin (VIe)

1.40 g (5.6 mmol) **VIc** und 4.37 g (28.8 mmol) Cäsiumfluorid in 16 mL DMF wurden für 40 min bei Raumtemperatur in einer Stickstoffatmosphäre gerührt. Es wurde dann eine Lösung aus 1.45 g (5.6 mmol) **VId** in 15 mL DMF hinzugegeben und für weitere

23 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 150 mL gesättigte Natriumcarbonatlösung hinzugegeben und die Lösung dreimal mit jeweils 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde fünfmal mit jeweils 100 mL Wasser und einmal mit 100 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: *n*-Hexan/EtOAc 10:2). Es wurde ein gelblicher Feststoff erhalten (1.25 g, 4.1 mmol).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.84 (dd, 1 H,  $^2J_{\text{Ha}3'-\text{Hb}3'} = 5.2$  Hz,  $^3J_{\text{Ha}3'-\text{H}2'} = 2.4$  Hz,  $\text{H}_a-3'$ ), 2.96 (dd, 1 H  $^3J_{\text{Hb}3'-\text{H}2'} = 4.4$  Hz,  $\text{H}_b-3'$ ), 3.48 (m, 1 H,  $\text{H}-2'$ ), 4.10 (dd, 1 H,  $^2J_{\text{Ha}1'-\text{Hb}1'} = 10.8$  Hz,  $^3J_{\text{Ha}1'-\text{H}2'} = 5.6$  Hz,  $\text{H}_a-1'$ ), 4.35 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{Hb}1'-\text{H}2'} = 3.2$  Hz,  $\text{H}_b-1'$ ), 5.20 (s, 2 H,  $\text{PhCH}_2\text{O-}$ ), 6.70 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH}2'-\text{ArH}3'} = 8.4$  Hz,  $\text{ArH}-2$  oder  $\text{H}-3$ ), 6.76 (d, 1 H,  $\text{ArH}-2$  oder  $\text{H}-3$ ), 7.35 (m, 1 H,  $\text{ArH}-4''$ ), 7.41 (m, 2 H,  $\text{ArH}-3''$ ,  $-5''$ ), 7.52 (m, 4 H,  $\text{ArH}-6$ ,  $-7$ ,  $-2''$ ,  $-6''$ ), 8.25 (m, 1 H,  $\text{ArH}-5$  oder  $\text{H}-8$ ), 8.30 (m, 1 H,  $\text{ArH}-5$  oder  $\text{H}-8$ )

• **(±)-3-(4-Benzoyloxy-1-naphthoxy)-1-(1-methylethyl)amino-2-propanol (Vif)**

1.39 g (4.5 mmol) **Vle**, 3.60 g (26.1 mmol) Kaliumcarbonat und 10.5 mL (122.6 mmol) *Isopropylamin* in 15 mL DMF wurden für 18 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde das überschüssige *Isopropylamin* abdestilliert. Anschließend wurden 200 mL Wasser hinzugegeben und die Lösung dreimal mit jeweils 200 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde fünfmal mit jeweils 100 mL Wasser und einmal mit 100 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbliche Rückstand aus Toluol umkristallisiert, so dass 0.60 g (1.6 mmol) eines gelblichen Feststoff erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.11 (d, 6 H,  $^3J_{\text{CH}_3-\text{CH}} = 6.4$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.87 (bs, 1 H,  $-\text{OH}$  oder  $-\text{NH}$ ), 2.86 (m, 2 H,  $\text{H}_a-1$ ,  $-\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.99 (m, 1 H,  $\text{H}_b-1$ ), 4.10 (m, 1 H,  $\text{H}_a-3$ ), 4.15 (m, 2 H,  $\text{H}_b-3$ ,  $\text{H}-2$ ), 5.21 (s, 2 H,  $\text{PhCH}_2\text{O-}$ ), 6.71 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH}2'-\text{ArH}3'} = 8.4$  Hz,  $\text{ArH}-2'$  oder  $\text{H}-3'$ ), 6.77 (d, 1 H,  $\text{ArH}-2'$  oder  $\text{H}-3'$ ), 7.35 (m, 1 H,  $\text{ArH}-4''$ ), 7.41 (m, 2 H,  $\text{ArH}-3''$ ,  $-5''$ ), 7.52 (m, 4 H,  $\text{ArH}-6'$ ,  $-7'$ ,  $-2''$ ,  $-6''$ ), 8.20 (m, 1 H,  $\text{ArH}-5'$  oder  $\text{H}-8'$ ), 8.30 (m, 1 H,  $\text{ArH}-5'$  oder  $\text{H}-8'$ )

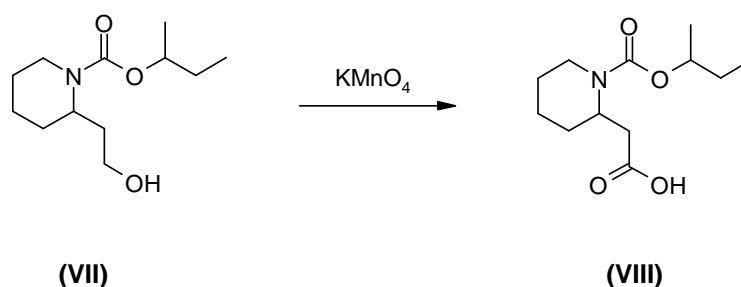
• **(±)-3-(4-Hydroxy-1-naphthoxy)-1-(1-methylethyl)amino-2-propanol (VI) (OHPL)**

Zu einer Lösung von **Vif** (0.60 g, 1.6 mmol) in 200 mL Diethylether wurden unter Eiskühlung 50 mL einer 3 %igen Lösung von HCl-Gas in Diethylether hinzugefügt. Das Lösungsmittel wurde anschließend entfernt, so dass Hydrochlorid von **Vif** erhalten wurde

(657 mg, 1.6 mmol). Eine Suspension von Palladiumhydroxid auf Aktivkohle (20 %ig, 407 mg) in 15 mL Diethylether wurde für 20 min bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Eine Lösung von **Vif** (657 mg) in 38 mL Diethylether wurde hinzugefügt und der gesamte Ansatz anschließend für 1.5 h unter denselben Bedingungen rühren gelassen. Es wurden 300 mL Ethanol hinzugefügt, der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mit Ethylacetat und Diethylether gewaschen, so dass 300 mg (0.96 mmol) eines braunen nadelartigen Feststoffes (**VI**) erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 1.35 (d, 6 H,  $^3J_{\text{CH}_3\text{-CH}} = 6.5$  Hz,  $-\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.20 (dd, 1 H,  $^2J_{\text{Ha}_1\text{-Hb}_1} = 12.7$  Hz,  $^3J_{\text{Ha}_1\text{-H}_2} = 9.7$  Hz,  $\text{H}_{\text{a}-1}$ ), 3.34 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{Hb}_1\text{-H}_2} = 3.0$  Hz,  $\text{H}_{\text{b}-1}$ ), 3.45 (m, 1 H,  $-\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.07 (dd, 1 H,  $^2J_{\text{Ha}_3\text{-Hb}_3} = 9.8$  Hz,  $^3J_{\text{Ha}_3\text{-H}_2} = 5.7$  Hz,  $\text{H}_{\text{a}-3}$ ), 4.14 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{Hb}_3\text{-H}_2} = 5.0$  Hz,  $\text{H}_{\text{b}-3}$ ) 4.34 (m, 1 H, H-2), 6.69 (d, 1 H,  $^3J_{\text{ArH}_2'\text{-ArH}_3'} = 8.2$  Hz, ArH-2 oder H-3), 6.74 (d, 1 H, ArH-2 oder H-3), 7.42 – 7.44 (m, 2 H, ArH-6, Ar H-7), 8.10 - 8.13 (m, 1 H, ArH-5 oder H-8), 8.15 – 8.17 (m, 1 H, ArH-5 oder H-8)

#### 7.1.7. Bayrepel (**VII**) und Bayrepel-Säure (**VIII**)



#### • Isolierung von Bayrepel

Es wurden 50 mL einer Autan-Sprühlotion mit 60 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 30 mL Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde bei Normaldruck destilliert, so dass 7.0 g einer farblosen öligen Flüssigkeit (**VII**) erhalten wurden.

DC ( $\text{SiO}_2$ , PE/EtOAc 2:1):  $R_f = 0.4$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.06 (dd, 3 H,  $^3J_{\text{CH}_2\text{-CH}_3} = 5.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.22 (dd, 3 H,  $^3J_{\text{CH-CH}_3} = 6.3$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$ ), 1.35 – 2.00 (m, 9 H,  $-\text{C}_3\text{H}_6-$ ,  $-\text{CH}_{2\text{a}}\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.93 – 2.00 (m, 1 H,  $-\text{CH}_{2\text{b}}\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2.71- 2.76 (m, 1 H,  $^2J_{\text{Ha-Hb}} = 15.7$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 2.5$  Hz,  $-\text{NCH}_{2\text{a}}$ ), 3.36 – 3.41 (m, 1 H,  $-\text{CH}_{2\text{a}}\text{OH}$ ), 3.59 – 3.62 (m, 1 H,  $-\text{CH}_{2\text{b}}\text{OH}$ ), 4.01 – 4.04 (m, 1 H,  $-\text{NCH}_{2\text{b}}$ ), 4.45 – 4.48 (m, 1 H,  $-\text{N-CH}$ ), 4.73 – 4.81 (m, 1 H,  $-\text{CHCH}_3$ )

**• Darstellung von Bayrepel-Säure**

2.4 g **VII** (10.5 mmol) wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst und 30 mL Wasser und 0.5 mL Aliquat 336 hinzugefügt. In der Kälte (0 °C) wurden portionsweise 4.0 g (25.3 mmol) Kaliumpermanganat hinzugefügt und der Ansatz für 3 h in der Kälte rühren gelassen. Die violette Lösung wurde anschließend bis zur Entfärbung mit gesättigter Natriumhydrogensulfidlösung versetzt, wobei sie sich erwärmte und es ein weißer Niederschlag ausfiel. Es wurde verdünnte Schwefelsäure bis zur vollständigen Auflösung des Niederschlags hinzugefügt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden noch zweimal mit Wasser gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abschließend bei vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: MeOH/DCM 1:20). Es wurden 240 mg (0.9 mmol) des gewünschten Produktes (**VIII**) in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO<sub>2</sub>, MeOH/DCM 1:20): R<sub>f</sub> = 0.28

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.90 (t, 3 H, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.20 (dd, 3 H, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub></sub> = 6.3 Hz, -CHCH<sub>3</sub>), 1.40 – 1.69 (m, 8 H, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.55 – 2.68 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>COOH), 2.79 – 2.85 (m, 1 H, <sup>2</sup>J<sub>H<sub>a</sub>-H<sub>b</sub></sub> = 13.0 Hz, -NCH<sub>2a</sub>), 4.05 (d, 1 H, -NCH<sub>2b</sub>), 4.72 – 4.78 (m, 2 H, -N-CH, CHCH<sub>3</sub>)

---

## 7.2. Instrumentelles

### 7.2.1. Verwendete Geräte

#### Gaschromatographie

- **GC-FID**

GC-Typ:	6000 Vega Series 2 (Carlo Erba Instruments, Italien)
Injektor:	On-column-Injektion
Trärgas:	Helium 5.0 (40 kPa)
Vorsäule:	Fused-silica-Säule (deaktiviert), Länge 1 m, ID 520 µm
Detektor:	FID (200 °C)
Detektorgase:	Wasserstoff 5.0 (60 kPa), Sauerstoff (120 kPa)
Make-up-Gas:	Stickstoff 5.0 (60 kPa)
Software:	Chromstar (SCFA & Bruker Franzen Analytik GmbH), Version 3.26

- **GC-MS**

GC-Typ:	Varian 3400 (Varian, USA)
Injektor:	Split/splitless-Injektor 1075 und SPI-Injektor 1093, 200 °C
Autosampler:	CTC A2005 (CTC-Analytics, Zwingen, Switzerland)
Trärgas:	Helium 5.0
Transfer-Line:	250 °C
MS-Typ:	Magnum ITD (Finnigan MAT, Bremen)
Emission:	70 eV, 10 µA
Ionenfalle:	200 °C
Software:	Magnum-DS

- **GC-MS/MS**

GC-Typ:	Varian 3400 (Varian, USA)
Injektor:	Split/splitless-Injektor 1077 und SPI-Injektor 1093, 200 °C
Autosampler:	Varian 8100 (Varian, USA)
Trärgas:	Helium 5.0
Transfer-Line:	250 °C
MS-Typ:	Saturn ITD (Varian, USA)
Emission:	70 eV, 10 µA
Ionenfalle:	220 °C
Software:	Saturn 3

## HPLC

Gynkotec HPLC-System (Germering, Deutschland)

Säulenthmostat: STH 585

Autosampler: GINA 50

Pumpe: Lichrograph L-6200 Gradienten-Pumpe (Merck-Hitachi, Darmstadt)

Detektor: UVD 340S (DAD, UV-VIS), 230 - 420 nm

Fraktionierer: SF-2120 (Advantec/MFS, CA, USA)

Software: Gynkosoft (Version 5.6)

## NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden von der NMR-Abteilung des Instituts für organische Chemie des Department Chemie mit folgenden Geräten aufgenommen:

- Bruker AMX 400 ( $^1\text{H}$  bei 400 MHz,  $^{13}\text{C}$  bei 101 MHz)
- Bruker AV 400 ( $^1\text{H}$  bei 400 MHz,  $^{13}\text{C}$  bei 101 MHz)
- Bruker DRX 500 ( $^1\text{H}$  bei 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  bei 126 MHz)

Die Auswertung erfolgte mittels der Software Mestre-C (Mestrelab Research). Die Signale wurden mithilfe zweidimensionaler Korrelationsspektren zugeordnet (H,H-COSY, C,H-COSY, HMBC und HMQC). Die Spektren wurden entweder unter Verwendung von Tetramethylsilan oder auf das entsprechende Lösungsmittelsignal kalibriert.

