Die approbierte Originalversion dieser Diplom-/Masterarbeit ist in der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt und zugänglich.
http://www.ub.tuwien.ac.at

The approved original version of this diploma or master thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology.
http://www.ub.tuwien.ac.at/eng

TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
Vienna University of Technology

……

Unterschrift (Betreuer)

Diplomarbeit

Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von Östrogenen im Oberflächengewässer und Abwasser mittels Online-SPE-LC-MS/MS

Ausgeführt am Institut für

Chemische Technologien und Analytik der Technischen Universität Wien und

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA) Duisburg, Deutschland

unter der Anleitung von

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Erwin Rosenberg und

Dr. Jochen Türk

durch

Tamara Sumalowitsch, BSc

Pappenheimgasse 70
1200 Wien

……

Wien, am 27.10.2017

Unterschrift (Student)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zu aller erst ganz herzlichst bei Herrn Prof. Erwin Rosenberg bedanken, ohne dessen Hilfe eine Diplomarbeit in Deutschland nicht möglich gewesen wäre. Der auch stets mit objektiven Ideen zur Problemlösung zur Stelle war und die Arbeit in einem anderen Licht beleuchtet hat.

An Herrn Dr. Jochen Türk geht mein Dank ganz besonders für die tolle Aufnahme in seinem Team und für die Tipps und Anregungen, ohne die ich den richtigen Weg in meiner Arbeit nicht hätte einschlagen können. Der mir zahlreiche Möglichkeiten geboten hat mein Potential zu entfalten und mich auch stets mit neuen Aufgaben gefordert hat. Auch Herrn Dr. Thorsten Teutenberg gebührt mein Dank für seine Unterstützung und Hilfestellungen, sowie aufmunternden Worten und praktische Ideen bei systembedingten Schwierigkeiten.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia vom Eyser bedanken, die nicht müde wurde bei den unterschiedlichsten Arten von Fehlern an meiner Seite zu sitzen und gemeinsam das Gerät wieder zum Laufen zu bringen. Die auch in stressigen Zeiten immer ein Ohr für meine Anliegen hatte und versucht hat notwendige Verbrauchsmaterialien zeitnah zu organisieren. Vor allem auch für die zahlreichen Rheinbesuche in ihrer Freizeit um doch noch kurzfristig eine Probe für mich zur Verfügung zu stellen.

Ein herzliches Danke möchte ich auch an das gesamte Team am IUTA richten, für die tolle Atmosphäre im Labor, Oliver Gassner für die Tage wenn´s mal wieder länger wurde, Fabian Itzel für die Probenahmefahrten und das Tragen und Heben der 10 L Gefäße, sowie Sophia Dircks, Leonie Mönkemeyer und Tobias Werres für den lustigen Kaffeepausentratsch und die Versorgung mit Seelenfutter wie Himbeertarte und Kuchen.

Zu guter Letzt geht mein Dank an diejenigen, die wohl am geduldigsten den Abschluss meines Studiums entgegensehnen. Meinen Eltern, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben und die mich auch in schweren Zeiten immer wieder aufgebaut und motiviert haben, sei es mit Mama´s Hausmannskost oder mit zurückgelegten Autostunden, weil die Lernunterlagen irgendwo vergessen wurden. Meinen Großeltern, die immer noch bei jeder Prüfung eine Kerze anzünden, damit auch alles gut geht und meinem Freund, der mich in Stresssituationen versucht auf andere Gedanken zu bringen und oft im Stillen sitzt damit ich in Ruhe lernen kann.

Abstract

The steroid hormones Estron (E1), 17β-Estradiol (E2) and 17α-Ethinylestradiol (EE2) received broad attention due to their potential as environmental contaminants capable of interfering with the normal function of the endocrine system at very low concentration levels. Therefore they are considered as Endocrine Disrupting Compounds (EDC). The major contribution to the discharge and presence of estrogens in the aquatic environment are effluents of waste water treatment plants, since treatments are not able to remove estrogenic contaminants entirely, resulting in a continuous exposure for aquatic wildlife. Especially the presence of E2 und EE2 is linked to fish feminization, fertility reduction and increase of breast and testicular cancer in humans. Hence E1, E2 and EE2 are currently listed on the *watch list* complementing the Water Framework Directive (European Parliament and Council 2000/60/EG) with limits of detection at pg/L-levels (400 pg/L E1 and E2, 35 pg/L EE2), being a challenge for current analytical methods. Therefore the objective of this thesis is the development of a sensitive online-SPE-LC-MS/MS method for the analysis of E1, E2 and EE2 in surface and waste waters. Effluents from waste water treatment plants in Duisburg as well as surface waters from the river Rhine were used as representative real samples. One part of this thesis focused on the development and improvement of a suitable separation and detection method, where mobile phase additives, chromatographic columns, gradient elution and MS parameter were evaluated. As mobile phase additive ammoniumfluoride showed the most effective signal enhancement up to 800%, due to its $[M-F]^-$ adduct formation and dissociation to $[M-H]^-$ in the gasphase. When choosing an ideal separation column a few criteria such as a suitable separation of the observed estrogens and the matrixpeak interferences and removal of coeluting matrix were taken into account. A Restek Raptor Biphenyl column showed an ideal behaviour, considering the required criteria and was used as separation column in the developed method. The analysis of environmental samples, especially waste water, usually suffers from major matrix based signal suppression, which can be reduced by increasing selectivity. Consequently MS^3 experiments with better selectivity were conducted, but did not show any benefit in signal to noise ratio. Higher selectivity can also be generated by an additional clean up step with MIP cartridges during manual sample preparation, where effective removal of matrix interferences and a better signal intensity was observed, contributing to further investigation of MIP cartridges. For analyte enrichment an additional online SPE step was introduced using CN-cartridges and a washing procedure with 5% acetonitrile. A good compromise between reduced recovery for E1 and signal enhancement for the critical parameter EE2 (highest requirements) could be observed. Method validation showed good method performance in linearity, reproducibility and an exceptional sensitivity with limits of detections meeting the *watch list* requirements for surface waters and E1 and E2 in waste water samples. Only the limit of detection for EE2 is not reached because of high matrix load in effluents of waste water treatment plants.

Kurzfassung

Estron (E1), 17β-Estradiol (E2) und 17α-Ethinylestradiol (EE2) zählen zu den Vertretern der Steroidhormone und zeigen bereits in geringen Konzentrationen negative Auswirkungen auf das endokrine System, sie werden daher auch als endokrine Distruptoren bezeichnet. Der Eintrag in die europäischen Gewässer erfolgt in einem hohen Maß über Kläranlagenabläufe, die als Punktquelle kontinuierlich Östrogene in die Umwelt freisetzen, da ein vollständiger Abbau über die unterschiedlichen Stufen der Kläranlage nicht erreicht wird. Die stetige Exposition an E1, E2 und EE2 führt zu einer nachweisbaren schädlichen Wirkung auf aquatische Lebewesen und die menschliche Gesundheit. Aus diesem Grund hat die EU-Kommission die untersuchten Östrogene auf die Beobachtungsliste im Zuge der Wasserrahmenrichtlinie gesetzt. Dort werden, wegen des hohen Wirkungspotentials, Nachweisgrenzen im pg/L-Bereich (400 pg/L für E1 und E2 sowie 35 pg/L für EE2) festgelegt, die mit dem heutigen Stand der Technik eine analytische Herausforderung sind. Im Zuge dieser Arbeit sollte nun eine zuverlässige, routinetaugliche und empfindliche Analysenmethode zur Bestimmung von E1, E2 und EE2 in Oberflächengewässern und Abwasser mit Hilfe der online-SPE-LC-MS/MS entwickelt werden. Als Realproben dienten Kläranlagenabläufe aus den regionalen Kläranalagen in der Umgebung von Duisburg (Deutschland), sowie Rheinwasser als Vertreter für Oberflächengewässer. Die Ansatzpunkte der Methodenentwicklung können dabei in drei große Bereiche eingeteilt werden. So wurden zunächst in der Entwicklung und Optimierung einer geeigneten analytischen Trenn- und Detektionsmethode unter anderem als Laufmitteladditive Ammoniumfluorid untersuchst, das durch die Bildung eines $[M-F]^-$-Addukts und Zerfall in der Gasphase zu $[M-H]^-$ eine Signalsteigerung von bis zu 800% ermöglicht. Eine Auswahl der geeigneten Trennsäule für das Analysensystem erfolgte anhand definierter Kriterien wie Ausmaß der Trennung der Analyten, Abtrennung von Störkomponenten in der Form von Störpeaks und coeluierender Matrix, wobei eine Restek Raptor Biphenyl Säule für die finale analytische Methode gewählt wurde. Im Zuge der Optimierung unterschiedlichster MS-Parameter erwies sich die Methode als weitgehend robust gegenüber Veränderungen der Quellparameter und zeigte, dass durch zusätzliche Selektivität des untersuchten MS^3-Modus bei dieser Fragestellung keine Steigerung der Empfindlichkeit möglich ist. Ein weiterer Ansatzpunkt beschäftigte sich mit den Aspekten der manuellen Probenvorbereitung, dabei zeigen die Vorversuche mit selektiven MIP-Kartuschen zur Aufreinigung eine gute Abtrennung der Störkomponenten und ein verbessertes Analytsignal und somit einen vielversprechender Ansatz für weitere Untersuchungen. Die Entwicklung eines geeigneten Anreicherungsschritts mittels online-SPE resultierte im Einsatz von CN-Kartuschen und einer Abtrennung von Störkomponenten durch einen Waschschritt mit 5%iger Acetonitrillösung, da ein guter Kompromiss aus Signalsteigerung des kritischen Parameters EE2 (höchste Anforderungen) und Analytverlust (E1) erzielt werden konnte. Eine Charakterisierung der entwickelten Methode resultierte in einer guten Methodenperformance und einer außerordentlichen Empfindlichkeit in Realproben, wodurch die geforderten Nachweisgrenzen der Beobachtungsliste für Oberflächengewässer und E1 und E2 im Kläranlagenablauf erreicht werden können. Lediglich im Kläranlagenablauf wird die Nachweisgrenze für EE2 durch die starke Matrixbelastung nicht erreicht.

Inhalt

1. Einleitung und Zielsetzung 6
2. Theoretischer Hintergrund 9
2.1. Anreicherung und Clean-Up 9
2.1.1. Offline Festphasenextraktion 9
2.1.2. Molecular Imprinted Polymers 11
2.1.3. Online SPE- automatisierte SPE gekoppelt mit LC 12
2.2. Massenspektrometrie 15
2.2.1. Ionensuppression in der Massenspektrometrie 17
3. Stand der Technik 20
4. Material und Methoden 25
4.1. Materialien und Chemikalien 25
4.2. Gerätekonfiguration und Funktionsweise 26
4.3. LC-Modus 28
4.4. Online SPE 29
4.5. Strategie & Konzept der Methodenentwicklung 30
4.6. Methoden und Praktische Arbeit 32
4.6.1. Probennahme 32
4.6.2. Lagerung 33
4.6.3. Manuelle Probenvorbereitung/Anreicherung 33
4.6.4. Laufmitteladditive 35
4.6.5. MRM Tuning und Quellparameteroptimierung 36
4.6.6. Säulenscreening & Totzeitbestimmung 36
4.6.7. Gradientenoptimierung 37
4.6.8. LC-MS Methodenparameter 38
4.6.9. MS^3 Modus 40
4.6.10. Verweilvolumen 40
4.6.11. MIP-Kartuschen zur manuellen Aufreinigung 42
4.6.12. Automatisierte Probenanreicherung SPEDex 5000 42
4.6.13. Kartuschenscreening in der online-SPE 43
4.6.14. Optimierung des Waschschritts in der online SPE 44
4.6.15. Resultierende online SPE-LC-MS-Methode 45
4.6.16. Charakterisierung der online SPE-LC-MS-Methode 46

5. Ergebnisse und Diskussion 48
5.1. Auswahl und Aspekte des chromatographischen Trennsystems und der MS/MS-Detektion 48
5.1.1. Laufmitteladditive 48
5.1.2. Säulenscreening 50
5.1.3. Verweilvolumen 54
5.1.4. Optimierung der Quellparameter 56
5.1.5. MS^3 57
5.2. Aspekte der manuellen Probenvorbereitung 60
5.2.1. MIP-Experiment 60
5.2.2. Horizon SPEDex 5000 62
5.3. Entwicklung eines geeigneten online-SPE Anreicherungs- und Aufreinigungsschrittes 65
5.3.1. Online-SPE Kartuschenauswahl 65
5.3.2. Optimierung der Waschschritte 67
5.4. Analytische Kenndaten und Charakterisierung der online-SPE-LC-MS/MS 70
6. Zusammenfassung und Ausblick 76
7. Literaturverzeichnis 79
8. Abkürzungen 84
9. Abbildungsverzeichnis 85
10. Tabellenverzeichnis 88
11. Anhang 90

1. Einleitung und Zielsetzung

In unserer heutigen Gesellschaft wird eine Vielzahl von organischen Verbindungen verwendet, die bereits vor Jahrzenten in unseren Alltag gefunden haben und aus diesem nicht mehr wegzudenken sind. Hierzu gehören Arzneimittelwirkstoffe, Diagnostika, Hormone, aber auch Haushaltschemikalien, wie Reinigungsmittel, sowie Biozide, Pestizide und unzählige mehr, die wir zu Unmengen konsumieren. Nur wenige dieser Substanzen sind natürlichen Ursprungs, die meisten werden dagegen industriell synthetisiert bzw. verändert. Ein Bewusstsein über die Auswirkungen dieses Konsumverhaltens auf unsere Umwelt ist in der breiten Bevölkerung nur in einigen wenigen Fällen gegeben, meist nur dann, wenn die freigesetzten Mengen des Wirkstoffs das mediale Interesse wecken, wie beim Einsatz von Pestiziden und Insektiziden in der Landwirtschaft. Es zeigt sich jedoch oftmals, dass bereits kleinste Mengen einiger organischer Substanzen starke Effekte auf die Umwelt und unseren Lebensraum haben können. Zu dieser Kategorie zählt auch die Substanzklasse der Steroidhormone, darunter die Sexualhormone Östrogene.

Östrogene sind tetracyclische Verbindungen mit Steran-Grundgerüst, mit zwei Cyclohexanringen, einem Cyclopentanring und einer Phenolgruppe. Die wichtigsten Vertreter sind anhand ihrer Häufigkeit und Wirkungspotentials die natürlichen Östrogene Estron (E1) und 17ß-Estradiol (E2), sowie das synthetische 17α-Ethinylestradiol (EE2).

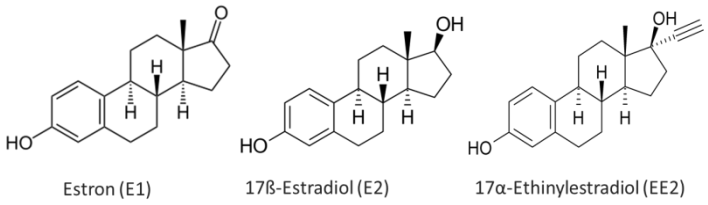

Abbildung 1 Strukturformeln der untersuchten Östrogene

Sie zählen unter anderem zu den biologisch aktiven Substanzen und zeigen bereits in geringen Konzentrationen negative Auswirkungen auf das endokrine System, dieses wird daher auch als endokrine Distruptor bezeichnet. Das endokrine System regelt über Botenstoffe, den Hormonen, viele wichtige Körperfunktionen wie Stoffwechsel, Wachstum und Entwicklung, Fortpflanzung, Schlaf und Stimmung. Zu den beobachteten negativen Effekten gehören irreversiblen Schädigungen in der Entwicklung von Organismen, über die Förderung bestimmter Krebsarten beim Menschen bis hin zur Gefährdung ganzer Populationen durch die deutliche Verschiebung von Geschlechterverhältnissen bei Wildtieren. Eine umfangreiche und detaillierte Betrachtung zum Thema endokrine Distruptoren der WHO aus dem Jahr 2002 kann [1] entnommen werden. Zahlreiche Studien unterstreichen zudem die konkrete Assoziierung von E2 und EE2 mit der Verweiblichung von Fischen [2], [3], sowie negativen Effekte auf die Fortpflanzung von aquatischen Wildtieren [4], [5].

Trotz der Beeinträchtigung und negativen Wirkung auf Mensch und Tier durch stetige Exposition, werden Östrogene in großem Maße als hormonelle Verhütungsmittel, der Anti-Baby-Pille mit dem Hauptinhaltsstoff EE2, oder in der Humanmedizin zu therapeutischen Zwecken bei Osteoporose, Hormonsubstitution in der Menopause, bei Alzheimer und anderen neurodegenerativen Krankheiten eingesetzt. Vom menschlichen Körper werden sie anschließend in konjugierter, biologisch inaktiver Form durch Glucuronidierung oder als Östrogensulfat über den Urin wieder ausgeschieden [6].

Obwohl konjugierte Östrogene die Hauptform beim Verlassen des menschlichen Körpers darstellen, zeigen Studien, dass freie Östrogene als dominante Spezies im Abwasser vorliegen [7], [8], da sie von Enzymen und Mikroorganismen wieder dekonjugiert und somit reaktiviert werden. Vor allem der Einsatz zur Empfängnisverhütung liefert dabei einen großen Beitrag zur Östrogenaktivität im Abwasser [9], so gelangen etwa 700 kg/Jahr an EE2 bezogen auf die gesamte Weltbevölkerung allein durch die Anti-Baby-Pille in die Umwelt [10]. Nicht nur menschliche Ausscheidungen sind verantwortlich für die besagten Östrogene im Abwasser, ein weitaus größerer Faktor, der oftmals vernachlässigt wird, ist die extensive Tierhaltung und Viehzucht. Der resultierende Eintrag an Östrogenen beläuft sich dabei etwa auf einen Faktor fünf im Vergleich zum Menschen [11] und erreicht allein im Vereinigten Königreich bereits Gesamtmengen an E1 und E2 im Bereich von 1315 und 570 kg/Jahr [10].

Die Östrogene erreichen, nach dem Ausscheiden, letzten Endes über das Abwasser die Kläranlage. In dieser werden sie einerseits vorwiegend durch Adsorption an Feststoffe, in der Primärbehandlung mit dem anfallenden Schlamm aus dem Wasser entfernt. Andererseits werden sie in der zweiten Stufe, der biologischen Behandlung, von den eingesetzten Mikroorganismen in geringen Maßen abgebaut, sowie abermals an den auftretenden Mikro-Flocken adsorbiert. Eine Vielzahl von Untersuchungen beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit der Effizienz und dem Ausmaß der Östrogen-Beseitigung, wobei sich im Allgemeinen zeigt, dass eine vollständige Entfernung aus dem Wasser nicht erreicht werden kann, da nur Eliminationsraten im Bereich von 60-90% realisiert werden [12]. Daher stellen Abflüsse von Kläranlagen die größte Quelle von natürlichen und synthetischen Östrogenen in der aquatische Umwelt dar. Es handelt sich dabei um einen permanenten, punktuellen Eintrag, da E1 und E2 laufend endogen produziert werden bzw. inklusive EE2 auch exogenen in Form von Humanarzneimittel langfristig eingenommen werden. So sind auch das Abwasser und damit der Ausfluss aus Kläranlagen permanent mit Östrogenen belastet.

Aus diesem Grund hat sich die europäische Kommission im Jahr 2015 dazu entschlossen im Zuge der Umsetzung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) E1, E2 und EE2 in die Beobachtungsliste aufzunehmen. In der EU-WRRL (2000/60/EG, Artikel 16: „Strategien gegen die Wasserverschmutzung“) wird festgelegt, dass Maßnahmen zur Bekämpfung von Schadstoffen, die ein erhebliches Risiko für die aquatische Umwelt darstellen, umgesetzt werden müssen. Das Ziel ist dabei einen guten chemischen und biologischen Zustand aller Gewässer herzustellen. So werden im Rahmen der WRRL Umweltqualitätsnormen (UQN) festgelegt, die Zielgrößen bzw. Grenzwerte für die prioritären Schadstoffe vorgeben. E1, E2 und EE2 weisen zwar ein erhebliches Gefährdungspotential für die aquatische Umwelt auf, aufgrund unzureichenden Monitoringdaten auf gesamt-europäischer Ebene wurden diese jedoch noch nicht in die Liste prioritärer Stoffe aufgenommen. Die Beobachtungsliste veranlasst nun EU-weit Daten zu sammeln, um bei Bestätigung der europaweiten Belastung E1, E2 und EE2 auf die Liste für prioritäre Schadstoffe zu setzen. Die geforderten Nachweisgrenzen der EU-Kommission für das Monitoring im Zuge der Beobachtungsliste richten sich nach UQN-Vorschlägen und analytischen Möglichkeiten, basierend auf Organismentests und realen Ergebnissen mit Sicherheitsfaktoren und belaufen sich für Estron und 17β-Estradiol auf 0,4 ng/L und für 17α-Ethinylestradiol auf 35 pg/L in Binnen- bzw. Oberflächengewässer. Da jedoch eine Belastungsbeurteilung durchgeführt werden muss und Kläranlagen Punktquellen für Mikroschadstoffe darstellen, werden zudem für den Kläranlagenablauf die erforderlichen Nachweisgrenzen für Oberflächengewässer vorgeschlagen [13], [14].

Ziel dieser Arbeit ist es nun eine geeignete Methode zur Bestimmung von Östrogenen, konkret E1, E2 und EE2, mittels online-SPE-LC-MS/MS im Oberflächengewässer und Abwasser zu entwickeln, um die Vorgaben der EU-Kommission zu erreichen und zudem die Methode am Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) als Routineanalyse einzusetzen. Aufgrund der sehr niedrigen geforderten Nachweisgrenzen in der Beobachtungsliste, ist es zwingend erforderlich Anreicherungsschritte in der Probenvorbereitung durchzuführen. Die gängigste Methode in der Analytik ist hierfür der Einsatz einer Festphasenextraktion (SPE), die zumeist manuell durchgeführt wird. So kann sie bei großen Probenmengen bzw. großer Probenanzahl, aber auch bei stark matrixbelasteten Proben die Waschschritte benötigen, sehr zeit- und laborintensiv werden. Eine hervorragende Alternative zur klassischen SPE bietet die sogenannte online-SPE, bei der die einzelnen Schritte einer Festphasenextraktion vollautomatisch durchgeführt werden. Dadurch wird vor allem der Zeitaufwand, aber auch die Labortätigkeit deutlich reduziert, der Probendurchsatz wiederum erhöht und durch die Automatisierung die Reproduzierbarkeit verbessert. Zudem ergibt sich die Möglichkeit die automatisierte SPE mit einem LC-MS/MS-Gerät direkt zu koppeln und so einerseits Transferschritte zu umgehen und gleichzeitig eine selektive, empfindliche Methode zur Erfassung der Östrogene bereitzustellen. Im Zuge der Östrogenanalytik werden häufig auch GC-MS-Methoden eingesetzt. Der Nachteil im Vergleich zur LC-MS ist jedoch, dass ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt durchgeführt werden muss, der mitunter zu weiteren Analytverlusten und höherem Zeitaufwand führt. So zeigt sich, dass mit der in dieser Arbeit eingesetzter Methodik die besten Voraussetzungen geschaffen werden, um eine routinetaugliche, selektive und empfindliche Methode zur Bestimmung von E1, E2 und EE2 im Oberflächengewässer und Abwasser zu entwickeln.

2. Theoretischer Hintergrund

Das immer größere Ausmaß an Umweltverschmutzung durch menschliches Handeln macht regulatorischen, legislativen Maßnahmen zum Schutze unseres Lebensraums notwendig. Um jedoch geeignete Maßnahmen setzten zu können und auch deren Einhaltung zu überwachen, sind zu verlässliche Daten über das Auftreten und die Konzentration von Schadstoffe in der Umwelt erforderlich. Vor allem im Bereich der Mikroschadstoffe, wo zahlreiche Substanzen im Spuren- und Ultraspurenbereich und zudem in stark matrixbelasteter Umgebung vorkommen, sind zuverlässige, selektive und empfindliche Bestimmungsverfahren unerlässlich. Diese Notwendigkeit ermöglichte die Entwicklung von modernen, analytischen Methoden und Verfahren, wobei die Entwicklung grob in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden kann. Zum einen wurde ein Hauptaugenmerk auf die Verbesserung und Entwicklung neuer Techniken auf Seiten der analytischen Trennung und Detektion forciert. Zum anderen wurden die Verfahren der Probenaufbereitung, in deren Zuge die Aufreinigung, aber vor allem auch Anreicherung der Zielanalyten passiert und bei der jeder Fehler gravierende Auswirkungen auf das Ergebnis haben kann, weiterentwickelt.

Da beide Kategorien eine tragende Rolle für eine zuverlässige Bestimmungsmethode von Schadstoffen, wie auch der Östrogene, spielen, werden in diesem Kapitel die notwendigen theoretischen Aspekte, der in dieser Arbeit eingesetzten Techniken zur Probenvorbereitung aber auch zur Detektion, erläutert. Grundlegende Kenntnisse der genannten Techniken werden hierbei vorausgesetzt.

2.1. Anreicherung und Clean-Up

2.1.1. Offline Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) ist heutzutage die Methode der Wahl im analytischen Labor, wenn die Fragestellung eine Anreicherung der Zielanalyten, bei gleichzeitiger Aufreinigung und Abtrennung der Matrix erfordert. Durch ihren simplen Arbeitsablauf, geringem Lösemittelverbrauch, guter Wiederfindung und hohem Anreicherungsfaktor für eine Vielzahl von Analyten in unterschiedlichster Matrix, hat sich diese Technik im Laufe der Zeit gegen zahlreiche andere Methoden zur Probenvorbereitung durchgesetzt.

Die Pionierarbeit im Bereich der SPE wurde bereits in den 1950er Jahren durchgeführt, als granulierter, aktivierter Kohlenstoff in Stahlzylinder gepackt wurde und somit organische Komponenten im Oberflächenwasser aufkonzentriert und analysiert wurden [15]. In den 1960er Jahren erkannte man bereits, dass aktivierter Kohlenstoff einige Limitierungen und Schwierigkeiten, wie erschwerte Desorption oder chemische Veränderung der desorbierten Verbindungen, zeigt, wodurch in den nachfolgenden Jahrzehnten ein regelrechter Boom in der Entwicklung besserer, modernerer Sorbentsmaterialien entstand [16]. Im Laufe der Zeit haben sich dabei Sorbentien, wie die klassischen, chemisch modifizierten Silikamaterialien oder polymerbasierte Materialien, etabliert und sind heutzutage die gängigsten SPE-Materialien am Markt.

Das Grundgerüst der modifizierten Silikamaterialien ist Silikagel, welches an der Oberfläche unterschiedlichste Formen der Silanolgruppe aufweist, sehr gute mechanische Eigenschaften, sowie eine Temperaturbeständigkeit zeigt und somit als geeignetes Normalphasen-Sorbens verwendet werden kann. Üblicherweise wird jedoch durch die etablierte, gut erforschte Silanchemie, die

Oberfläche mit einer Vielzahl von unterschiedlichsten funktionellen Gruppen modifiziert, um das Anwendungsgebiet deutlich zu erweitern. Die gängigsten sind dabei unpolare Gruppen wie, Octadecyl- (C_{18}), Octacyl- (C_8), Ethyl- (C_2), oder Phenylgruppen (Ph), aber auch polare funktionelle Gruppen wie Aminopropyl- oder Diolgruppen und ionische Gruppen wie quarternäre Amine, die über einen Ionentauschermechanismus geladene Analytmoleküle adsorbieren [17]. Hauptsächlich werden alkylderivatisierte Materialien verwendet, deren Retention der Zielanalyten weitestgehend auf hydrophoben Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Van-der-Waals-Kräften, basieren. Trotz ihrer breiten Anwendbarkeit, haben Silikamaterialien auch einige Nachteile. So zeigen sie geringe Wiederfindung bei der Extraktion schwach polarer bis polarer organischer Substanzen, aber auch eine relativ schlechte pH-Stabilität, vor allem bei extremen pH-Werten [18]. Eine Alternative zu den silikabasierten Sorbentien sind die Polymermaterialien, die im Vergleich eine deutlich bessere pH-Stabilität zeigen und zudem im Falle der HLB-hydrophilic lipophilic balance-Polymere eine gute Wiederfindung im polaren Bereich aufweisen. Die am häufigsten eingesetzten Polymere sind üblicherweise Copolymere aus Polystyrol quervernetzt mit Divinylbenzol, mit einer moderaten spezifischen Oberfläche von 500 m^2/g oder bei höherer Quervernetzung bis zu 1200 m^2/g. Die Interaktion mit den vorzugsweise ungesättigten Probemolekülen basiert dabei auf starken π-π Wechselwirkungen des aromatischen Systems des Sorbensmaterials und erzeugt so eine stärkere Retention für polare Verbindungen [19, 20]. Eine Kombination aus dem beschriebenen Polymergerüst und zusätzlichen funktionellen Gruppen ermöglichen es, die Benetzbarkeit, mit zum Beispiel Wasser, deutlich zu erhöhen und damit den Massentransfer sowie die Interaktion der Zielanalyten mit den funktionellen Gruppen zu unterstützen, wodurch die Retention der polaren Analyten deutlich verbessert wird. Eine kommerzielle, sehr beliebte Variante eines solchen hydrophilisierten Polymers ist Oasis HLB von Waters. Bei diesem Produkt handelt es sich um einen makroporöses Poly(N-vinylpyrrolidondivinylbenzol) bzw. PVP-DVB-Copolymer mit einer spezifischen Oberfläche von etwa 800 m^2/g. C_{18}-Silikamaterialien sind neben HLB-Produkten die am häufigsten verwendeten SPE Sorbentien in der Aufarbeitung von wässrigen Proben und werden in all ihren möglichen Formaten, über klassische Kartuschen, Diskformaten bis hin zu Spezialformaten in der online-SPE, eingesetzt. Sie sind daher aus der Umweltanalytik nicht mehr wegzudenken [18].

Da jedoch die Probleme und Anforderungen immer komplexer werden und immer geringere Nachweisgrenzen gefordert werden, die zum Teil nur über eine Erhöhung der Selektivität erreichbar sind, ist der genannte Vorteil von C_{18}-Silikamaterialien und Polymermaterialien für viele moderne Problemstellungen ein großes Hindernis. So zeigt sich, dass gerade die flexible Anwendung der genannten Sorbentien und die Eignung für ein breites Anwendungsgebiet mit einer Vielzahl von Fragestellungen nicht mehr mithalten kann. Daher hat sich ein Trend hin zu immer selektiveren Materialien entwickelt, die eine spezifische Adsorption des Zielanalyten und damit eine stark verbesserte Matrixabtrennung gewährleisten. Die wohl selektivste Interaktion zwischen Probenmolekül und Sorbensmaterial basiert auf einem aus der Natur bekanntem Prinzip, der Antikörper-Antigen Wechselwirkung. Neu entwickelte Materialien ermöglichen die Immobilisierung von Antikörpern über kovalente Bindung an silikabasiertem Sorbens, wodurch strukturähnliche Moleküle, die als Antigene fungieren, bei der Extraktion zurückgehalten werden. Aufgrund ihrer Herstellung, die Immunisierung von Nagetieren und anschließendem Isolieren, ist die Verfügbarkeit, aber auch die Varianz zwischen den einzelnen Chargen oftmals problematisch, zumal auch ein vergleichsweise größerer finanzieller Aufwand besteht [21]. Um diese negativen Aspekte zu umgehen bedient man sich einem weiteren selektiven Prinzip aus der Natur, auf dem alle enzymbasierten Reaktionen basieren, dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die zeitaufwendige, kostenintensive Produktion

wie bei den Immunosorbentien wird durch eine gezielte Polymerisation von geeigneten funktionellen Gruppen um den Analyten ersetzt. Dadurch werden sogenannte Molecular-Imprinted-Polymers erhalten, die eine erhöhte Selektivität, über einerseits die gewählten funktionellen Gruppen, aber auch aufgrund der sterischen Beschaffenheit, aufweisen [22]. Eine weitere Möglichkeit, die sterische Effekte, konkreter den Größenausschluss, ausnutzt, ist die Verwendung von RAM-Materialien (Restricted Access Materials) bei biologischen Proben, aber auch Umweltproben. Das Prinzip der RAM-Materialien ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Dabei werden Makromoleküle, wie Proteine, über eine Diffusionsbarriere daran gehindert mit dem Sorbentsmaterial in den Poren bzw. Hohlräumen zu interagieren, wodurch nur kleinere Moleküle retentiert werden. Je nach Material wird diese Diffusionsbarriere durch eine physische Barriere über die Porengröße, oder durch eine chemische Barriere über die Oberflächenmodifikation mit Makromolekülen, zum Beispiel Proteinen oder Polymere, geschaffen [23].

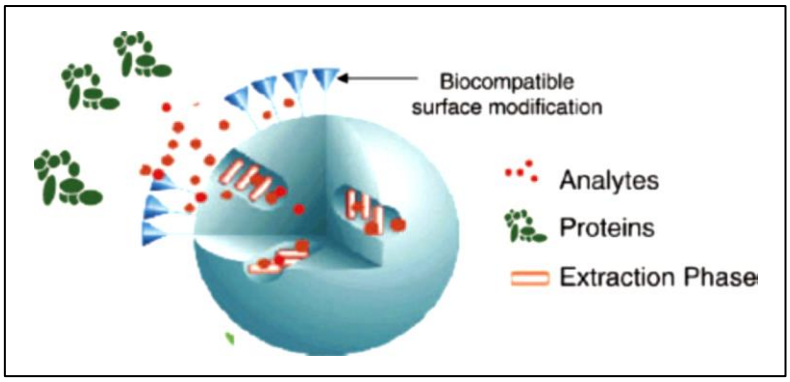

Abbildung 2 Grafische Darstellung der Wirkungsweise von RAM-Materialien [22]

2.1.2. Molecular Imprinted Polymers

Wie bereits im Kapitel 2.1.1 angesprochen, sind Molecular Imprinted Polymers, kurz MIPs, synthetisch hergestellte Polymermaterialien mit spezifischen Erkennungsstellen, die mit ihrer Größe, Form und in ihren funktionellen Gruppen komplementär zum Zielanalyten bzw. zur Analytgruppe sind. Ihre Interaktion mit dem Probenmolekül beruht dementsprechend auf einer Erkennung auf molekularer Ebene. Aufgrund ihrer Stabilität, ihrer Selektivität und Affinität zur Zielsubstanz, aber auch aufgrund der vergleichsweise niedrigen Kosten (Immunosorbentien) und relativ einfachen Herstellung bieten sie großes Potential in unterschiedlichsten Anwendungsgebieten [22]. Zu diesen zählt die Verwendung bei der chiralen Trennung [24], als chemische Sensoren [25] oder zur Immunoassay-ähnlichen Analyse [26], um nur einige wenige Gebiete zu nennen. Die meiste Relevanz im Bereich der MIPs hat jedoch der Einsatz als Sorbensmaterial im Zuge der Festphasenextraktion.

Ihre Herstellung erfolgt zumeist über eine Quervernetzung der einzelnen funktionellen Monomeren in Lösung, die sich um das Zielmolekül bzw. Templat über nicht-kovalente Wechselwirkungen anordnen. Die Vernetzung wird durch Zugabe eines Initiators mit Hilfe eines Crosslinkers, wie Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA), der eingesetzten Monomere erreicht. Im Anschluss wird über zahlreiche Extraktionsschritte mit organischem Lösemittel, auch zum Teil unter basischen oder sauren Bedingungen, das Templat entfernt. Üblicherweise werden so MIP-Materialien im monolithischen Bulk-Format erhalten, welche im letzten Schritt gemahlen und Partikel im Bereich von 25-50 µm über Sieben des Granulats erhalten werden [27]. Der Ablauf der klassischen Synthese ist in Abbildung 3 gezeigt.

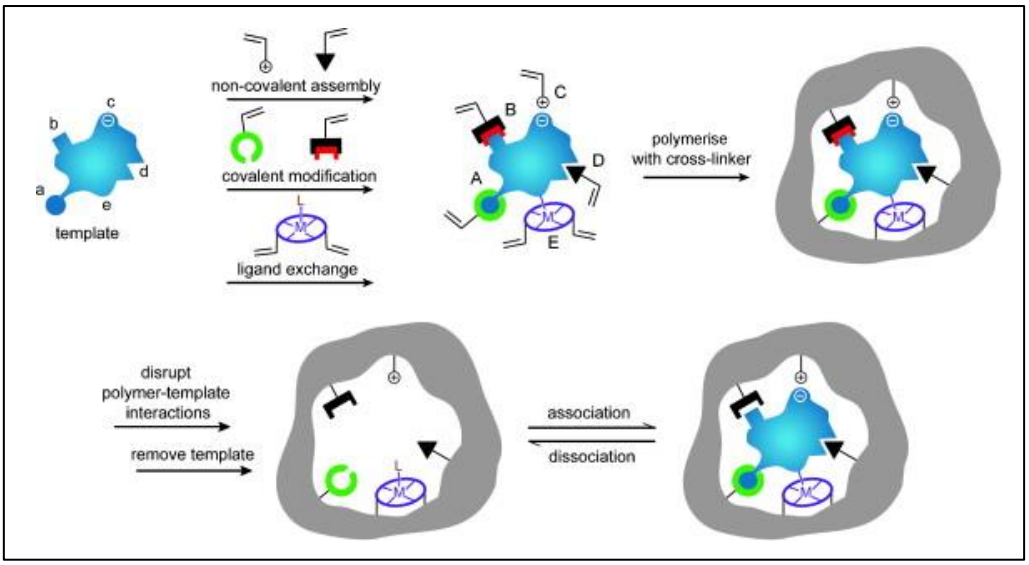

Abbildung 3 Schematische Darstellung der MIP-Synthese [28]

Dabei ist die Auswahl der Analytvorlage, sprich des Templats, von entscheidender Bedeutung. Zum einen kann, sofern verfügbar und kostengünstig, der Zielanalyt selbst zur Herstellung der Polymere verwendet werden. Dabei muss eine effiziente und möglichst vollständige Entfernung des Zielmoleküls über Extraktionsschritte gewährleistet werden, um Blindwerte und fehlerbehafteten Ergebnissen in der Analyse zu vermeiden. Dies ist bei den kommerziell erhältlichen (Östrogen-) MIPs nur bedingt realisiert. Wird stattdessen eine dem Zielanalyten strukturell ähnliche Verbindung verwendet, so sollten Größe, Form und Funktionalität möglichst identisch sein, um eine bestmögliche molekulare Erkennung zu ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von 6-Ketoestradiol als Templat zur Bestimmung von 17β-Estradiol im Oberflächengewässer [29]. Auch das bei der Herstellung verwendete Lösemittel ist entscheidend für die spätere Anwendung des MIP-Materials. So wird meist ein aprotisches, apolares Lösemittel eingesetzt, um die stark polaren Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindung, zwischen Lösemittel und Templat/Analyt zu verhindern. Dies wiederum verstärkt die zumeist polaren Wechselwirkungen des Zielmoleküls mit den spezifischen funktionellen Gruppen der eingesetzten Monomere [30].