## Polarimetrie

Die optischen Drehwerte wurden mit dem Polarimeter 341 von Perkin Elmer bestimmt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in einer Küvette von 1 dm Länge unter Verwendung einer Natriumlampe bei 589 nm.

### 7.2.2. Verwendete Trennsäulen und Chromatographiebedingungen

Im Rahmen der gaschromatographischen Arbeiten wurden die folgenden Trennsäulen und Temperaturbedingungen verwendet:

- DB-5ms (Agilent JW Scientific, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 15 m und 30 m Länge)
  - 70 °C (2min), 20 °C/min, 270 °C (5 min), 83 bzw. 96 kPa
- VF-5ms (Varian, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 15 m und 30 m Länge)
  - 70 °C (2min), 20 °C/min, 270 °C (5 min), 83 bzw. 96 kPa
  - 70 °C (2min), 10 °C/min, 270 °C (5 min), 83 bzw. 96 kPa
- VF-1701ms (Varian, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  Filmdicke, 15 m Länge)
  - 70 °C (2min), 20 °C/min, 270 °C (5 min), 83 kPa



- Hydrodex- $\beta$ -6TBDM (Macherey-Nagel, 0.25 mm ID, 0.1  $\mu$ m Filmdicke, 25 m Länge)
  - 70 °C (15 min), 2 °C/min, 180 °C (60 min); 83 kPa (Ibu, IbuOH, BayCOOH, NPX)
  - 70 °C (15 min), 2 °C/min, 200 °C (60 min); 83 kPa (für DMNPX)
  - 70 °C (2 min), 10 °C/min, 180 °C; 83 kPa (für Bayreperel)
  - 60 °C (15 min), 5 °C/min, 180 °C (80 min), 10 °C/min, 220 °C; 55 kPa (Betablocker, MetoCOOH)

Für die Arbeiten mittels HPLC wurden die folgenden Trennsäulen und Parameter benutzt:

- CC 125/4 Nucleosil 100-5 NO<sub>2</sub> (Macherey-Nagel, 4 × 125 mm Länge)
  - Bedingungen für die Abtrennung von MetoCOOH von Metoprolol und den übrigen Metoprolol-Metaboliten:  
40 % *n*-Hexan (+0.1 % HCOOH)/60 % 2-PrOH, 20 °C, 1.5 mL/min
  - Bedingungen für die Fraktionierung von Metoprolol, MetoK, MetoOH:  
95 % *n*-Hexan (+ 0.2 % DEA)/5 % 2-PrOH, 5 °C, 1.0 mL/min
- Kromasil-CC (Akzo-Nobel, 4.6 × 250 mm Länge)
  - 99 % *n*-Hexan (+ 0.1 % DEA)/1 % 2-PrOH, 5 °C, 0.5 mL/min (für MetoK)
  - 98 % *n*-Hexan (+ 0.1 % DEA)/2 % 2-PrOH, 5 °C, 0.7 mL/min (für MetoOH)
  - 90 % *n*-Hexan/10 % 2-PrOH, 20 °C, 1.5 mL/min (für NLA)
  - 100 % *n*-Hexan, 10 °C, 0.5 mL/min (für MBC)

## 7.3. Derivatisierungen

### 7.3.1. Trifluoracetylierung der Betablocker

Es wurden 100  $\mu$ L der gewünschten methanolischen Standardlösung in einem Vial im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. 200  $\mu$ L einer Mischung aus Trifluoressigsäureanhydrid und Ethylacetat (2:1) wurden hinzugefügt, der Ansatz einige Sekunden geschüttelt und für 40 min bei 60 °C reagieren lassen. Die Lösung wurde anschließend im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und der Rückstand in 200  $\mu$ L *n*-Hexan aufgenommen. Die Lösung wurde mit 200  $\mu$ L gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung entsäuert, mit Wasser bis zur Neutralisation gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde abschließend auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ L reduziert.

### 7.3.2. Trimethylsilylierung/Trifluoracetylierung der Betablocker

Es wurden 100  $\mu$ L der gewünschten methanolischen Standardlösung in einem Vial im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Anschließend wurden 100  $\mu$ L MSTFA hinzugefügt,

der Ansatz einige Sekunden lang geschüttelt und für mindestens 5 min bei 60 °C reagieren lassen. Es wurden 30 µL MBTFA hinzugefügt und der Ansatz für weitere 5 min bei 60 °C reagieren lassen. Die Lösung wurde im Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen und der Rückstand in 100 µL *n*-Hexan aufgenommen.

### 7.3.3. Reaktion mit Chlormethyldimethylsilylchlorid

Zu 2 mL *n*-Hexan wurden 150 µL Chlormethyldimethylsilylchlorid und 150 µL Diethylamin hinzugefügt. Die Mischung wurde kräftig geschüttelt und für 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Für die Derivatisierung wurde der Überstand verwendet.

100 µL der gewünschten Standardlösung wurden in einem Vial im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 25 µL Toluol aufgenommen und 150 µL des vorbereiteten Derivatisierungsmix wurden zugefügt. Die Lösung wurde einige Sekunden geschüttelt und für 20 min bei 80 °C reagieren lassen. Anschließend wurde die Lösung im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in 100 µL *n*-Hexan aufgenommen.

### 7.3.4. Reaktion mit Methylchlormethanoat (MCM)

Es wurden 100 µL der gewünschten methanolischen Lösung in einem Vial mit 150 µL Wasser und 20 µL Pyridin versetzt. Anschließend wurden 14 µL MCM hinzugefügt, das Vial verschlossen und der Ansatz für einige Sekunden kräftig geschüttelt. Dabei war eine Gasentwicklung zu beobachten. Es wurden 200 µL Wasser hinzugefügt und dann wurde der Ansatz mit 400 µL *n*-Hexan extrahiert. Die organische Phase noch zweimal mit jeweils 200 µL Wasser gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und im Stickstoffstrom auf ein Volumen von 100 µL reduziert.

### 7.3.5. Säurekatalysierte Methylierung

In einem Vial wurden 100 µL der gewünschten Lösung zur Trockne eingeeengt und in 200 µL Methanol aufgenommen. Es wurden eine Spatelspitze Natriumsulfat und ein Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt, das Vial verschlossen und einige Sekunden lang geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 60 °C erwärmt. Die Lösung wurde anschließend durch Überführen in ein neues Vial vom Natriumsulfat abgetrennt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (~ 200 µL) neutralisiert. Die Lösung wurde zweimal mit 300 µL Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde dann zweimal mit 200 µL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 100 µL *n*-Hexan aufgenommen.

## 7.4. Probenaufarbeitung

### 7.4.1. Probenvorbereitung

Es wurden 2.0 L der gewünschten Probe über einen Büchner-Trichter mit Glasfaserfilter (Whatman GF/A, 1.6 µm Porengröße) vorfiltriert. Je nach zu untersuchenden Substanzen wurde der pH-Wert der Probe verändert:

- Gruppe 1: Addition von 700 µL Salzsäure (konz.)
- Betablocker: Addition von 700 µL Natronlauge (2 M)

### 7.4.2. Vorbereitung der Extraktionskartuschen

Eine 20 mL Glaskartusche wurde folgendermaßen von unten nach oben ausgestattet mit:

- einem Teflonsieb (19 mm ID)
- einem Glasfaserfilter (22 mm ID, Whatman GF/D, 2.7 µm Porengröße)
- dem Festphasenmaterial:
  - Gruppe 1 und 2: 1 g Oasis HLB *bulk*- Material
  - Gruppe 3: 500 mg SDB-1
- einem zweiten Glasfaserfilter (22 mm ID)
- einem zweiten Teflonsieb (19 mm ID)
- einem Teflonring (20 mm ID), durch den die ganze Packung zusammengepreßt wurde.

Der Auslaß der Kartusche wurde mit einem Ventil versehen, und unmittelbar vor Beginn der Extraktion wurde die gepackte Kartusche konditioniert, indem sie mit folgenden Lösungsmitteln gespült wurde:

- Gruppe 1: 20 mL Methanol, 20 mL Seral-Wasser
- Gruppe 2: 10 mL Chloroform, 10 mL Methanol, 20 mL Seral-Wasser
- Gruppe 3: 25 mL Chloroform/Ethylacetat, 25 mL Chloroform/Methanol, 25 mL Seral-Wasser

Die später verwendeten fertig-gepackten Oasis HLB-Extraktionskartuschen wurden analog konditioniert. Die Kartuschen wurden anschließend komplett mit Seral-Wasser aufgefüllt und mit einem durchbohrten Teflonstopfen verschlossen.

### 7.4.3. Extraktion und Trocknen der Festphase

Die Wasserprobe wurde mit der Extraktionskartusche über einen Teflonschlauch verbunden und die Extraktion wurde bei einem Druck von 800 mbar, der durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, durch Öffnen des Auslaßventils begonnen. Der Druck wurde während der Extraktion langsam erniedrigt, um die Flussrate etwa bei 20 mL/min konstant zu halten. Anschließend wurde das Probengefäß nochmals mit ca. 200 mL Seral-

Wasser gefüllt, geschüttelt und dieses ebenfalls über die Kartusche geleitet. Durch die Extraktionskartusche wurde unmittelbar danach ein Stickstoffstrom geleitet, um die Festphase zu trocknen. Der Trocknungsvorgang dauerte sowohl bei Verwendung von Oasis HLB als auch bei SDB-1 etwa 2 h und konnte optisch verfolgt werden, da die trockene Festphase heller als die nasse war.

#### **7.4.4. Elution**

Die Festphase wurde anschließend mit folgenden Lösungsmitteln eluiert:

- Gruppe 1: 40 mL Methanol
- Gruppe 2: 10 mL Chloroform, 20 mL Methanol, die Eluate wurden vereinigt
- Gruppe 3: 25 mL Chloroform/Methanol, 25 mL Chloroform/Ethylacetat, die Eluate wurden vereinigt

Die Eluate wurden am Rotationsverdampfer eingeengt bis auf etwa 500 µL und anschließend in ein Vial überführt und bis zur Derivatisierung verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt.

## 7.5. Transformationsexperimente

### 7.5.1. Analyse von Metoprolol und Propranolol

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über alle relevanten Daten zu den sieben verschiedenen Metoprolol-Ansätzen und den fünf Propranolol-Experimenten. Bei allen Extraktionen wurden ~ 1L Aliquote abgemessen und nach den entsprechenden in Abschn. 7.4. beschriebenen Anweisungen aufgearbeitet. Der pH-Wert blieb dabei in allen Fällen unverändert.

**Tab. 25: Metoprolol-Ansätze**

Zeitraum	Gesamtvolumen	Dotierungslevel	Extraktionsmaterial	Elution
<b>(1)</b> 15.02. - 25.03.08	5.0 L	100 µg/L	SDB-1	40 mL MeOH
<b>(2)</b> 15.02. - 25.03.08	5.0 L	100 µg/L	SDB-1	40 mL MeOH
<b>(3)</b> 30.06. - 09.08.08	5.55 L	99.8 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(4)</b> 30.06. - 09.08.08	5.0 L	110 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(5)</b> 13.11. - 15.12.08	7.0 L	554 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(6)</b> 06.08. - 01.09.08	5.0 L	110 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(7)</b> 06.08. - 01.09.08	5.0 L	110 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH

**Tab. 26: Propranolol-Ansätze**

Zeitraum	Gesamtvolumen	Dotierungslevel	Extraktionsmaterial	Elution
<b>(1)</b> 15.02. - 25.03.08	5.0 L	97.4 µg/L	SDB-1	40 mL MeOH
<b>(2)</b> 15.02. - 25.03.08	5.0 L	97.4 µg/L	SDB-1	40 mL MeOH
<b>(3)</b> 30.06. - 08.08.08	5.55 L	88.6 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(4)</b> 30.06. - 10.08.08	4.1 L	122.2 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(5)</b> 26.11. - 29.12.08	5.0 L	501 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH

### 7.5.2. Analyse von Bayrepel und Bayrepel-Säure

Es wurden 2.7 L-Braunglasgebinde verwendet, die mit 2.6 L Wasser von der Alster gefüllt waren. Die eine Hälfte davon wurde mit Bayrepel ( $c = 8.17 \mu\text{g/L}$ ), die andere mit Bayrepel-Säure ( $c = 8.12 \mu\text{g/L}$ ) dotiert. Pro Extraktionstag wurde pro Verbindung immer der Inhalt von zwei Flaschen parallel extrahiert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte entsprechend nach Abschn. 7.4. Die Extraktion erfolgte bei unverändertem pH-Wert und es wurden 500 mg SDB-1-Material verwendet. Für die Elution wurden folgende Lösungsmittel verwendet:

- 40 *n*-Hexan
- 40 mL CHCl<sub>3</sub>/EtOAc (1:1)
- 40 mL Methanol

Der erhaltene CHCl<sub>3</sub>/EtOAc-Extrakt wurde komplett eingengt und in 100 µL *n*-Hexan (+ Volumenstandard) aufgenommen. Der erhaltene eingengte methanolische Extrakt wurde mit MCM derivatisiert.

### 7.5.3. Analyse von Naproxen

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über alle relevanten Daten zu den vier verschiedenen Naproxen-Ansätzen in Wasser der Elbe und der Alster. Bei allen Extraktionen wurden ~ 1L Aliquote abgemessen und nach den in Abschn. 7.4. beschriebenen Anweisungen aufgearbeitet. Der pH-Wert blieb dabei in allen Fällen unverändert.

**Tab. 27: Naproxen-Ansätze**

Zeitraum	Gesamtvolumen	Dotierungslevel	Extraktionsmaterial	Elution
<b>(1)</b> 11.08. - 01.09.08	5.0 L	250 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(2)</b> 11.08. - 01.09.08	5.0 L	250 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(3)</b> 21.11. - 29.01.09	5.0 L	508 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH
<b>(4)</b> 21.11. - 29.01.09	5.0 L	508 µg/L	Oasis HLB	40 mL MeOH

## 7.6. Verwendete Chemikalien

Name	Gefahrensymbol	CAS-Nr.	R-Sätze	S-Sätze
<b>Lösungsmittel</b>				
Aceton p. a.	Xi, F	67-64-1	11-36-66-67	9-16-26-45-36/37
Chloroform s. s.	Xn	67-66-3	22-38-40- 48/20/22	(2)-36/37
Dichlormethan s. s.	Xn	75-09-2	40	23-24/25-36/37
Diethylether p. a.	F+, Xn	60-29-7	12-19-22-66-67	(2)-9-16-29-33
Ethanol s. s.	F	64-17-5	11	(2)-7-16
Ethylacetat s. s.	Xi, F	141-78-6	11-36-66-67	(2)-16-26-33
<i>n</i> -Hexan	F, Xn, N	110-54-3	11-38-48/20-62- 65-67-51/53	(2)-9-16-29-33- 36/37-61-62
Methanol s. s.	F, T	67-56-1	11-23/24/25- 39/23/24/25	(1/2)-7-16-36/37-45
2-Propanol s. s.	F, Xi	67-63-0	11-36-67	(2)-7-16-24/25-26
Toluol s. s.	F, Xn	108-88-3	11-38-48/20-63- 65-67	(2)-36/37-62
<b>Derivatisierungsreagenzien</b>				
Chlormethyldimethylsilylchlorid	C	1719-57-9	10-14-35-37-34- 36/37-11	26-36/37/39-45-25- 16
Ethylchlormethanoat	F, T+	541-41-3	11-22-26-34	9-16-26-28-33- 36/37/39-45
<i>N</i> -Methylbis(trifluoracetamid)	Xi	685-27-8	10-34-44	26-36/37/39-45-16
Methylchloromethanoat	F, T+	79-22-1	11-21/22-26-34	14-26-28-36/37/39- 45-63-46-28A-39- 36/37
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoracetamid	Xi	24589-78-4	10-36/37/38	26-36-37/39-16
Trifluoressigsäureanhydrid	C, Xn, N	407-25-0	14-20-35-52/53 - 34-23/24/25	26-36/37/39-43-45- 61-9-8-28A-27

Name	Gefahrensymbol	CAS-Nr.	R-Sätze	S-Sätze
<b>Referenzsubstanzen</b>				
Bayrepel	A	119515-38-7	-	-
Bayrepel-Säure	A	-	-	-
Bisoprolol Hemifumarat	A	104344-23-2	22	-
O-Desmethylnaproxen	Xn, N	52079-10-4	22-43-50/53	36/37-60-61
Ethylhexylmethoxy-cinnamat	A	5466-77-3	-	24/25
Ibuprofen	Xn	15687-27-1	22-63-51/53	36-61-36/37
Hydroxy-Ibuprofen	A	51146-55-5	-	-
4-Methylbenzyliden-campher	N	36861-47-9	36/37/38-50-53	26-37/39-61
Metoprolol Tartrat	A	56362-17-7	52/53-63	22-36/37-57-61
(S)-Naproxen	Xn	22204-53-1	22	36/37
Octocrylene	A	6197-30-4	36/37/38-53	26-37/39-61
Propranolol Hydrochlorid	Xn	318-98-9	22	22
(S)-Propranolol Hydrochlorid	Xn	4199-10-4	22	22
<b>Edukte, Reagenzien, Hilfschemikalien</b>				
Aktivkohle	Xi	7440-44-0	36/37	22-24/25
Aliquat 336	Xn	5137-55-3	22-38-41-50/53-36/37/38-20/21/22	26-39-60-61-36
Ameisensäure	C	64-18-6	35	(1/2)-23-26-45
Ammoniumchlorid	Xn	12125-02-9	22-36	(2)-22
Benzylbromid	Xi	100-39-0	36/37/38	(2)-39
$\alpha$ -Bromacetaldehyd-diethylacetal	Xi	2032-35-1	10-22-23-36/38	16-26-28A-37/39-38-45
Cäsiumfluorid	T, C	13400-13-0	20/21/22	36/37
Diethylamin	F, C	109-89-7	11-20/21/22-35	(1/2)-16-26-29-36/37/39-45
1.4-Dihydroxynaphthalin	Xi, T	571-60-8	25-36/37/38-43	24-26-28A-36/37/39-45
1.2-Dimethoxyethan	F, T	110-71-4	11-19-20-60-61	45-53



Name	Gefahrensymbol	CAS-Nr.	R-Sätze	S-Sätze
DMF	T	68-12-2	61-20/21-36	53-45
2.2-Dimethyl-4-tosyl-oxymethyl-1.3-dioxolan	Xi	7305-59-1	36/37/38	26-36
Epichlorhydrin	T	106-89-8	10-23/24/25-34-43-45	45-53
Essigsäureanhydrid	C	108-24-7	10-20/22-34	(1/2)-26-36/37/39-45
(±)-Glycidol	T	556-52-5	21/22-23-36/37/38-45-60-68	45-53
4-Hydroxyacetophenon	Xi	121-71-1	22-36/37/38	22-24/25-37/39-26-36
4-(2-Hydroxyethyl)phenol	Xi	501-94-0	36/37/38	26-37/39-24/25-36
Hydroxyphenyl-essigsäure	Xi	614-75-5	36/37/38	26-26
Iodmethan	T	74-88-4	21-23/25-37/38-40	(1/2)-36/37-38-45
Isopropylamin	F+, Xi	75-31-0	12-36/37/38	(2)-16-26-29
Kaliumcarbonat	Xn	584-08-7	22-36/37/38-20/21/22	26-36-37/39
Kaliumchlorid		7447-40-7	-	-
Kaliumcyanid	T+, Xn	151-50-8	26/27/28-32-50/53	(1/2)-7-28-29-45-60-61
Kaliumhydroxid	C	1310-58-3	22-35	(1/2)-26-36/37/39-45
Kaliumpermanganat	N, Xn, O	7722-64-7	8-22-50/53	(2)-60-61
Kupferdibromid	Xn	7789-45-9	22-34-50/53	26-36/37/39-45-61
Kupfersulfat	Xn, N	7758-98-7	22-36/38-50/53	(2)-22-60-61
DL-6-Methoxy-alpha-methyl-2-naphtalinmethanol	A	77301-42-9	-	-
Morpholin	C	110-91-8	10-20/21/22-34	23-36-45
1-Naphthol	Xn	90-15-3	21/22-37/38-41	2-22-26-37/39
Natrium	F, C	7440-23-5	14/15-34	(1/2)-5-8-43-45
Natriumborhydrid	T, C, F	16940-66-2	15-24/25-35	7/8-26-36-43-45
Natriumcarbonat	Xi	497-19-8	36	(2)-22-26
Natriumdisulfid	Xn	7681-57-4	22-31-41	(2)-26-39-46

Name	Gefahrensymbol	CAS-Nr.	R-Sätze	S-Sätze
Natriumhydrid (60 % in Paraffin)	F	7646-69-7	15	24/25-43A-7/8
Natriumhydrogen- carbonat		144-55-8	-	-
Natriumhydroxid	C	1310-73-2	35	(1/2)-26-37/39-45
Natriumsulfat		7757-82-6	-	-
3-Nitrobenzol- sulfonylchlorid	C	121-51-7	5-34	26-36/37/39-45
Palladiumhydroxid (auf Aktivkohle)		12135-22-7	11-36/37/38	22-24/25-14-36-26- 20/21-36/37/39-33- 27-16-7/9
Pyridin	F, Xn	110-86-1	11-20/21/22	(2)-26-28
Salzsäure (konz.)	C	7647-01-0	34-37	(1/2)-26-45
Schwefel	Xi	7704-34-9	38	(2)-46
Schwefelsäure (konz.)	C	7664-93-9	35	(1/2)-26-30-45
Tosylchlorid	C, Xi	98-59-9	29-34	26-36/37/39-45
Triethylamin	F, C	121-44-8	11-20/21/22-35	(1/2)-3-16-26-29- 36/37/39-45

### 7.7. Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen, Kat. I und II

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in den Zeiträumen von Mai – Juli 2005, November 2005 – Januar 2006 und April 2009 mit folgenden KMR-Substanzen der Kategorie I und II gearbeitet (Tab. 28).

Tab. 28: Verwendete KMR-Substanzen

CAS-Nr.	Stoffname (IUPAC)	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie (I oder II)
110-71-4	1,2-Dimethoxyethan	Verwendung als Lösungsmittel (15 mL)	Repr. Cat. II
68-12-2	<i>N,N</i> -Dimethylmethanamid (DMF)	Verwendung als Lösungsmittel (230 mL)	Repr. Cat. II
106-89-8	1-Chlor-2,3-epoxypropan (Epichlorhydrin)	Darstellung der Verbindungen <b>IIb</b> und <b>IV</b> (3,5 mL)	Carc. Cat. II
556-52-5	2,3-Epoxy-1-propanol (Glycidol)	Darstellung einer Zwischenstufe der Verbindung <b>VId</b> (1 mL)	Carc. Cat. II Repr. Cat. II

---

## 8. Literatur

- [1] M. Oehme, M. Schlabach, K. Hummert, B. Luckas, E. S. Nordoy: Determination of levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, biphenyls and pesticides in harp seals from the Greenland Sea, *Sci. Tot. Environ.*, **1995**, 162 (2), 75-91.
- [2] S. Jensen: Report of a new chemical hazard, *New Scient.*, **1966**, 32, 612-624.
- [3] J. K. Quirjins, C. G. van der Paauw, M. C. Ten Noever de Brauw, R.H. de Vos: Survey of the contamination of Dutch coastal waters by chlorinated hydrocarbons, including the occurrence of methylthiopentachlorobenzene and di(methylthio)-tetrachlorobenzene, *Sci. Tot. Environ.*, **1979**, 13, 225-233.
- [4] G. Rimkus: Synthetic musk fragrances in the environment, **2004**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [5] EAWAG-News 67: Anthroogene Spurenstoffe im Wasser, Effekte - Risiken - Maßnahmen, Juni **2009**.
- [6] N. C. Mueller, B. Nowack: Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment, *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, 42 (12), 4447–4453.
- [7] B. Crathorne, M. Fielding, C. P. Steel, C. D. Watts: Organic compounds in water: analysis using coupled-column high performance liquid chromatography and soft-ionization mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.*, **1984**, 18 (10), 797-802.
- [8] U. Schwabe, D. Paffrath (eds): Arzneiverordnungsreport 2001, Springer-Verlag, Berlin, **2001**.
- [9] T. A. Ternes, T. Knacker, J. Oehlmann: Körperpflegemittel in der aquatischen Umwelt, *Z. Umweltchem. Ökotox.*, **2003**, 15 (3), 169-180.
- [10] S. Weigel, J. Kuhlmann, H. Hühnerfuss: Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea, *Sci. Environ. Technol.*, **2002**, 295, 131-141.