Zudem wird eine möglichst gute Interaktion der Probenmoleküle mit den spezifischen Kavitäten des MIP-Materials oftmals nur dann erreicht, wenn die gleichen bzw. ähnlichen Bedingungen wie bei der Herstellung vorliegen und polare Wechselwirkungen mit dem Lösemittel gering gehalten werden. Da MIP-SPE-Kartuschen vorzugsweise als clean-up Schritt eingesetzt werden, kann eine vorhergehende Anreicherung und damit Vorliegen des Analyten im organischen Extrakt, die Aufreinigung der MIPs begünstigen [30].

2.1.3. Online SPE- automatisierte SPE gekoppelt mit LC

Die Festphasenextraktion hat sich nicht nur in ihrem klassischen Format, offline mit Einwegkartuschen, in den analytischen Labors etabliert, sondern wird auch in ihrem online-Format immer öfter eingesetzt. Nach einigen anfänglichen Schwierigkeiten zu Beginn der Kommerzialisierung von automatisierten SPE Systemen in den späten 1980er Jahren, stieg die Anzahl der veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten drastisch und findet heutzutage, in Form der online-Kopplung mit LC-MS-Systemen, immer öfter Anwendung in der Routineanalytik bei der Untersuchung von Schadstoffen in Umweltproben [31].

Einige grundlegende Vorteile gegenüber der offline Variante lässt diese Technik vor allem für gut ausgelastete Routinelabors attraktiv werden. So können durch die vollautomatisierten Extraktionsschritte, wie Konditionierung, Equilibrierung, Probenaufgabe, clean-up und Elution, Extraktionssequenzen unzähliger Proben ohne menschliches Zutun über Nacht oder Wochenende durchgeführt werden. Zudem ermöglichen gewisse Konfigurationen des online-SPE-Systems die parallele Aufarbeitung von Proben während der chromatographischen Messung der vorhergehenden. Dies führt wiederum zur deutlichen Erhöhung des Probendurchsatzes und resultiert des Weiteren, durch die Automatisierung, in einer verbesserten Reproduzierbarkeit. Auch menschliche Aspekte werden durch die Mechanisierung der Arbeitsschritte verbessert. So können menschliche Fehlerquellen eliminiert werden, die Aussetzung schädlicher oder gesundheits-gefährdender Chemikalien wird verringert, aber auch die Probenkontamination durch manuelles Handling können dementsprechend reduziert werden. In der Spuren- und Ultraspurenanalytik kommt ein entscheidender Vorteil zu tragen. Aufgrund der geforderten, geringen Nachweisgrenzen, kann durch Einsatz der online-SPE, bei der die gesamte Probe bzw. Probenextrakt anstelle eines kleinen Aliquots bei der offline Variante in das System eingebracht wird, die Empfindlichkeit verbessern. Alternativ kann auch durch die so gewonnene Empfindlichkeit das ursprüngliche Probenvolumen reduziert werden. Aus ökonomischer Sicht sind die Anschaffungskosten durch die Komplexität des Systems deutlich höher, es zeigt sich jedoch im Betrieb, dass ein geringerer Lösemittelverbrauch, die Wiederverwendung von Kartuschen und durch die Automatisierung letztlich auch weniger Personal der Wirtschaftlichkeit des online Systems zu Gute kommen. Auch in der Methodenentwicklung können mühelos zahlreiche unterschiedliche Kartuschenmaterialien, Waschlösungen und Volumina der eingesetzten Lösemittel ohne großen Aufwand variiert und getestet werden. Dazu sind einzelne Methodenentwicklunsgkits bei den Herstellern kommerziell erhältlich und müssen nur mehr eingesetzt und eine entsprechende Sequenz programmiert werden. Dabei ist jedoch anzumerken, dass Extraktionsprotokolle aus der offline SPE nicht 1:1 übernommen werden können, da einige Unterschiede in den Betriebsbedingungen, zum Beispiel Flussraten oder den vorliegenden Drücken, gegeben sind [32, 33].

Die einfachste und gängigste Methode die SPE mit einer Flüssigchromatographie zu koppeln, ist die sogenannte „column switching“-Technik, dargestellt in Abbildung 4. Dabei wird die Festphasenextraktion auf einer Art Vorsäule durchgeführt, die in der Schleife eines 3-Wege-Ventils eingebracht ist. So erfolgt die Probenaufgabe, aber auch Konditionierung oder Equilibrierung, wie bei einem klassischen 3-Wege-Ventil, in der Ladeposition unter Einsatz einer Hochdruckpumpe. Durch Wechsel in die Inject- Position kommt es zur Elution und Transfer auf die analytische Trennsäule. Da jedoch bei diesem System keine parallele Bearbeitung der Proben möglich ist, wird der Probendurchsatz deutlich verringert. Auch bei Mehrfachnutzung der Kartusche bzw. Vorsäule, kann das Sorbensmaterial stark beeinträchtigt werden, wodurch geringere Kapazitäten oder Veränderungen in der Selektivität beobachtet werden können. Vor allem bei stark matrixbelasteten Proben ist auch die Möglichkeit einer Verschleppung (carry-over) nicht auszuschließen. Zudem ist ein manueller Kartuschenwechsel erforderlich [34].

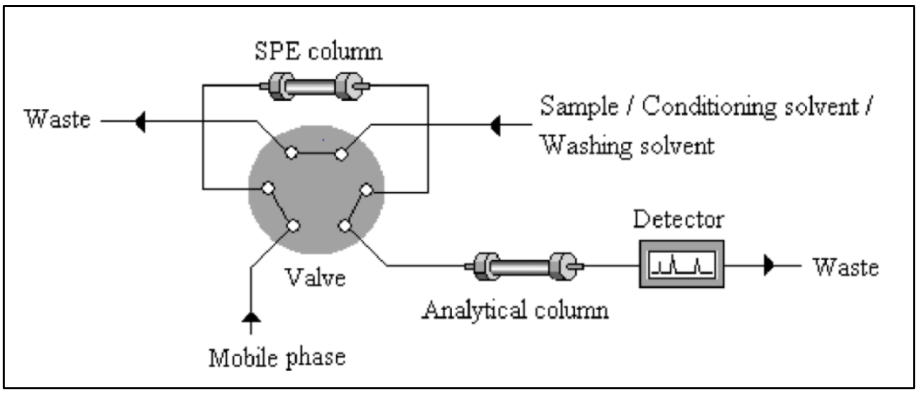

Abbildung 4 Anordnung der "column switching" Technik [33]

Alternativ dazu wird häufig eine Konfiguration zur online Kopplung gewählt, die dem Aufbau und der Funktionsweise des Prospekt bzw. Prospekt 2 von Spark Holland entspricht bzw. ähnelt. So auch das in dieser Arbeit verwendete System von Axel Semrau die CHRONECT µSPE. Bei diesem System (Abbildung 5) wird das volle Potential der automatisierten SPE ausgenutzt, indem eine parallele Bearbeitung der Proben durch zwei weitgehend unabhängigen Kartuschenpositionen ermöglicht wird. Diese können durch entsprechende Wahl der Ventilstellungen verschiedene Aufgaben verfolgen und werden durch ein automatisiertes Kartuschenbearbeitungsmodul unterstützt. Dabei wird ein spezielles Kartuschenformat (10 x 1 mm) verwendet, das unter anderem Hochdruckbedingungen standhält. Zudem werden diese üblicherweise als Einwegkartuschen benutzt, wodurch die Verschleppungsgefahr weitestgehend eliminiert wird. Es gibt jedoch auch Anwendungen die eine Mehrfachnutzung der Kartuschen von bis zu 20 Injektionen durchführen, ohne signifikante Veränderungen in der Wiederfindung und Rückdruck des Systems zu registrieren [35]. Ein üblicher Messablauf besteht zunächst aus der Konditionierung und Äquilibrierung der Kartuschen, die mit Hilfe des Kartuschenbearbeitungmoduls in eine der vorgesehenen Positionen gebracht wird. Die entsprechenden Lösemittel werden dabei von einer Hochdruckspritzenpumpe zur Verfügung gestellt. Nach erfolgter Probenaufgabe über die Autosamplereinheit wird die Kartusche vollautomatisch in die zweite Position übergeführt und durch die LC-Pumpe die Probe auf die Säule eluiert. Durch den Wechsel der Kartuschenposition kann ein paralleler Ablauf erzielt werden. Weitere Details zur konkreten Funktionsweise können dem Kapitel 4.2 entnommen werden.

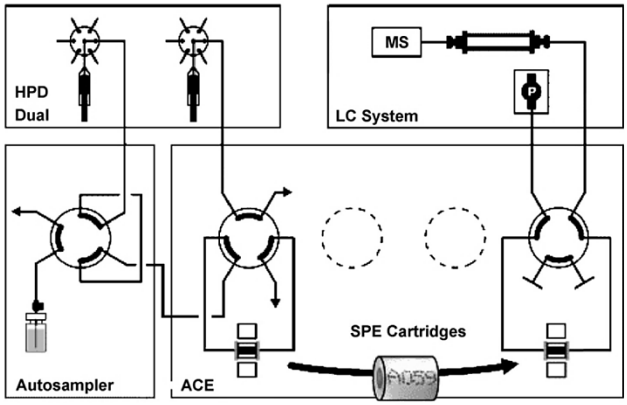

Abbildung 5 Gerätekonfiguration Prospekt 2-Systeme [34]

2.2. Massenspektrometrie

Neben der Probenvorbereitung, die Anreicherung- und Aufreinigungsschritte beinhaltet, ist die eingesetzte analytische Technik zur Trennung und Detektion von entscheidender Bedeutung für eine robuste und empfindliche Analyse der Zielsubstanzen. Ohne eine ausreichende chromatographische Trennung und empfindliche, selektive Erfassung der Analyten, führt auch eine optimale Probenvorbereitung nicht zum gewünschten Erfolg in der Bestimmung von Spuren- und Ultraspurenstoffen in Umweltproben.

Der „Goldstandard“ für komplexe Fragestellungen im Bereich der aquatischen Umweltanalytik ist der Einsatz eines LC-MS/MS Systems, da aufgrund der Kombination mehrerer Quadrupole eine unübertroffene Selektivität, aber auch eine außergewöhnliche Empfindlichkeit erreicht wird. So erzielen M. Diaz-Cruz *et al* [36] mit dem Einsatz eines LC-MS/MS System, im Vergleich zu einem klassischen LC-MS System, eine zehnfach bessere Nachweisgrenze bei der Analyse von Östrogenen. In der quantifizierenden Routineanalytik haben sich Tandem-MS Systeme etabliert, die auf der Tripel-Quadrupol-Technik basieren. In diesen Geräten werden drei Quadrupole seriell bzw. linear angeordnet, wobei zwei Einheiten als Massenfilter (Q1 und Q3) benutzt werden, die von einer Kollisionszelle (q2) voneinander getrennt werden. Durch diese Anordnung besteht die Möglichkeit sowohl vor, als auch nach der Fragmentierung im q2, Molekülionen zu selektieren. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Betriebsmodi bzw. Scantechniken, die einzeln oder in Kombination angewendet werden können. Für die exakte und sensitive Quantifizierung bei der Analyse von Mikroschadstoffen eignet sich insbesondere der „selected reaction monitoring“ (SRM) Modus bzw. der „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus, bei dem mehrere Massenübergänge beobachtet werden. Hierbei wird ein charakteristisches Vorläuferion im ersten Quadrupol ausgewählt, anschließend in der Kollisionszelle gegen ein Kollisionsgas, mit Hilfe einer bestimmten Spannung, beschleunigt und ein dabei entstehendes, ausgewähltes Produkt-Ion im dritten Quadrupol abermals selektiert und detektiert. Durch die zweifache Massenselektion können Matrixstörungen sehr gut abgetrennt werden, wobei die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen solcher Messungen, trotz der geringeren Ionenausbeute, sehr niedrig aufgrund des verbesserten Signal zu Rausch-Verhältnis ausfallen. Die weiteren Messmodi, der Produktionenscan, „Neutral-Loss“ und Vorläuferionen-Scan, werden weitestgehend für die Strukturaufklärung benutzt. Dabei wird im Produktionen-Scan, das Fragmentierungsmuster eines gewissen Vorläuferions registriert, beim „Neutral-Loss“ werden ausschließlich Ionen einer gewissen Massendifferenz zwischen Q1 und Q3 registriert, die einem Neutralteilchen entsprechen und im Vorläuferionen-Scan wird ein vorgegebenes Produktion im Q3 gemessen während im Q1 über einen vorgegebenen Massenbereich gescannt wird. Die unterschiedlichen Betriebsweisen sind in Abbildung 6 dargestellt.

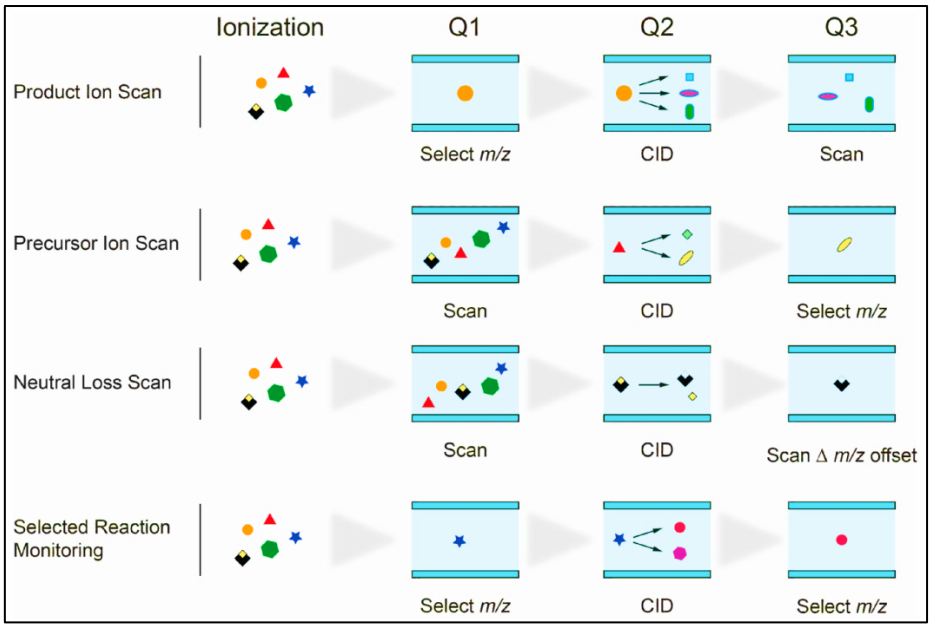

Abbildung 6 Scanmodi der Tandem-MS Systeme [37]

Die Triple-Quadrupol-Systeme bieten mit ihrer zweifachen Massenselektion beste Voraussetzungen zur Abtrennung von Matrixkomponenten um Interferenzen und Rauschen im Chromatogramm möglichst gering zu halten. Bei manchen Fragestellungen und komplexen Proben ist die Selektivität jedoch nicht ausreichend um eine konkrete Aussage über das Vorliegen von Zielsubstanzen und deren Quantifizierung treffen zu können. Durch Kombination der Triple-Quadrupol-Technologie mit dem Einsatz einer linearen Ionenfalle (LIT) ermöglichen Hersteller, wie AB Sciex mit dem QTRAP-System, die Selektivität des Systems erneut zu verbessern und so auch Proben mit schwieriger Matrixzusammensetzung zuverlässig zu analysieren. So kann der zweite analytische Quadrupol (Q3) sowohl als klassischer Quadrupol, als auch als Ionenfalle genutzt und damit Messungen im MS^3 Modus durchgeführt werden können. Bei diesem Modus werden, wie im klassischen MRM-Modus, zunächst Vorläuferionen aus dem Q1 in der Kollisionszelle fragmentiert und im Anschluss die gebildeten Produktionen im Q3, der nun als Ionenfalle fungiert, getrapped. Dabei wird an den Enden der linearen Ionenfalle eine Gleichspannung angelegt um die Ionen in z-Richtung am Verlassen der Falle zu hindern und durch zusätzlichen Einsatz eines Hochfrequenzfelds, das auf den Mittelteil wirkt, die Ionen auch in radialer Richtung zu begrenzen. Durch Variieren der Spannungen können in einem nächsten Schritt, Ionen mit gewissem *m/z* einerseits in x-Richtung die Ionenfalle ausgestoßen werden und so das gewünschte Produktion in der Zelle angereichert werden. Durch anschließende resonate Anregung wird das so getrappte Produktion erneut fragmentiert und kann in z-Richtung die Ionenfalle verlassen und am Detektor registriert werden [38]. Der Vorgang des MS^3-Modus wird in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

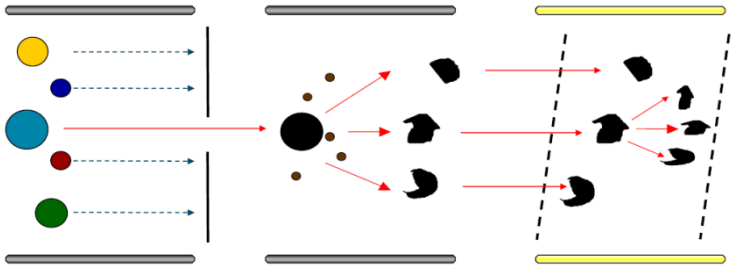

Abbildung 7 Grafische Darstellung des MS3-Grundprinzips [39]

Zusätzlich ist es über den Einsatz der LIT möglich, einen sogenannten „enhanced product ion scan“ (EPI) sowie einen „enhanced MS Scan“ (EMS) durchzuführen. Im EMS, dem klassischen Ionenfallen-Modus, werden die gebildeten Ionen aus der Quelle über den Q1 und q2 in die Ionenfalle geleitet, dort gesammelt und ein Massenspektrum aufgenommen. Im EPI-Modus werden, angelehnt an den Standard-Produktionenscan, die im q2 gebildeten Fragmentionen abermals in der Ionenfalle getrapped bzw. gesammelt und anschließend über einen entsprechenden Massenbereich gescannt. Durch den zusätzlichen Sammelschritt über die Ionenfalle können daher bessere S/N-Verhältnisse generiert werden [40]. Da die Prozesse in den einzelnen Einheiten der QTRAP bzw. ganz allgemein in Masseanalysatoren nicht vollständig extrahieren und fragmentieren können, kommt es üblicherweise zu einer Verminderung des absoluten Signals durch die zusätzlichen Schritte in der linearen Ionenfalle. Durch die gewonnene Selektivität werden jedoch Störsignale eliminiert bzw. stärker unterdrückt, wodurch bei stark matrixbelasteten Proben eine Verbesserung im S/N-Verhältnis durch den Einsatz des MS^3-Modus erzielt werden kann.

2.2.1. Ionensuppression in der Massenspektrometrie

Trotz der hervorragenden Selektivität und Empfindlichkeit von LC-MS/MS-Systemen, vor allem im MS^n-Modus, stoßen auch diese Methoden bei Anwendung auf Realproben schnell auf unerwartete Limitierungen. Gerade auf dem Gebiet der Umweltanalytik und Bioanalytik zählen stark matrixbelastete Proben zu den alltäglichen Fragestellungen, die immer wieder Anwender vor große Probleme stellen. So werden trotz Einsatz der neuesten und besten Massenanalysatoren zumeist starke Einbußen in der Empfindlichkeit beobachtet. Dieses Phänomen, die sogenannte Ionensuppression, erfolgt jedoch bereits in der Ionenquelle und beeinflusst die Effizienz der Ionenbildung und damit auch die gesamte Ionenausbeute. So kann der verwendete Analysator die maximale Selektivität und Empfindlichkeit am Markt zeigen, werden Matrixeffekte nicht beseitigt, ist auch bei diesen Systemen eine schlechte Performance unausweichlich.

Nicht nur die Ionensuppression, die Verringerung des Analytsignals, zählt zu den in Realproben auftretenden Matrixeffekten. Auch die Verstärkung des Signals ist eine Möglichkeit, die jedoch in weitaus selteneren Fällen auftritt und daher in dieser Arbeit nicht weiter behandelt wird.

Matrixeffekte wurden erstmals von Kebarle und Tang beschrieben, die coeluierende Matrixkomponenten für die Ionensuppression der Zielanalyten und damit auch deren negative Auswirkungen auf Empfindlichkeit, Richtigkeit und Präzision der Analyse, verantwortlich machen [41] und zumeist nicht im Chromatogramm ersichtlich sind. Eine logische Konsequenz der Signalsuppression ist die verminderte Empfindlichkeit des Verfahrens, was wiederum in falsch negativen Ergebnissen bei belasteten Proben oder Minderbefunden resultiert. Je nach Art der Probe und deren Zusammensetzung ist auch das Ausmaß der Matrixeffekte unterschiedlich, wodurch die Präzision aber auch die Linearität und damit die Quantifizierung und Richtigkeit des Verfahrens, negativ beeinflusst werden [42]. Zudem ist das Ausmaß vom Verhältnis coeluierender Komponenten und Analyt abhängig, so erfolgt zum Beispiel eine deutlich stärkere Ionensuppression bei höheren Konzentrationen an Clenbuterol in Urin, wobei der Zusammenhang meist nicht linear ist [43]. Als Quelle der Ionensuppression müssen nicht zwangsläufig coeluierende Matrixkomponenten aus der Realprobe dienen, auch Laufmitteladditive, wie zum Beispiel Trifluoressigsäure TFA [44], oder Komponenten aus der Probenvorbereitung, extrahierte Polymermoleküle aus Kunststoffgefäßen bzw. Kartuschen [45], können zur Signalunterdrückung führen.

Obwohl der exakte Mechanismus noch nicht vollständig bekannt ist, gibt es einige Ansätze um die Ursache der Signalsuppression zu erklären. Einerseits können, unabhängig von den gängigen Ionisationstechnik ESI oder APCI, Säure-Basen Reaktionen in der Gasphase der Ionenquelle zum Verlust der Ladung und somit zur geringeren Ionenausbeute führen. Andererseits wird, bei Einsatz von ESI-Quellen, durch eine hohe Konzentration von coeluierenden Matrixkomponenten die Viskosität und Oberflächenspannung der Tröpfchen deutlich erhöht, wodurch der Transfer der Analytionen in die Gasphase erschwert und somit die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Ionenpaaren oder Adduktionen erhöht wird. Zudem konkurrieren Matrixmoleküle mit den Analyten um den Zugang zur Oberfläche der Mikrotröpfchen, wodurch der Transfer der Analytionen in die Gasphase im Allgemeinen erschwert wird. Da des Weiteren nur eine limitierte Anzahl an Ladungen in der Quelle zu Verfügung steht, wird durch die eingebrachten Matrixkomponenten eine Konkurrenzsituation zwischen Analyt und Matrix erzeugt. So können im positiven ESI-Modus Substanzen mit höherer Protonenaffinität im Vergleich zur Zielkomponente die Bildung von Analytionen deutlich verringern. Im Gegensatz dazu führt eine geringere Protonenaffinität der coeluierenden Matrixbestandteile im negativen-Modus zur Signalreduktion. Zu guter Letzt können nicht flüchtige Stoffe für eine geringere Effizienz in der Tröpfchengenerierung sorgen, oder aber die Tröpfchen daran hindern, den kritischen Radius für einen Transfer der Analytmoleküle in die Gasphase zu erreichen [46].

Viele der genannten Hypothesen finden in der kondensierten Phase, in den Tröpfchen statt, die besonders auf ESI-Quellen zutreffen. Im Vergleich dazu sind APCI-Quellen aufgrund ihres unterschiedlichen Ionisationsmechanismus nicht in diesem Ausmaß von Matrixeffekten betroffen. Vor allem die Konkurrenzsituation, bezogen auf Ladung und Oberflächenposition, durch die coeluierende Matrix wird nahezu aufgehoben, da üblicherweise bei APCI-Prozessen deutlich mehr Ladungsträger generiert werden und der Übergang des Analyten in die Gasphase im Vergleich zur ESI über neutrale Moleküle erfolgt [45, 46]. Daher wird oftmals als Abhilfe zur Beseitigung der Matrixeffekte der Wechsel der Ionenquelle empfohlen. Ob sich tatsächlich ein Vorteil ergibt, ist jedoch stark abhängig von der Fragestellung, wie Mei H. *et al* [47] zeigen. So kann entgegen der generellen Meinung auch bei der APCI, je nach eingesetzter Quelle und Dimensionierung bzw. Design der Quelle, verstärkte Ionensuppression auftreten.

Ist ein Wechsel der Ionenquelle nicht möglich oder bleiben erwartete Ergebnisse aus, kann auch die Reduzierung der Flussrate auf nL/min und damit eine Miniaturisierung angestrebt werden, wodurch kleinere Tröpfchen mit höherer Anzahl an Ladungsträgern generiert werden und so die Signalsuppression verringert wird [48]. Die effektivsten Methoden zur Elimination von Matrixeffekten sind jedoch die Verbesserung der Selektivität in der Probenvorbereitung bzw. Optimierung der chromatographischen Trennung und damit eine bessere Abtrennung möglicher coeluierender Komponenten. Der Optimierung der LC-Methode ist im Vergleich zur Probenvorbereitung einem deutlich geringerem Zeit- bzw. Laboraufwand zuzuschreiben und sollte somit in einem ersten Schritt zur Verbesserung des Analytsignals durchgeführt werden. Dabei werden Parameter, wie das Säulenmaterial, Säulenlänge, Partikelgröße, Flussrate, Zusammensetzung der mobilen Phase, aber auch Temperatur und der Gradient, inkludiert [42]. Es ist jedoch nicht immer möglich Matrixkomponenten, deren Elutionsfenster mit denen der Zielanalyten überlappen, chromatographisch abzutrennen, daher ist die selektive Probenvorbereitung, genauer der Clean-Up-Schritt, von entscheidender Bedeutung. Wie bereits im vorhergehenden Kapitel 2.1 beschrieben, ist die gängigste Methode zur Aufreinigung die Festphasenextraktion, aber auch andere Techniken, wie

die Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Fällungsreaktionen in der Bioanalytik, werden routinemäßig eingesetzt.

Kann durch die oben genannten Methoden das Phänomen der Matrixeffekte nicht vollständig beseitigt werden, oder zumindest auf ein vernachlässigbares Ausmaß reduziert werden, müssen geeignete Kalibrationsstrategien verwendet werden, um die Signalsuppression zu kompensieren. Eine gängige Möglichkeit ist die Verwendung eines internen Standards. Besonders in der Form eines isotopenmarkierten Standards, quasi identisch zum Zielmolekül, ermöglicht dieser einen Ausgleich der Signalveränderung und verbessert die Richtigkeit in der Quantifizierung. Ist ein solcher Einsatz aus ökonomischer Sicht nicht möglich oder sind isotopenmarkierte Standards für gewisse Fragestellungen kommerziell nicht verfügbar, müssen Methoden wie die Standardaddition (hoher Zeit- und Kostenaufwand) oder einer „matrix-matched“ Kalibration, bei Abwasserproben kaum möglich, eingesetzt werden [49].

3. Stand der Technik

Aufgrund des verstärkten Bewusstseins für die schädigenden Effekte auf die aquatische Umwelt und Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, sowie die aufgezeigten Belastungen unzähliger Gewässer [50], steigt die Zahl an Studien und Publikationen, die sich mit dieser Thematik befassen, unaufhörlich an. Zudem sorgen die regulatorischen Bemühungen der EU-Kommission, aber auch der amerikanischen Umweltbehörde EPA, für ein steigendes Interesse an der Entwicklung zuverlässiger Analysenverfahren zur Bestimmung von E1, E2 und EE2, um den gesetzlichen Anforderungen zu entsprechen. Vor allem die geforderten Nachweisgrenzen der Beobachtungliste stellen, wie in diesem Kapitel erläutert werden soll, eine analytische Herausforderung dar, die den Einsatz hochauflösender, selektiver und aufwendiger Analysenverfahren erfordert. Dieses Interesse findet sich auch als Publikationstrend in der Literatur wieder, wo Studien mit Fokus auf die Überwachung und Bestimmung der Östrogene die häufigste Thematik darstellen, gefolgt von einer immer größer werdenden Anzahl zur Steuerungsmaßnahmen und Reduktion der Steroidhormonbelastung [51].

Für den amerikanischen Raum wurde bereits 2007 (EPA 1698) und 2010 (EPA 539) zwei Methoden für die Bestimmung von Steroidhormonen durch die Umweltbehörde EPA entwickelt, die für die Anwendung auf Umweltproben unterschiedlichster Matrix ausgelegt sind. So umfasst die Methode EPA 1698 ein relativ breites Probenspektrum, von Wasserproben über Sediment- und biologischen Feststoffen, wobei durch Einsatz von hochauflösender GC in Kombination mit HRMS und Verwendung von isotopenmarkierten Standards, neben E1, E2 und EE2, auch etwa 30 weitere Steroidhormone quantifiziert werden können. Für wässrige Proben wird als Probenvorbereitung zunächst die Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Methylenchlorid und anschließender Aufreinigung über Florisilsäulen vorgeschlagen. Um eine ausreichende Flüchtigkeit der Analyten zu gewährleisten, wird N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid mit Trimethylchlorosilan (BSTFA:TMCS) zur Derivatisierung eingesetzt und so die Analyten in ihre Trimethylsilylether-Form übergeführt [52]. Die EPA 539 Methode [53] beschäftigt sich wiederum ausschließlich mit der Bestimmung von Steroidhormonen (E1, E2, EE2 und vier weitere) in Trinkwasser. Dazu wird die Probe über eine C18-SPE-Disk angereichert, mit Methanol eluiert, zur Trockene im Stickstoffstrom eingedampft, abermals in Methanol:Wasser (50:50) aufgenommen und der interne Standard hinzugefügt. Die flüssigchromatographische Trennung eines Aliquots von 50 µL erfolgt über eine C18-Säule mit anschließender MS/MS-Detektion.

Die Nachweisgrenzen belaufen sich bei diesen Verfahren auf 0,1 ng/L E1, E2 und EE2 (method detection limit, MDL) bei der Anwendung der EPA 1698 bzw. auf 0,39 ng/L für E1 und E2 sowie 0,33 ng/L EE2 (limit of detection, LOD) bei der Bestimmung nach EPA 539 [54]. In Anbetracht der Nachweisgrenzen für Östrogene der Beobachtungsliste zeigt sich, dass geforderte Ziele für den kritischen Parameter EE2 deutlich verfehlt werden und sich diese Methoden für Monitoringzwecke im EU Raum nicht eignen.

Auf europäischer Ebene ist eine Vereinheitlichung bzw. Normierung der Bestimmungsverfahren zur Quantifizierung der genannten Östrogene aufgrund der unzureichenden Datenlage und der ungenügenden Empfindlichkeit bestehender Methoden weiterhin ausstehend. So zeigt ein Bericht des Joint Research Center (JRC) der EU-Kommission, dass in den einzelnen Mitgliedsländern, aber auch den jeweiligen Laboren und Institutionen, unterschiedlichste Analysemethoden eingesetzt werden. Zusätzlich werden in diesem Zusammenhang Literaturmethoden vom JRC jährlich anhand

ihrer Empfindlichkeit und Routinetauglichkeit evaluiert, wobei nach dem Stand 2015 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren pg/L-Bereich für EE2 als „extrem schwierig, wenn nicht unmöglich mit dem heutigen Stand der Technik“ eingestuft werden [54].

In der Literatur werden zahlreiche Analyseverfahren zur Bestimmung von Östrogenen in Umwelt- bzw. Wasserproben beschrieben, die gängigsten Verfahren werden in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst dargestellt.

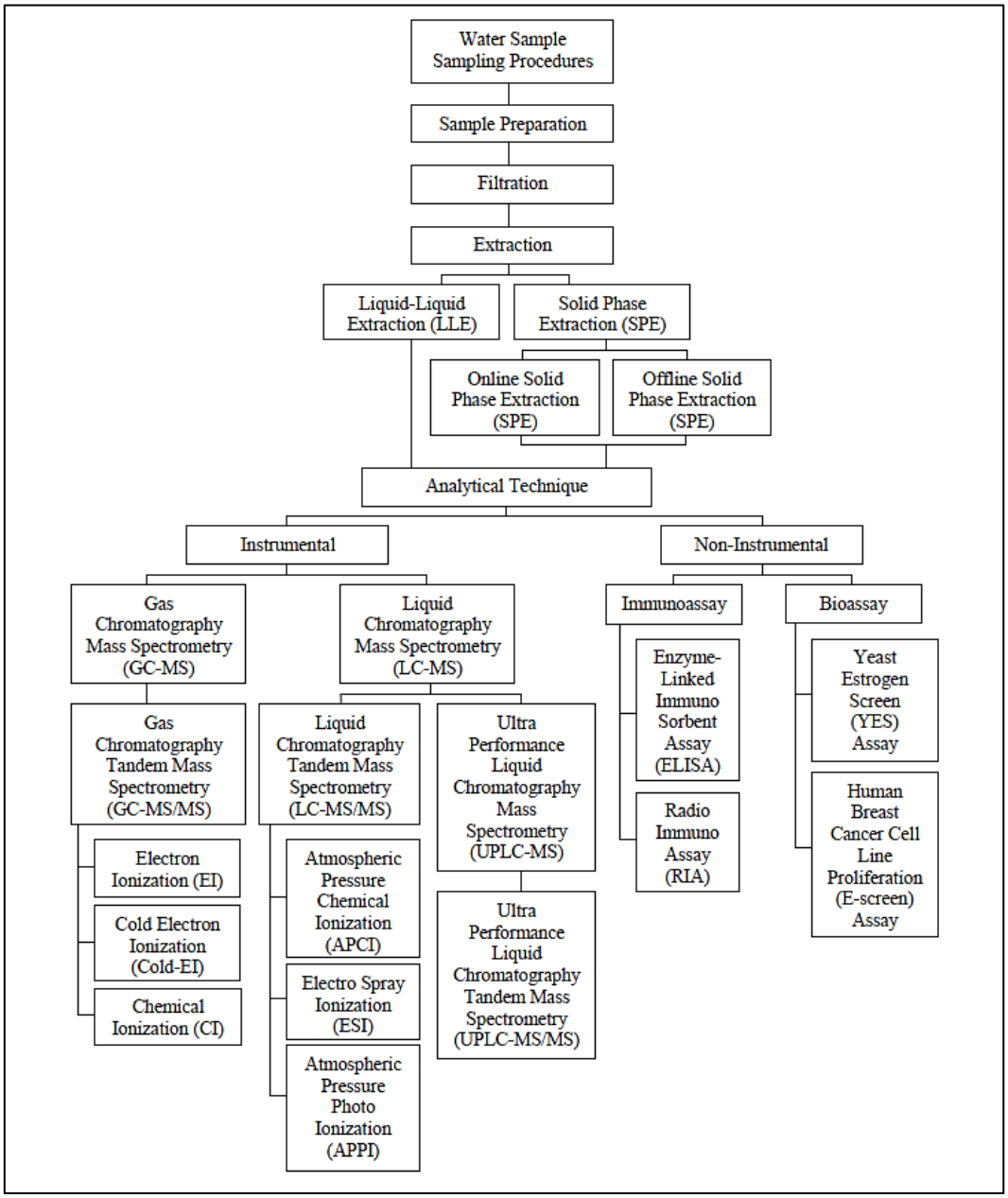

Abbildung 8 Methodenüberblick der gängigsten Verfahren zur Bestimmung von Östrogenen in Wasserproben [55]

In einem ersten Schritt der Probenvorbereitung werden Kläranlagenab- und zuläufe, aber auch Proben von Oberflächengewässer, zumeist auf pH 2-4 angesäuert und filtriert, um unerwünschte Schwebstoffe zu entfernen und den mikrobiologischen Abbau zu vermeiden bzw. zu reduzieren [56]. Die Mehrzahl der Studien, die eine Filtration durchführen, verwenden dabei Glasfaserfilter, da der Analytverlust durch Sorption gering gehalten wird [57]. Im Anschluss erfolgt die Extraktion der Östrogene vorwiegend über eine Festphasenextraktion unterschiedlichster Formate, von klassischen

Kartuschen über spezielle Disk-Formate, in offline Anwendung. Barreiros *et al.* [56] stellen bei der Untersuchung von 50 Studien zur Steroidhormonanalytik mit Einsatz der SPE als Extraktiosnschritt fest, dass in 46% aller Verfahren Oasis HLB als RP-Sorbensmaterial verwendet wurde, gefolgt von klassischen C18-Materialien. Neben den klassischen Sorbensmaterialien werden auch selektive MIP-Sorbentien, aus Eigenproduktion oder kommerziell erhältlich, eingesetzt, wie die Autoren von Zacs *et al.* [58] zeigen. Durch handelsübliche AFFINIMIP-Kartuschen von AFFINISEP-Polyintell werden Bestimmungsgrenzen von 0,08 ng/L für E2 und EE2 in Kalibrationstandards durch GC-HRMS-Analyse berechnet. Zudem werden auch online-SPE-Systeme gekoppelt mit LC-MS/MS immer häufiger zur Bestimmung von E1, E2 und EE2 eingesetzt. So nutzen erstmals Rodriduez-Mozaz *et al.* [59] den Prospekt 2 von Spark Holland zur Quantifizierung von E1, E2, EE2, E3, sowie deren konjugierten Vertreter. Durch die Verwendung von 250 mL Probe, Polymerkartuschen (PRLP-quervernetzer Styrene-Divinylbenzen-Polymer) und LC-ESI-MS/MS Trennung bzw. Detektion, konnten Nachweisgrenzen für Grundwasserproben im Bereich von 0,01-0,38 ng/L (E1 0,07 ng/L, E2 0,22 ng/L und EE2 0,38 ng/L) der betrachteten Östrogene erreicht werden. Ciofi *et al.* [60] erzielten, über ein „column switching“ System von Dionex USA (Ultimate™ 3000) gekoppelt mit einer QTRAP 3200 (MS/MS) und Anreicherung von 2,5 mL Probe auf einer Strata C18E Kartusche, Nachweisgrenzen von 0,15 ng/L für E1, 0,31 ng/L für E2und 0,51 ng/L für EE2. Die Ermittlung erfolgte über ein S/N von 3 in den eingesetzten Standards, wodurch die Aussagekraft bezüglich Methodenperformance bei Realproben in Frage gestellt werden sollte, da die bestimmten Matrixeffekte stark probenabhängig, sowie konzentrationsabhängig sind und mitunter die Empfindlichkeit stark beeinträchtigen. Diese Problematik tritt bei einer Vielzahl von veröffentlichten Studien auf. Esteban *et al.* [61] konnten jedoch Nachweisgrenzen in Realproben in einem Bereich von 0,037-0,14 ng/L (EE2 0,14 ng/L) erzielen, indem Analytkonzenrationen Oberflächengewässer zudotiert wurden, die ein S/N von 3 lieferten. Die online-Anreicherung wird dabei über ein duales LC-„column switching“-System mit EQan Technologie erreicht, wobei die vorgeschaltete Säule (Hypersil GOLD) zur Aufkonzentrierung, wie bei einem klassischen online-SPE System, dient.