- 
- [11] H.-J. Stan, T. Heberer, M. Linkhäger: Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System – Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen, Grund- und Trinkwasser?, *Vom Wasser*, **1994**, *84*, 57-68.
- [12] T. Heberer, H.-J. Stan: Vorkommen von polaren Kontaminanten im Berliner Trinkwasser, *Vom Wasser*, **1996**, *86*, 19-31.
- [13] M. Stumpf, T. A. Ternes, K. Haberer, P. Seel, W. Baumann: Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern, *Vom Wasser*, **1996**, *86*, 291-303.
- [14] M. Stumpf, T. A. Ternes, K. Haberer, W. Baumann: Nachweis von natürlichen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern, *Vom Wasser*, **1996**, *87*, 251-261.
- [15] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz: Nachweis von Betablockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt, *Vom Wasser*, **1996**, *87*, 263-274.
- [16] H.-R. Buser, M. D. Müller: Occurrence of the pharmaceutical drug Clofibric acid and the herbicide Mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, *32*, 188-192.
- [17] F. Sacher, E. Lochow, D. Bethmann, H. J. Brauch: Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern, *Vom Wasser*, **1998**, *90*, 233-243.
- [18] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.*, **1999**, *225*, 109-118.
- [19] T. A. Ternes, R. Hirsch, J. Mueller, K. Haberer: Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and  $\beta$ 2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1998**, *362*, 329-340.
- [20] T. A. Ternes, M. Stumpf, B. Schuppert, K. Haberer: Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in Sewage and river water, *Vom Wasser*, **1998**, *90*, 295-309.

- 
- [21] T. A. Ternes: Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Wat. Res.*, **1998**, 32(11), 3245-3260.
- [22] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp: Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples, *J. Chrom. A*, **2000**, 873 (1), 95-106.
- [23] F. Sacher, F. T. Lange, H.-J. Brauch, I. Blankenhorn: Pharmaceuticals in groundwaters, Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, *J. Chrom. A*, **2001**, 938, 199-210.
- [24] T. A. Ternes: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *Tr. Anal. Chem.*, **2001**, 20(8), 419-434
- [25] S. Weigel, K. Bester, H. Hühnerfuss: New methods for rapid solid phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **2001**, 912, 151-161.
- [26] C. D. Metcalfe, B. G. Koenig, D. T. Bennie, M. Servos, T. A. Ternes, R. Hirsch: Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluent of Canadian sewage treatment plants, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2003**, 22(12), 2872-2880.
- [27] B. Gross, J. Montgomery-Brown, A. Naumann, M. Reinhard: Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2004**, 23(9), 2074-2083.
- [28] S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss: Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas-chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **2004**, 1023, 183-195.
- [29] T. Reemtsma, S. Weiss, J. Mueller, M. Petrovic, S. Gonzalez, D. Barcelo, F. Ventura, T. P. Knepper: Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European perspective, *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40, 5451-5458.

- 
- [30] M. Petrovic, D. Barcelo: Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, *Comprehensive Anal. Chem.*, **2007**, 50, 14.
- [31] B. I. Escher, N. Bramaz, M. Richter, J. Lienert: Comparative ecological hazard assessment of beta-blockers and their human metabolites using a mode-of-action-based test battery and a QSAR approach, *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40(23), 7402-7408.
- [32] B. I. Escher, J. L. M. Hermens: Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects, *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36 (20), 4201-4217.
- [33] C. G. Daughton: Environmental stewardship and drugs as pollutants, *Lancet.*, **2002**, 360 (9339), 1035-1036.
- [34] B. Halling-Sørensen, S. N. Nielson, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. Holten-Lützhøft, S. E. Jørgensen: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review, *Chemosphere*, **1998**, 36 (2), 357-393.
- [35] C. G. Daughton, T. A. Ternes: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, *Environ. Health Perspect.*, **1999**, 107(6), 907-938.
- [36] C. E. Purdom, P. A. Hardiman, V. J. Bye, N. C. Eno, C. R. Tyler, J. P. Sumpter: Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, *Chem. Ecol.*, **1994**, 8, 275-285.
- [37] E. J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G. C. Brighty, M. Waldock, J. P. Sumpter: Identification of estrogenic chemicals in STP effluent. 2. In vivo responses in trout and roach, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32, 1559-1565.
- [38] K. Kümmerer: Resistance in the environment, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2004**, 54, 311-320.
- [39] V. J. Harwood, M. Brownell, W. Persusek, J. E. Whitlock: Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken faeces in the united states, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67, 4930-4933.

- 
- [40] A. Iversen, I. Kuhn, A. Franklin, R. Möllby: High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 2838-2842.
- [41] S. R. Andersen, R. A. Sandea: Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, *60*, 908-912.
- [42] C. D. Miranda, R. Zemelman: Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile, *Mar. Pollut. Bull.*, **2001**, *42*, 1096-1102.
- [43] EU-Richtlinie 2004/27/EG
- [44] EU-Richtlinie 2004/28/EG
- [45] EU-Projekt POSEIDON: Assessment of technologies for the removal of pharmaceutical and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, **2001-2003**.  
<http://www.eu-poseidon.com>
- [46] EU-Projekt REMPHARMAWATER: Ecotoxicological assessments and removal technologies for pharmaceuticals in wastewater, **2001-2003**.
- [47] T. Walle, J. G. Webb, E. E. Bagwell, U. K. Walle, H. B. Daniell, T. E. Gaffney: Stereoselective delivery and actions of beta receptor antagonists, *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, *37 (1)*, 115-124.
- [48] G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher, F. Kohler: Chromatographic racemic separation of Thalidomide and teratogene activity of its enantiomers, *Arzneim.-Forsch.*, **1979**, *29*, 1640-1642.
- [49] W. A. König: *The practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*, Hüthig Verl., Heidelberg, **1987**.
- [50] E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1991**.



- 
- [51] S. Caccia: Metabolism of the newer antidepressants - An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications, *Clin. Pharmacokinet.*, **1998**, *34*, 281-302.
- [52] K. O. Borg, F. Carlsson, K.-J. Hoffmann, T.-F. Jonsson, H. Thorin, B. Wallin: Metabolism of metoprolol-(<sup>3</sup>H) in man, the dog and the rat, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **1975**, *36 (Suppl. V)*, 125-135.
- [53] J. A. Nathanson: Stereospecificity of beta adrenergic antagonists: *R*-enantiomers show increased selectivity for beta-2 receptors in ciliary process, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1988**, *245(1)*, 94-101.
- [54] P. M. Cerqueira, E J. Cesarino, F. H. Mateus, Y. Mere jr., S. R. C. J. Santos, V. L. Lanchote: Enantioselectivity in steady-state pharmacokinetics of Metoprolol in hypertensive patients, *Chirality*, **1999**, *11*, 591-597.
- [55] S. S. Murthy, H. U. Shetty, W. L. Nelson, P. R. Jackson, M. S. Lennard: Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of Metoprolol, *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *40 (7)*, 1637-1644.
- [56] F. Li, S. F. Cooper, M. Côté: Determination of the Enantiomers of Metoprolol and its major acidic metabolite in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chrom. B*, **1995**, *668*, 67-75.
- [57] H.-K. Lim, P.T. Linh, C.-H. Hong, K.-H. Kim, J.-S. Kang: Enantioselective determination of Metoprolol and its major metabolites in human urine by capillar electrophoresis, *J. Chrom. B*, **2001**, *755*, 259-264.
- [58] P. M. Cerqueira, V. B. Boralli, E. B. Coelho, N. P. Lopes, L. F. Lopes Guimaraes, P. S. Bonato, V. L. Lanchote: Enantioselective determination of Metoprolol acidic metabolite in plasma and urine using liquid chromatography chiral columns: applications to pharmacokinetics, *J. Chrom. B*, **2003**, *783*, 433-441.
- [59] P. M. Cerqueira, E J. Cesarino, C. Bertucci, P. S. Bonato, V. L. Lanchote: Stereoselective metabolism of Metoprolol: enantioselectivity of  $\alpha$ -Hydroxymetoprolol in plasma and urine, *Chirality*, **2003**, *15*, 542-549.

- 
- [60] R. F. N. Mills, S. S. Adams, E. E. Cliffe, W. Dickinson, J. S. Nicholson: Metabolism of ibuprofen, *Xenobiotica*, **1973**, 3 (9), 589-98.
- [61] J. V. Andersen, S. H. Hansen: Simultaneous quantitative determination of Naproxen, its metabolite 6-O-desmethylnaproxen and their five conjugates in plasma and urine samples by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica, *J. Chrom.*, **1992**, 577, 325-333.
- [62] T. Walle, U. K. Walle, L. S. Olanoff: Quantitative account of Propranolol metabolism in urine of normal man, *Drug Metab. Disp.*, **1985**, 13 (2), 204-209.
- [63] H. Stierlin, J. W. Faigle: Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile, *Xenobiotica*, **1979**, 9 (10), 611-621.
- [64] M. L. Richardson, J. M. Bowron: The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1985**, 37, 1-12.
- [65] B. Halling-Sørensen, G. Sengelov, J. Tjornelund: Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected Tetracycline-resistant bacteria, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2002**, 42 (3), 263-271.
- [66] R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in the aquatic environment, *Chemosphere*, **2003**, 50, 1319-1330.
- [67] C. Tixier, H. P. Singer, S. Oellers, S. R. Mueller: Occurrence and fate of Carbamazepine, Clofibric acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in surface waters, *Environ. Sci. Technol.*, **2003**, 37(6), 1061-1068.
- [68] 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.*, **1998**, 32 (22), 3449-3456.

- 
- [69] M. W. Lam, C. J. Young, R. A. Brain, D. J. Johnson, M. A. Hanson, C. J. Wilson, S. M. Richards, K. R. Solomon, S. A. Mabury: Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2004**, 23 (6), 1431-1440.
- [70] M. Isidori, M. Lavorgna, A. Nardelli, A. Parrella, L. Previtiera, M. Rubino: Ecotoxicity of Naproxen and its phototransformation products, *Sci. Tot. Environ.*, **2005**, 348, 93-101.
- [71] D. Löffler, J. Römbke, M. Meller, T. A. Ternes: Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 5209-5218.
- [72] H. Hühnerfuss, S. Selke, R. Kallenborn, J. Kuhlmann, S. Weigel: Enzymatic transformation of chiral pharmaceuticals in the environment as revealed by enantioselective chromatography, *Organohal. Compounds*, **2006**, 68, 17-20.
- [73] T. P. Knepper: Analysis and mass spectrometric characterisation of the insect repellent Bayrepel and its main metabolite Bayrepel-acid, *J. Chrom. A*, **2004**, 1046, 159-166.
- [74] W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky: Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 347-362.
- [75] H. Frank, G. J. Nicholson, E. Bayer: Chirale Polysiloxane zur Trennung von optischen Antipoden, *Angew. Chem.*, **1978**, 90 (5), 396-398.
- [76] E. Gil-Av, B. Freibusch, R. Charles-Sigler: Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 10, 1009-1015.
- [77] V. Schurig: Gas chromatographic separation of enantiomers on optically active metal-komplex-free stationary phases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1984**, 23 (10), 747-830.
- [78] V. Schurig, W. Bürkle: Extending the Scope of Enantiomer Resolution by Complexation Gas Chromatography, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104 (26), 7573-7580.

- 
- [79] V. Schurig: Enantiomer analysis by complexation gas chromatography, *J. Chromatogr.*, **1988**, 441, 135-153.
- [80] V. Schurig, H.-P. Nowotny: Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Cyclodextrinderivaten, *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 969-1108.
- [81] W. A. König: *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Hüthig Verl., Heidelberg, **1992**.
- [82] G. Hesse, R. Hagel: Über Inclusions-Chromatographie und ein neues Retentionsprinzip für Benzolderivate, *Chromatographia*, **1976**, 9 (2), 62-68.
- [83] I. W. Wainer, M. C. Alemik: Resolution of enantiomeric amides on a cellulose-based chiral stationary phase, *J. Chrom.*, **1986**, 358, 85-93.
- [84] J. Faller, H. Hühnerfuss, W. A. König, P. Ludwig: Gas chromatographic separation of the enantiomers of marine organic pollutants: Distribution of  $\alpha$ -HCH enantiomers in the North Sea, *Mar. Pollut. Bull.*, **1991**, 22, 82 - 86.
- [85] L. J. Fono, D. L. Sedlak: Use of the chiral pharmaceutical Propranolol to identify sewage discharges into surface waters, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 9244-9252.
- [86] 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.*, **1999**, 33, 2529-2535.
- [87] L. N. Nikolai, E. L. McClure, S. L. MacLeod, C. S. Wong: Stereoisomer quantification of the  $\beta$ -blocker drugs atenolol, metoprolol, and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1131, 103-109.
- [88] S. L. MacLeod, P. Sudhir, C. S. Wong: Stereoisomer analysis of wastewater-derived  $\beta$ -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **2007**, 1170, 23-33.

- 
- [89] L. J. Fono, E. P. Kolodziej, D. L. Sedlak: Attenuation of wastewater-derived contaminants in an effluent-dominated river, *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, *40*, 7257-7262.
- [90] P. A. Bond: Metabolism of Propranolol, a potent, specific  $\beta$ -adrenergic receptor blocking agent, *Nature*, **1967**, *18*, 721.
- [91] S. Weigel: Occurrence, distribution and fate of pharmaceuticals and further polar contaminants in the marine environment, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2003**.
- [92] J. Kuhlmann: Methodenentwicklung und Bestimmung anthropogener organischer Kontaminanten, ihrer Transformationsprodukte und potentiell biogener Organohalogenverbindungen in der aquatischen Umwelt, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2007**.
- [93] S. Selke: Enantioselektive gaschromatographische Trennung von chiralen Pharmazeutika in der aquatischen Umwelt, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **2004**.
- [94] A. P. Roszkowski, W. H. Rooks II, A. J. Tomolouis, L. M. Miller: Anti-inflammatory and analgetic properties of *d*-2-(6'-Methoxy-2'-naphthyl)-propionic acid (Naproxen), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1971**, *179* (1), 114-123.
- [95] EU Direktive 76/768/EEC Annex VII.
- [96] T. Ternes: Qualifizierung und Quantifizierung von Fremdstoffen in Wasser und Fischen aus unterschiedlich belasteten Gewässern mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität Mainz, **1993**.
- [97] J. O. Straub: Concentrations of the UV-Filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic environment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data, *Toxicol. Lett.*, **2002**, *131*, 29-37.
- [98] T. Poiger, H-R. Buser, M. E. Balmer, P.-A. Bergqvist, M. D. Müller: Occurrence of UV-filter compounds from sunscreens in surface water: regional balance in two Swiss lakes, *Chemosphere*, **2004**, *55*, 951-963.

- 
- [99] M. E. Balmer, H.-R. Buser, M. D. Müller, T. Poiger: Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface water, and in fish from Swiss lakes, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 953-962.
- [100] M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, W. Lichtensteiger: In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens, *Environ. Health Perspect.*, **2001**, 109, 239-244.
- [101] M. Nagtegaal, T. A. Ternes, W. Baumann, R. Nagel: Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen aus dem Meerfelder Maar in der Eifel, *UWSF-Z Umweltchem Ökotox*, **1997**, 9, 79-86.
- [102] H.-R. Buser, M. E. Balmer, P. Schmid, M. Kohler: Occurrence of UV-Filter 4-Methylbenzylidene Camphor and Octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants, *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40(5), 1427-1431.
- [103] D. L. Giokas, V. A. Sakkas, T. A. Albanis: Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **2004**, 1026, 289-293.
- [104] P. Kudermann, E. Heath: Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 378, 1343-1350.
- [105] W. Li, Y. Ma, C. Guo, W. Hu, K. Liu, Y. Wang, T. Zhu: Occurrence and behaviour of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant, *Wat. Res.*, **2007**, 41, 3506-3512.
- [106] H. R. Buser, T. Poiger, M. D. Müller: Stereoisomer composition of the chiral UV filter 4-Methylbenzylidene Camphor in environmental samples, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 3013-3019.
- [107] T. Knepper, N. Pilz, P. Seel: Das Insektenrepellent Diethyltoluolamid (DEET): Ein neuer Problemstoff für die Wasserwerke?, *ARW-Bericht*, **1996**, 53, 65-78.

- 
- [108] M. Ervik, K.-J. Hoffmann, K. Kylberg-Hanssen: Selected ion monitoring of Metoprolol and two metabolites in plasma and urine using deuterated internal standards, *Biomed. Mass Spectrom.*, **1981**, 8 (7), 322-326.
- [109] M. S. Leroux, E. G. de Jong, R. A. A. Maes: Improved screening method for beta-blockers in urine using solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom.*, **1989**, 488, 357-367.
- [110] S. B. Black, A. M. Stenhouse, R. C. Hansson: Solid-phase extraction and derivatisation methods for  $\beta$ -blockers in human post mortem whole blood, urine and equine urine, *J. Chrom. A*, **1996**, 685, 67-80.
- [111] O. Gyllendaal, K.-J. Hoffmann: Simultaneous determination of Metoprolol and Metabolites in urine by capillary column gas chromatography as oxazolidineone and trimethylsilyl derivatives, *J. Chrom.*, **1984**, 309, 317-328.,
- [112] H. F. Schmitthener, M. Fedorchuk, D. J. Walter: Resolution of antihypertensive aryloxypropanolamine enantiomers by reversed phase chromatography of (-)-menthyl chloroformate, *J. Chrom.*, **1989**, 487, 197-203.
- [113] M. Ahnoff, S. Chen, A. Green, I. Grundvik: Chiral chloroformates as transparent reagents for the resolution of Metoprolol enantiomers by reversed phase liquid chromatography, *J. Chrom.*, **1990**, 506, 593-599.
- [114] C.-G. Hammar: The formation of cyclized silyl derivatives of  $\beta$ -hydroxyamines and their analyses by means of gas chromatography mass spectrometry, *Biomed. Mass Spectrom.*, **1978**, 5 (1), 25-28.
- [115] M. C. Dumasia, E. Houghton: Screening and confirmatory analysis of  $\beta$ -agonists,  $\beta$ -antagonists and their metabolites in horse urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom.*, **1991**, 564, 503-513.
- [116] D. E. Easterling, T. Walle, E. C. Conradi, T. E. Gaffney: Quantitative analysis of naphthoxylactic acid, a major metabolite of Propranolol in plasma in man, *J. Chrom.*, **1979**, 162, 439-445.

- 
- [117] T. Walle, J. Morrison, K. Walle, E. Conradi: Simultaneous determination of Propranolol and 4-Hydroxypropranolol in plasma by mass fragmentography, *J. Chrom.*, **1975**, 114, 351-359.
- [118] P. Husek: Derivatisation and gas chromatographic determination of hydroxyl-carboxylic acids treated with chloroformates, *J. Chrom.*, **1991**, 547, 307-314.
- [119] N. Peters: Enantioselektive HPLC-Trennung und VCD-Strukturbestimmung von atropisomeren MeSO<sub>2</sub>-PCB sowie Studien über deren Toxizität und deren Verteilung in Biota-Proben, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2002**.
- [120] B. Kofoed-Hansen: Chiral Analysis and Purification using Kromasil CelluCoat, *LC-GC Europe*, **2007**, 31-32.
- [121] B. Mistry, J. L. Leslie, N. D. Eddington: Influence on input rate on the stereospecific and nonstereospecific first pass metabolism and pharmacokinetics of Metoprolol extended release formulations, *Chirality*, **2002**, 14, 297-304.
- [122] K. Balmer, A. Persson, P.-O. Lagerström, B.-A. Persson: Liquid chromatographic separation of the enantiomers of metoprolol and its  $\alpha$ -hydroxy metabolite on Chiralcel OD for determination in plasma and urine, *J. Chrom.*, **1991**, 553, 391-397.
- [123] K. H. Kim, S. D. Shin, J. H. Lee, S. C. Lee, J.-S. Kang, W. Mar, S.-P. Hong, H. J. Kim: Chiral separation of the Enantiomers of Metoprolol and its metabolites by high performance liquid chromatography, *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, 23 (3), 230-236.
- [124] Macherey-Nagel: *Chromatographie-Katalog*, **2001**.
- [125] W. Steck: Harmonisierter Leitfaden für die Validierung von Analysemethoden durch Einzellaboratorien, *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 2019-2034.
- [126] J. Fleming, B. Neidhart, C. Tausch, W. Wegscheider: Glossary of analytical terms, *Accred. Qual. Assur.*, **1996**, 1, 41-43.
- [127] J. Fleming, H. Albus, B. Neidhart, W. Wegscheider: Glossary of analytical terms (II)-(IV), (VI), *Accred. Qual. Assur.*, **1996**, 1, 87-88, 135, 190-191.



- 
- [128] H.-B. Lee, K. Sarafin, T. E. Peart : Determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ 2-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **2007**, 1148, 158-167.
- [129] H.-J. de Geus, P. G. Wester, J. de Boer, U. A. T. Brinkman: Enantiomer fractions instead of enantiomer ratios, *Chemosphere*, **2000**, 41, 725-727.
- [130] S. Selke, M. Scheurell, M. R. Shah, H. Hühnerfuss: Identification and enantioselective gaschromatographic mass-spectrometric separation of O-Desmethylnaproxen, the main metabolite of the drug naproxen, as new environmental contaminant, *J. Chrom. A*, **2010**, in Druck.
- [131] V. Matamoros, M. Hijosa, J. M Bayona : Assessment of the pharmaceutical active compounds removal in wastewater treatment systems at enantiomeric level. Ibuprofen and naproxen, *Chemosphere*, **2009**, 75, 200-205.
- [132] M.-J. Paik, D. T. Ngugen, I. S. Cho, S. Lee, K.-R.Kim: Measurement and identification of (*R*)- and (*S*)-6-O-Desmethylnaproxen enantiomers as diastereomeric O-Ethoxycarbonyl/(*R*)-(+)-1-phenylethylamides in urine by GC and GC-MS, *Chromatographia*, **2006**, 63 (11/12), 623-628.
- [133] J. B. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma: Pathways and metabolites of selected acidic pharmaceuticals and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor, *Wat. Res.*, **2005**, 39, 2654-2664.
- [134] T. Walle, T. E. Gaffney: Propranolol metabolism in man and dog: mass spectrometric identification of six new metabolites, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1972**, 182 (1), 83-91.
- [135] F. Bosca, M. A. Miranda, L. Vano, F. Vargas: New photodegradation pathways for Naproxen, a phototoxic nonsteroidal anti-inflammatory drug, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **1990**, 54, 131-134.
- [136] I.T. Harrison, B. Lewis, P. Nelson, W. Rooks, A. Roszkowski, A. Tomolonis, J.H. Fried: Nonsteroidal Antiinflammatory Agents. I. 6-substituted 2-Naphthylacetic acids, *J. Med. Chem.*, **1970**, 13, 203-205.

- [137] S.-H. Jung, P. T. Linh, H.-K. Lim, H.-J. Kim, K.-H. Kim, J.-S. Kang: Enantioselective preparation of Metoprolol and its major metabolites, *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, *23* (3), 226-229.
- [138] L. C. King, G. K. Ostrum: Selective bromination with Copper (II)-bromide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *170*, 3459-3461.
- [139] H. U. Shetty, W. L. Nelson: Chemical aspects of Metoprolol metabolism. Assymmetric Synthesis and absolute configuration of the 3-[4-(1-Hydroxy-2-methoxyethyl)phenoxy]-1-(isopropylamino)-2-propanols, the diastereomeric benzylic hydroxylation metabolites, *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 55-59.
- [140] W. L. Nelson, M. J. Bartels: Absolute configuration of glycerol derivatives. 8. 2-Hydroxy-3-(1-naphthoxy)propionic acid, a major oxidative metabolite of the  $\beta$ -adrenergic antagonist Propranolol, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 1574-1576.
- [141] T. Kumamoto, N. Aoyama, S. Nakano, T. Ishikawa, S. Narimatsu: Synthesis of enantiomeric 4-Hydroxypropranolols from 1,4-Dihydroxynaphthalene, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 791-795.

## 9. Anhang

### Anhang I

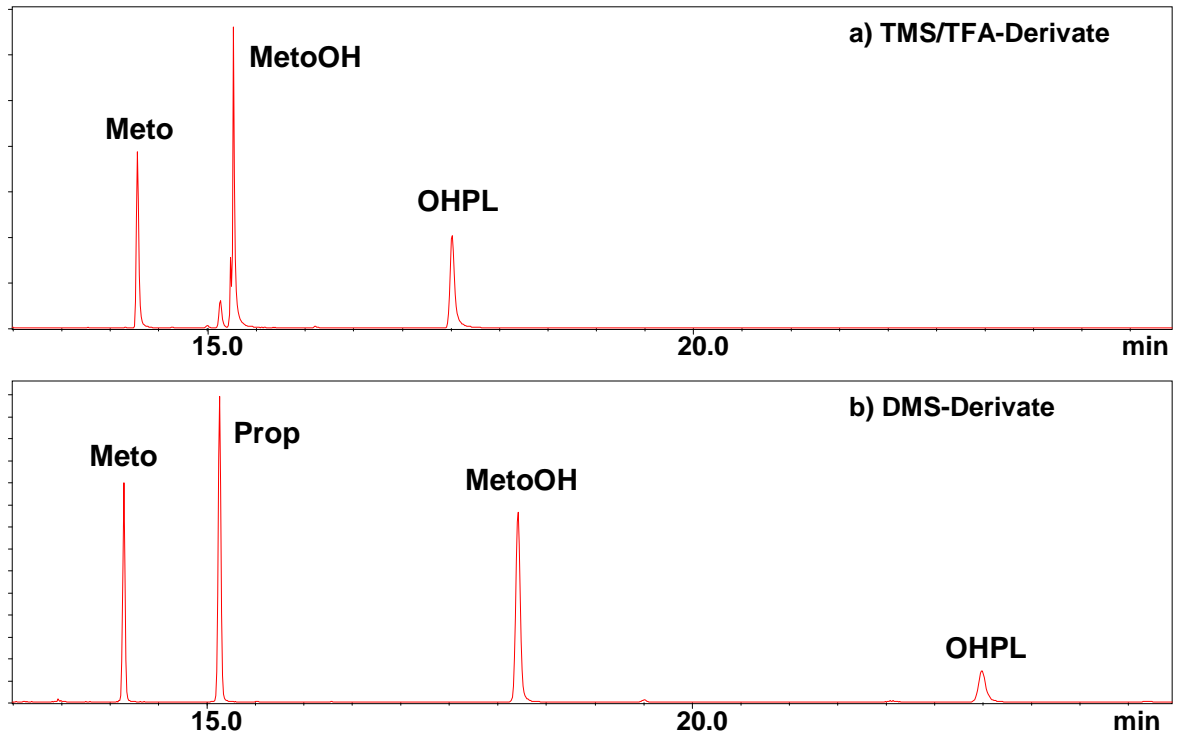


Abb. 84: Chromatogramme der Derivate von MetoOH und OHPL (Säule: DB5-ms, 30 m, Konzentration: 5 µg/mL)