Im Bereich der Online-SPE zeigt sich der Vorteil von LC-MS/MS (MS) Systemen gegenüber den GC-Systemen, indem eine vergleichsweise unkomplizierte Automatisierung der Probenvorbereitung und einhergehender Kopplung mit dem analytischen System durchgeführt werden kann und keine Derivatisierungsschritte erforderlich sind. Nichtsdestotrotz werden Derivatisierungen der Steroidhormone in der LC-MS/MS durchgeführt, um die Empfindlichkeit der Methode durch Verbesserung der Ionisation zu steigern, wie Lien *et al.* [62] durch Einsatz von Dansylchlorid als Derivatisierungsreagenz zeigen. Die häufigste Ionisationstechnik für E1, E2 und EE2 in der Flüssigchromatographie sind ESI-Quellen, die im negativ Modus verwendet werden, da aufgrund der schwach sauren Eigenschaften (pKa im Bereich 10,4 [63]), durch die Phenolgruppe der betrachteten Östrogene, die Deprotonierung erleichtert wird. So nutzten Shi *et al*. [64] das hier beschriebene, gängigste Verfahren in der Literatur, von der Filtration der zwei Liter Probe über Glasfaserfilter, der Extraktion mit Hilfe von Oasis HLB Kartuschen und anschließendem Aufreinigungsschritt mittels Florisil, sowie der Trennung auf einer C18 Säule (Nova Pack C18, Waters) und Detektion durch eine QTRAP 3200, um Nachweisgrenzen für E1, E2, EE2 und Bisphenol A in einem Bereich von 0,02-0,1 ng/L für Oberflächenwasser zu realisieren. Die empfindlichste Methode bezogen auf Realproben, die zurzeit in der Literatur angegeben wird und auch aus der Evaluierung des JRC hervorging, ist die, von Williams *et al.* [65] zitierte, Bestimmung von E1, E2 und EE2 durch vorangehende Filtration der Probe über Glasfaserfilter mit anschließender Anreicherung durch Styrol-Divinylbenzol Kartuschen, Aufreinigung des Extraktes mittels Gelpermeationschromatographie (PLGEL 50A, PolymerLabs) und

LC-MS/MS Analyse. Durch Spiken von Kläranlagenablaufproben und Oberflächengewässer mit Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenzen, konnten diese für die drei genannten Östrogene mit 0,05 ng/L bestimmt werden. Im Vergleich dazu beschreiben Tavazzi *et al.* [66] in ihrem Validierungsbericht des JRC von 2016 eine Methode, die auf der Anreicherung mittels Oasis HLB Kartuschen und anschließender UHPLC-MS/MS Analyse (QTRAP 5500 und Hypersil GOLD Säule) basiert und die geforderten Nachweisgrenzen der Beobachtungsliste erreichen. Die Bestimmung wurden jedoch über Analyse der Blindwertproben in entsprechender Matrix erhalten und erzielte für E1 0,02 ng/L, für E2 0,13 ng/L und für EE2 0,03 ng/L im Oberflächengewässer. Wie die Autoren dabei anmerken, kann die Empfindlichkeit der Methode bei der Analyse von Realproben im Konzentrationsbereich nahe der Grenzen, durch Matrixeffekte beeinträchtigt und womöglich nicht mehr erreicht werden. Zur zuverlässigen Verifizierung der Performance sollten die entsprechenden Grenzen über das Analytsignal in Realproben bestätigt werden.

Die Mehrheit aller Verfahren zur Analyse von Östrogenen, mit etwa 43% der von Barreiros *et al*. [56] betrachteten Publikationen, setzt jedoch GC-MS (MS/MS) Systeme als Trenn- und Detektionsmethode ein, die im Vergleich zur Flüssigchromatographie deutlich geringer von Matrixeffekten beeinflusst werden und eine hohe Trenneffizienz zeigen [55]. In den meisten Fällen wird zudem eine EI-Ionisation mit Detektion im SIM-Modus durch Verwendung eines GC-MS Systems durchgeführt. Dessen ungeachtet ist jedoch ein Derivatisierungsschritt zur Generierung der notwendigen Flüchtigkeit dringend erforderlich. Der Einsatz von BSTFA mit TMCS ist, nicht nur durch die EPA-Regelung, weit verbreitet, so zeigen einige Studien [67, 68] eine verbesserte Silylierung und damit erhöhte Empfindlichkeit und Selektivität im Vergleich zu Pentafluorbenzoylchlorid, Trimethylsilyltrifluoracetamide (MSTFA) und Dansylchlorid als Derivatisierungsreagenzien. Alvarez *et al.*[69] verwenden MSTFA um E1, E2, EE2 und E3 in die entsprechenden Trimethylsilylderivate zu überführen, nachdem die unfiltrierte Probe über eine C18-SPE-Disk angereichert und über Florisilkartusche aufgereinigt wurde. Durch die Analyse mittels GC-MS/MS (Quattro-micro-GC, Waters) konnten für die drei, in dieser Arbeit relevanten, Östrogene Nachweisgrenzen von 0,4 ng/L im Oberflächengewässer erreicht werden.

Das Hauptaugenmerk der gewählten bzw. vorgestellten Verfahren liegt auf der angegebenen Empfindlichkeit, sowie Routinetauglichkeit der Methoden und bieten daher die Möglichkeit diese relativ unkompliziert in Labors, gegebenenfalls im EU-Raum, zu etablieren. Dem Gegenüber werden Verfahren in der Literatur angeführt, die einen anderen Ansatz, durch Einsatz neuester Methoden und modernster Technologien, verfolgen, jedoch die Routinetauglichkeit zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben bzw. schwer realisierbar ist. Zheng *et al.* [70] verfolgen den Ansatz der Kopplung einer HPLC (Thermo Fisher Ultimate 3000) mit einem ATR-FTIR-System um, unter anderem, E1, E2 und EE2 in Oberflächenwasser in einer Konzentration von 1 ng/L erfolgreich zu bestimmen. Die mobile Phase wurde dabei im Interface über eine beheizte Vorrichtung unter Stickstoffstrom entfernt, die Probe bzw. Analyten auf einem ZnSe-Kristall abgeschieden und durch Rotation in die Messposition über IR-Strahlung und einen MCT-Detektor analysiert. Durch Wasch- und Trockenpositionen kann die Probenposition vollautomatisch gereinigt und weiter eingesetzt werden. Martinez *et al.* [71] konnten wiederum eine selektive, sehr empfindliche Methode EE2-Analyse entwickeln. Die Anreicherung von EE2 in den Oberflächenwasserproben erfolgte über eine Bioaffinitätsträger, bestehend aus Anti-EE2-Antikörper immobilisiert auf magnetischen Partikeln (MP), wobei die an den MP gebundenen Analytmoleküle im Anschluss in einer elektrochemischen Zelle in ihre freie Form übergeführt wurden und diese über voltammetrische Detektion (SWV-square wave voltammetry) mit einer speziell entwickelten Kohlenstoffelektrode, modifiziert mit multi-walled Carbonanotubes (MWCNT),

quantifiziert wurden. Die Blindwertmethode wurde dabei zur Bestimmung der Methodengrenzen eingesetzt, wobei eine Nachweisgrenze von 0,01 ng/L bzw. einer Bestimmungsgrenze von 0,033 ng/L berechnet werden konnte.

Neben dem klassischen instrumentell-analytischen Ansatz, wo Zielmoleküle identifiziert und deren Konzentration quantifiziert werden können, gibt es auch einen alternativen Weg, den der wirkungsbezogenen Analytik. Dabei wird die östrogene Aktivität, als Summenparameter, mit Hilfe von transgenen Organismen, wie Hefezellen oder humanen Brustkrebszellen, erfasst, wobei keine konkrete Aussage zu einzelnen Substanzen getroffen werden kann. Die östrogene Aktivität wird dabei durch den Bezugspunkt 17β-Estradiolequivalentkonzentration (EEQ) ausgedrückt und umfasst die Gesamtheit der östrogen wirksamen Stoffe. Im Vergleich zum instrumentellen Ansatz werden hier auch Stoffe, die antiöstrogene Effekte zeigen, also Substanzen, die die östrogene Wirkung in einem Organismus unterdrücken können, miterfasst [56]. Diese Herangehensweise liefert damit ein breiteres Bild der östrogenen Belastung eines Gewässers bzw. der entsprechenden Umweltprobe. Die eingesetzten Assays basieren prinzipiell auf der Bindung der östrogen aktiven Substanz an den entsprechenden humanen Rezeptor in den eingesetzten transgenen Zellen, wodurch ein Reporter-Enzym expremiert wird. Dieses Enzym wird im Anschluss üblicherweise photometrisch über eine Enzym-Substrat-Reaktion analysiert [72]. So haben Itzel *et al*. [73] unter anderem den *Arxula Adeninivorans Yeast Estrogen* Screen (A-YES) zur Analyse der östrogenen Aktivität verwendet, um die Effizienz des Ozon-Nachbehandlungsprozesses von Abwasser in einer Kläranlage zu bestimmen. Die erzielten Nachweisgrenzen der Bioassays belaufen sich dabei auf 0,032 ng EEQ/L und zeigen, dass mitunter eine bessere Empfindlichkeit gegenüber instrumentellen Verfahren erreicht werden kann.

Jedoch können über die hier behandelten Methoden keine Differenzierung zwischen E1, E2 , EE2 oder anderen unregulierten Substanzen, die auch eine gewisse Affinität zum jeweiligen Rezeptor besitzen, erfolgen. Zudem ist es nicht möglich das Signal im Bereich zwischen 0,035 ng/L und 0,4 ng/L bei positiven Nachweis EE2 zuzuordnen, daher wird ein sogenannten „Trigger-Wert“ von 0,4 EEQ/L eingeführt bei dessen Unterschreiten der Gewässerzustand als „gut bis sehr gut“ definiert ist [72]. Auf instrumenteller analytischer Seite werden wiederum mit den zurzeit verfügbaren Methoden nur in selten Fällen die geforderten Nachweisgrenzen, vor allem für EE2, der Beobachtungsliste in Realproben erreicht. Daher ist die Entwicklung neuer, empfindlicher und selektiver Annalysenmethoden, wie die vorgestellte Arbeit, von entscheidender Bedeutung.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien und Chemikalien

Tabelle 1 Eingesetzte Software und deren Funktion

Software	Betreiber	Version	Funktion
Chronos	Axel Semrau (D)	4.6.0.0	Steuerung RTC PAL, ACE und HPD
AS SEM Methodeneditor	Axel Semrau (D)	1.2.3.2043	Erstellung von SPE-Abläufen und -Methoden
Analyst	AB Sciex GmbH. (D)	1.6.3	Datenaufzeichnung & -auswertung

Tabelle 2 Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Stammlösungen

Chemikalie	Hersteller	Molekulargewicht [g/mol]	Reinheit/Konzentration
Reinsubstanzen			
Acetonitril	Chemsolute-TH.Geyer (D)	41,05	LC-MS
Ammoniumfluoride	Fluka (D)	37,04	> 98,0%
Ammoniak-Lösung	LGC Promochem (GB)	-	21%
Methanol	Chemsolute-TH.Geyer (D)	32,04	LC-MS
Wasser	Chemsolute-TH.Geyer (D)	18,02	LC-MS
Stammlösungen			
Estron*	Sigma-Aldrich (USA)	270,37	1 g/L (99%)
17β-Estradiol*	Sigma-Aldrich (USA)	272,38	1 g/L (98%)
17α-Ethinylestradiol*	Sigma-Aldrich (USA)	296,40	1 g/L (98%)
Estron-d4*	Isotec (USA)	274,41	1 g/L (95 atom% D)
17β-Estradiol-d3*	Isotec (USA)	275,42	1 g/L (98 atom% D)
17α-Ethinylestradiol-d4*	CDN Isotopes (CAN)	300,43	1 g/L (98 atom% D)

* hausintern hergestellt aus den Reinsubstanzen in Methanol

Tabelle 3 Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Anmerkung/Format
Spritzenfilter		
Polyethylenterephthalat PET	Macherey-Nagel (D)	45 µm/25 mm
Glasfaser GF	Macherey-Nagel (D)	100 µm /25 mm
PET/GF	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Polyamid PA	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Regenerierte Cellulose RC	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Celluloseacetat CA	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Cellulose-Mix	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Polytetrafluorethylen PTFE	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Polyvinylidenfluorid PVDF	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Polyethersulfon PES	Macherey-Nagel (D)	45 µm /25 mm
Offline-SPE Kartuschen		
AFFINIMIP SPE-Estrogens	Affinisep (FR)	3 mL
Bakerbond Speedisk C18	J.T. Baker (USA)	50 mm
Online-SPE Kartuschen (10 x 1 mm)		
CN-SE	Spark Holland (NL)	7 µm
C2-SE	Spark Holland (NL)	7 µm
C8 EC-SE	Spark Holland (NL)	10 µm
C18 HD	Spark Holland (NL)	7 µm
Resin GP	Spark Holland (NL)	10 µm
Resin SH	Spark Holland (NL)	35 µm

4.2. Gerätekonfiguration und Funktionsweise

Die in dieser Arbeit angeführten Messungen wurden an dem in Abbildung 9 dargestellten System durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine spezielle Konfiguration der CHRONECT µSPE-Einheit von Axel Semrau gekoppelt mit einer QTRAP 6500+ von AB Sciex. Im nachfolgenden Kapitel werden sowohl der Aufbau und die Funktionsweise des Systems beschrieben, als auch der Ablauf der einzelnen Messmodi erläutert.

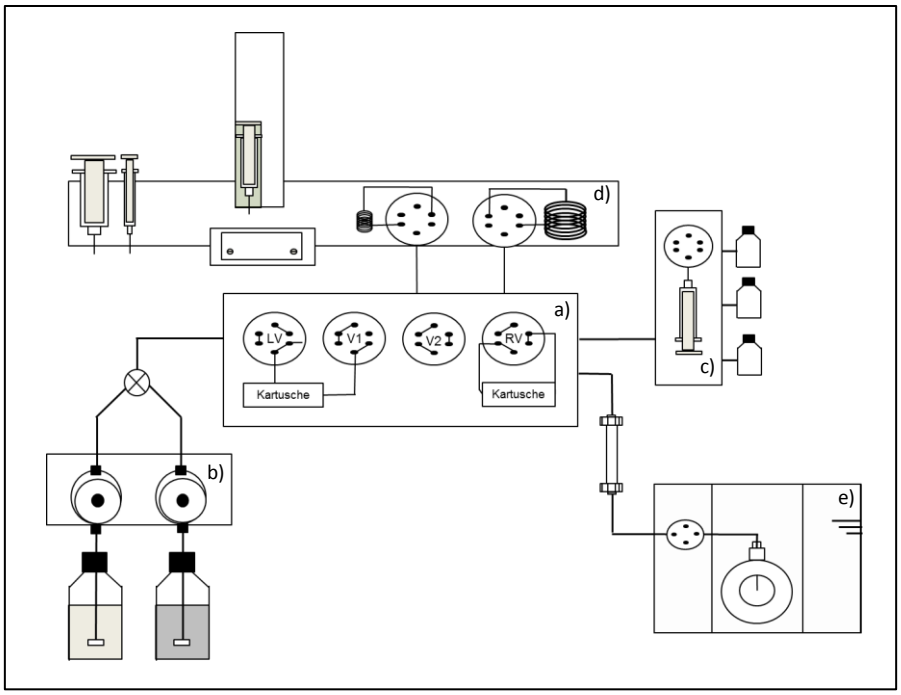

Abbildung 9 Schematische Darstellung des Messsystems bestehend aus a) ACE-Einheit b) Agilent 1100 Pumysystem c) HPD-Einheit d) PAL RTC e) QTRAP 6500+

Als Herzstück des Messsystems agiert die CHRONECT µSPE, die aus einem Ventilsystem (ACE, Abbildung 9a) zur Steuerung der Flusswege, als auch aus einer Kartuschenwechseleinheit zur Bereitstellung und Beförderung der SPE-Kartuschen besteht. Die beiden Einheiten stammen dabei von Spark Holland und werden in Kombination mit dem Autosampler als Chronos CHRONECT µSPE von Axel Semrau vertrieben. Der Flüssigkeitsstrom zur Elution der Kartuschen kann einerseits über ein klassisches Pumpsystem der Serie 1100 von Agilent (Abbildung 9b) bereitgestellt werden, oder über eine Hochdruckspritzenpumpe (HPD, Abbildung 9c) mit unterschiedlichen Lösemittel zur Elution, Konditionierung oder etwaiger Waschschritte, versorgt werden. Hier liegt bereits eine Besonderheit des Systems, da die Verwendung von speziellen, bis zu 300 bar druckfesten Kartuschen, anstelle der herkömmlichen SPE-Kartuschenformate, den Einsatz der Hochdruckpumpe gewährleisten und damit eine präzise und reproduzierbare Förderung sichergestellt wird. Die Probenzufuhr erfolgt vollautomatisch durch den RTC PAL Autosampler (Abbildung 9d), der mit drei unterschiedlichen Spritzen(100 µL, 1 mL, 10 mL) und zwei Injektionsventilen ausgestattet ist, die je nach Bedarf innerhalb einer Analysenserie variiert werden können. Zudem ist es bei der Anwendung der SPE-Kartuschen möglich, eine mehrmalige Probenaufgabe durchzuführen und damit die Probenmenge auf ein Vielfaches von 10 mL zu erweitern. In dieser Arbeit wurden eine 50 µL Probenschleife für den klassischen LC-Modus, als auch eine 1 mL Schleife für die Messung mittels online SPE verbaut. Über das Ventilsystem des ACE gelangt die Probe von der Kartusche bzw. der Probenschleife auf die Säule, wo die Trennung der Analyten erfolgt. Dabei befindet sich die Säule in einem auf 40°C beheizten AµMass-Säulenofen, der mit Hilfe einer Halterung nahe an das Massenspektrometer herangeführt wird, um das Totvolumen der Transferleitung und damit die Bandenverbreiterung zu minimieren. Detektiert werden die so aufgetrennten Hormone über eine QTRAP 6500+ von AB Sciex. Die QTRAP 6500+ bietet dabei die Option über einen schnellen Wechsel des Emittertips sowohl im ESI-Modus als auch im APCI-Modus betrieben zu werden und durch die Kombination der Triplequad-Technologie mit einer linearen Ionenfalle MRM^3-Messungen für erhöhte Selektivität durchführen zu können.

Neben den unterschiedlichen Messoptionen hinsichtlich Detektion und Probenaufgabe, können durch eine optimale Wahl der Ventilanschlüsse und Ventilstellung mehrere Varianten der online SPE und ein effizienterer Probendurchsatz realisiert werden.

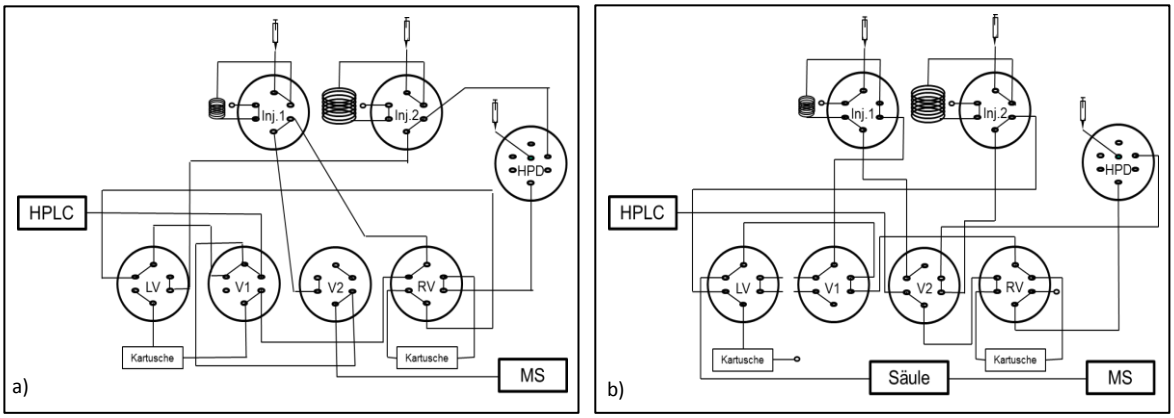

Abbildung 10 Konfiguration der Flusswege a) neue Konfiguration b) alte Konfiguration

So wurden im ersten Schritt dieser Arbeit die Flusswege der online SPE bzw. die einzelnen Ventilanschlüsse optimiert, da die alte Konfiguration einige ungenutzte Ventilports (LV und V1 in Abbildung 10) aufwies. Zu diesem Zweck wurde in V1 eine spezielle Variante des 3-Wege-Ventils mit integriertem T-Stück eingebaut, um eine sogenannte Pfropfenelution zu ermöglichen. Dabei wird die auf die Kartusche aufgegebene Probe mit einer gewünschten Menge reinem, organischem Lösungsmittel mittels HPD eluiert und über das T-Stück mit dem LC-Fluss zusammengeführt. Neben dem klassischen LC-Modus, und einer herkömmlichen online-SPE Messung kann auch eine serielle Kombination aus zwei Kartuschen verwendet werden. Bei dieser Variante wird die Probe zunächst auf die Kartusche in der linken Klammer der Kartuschenwechseleinheit aufgebracht und in einem anschließenden Schritt die Probe mit einem geeigneten Lösemittel auf die zweite Kartusche in der rechten Klammer transferiert. Dabei muss jedoch auf die Kompatibilität der beiden Kartuschen (z.B. erste Normalphasenkartuschen, zweite Umkehrphasenkartusche), sowie der eingesetzten Lösemittel geachtet werden. Im finalen Schritt wird dann die Probe mithilfe des LC-Flusses oder mittels Pfropfenelution auf die Säule aufgebracht. Neben den unterschiedlichen SPE-Modi ist ein weiterer Vorteil der effizientere Probendurchsatz. So können bei der Pfropfenelution, als auch im simplen online SPE-Modus zwei Proben zeitlich versetzt bzw. „verschachtelt“ und damit quasi parallel bearbeitet werden. Die einzelnen Schritte und zugehörigen Flusswege sind im Anhang zu finden.

Die gesamte Steuerung der CHRONECT µSPE, sowie des Autosamplers PAL RTC erfolgt über die Software CHRONOS von Axel Semrau, wobei durch Einbinden der Analyst Software von AB Sciex die Datenaufzeichnung ermöglicht wird.

4.3. LC-Modus

Der LC-Modus steht als Synonym für eine herkömmliche, flüssigchromatographische Messung der eingebrachten Probe, ohne vorangehende Anreicherung über die CHRONECT µSPE-Einheit. Diese dient im LC-Modus durch eine entsprechende Ventilstellung (Abbildung 11) als reiner Transfer der injizierten Probe auf die Säule. Zudem wird in der LC-Variante ausschließlich Injektor 1 mit einer 50 µL Probenschleife verwendet und die entsprechende Menge Probe mittels 100 µL Spritze injiziert.

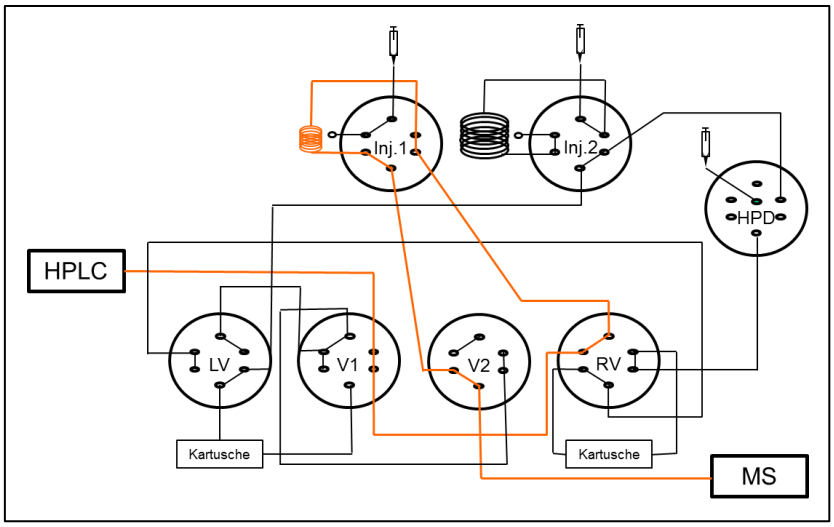

Abbildung 11 Ventilstellung und Flusswege im LC-Modus

Der Ablauf einer Messung der Probe mittels LC-Modus beginnt zunächst mit der Initialisierung der Chronossoftware und dem Überprüfen der aufrechten Kommunikation zwischen CHRONOS und Analyst. In weiterer Folge wird der Injektor 1 in Ladeposition gebracht und die LC-Methode geladen. Die Methode gibt dabei die Ventilstellungen des ACE an, stellt eine Verknüpfung der in der Batchliste eingetragenen Parameter, wie Laufzeit, Injektionsvolumen, verwendete Spritze etc., her und übernimmt die jeweiligen Parameter für die Messung. 60 µL Probe werden mittels 100 µL Spritze aufgezogen und in die Probenschleife transferiert. Beim Schalten des Injektionsventils 1 in die Inject-Position wird gleichzeitig ein Signal an Analyst übermittelt, wodurch die Aufzeichnung des MS erfolgt. Während der Messung werden sowohl Spritze als auch Injektor 1 (in Ladeposition) mit 100% bzw. 10% des Füllvolumens Wasser und Acetonitril gewaschen. Nach beendetem Waschvorgang begibt sich der PAL in die Home-Position, wodurch das System zur nächsten Messung bereitsteht und auf das entsprechende Signal wartet.

4.4. Online SPE

Der Ablauf einer Messung mittels vorhergehender Anreicherung über die CHRONECT µSPE-Einheit gestaltet sich im Vergleich zum LC-Modus deutlich komplexer, wobei hier das volle Potential des online SPE-Systems ausgenutzt wird. Für die Probenaufgabe ist an Injektor 2 eine 1 mL Probenschleife eingebaut, die mittels 1 mL Spritze über den RTC PAL befüllt wird.

Wie auch beim LC-Modus wird zu Beginn des Ablaufs die Kommunikation der beiden Softwaren sichergestellt und die umfangreiche SPE-Methode geladen. Diese beinhalten die einzelnen Verfahrensschritte, wie Konditionierung, Äquilibrierung etc. und die dazugehörigen Ventilpositionen, sowie die für jeden Schritt gewählten Lösemittel. Realisiert wird die Auswahl der Flüssigkeiten über die Angabe des entsprechenden Ventilanschlusses am HPD. Weiters können in der Methode Lösemittelvolumina und Geschwindigkeit der Hochdruckspritzenpumpe hinterlegt und die in den Batchlisten definierten Parameter übernommen werden. Wenn nicht anders im Text vermerkt, wird für alle angeführten online SPE-Messungen eine Aufgabegeschwindigkeit des HPD von 2 mL/min verwendet, da dies einen Kompromiss aus mechanischer Abnutzung und zeitlichem Aufwand darstellt. Neben Injektionsvolumen, Laufzeit und Spritzen, sind in den Batchlisten die Positionen des Kartuschengestells, die Kartuschennummer, sowie das Volumen zur Überführung der Probe aus der Injektionsschleife auf die Kartusche anzugeben.

Im nächsten Schritt werden die einzelnen Punkte der Methode von ACE und HPD abgearbeitet. Dazu wird die hinterlegte Kartusche anfangs ausgewählt und in die linke Klammer eingespannt. Mittels Synchronisationsschritts wird der HPD angesprochen, welcher die gewünschte Menge an organischem Lösungsmittel zur Konditionierung, in dieser Arbeit 2 mL Methanol, bereitstellt und überführt. Für die Äquilibrierung wird im Anschluss 2mL Wasser auf die Kartusche transferiert und die geeignete Injektionsspritze für die Probenaufgabe ausgewählt. Die auf 6 °C gekühlte Probe wird in die Schleife überführt und mit 2 mL Wasser auf die Kartusche aufgebracht. Im Anschluss wird die Kartusche mittels der Kartuschenwechseleinheit in die rechte Klammer eingespannt und über den LC-Fluss der Pumpe eluiert, wobei über ein Signal die Messaufzeichnung gestartet wird. Nur durch den Transferschritt der Kartusche wird eine parallele („verschachtelte“) Bearbeitung der Proben ermöglicht.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die unterschiedlichen Ventilstellungen für die einzelnen Verfahrensschritte in der online SPE.

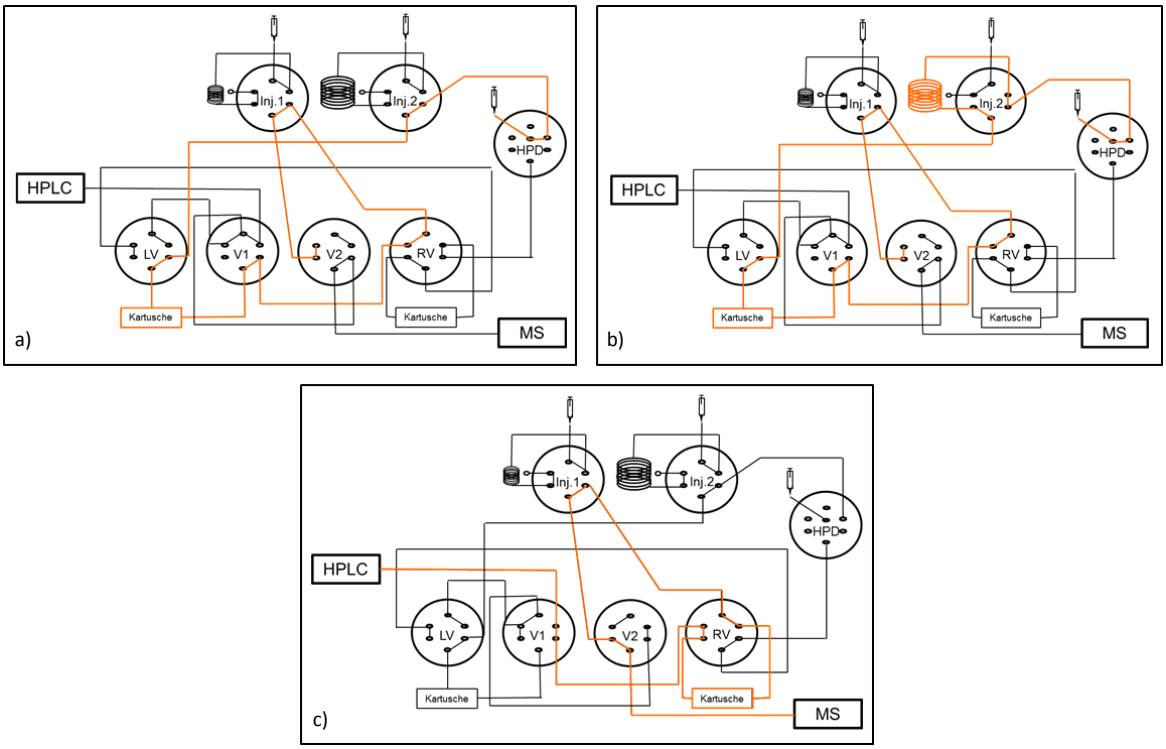

Abbildung 12 Ventilstellungen und Flusswege der einzelnen online-SPE Schritten a) Konditionierung & Äquilibrierung b) Probenaufgabe c) Elution

4.5. Strategie & Konzept der Methodenentwicklung

Im Allgemeinen muss bei der Methodenentwicklung der Umfang bzw. Aufwand mit dem zur Verfügung stehende Zeitraum abgestimmt werden, da zumeist unzählige Ansatzpunkte bestehen, die nicht zur Gänze im Detail betrachtet werden können. Daher wurde zu Beginn der Masterarbeit ein grobes Konzept bzw. Leitfaden erarbeitet, der sich vereinfacht in drei größere Abschnitte unterteilen lässt.

Der erste Teilbereich handelt von der Erarbeitung einer geeigneten LC-Methode, die eine zuverlässige Bestimmung der drei Analyten Estron, Estradiol und Ethinylestradiol ermöglicht. Dabei wurden Laufmitteladditive und Säulen unterschiedlichster Selektivität verglichen, Laufmittel variiert, sowie Gradienten optimiert. Ein weiterer, kleinerer Aspekt des ersten Arbeitspakets war die

Optimierung der MS-Parameter, Quellenparameter und Experimente mit dem MS^3-Modus der QTRAP 6500+. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf einer Steigerung der Signalintensität, einer Basislinientrennung der Analytpeaks, sowie der ausreichenden Abtrennung möglicher Matrix- bzw. Störpeaks in den einzelnen Massenspuren.

Der zweite Abschnitt sollte sich mit der online SPE befassen, wo die geeigneten Kartuschenmaterialien gewählt, entsprechende Spül- bzw. Waschschritte eruiert und auch die optimale Menge und Art der Lösemittel für den Spülschritt bestimmt werden sollten. Der Fokus wurde dabei auf die Matrixabtrennung von hauptsächlich coeluierenden Substanzen mittels Waschschrittes gelegt, die zu einer starken Signalsuppression führen.

Der dritte und letzte kleinere Abschnitt beschäftigt sich mit der manuellen Probenvorbereitung, wo zusätzliche Aufreinigungsschritte durch Einsatz von MIP-Kartuschen ausgetestet wurden. Als Nebenaspekt dieses Teilbereichs sollte zudem eruiert werden, ob eine Automatisierung des Anreicherungsschrittes durch das SPEDex 5000 System von Horizon ermöglicht werden kann.

Als finales Experiment sollten im Anschluss die Methodenparameter, wie Nachweis und Bestimmungsgrenzen, der entwickelten Methode zur Bestimmung von Östrogenen im Oberflächengewässer und Abwasser erfasst werden. Die genannten Ansatzpunkte der Methodenentwicklung sind nachfolgend dargestellt.

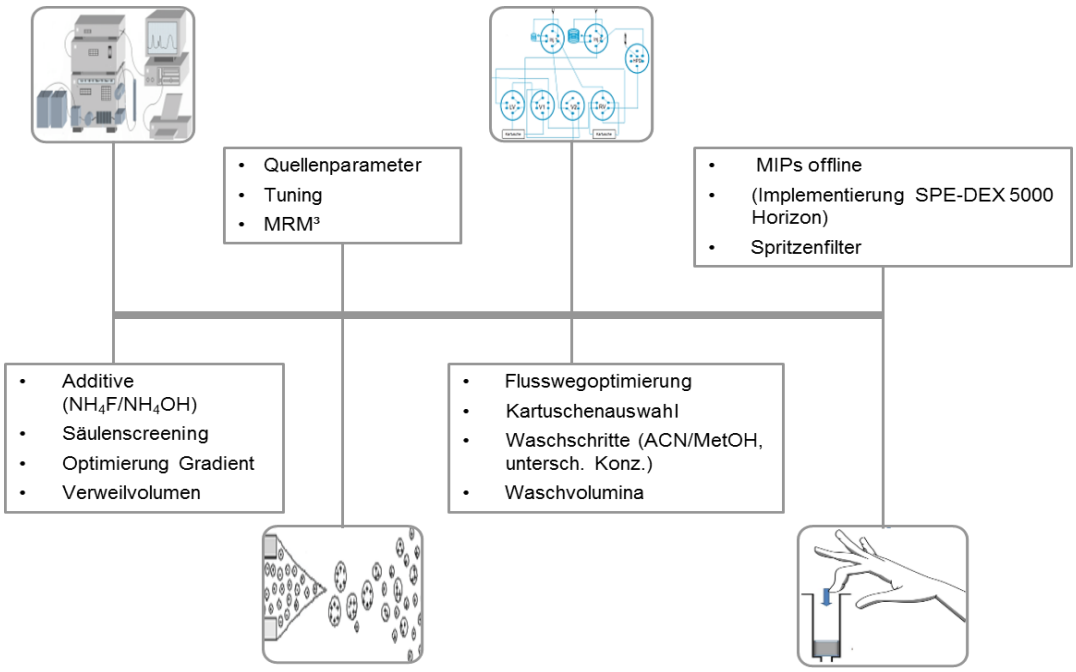

Abbildung 13 Überblick über die Ansatzpunkte der Methodenentwicklung

4.6. Methoden und Praktische Arbeit

4.6.1. Probennahme

Wie bereits in Kapitel 1 erläutert, behandelt diese Arbeit ausschließlich die in der Wasserrahmenrichtlinie der EU-Kommission definierte Probenmatrix, Oberflächengewässer, sowie der als Punktquelle auftretende Kläranlagenablauf. Um repräsentative Proben für die Erstellung einer geeigneten Messmethode zu erhalten, wurden die umliegenden Kläranlagen, sowie der nahegelegene Rhein als Repräsentant des Oberflächengewässers, in Form von Stichproben beprobt. Die nachfolgende Abbildung zeigt die einzelnen, nahegelegenen Probenahmestellen in der Region Duisburg.