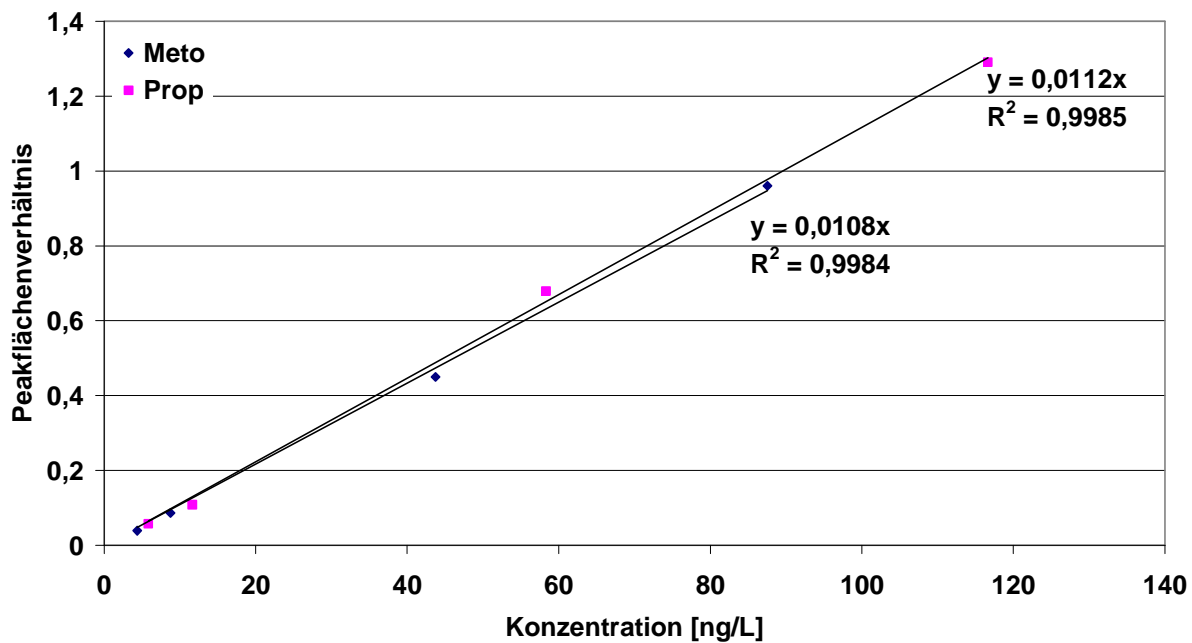
### Anhang II

Tab. 29: Verwendete Wiederfindungsraten für die Abschätzung der Konzentrationen der sauren PPCP (\* nach [91], \*\* nach [92])

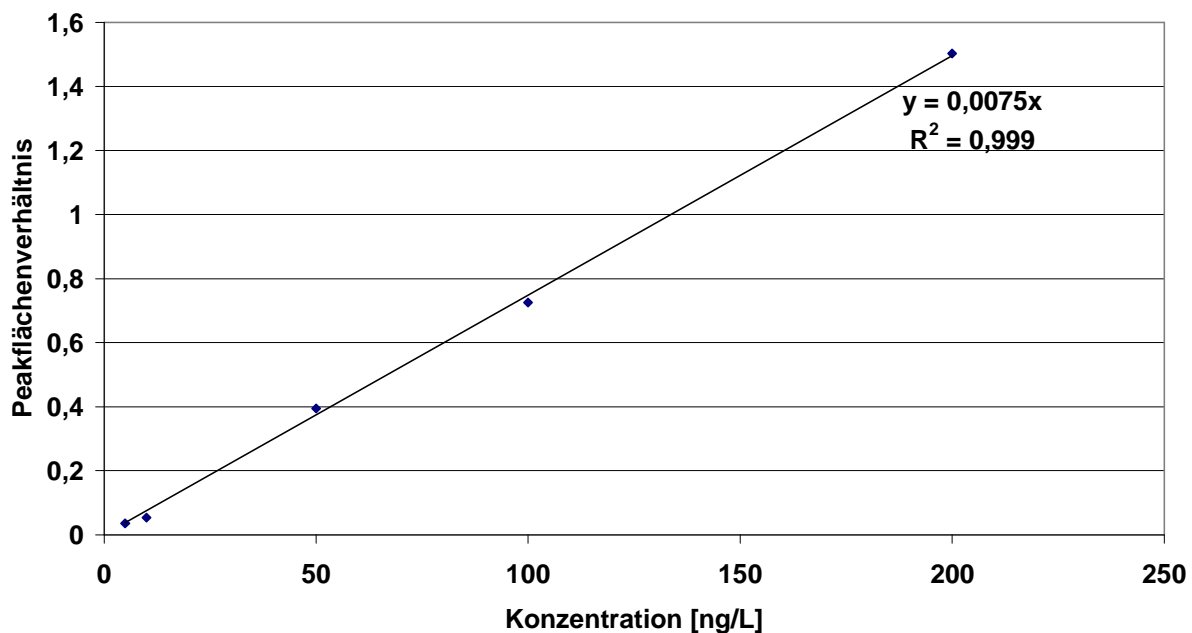
Ibuprofen *	IbuOH *	IbuCOOH *	Naproxen **	Bayrepel-Säure **
74 %	92 %	74 %	80 %	87 %

## Anhang III

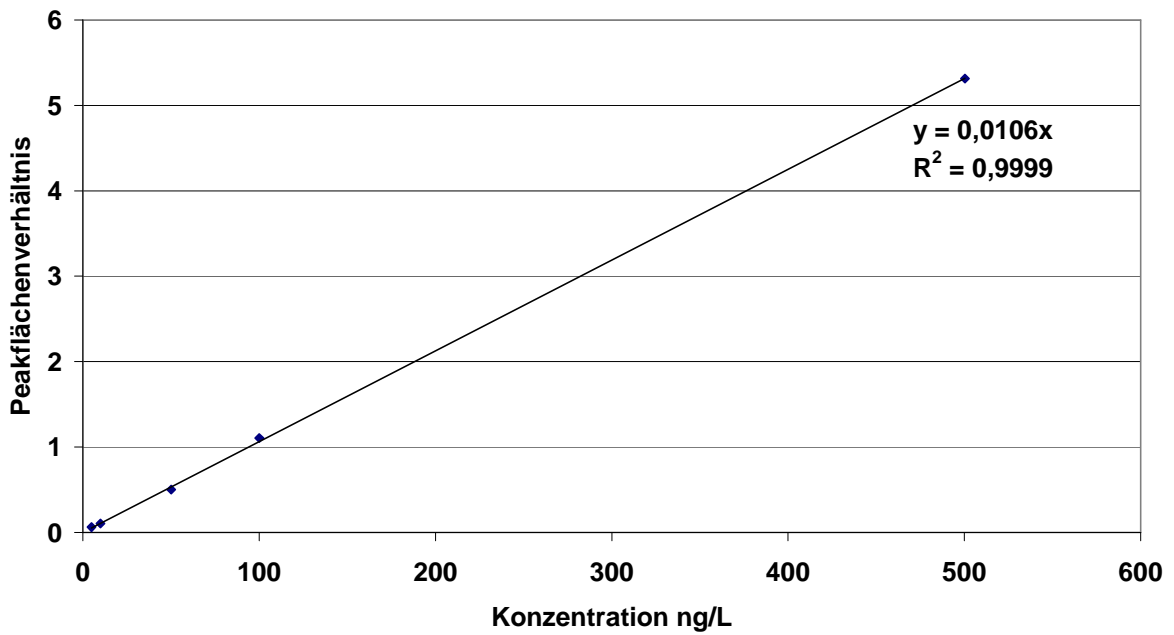
## a) Kalibriergeraden für Metoprolol und Propranolol



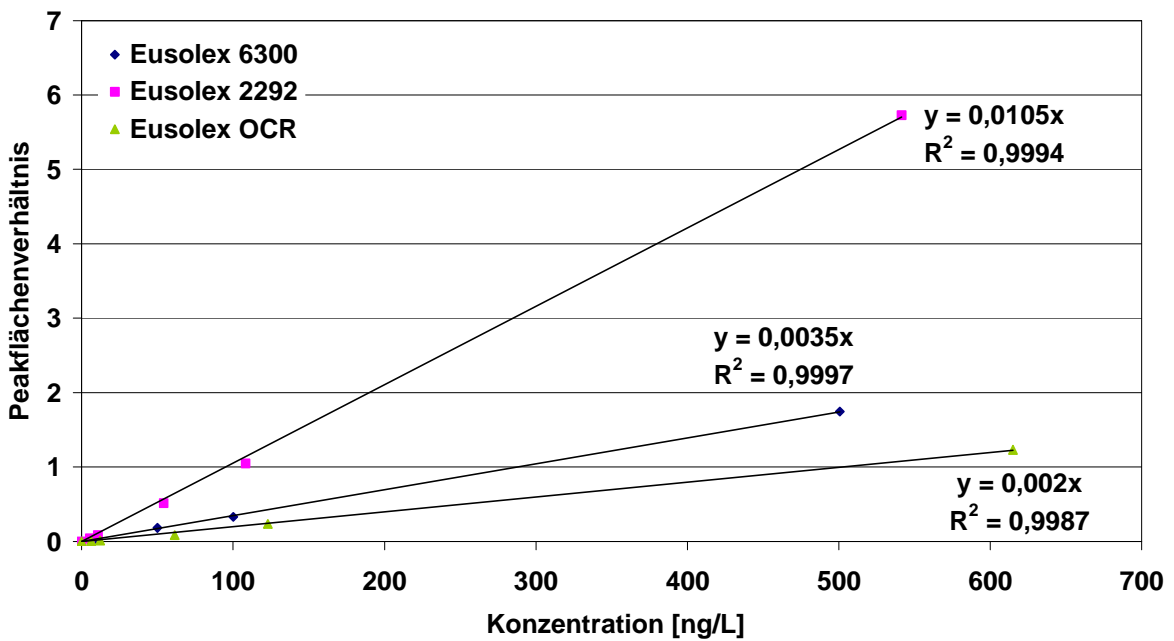
## b) Kalibriergerade für OHPL



## c) Kalibriergerade für NLA

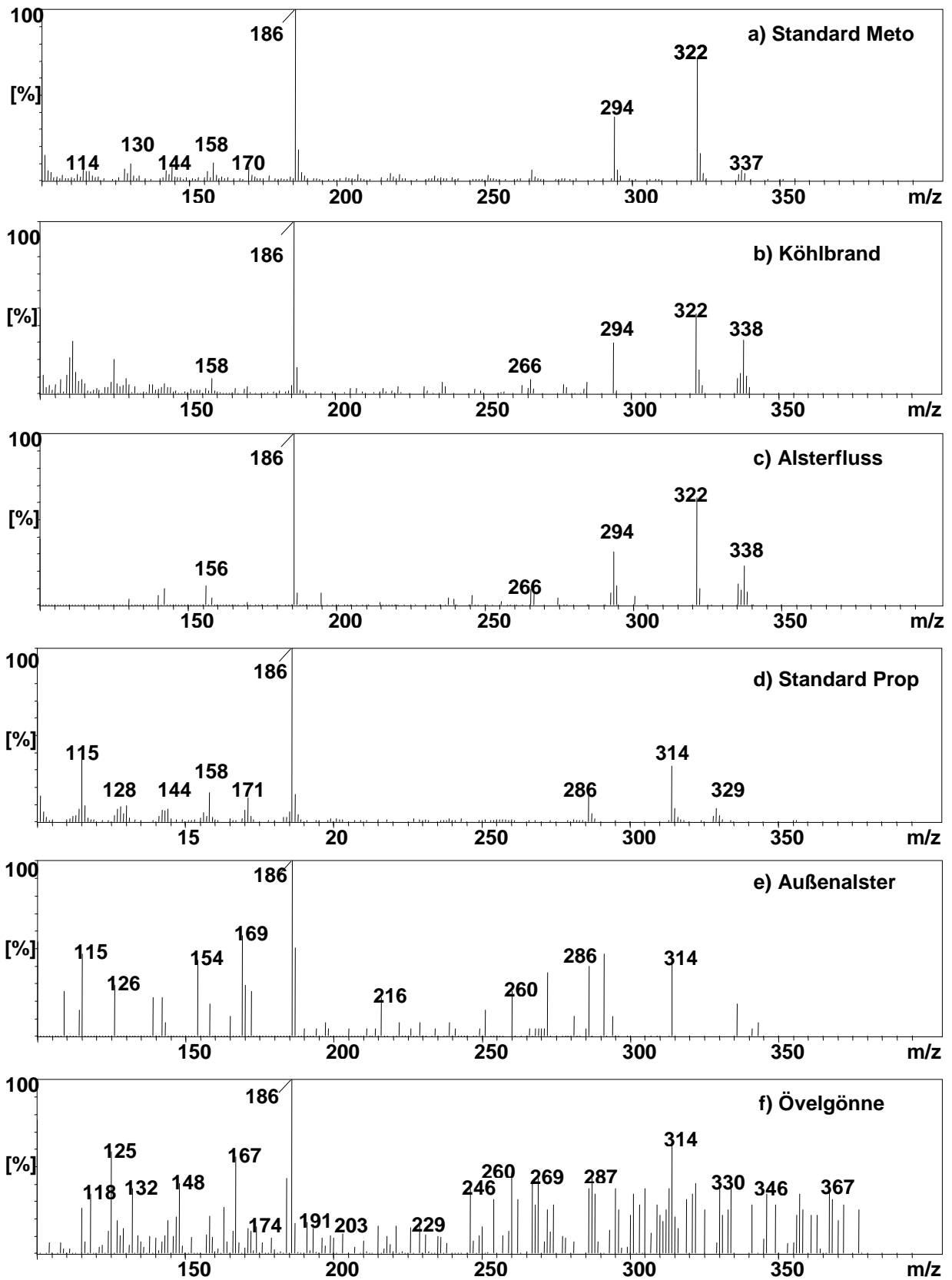


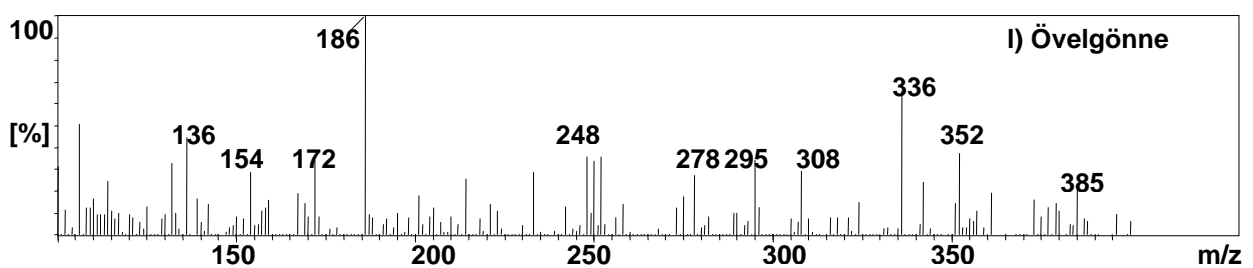
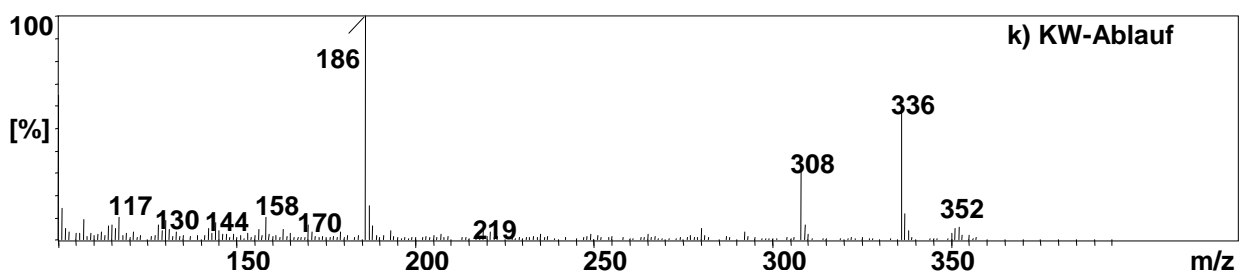
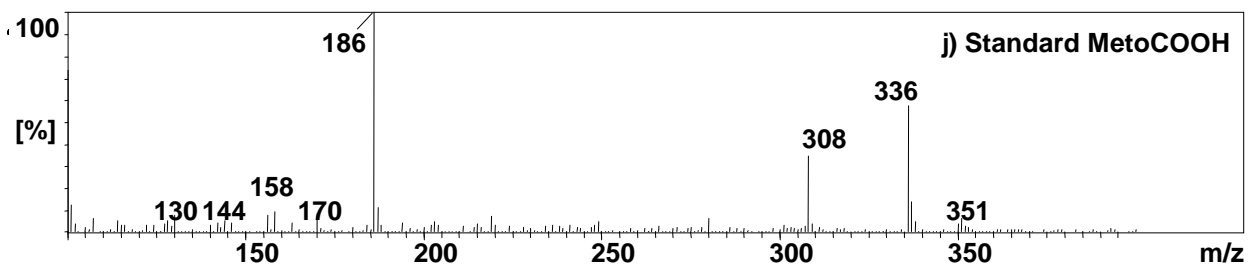
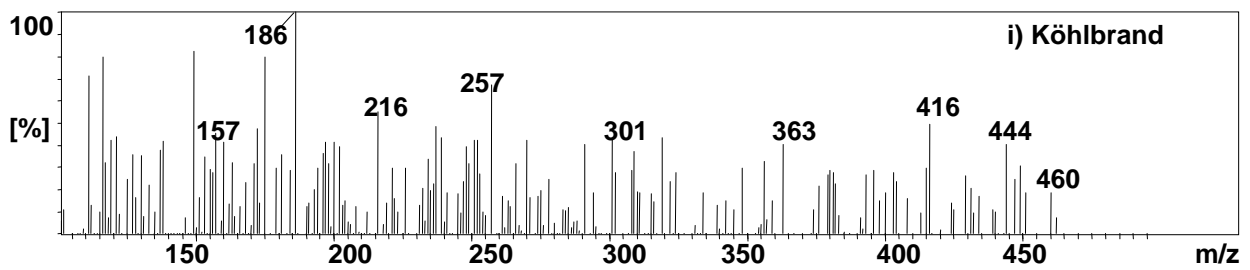
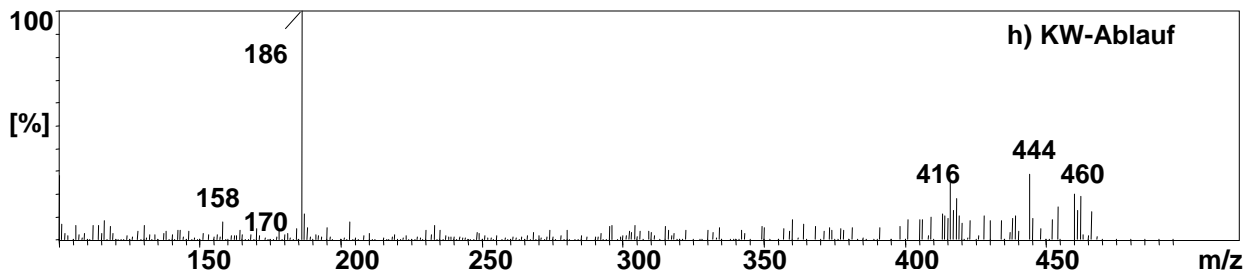
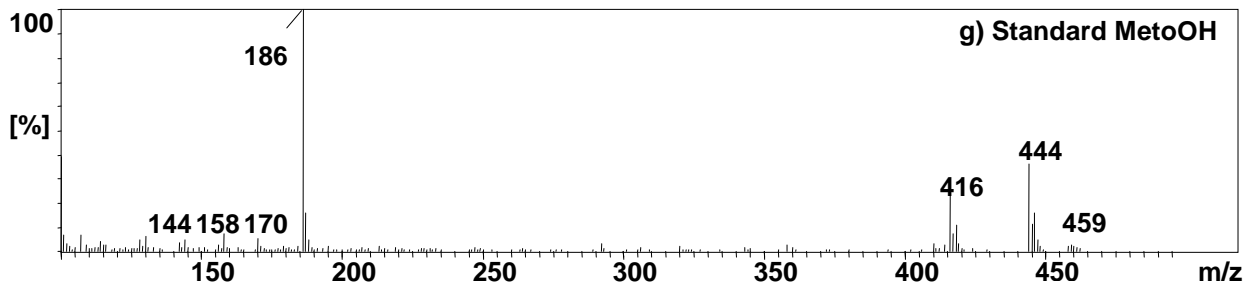
## d) Kalibriergeraden für die UV-Filter



## Anhang IV

## EI-Massenspektren von Metoprolol (a-c) und Propranolol (d-f)



EI-Massenspektren von  $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol (g-i) und Metoprolol-Säure (j-l)

## Anhang V

Tab. 30: Durchschnittliche Konzentrationen von Metoprolol in den Oberflächengewässerproben (in ng/L, \* nicht bestimmbar, da andere chromatographische Parameter benutzt wurden, die eine sichere Quantifizierung nicht gewährleisteten)

Feb. 08 Köhlbrand	Feb. 08 KdL	Feb. 08 Övelgönne	Feb. 08 Außenalster	Feb. 08 Alsterfluss	Nov. 08 Övelgönne	Feb. 09 Köhlbrand
87.4	70.6	75.4	49.2	102.1	49.6	n. b. *

Tab. 31: Konzentrationen der Betablocker und Metaboliten im Klärwerksablauf im Feb. 2009 (in µg/L, \* minimalste Konzentration, da keine WfR bestimmt wurde)

Meto	Prop	Biso	MetoOH	MetoCOOH	MetoK
16.31	0.20	1.45 *	1.06	1.30 *	6.05

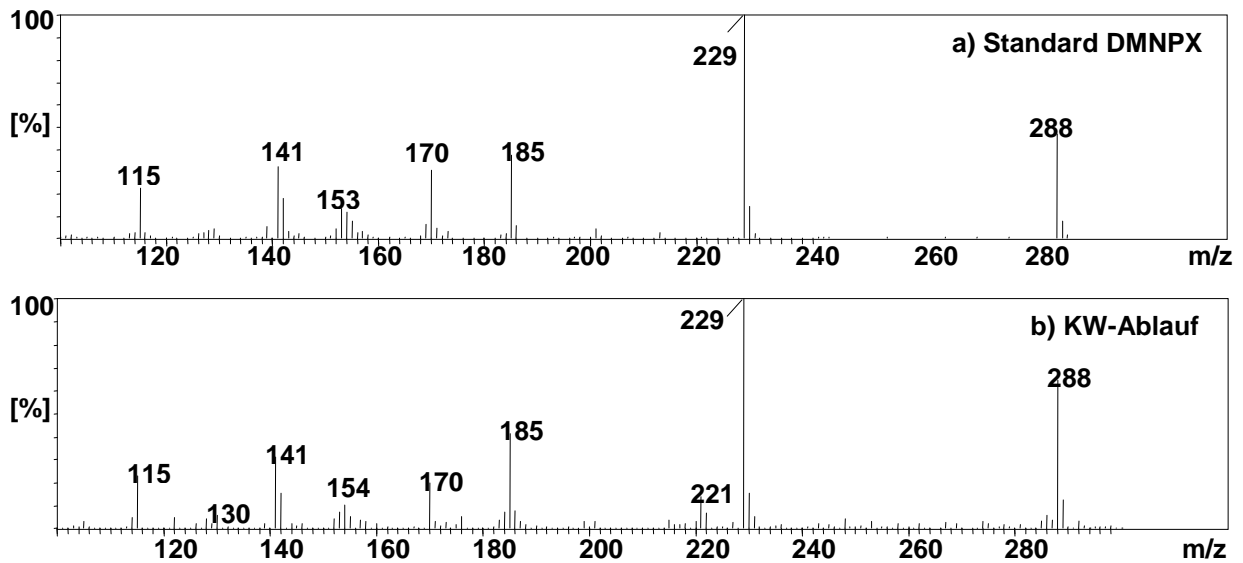
Tab. 32: Abgeschätzte Konzentrationen der sauren PPCP in Proben (in ng/L, \* Verwendung der WfR von Naproxen)

	Ibu	IbuOH	IbuCOOH	BayCOOH	NPX	DMNPX
Feb. 09 KW	41.0	110.3	n. d.	239.2	214.6	205.0 *
Feb. 09 Köhlbrand	8.0	32.9	18.9	9.3	5.6	< LOQ
Feb. 08 Köhlbrand	2.9	15.3	7.8	7.2	2.9	n. d.
Juli 08 Köhlbrand	3.5	n. d.	n. d.	28.4	7.3	n. d.
Feb. 08 KdL	2.9	15.9	6.6	7.5	2.3	n. d.
Feb. 08 Övelgönne	2.8	18.8	10.7	7.9	3.7	n. d.
Juli 08 Fischmarkt	2.4	n. d.	n. d.	16.6	6.7	n. d.
Nov. 08 Övelgönne	2.4	4.2	n. d.	10.9	4.6	n. d.
Okt. 06 Außenalster	1.1	3.8	n. d.	45.0	4.2	n. d.
Feb. 08 Außenalster	1.9	11.9	10.1	n. d.	2.3	n. d.
Juli 08 Außenalster	4.0	n. d.	n. d.	25.7	n. d.	n. d.
Juli 08 Alsterfluss	2.7	n. d.	n. d.	35.2	n. d.	n. d.