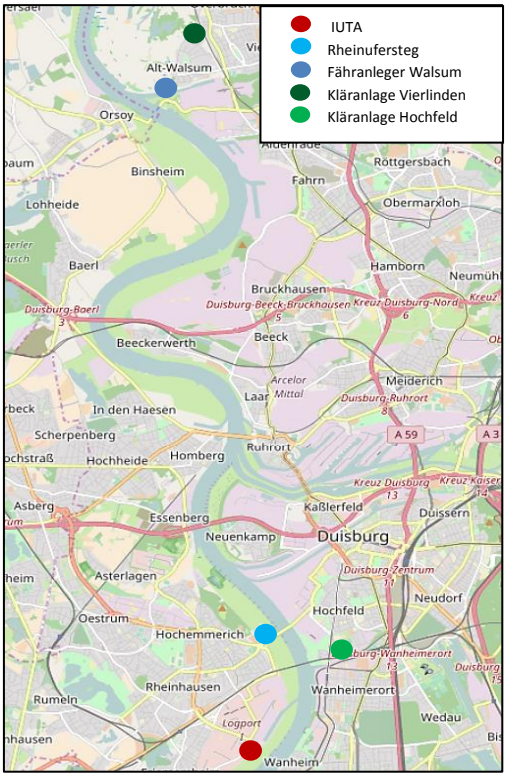

Abbildung 14 Regionale Probenahmestellen Duisburg

Zur Vorbereitung der Probennahme wurden die gewählten Gefäße zunächst im Geschirrspüler einem geeigneten Reinigungsprogramm unterzogen, anschließend im Trockenschrank getrocknet, weiters mit unterschiedlichen Lösungsmitteln wie Methanol und Ethylacetat gespült und über Nacht im Abzug ausgedampft. In einem finalen Schritt wurden die Gefäße bei 400 °C im Muffelofen für mehrere Stunden ausgeglüht, um noch etwaige Analytrückstände zu eliminieren.

Die eigentliche Probenahme des Kläranlagenablaufs erfolgte, nach Absprache mit den jeweiligen Kläranlagenbetreibern, an einem geeigneten Schacht oder Ablaufrinne, wo mittels Probenahmehilfe die gewünschte Menge in das vorbereitete Probengefäß überführt wurde. Zudem wurden Parameter, wie Leitfähigkeit, Temperatur und pH-Wert, sowie optische Merkmale der Probe vor Ort bestimmt und dokumentiert. Erfolgte die Entnahme des Rheinwassers am Fähranleger Walsum, wurde der beschriebene Ablauf am Fähranlegersteg wiederholt. Alternativ dazu, wurde jedoch auch das Rheinufer in Rheinhausen beprobt, wobei aufgrund der Dringlichkeit bzw. Verfügbarkeit des Probenahmeequiptments keine Vorortbestimmung der Probenparameter vorgenommen wurde.

4.6.2. Lagerung

Nach dem Transport der Proben wurden diese zunächst, sofern nicht umgehend abgefüllt, im Kühlhaus < 8 °C gelagert. Wie aus früheren Experimenten hervorging, ist eine stabile Lagerung der Wasserprobe in ihrer ursprünglichen Form (wässrige Matrix) für die Hormonanalytik nur in einem Zeitraum von 2 Tagen gegeben, da diese einem schnellen mikrobiellen Abbau, sowie Transformation von E2 zu E1 unterliegen [74]. Daher muss die Aufarbeitung der Proben möglichst zeitnah, innerhalb dieser beiden Tage, erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die Proben in saubere, ausgeglühte 1 Liter Probengefäße überführt. Je nach Verwendungszweck wurden die Proben anschließend mit unterschiedlichen Mengen an internem Standard und/oder Analyt gespiked. Die genauen Konzentrationen sind in den jeweiligen Unterkapiteln im Nachfolgenden angegeben. Um die Stabilität der Proben für einen längeren Zeitraum zu gewährleisten wurden die 1 L Proben im Laufe der Probenvorbereitung auf C18 Speedisk Kartuschen angereichert, getrocknet und anschließend bei -21 °C in Alufolie verpackt gelagert. So konnte ein Abbau/Umlagerung bedingter Verlust der Analyten verhindert und die Proben abermals mit Methanol zu einem passenden Zeitpunkt eluiert werden. Die einzelnen Arbeitsschritte sind detailliert dem Kapitel 4.6.3 zu entnehmen.

4.6.3. Manuelle Probenvorbereitung/Anreicherung

Nicht nur zum Zweck der stabilen Lagerung, sondern auch aufgrund der benötigten Anreicherung der Analyten aus der Probenmatrix bestand der Großteil der manuellen Probenvorbereitung aus einer Festphasenextraktion von 1 L Probe über C18 Speedisk-Kartuschen. Die chemische Natur der Östrogene, mit ihrem schwach polaren Charakter, lassen sowohl eine Anreicherung auf Normalphasen, als auch auf RP-Materialien zu. Da jedoch C18-Kartuschen zu den gängigsten Phasen zählen, eine sehr gute Wiederfindung für Östrogene aufweisen und zudem in einem speziellen Kartuschenformat (Speedisk) für stark partikelbelastete Proben kommerziell erhältlich sind, werden sie für die Anreicherung standardmäßig eingesetzt. Zudem ist eine Analyse der Gesamtwasserprobe im Rahmen der WRRL durchzuführen und somit eine entsprechende Filtration der Probe zur Abtrennung der Schwebstoffe nicht möglich. Daher bietet vor allem bei Klaranlagenabläufen, aber auch bei Rheinuferwasser, das spezielle Speediskformat eine geeignete Alternative, um auch unfiltrierte Proben problemlos, ohne Verstopfen der Kartuschen, mit sehr geringem Zeitaufwand, aufzuarbeiten.

Für die Festphasenextraktion wurde eine eigens für das Speediskformat konzipierte Halterung verwendet, die eine parallele Aufarbeitung von sechs Proben ermöglicht und in Abbildung 15 dargestellt ist. Zunächst wurden die Kartuschen mit einem doppelten Bettvolumen, entsprechend etwa 20 mL, Methanol mit einer Verweilzeit von etwa 5-10 Minuten konditioniert und für die Äquilibrierung weiters 20 mL Wasser aufgebracht. Nach einer abermaligen Verweilzeit von 5-10 Minuten wurde der noch verbliebene, wässrige Überstand entfernt, die Kartusche auf die Öffnung des 1 L Probengefäßes gegeben, mit einem schnellen Ruck um 180° gedreht und an der Halterung angebracht (Abbildung 15). Nach erfolgter Probenaufgabe wurden die Kartuschen im Luftstrom für etwa 20 Minuten getrocknet und je nach Verwendungszweck eingelagert oder eluiert.

Abbildung 15 Darstellung der Speedisk-Halterung bei der Probenaufgabe

Zur Elution der Analyten von der Kartusche erfolgte ein Wechsel auf eine klassisches SPE-Einheit, wo 25 mL Methanol vorgelegt und mit einer Geschwindigkeit von etwa 1-2 mL/min eluiert wurden, um eine ausreichende Interaktion mit dem Elutenten zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Proben an der Eindampfstation mittels N_2-Stroms bei 60 °C bis zur Trockene eingeengt und je nach Messmethode in 1 mL Wasser für einen LC- bzw. 4 mL Wasser für den online SPE-Modus aufgenommen. Ein exemplarisches Beispiel ist in der nachfolgenden Abbildung 16 gezeigt.

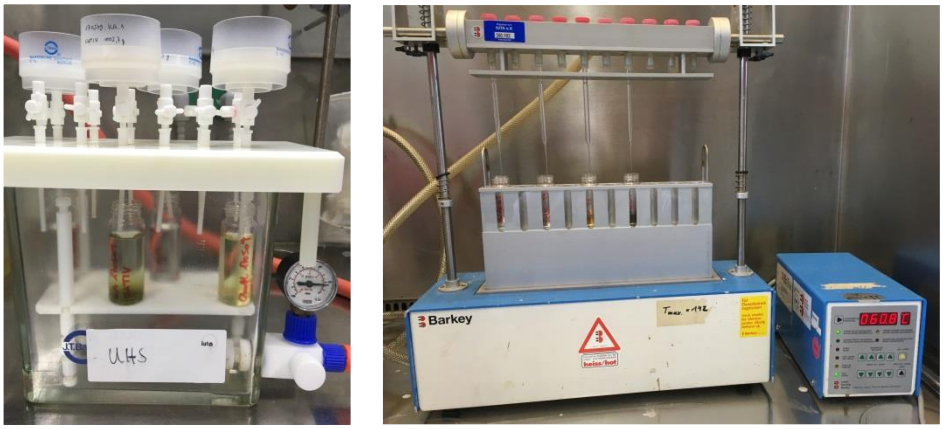

Abbildung 16 Manuelle Probenelution und Eindampfstation

Im finalen Schritt der Probenvorbereitung wurden die zum Teil stark partikelhaltigen Proben über einen Spritzenfilter, PET- oder PET/GF-Filter, je nach Verfügbarkeit, filtriert und in ein Vial abgefüllt. Die Auswahl der beiden Filtertypen erfolgte im Laufe der Arbeit über einen Vergleich von unterschiedlichen Filtermaterialen (Tabelle 3) anhand ihrer Wiederfindung. Mit 80-90% für die betrachteten Östrogene, sowie dem Porendurchmesser von 45 µm, womit klare Lösungen nach der Filtration erhalten werden konnten, wurden PET bzw. PET/GF-Filter ausgewählt.

4.6.4. Laufmitteladditive

Um die Auswirkungen unterschiedlichster Laufmittelzusätze auf das Analytsignal bestimmen zu können, mussten Lösungen der gewählten Additive in entsprechenden Konzentrationen hergestellt und über eine geeignete chromatographische Methode das resultierende Signal aufgezeichnet werden.

Da die Messung der Analyten im negativen ESI-Modus erfolgte, wurde zunächst Ammoniak als geeignetes Additiv gewählt, da durch eine klassische Säure-Basen Reaktion die Deprotonierung der Östrogene bei der Ionisation begünstigt wird und keine Salzrückstände in der Quelle durch den Verdampfungs- bzw. Ionisationsprozess zurückbleiben. Zudem zeigten vorhergehenden Messungen, aber auch eingehende Literaturrecherche [75], dass Ammoniumfluorid zu einer deutlichen Signalerhöhung bei der Bestimmung von Östrogenen im negativen Modus führt und somit als weiteres Laufmitteladditiv eingesetzt wurde.

Zunächst wurden für die beiden Versuchssubstanzen Stammlösungen durch Einwaage einer definierten Menge Ammoniumfluoride, 37,04 mg in 10 mL für eine 100 mM Lösung, bzw. Verdünnung der in Tabelle 2 angegebenen Ammoniaklösung auf 1% hergestellt. Weitere Verdünnungsschritte ergaben schließlich die entsprechenden Versuchslösungen im Bereich von 0,01-1 mM für Ammoniumfluorid und von 0,005-0,05 % für die Ammoniaklösung. Verwendet wurde dabei LC-MS Wasser als Lösungsmittel, da die Additive aufgrund der zum Teil auftretenden schlechten Löslichkeit in Acetonitril ausschließlich für die wässrige mobile Phase eingesetzt wurden. Für die Messungen wurde Acetonitril als organische Phase eingesetzt, aber auch Versuche mit Methanol als organischen Bestandteil durchgeführt, um die Auswirkungen auf das Signal von protischen bzw. aprotischen Lösemitteln zu ermitteln.

Bei der tatsächlichen Analyse wurde ein 1 ng/mL Standard aus den in Tabelle 2 angegebenen Stammlösungen durch Verdünnen hergestellt und dieser mit den im nachfolgenden angeführten chromatographischen Bedingungen getrennt und im negativen Modus über das $[M-H]^-$ Ion der jeweiligen Östrogene detektiert.

Tabelle 4 Eingesetzter Gradient für die Additivversuchsreihe

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Flussrate [ml/min]	Ofentemperatur [°C]
0	70	30	0,5	40
5	1	99	0,5	40
6	1	99	0,5	40
6,2	70	30	0,5	40
8,5	70	30	0,5	40

Der Gradient wurde dabei so gewählt, dass der Zeitaufwand gering gehalten wurde. Da vor allem bei Methanol ein größerer Rückdruck aufgrund der höheren Viskosität zu erwarten ist und das System nicht erheblicher Druckbelastung ausgesetzt werden sollte, wurde eine monolithische Säule, die Chromolith Fastgradient RP18 von Merck, für die Messung gewählt.

4.6.5. MRM Tuning und Quellparameteroptimierung

Eine Verbesserung des Analytsignals kann nicht nur durch die Zugabe von Additiven in die mobile Phase erfolgen, sondern auch durch eine optimale Wahl der MS-Parameter. Eine Möglichkeit dabei ist eine geeignete Temperatur bzw. geeignete Gasströme in der ESI-Quelle zu wählen, die zur Verbesserung der Ionisationsausbeute führen und die Spraystabilität positiv beeinflussen. Weiters können entsprechende Anpassungen von Kollisionszellspannung und Declustering Potential bei der MRM Messung abermals zu einer Zunahme der am Detektor registrierten (Fragment-)Ionen führen.

Die Ermittlung der optimierten ESI-Parameter wurde mit einer Fließinjektionsanalyse (FIA) im negativen Modus eines 50 ng/mL Standards von EE2 in 50:50 ACN:H_2O durchgeführt. Da über die spezielle Konfiguration des Systems keine automatische Parameteroptimierung durch die Software Analyst realisiert werden konnte, wurden die jeweiligen Parameter in der Analyst Methode manuell angepasst. Aufgrund des dadurch entstehenden hohen Zeitaufwands wurden die Untersuchungen ausschließlich für den kritischen Analyten EE2 (geringste Empfindlichkeit und höchste Anforderung) durchgeführt. Die Messung von 20 µL injiziertem Standard erfolgte bei einer Flussrate von 0,4 mL/min mit einer LC-Laufzeit von einer Minute und einer Laufmittelzusammensetzung von 50 % Acetonitril und 50% 0,01 mM NH_4F-Lösung.

Das MRM Tuning wurde über Injektion eines 100 ng/mL Standards (50:50 ACN:H_2O) des jeweiligen Östrogens mittels Spritzenpumpe, bei einer Flussrate von 7 µL/min durchgeführt. Zunächst wurden dabei durch einen Q1 MS-Scan die Massen der Vorläuferionen, sprich der entsprechenden Östrogene bestimmt. Der anschließende Product Ion Scan-Modus führte zu den Massen der Fragmentionen die im Q3 selektiert und schließlich am Detektor registriert werden. Die so erhaltenen Massenübergänge wurden im Anschluss für die automatische Optimierung der Kollisionsenergie, des Declustering Potentials, sowie des Kollisionsausgangspotentials über die Software Analyst verwendet. Die resultierenden Einstellungen können Kapitel 4.6.8 entnommen werden.

4.6.6. Säulenscreening & Totzeitbestimmung

Ein wichtiger Punkt in der Methodenentwicklung ist die Auswahl einer geeigneten LC-Säule, um sowohl eine gute Trennung der Analyten zueinander, aber auch von etwaigen Störpeaks zu gewährleisten und zudem eine optimale Peakform zu erreichen. Ein weiteres Kriterium in dieser Arbeit ist das bereits erwähnte Drucklimit von 300 bar, wodurch eine Einschränkung der Säulenauswahl für kleine Partikeldurchmesser (<< 3 µm) bzw. und/oder der Säulenlänge besteht.

Das Ziel dieses Experiments war eine geeignete Säule für das vorliegende Trennproblem zu finden, die die angeführten Kriterien erfüllt und zugleich eine angemessen kurze Laufzeit ermöglicht, um in der Routine einen optimalen Probendurchsatz gewährleisten zu können. Es sei hierzu explizit angemerkt, dass dieser Versuch keinen Vergleich der Säulen untereinander darstellt und somit auch keine Anpassung der Versuchsbedingungen auf die unterschiedlichen Dimensionen der gewählten Säulen vorgenommen wurde. Die Parameter der LC-Methode für das Screening können der Tabelle 6 entnommen werden.

Um ein breites Spektrum an unterschiedlichen Selektivitäten, Dimensionierungen und Typen (Monolith, Core Shell, Vollporös) abdecken zu können, wurden die in Tabelle 5 angeführten Säulen für das Screening verwendet.

Tabelle 5 Zusammenfassung der verwendeten Trennsäulen bei der Screeningversuchsreihe

Bezeichnung	Dimensionierung [mm]	Partikelgröße [µm]	Typ
Zorbax SB-C18	150 x 4,6	5	Vollporös
Zorbax Eclipse XDB-C18	100 x 4,6	3,5	Vollporös
Chromolith	50 x 2	-	Monolith
SunShell RP-AQUA (C28)	50 x 2,1	2,6	Core Shell
Raptor Biphenyl	50 x 2,1	2,7	Core Shell
Raptor Biphenyl	100 x 2,1	2,7	Core Shell

Um nun die Trennleistung der unterschiedlichen Säulen anhand der gewählten Kriterien beurteilen zu können, wurden matrixbelastete Realproben verwendet. Sowohl Rheinwasser (Ufer) als auch Kläranlagenablauf (Hochfeld) wurden über die in 4.6.3 beschriebenen Probenvorbereitung mittels C18 Speedisk aufgearbeitet und auf eine Endkonzentration von 10 ng/mL mit E1, E2 und EE2 dotiert. Zunächst wurde die Rheinwasserprobe über eine LC-Modus, bei einer Flussrate von 0,4 mL/min, analysiert, da eine deutlich geringere Matrixbelastung im Vergleich zum Kläranlagenablauf besteht und somit eine schonende Vorselektion der Säulen getroffen werden konnte. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung von 50 µL angereicherten Kläranlagenablaufs unter den nachfolgenden Bedingungen.

Tabelle 6 LC-Bedingungen bei der Screeningversuchsreihe

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Flussrate [ml/min]	Ofentemperatur [°C]
0	90	10	0,4	40
15	30	70	0,4	40
15,5	1	99	0,4	40
16,5	1	99	0,4	40
17	90	10	0,4	40
23	90	10	0,4	40

In diesem Zusammenhang wurde weiters, über einen Standardmix, mit einer Konzentration an 10 ng/ml an E1, E2, EE2 und dem Marker 5-Fluorouracil, die Totzeiten der einzelnen Säulen bestimmt. 5-Fluorouracil erwies sich bereits in vorhergehenden Fragestellungen des IUTA als geeigneter Totzeitmarker für C18- bzw. C18-ähnlichen Trennphasen und wurde daher auch für diesen Versuch ausgewählt.

4.6.7. Gradientenoptimierung

Um eine bestmögliche Abtrennung der Matrix, die sowohl in Form von Störpeaks im Chromatogramm, als auch in der Form von Signalsuppression bei Coelution auftreten kann, zu erreichen, muss ein optimaler Gradient für die LC-Methode gewählt werden. Zu diesem Zweck wurde

Rheinwasser (Ufer) mit einem Injektionsvolumen von 50 µL im LC-Modus mit unterschiedlichen Gradienten gemessen. Die gewählten Bedingungen sind in 4.6.8 dargestellt.

4.6.8. LC-MS Methodenparameter

Durch die vorangehenden Optimierungsexperimente bezüglich der Methodenparameter konnten geeignete Bedingungen für die finale LC-MS Methode gewählt werden, die im Nachfolgenden (Tabelle 7, Tabelle 9) dargestellt sind. Werden keine expliziten Anmerkungen bzw. Abweichungen zur angegeben Methode in den Unterkapiteln des Kapitels Methoden und Praktische Arbeit angeführt, so wurde diese bei den durchgeführten Versuchen übernommen.

Tabelle 7 Zusammenfassung der finalen LC-MS-Methodenparameter

LC-MS Parameter	
HPLC	
Säule	Restek Raptor Biphenyl (50 x 2,1 mm; 2,7 µm Partikeldurchmesser)
Ofentemperatur	40 °C
Temperatur des Autosamplers	4 °C
Eluent A	0,01 mM NH_4F-Lösung
Eluent B	Acetonitril
Flussrate	0,4 mL/min
Injektionsvolumen LC-Modus	50 µL
Injektionsvolumen online SPE	1 mL
Vorsäule	Restek Raptor Biphenyl (5 x 2,1 mm; 2,7 µm Partikeldurchmesser)
QTRAP 6500+ Parameter	
IonSpray Voltage (IS)	-4,5 kV
Temperatur	650 °C
Curtain Gas (CUR)	25 psi
Collision Gas (CAD)	Einstellung: High
Ion Source Gas 1 (GS1)	42 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	44 psi
Auflösung Q1	High
Auflösung Q3	High

In Tabelle 8 sind die ausgewählten Gradienten für den LC-Modus und der online SPE Variante gezeigt. Für den SPE-Modus ist anzumerken, dass aufgrund softwaretechnischer Probleme keine Ventilschaltung während dem LC-Lauf am ACE möglich ist. Daher wurde der Gradient so gewählt, dass der B-Anteil nicht auf ein Niveau von >> 50% erhöht wurde, um die verbleibende Matrix auf der

Kartusche nicht auf die Säule zu eluieren. Als Abhilfe zum ausbleibenden Spülschritt der Säule mit hohem B-Anteil wurde am Ende einer jeden Probensequenz eine Spülmethode angehängt.

Tabelle 8 Gradienten der finalen LC-MS-Methode (LC-Modus und online-SPE)

LC-Modus			Online SPE		
Zeit [min]	**A [%]**	**B [%]**	**Zeit [min]**	**A [%]**	**B [%]**
0	90	10	0	90	10
15	50	50	15	50	50
16	1	99	16	90	10
17,5	1	99	19	90	10
18	90	10	-	-	-
21	90	10	-	-	-

Tabelle 9 Zusammenfassung der aufgezeichneten MRM-Übergänge und zugehörigen Einstellungen in der finalen Methode

Bezeichnung	Q1 *m/z*	Q3 *m/z*	Zeit (dwell time) [msec]	Declustering Potential [V]	Collision Energy [eV]	Collision Exit Potential [V]
E1_1**	269	145	10	-155	-48	-15
E1_2*	269	143	10	-155	-68	-15
E1_3	269	183	10	-155	-50	-21
E1_4	269	159	10	-155	-46	-17
E2_1	271	183	10	-170	-54	-19
E2_2**	271	145	10	-170	-54	-15
E2_3	271	239	10	-170	-52	-25
E2_4*	271	143	10	-170	-68	-17
EE2_1*	295	145	10	-165	-48	-17
EE2_2	295	159	10	-165	-46	-17
EE2_3	295	199	10	-165	-52	-19
EE2_4**	295	269	10	-165	-44	-29
E1_d4_1	273	147	10	-130	-50	-17
E1_d4_2	273	145	10	-130	-72	-19
E2_d3_1	274	185	10	-150	-54	-23
E2_d3_2	274	145	10	-150	-52	-15
EE2_d4_1	299	147	10	-135	-50	-15
EE2_d4_2	299	161	10	-135	-46	-17

** Massenspur der Quantifizierung; * Massenspur zur Verifizierung

4.6.9. MS^3 Modus

Die Besonderheit der QTRAP 6500+ ist die Möglichkeit den Q3 als lineare Ionenfalle (LIT) zu verwenden und damit eine weitere Fragmentierung des Produktions im Vergleich zum klassischen MRM zu erreichen. Dies führt zu einer deutlichen Steigerung in der Selektivität der Detektion. Allerdings bringt dies auch eine Abnahme der Intensität mit sich. Ziel dieses Versuchs ist den Effekt des MS^3-Modus auf das Signal, mit Hauptaugenmerk auf die coeluierende Matrix zu legen, um idealerweise durch die erhöhte Selektivität weniger Matrixstörung und ein verbessertes Signal zu Rausch-Verhältnis zu erzielen. Hierdurch wäre, trotz Intensitätsverlusts eine Steigerung in der Empfindlichkeit möglich.

Anfänglich wurden über einen MS^3-Scan und Angabe der entsprechenden Vorläufer- und Produktionen des klassischen MRM für E1, E2 und EE2 die intensivsten Fragmentionen der LIT in einem Bereich von *m/z* 50-300 bestimmt. Dabei wurden mit einer Flussrate von 7 µL/min durch die integrierte Spritzenpumpe ein Standard von 50 ng/mL des jeweiligen Östrogens, gelöst in 50:50 ACN:H_2O, der Quelle zugeführt. Unterdessen wurde die Anregungsenergie (AF2) manuell variiert um eine stabile Generierung der Fragmentionen mit hoher Ausbeute zu ermöglichen. Die erhaltenen Massenübergänge für den MS^3-Modus sind nachfolgend dargestellt.

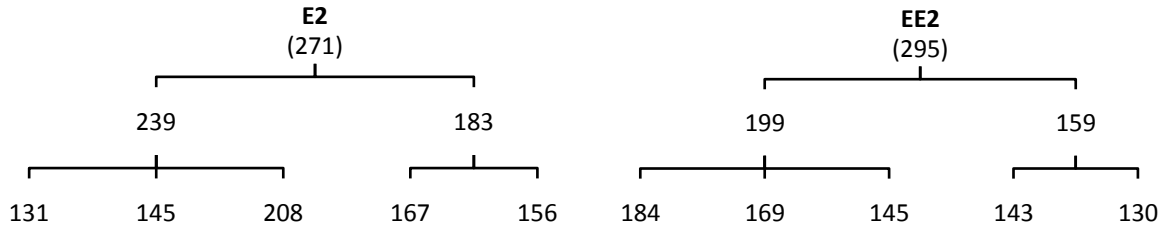

Abbildung 17 Verwendete Massenübergänge bzw. Fragmentionen des MS^3-Experiments

Zur Beurteilung der Auswirkungen auf das Signal in einer Realprobe wurden abermals mit 10 ng/mL dotiertes Rheinuferwasser und Kläranlagenablauf (Hochfeld) mittels klassischer LC-Messung untersucht. Die LC-Methode wurde mit den MS^3-Massenübergängen ergänzt und dabei zusätzlich die Signalaufzeichnung mittels einem Scan und dem Summieren von drei Scans gewählt.

4.6.10. Verweilvolumen

Die Methodenentwicklung stellt oftmals einen iterativen Prozess dar, bei dem laufend Parameter verändert werden. Handelt es sich dabei um Parameter, die einen starken Einfluss auf die Methode ausüben, muss diese an die geänderten Bedingungen angepasst werden. Ein Beispiel dafür ist die Änderung der eingesetzten Trennsäule, die durch ihre charakteristische Selektivität unter anderem starken Einfluss auf Trennleistung und Laufmittelzusammensetzung bei der Elution der Analyten zeigt.

So wurde zu Beginn der Arbeit, unter Verwendung der Chromolith Fastgradient RP18 Säule, die optimale Additivkonzentration der mobilen Phasen ermittelt, die eine größtmögliche Signalsteigerung verursacht. Da aufgrund der Löslichkeit nur der wässrigen mobilen Phase NH_4F zugesetzt wurde, ist das Optimum der Additivkonzentration abhängig von der Laufmittel-zusammensetzung bzw. des Anteils an Eluent A bei der Analytelution. In der finalen LC-MS Methode wurde jedoch als Trennsäule die Raptor Biphenyl von Restek eingesetzt, deren Interaktion mit der

Probe im Vergleich zur monolithischen C18 Säule primär über π-π Wechselwirkung erfolgt und somit ein Unterschied in der Selektivität bzw. Laufmittelzusammensetzung bei der Elution besteht.

Um nun die NH_4F-Konzentration an die finalen Gegebenheiten anzupassen, musste die tatsächliche Laufmittelzusammensetzung für die einzelnen Analyten bei den jeweiligen Methoden (Additiv/finale Methode) festgestellt werden. Einfache Berechnungen mittels Retentionszeit und Gradientensteigung ergeben hier ein falsches Bild, da aufgrund der Verweilzeit im System die berechnete Zusammensetzung nicht mit der tatsächlichen übereinstimmt. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurde über die in Abbildung 18 gezeigte Systemkonfiguration das Verweilvolumen bzw. die Verweilzeit im System bestimmt.

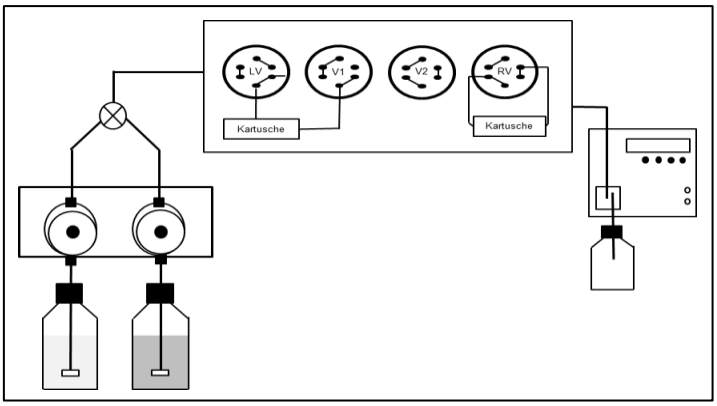

Abbildung 18 Systemkonfiguration zur Bestimmung des Verweilvolumens

Für diesen Versuch wurde die Art der Detektion von einer massenspektrometrischen Detektion auf eine UV-Detektion geändert, um den erstellten Gradienten einfacher und ohne Rauschen abbilden zu können. Hierzu wurde die abgehende Kapillare des ACE direkt mit der Detektorzelle der Shimadzudetektionseinheit verbunden und der Gradient bei 272 nm aufgezeichnet. Um ein entsprechendes UV-Signal registrieren zu können, wurde als Laufmittel Wasser (Eluent A) und 0,1%ige Acetonlösung (in Wasser, Eluent B) mit einer Flussrate von 0,4 mL/min durch das Kapillar- bzw. Ventilsystem geleitet. Dabei wurden zunächst die Ventilstellungen der LC-Variante und im Anschluss jener der online SPE inklusive Kartusche eingesetzt. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 Gradienten der Verweilvolumen-Versuchsreihe

LC-Modus			Online SPE		
Zeit [min]	**A [%]**	**B [%]**	**Zeit [min]**	**A [%]**	**B [%]**
0	90	10	0	90	10
4	90	10	5	90	10
12	10	90	12	10	90
14	10	90	16	10	90
15	90	10	17	90	10
18	90	10	20	90	10

4.6.11. MIP-Kartuschen zur manuellen Aufreinigung

Können Störkomponenten in der Probe nicht in einem ausreichenden Maße auf chromatographischen oder masstenspektrometrischen Weg abgetrennt bzw. eliminiert werden, müssen im Zuge der Probenvorbereitung weitere Aufreinigungsschritte etabliert werden. Bevorzugt werden dabei Methoden gewählt, die in ihrer Interaktion mit der Probe weitgehend unabhängig bzw. orthogonal von den übrigen Verfahrensschritten sind. Da sowohl die manuelle Anreicherung, als auch die LC-Methode mit RP-Materialen durchgeführt werden, ist eine Möglichkeit zur zusätzlichen Abtrennung der Matrix der Einsatz von sogenannten Molecular Imprinted Polymer-Kartuschen.

Für diese Aufreinigungsversuche wurden Kläranlagenablauf (Vierlinden) und Rheinwasser (Walsum) beim Abfüllen der 1 L Proben mit einer Endkonzentration von 5 ng/L E1, E2 und EE2 in der nativen Form bzw. 5 ng/mL angereichert (Anreicherungsfaktor 1000) und den internen Standards E1-d4, E2-d3 und EE2-d4 in einer Endkonzentration von 1 ng/L bzw. 1 ng/mL gespiked. Diese wurden im Anschluss über Speedisk Kartuschen angereichert und die Analyten für die weitere Aufreinigung abermals, statt in 1 mL Wasser, in 10 mL aufgenommen. Zusätzlich wurden 3 x 10 mL Standards bzw. QC (Quality Control)-Proben mit einer Konzentration von 5 ng/mL Analyten und 1 ng/mL internen Standards hergestellt. Als Blindwertproben wurde LC-MS Wasser verwendet.

Sowohl Blindwert und QC-Proben, als auch die angereicherten Realproben wurden mit Hilfe von AFFINISEP MIP Kartuschen aufgereinigt. Dazu wurden die Kartuschen zunächst mit 5 mL Acetonitril konditioniert und mit 5 mL Wasser äquilibriert. Die Probenaufgabe erfolgte in Schritten von je 3,5 mL, mit einer Durchlaufzeit von insgesamt 10 Minuten. Nach weiteren Waschschritten, mit 4 mL Wasser:Acetonirtil (80:20) und 2 mL Wasser, wurden die Kartuschen durch den Luftstrom für 10 Minuten getrocknet. Im finalen Schritt wurden die Analyten mit 3 mL Methanol eluiert, bis zur Trockene eingedampft und abermals in 1 mL Wasser aufgenommen. Zusätzlich zur MIP-Aufreinigung wurden, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, weitere Proben derselben Probenahme mit dem in Kapitel 4.6.3 beschriebenen Methode aufgearbeitet und beide Versuchsreihen über eine LC-Messung analysiert. Bei diesem Vergleich mussten, aufgrund des Schwebstoffanteils, die Proben ohne MIP-Aufreinigung mit RC-Spritzenfilter (keine Verfügbarkeit von GF/PET-Filter) vor der Injektion filtriert werden. Da aus diesem Grund keine direkte Vergleichbarkeit mehr gewährleistet ist, wurde, trotz des klaren Extrakts, zusätzlich eine der MIP-aufgereinigten Proben mit RC-Filtern filtriert.

4.6.12. Automatisierte Probenanreicherung SPEDex 5000

Das Automatisieren von Arbeitsschritte bringt im Idealfall zahlreiche Vorteile, wie die Verbesserung der Reproduzierbarkeit und des Probendurchsatzes, sowie einen geringeren Arbeits- und Zeitaufwand mit sich. Je nach Konzept und Umsetzung der Automatisierung werden bei Anwendung in der Praxis jedoch oftmals Hindernisse und Nachteile aufgezeigt, die den Einsatz für die Routine in Frage stellen.

Im Zuge dieser kleineren Versuchsreihe sollte der Einsatz des SPEDEex 5000 System von Horizon für die automatisierte Probenanreicherung anhand der möglichen Vorteile gegenüber der manuellen Variante beurteilt werden. Das verwendete Modul ist in Abbildung 19 gezeigt.

Abbildung 19 SPEDex 5000 Modul von Horizon

Zunächst wurde die in einer 1 L Schottflasche abgefüllte Probe, Blindwert oder QC-Probe auf das SPEDex Modul montiert, indem die Polymerhalterung mit eingesetztem Ventil auf die Schottflasche befestigt und die gesamte Konstruktion (Flasche+Halterung) mit einer 180° Drehung abermals am SPEDex Modul angebracht wurde. Im Anschluss wurden C18-HD-Disks für die Festphasenextraktion in die dafür vorgesehenen Halterungen eingelegt und verschraubt, sowie 40 mL Vials für die Elution befestigt. Über die beigefügte Software wurden anschließend die einzelnen Schritte der Probenanreicherung programmiert bzw. entsprechende Lösemittel, Volumina, Pumpenstärke und die damit verbundene Verweilzeit eingestellt. Der Ablauf, sowie die Parameter der SPEDex-Methode, sind detailliert im Anhang angegeben. Über das Softwareinterface kann der Ablauf nach erfolgtem Start der Festphasenextraktion mitverfolgt werden. Das methanolische Eluat wurde nach beendeter Extraktion mittels N_2-Stroms zur Trockene eingedampft und in 1 mL Wasser aufgenommen und über den LC-Modus analysiert. So wurden in diesem Zusammenhang Blindwerte mittels LC-MS Wasser der drei Einheiten des SPEDex-Moduls, sowie die Wiederfindung des Systems über 5 ng/ml QC-Proben (Analyt+interne Standards) bestimmt. Weiters wurden Realproben, Kläranlagenablauf (Vierlinden) sowie Rheinwasser (Walsum), über das SPEDex-System aufgearbeitet und wie in Kapitel 4.6.8 beschrieben im LC-Modus gemessen.

Zwischen den einzelnen Proben wurde eine, abermals im Anhang angegebene, Spülmethode verwendet um das System zu reinigen. Dazu wurden unbenutzte 1 L Schottflaschen, sowie Erlenmeyerkolben zum Auffangen der Waschlösung montiert. Vor der eigentlichen Systemreinigung mussten zudem die SPE-Disks entfernt und die Diskhalterungen manuell mit Methanol und Wasser gereinigt werden.

4.6.13. Kartuschenscreening in der online-SPE

Wie bei der manuellen SPE Anreicherung ist auch bei dem vollautomatisierten System die geeignete Wahl des Kartuschenmaterials unerlässlich, um die Analyten möglichst selektiv anzureichern und Matrix jeglicher Form bestmöglich abzutrennen. Da die CHRONECT µSPE-Einheit zudem direkt mit der chromatographischen Trennsäule gekoppelt ist, hat die Wahl des SPE-Materials zusätzliche Auswirkungen auf die Trennleistung des Systems.

Um eine geeignete Auswahl an unterschiedlichen Kartuschenmaterialien zur Verfügung zu haben, wurde ein Kartuschenset von Spark, konzipiert für die Methodenentwicklung, eingesetzt. Dieses

beinhaltet CN-, C2-, C8-, C18-, Resin GP- und Resin SH-Kartuschen, wodurch ein Großteil der verschiedenen RP-Materialien abgedeckt und ein guter Überblick geschaffen wird. Zudem wurde, als untersuchte Probe, Kläranlagenablauf (Vierlinden) verwendet, der aus einer großvolumigen Probenahme resultiert und für die weiteren online SPE Versuche eingesetzt wurde.

Um zunächst den Kläranlagenablauf anhand der nativ vorhandenen Hormonkonzentrationen zu charakterisieren und dabei bereits den erhöhten Anreicherungsfaktor beim Einsatz der online SPE zu berücksichtigen, wurde die Probe in 4 mL Wasser nach der Speedisk-Anreicherung aufgenommen und 1 mL dieses Konzentrats online auf eine C18 Kartusche überführt. C18-Kartuschen wurden anfänglich für die online SPE gewählt, da aus der Routine und Vorversuchen mit Analyten unterschiedlichster Substanzklassen gute Resultate bzw. Wiederfindungen erzielt werden konnten. Die Kartusche wurde vor der Probenaufgabe mit 2 mL Methanol mit einer Geschwindigkeit des HPD von 2 mL/min konditioniert und mit 2 mL Wasser bei 2 mL/min äquilibriert. Da die gesamte Menge des Analyten, enthalten in dem aufgebrachten Milliliter Probe, bei der online SPE letzten Endes über den Gradienten auf die Säule bzw. in die Ionenquelle gelangt, ergibt sich im Vergleich zur klassischen LC-Variante ein Anreicherungsfaktor von 20. Wird der gesamte Prozess inklusive manuelle Probenvorbereitung (1 L Probe auf 4 mL, Faktor 250) berücksichtigt, resultiert ein Anreicherungsfaktor der Analyten aus der ursprünglichen Probe von 5000 beim Einsatz des online SPE-Modus. Die Messung des Kläranlagenablaufs erfolgte wie in Kapitel 4.6.8 angegeben.

Im Zuge dieses Experiments wurde die Raptor Biphenylsäule aufgrund der abnehmenden Trennleistung und des zunehmenden Rückdrucks durch eine neue Restek Raptor Bihenylsäule ersetzt und eine zusätzliche Vorsäule eingebaut. Um die Matrixbelastung für die neue Trennsäule anfänglich gering zu halten, wurde die Kläranlagenprobe 1:10 verdünnt und mit 5 ng/mL E1, E2, EE2 sowie internen Standards dotiert. Das Kartuschenscreening wurde durch Verwendung von QC-Proben mit 5 ng/mL Analyten und internen Standards, sowie dem 1:10 verdünnten Kläranlagenablauf mit Hilfe der in Kapitel 4.6.8 angegebenen Methode durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine zweite Versuchsreihe mit Rheinuferwasser (1ng/mL dotiert) mit den bereits vorselektierten Kartuschen durchgeführt, um auch die Anwendbarkeit für Oberflächengewässer zu gewährleisten.

4.6.14. Optimierung des Waschschritts in der online SPE

Da die Matrixbelastung bzw. Signalsuppression bei Erhöhung des Anreicherungsfaktors weiter zunimmt, ist es unerlässlich Störkomponenten der Probe in Form von Waschschritten in der online SPE abzutrennen. Dabei ist es notwendig einen Kompromiss aus Matrixabtrennung und Analytverlust zu finden, um eine optimale Signalausbeute zu erhalten. Neben den eingesetzten Waschlösungen, die sich in dem zugesetzten Organikanteil, aber auch in der Art des verwendeten organischen Lösemittels unterscheiden, muss zudem die Menge bzw. das Volumen der Waschlösung optimiert werden.

Für diesen Versuch wurden Mischungen von Wasser/Acetonitril bzw. Wasser/Methanol in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, da die beiden organischen Komponenten gängige Zusätze für Waschschritte in der Festphasenextraktion darstellen. So wurden Lösungen mit einem Organikanteil von 5%, 10% und 15% hergestellt und jeweils an die verfügbaren Ports am HPD angeschlossen. Zudem wurde ein Waschschritt mit LC-MS Wasser durchgeführt. Als Realproben wurden Kläranlagenablauf (Vierlinden) sowie Rheinwasser (Walsum) über Speediskkartuschen

angereichert und mit 5 ng/ml E1, E2 und EE2 dotiert. 1 mL der in 4 mL Wasser aufgenommenen Proben wurde auf konditionierte und äquilibrierte CN-Kartuschen vollautomatisch überführt und anschließend mit 1 mL der angesetzten Waschlösungen mit einer Geschwindigkeit der HPD-Spritzenpumpe von 2 mL/min gewaschen. Die Elution bzw. Messung erfolgte mit dem in Kapitel 4.6.8 angegebenen Gradienten für den online SPE-Modus.

In einem weiteren Experiment wurde die optimale Menge der ausgewählten Waschlösung bestimmt. Hierzu wurden abermals die oben angeführten Proben und die genannten Bedingungen in der online SPE verwendet. Die Realproben, Kläranlagenablauf und Rheinwasser, wurden innerhalb der Versuchsreihe jeweils mit 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL und 2 mL Waschlösung mit einer Geschwindigkeit von 2 mL/min vollautomatisch gewaschen und abermals die Effekte auf das Analytsignal bestimmt.

4.6.15. Resultierende online SPE-LC-MS-Methode

Aus den vorangehenden Experimenten konnte eine optimale Messmethode zur Bestimmung von ausgewählten Östrogenen im Oberflächen- und Abwasser entwickelt werden. Die Parameter, inklusive des gesamten Ablaufs, werden als Überblick in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Diese Methode wird für die finalen Experimente, aber auch zukünftig in der Routine, eingesetzt.

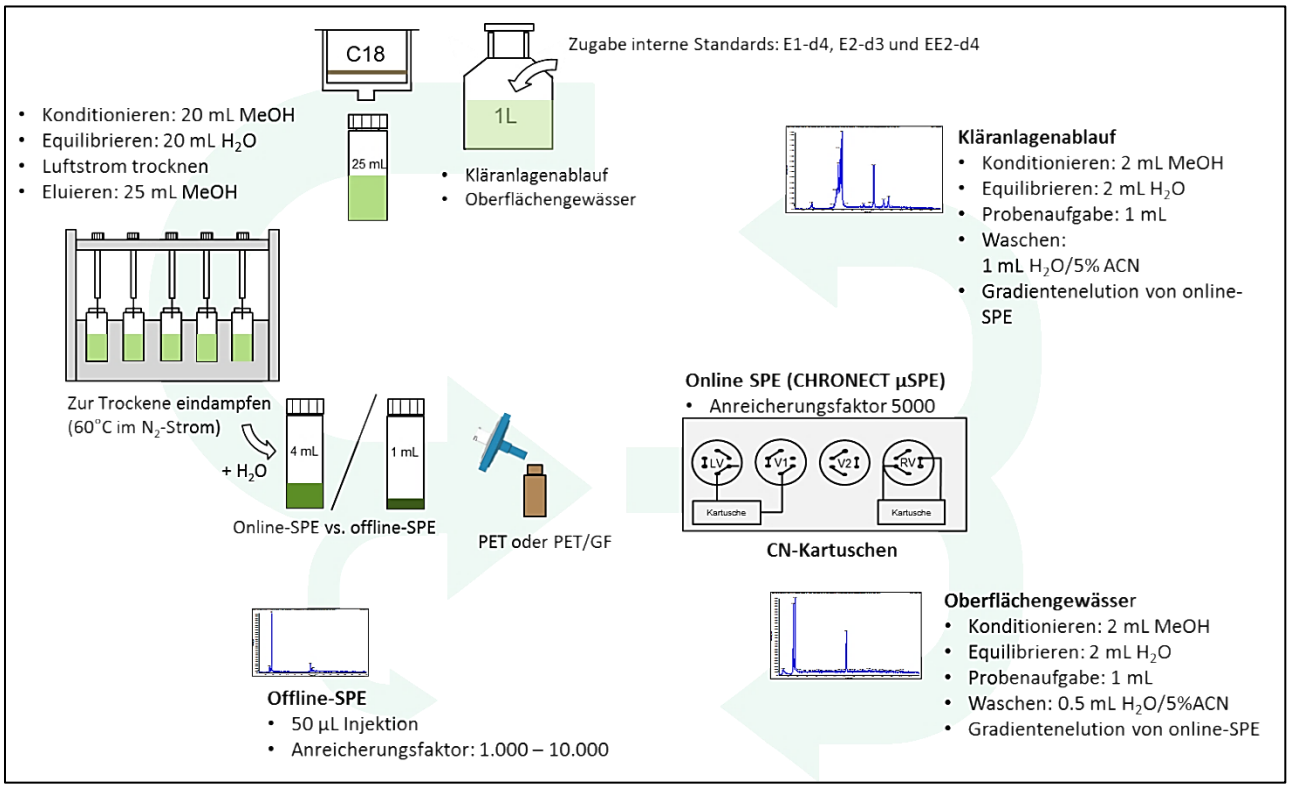

Abbildung 20 Zusammenfassung der Probenvorbereitung off- und online inklusive zugehöriger Parameter

4.6.16. Charakterisierung der online SPE-LC-MS-Methode

Jede Analysenmethode, sei es neu entwickelt oder bereits bestehend und optimiert, muss auf ihre Anwendbarkeit und Kompetenz in der Praxis bzw. Routine charakterisiert werden. Üblicherweise wird dies anhand einer umfangreichen Validierung vorgenommen, wobei typische Beurteilungskriterien unter anderem die Verfahrensgrenzen, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen, als auch Reproduzierbarkeit, Linearität und Wiederfindung darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Vereinfachungen zur klassischen Validierung vorgenommen, da aufgrund des Zeitaufwands keine umfangreiche Beurteilung, wie zum Beispiel in der DIN 32645 Leitlinien zur Methodenvalidierung angegeben, durchgeführt werden konnte. So wurde einerseits die Linearität für den oberen Konzentrationsbereich nicht bestimmt, da die Analytkonzentrationen in den, für die Methode ausgelegten Realproben, höchsten, verwendeten Standard üblicherweise nicht übersteigen.

Das in der Arbeit verwendete Messkonzept beinhaltet die Analyse einer Kalibrationsreihe aus sechs Standards mit 0,05 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL und 10 ng/mL der ausgewählten Östrogene, sowie 5 ng/mL für die internen Standards, für jede Messsequenz. Die Messung erfolgte üblicherweise als Doppelbestimmung, sowohl vor, als auch nach den zu analysierenden Realproben. Um den Zeitaufwand dabei möglichst gering zu halten, wurde die Kalibrationsreihe über den LC-Modus analysiert, wobei je nach Messmodus der Realproben (online SPE vs. LC-Modus), der Gradient angepasst wurde.

Um nun die Vergleichbarkeit der beiden Messmodi, und damit Standard und Probe, zu gewährleisten, wurden zwei Kalibrationsreihen in einem Konzentrationsbereich von 0,05-10 ng/mL hergestellt. Dabei musste der Anreicherungsfaktor von 20 bei der online SPE-Messung gegenüber dem LC-Modus berücksichtigt werden. Die Standardreihen wurden im Anschluss über die entsprechende LC-MS-Methode gemessen und miteinander verglichen.

Für die Bestimmung der Verfahrensgrenzen wurden fünf Standards im Bereich von 10-70 pg/mL zusätzlich zur gewohnten Kalibrationsreihe hergestellt und diese im Zuge der Messsequenz des Intra-Assays analysiert. Dieses besteht aus einer zehnfachen Bestimmung eines 1 ng/mL Standards, wodurch die tagesaktuelle Reproduzierbarkeit der Methode ermittelt werden konnte. Über einen sogenannten Inter-Assay konnte durch eine vierfache Bestimmung eines 1 ng/mL Standards an drei hintereinander folgenden Tagen die tagesunabhängige Reproduzierbarkeit berechnet und hieraus die Messunsicherheit des Analysenverfahrens eruiert werden. Die Methodenparameter der LC-Methode können dem Kapitel 4.6.8 entnommen werden.

Um zusätzlich die Verfahrensgrenzen, bezogen auf Realproben, zu bestimmen, wurden sowohl für Kläranlagenablauf (Vierlinden), als auch Rheinwasser (Walsum) zunächst die native Konzentration von E1, E2 und EE2 über die online-SPE-LC-MS-Methode (Kapitel 4.6.8 und 4.6.15) gemessen. Zudem wurden Realproben in einem Konzentrationsbereich der zu erwartenden Verfahrensgrenzen mit den ausgewählten Östrogenen dotiert und diese analysiert, um die Grenzen einerseits über die vorhandene native Konzentration oder über die zudotierten Konzentrationen ermitteln zu können.

In einer letzten Versuchsreihe der Methodencharakterisierung sollten die relativen Wiederfindungen für die jeweiligen Hormone der finalen Methode (online SPE-Modus) bestimmt werden. Dazu wurden QC-Proben und Realproben, Kläranlagenablauf (Vierlinden) und Rheinwasser

(Walsum), mit einer Endkonzentration von 5 ng/mL (Analyt+internere Standards) nach dem in Kapitel und 4.6.15 angegebenen Schritten aufgearbeitet und mit den entsprechenden Methodenparametern in Kapitel 4.6.8 analysiert.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln beispielhaft anhand der zur Quantifizierung verwendeten Massenspuren, E1_1 und E2_2 als empfindlichster Übergang und EE2_4 als selektivster Übergang. Diese Massenspuren wurden über die resultierende, hohe Signalintensität bzw. S/N-Verhältnissen in den Experimenten ausgewählt. EE2 besitzt jedoch eine sehr selektive Massenspur, die im Vergleich zum intensiven Übergang EE2_1 ein geringes Rauschen (besseres S/N-Verhältnis) und nahezu keine Interferenzen in den Chromatogrammen zeigt, wodurch diese zur Quantifizierung herangezogen wird. Beschriebene Trends und Aussagen sind, sofern nicht anders angegeben, für alle aufgezeichneten Massenspuren gültig. Die exemplarischen Chromatogramme zeigen alle aufgezeichneten Massenspuren der Östrogene um beschriebenes Matrix- und Analytverhalten zu verdeutlichen.

5.1. Auswahl und Aspekte des chromatographischen Trennsystems und der MS/MS-Detektion

5.1.1. Laufmitteladditive

Wie in Kapitel 4.6.4 beschrieben, erfolgte die Analyse eines 1 ng/mL Standardmix bei unterschiedlichen Additivkonzentrationen in einer Dreifachbestimmung, um die Effekte auf das Analytsignal zu beobachten. Dabei wurden als Laufmittelzusätze Ammoniak und Ammoniumfluorid gewählt, sowie als aprotische organische mobile Phase Acetonitril bzw. protische mobile Phase Methanol eingesetzt. Die Auswertung und Beurteilung erfolgte anhand der resultierenden, mittleren Peakflächen. Relative Standardabweichungen liegen dabei in einem Bereich von 0,2-3,7%.

Bei der Zugabe von Ammoniak zur wässrigen mobilen Phase konnten, wie in den nachfolgenden Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt wird, sowohl für Acetonitril, als auch für Methanol eine Reduzierung des Analytsignals von E1, E2 und EE2 registriert werden. Trotz des vorliegenden hohen pH-Wertes von 9-11, je nach prozentuellem Anteil an Ammoniak, und der damit einhergehenden erleichterten Deprotonierung der Phenolgruppe, konnte die Ionisation der Östrogene nicht verbessert werden. Verschiedenste Publikationen zeigen, dass die Auswirkungen durch den Laufmittelzusatz Ammoniak nicht einheitlich zur Signalerhöhung führen. Die Mehrheit der dabei veröffentlichten Studien weist auf eine moderate Steigerung der Empfindlichkeit hin, andere wiederum können keinen merklichen Einfluss verzeichnen [76], oder aber eine Reduktion feststellen [77]. Der resultierende Effekt des Additivs ist somit stark von den vorliegenden Bedingungen und dem eingesetzten System abhängig.

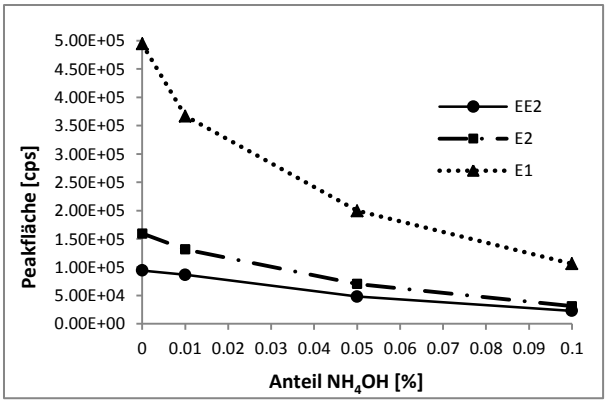

Abbildung 21 Signalverlauf der empfindlichsten Massenspuren in Abhängigkeit des NH_4OH-Anteils für ACN/H_2O

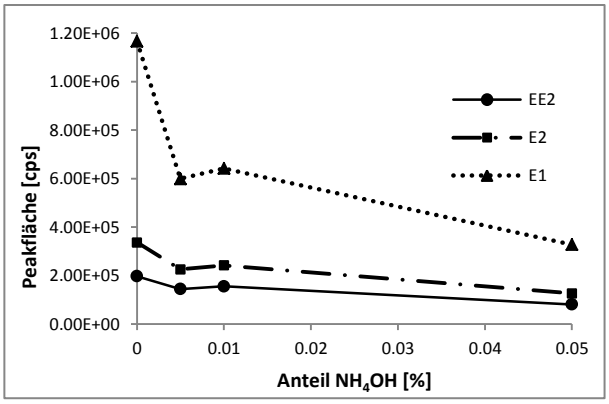

Abbildung 22 Signalverlauf der empfindlichsten Massenspuren in Abhängigkeit des NH_4OH-Anteils für $MetOH/H_2O$

Wird Ammoniumfluorid als Additiv eingesetzt, zeigt sich eine deutliche Verbesserung des resultierenden Östrogensignals für alle aufgezeichneten Massenspuren. So konnte im Falle der aprotischen organischen Phase eine relative Steigerung von bis zu 800% erzielt werden und für die protische Phase Methanol zumindest eine Verdoppelung erreicht werden, wie Abbildung 24 verdeutlicht. Vergleicht man zudem das erzeugte Signal (Tabelle 11) der beiden Messserien, werden bei Verwendung von Methanol als organischen Laufmittelanteil, höhere Intensitäten beobachtet. Die geringere Elutionskraft von Methanol führt zu einem größeren Anteil an organischer Phase bei der Elution der Analyten und damit veränderten Lösemitteleigenschaften (Viskosität, Oberflächenspannung etc.), wodurch wiederum der Sprayvorgang und damit die Produktion kleinerer Tröpfchen begünstigt wird. Zudem kann eine bessere Stabilisierung der gebildeten Analytionen in der flüssigen Phase durch die Verwendung des protischen Lösemittels zur vergleichsweisen Erhöhung des Probensignals führen.

Abbildung 23 zeigt den beobachteten Signalverlauf in Abhängigkeit der Additivkonzentration. Dabei ist ein deutliches Optimum bei 0,01 mM Ammoniumfluoridkonzentration zu erkennen. Dumont *et al*. [78] konnten den Wirkmechanismus der Fluoridionen zur Steigerung der Ionisationseffizienz auf die Bildung eines stabilen Fluorid-Addukts in der flüssigen Phase zurückführen, welches in der Gasphase durch Abspaltung von Fluorwasserstoff das gewünschten $[M-H]^{--}$-Ion liefert. Liegt das Verhältnis von Additiv zu Analyten auf der Seite der Zielmoleküle, führt eine weitere Zugabe des Additivs zur Signalsteigerung, bis ein entsprechendes Verhältnis erreicht wird, bei der eine optimale Ionisationseffizienz vorliegt. Wird dieses Verhältnis in Richtung Ammoniumfluorid überschritten, kommt es wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben zur Ionen- bzw. Signalsuppression, da die Konkurrenzsituation der begrenzten Ladungsträger durch den Überschuss an Fluoridionen in der flüssigen Phase zu Gunsten des Additivs verschoben wird.

Tabelle 11 Resultierende mittlere Peakflächen der Versuchsreihe Laufmitteladditive

Bezeichnung	ACN/H_2O	ACN/H_2O (0,01 mM NH_4F)	$MetOH/H_2O$	$MetOH/H_2O$ (0,01 mM NH_4F)
E1_1	4,94E+05	2,79E+06	1,17E+06	3,14E+06
E2_2	1,59E+05	8,11E+05	3,36E+05	1,22E+06
EE2_4	2,89E+04	1,66E+05	5,86E+04	2,26E+05

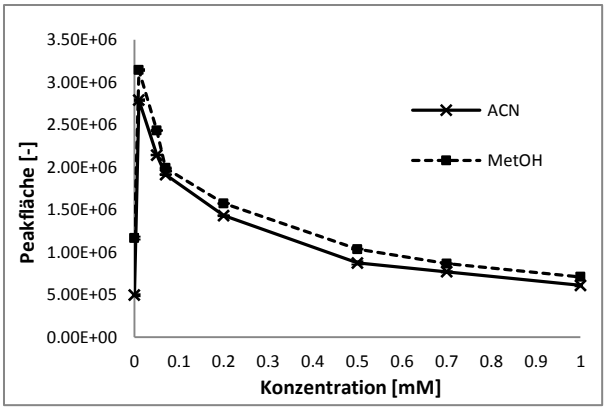

Abbildung 23 Signalverlauf in Abhängigkeit der NH_4F-Konzentration exemplarisch an E1_1

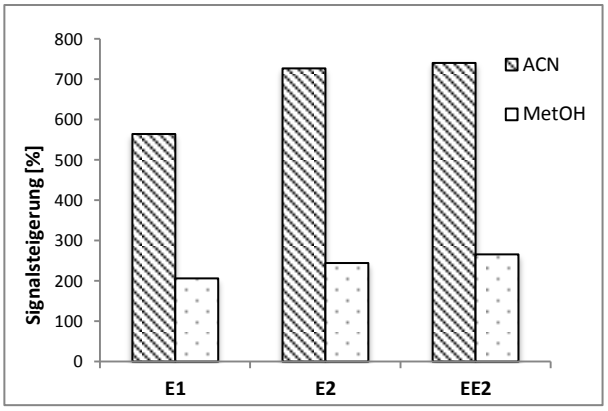

Abbildung 24 Prozentuelle Signalsteigerung durch 0,01 mM Ammoniumfluoridkonzentration in der mobilen Phase

Aus diesen Ergebnissen wurde für das weitere Vorgehen bzw. für die zu entwickelnde Analysenmethode eine Laufmittelzusammensetzung von Acetonitril/Wasser mit einer Ammonium-fluoridkonzentration von 0,01 mM gewählt. Trotz des moderat höheren Analytsignals bei Verwendung von Methanol, wurde im Hinblick auf die auszuwählende Trennsäule, Acetonitril als organische Phase gewählt, da durch die unterschiedliche Viskosität bzw. Dichte ein geringerer Rückdruck registriert wurde.

5.1.2. Säulenscreening

Einer der maßgeblichen Punkte der Methodenentwicklung ist die Auswahl einer geeigneten chromatographischen Säule. Die Beurteilung über Trenneffizienz und Eignung für das vorliegende Trennproblem erfolgte mit Hilfe matrixbelasteter Realproben, da sowohl das Verhalten der Analyten als auch der vorhandenen Matrix für die Bewertung erfasst werden müssen. Zunächst wurde Rheinwasser (Ufer) zur Vorselektion und Kläranlagenablauf (Hochfeld) zur finalen Wahl der geeigneten Säule, unter Verwendung unterschiedlichster Trennsäulen mit den in Kapitel 4.6.6 angegebenen Bedingungen, untersucht. Die eingesetzten Säulen können der Tabelle 5 in Kapitel 4.6.6 entnommen werden. Um eine zuverlässige, robuste und routinetaugliche Methode mit hoher Trennleistung zu entwickeln, wurden zur Bewertung klare Auswahlkriterien definiert. Diese beinhalten die Trennung der Analyten E1, E2 und EE2, die Abtrennung etwaiger Störpeaks und coeluierender Matrix, eine optimale Peakform und durch das vorliegende Drucklimit von 300 bar, einen möglichst geringen Rückdruck, um eine Flussrate von 0,4 mL/min beizubehalten und damit einen entsprechenden Probendurchsatz zu gewährleisten. Die Beurteilung anhand der experimentell aufgezeichneten Bedingungen und Chromatogramme von Rheinuferwasser sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Beurteilungskriterien und deren Erfüllung

Bezeichnung	Matrixabtrennung (Störpeaks)	Trennung E1/E2/EE2	Peakform	Rückdruck (bar)
Zorbax SB	✓	✓	✓	✓ (100)
Zorbax Eclipse XDB	✓	~	✓	✓ (100)
Chromolith	**X**	**X**	**X**	✓ (120)
SunShell RP-AQUA	**X**	**X**	**X**	**X** (255)
Raptor Biphenyl 5 cm	✓	✓	✓	✓ (145)
Raptor Biphenyl 10 cm	✓	✓	✓	**X** (245)

Wie die angeführten Ergebnisse zeigen, sind für die vorliegende Fragestellung die monolithische Säule (Chromolith Fastgradient) und die untersuchte SunShell ungeeignet, da diese keine der Auswahlkriterien erfüllen. Lediglich der erzielte Rückdruck, eines der Merkmale monolithischer Säulen, ist im Falle der Chromolith vergleichsweise passabel. Bereits bei visueller Betrachtung der aufgezeichneten Chromatogramme eines 10 ng/mL Standards wird eine unzureichende Trennung der Analyten E1 und EE2, sowie ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Peaktailing, bedingt durch das Alter der Trennsäulen, festgestellt (Abbildung 25 und Abbildung 26).

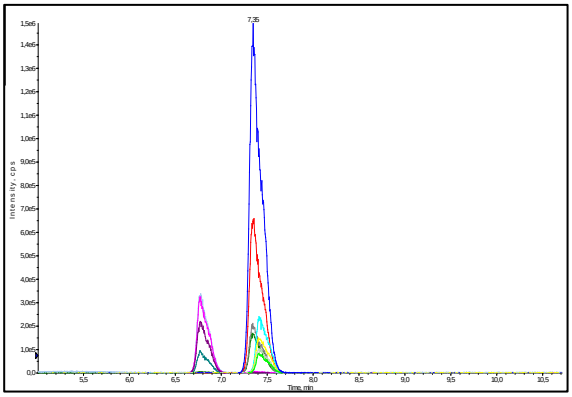

Abbildung 25 Resultierendes Chromatogramm eines 10 ng/mL Standards bei Verwendung der SunShell RP-AQUA

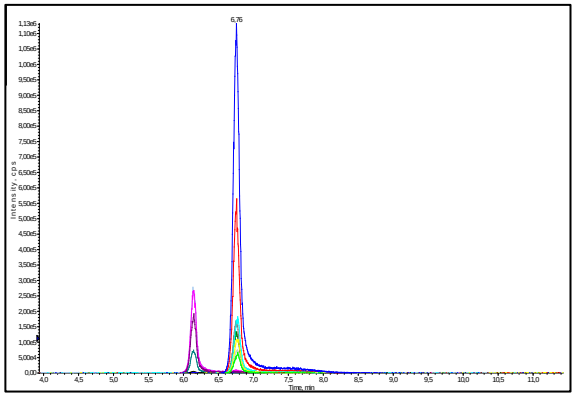

Abbildung 26 Resultierendes Chromatogramm eines 10 ng/mL Standards bei Verwendung des Chromoliths

Zudem kann anhand experimentell bestimmter, chromatographischer Kenndaten, das bestehende Trennproblem für E1 und EE2 bei Verwendung von Chromolith und SunShell theoretisch untermauert werden. Im Allgemeinen wird das Auflösungsvermögen einer chromatographischen Säule für die Trennung zweier Substanzen, wie die Paarung E1 und EE2, durch drei Parameter bzw. Terme maßgeblich bestimmt, der Trenneffizienz, der Selektivität und dem Retentionsvermögen. Der mathematische Zusammenhang ist in der nachfolgenden Gleichung angegeben.

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k' + 1} \qquad (1)$$

Die Trenneffizienz, ausgedrückt in der Trennstufenanzahl N, ist bei Anwendung einer monolithischen Säule vergleichsweise gering, da, bedingt durch das Herstellungsverfahren, keine hohe spezifische Oberfläche der stationären Phase generiert werden kann. In Anbetracht der SunShell mit 2,6 µm

Partikeldurchmesser (Core Shell-Technologie), sollte eine ausreichend hohe Trenneffizienz vorliegen, da diese jedoch dauerhaft in der Abwasseranalytik am IUTA eingesetzt wird, ist eine ausreichende Trennleistung der Säule, durch die starke Matrixbelastung in diesem Bereich, nicht mehr gegeben.

Um Aussagen über die Selektivität und das Retentionsvermögen treffen zu können, wurden aus den experimentellen Daten (Totzeit/Retentionszeit) der Retentionsfaktor k´ und darüber der Selektivitätsfaktor α berechnet. Die verwendeten Daten werden im Anhang angeführt. Diese Methode ist zu Vergleichszwecken lediglich bei einem gleichbleibenden Verhältnis von Totzeit und Gradientenlaufzeit anwendbar [79], da jedoch die Dimensionierung der Trennsäule verändert wurden und der Gradient unverändert blieb, wird ein Vergleich der eingesetzten Trennsäulen ausschließlich für die Restek Raptor Biphenyl 5 cm, die SunShell RP-AQUA und die Chromolith FastGradient vorgenommen.

Tabelle 13 Experimentell bestimmte Kenndaten der Trennsäulen

Trennsäule	k´ E1	k´ E2	k´ EE2	α E1_EE2
Raptor Biphenyl	13.656	11.599	12.828	1.065
SunShell RP-AQUA	13.582	12.447	13.713	0.990
Chromolith	11.797	10.605	11.860	0.995

Vor allem die Selektivität, ausgedrückt über den Selektivitätsfaktor α, ist ausschlaggebend für eine optimale Auflösung des Peakpaares E1 und EE2, wie auch anhand Gleichung (1) gezeigt werden kann, da eine geringe Variation des α-Wertes eine maßgebliche Veränderung im Auflösungsvermögen bewirkt. Durch einen niedrigen α-Wert (Tabelle 13) wird daher abermals ein unzureichendes Auflösungsvermögen der beiden Trennsäulen, SunShell und Chromolith, verdeutlicht. Zudem zeigt der Retentionsfaktor, wie erwartet, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Affinität der Analyten zur stationären Phase, wodurch, je nach verwendeter Trennsäule, unterschiedliche Elutionsbedingungen (Laufmittelzusammensetzung) vorliegen. Diese Thematik wird in Kapitel 5.1.3 weiter behandelt.

Neben der unzureichenden Performance der beiden genannten Säulen, konnte jedoch im Hinblick auf die Trennung der Analyten, für die weiteren eine zufriedenstellende Auflösung der drei Östrogene erzielt werden. Die Zorbax Eclipse XDB weist dabei ein etwas geringeres Ausmaß der Trennung des Peakpaares E1 und EE2 auf, wodurch auch diese Säule nicht weiter untersucht wurde. Zudem wurde eine ausreichende Matrixabtrennung, in Form von Störpeaks in den Massenspuren, im Falle der Raptor Biphenyl 10 cm und 5 cm, als auch bei der Zorbax SB beobachtet. Für diesen Aspekt konnte lediglich eine visuelle Beurteilung erfolgen, da die Zusammensetzung der Störpeaks nicht bekannt ist und somit keine konkrete Substanz bzw. Retentionszeit, für einen Vergleich über die bereits angesprochenen Kenndaten, zugeordnet werden konnten. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Rheinwasser-Chromatogramme (inklusive sämtlicher aufgezeichneten Massenspuren) der Trennsäulen mit zufriedenstellender Performance. Dabei befindet sich im hinteren Bereich der dargestellten Chromatogramme das Elutionsfenster der Östrogene mit Elutionsreihenfolge E2, EE2 und E1, gekennzeichnet über eine Nummerierung (1-3).

So konnten über die Vorselektion mit Rheinuferwasser die Auswahl auf die beiden Restek Raptor Biphenyl Säulen und auf die Zorbax SB begrenzt werden.

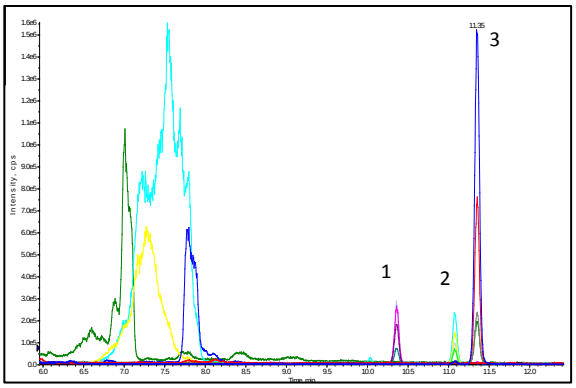

Abbildung 27 Chromatogramm Rheinwasser Zorbax Eclipse XDB (1-E2, 2-EE2, 3-E1)

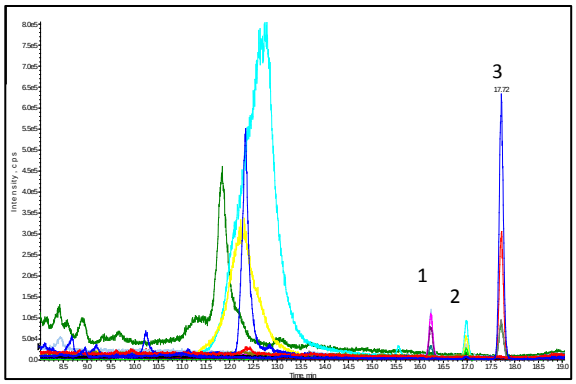

Abbildung 28 Chromatogramm Rheinwasser Zorbax SB (1-E2, 2-EE2, 3-E1)

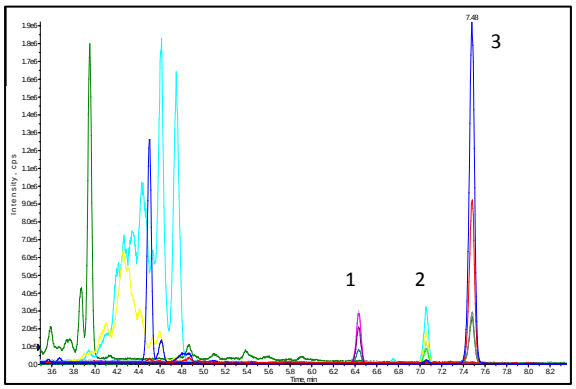

Abbildung 29 Chromatogramm Rheinwasser Raptor Biphenyl 5 cm (1-E2, 2-EE2, 3-E1)

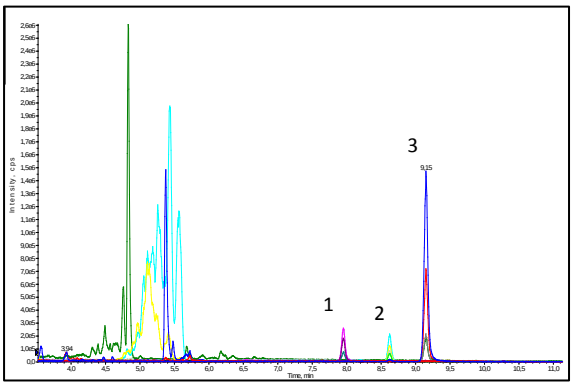

Abbildung 30 Chromatogramm Rheinwasser Raptor Biphenyl 10 cm (1-E2, 2-EE2, 3-E1)

Weiterführende Untersuchungen mittels Kläranlagenablauf (Hochfeld) ergaben für die angesprochenen Kriterien (Störpeak/Analyten/Rückdruck/Peakform) ein identisches Bild in Bezug auf die vorselektierten Trennsäulen, daher konnte hier keine weitere Eingrenzung erfolgen.

Eines der wichtigsten Beurteilungskriterien im Zusammenhang mit Abwasseranalytik bzw. im allgemeinen Realproben, ist die ausreichende Abtrennung von coeluierender Matrix, die eine starke Signalsuppression erzeugt. Diese Matrixkomponenten werden jedoch nicht im Chromatogramm registriert, daher kann auf dem konventionellen, visuellen Weg, keine Aussage getroffen werden. Um dennoch eine Beurteilung der Trennsäulen durchführen zu können, wurde die Wiederfindung des Analytsignals (Peakfläche) bezogen auf das Signal eines 10 ng/mL Standards berechnet. Wird eine signifikante Steigerung in der Wiederfindung erzielt, so erfolgt eine bessere Trennung der Analyten von den unbekannten, coeluierenden Matrixkomponenten. Die bestimmten Wiederfindungen sind in den nachfolgenden Abbildungen, sowohl für Rheinuferwasser, als auch für den Kläranlagenablauf mit einer gespikten Konzentration von 10 ng/mL dargestellt. Es zeigt sich, dass ohne Korrektur mit internem Standard ein Signalverlust über das Gesamtverfahren (Kapitel 4.6.6, Anreicherung über Speediskkartuschen und anschließende Messung im LC-Modus) von 90-95% im Kläranlagenablauf beobachtet wird und damit die enorme Signalsuppression durch die Matrixbelastung bestätigt wird.