## Anhang VI

## EI-Massenspektren von Desmethyl-Naproxen



## Anhang VII

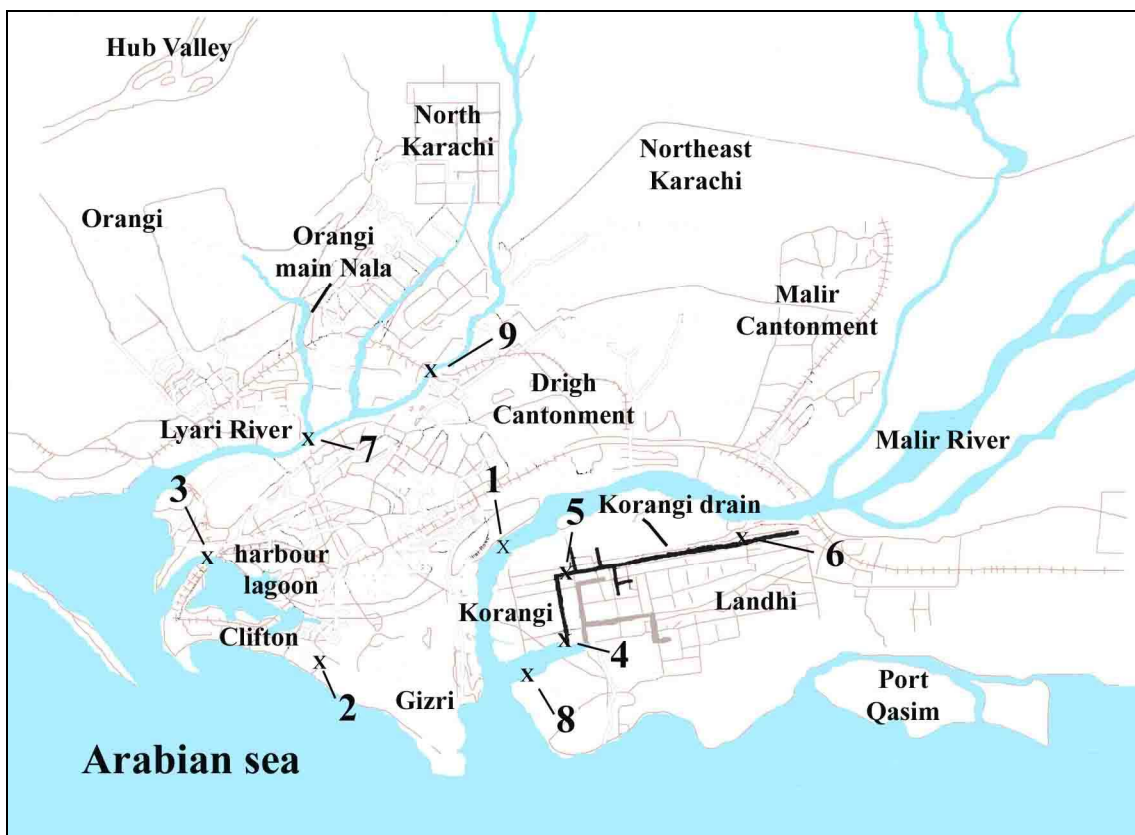


Abb. 85: Karte des Großraums Karachi/Pakistan (aus [130], Probenahmestellen sind mit einem X markiert)

## Anhang IIX

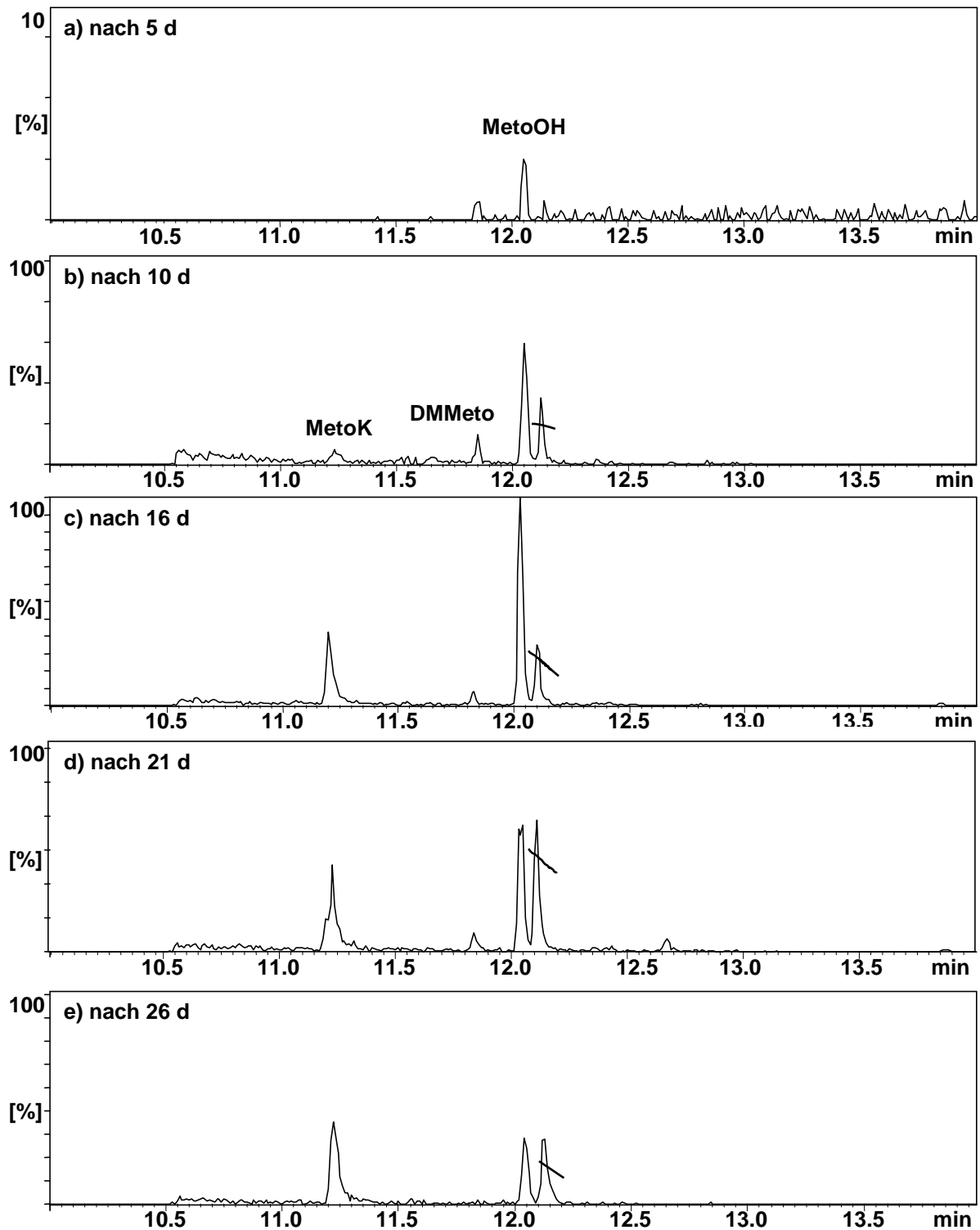


Abb. 86: Chromatogramme der Transformationsexperimente mit dotiertem Wasser der Alster (Säule: VF-1701ms, 15 m, Ionenspur 186, die Peakhöhen wurden relativ zu der des Volumenstandards korrigiert,  $c_{\max}$  [MetoOH] = 100 %)

## Anhang IX

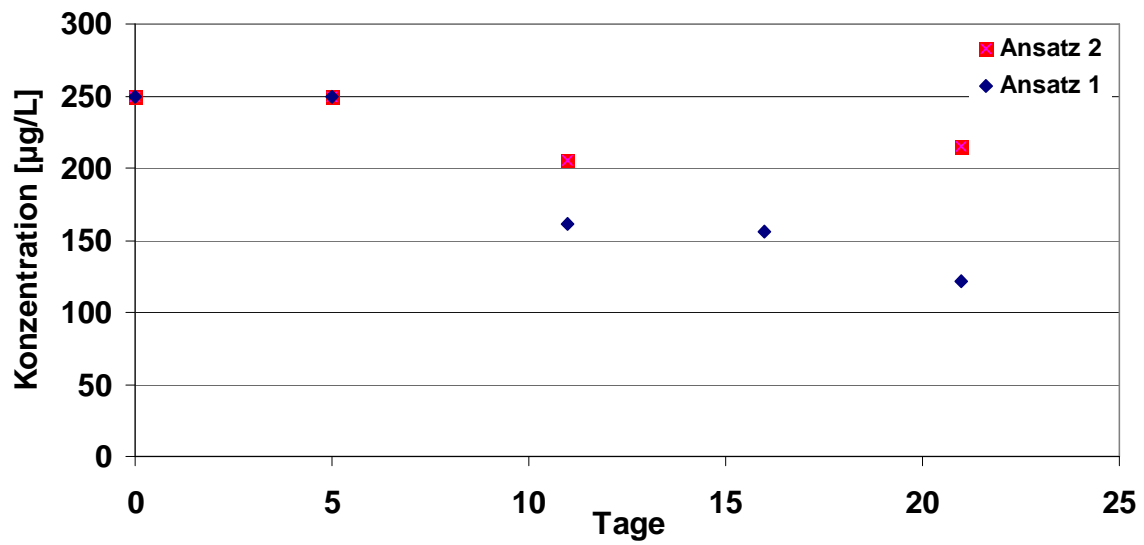


Abb. 87: Konzentration von Naproxen in den dotierten Alsterwasser-Ansätzen an verschiedenen Tagen



## Danksagung

Mein Dank geht zunächst an Dr. Jan Kuhlmann und Dr. Stefan Weigel, die mit ihren umfangreichen Forschungen sozusagen die „Vorarbeit“ geleistet und somit die Basis für mein spannendes und vielfältiges Thema bereitet haben. Durch Jan habe ich ferner zu Beginn alles Grundlegende gelernt, was das analytische und instrumentelle Arbeiten betrifft.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Hai Pham-Tuan bedanken, der mir insbesondere bei allem, was das Enantioselektive betraf, sehr hilfsbereit und geduldig zur Seite stand und der insgesamt mit seiner unermüdlichen und freundlichen Art eine Bereicherung für den Arbeitskreis war.

Ebenso einen ganz herzlichen Dank an Markus Scheurell, der mich vom Beginn meiner Diplomarbeit bis zum Ende meiner Diss begleitet hat und der mir mit der Zeit ein guter Freund geworden ist. Vor allem in Hinblick auf die Launen unserer Geräte, die sich ständig etwas Neues ausgedacht haben, um uns das Leben schwer zu machen, haben wir uns sehr gut ergänzt und sie so am Leben erhalten.

Auch möchte ich mich nochmals bei meinen OC-F- und Schwerpunktspraktikanten, Matthias Böge, Gabi Büttner, Andreas Rehmers und Olli Röhrs (Bleifuß), bedanken, die für den Großteil der präparativen Arbeiten verantwortlich waren, ebenso wie bei den Auszubildenden zum CTA, Viviane Rellinghausen und Sandra Maracke, die mit ihrer kompetenten Art ebenfalls meine Arbeit vorangebracht haben.

Ein GANZ großer Dank geht ferner an alle, die ich in all der Zeit für die Wasserprobenahme rekrutiert habe und die mir bei jedem Wetter fleißig beim Schleppen und Transportieren geholfen haben – und in der Tat vom brennenden Sonnenschein bis zum Schnee haben wir kein Wetter ausgelassen!

An Heike Dannhauer geht auch ein ganz großer Dank, die unseren Etat unter Kontrolle hatte und die es immer so gedreht hat, dass unsere Bestellungen möglich wurden. Ebenfalls Danke für die zahlreichen Gespräche!

Zuletzt möchte ich mich natürlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Heinrich Hühnerfuß, bedanken, der mir dieses tolle Thema überließ und mir alle Freiheiten gewährte, um zum Ziel zu gelangen. Schade, dass seine aktive Zeit nun zu Ende geht, denn gerade mein Thema ist längst noch nicht ausgereizt und böte die Möglichkeit zu weiteren Forschungen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen, welche ich als solche kenntlich gemacht, verwandt habe.

Ich erkläre außerdem, dass vorher keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg, im April 2010

## Wissenschaftliche Publikationen

- H. Hühnerfuss, S. Selke, R. Kallenborn, J. Kuhlmann, S. Weigel: Enzymatic transformation of chiral pharmaceuticals in the environment as revealed by enantioselective chromatography, *Organohal. Compounds*, **2006**, 68, 17-20.
- S. Selke, H. Hühnerfuss: The enantioselective transformation of the chiral insect repellent Bayrepel® and its main metabolite Bayrepel acid in the aquatic environment, *Organohal. Compounds*, **2007**, 69, 267-270.
- S. Selke, H. Hühnerfuss: Detection and stereoisomer analysis of three Metoprolol metabolites in STP-effluent samples, *Organohal. Compounds*, **2009**, 71, 463-467.
- S. Selke, M. Scheurell, M. Raza Shah, H. Hühnerfuss: Identification and enantioselective gaschromatographic mass-spectrometric separation of O-Desmethylnaproxen, the main metabolite of the drug naproxen, as a new environmental contaminant, *J. Chrom. A*, **2010**, 1217, 419-423.
- H. Hühnerfuss, S. Selke, M. Scheurell, M. R. Shah, S. Nadeem: The drug naproxen and its transformation products as an example for emerging environmental pollutants, *Organohal. Compounds*, **2010**, 72, in Druck.