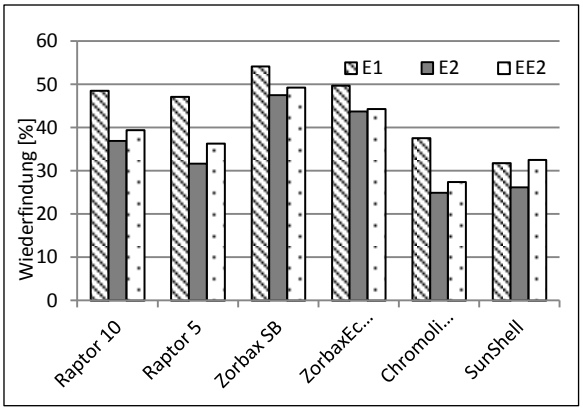

Abbildung 31 Berechnete Wiederfindung für Rheinwasser in Abhängigkeit der untersuchten Trennsäule

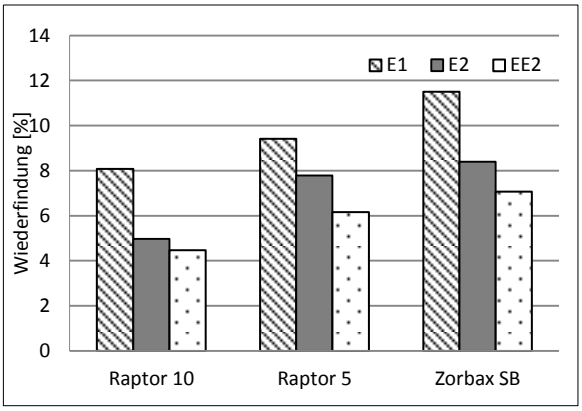

Abbildung 32 Berechnete Wiederfindung für Kläranlagen-ablauf in Abhängigkeit der untersuchten Trennsäule

Aus Abbildung 31 und Abbildung 32 ist ersichtlich, dass eine geringe Verbesserung des Analytsignals, mit einem Ausmaß von etwa 15% bei Rheinwasser und 4 % bei Kläranlagenablauf, bei Einsatz der Zorbax C18 Säulen erreicht wird. Vor allem für Kläranlagenablauf ist diese Verbesserung vernachlässigbar gering, wodurch abermals ein ähnliches Verhalten der untersuchten Trennsäulen festgestellt werden kann.

Die endgültige Wahl richtet sich daher an den routinetauglichen Aspekten der untersuchten Trennsäulen. Da keine merkliche Verbesserung der Raptor Biphenyl 10 cm gegenüber der 5 cm Säule festgestellt werden konnte und der Rückdruck durch die erhöhte Säulenlänge in einen Bereich steigt, der nahe am Drucklimit liegt, wurde die 5 cm Säule der 10 cm vorgezogen. Ein weiterer Aspekt, der auch auf die Zorbax SB im Vergleich zur Raptor Biphenyl zutrifft, ist die erhöhte Messdauer aufgrund verlängerten Äquilibrierschritten durch die gegebene Säulenlänge von 10 bzw. 15 cm, die den Probendurchsatz in der Routine verringert. Daher führt die Wahl der geeigneten Trennsäule für die weitere Methodenentwicklung und das finale Analysenverfahren auf die Restek Raptor Biphenyl (5 cm).

5.1.3. Verweilvolumen

Geänderte Elutionsbedingungen, wie die Laufmittelzusammensetzung bzw. der prozentuale Anteil an organischer Phase, hervorgerufen durch eine Änderung der Selektivität der eingesetzten Trennsäule, können die Intensität des Analytsignals negativ beeinflussen. Um diese Effekte zu umgehen, müssen die eingesetzten Additivkonzentrationen durch Kenntnis des Verweilvolumens bzw. -zeit den neuen Bedingungen (Raptor Biphenyl/Chromolith) angepasst werden.

Hierzu wurde ein, in Kapitel 4.6.10 Tabelle 10 beschriebener, Wasser-Aceton Gradient mit Hilfe eines UV-Detektors bei 272 nm aufgezeichnet. Die Messungen wurden sowohl für den LC-Modus, als auch für den Einsatz der online-SPE durchgeführt. Aus dem resultierenden Gradientenverlauf kann das Verweilvolumen durch die Berechnung des Schnittpunkts zweier Geraden ermittelt werden. Wird die Differenz aus der berechneten Zeit des Schnittpunkts und dem Zeitpunkt des programmierten Gradientenanstiegs gebildet, kann mithilfe der Flussrate (0,4 mL/min) die so berechnete Verweilzeit in das Verweilvolumen übergeführt werden. In der nachfolgenden Abbildung ist exemplarisch der registrierte Gradientenverlauf des online-SPE Experiments gezeigt. Die strichlierte Linie stellt dabei den programmierten Gradienten und die durchgehende Linie den aufgezeichneten Gradienten dar.

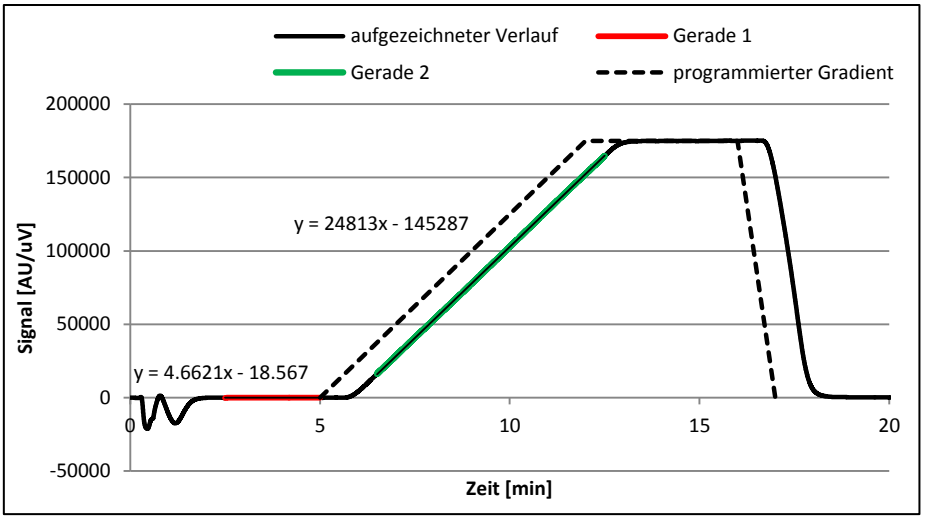

Abbildung 33 Aufgezeichneter Gradientenverlauf im online-SPE-Modus bei der Verweilvolumsbestimmung

Durch Auflösen des Gleichungssystems der beiden Geradengleichungen (Abbildung 33) konnte die Verweilzeit für beide Varianten des µCHRONECT SPE-Betriebs bestimmt werden. Die resultierenden Verweilvolumina und -zeiten sind in der anschließenden Tabelle angeführt und die zugrundeliegenden Diagramme im Anhang angegeben.

Tabelle 14 Berechnete Verweilzeiten und- volumina

Parameter	Verweilzeit [min]	Verweilvolumen [µL]
LC-Messung 1	0,666	266,3
LC-Messung 2	0,673	269,1
Mittelwert	**0,670**	**267,7**
Online-SPE 1	0,856	342,3
Online-SPE 2	0,862	344,7
Mittelwert	**0,859**	**343,5**

Trotz der komplexen und langen Kapillartransferwege der eingesetzten Gerätekonfiguration, im online Modus inklusive Kartuschen im Flussweg, liegen die berechneten Verweilvolumina in einem moderaten Bereich. Diese erhaltenen Daten wurden benutzt um im nächsten Schritt, mit Hilfe der mittleren Retentionszeiten und dem verwendeten Gradienten der Additivexperimente, sowie dem finalen Methodengradienten, die tatsächliche Laufmittelzusammensetzung am Zeitpunkt der Analytelution für die Raptor Biphenyl und die monolithische Säule zu ermitteln. Die Resultate sind in Tabelle 15 angeführt. Dabei zeigt sich ein Unterschied im Organikanteil von etwa 12%, wobei unter anderem aus dem bestimmten Signalverlauf (Kapitel 5.1.1, Abbildung 21 bespielhaft) ersichtlich wurde, dass diese geringe Abweichung keine signifikante Änderung im Analytsignal hervorruft.

Tabelle 15 Berechneter Organikanteil bei der Elution der Additivexperimente im Vergleich zur finalen Methode

	Retentionszeit	%B $_{theor}$	%B $_{korr}$
	Chromolith		
E1	1,424	49,7	40,4
E2	1,222	46,9	37,6
EE2	1,392	49,2	40,0
	Raptor Biphenyl		
E1	7,494	30,0	28,2
E2	6,443	27,2	25,4
EE2	7,071	28,8	27,1

5.1.4. Optimierung der Quellparameter

Die praktische Bestimmung der optimalen Quellparameter erfolgte anhand des kritischen Parameters EE2 über eine Fließinjektionsanalyse und kann im Detail dem Kapitel 4.6.5 entnommen werden. Die Standardeinstellungen (übernommen von Voruntersuchungen am IUTA) sind in Tabelle 16 angegeben und wurden sukzessiv verändert, sowie das resultierende Signal aufgezeichnet. Über die integrierten Peakflächen erfolgt eine Beurteilung der optimalen Parametereinstellungen.

Tabelle 16 Anfängliche Einstellung der MS-Quellparameter

MS Quellparameter	
IonSpray Voltage (IS)	-4,5 kV
Temperatur	650°C
Curtain Gas (CUR)	25 psi
Collision Gas (CAD)	Einstellung: High
Ion Source Gas 1 (GS1)	42 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	44 psi

Wie der Verlauf der aufgezeichneten Signalintensitäten für die beiden empfindlichsten bzw. selektivsten Massenspuren (Abbildung 34) zeigt, ist die Ionisation bei der Wahl von vernünftigen Quellparametern sehr stabil. Kleinste Änderungen in Temperatur oder Gasstrom zeigen keine maßgeblichen Auswirkungen auf das Analytsignal und daher eine gute Robustheit der Methode bezüglich der Quellparameter. Eine deutliche Reduktion der Intensität (Peakfläche) wird lediglich für geringe Temperaturen und Ionspray-Spannungen beobachtet, da unter diesen Bedingungen eine unzureichende Verdampfung bzw. eine geringere Ionenausbeute und Spraystabilität vorliegt. Bei einer Erhöhung des Curtain-Gasflusses werden nicht nur Lösemitteltröpfchen, sondern auch bereits Analytmoleküle am Eintritt in das Massenspektrometer gehindert, wodurch abermals ein Intensitätsverlust verzeichnet wird (Abbildung 34, „CUR 40“). In wenigen Fällen, wie bei einer

Temperatur von 700 °C oder einem Ionsource-Gasstrom 2 von 70 psi, konnte eine Verbesserung der Intensität festgestellt werden, da diese jedoch in einem relativ geringen Ausmaß auftreten (2-3% Erhöhung) und damit in einen Bereich der tagesinternen Messabweichung liegen, wurden die Standardeinstellungen der Tabelle 16 für die weitere Methodenentwicklung bzw. auch für das resultierende, finale Analysenverfahren beibehalten.

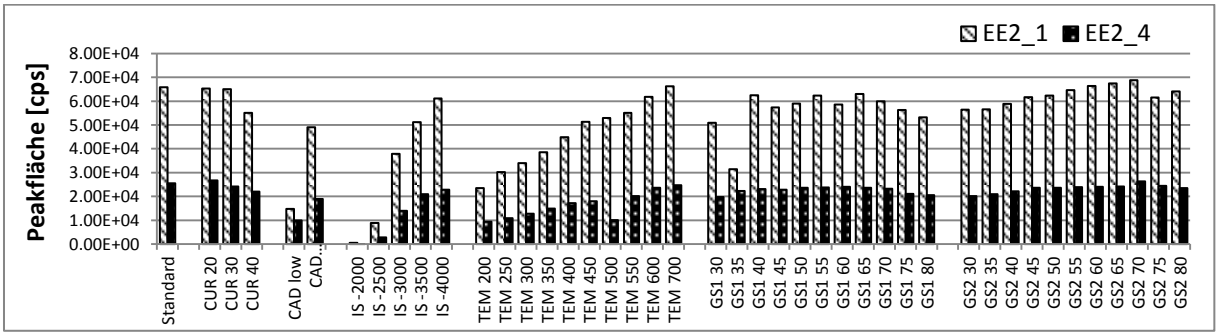

Abbildung 34 Resultierende Signalintensität in Form der Peakfläche in Abhängigkeit der veränderten Parameter

5.1.5. MS³

Durch die zusätzliche Fragmentierung im Q3 und abermalige Selektion der gewünschten Produktionen, die für die Selektivität des MS^3-Modus entscheidend ist, werden jedoch weitere Einbußen in der Ionenausbeute und damit einhergehend eine Verringerung des absoluten Signals verzeichnet. Wie in Kapitel 4.6.9 erläutert, soll durch die Anwendung des MS^3-Modus auf Realproben getestet werden, ob durch die erhöhte Selektivität die Reduktion der Signalhöhe im Signal zu Rausch Verhältnis (S/N) ausgeglichen werden kann.

Durch einen Scan der resultierenden Fragmentionen der LIT während der Veränderung der Anregungsspannung (AF2) wurden die empfindlichsten Massenübergänge ausgewählt und diese zur Analyse der mit 10 ng/mL gespikten Rheinuferprobe und Kläranlagenablaufprobe (Hochfeld) verwendet. Wie sich dabei herausstellte, weist das Produktion aus dem q2 mit der Masse 145 eine hohe Stabilität auf, wodurch keine zufriedenstellende Fragmentierung erreicht werden konnte. Die Masse 145 beschreibt ein Fragmention, das sich durch Ringöffnung des C_6-Ringes des Steroidsystems und Abgang eines $C_8H_{12}O$-Moleküls bildet. Das verbleibende tetralin-ähnliche Ion mit phenolischen Ring kann durch die Stabilität des vorliegenden (aromatischen) Ringsystems nicht weiter in einem vernünftigen Maß fragmentiert werden. Dies ist insofern problematisch, da das Ion 145 an den beiden empfindlichsten Massenübergängen für E1 und E2 beteiligt ist und dieses somit für eine MS^3 Messung nicht zur Verfügung steht. Für die alternativen Massenübergänge des Estron, mit vergleichsweise geringen Ionenausbeuten, konnte bei der Anwendung auf Realproben kein Analytsignal registriert werden. Daher ist Estron für eine MS^3-Messung nicht zugänglich.

Im Falle des E2 konnten zufriedenstellende Analytsignale durch die alternativen Massenübergänge (271→239 und 271→183) sowohl im Rheinwasser, als auch im Kläranlagenablauf erzielt werden. Die erhaltenen Fragmentionen für die angegebenen Übergänge sind in Kapitel 4.6.9 Abbildung 17 dargestellt und werden als Signalsumme bei der Messung registriert. Da die absolute Signalintensität durch den MS^3-Modus abnimmt, wurde für eine Beurteilung der Empfindlichkeit das S/N-Verhältnis herangezogen und dieses mit den erzielten S/N-Verhältnissen des klassischen MRM-Modus verglichen. Diese sind zusammengefasst in der nachfolgenden Tabelle angegeben und exemplarisch in Abbildung 35 und Abbildung 36 ersichtlich.

Tabelle 17 Zusammenfassung der erzielten S/N-Verhältnisse der beobachteten Massenübergänge für E2

Massenübergang	Scananzahl	S/N Rhein	S/N KA
271→239→131/145/208	1 (MS^3)	37	6
271→239→131/145/208	3 (MS^3)	57	28
271→183→156/167	1 (MS^3)	20	6
271→183→156/167	3 (MS^3)	41	3
271→145	(MRM)	53	4

Die Ergebnisse zeigen, dass bei beiden primären Massenübergängen für E2 keine signifikante Verbesserung im S/N-Verhältnis, bei Anwendung auf Rheinuferwasser, erreicht werden kann. Die Matrixbelastung der Oberflächenwasserprobe ist vergleichsweise gering ausgeprägt, daher kann der Verlust an Empfindlichkeit durch die Abtrennung der Matrixkomponenten nicht ausgeglichen werden. Eine Anwendung des MS^3-Modus zum Zwecke der Empfindlichkeitsverbesserung ist daher für Rheinwasser nicht geeignet. Im Kläranlagenablauf hingegen wird eine Erhöhung des S/N-Verhältnisses für die primäre Massenspur von 271→239 bei einer Scananzahl von 3 beobachtet. Sind demnach Probleme in der Empfindlichkeit bei gewissen Realproben durch starke Matrixbelastung gegeben, kann zusätzlich zum klassischen MRM in einer separaten Analyse, der MS^3-Modus eingesetzt werden. In Anbetracht der verhältnismäßig hohen Nachweisgrenzen für E2 und dem zusätzlichen Zeitaufwand durch eine separate Messung, bedingt durch die hohen Zykluszeiten der MS^3-Analyse, muss der Nutzen je nach Problemstellung abgewogen werden. Für die alltägliche Routineanalytik der drei untersuchten Östrogene ist diese Technik jedoch nicht erforderlich.

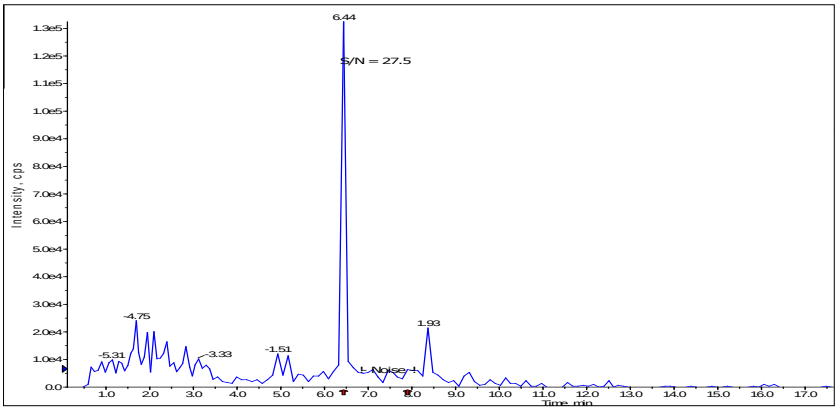

Abbildung 35 Resultierendes Chromatogramm für E2 im MS^3-Modus (271→239, summierte Scananzahl 3)

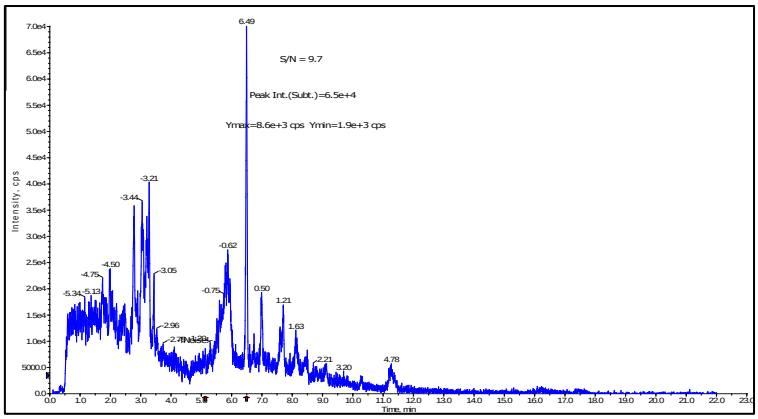

Abbildung 36 Resultierendes Chromatogramm für E2 im MRM-Modus (271→145)

Die Resultate für EE2 spiegeln abermals die Problematik der Signalausbeute wieder. Wie auch bei E2, konnte keine Verbesserung im S/N-Verhältnis durch Einsatz der MS^3-Technik bei den Rheinwasserproben, aber auch für den Kläranlagenablauf, erreicht werden (Tabelle 18). EE2 stellt in der LC-MS/MS den unempfindlichsten Parameter dar, die Ionenausbeute ist daher bereits zu Beginn verhältnismäßig gering, wodurch weitere Einbußen in der Anzahl der Ionen zu einem deutlichen Empfindlichkeitsverlust führen. Zudem liegt mit der Massenspur 295→269 (EE2_4) ein sehr selektiver LC-MS/MS Übergang für EE2 vor, bei dem die Signalsupression relativ geringe Auswirkungen zeigt und matrixbedingte Störpeaks selten oder gar nicht im Spektrum beobachtet werden. Sollte es dennoch zu Interferenzen im Bereich der Analytpeaks durch die vorhandenen Matrixkomponenten kommen und dadurch eine Quantifizierung erschwert, oder gar unmöglich werden, so kann durch die zusätzliche Selektivität eine separate Messung im MS^3-Modus für EE2, aber auch E2, durchgeführt werden.

Tabelle 18 Zusammenfassung der erzielten S/N-Verhältnisse der beobachteten Massenübergänge für EE2

Massenübergang	Scananzahl	S/N Rhein	S/N KA
295→199	1	34	7
295→199	3	67	3
295→159	1	52	4
295→159	3	122	4
295→269	(MRM)	229	5

5.2. Aspekte der manuellen Probenvorbereitung

5.2.1. MIP-Experiment

Ziel der in Kapitel 4.6.11 beschriebenen Versuchsreihe ist, einen ersten Einblick in das Ausmaß der Aufreinigung durch Anwendung der MIP-Kartuschen zu erhalten und die Kenngrößen Wiederfindung und Auftreten von Blindwerten zu bestimmen. Durch die resultierenden Ergebnisse soll eine erste Abschätzung betreffend der Anwendbarkeit und Etablierung in den Verfahrensablauf getroffen werden.

Anhand einer Dreifachbestimmung von QC-Proben, bestehend aus gespikten Standards mit einer Konzentration von 5 ng/mL Analyt und 1 ng/mL internem Standard, wurden die Wiederfindungen anhand der Peakflächen, ohne Korrektur des internen Standards, bestimmt. Die resultierenden prozentuellen Angaben für die empfindlichsten Massenspuren sind in der nachfolgenden Abbildung angegeben.

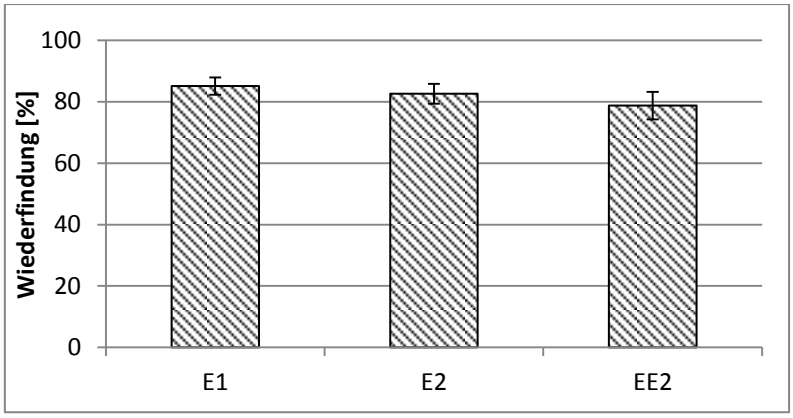

Abbildung 37 Wiederfindungsraten für E1, E2 und EE2 bei der Anwendung von MIP-Kartuschen (c = 5 ng/L)

Die Ergebnisse zeigen eine geringe Schwankungsbreite und zufriedenstellendes Ausmaß der Wiederfindung und damit gute Robustheit im Bereich von 79-85% bei einer relativen Standardabweichung zwischen 2,8 und 4,5%. Zudem lassen auch die gemessenen Blindwertproben keine Störpeaks im Chromatogramm erkennen bzw. werden keine Analytsignale verzeichnet. Die empfindlichsten Massenspuren einer exemplarischen Blindwertprobe sind in Abbildung 38 dargestellt. Lediglich für den sensitivsten Massenübergang von Estron lässt sich ein Signal erahnen, das jedoch ein S/N (S/N=2) unterhalb der Nachweisgrenze (S/N=3) aufzeigt. Wie in Kapitel 4.6.11 angegeben, erfolgte die Analyse der Versuchsreihe im LC-Modus, da zu dem gegebenen Zeitpunkt keine geeignete online-Methode zur Verfügung stand. Aus diesem Grund sollte die Blindwertbestimmung erneut mit Hilfe der online-SPE erfolgen, da ein höherer Anreicherungsfaktor realisiert wird und dadurch gegebenenfalls Analytsignale oberhalb der Nachweisgrenze in den Blindwertproben auftreten könnten.

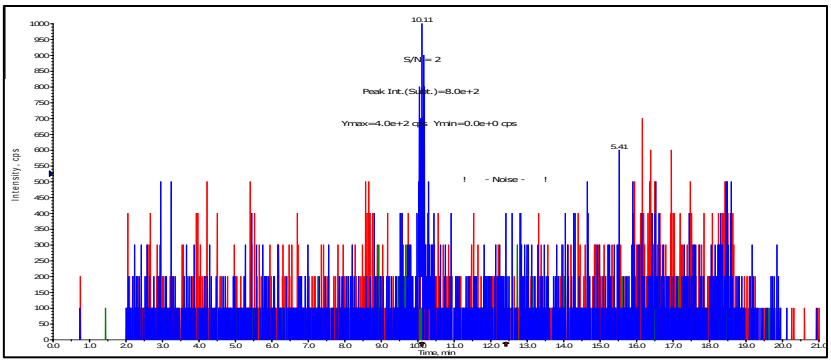

Abbildung 38 Massenspuren E1_1 (blau), E2_2 (rot) und EE2_4 (grün) einer Blindwertprobe

Ein Vergleich von Realproben mit und ohne der Aufarbeitung mit MIP-Kartuschen wird beispielhaft in der Abbildung 39 und Abbildung 40 dargestellt. Es ist dabei deutlich zu erkennen, dass Matrixpeaks und Störsignale aus dem Kläranlagenablauf vollständig entfernt werden konnten. Die vorliegende Peakform bzw. die relativ starke Verbreiterung der Peaks ist auf die zahlreichen matrixbelasteten Realprobenmessungen zurückzuführen, die die Trennleistung der Säule stark beeinträchtigt haben.

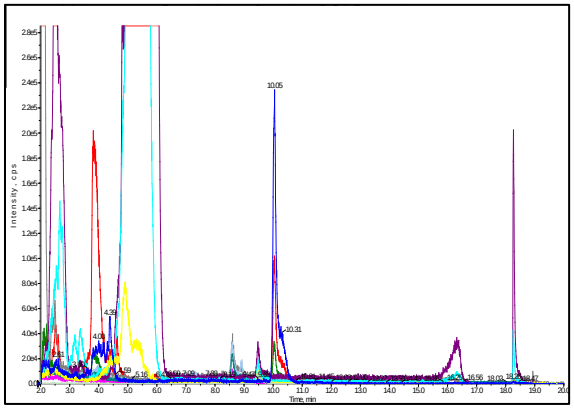

Abbildung 39 Native Kläranlagenablauf-Messung ohne MIP Aufreinigung

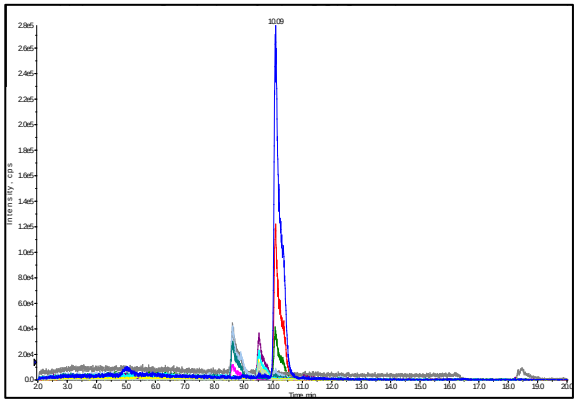

Abbildung 40 Kläranlagenablauf-Chromatogramm nach der Aufreinigung mit MIP-Kartuschen

Werden die erhaltenen Analytsignale des Kläranlagenablaufs in der Form der Peakfläche miteinander verglichen, zeigt sich eine Steigerung des Signals beim Einsatz der MIP-Kartuschen. Zudem wird, wie erwartet, durch die Filtration mit RC-Filtern die, in der Probe enthaltene Analytmenge reduziert und daher ein geringeres Signal registriert (Abbildung 41 und Abbildung 42). Ein Vorteil des zusätzlichen MIP-Aufreinigungsschrittes ist jedoch, dass ein klares Probenextrakt selbst bei Kläranalgenablauf erhalten wird, wodurch die Filtration als Teil der Probenvorbereitung eliminiert werden könnte. Die Gegenüberstellung des MIP-Signals und den erzielten Peakflächen im zugehörigen 5 ng/mL Standard verdeutlicht wiederum, dass, trotz der erhöhten Selektivität, eine vollständige Abtrennung der Matrix nicht realisiert werden kann und weiterhin eine ausgeprägte Signalsuppression erzeugt wird.

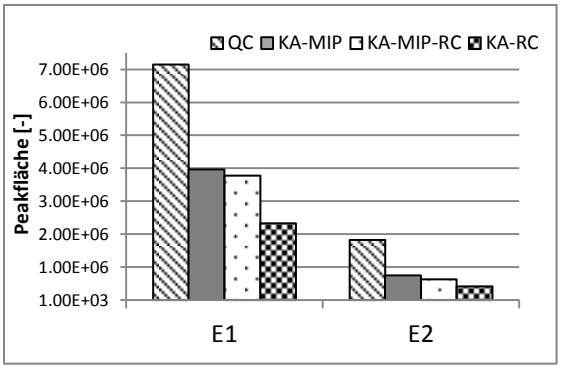

Abbildung 41 Vergleich der resultierenden Peakflächen der MIP-Versuchsreihe für E1 und E2

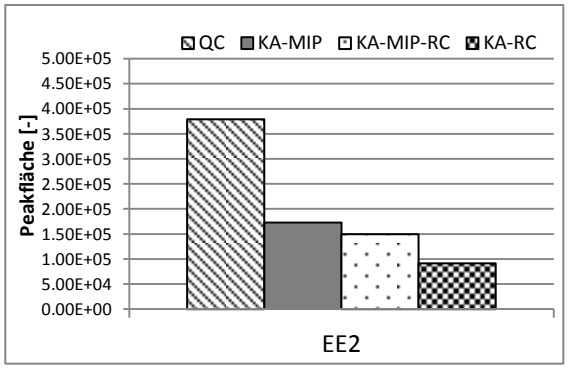

Abbildung 42 Vergleich der resultierenden Peakflächen der MIP-Versuchsreihe für EE2

Betrachtet man weiters die relativen Wiederfindungen (Tabelle 19, in Klammer), die durch die Berechnung mittels interner Standardkorrektur und der im Anhang angeführten Kalibrationsfunktionen erhalten wurden, so zeigt sich, dass abermals zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden konnten. Eine erhöhte Wiederfindung bei E1 liegt der nativen Konzentration im Kläranalgenablauf zugrunde. Diese konnte mit der bestehenden Bestimmungsmethode zum Zeitpunkt des Experiments in der nativen Kläranlagenablaufprobe nicht erfasst werden, da aufgrund der Matrixsuppression kein Signal in der Probe registriert werden konnte.

Tabelle 19 berechnete Analytkonzentrationen und bestimmte relative Wiederfindung

Konz [Soll 5 ng/mL]	E1	E2	EE2
KA-MIP	6,03 (121%)	5,39 (108%)	4,58 (91%)
KA -MIP-RC	5,93 (119%)	4,89 (98%)	4,61 (92%)
KA-RC	5,04 (101%)	4.44 (89%)	4,62 (93%)

Die ersten Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind für die Anwendbarkeit der MIP-Kartuschen auf Kläranlagenablauf sehr vielversprechend. Um eine Entscheidung bezüglich Etablierung in den Verfahrensablauf treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Diese Thematik wird in Kapitel 6 näher betrachtet.

5.2.2. Horizon SPEDex 5000

Die Bestimmung der Wiederfindung und Blindwerten, das Verhalten bei der Realprobenaufbereitung und die Anwendbarkeit im Hinblick auf Dauer und Probendurchsatz in der Routine sollen in dieser experimentellen Versuchsreihe als Nebenaspekt eruiert und mit der manuellen Anreicherung verglichen werden. Die durchgeführten Experimente sind im Detail in Kapitel 4.6.12 beschrieben.

Durch die Verwendung von 5 ng/mL dotierten QC-Proben, die an der jeweiligen Einheit 1-3 des SPEDex-Moduls aufgearbeitet wurden, konnte die Wiederfindung (82-87%) aus den resultierenden Peakflächen bestimmt werden. Sie werden im nachfolgenden als Mittelwert für die betrachteten Östrogene angegeben.

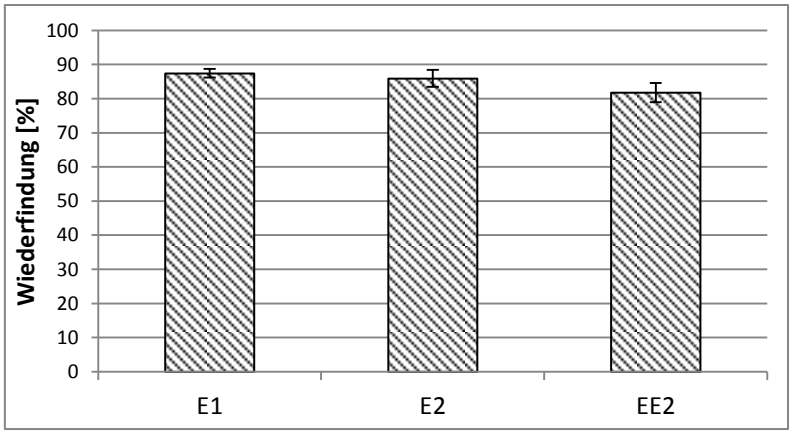

Abbildung 43 Resultierende Wiederfindung der QC-Proben (5 ng/mL) für das SPEDex 5000 Horizon System

Neben der über die Peakflächen bestimmten Wiederfindung, zeigt auch die relative Wiederfindung (Tabelle 20, in Klammer), mit interner Standardkorrektur, sowohl für die QC-Proben als auch für die gemessenen Realproben Rheinwasser und Kläranlagenablauf, zufriedenstellende Ergebnisse im Bereich von 80-105% und liegt damit in derselben Region wie die manuelle Aufbereitung.

Tabelle 20 Berechnete Konzentrationen von E1, E2 und EE2 und zugehörige relative Wiederfindung

Konz [Soll 5 ng/mL]	E1	E2	EE2
QC	4,83 (97%)	5,2 (104%)	4,99 (100%)
Rhein	4,95 (99%)	4,07 (81%)	4,77 (95%)
KA	5,05 (101%)	5,00 (100%)	4,86 (97%)

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Blindwertmessungen, so zeigt sich im Gegensatz zur manuellen Aufbereitung, bereits direkt nach Montage des SPEDex-Moduls ein Blindwert für Estron auf den beiden empfindlichsten Massenspuren E1_1 und E1_2 mit einem S/N von 5-6 auf jeder der drei Einheiten. Nach einer Reihe von Durchläufen (3xQC Proben; QC/KA/Rhein etc.) konnte eine Abnahme des Blindwerts bei allen Einheiten (S/N 3-5) verzeichnet werden. Eine Verschleppung und daraus resultierenden Blindwerten könnte durch Vorversuche mit hohen Konzentrationen an E1 anderer Einrichtungen hervorgerufen werden, dies würde auch die Abnahme der Blindwerte im Laufe der Zeit erklären. Es sind jedoch keine Untersuchungen anderer Einrichtungen bekannt, daher kann diese Überlegung nicht bestätigt werden. Nicht nur die auftretenden Blindwerte, auch der Probendurchsatz und die Dauer des Verfahrensschrittes können mit der einer manuellen Aufbereitung nicht mithalten. Aufgrund der speziellen Vorrichtung von Bakerbond können manuell 6 Proben gleichzeitig in kurzer Zeit aufgearbeitet werden. Durch die zusätzlichen Handgriffe des SPEDex-Systems beim Wechsel der SPE-Disks und der Reinigungsschritte, da keine Einwegkartuschen verwendet werden können, ist es möglich ausschließlich 3 Proben in einem ähnlichen Zeitaufwand zu bearbeiten. Die einzelnen Bearbeitungsschritte der beiden Anreicherungsvarianten sind als Vergleich nachfolgend dargestellt.

Tabelle 21 Vergleich des Extraktionsablaufs der manuellen Aufbereitung und dem SPEDex 5000

Arbeitsschritte	Dauer [min]	Kommentar
SPEDex 5000 n=3		
Reinigung	10	Reinigungsflaschen/Reinigungskolben montieren, Methoden 3x Laden/Wartezeit
Vorbereitung	5	SPE Disks einlegen, Flaschen/Elutionsvials montieren, Methode laden
SPE	40	vollautomatisch
Abmontieren	5	Disks verwerfen, Halterung abmontieren/zerlegen
Reinigung	15	Reinigungsflaschen/Reinigungskolben montieren, Methoden 3x Laden/Wartezeit, Halterung manuell mit MetOH reinigen
Manuelle Aufbereitung Speedisk Bakerbond n=6		
Vorbereitung	5	Lösemittel und Vials vorbereiten, Kartuschen anstecken
SPE	80	Konditionieren, Äquilibrieren, Probeaufgeben, Trockensaugen
Umstecken	5	zur Elution → SPE-Einheit
Eluieren	10	-

Lediglich die Anschaffung eines weiteren Moduls, das wiederum einen gewissen Platzbedarf benötigt, lässt den Probendurchsatz im Vergleich zur manuellen Bearbeitung steigern. Auch die zusätzlichen Kosten sind dabei nicht zu verachten. Aus diesem Grund und der ähnlichen Performance bei Anwendung auf Realproben wurde die Variante zur manuellen Probenvorbereitung beibehalten.

5.3. Entwicklung eines geeigneten online-SPE Anreicherungs- und Aufreinigungsschrittes

5.3.1. Online-SPE Kartuschenauswahl

Neben der geeigneten Affinität des Kartuschenmaterials und der damit verbundenen Wiederfindung, sowie eine gute Selektivität zur Abtrennung von Matrixkomponenten, ist auch die Interaktion zwischen Material und Analyt im Vergleich zur Trennsäule von entscheidender Bedeutung. Die geeignete Wahl einer Kartusche in der online-SPE hat somit auch Auswirkungen auf die Trennleistung.

Wie in Kapitel 4.6.13 beschrieben, wurde eine Vorselektion der Kartuschen des Methodenentwicklungskits (C2-, C8-, C18-, CN-, Resin GP- und Resin SH-Kartuschen) zunächst durch 5 ng/mL dotierte QC-Proben und anschließend durch verdünnten Kläranlagenablauf durchgeführt. Die resultierenden Chromatogramme der QC-Proben wurden anhand der Peakform und Intensität der Analytsignale beurteilt. Durch visuelle Bewertung konnten bereits eine deutliche Peakverbreiterung und Tailing bei Einsatz von C18-, Resin GP- und Resin SH-Kartuschen festgestellt werden. Diese Beobachtung wird auch in den resultierenden Peakbreiten und Höhen im Anhang bestätigt. Die zugehörigen Chromatogramme sind in den nächsten Abbildungen dargestellt.

Zeigen die Analyten eine vergleichsweise geringe Affinität zum Kartuschenmaterial werden sie idealerweise am Beginn des Gradienten, bei niedrigem Organikanteil, vollständig von der Kartusche als schmaler Plug eluiert. Über die hohe Trenneffizienz der analytischen Säule mit größerer Affinität zu den Probenmolekülen können letztendlich Signale mit geringer Peakbreite generiert werden. Es kommt somit zur Fokussierung der Analytpeaks. Im Gegensatz dazu führt eine stärkere Retention der Analyten auf der eingesetzten SPE-Kartusche, im Vergleich mit der Trennsäule, zur teils enormer Peakverbreiterung, da die Elution nur sehr langsam in einer breiten Bande im Gegensatz zu einem schmalen Plug erfolgt [80]. Zudem mindert der erhöhte Organikanteil bei der Elution auf die Trennsäule die Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase, was wiederum die Trennleistung beeinträchtigt. Im Falle der genannten Kartuschen, führt die erhöhte Hydrophobizität im Vergleich zu den weiteren C2-, CN- und C8-Materialien zu einer verstärkten Retention der Östrogene und damit einhergehend zur Peakverbreiterung und Tailing. Besonders stark ist dies bei Resin SH als Kartuschenmaterial ausgeprägt, das durch seine Struktur die höchste Hydrophobizität aufweist und daher auch den Beinamen SH = „strong hydrophobic“ trägt. Die höhere Partikelgröße könnte hier nur bedingt eine Rolle spielen. So kann durch Einsatz von kleinen Partikelgrößen die Kapazität erhöht und das Durchbruchsvolumen verbessert werden und damit wiederum eine möglichen Reduktion des Bettvolumens bzw. der verwendeten Sorbensmenge vorgenommen werden. Dies führt zu einem reduzierten Elutionsvolumen und resultiert daher abermals in einer schmaleren Elutionsbande [81]. Da die eingesetzten Sorbensmengen vom Hersteller nicht angegeben werden, ist dies jedoch eine reine Vermutung. Zudem konnten Guenu *et al.* [82] zeigen, dass die Peakverbreiterung weitgehend von dem Affinitätsverhältnis von Kartusche und Trennsäule abhängig ist und eine erhöhte Partikelgröße keine maßgeblichen Effekte zeigt.

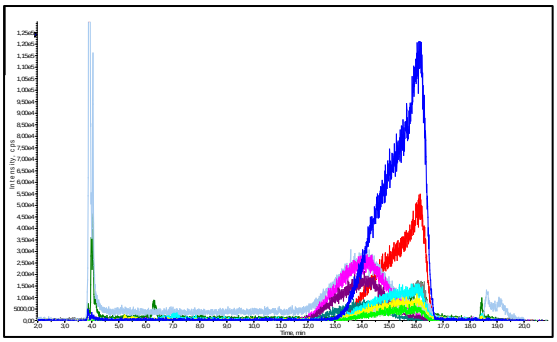

Abbildung 44 Chromatogramm einer QC-Probe mit Resign SH-Kartusche

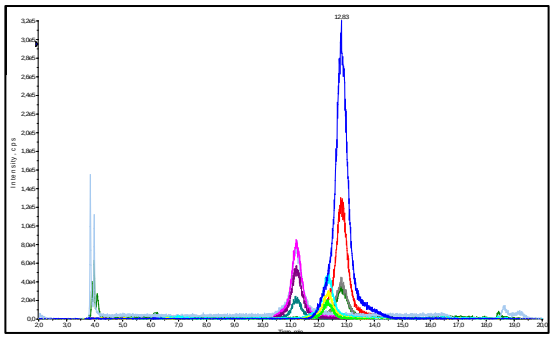

Abbildung 45 Chromatogramm einer QC-Probe mit Resign GP-Kartusche

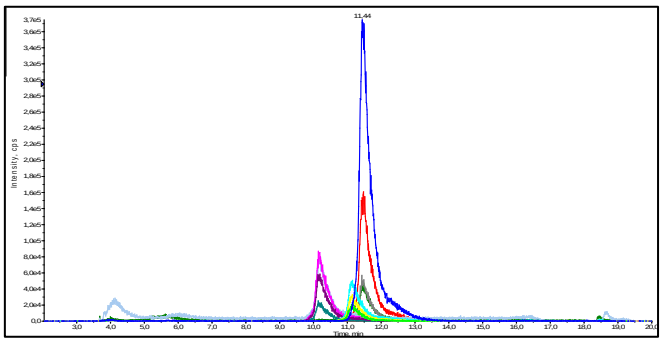

Abbildung 46 Chromatogramm einer QC-Probe mit C18-Kartusche

Um das Verhalten der Analyten und Matrixkomponenten bei Anwendung der weiteren Kartuschenmaterialien C2, C8 und CN auf Realproben beurteilen zu können, wurde im nächsten Schritt verdünnter Kläranlagenablauf analysiert. Dabei zeigte sich, dass es aufgrund der hydrophilen Wechselwirkung des C2-Kartuschenmaterials mit den polaren Matrixsubstanzen zu einer Verschiebung der Störpeaks im resultierenden Chromatogramm (Abbildung 47) kommt und diese im Elutionsfenster der Östrogene auftreten. Dadurch wird wiederum die Quantifizierung und Bestätigung der Anwesenheit, vor allem für EE2, der Zielanalyten erschwert bzw. verhindert, aber auch die Matrixsuppression verstärkt, wodurch C2 als Kartuschenmaterial für die Bestimmung von E1, E2 und EE2 mit diesem System nicht geeignet ist.

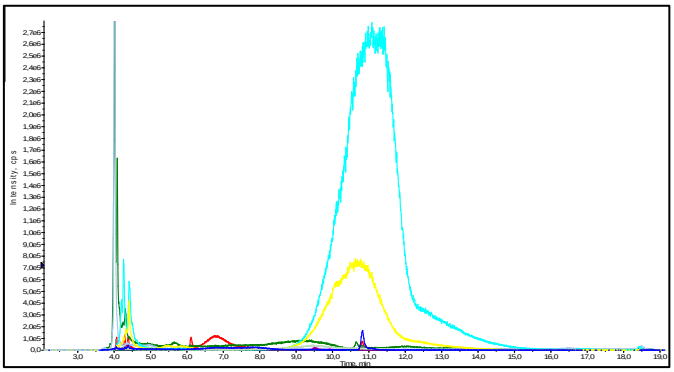

Abbildung 47 Chromatogramm eines verdünnten Kläranlagenablaufs mit C2-Kartusche

CN- und C8-Kartuschen weisen die intensivsten Analytsignale in den QC-Proben auf, mit einem Unterschied von etwa 13% der Peakhöhen und einer vergleichbaren Wiederfindung zwischen 80-100% (Abbildung 48).

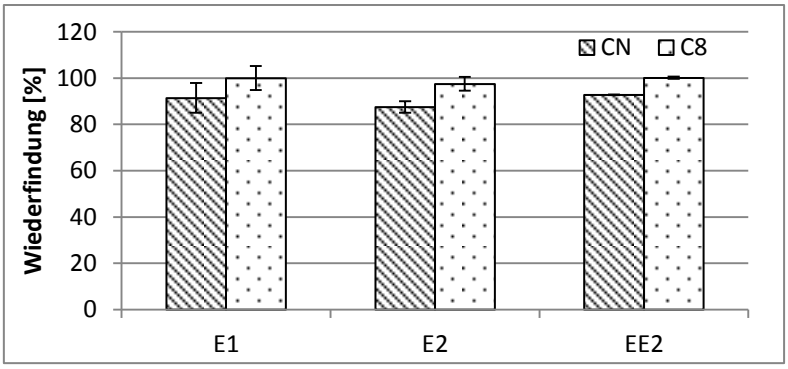

Abbildung 48 Berechnete Wiederfindung der QC-Proben (5 ng/mL) für CN- und C8-Kartuschen

Zudem zeigen sie bei der Analyse von verdünntem Kläranlagenablauf ein ähnliches Verhalten in Hinblick auf Störpeakabtrennung und Matrixsuppression (ähnliche Peakflächen und –höhen). Trotz der geringeren Wiederfindung kann eine erhöhte Signalintensität und damit einhergehend coeluierende Matrixabtrennung bei Einsatz der CN-Kartuschen erzielt werden, wodurch die Wahl der geeigneten online-SPE Kartusche auf das CN-Material fiel. Als Vergleich sind die beiden erhaltenen Kläranlagenablaufchromatogramme in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

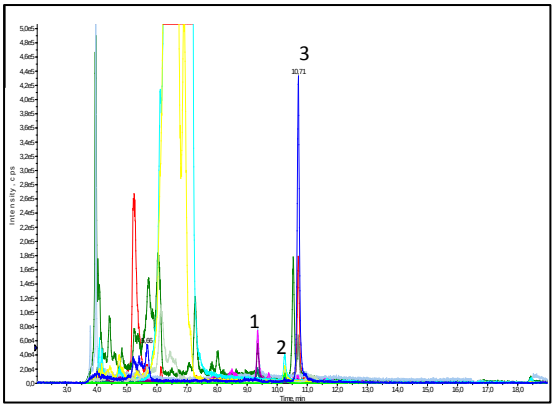

Abbildung 49 Kläranlagenablauf Messung mit CN-Kartusche (1-E2, 2-EE2, 3-E1)

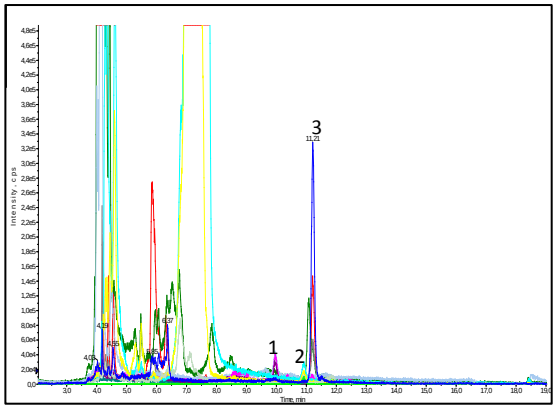

Abbildung 50 Kläranlagenablauf Messung mit C8-Kartusche (1-E2, 2-EE2, 3-E1)

5.3.2. Optimierung der Waschschritte

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der in dieser Arbeit betrachtet wird, ist die notwendige Abtrennung der Matrixkomponenten sowohl in der Form von Störpeaks, als auch in der Form coeluierender Substanzen. Die online-SPE bietet über die Möglichkeit der vollautomatisierten Waschschritte eine einfache Methode zur Aufreinigung der Realproben. Um die Auswirkungen von Waschschritten mit unterschiedlichem Organikanteil zu ermitteln, wurden abermals die beiden Arten an Wasserproben verwendet, sowie die Möglichkeiten in einem ersten Schritt über QC-Proben eingeschränkt. Dabei wurde, wie in Kapitel 4.6.14 angeführt, der Kläranlagenablauf zur Beurteilung der resultierenden Effekte herangezogen und im Anschluss diese durch Oberflächengewässerproben verifiziert.

Zunächst wurden QC-Proben (5 ng/mL) mit einem Anteil an 5%, 10% und 15% Acetonitril bzw. Methanol, sowie reinem LC-MS Wasser („0%“) gewaschen und die resultierenden Signale aufgezeichnet. Die Beobachtungen werden im Nachfolgenden anhand der Ergebnisse von Acetonitril beschrieben und sind auch für die Methanolexperimente zutreffend. Wie in Abbildung 51 angegeben, erfolgt eine Reduktion des Signals, dargestellt als Peakfläche, von E1 und E2 durch Erhöhung des Organikanteils. EE2 liefert hingegen ein nahezu gleichbleibendes Signal, wodurch eine

erhöhte Retentionskraft des Materials für EE2 verdeutlicht wird. Betrachtet man die berechneten Wiederfindungen aus den Peakflächen und der Kalibrationsfunktion und vergleicht diese mit der Abbildung 52, so zeigt sich, dass bei einem Anteil von 5% Acetonitril kein Analytverlust von E2 und EE2 auftritt. Auch im Falle der Verwendung von LC-MS Wasser als Waschlösung können keine Verluste für die drei Steroidhormone beobachtet werden. Lediglich bei E1 erfolgt bei allen angeführten Waschlösungen mit organischem Zusatz eine Verringerung des Analytsignals.

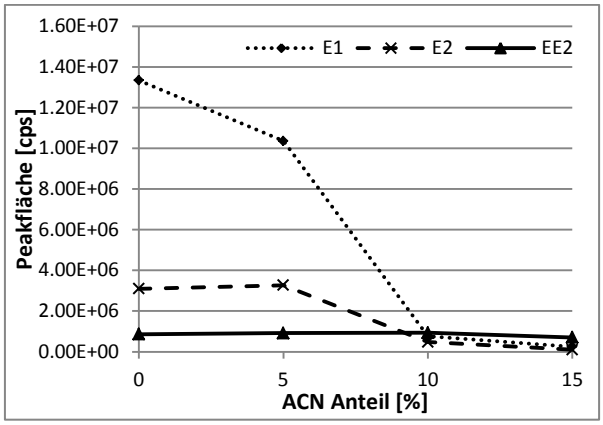

Abbildung 51 Signalverlauf in Abhängigkeit des Acetonitril Anteils der Waschlösung

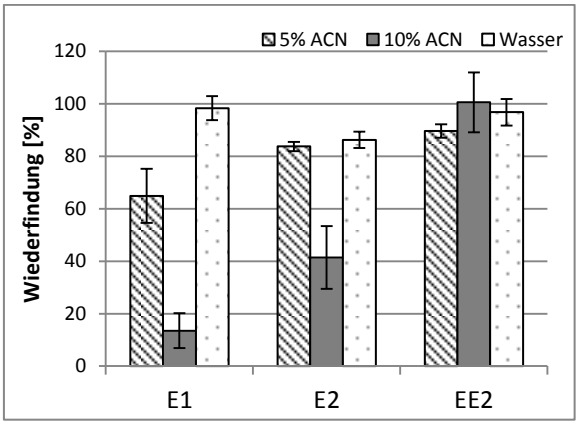

Abbildung 52 Berechnete Wiederfindung der QC-Proben (5 ng/mL) für unterschiedliche Waschlösungen

Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurden für die weiteren Experimente mit Kläranlagenablauf als Waschlösungen LC-MS-Wasser, sowie 5% ACN und 5% Methanollösung verwendet. Dabei wurde zunächst als Auswahlkriterium die Verbesserung des Analytsignals hinsichtlich der Empfindlichkeit beurteilt und dadurch eine weitere Einschränkung getroffen. Hierzu wurden die S/N-Verhältnisse der empfindlichsten Massenspuren miteinander verglichen (Tabelle 22). Wie erwartet wird durch den organischen Anteil in der Waschlösung im Vergleich zu LC-MS Wasser mehr coeluierende Matrix abgetrennt, die wiederum eine Erhöhung der Empfindlichkeit bewirkt. Bei Estron kann jedoch die Signalsteigerung durch Matrixabtrennung den Analytverlust nicht ausgleichen, es kommt daher zu einer Reduktion des S/N-Verhältnisses.

Tabelle 22 S/N-Verhältnisse bei Verwendung unterschiedlicher Waschlösungen

S/N [5 ng/mL]	5% ACN	5% MetOH	H_2O	ohne
E1	64	77	101	85
E2	26	23	18	11
EE2	35	32	25	14

Aufgrund der nahezu Verdreifachung des S/N-Verhältnisses des kritischen Parameters EE2 und auch einer merklichen Verbesserung des E2-Signals, wurde die Auswahl auf die beiden Waschlösungen mit organischem Zusatz beschränkt.

Die konkrete Wahl der optimalen Waschlösung wurde anhand der visuellen Beurteilung der Chromatogramme, im Hinblick auf Reduktion der Störpeaks und ein geringeres Rauschen der Basislinie, getroffen. Dabei wurde als Waschlösung für den online-SPE Schritt 5%ige Acetonitrillösung

gewählt und die Ergebnisse durch Messung von Rheinwasserproben verifiziert. Nachfolgend sind zwei Chromatogramme für den Kläranlagenablauf, die als Bewertung verwendet wurden, dargestellt.

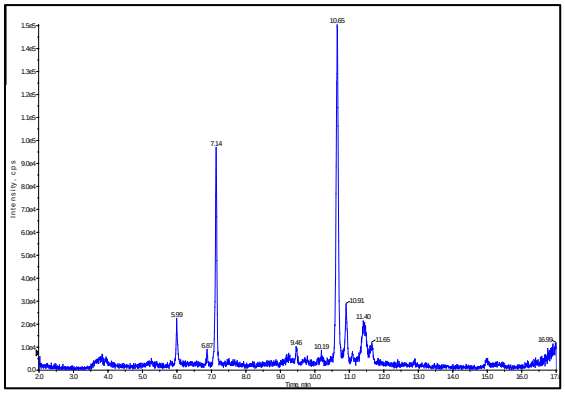

Abbildung 53 Resultierendes Chromatogramm der E1_2 Spur mit 5%iger Methanollösung

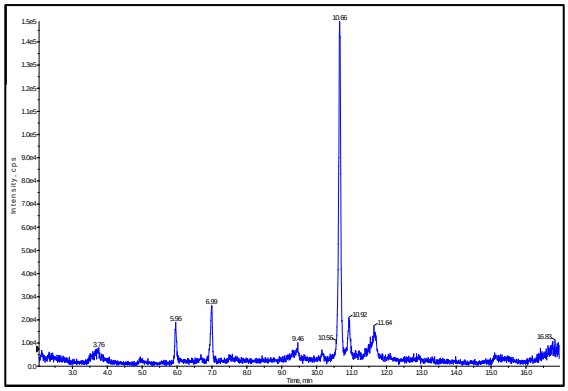

Abbildung 54 Resultierendes Chromatogramm der E1_2 Spur mit 5%iger Acetonitrillösung

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die optimale Menge der eingesetzten Waschlösung sowohl für Kläranlagenablauf, als auch für Rheinwasserproben bestimmt. Die Bewertung erfolgte abermals anhand der resultierenden S/N-Verhältnisse für die 5 ng/mL dotierten Proben, welche in der nachfolgenden Tabelle für die unterschiedlichen Volumina dargestellt werden. Betrachtet man dabei das Signal von EE2 für beide Probearten, so zeigt sich, dass keine merkliche Verbesserung durch Variation der Waschvolumina erzielt werden kann. Die erhöhte Menge an organischer Phase bei 1,5 bzw. 2 mL, kann somit keine weiteren coeluierenden Komponenten abtrennen. Für E1 zeigt sich abermals, dass eine Steigerung der Acetonitrilmenge zu einem deutlichen Analytverlust führt, da jedoch im Falle des Kläranlagenablaufs für E2 eine weitaus bessere Matrixabtrennung erreicht wird, wurde für stark belastete Proben 1 mL als eingesetztes Waschvolumen gewählt. Für Oberflächengewässer resultiert ein Waschvolumen von 0,5 mL in einem verbesserten S/N-Verhältnis für E1 und E2, daher wurde auch dieses in der finalen Methode eingesetzt.

Tabelle 23 Resultierende S/N-Verhältnisse für unterschiedliche Waschvolumina

Waschvolumen	0,5 mL	1 mL	1,5 mL	2 mL
Kläranlagenablauf				
E1	155	106	50	23
E2	20	38	30	12
EE2	30	35	33	31
Rheinwasser				
E1	188	118	51	20
E2	45	30	32	21
EE2	51	50	60	54

5.4. Analytische Kenndaten und Charakterisierung der online-SPE-LC-MS/MS

Im nachfolgenden wird die entwickelte, finale Methode über unterschiedliche Versuchsreihen (Kapitel 4.6.16) anhand ihrer Verfahrenskenndaten und statistischen Merkmalen beurteilt und so eine Aussage über die Methodenperformance getroffen.

Das Messkonzept dieser Methode besteht aus einer zeitsparenden, klassischen LC-Messung der hergestellten Standards, sowie der Analyse der Realproben über den online-SPE-Modus mit, entsprechend der vorliegenden Matrix, angepassten Waschvolumina. Zur eindeutigen Verifizierung der in stark matrixbelasteten Proben müssen die Zielanalyten anhand von zwei Massenübergängen identifiziert werden, sowie die Retentionszeit der erhaltenen Analytpeaks innerhalb einer 2%igen Abweichung von den entsprechenden Standards liegen [83]. Da jedoch durch die verschiedenen Kapillarwege und die SPE-Kartusche im Flussweg, wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, unterschiedliche Verweilzeiten zwischen LC-Modus und online-SPE-Analyse bestehen, kommt es systembedingt zu einer Retentionszeitverschiebung von etwa 0,5 Minuten. Daher ist ein Vergleich der Retentionszeiten nur gegenüber einer QC-Probe, bestimmt durch die online-SPE-Methode, zielführend. Für die durchgeführten Versuchsreihen konnte dieses Kriterium bestätigt werden, wie exemplarisch anhand von experimentellen Daten der Waschvolumina-Reihe (Tabelle 24) gezeigt wird.

Tabelle 24 Zusammenfassung der bestimmten Retentionszeiten des Waschvolumenexperiments

	mittlere t_R QC [min]	t_R Rhein [min]	Abweichung [%]	t_R KA [min]	Abweichung [%]
E1	10,44	10,44	0,045	10,45	0,048
E2	8,979	8,990	0.120	8,997	0,198
EE2	9,956	9,962	0,059	9,958	0,023

Zudem muss durch das vorliegende Messkonzept gewährleistet werden, dass die beiden Messmodi und damit Standard und Realprobe vergleichbar sind. Zu diesem Zweck wurde jeweils eine Kalibrationsgerade mit der entsprechenden Analysenart aufgenommen und miteinander verglichen. Dabei wurden zunächst die erhaltenen Kalibrationspunkte der beiden Modi zu einer Kalibrationsfunktion zusammengeführt und das Bestimmtheitsmaß (R^2), sowie die erhaltenen Genauigkeiten der einzelnen Punkte für die unterschiedlichen Massenspuren berechnet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 25 angeführt. Zusätzlich wurden beide Kalibrationsgeraden separat ausgewertet und zur Kontrolle der Vergleichbarkeit ein Kalibrationsstandard der jeweils anderen Kalibrationsreihe als QC-Probe behandelt. Die zufriedenstellenden Genauigkeit und die hervorragenden Werte für R^2 lassen auf eine Vergleichbarkeit schließen und bestätigen die Linearität im betrachteten Konzentrationsbereich der Standards.

Tabelle 25 Kenndaten der zusammengeführten Kalibrationsfunktion

	Steigung k	Achsenabschnitt d	Genauigkeit [%]	R^2
E1	1,18	2,80E-03	93-104	0,9998
E2	1,25	2,58E-03	97-104	0,9997
EE2	0,324	0,249E-04	95-106	0,9999

Zusätzlich wurden beide Kalibrationsgeraden separat ausgewertet und zur Kontrolle der Vergleichbarkeit ein Kalibrationsstandard der jeweils anderen Kalibrationsreihe als QC-Probe behandelt. Dabei wurden relative Wiederfindungen von 96 bis 108% erhalten. Dies stellt eine sehr gute Genauigkeit dar. Die hohen Bestimmtheitsmaße R^2, sowie der guten relativen Wiederfindungsraten zeigen, dass eine sehr gute Vergleichbarkeit und Linearität besteht.

Um dies auch statistisch zu belegen, wurden die korrigierten Peakflächen von E1, E2 und EE2 der beiden Messmodi verwendet um eine Korrelation zwischen den beiden Methoden herzustellen. Dazu wurde eine lineare Regression durchgeführt, die bei Vergleichbarkeit bzw. beim Fehlen von proportional und konstant systematischen Fehler in einer Steigung (k) von 1 und einem Achsenabschnitt (d) von 0 resultiert [84]. Durch zufällige Messabweichung in der Praxis können jedoch diese Werte nie exakt erreicht werden. Um dennoch die Vergleichbarkeit beurteilen zu können, wurden die Vertrauensbereiche bei einem Konfidenzniveau von 95% für k und d berechnet. Werden dabei die Werte 1 für k und 0 für d abgedeckt, kann von einer Gleichwertigkeit der beiden Methoden gesprochen werden. Die berechneten Kenndaten können exemplarisch Tabelle 26 und die verwendeten Daten dem Anhang entnommen werden. Wie sich aus den Ergebnissen zeigt, umfassen die angeführten Vertrauensbereiche der Funktionsparameter der drei untersuchten Östrogene den Wert 1 für k bzw. 0 für d. Dadurch ist auch durch eine statistische Überlegung die Vergleichbarkeit belegt.

Tabelle 26 Berechnete Werte und Kenndaten des Einstichproben-t-Tests

	k	VB_k	d	VB_d	R^2
E1	1,018	**0.995 - 1.042**	-1,089E-03	**-0.029 - 0.027**	0.9998
E2	0.977	**0.949 - 1.005**	6,474E-03	**-0.026 -0.039**	0.9996
EE2	0.986	**0.952 - 1.019**	1,888E-03	**-8,197E-03 - 1,197E-02**	0.9993

In einem nachfolgenden Schritt wurden Intra- und Inter-Assays mit einem 1 ng/mL Standardmix durchgeführt, sowie Standards mit Konzentrationen im Bereich der Verfahrensgrenzen gemessen, um die Performance bzw. die analytischen Kenndaten der entwickelten Methode zu bestimmen. Die detaillierten Experimente sind in Kapitel 4.6.16 beschrieben.

Dabei wurden, anhand der relativen Standardabweichung der entsprechenden Assays, die tagesinterne, sowie die tagesunabhängige Reproduzierbarkeit der Methode bestimmt. Es zeigt sich

eine gute Reproduzierbarkeit für den Intra-Assay in einem Bereich von 1-3% Abweichung, sowie für den Inter-Assay im Bereich von 7-12%. Die berechneten Werte sind in Tabelle 27 angegeben.

Tabelle 27 Ermittelte Reproduzierbarkeit des Intra- und Interassays

	RSD_{Intra} [%]	RSD_{Inter} [%]
E1	3,4	7,4
E2	1,3	11,6
EE2	1,0	11,0

Die Verfahrensgrenzen wurden über ein definiertes S/N-Verhältnis von 3 für die Nachweisgrenze (NWG) bzw. 10 für die Bestimmungsgrenze (BG) anhand der, über den LC-Modus, analysierten Standards ermittelt. Die resultierenden Verfahrensgrenzen mit entsprechendem S/N-Verhältnis (Tabelle 28, in Klammer) sind nachfolgend dargestellt.

Tabelle 28 Resultierende Verfahrensgrenzen im Standard

Verfahrensgrenzen	NWG [pg/mL]	BG [pg/mL]
E1	5 (3,8)	10 (11)
E2	10 (2,9)	30 (9,8)
EE2	30 (4,2)	50 (10,6)

Berücksichtigt man dabei den Anreicherungsfaktor von 1000 beim LC-Modus, so können die geforderten Nachweisgrenzen der Beobachtungsliste für die drei untersuchten Östrogene in den Standards erreicht werden. Selbst die Bestimmungsgrenzen für Estron und Estradiol liegen eine Größenordnung unter den definierten Nachweisgrenzen der EU-Kommission. Lediglich für den kritischen Parameter EE2 konnten die Grenzen in den Standards nur knapp erreicht werden, wodurch die Dringlichkeit des zusätzlichen Anreicherungsschritts mittels online-SPE verdeutlicht wird, zumal für Realproben eine stark ausgeprägte Signalsuppression vorliegt.

Um auch die Anwendbarkeit und Empfindlichkeit der Methode anhand von Realproben zu demonstrieren wurden Kläranlagenablauf- und Rheinwasserproben nativ, sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen an E1, E2 und EE2 (inklusive interner Standards) gespikten Proben, mit Hilfe der entwickelten online-SPE Methode analysiert. Für Estron wurden in beiden Probematricen native Analytsignale bestimmt, die deutlich über den definierten S/N-Verhältnissen der BG liegen und somit die Verfahrensgrenzen durch Rückrechnen der Konzentrationen auf entsprechende S/N-Verhältnisse ermittelt wurden. Weitere native Belastung konnte sowohl für E2 und EE2 im Kläranlagenablauf, als auch für E2 im Rheinwasser registriert werden (Tabelle 29, S/N in

Klammer). Die nachfolgend angegebenen Daten beinhalten bereits den Anreicherungsfaktor von 5000 im online-SPE-Modus.

Tabelle 29 Native Konzentrationen und S/N-Verhältnisse in den untersuchten Realproben

Native Konz.	Rhein [pg/L]	S/N	KA [pg/L]	S/N
E1	330	52	1850	64
E2	40	2,5	115	4,4
EE2	-	-	75	2,8

Die bestimmten S/N-Verhältnisse der Analytpeaks liegen hier in einem Bereich von etwa 3, anhand derer eine Schätzung der erzielten Nachweisgrenzen über die Kalibrationsfunktion durchgeführt und weiters in der Ermittlung der Bestimmungsgrenzen berücksichtigt wurden. Da die berechneten Konzentrationen dabei mit einer großen Unsicherheit behaftet sind, dienen die so berechneten Verfahrensgrenzen ausschließlich als Richt- bzw. Schätzwert (E2, EE2-KA). Lediglich für die Bestimmung der Verfahrensgrenzen für EE2 im Rheinwasser wurden gespikte Proben eingesetzt, da keine native Belastung registriert werden konnte.

Tabelle 30 Ermittelte Verfahrensgrenzen in Realproben

Verfahrensgrenzen	NWG [pg/L]	Bestimmungsart	BG [pg/L]	Bestimmungsart
Kläranlagenablauf				
E1	85	N	290	N
E2	80	N	280	S (500 pg/L)
EE2	80	N	290	S (500 pg/L)
Rheinwasser				
E1	20	N	65	N
E2	50	N	200	S (150 pg/L)
EE2	30	S (30 pg/L)	100	S (150 pg/L)

N-nativ, S-gespikte Probe

Die resultierenden Verfahrensgrenzen in Tabelle 30 zeigen, dass für E1 und E2 die geforderten Kriterien der Beobachtungsliste sowohl im Oberflächengewässer, als auch im Kläranlagenablauf erreicht werden können. Zudem kann eine Konzentration von 30 pg/L EE2 in einer Realprobe (Abbildung 55) mit einem S/N-Verhältnis von 3,2 nachgewiesen werden und so auch dadurch die Nachweisgrenzen der Beobachtungsliste für EE2 im Oberflächengewässer bestätigt werden.

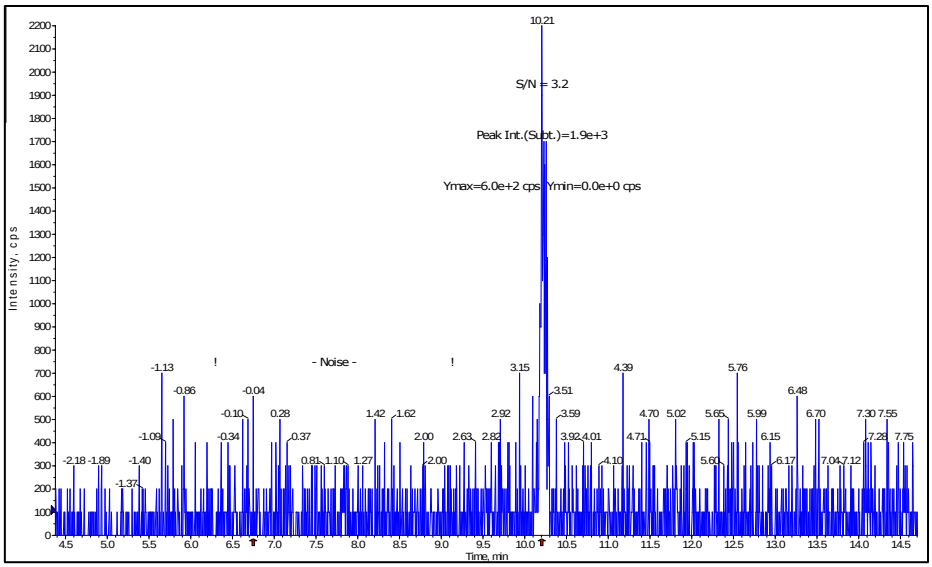

Abbildung 55 Chromatogramm einer 30 pg/L EE2 dotierten Rheinprobe (EE2_4)

Lediglich durch die starke Matrixbelastung im Kläranlagenablauf wird das gewünschte Ziel für EE2 nicht erfüllt. Aus den Verfahrensgrenzen kann zudem der Kompromiss, der vor allem bei Multianalytmethode eingegangen werden muss, verdeutlicht werden. Estradiol ist im Vergleich zu EE2 hinsichtlich der Signalintensität deutlich empfindlicher, da jedoch im Hinblick auf die Kriterien der WRRL eine Methode entwickelt werden musste, die eine möglichst hohe Empfindlichkeit für EE2 besitzt, wurden Verluste durch Waschschritte etc. für E2 in Kauf genommen. Diese resultieren jedoch in schlechteren Verfahrensgrenzen für Estradiol. Daher zeigt sich, dass ähnlich zu Multianalytmethoden, keine ideale Empfindlichkeit für jeden betrachteten Parameter erreicht werden kann.

In einem letzten Schritt wurde der Signalverlust über den gesamten Verfahrensablauf mithilfe der Wiederfindung anhand der resultierenden Peakflächen und der Kalibrationsfunktion bestimmt. Dabei fließen sowohl etwaige Verluste aus der manuellen Probenvorbereitung, aus den Waschschritten sowie die Signalsuppression der Matrix mit ein. Zudem sollte die relative Wiederfindung und damit einhergehend die Anwendbarkeit bzw. das Korrekturpotential des internen Standards über das Gesamtverfahren bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden, mit 5 ng/mL dotierte, Realproben analysiert und unter Berücksichtigung der nativen Konzentrationen an E1, E2 und EE2 die beiden Arten der Wiederfindung berechnet (Abbildung 56 und Abbildung 57).

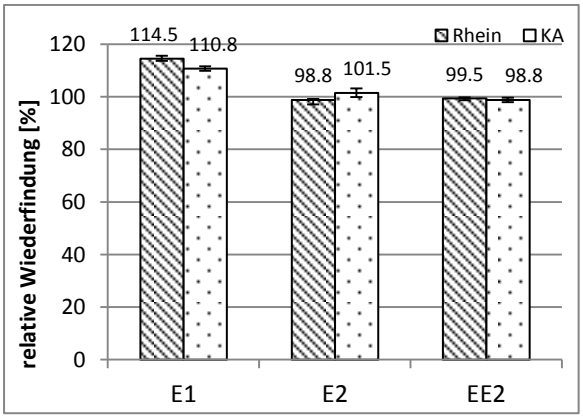

Abbildung 56 Relative Wiederfindung der Realproben über das Gesamtverfahren

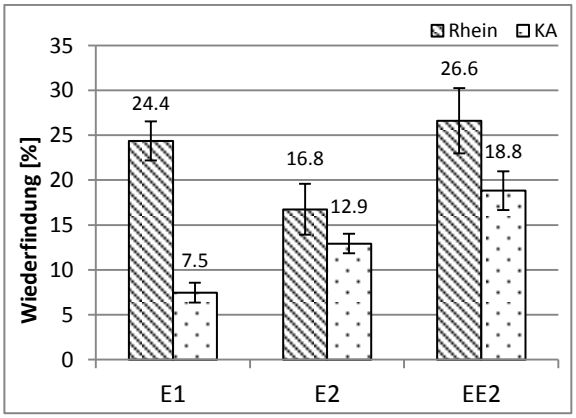

Abbildung 57 Signalintensität in Realproben über das Gesamtverfahren ausgedrückt als absolute Wiederfindung

Die zufriedenstellenden Werte der relativen Wiederfindung lassen darauf schließen, dass, wie erwartet, die internen Standards ein nahezu identes Verhalten wie die untersuchten Analyten aufweisen und ein hohes Maß an Korrekturpotential gegeben ist. Betrachtet man jedoch den Gesamtsignalverlust anhand der Wiederfindung, so zeigt sich eine starke Reduktion des Signals durch die unterschiedlichen negativen Beiträge, wie die matrixbedingte Signalsuppression oder die zahlreichen Probenvorbereitungsschritte mit Wiederfindungen im Bereich von 80%. Auch der Vergleich zwischen Rheinwasser und Kläranlagenablauf bestätigt einen deutlichen Einfluss der höheren Matrixbelastung, vor allem für E1, im Abwasser.

Aus den unterschiedlichen Experimenten konnte eine gute Methodenperformance bestätigt werden, wobei sich eine beachtliche Empfindlichkeit, selbst in Realproben, erzielen lässt. Der deutliche Signalverlust bzw. Analytverlust des Verfahrens zeigt jedoch auch, dass hier weiteres Optimierungspotential vorliegt, auf das im Kapitel 6 näher eingegangen wird.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Nach dem heutigen Stand der Technik sind die ambitionierten Nachweisgrenzen der Beobachtungsliste im Rahmen der WRRL, wie bereits das JRC in seiner jährlichen Evaluierung feststellte, eine analytische Herausforderung. Vor allem in Realproben können, aufgrund der Matrixbelastung in Kombination mit der zumeist unzureichenden Empfindlichkeit und Selektivität, die geforderten Kriterien nur für die empfindlicher detektierbaren Östrogene, E1 und E2, erreicht werden. Mit Hilfe der, in dieser Arbeit, entwickelten Analysenmethode zur Bestimmung von E1, E2 und EE2 in Oberflächengewässer und Abwasser, konnte erstmals eine Konzentration von 30 pg/L EE2 im Oberflächengewässern mit einem S/N-Verhältnis von 3 nachgewiesen werden. Zudem werden die geforderten analytischen Grenzen für E1 und E2 sowohl im Kläranlagenablauf, als auch im Oberflächengewässer erfüllt. Lediglich für die Bestimmung von EE2 im Bereich von 30 pg/L im matrixbelasteten Kläranlagenablauf, muss die Methode weiter hinsichtlich einer Steigerung der Empfindlichkeit oder Selektivität, optimiert werden und so gegebenenfalls der suppressionsbedingte Signalverlust minimiert werden. Aufgrund der gezeigten, exzellenten Methodenperformance, der Linearität im gewählten Arbeitsbereich von 0,05-10 ng/mL, der Vergleichbarkeit der beiden eingesetzten Messmodi (LC-Modus/online-SPE), der tagesinternen Reproduzierbarkeit im Bereich von 1-3% bzw. tagesunabhängigen im Bereich von 7-12% und der beachtlichen, erzielten Verfahrensgrenzen, ist dieses Analyseverfahren für eine Anwendung in der Routine geeignet. Diese Aussage bezieht sich dabei lediglich auf die untersuchten Kriterien, wobei eine umfangreiche Validierung durchgeführt und in diesem Zuge die Robustheit des Verfahrens, wie Haltbarkeit der Trennsäule etc. eruiert werden müssen.

Auch die einzelnen Verfahrensschritte ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und erfordern einen geringen Laboraufwand. Selbst die manuelle Probenvorbereitung ist durch den Einsatz von C18 Speedisk Kartuschen zur Anreicherung und über Verwendung der speziellen Kartuschenhalterung verhältnismäßig zeitsparend und ermöglicht eine händische Aufarbeitung von bis zu 20 Proben (inklusive Elution) bzw. 35 Proben (Lagerung auf Kartuschen) pro Tag. Durch diese Zeitersparnis und Probendurchsatz ist auch der Einsatz einer automatisierten Festphasenextraktionseinheit wie der SPEDex 5000 mit drei Extraktionseinheiten nicht erforderlich. Des Weiteren muss mit diesen noch die E1-Blindwertproblematik gelöst werden. Da für einen vergleichbaren Probendurchsatz mindestens zwei Module benötigt werden, wobei die Personalkostenersparnis lediglich marginal, die Investitionskosten jedoch sehr hoch ausfallen. Zusätzlich eignen sich die SPE-Kartuschen hervorragend zur Langzeit-Lagerung der Proben bei -20 °C, wodurch auch eine langfristige Stabilität erreicht wird. So können rückgestellte Proben, nach kurzem Auftauen, mit 25 mL Methanol eluiert, unter Stickstoffstrom bei einer Temperatur von 60 °C eingedampft und in Wasser bzw. in dem für die weitere Probenaufbereitung notwendigen Lösemittel aufgenommen werden. Hier besteht nun die Möglichkeit die Probe, je nach Belastung, in 4 mL Wasser aufzunehmen, um anschließend eine Analyse mittels online-SPE durchzuführen, oder 1 mL einzusetzen um eine klassische Messung im LC-Modus bei sehr hohen Erwartungskonzentrationen im unteren ng/L-Bereich für E1, E2 und EE2 zu verrichten. Bei der online-SPE Methode zeigten sich im Zuge der Arbeit CN-Material als optimales Kartuschenmaterial für die zusätzliche Anreicherung mit anschließender chromatographischer Trennung. Durch einen Waschschritt mit 5% Acetonitrillösung, je nach Probenmatrix, für Rheinwasser mit einem Waschvolumen von 0,5 mL bzw. für Kläranlagenablauf von 1 mL der 5%igen Lösung, können Störpeaks im Chromatogramm, sowie coeluierende Matrix beseitigt werden, was

wiederum die Empfindlichkeit verbessert. Als Trennsäule wird eine 50 x 2,1 mm Restek Raptor Biphenylsäule (Coreshell-Material mit 2,7 µm Partikeldurchmesser) verwendet, da eine zufriedenstellende Auflösung der Analyten, sowie eine ausreichende Abtrennung von matrixbedingten Störpeaks erzielt wurde. Zudem liegt der resultierende Rückdruck von 145 bar bzw. inklusive Vorsäule 195 bar deutlich unter dem systembedingten Drucklimit von 300 bar. Über einen flachen Gradienten von 10% auf 50% Acetonitrilanteil bei einer Flussrate von 0,4 mL/min kann eine optimale Abtrennung der Matrix erreicht werden und bedingt durch den moderaten Rückdruck und der Flussrate eine kurze Analysenzeit von 19 bzw. 21 Minuten realisiert werden. Wie sich durch die unterschiedlichen Laufmitteladditivexperimente herausstellte, kann durch Zusatz von 0,01 mM Ammoniumfluorid das Signal maßgeblich gesteigert und damit einhergehend die Empfindlichkeit verbessert werden. Der eingesetzte MRM-Modus ermöglicht eine selektive Detektion der Zielanalyten E1, E2 und EE2 in den untersuchten Realproben. Anhand der speziellen Funktion der QTRAP 6500+, kann jedoch bei möglichen Interferenzen im Elutionsbereich der Östrogene und erschwerte Quantifizierung auf den MS^3-Modus mit einer summierten Scananzahl von 3 zurückgegriffen werden. Da der hohe Zeitaufwand, bedingt durch die Zykluszeiten des MS^3-Modus, eine separate Messung erfordert und keine verbesserte Empfindlichkeit durch die zusätzliche Selektivität festgestellt werden konnte, besteht keine Notwendigkeit in der Routineanalytik.

Um die Selektivität und damit die Abtrennung von Matrixkomponenten zu verbessern und so gegebenenfalls die Empfindlichkeit zu steigern, zeigten erste Versuchsreihen mit MIP-Kartuschen in der manuellen Probenvorbereitung ein großes Potential. Dabei sollten die Auswirkungen der Kombination aus MIP-Aufreinigung und anschließender online-SPE-Analyse auf das Analytsignal ermittelt werden, zumal mögliche Blindwerte durch die Aufkonzentrierung auftreten können. Da in jedem SPE-Schritt neben den Zielmolekülen auch die Störkomponenten angereichert werden, könnte jedoch eine vorangehende Abtrennung in der manuellen Probenvorbereitung die Signalintensität wesentlich beeinflussen. Da der Einsatz von MIPs aufwendige Laborarbeit erfordert, wäre eine Integration in den online-SPE Schritt in Form von Kartuschen von Vorteil, sofern das verwendete Material für ein Packen der online-SPE Kartuschen zur Verfügung stünde. Auch ein Vergleich der unterschiedlichen Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte in Hinblick auf die Notwendigkeit der einzelnen Methoden bzw. deren Kombination könnte eine Vereinfachung des Analyseverfahrens aufzeigen. So muss eruiert werden, ob durch die zusätzliche Matrixabtrennung der MIPs, vor allem für Oberflächengewässer, ein weiterer Anreicherungsschritt in Form der online-SPE durchgeführt werden muss. Eine weitere Möglichkeit wäre durch die verbesserte Empfindlichkeit bei MIP-Einsatz eine Reduktion des Probenvolumens, wodurch gegebenenfalls die offline Anreicherung eingespart werden könnte. Wie in Kapitel 3 beschrieben, werden oftmals Florisil-Kartuschen zur Aufreinigung verwendet oder SIlikamaterialien, die direkt aus der organischen Phase des SPE-Extrakts eingesetzt werden können und so ein weiterer Verfahrensschritt, das Eindampfen und erneute Aufnehmen in wässriger Lösung beim Verwendung der MIP-Kartuschen, eingespart werden kann. Aus vorangehender Erfahrung am IUTA mit Florisilkartuschen in der Hormonanalytik zeigt sich jedoch, dass die kommerziell erhältlichen Kartuschen in der Probenvorbereitung ungeeignet sind, da während der Aufarbeitung das zum Trocknen des organischen Extrakts in den Florisilkartuschen eingesetzte Natriumsulfat ausfällt und nicht über Spritzenfilter etc. abgetrennt werden kann. Um dieses Problem zu umgehend könnten jedoch eigens gepackte Kartuschen verwendet werden.

Neben einer separaten Aufreinigung in der manuellen Probenvorbereitung, kann auch eine verbesserte Selektivität in der Anreicherung zu einer erhöhten Empfindlichkeit führen. So ermöglichen die unspezifischen Wechselwirkungen der zurzeit eingesetzten C18 Speedisk eine

Aufkonzentrierung an zahlreichen Störkomponenten. Um hier einen zusätzlichen Mechanismus der Abtrennung von unerwünschter Matrix zu Verfügung zu stellen, können über Ionentauscher- oder Mixedmode-Kartuschen durch Regulierung des pH-Werts bei der Elution und gegebenenfalls Waschschritten weitere Substanzen abgetrennt werden. Eine Verminderung der einzelnen Verfahrensschritte bzw. eine Optimierung der Extraktionsschritte bezüglich verwendeter Lösemittelvolumina (manuelle Extraktion) oder Lösemittelverweilzeiten, sowie Alternativen zur Filtration der aufgearbeiteten Proben (MIPs, Kapitel 5.2.1) können die Wiederfindung der untersuchten Östrogene über das Gesamtverfahren verbessern.

Die wohl effizienteste Methode zur weiteren Matrixabtrennung ist der Einsatz von, zur RP-Festphasenextraktion, orthogonalen Methoden, da über einen gänzlich unabhängigen Mechanismus weitere Selektivität erzielt werden kann. Hier bieten sich Verfahren, wie die Gelpermeationschromatographie, also eine Trennung anhand der unterschiedlichen Molekülgrößen, als routinetaugliche Alternative an. Wie Williams *et al.* [65] bestätigen, kann durch eine Kombination aus offline SPE und Gelpermeationschromatographie in der Probenvorbereitung eine gute Empfindlichkeit für E1, E2 und EE2 erreicht werden. Eine weitere instrumentelle Alternative ist die chromatographische Matrixabtrennung in Form einer 2D-LC-MS/MS Methode, die sich durch die hohe Trenneffizienz und außerordentliche Selektivität des Systems auszeichnet und so, sofern eine ausreichende Empfindlichkeit realisiert wird, gegebenenfalls die Anzahl der Schritte in der Probenvorbereitung vermindern und damit den Analytverlust reduzieren.

Es zeigt sich, dass bei neu entwickelten Analysenmethoden, wie die in dieser Arbeit vorgestellte Methode, ein hohes Maß an Verbesserungs- bzw. Optimierungspotential gegeben ist und hier weitere Untersuchungen, Feinabstimmungen und eine umfangreiche Methodenvalidierung benötigt werden, um eine verbesserte Empfindlichkeit zu ermöglichen und das Verfahren im Laboralltag zu etablieren.

7. Literaturverzeichnis

[1] T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G. Kraak, Global Assessment of the State-of-Science of Endocrine Disruptors, in, World Health Organization Geneva, Switzerland 2002.
[2] K.E. Arnold, A.R. Brown, G.T. Ankley, J.P. Sumpter, Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 369 (2014).
[3] J.P. Sumpter, Feminized responses in fish to environmental estrogens, Toxicology Letters, 82 (1995) 737-742.
[4] G. Panter, R. S Thompson, J. Sumpter, Adverse Reproductive Effects in Male Fathead Minnows (Pimephales promelas) Exposed to Environmentally Relevant Concentrations of the Natural Oestrogens, Oestradiol and Oestrone, 1998.
[5] A.M. Vajda, L.B. Barber, J.L. Gray, E.M. Lopez, J.D. Woodling, D.O. Norris, Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent, Environmental Science & Technology, 42 (2008) 3407-3414.
[6] H. Adlercreutz, K. Hockerstedt, C. Bannwart, S. Bloigu, E. Hamalainen, T. Fotsis, A. Ollus, Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG), Journal of steroid biochemistry, 27 (1987) 1135-1144.
[7] S. Reddy, C. R Iden, B. Brownawell, Analysis of Steroid Conjugates in Sewage Influent and Effluent by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, 2005.
[8] R. Gomes, J. Birkett, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester, Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography / mass spectrometry, 2005.
[9] M. Cargouet, D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Karolak, Y. Levi, Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France), 2004.
[10] M. Adeel, X. Song, Y. Wang, D. Francis, Y. Yang, Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, Environment International, 99 (2017) 107-119.
[11] A. Schoenborn, P. Kunz, M. Koster, Estrogenic activity in drainage water: a field study on a Swiss cattle pasture, Environmental Sciences Europe, 27 (2015) 17.
[12] H. Hamid, C. Eskicioglu, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, Water Research, 46 (2012) 5813-5833.
[13] T. Hillenbrand, F. Tettenborn, S. Fuchs, S. Toshovski, S. Metzger, I. Tjoeng, P. Wermter, M. Kersting, D. Hecht, N. Werbeck, P. Wunderlin, Maßnahmen zur Verminderung des Eintrages von Mikroschadstoffen in die Gewässer – Phase 2, 2016.
[14] H. Hollert, S. Heise, S. Keiter, P. Heininger, U. Förstner, Wasserrahmenrichtlinie — Fortschritte und Defizite, 2007.
[15] H. Braus, F. Middleton, G. Walton, Orangic Chemical Compounds in Raw and Filtered Surface Waters, Analytical Chemistry, 23 (1951) 1160-1164.
[16] I. Liška, Fifty Years of Solid-Phase Extraction in Water Analysis — Historical Development and Overview, 2000.
[17] Boguslaw Buszewski & Malgorzata Szultka (2012) Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 42:3, 198-213.
[18] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, New hydrophilic materials for solid-phase extraction, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 24 (2005) 394-406.
[19] A. Zwir-Ferenc, M. Biziuk, Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications, 2006.
[20] D. Rendle, Analytical SolidPhase Extraction, by J.S. Fritz, Wiley-VCH, New York, 1999, xiii+209 pp, ISBN 0-471-24667-0; £41.95, 2000.

[21] J. Płotka-Wasylka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 77 (2016) 23-43.
[22] B. Buszewski, M. Szultka, Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 42 (2012) 198-213.
[23] N.M. Cassiano, V.V. Lima, R.V. Oliveira, A.C. de Pietro, Q.B. Cass, Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384 (2006) 1462-1469.
[24] R.J. Ansell, Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs, Advanced Drug Delivery Reviews, 57 (2005) 1809-1835.
[25] M. Ávila, M. Zougagh, Á. Ríos, A. Escarpa, Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 27 (2008) 54-65.
[26] J. Ye, Y. Chen, Z. Liu, A Boronate Affinity Sandwich Assay: An Appealing Alternative to Immunoassays for the Determination of Glycoproteins, Angewandte Chemie International Edition, 53 (2014) 10386-10389.
[27] N. Pérez-Moral, A.G. Mayes, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, Analytica Chimica Acta, 504 (2004) 15-21.
[28] I.A. Nicholls, H.S. Andersson, C. Charlton, H. Henschel, B.C.G. Karlsson, J.G. Karlsson, J. O'Mahony, A.M. Rosengren, K.J. Rosengren, S. Wikman, Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design, Biosensors and Bioelectronics, 25 (2009) 543-552.
[29] Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, Fully automated liquid chromatography–mass spectrometry determination of 17β-estradiol in river water, Journal of Chromatography A, 1120 (2006) 252-259.
[30] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review, Analytica Chimica Acta, 622 (2008) 48-61.
[31] M.-C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 856 (1999) 3-54.
[32] D.T. Rossi, N. Zhang, Automating solid-phase extraction: current aspecs and future prospekts, Journal of Chromatography A, 885 (2000) 97-113.
[33] L. Chen, H. Wang, Q. Zeng, Y. Xu, L. Sun, H. Xu, L. Ding, On-line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography--A Review, 2009.
[34] S. Rodríguez-Mozaz, M. Lopez de Alda, D. Barcelo, Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, 2007.
[35] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, A.I. Gusev, Development and application of a new on-line SPE system combined with LC–MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma, Journal of Chromatography A, 1080 (2005) 99-106.
[36] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, R. López, D. Barceló, Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS), Journal of Mass Spectrometry, 38 (2003) 917-923.
[37] D.F. Markgraf, H. Al-Hasani, S. Lehr, Lipidomics—Reshaping the Analysis and Perception of Type 2 Diabetes, International journal of molecular sciences, 17 (2016) 1841.
[38] D.C. Harris, G. Werner, T. Werner, Lehrbuch der Quantitativen Analyse, Springer Berlin Heidelberg, 2014.
[39] D.M.S.A. Sciex, MRM^3 Quantitation, in: Berin User Meeting, 2017.
[40] K.T. Wanner, G. Höfner, Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry: Applications in Drug Discovery, Wiley, 2007.
[41] P. Kebarle, L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry, Analytical Chemistry, 65 (1993) 972A-986A.
[42] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, Talanta, 115 (2013) 104-122.
[43] W. Lambert, Pitfalls in LC–MS (–MS) analysis, Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists, 24 (2004) 59-61.

[44] Y. Liu, Z. Miao, R. Lakshmanan, R.R. Ogorzalek Loo, J.A. Loo, H. Chen, Signal and Charge Enhancement for Protein Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Desorption Electrospray Ionization, International journal of mass spectrometry, 325-327 (2012) 161-166.
[45] R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy, Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 14 (2003) 1290-1294.
[46] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 11 (2000) 942-950.
[47] H. Mei, Y. Hsieh, C. Nardo, X. Xu, S. Wang, K. Ng, W.A. Korfmacher, Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 17 (2003) 97-103.
[48] E.T. Gangl, M. Annan, N. Spooner, P. Vouros, Reduction of Signal Suppression Effects in ESI-MS Using a Nanosplitting Device, Analytical Chemistry, 73 (2001) 5635-5644.
[49] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 3929-3937.
[50] A.C. Johnson, E. Dumont, R.J. Williams, R. Oldenkamp, I. Cisowska, J.P. Sumpter, Do concentrations of ethinylestradiol, estradiol, and diclofenac in European rivers exceed proposed EU environmental quality standards?, Environmental science & technology, 47 (2013) 12297-12304.
[51] N. Rowan, Secure Archive For Environmental Research Data, in, Environmental Protection Agency Ireland, pp. Investigation of the implications for Ireland of emerging standards on pharmaceuticals in receiving waters.
[52] U.S.E.P. Agency, Method 1698: Steroids and hormones in water, soil, sediment, and biosolids by HRGC/HRMS: USEPA, in, Washington, DC, 2007.
[53] U.S.E.P. Agency, Method 539: Determination of Hormones in Drinking Water by Solid Phase Extraction (SPE) and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS), in, Washington, DC, 2010.
[54] R. Loos, Analytical methods for possible WFD 1st Watch List substances, in, Directive 2008/105/EC as amended by Directive 2013/39/EU in the field of water policy. JRC Science and Policy Report, 2015.
[55] T.Y. Fang, S.M. Praveena, C. deBurbure, A.Z. Aris, S.N.S. Ismail, I. Rasdi, Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review, Chemosphere, 165 (2016) 358-368.
[56] L. Barreiros, J.F. Queiroz, L.M. Magalhães, A.M.T. Silva, M.A. Segundo, Analysis of 17-β-estradiol and 17-α-ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review, Microchemical Journal, 126 (2016) 243-262.
[57] M. Locatelli, F. Sciascia, R. Cifelli, L. Malatesta, P. Bruni, F. Croce, Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples, 2016.
[58] D. Zacs, I. Perkons, V. Bartkevics, Determination of steroidal oestrogens in tap water samples using solid-phase extraction on a molecularly imprinted polymer sorbent and quantification with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), 2016.
[59] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, Picogram per Liter Level Determination of Estrogens in Natural Waters and Waterworks by a Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method, Analytical Chemistry, 76 (2004) 6998-7006.
[60] L. Ciofi, D. Fibbi, U. Chiuminatto, E. Coppini, L. Checchini, M. Del Bubba, Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater, Journal of Chromatography A, 1283 (2013) 53-61.
[61] S. Esteban, M. Gorga, M. Petrovic, S. González-Alonso, D. Barceló, Y. Valcárcel, Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain, Science of The Total Environment, 466 (2014) 939-951.

[62] G.-W. Lien, C.-Y. Chen, G.-S. Wang, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 956-966.
[63] A. Shareef, M.J. Angove, J.D. Wells, B.B. Johnson, Aqueous Solubilities of Estrone, 17β-Estradiol, 17α-Ethynylestradiol, and Bisphenol A, Journal of Chemical & Engineering Data, 51 (2006) 879-881.
[64] J. Shi, X. Liu, Q. Chen, H. Zhang, Spatial and seasonal distributions of estrogens and bisphenol A in the Yangtze River Estuary and the adjacent East China Sea, Chemosphere, 111 (2014) 336-343.
[65] R. J Williams, J. H Churchley, R. Kanda, A. Johnson, Comparing predicted against measured steroid estrogen concentrations and the associated risk in two United Kingdom river catchments, 2012.
[66] S. Tavazzi, Mariani, G., Comero, S., Ricci, M., Paracchini, B., Skejo, H., Gawlik, Water Framework Directive Watch List Method Analytical Method for the Determination of Compounds Selected for the First Surface Water Watch List, in: JRC Validation Report, 2016.
[67] A. Vallejo, A. Usobiaga, I. Martinez-Arkarazo, A. Prieto, N. Etxebarria, O. Zuloaga, L.A. Fernández, Ultrasonic-assisted derivatization of estrogenic compounds in a cup horn booster and determination by GC-MS, Journal of Separation Science, 33 (2010) 104-111.
[68] Y. Nie, Z. Qiang, H. Zhang, C. Adams, Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 7071-7080.
[69] D.A. Alvarez, N.W. Shappell, L.O. Billey, D.S. Bermudez, V.S. Wilson, D.W. Kolpin, S.D. Perkins, N. Evans, W.T. Foreman, J.L. Gray, M.J. Shipitalo, M.T. Meyer, Bioassay of estrogenicity and chemical analyses of estrogens in streams across the United States associated with livestock operations, Water Research, 47 (2013) 3347-3363.
[70] B. Zheng, W. Li, H. Li, L. Liu, P. Lei, X. Ge, Z. Yu, Y. Zhou, Separation and determination of estrogen in the water environment by high performance liquid chromatography-fourier transform infrared spectroscopy, 6 (2016) 32264.
[71] N.A. Martínez, S.V. Pereira, F.A. Bertolino, R.J. Schneider, G.A. Messina, J. Raba, Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure, Analytica Chimica Acta, 723 (2012) 27-32.
[72] L. Gehrmann, H. Bielak, M. Behr, F. Itzel, S. Lyko, A. Simon, G. Kunze, E. Dopp, M. Wagner, J. Tuerk, (Anti-)estrogenic and (anti-)androgenic effects in wastewater during advanced treatment: comparison of three in vitro bioassays, Environmental Science and Pollution Research, (2016).
[73] F. Itzel, L. Gehrmann, H. Bielak, P. Ebersbach, A. Boergers, H. Herbst, C. Maus, A. Simon, E. Dopp, M. Hammers-Wirtz, T.C. Schmidt, J. Tuerk, Investigation of full-scale ozonation at a municipal wastewater treatment plant using a toxicity-based evaluation concept, Journal of toxicology and environmental health. Part A, (2017) 1-17.
[74] M.D. Jürgens, K.I.E. Holthaus, A.C. Johnson, J.J.L. Smith, M. Hetheridge, R.J. Williams, The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers, Environmental Toxicology and Chemistry, 21 (2002) 480-488.
[75] D.R. Griffith, M.C. Kido Soule, H. Matsufuji, T.I. Eglinton, E.B. Kujawinski, P.M. Gschwend, Measuring Free, Conjugated, and Halogenated Estrogens in Secondary Treated Wastewater Effluent, Environmental Science & Technology, 48 (2014) 2569-2578.
[76] E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M.-F. Grenier-Loustalot, Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, 2008.
[77] S. Zühlke, U. Duennbier, T. Heberer, Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, 2005.
[78] Q. Dumont, M. Barcenas, H. Dossmann, I. Bailloux, C. Buisson, N. Mechin, A. Molina, F. Lasne, N. S. Rannulu, R. B. Cole, Improved Steroids Detection and Evidence for Their Regiospecific Decompositions Using Anion Attachment Mass Spectrometry, 2016.
[79] U. D Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, 2005.

[80] D. Gode, M. M Martin, F. Steiner, C. Huber, D. Volmer, Rapid narrow band elution for on-line SPE using a novel solvent plug injection technique, 2012.
[81] I. Tecan SP, 2016. https://www.spewarecorporation.com/science-and-technology.aspx
[82] S. Guenu, M.-C. Hennion, Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides, 1996.
[83] C. Zwiener, F.H. Frimmel, LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology – a critical review, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378 (2004) 862-874.
[84] J.N.M.J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, in, Pearson Education Limited, Edinburgh, 2010.

8. Abkürzungen

Abkürzung/Symbol	Bedeutung
ACE	Automated Cartridge Exchange
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
A-YES	Arxula Adeninivorans Yeast Estrogen
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
EE2	17α-Ethinylestradiol
EDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
EEQ	17β-Estradiolequivalentkonzentration
EMS	Enhanced MS Scan
EPA	Environmental Protection Agency
EPI	Enhanced Product Ion Scan
ESI	Electrospray Ionisation
GC	Gaschromatographie
H_2O	Wasser
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPD	High Pressure Dispenser
HRMS	High Resolution MS
JRC	Joint Research Center
LC	Liquid Chromatography
LIT	Linear Ion Trap
LOD	Limit of Detection
MCT	Mercury Cadmium Telluride
MDL	Method Detection Limit
MetOH	Methanol
MIP	Molecular Imprinted Polymer
mM	Millimolar
MP	Magnetic Particle
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MWCNT	Multi Walled Carbonanotubes
NH_4F	Ammoniumfluorid
Q (1/2/3)	Quadrupol
RAM	Restricted Access Material
RP	Reversed Phase
S/N	Signal to Noise
SPE	Solid Phase Extraction
TFA	Trifluoressigsäure
UQN	Umweltqualitätsnorm
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strukturformeln der untersuchten Östrogene 6
Abbildung 2 Grafische Darstellung der Wirkungsweise von RAM-Materialien [22] 11
Abbildung 3 Schematische Darstellung der MIP-Synthese [28] 12
Abbildung 4 Anordnung der "column switching" Technik [33] 14
Abbildung 5 Gerätekonfiguration Prospekt 2-Systeme [34] 14
Abbildung 6 Scanmodi der Tandem-MS Systeme [37] 16
Abbildung 7 Grafische Darstellung des MS3-Grundprinzips [39] 16
Abbildung 8 Methodenüberblick der gängigsten Verfahren zur Bestimmung von Östrogenen in Wasserproben [55] 21
Abbildung 9 Schematische Darstellung des Messsystems bestehend aus a) ACE-Einheit b) Agilent 1100 Pumysystem c) HPD-Einheit d) PAL RTC e) QTRAP 6500+ 27
Abbildung 10 Konfiguration der Flusswege a) neue Konfiguration b) alte Konfiguration 28
Abbildung 11 Ventilstellung und Flusswege im LC-Modus 29
Abbildung 12 Ventilstellungen und Flusswege der einzelnen online-SPE Schritten a) Konditionierung & Äquilibrierung b) Probenaufgabe c) Elution 30
Abbildung 13 Überblick über die Ansatzpunkte der Methodenentwicklung 31
Abbildung 14 Regionale Probenahmestellen Duisburg 32
Abbildung 15 Darstellung der Speedisk-Halterung bei der Probenaufgabe 34
Abbildung 16 Manuelle Probenelution und Eindampfstation 34
Abbildung 17 Verwendete Massenübergänge bzw. Fragmentionen des MS^3-Experiments 40
Abbildung 18 Systemkonfiguration zur Bestimmung des Verweilvolumens 41
Abbildung 19 SPEDex 5000 Modul von Horizon 43
Abbildung 20 Zusammenfassung der Probenvorbereitung off- und online inklusive zugehöriger Parameter 45
Abbildung 21 Signalverlauf der empfindlichsten Massen-spuren in Abhängigkeit des NH_4OH-Anteils für ACN/H_2O 49
Abbildung 22 Signalverlauf der empfindlichsten Massen-spuren in Abhängigkeit des NH_4OH-Anteils für $MetOH/H_2O$ 49
Abbildung 23 Signalverlauf in Abhängigkeit der NH_4F-Konzentration exemplarisch an E1_1 50
Abbildung 24 Prozentuelle Signalsteigerung durch 0,01 mM Ammoniumfluoridkonzentration in der mobilen Phase 50
Abbildung 25 Resultierendes Chromatogramm eines 10 ng/mL Standards bei Verwendung der SunShell RP-AQUA 51
Abbildung 26 Resultierendes Chromatogramm eines 10 ng/mL Standards bei Verwendung des Chromoliths 51
Abbildung 27 Chromatogramm Rheinwasser Zorbax Eclipse XDB (1-E2, 2-EE2, 3-E1) 53
Abbildung 28 Chromatogramm Rheinwasser Zorbax SB (1-E2, 2-EE2, 3-E1) 53
Abbildung 29 Chromatogramm Rheinwasser Raptor Biphenyl 5 cm (1-E2, 2-EE2, 3-E1) 53
Abbildung 30 Chromatogramm Rheinwasser Raptor Biphenyl 10 cm (1-E2, 2-EE2, 3-E1) 53
Abbildung 31 Berechnete Wiederfindung für Rheinwasser in Abhängigkeit der untersuchten Trennsäule 54
Abbildung 32 Berechnete Wiederfindung für Kläranlagen-ablauf in Abhängigkeit der untersuchten Trennsäule 54

Abbildung 33 Aufgezeichneter Gradientenverlauf im online-SPE-Modus bei der Verweilvolumsbestimmung 55
Abbildung 34 Resultierende Signalintensität in Form der Peakfläche in Abhängigkeit der veränderten Parameter 57
Abbildung 35 Resultierendes Chromatogramm für E2 im MS^3-Modus (271→239, summierte Scananzahl 3) 58
Abbildung 36 Resultierendes Chromatogramm für E2 im MRM-Modus (271→145) 59
Abbildung 37 Wiederfindungsraten für E1, E2 und EE2 bei der Anwendung von MIP-Kartuschen (c = 5 ng/L) 60
Abbildung 38 Massenspuren E1_1 (blau), E2_2 (rot) und EE2_4 (grün) einer Blindwertprobe 61
Abbildung 39 Native Kläranlagenablauf-Messung ohne MIP Aufreinigung 61
Abbildung 40 Kläranlagenablauf-Chromatogramm nach der Aufreinigung mit MIP-Kartuschen 61
Abbildung 41 Vergleich der resultierenden Peakflächen der MIP-Versuchsreihe für E1 und E2 62
Abbildung 42 Vergleich der resultierenden Peakflächen der MIP-Versuchsreihe für EE2 62
Abbildung 43 Resultierende Wiederfindung der QC-Proben (5 ng/mL) für das SPEDex 5000 Horizon System 63
Abbildung 44 Chromatogramm einer QC-Probe mit Resign SH-Kartusche 66
Abbildung 45 Chromatogramm einer QC-Probe mit Resign GP-Kartusche 66
Abbildung 46 Chromatogramm einer QC-Probe mit C18-Kartusche 66
Abbildung 47 Chromatogramm eines verdünnten Kläranlagenablaufs mit C2-Kartusche 66
Abbildung 48 Berechnete Wiederfindung der QC-Proben (5 ng/mL) für CN- und C8-Kartuschen 67
Abbildung 49 Kläranlagenablauf Messung mit CN-Kartusche (1-E2, 2-EE2, 3-E1) 67
Abbildung 50 Kläranlagenablauf Messung mit C8-Kartusche (1-E2, 2-EE2, 3-E1) 67
Abbildung 51 Signalverlauf in Abhängigkeit des Acetonitril Anteils der Waschlösung 68
Abbildung 52 Berechnete Wiederfindung der QC-Proben (5 ng/mL) für unterschiedliche Waschlösungen 68
Abbildung 53 Resultierendes Chromatogramm der E1_2 Spur mit 5%iger Methanollösung 69
Abbildung 54 Resultierendes Chromatogramm der E1_2 Spur mit 5%iger Acetonitrillösung 69
Abbildung 55 Chromatogramm einer 30 pg/L EE2 dotierten Rheinprobe (EE2_4) 74
Abbildung 56 Relative Wiederfindung der Realproben über das Gesamtverfahren 74
Abbildung 57 Signalintensität in Realproben über das Gesamtverfahren ausgedrückt als absolute Wiederfindung 74
Abbildung 58 Flusswege: Konditionierung in der Pfropfenelution 90
Abbildung 59 Flusswege: Elution in der Pfropfenelution 90
Abbildung 60 Flusswege: Konditionierung Kartusche (l) bei Verwendung von seriellen Kartuschen .. 91
Abbildung 61 Flusswege: Konditionierung Kartusche (r) bei Verwendung von seriellen Kartuschen .. 91
Abbildung 62 Flussweg: Überführung bei Verwendung serieller Kartuschen 91
Abbildung 63 SPEDex 5000 Extraktionsschritte Teil 1 92
Abbildung 64 SPEDex 5000 Extraktionsschritte Teil 2 93
Abbildung 65 SPEDex 5000 Reinigungsschritte 93
Abbildung 66 Signal- bzw. Gradientverlauf bei der Verweilvolumsbestimmung im LC-Modus (1) 94
Abbildung 67 Signal- bzw. Gradientverlauf bei der Verweilvolumsbestimmung im LC-Modus (2) 94
Abbildung 68 Signal- bzw. Gradientverlauf bei der Verweilvolumsbestimmung im online SPE-Modus (2) 95
Abbildung 69 Charakterisierung: Kalibrationsfunktion E1 der zusamengeführte LC/online SPE Daten98
Abbildung 70 Charakterisierung: Kalibrationsfunktion E2 der zusamengeführte LC/online SPE Daten98

Abbildung 71 Charakterisierung: Kalibrationsfunktion EE2 der zusamengeführte LC/online SPE Daten 99
Abbildung 72 Charakterisierung: Chromatogramm E1_1 Nativbestimmung Kläranlagenablauf 101
Abbildung 73 Charakterisierung: Chromatogramm E1_1 Nativbestimmung Rhein 101
Abbildung 74 Charakterisierung: Chromatogramm E2_2 Nativbestimmung Kläranlagenablauf (rot interner Standard) 101
Abbildung 75 Charakterisierung: Chromatogramm E2_2 Nativbestimmung Rhein (rot interner Standard) 101
Abbildung 76 Charakterisierung: Chromatogramm EE2_4 Nativbestimmung Kläranlagenablauf 101
Abbildung 77 Charakterisierung: Chromatogramm EE2_4 Nativbestimmung Rhein 101

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Eingesetzte Software und deren Funktion 25
Tabelle 2 Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Stammlösungen 25
Tabelle 3 Auflistung der Verbrauchsmaterialien 26
Tabelle 4 Eingesetzter Gradient für die Additivversuchsreihe 35
Tabelle 5 Zusammenfassung der verwendeten Trennsäulen bei der Screeningversuchsreihe 37
Tabelle 6 LC-Bedingungen bei der Screeningversuchsreihe 37
Tabelle 7 Zusammenfassung der finalen LC-MS-Methodenparameter 38
Tabelle 8 Gradienten der finalen LC-MS-Methode (LC-Modus und online-SPE) 39
Tabelle 9 Zusammenfassung der aufgezeichneten MRM-Übergänge und zugehörigen Einstellungen in der finalen Methode 39
Tabelle 10 Gradienten der Verweilvolumen-Versuchsreihe 41
Tabelle 11 Resultierende mittlere Peakflächen der Versuchsreihe Laufmitteladditive 49
Tabelle 12 Zusammenfassung der Beurteilungskriterien und deren Erfüllung 51
Tabelle 13 Experimentell bestimmte Kenndaten der Trennsäulen 52
Tabelle 14 Berechnete Verweilzeiten und- volumina 55
Tabelle 15 Berechneter Organikanteil bei der Elution der Additivexperimente im Vergleich zur finalen Methode 56
Tabelle 16 Anfängliche Einstellung der MS-Quellparameter 56
Tabelle 17 Zusammenfassung der erzielten S/N-Verhältnisse der beobachteten Massenübergänge für E2 58
Tabelle 18 Zusammenfassung der erzielten S/N-Verhältnisse der beobachteten Massenübergänge für EE2 59
Tabelle 19 berechnete Analytkonzentrationen und bestimmte relative Wiederfindung 62
Tabelle 20 Berechnete Konzentrationen von E1, E2 und EE2 und zugehörige relative Wiederfindung63
Tabelle 21 Vergleich des Extraktionsablaufs der manuellen Aufbereitung und dem SPEDex 5000 64
Tabelle 22 S/N-Verhältnisse bei Verwendung unterschiedlicher Waschlösungen 68
Tabelle 23 Resultierende S/N-Verhältnisse für unterschiedliche Waschvolumina 69
Tabelle 24 Zusammenfassung der bestimmten Retentionszeiten des Waschvolumenexperiments ... 70
Tabelle 25 Kenndaten der zusammengeführten Kalibrationsfunktion 71
Tabelle 26 Berechnete Werte und Kenndaten des Einstichproben-t-Tests 71
Tabelle 27 Ermittelte Reproduzierbarkeit des Intra- und Interassays 72
Tabelle 28 Resultierende Verfahrensgrenzen im Standard 72
Tabelle 29 Native Konzentrationen und S/N-Verhältnisse in den untersuchten Realproben 73
Tabelle 30 Ermittelte Verfahrensgrenzen in Realproben 73
Tabelle 31 Retentions- und Totzeiten beim Säulenscreeningexperiment 94
Tabelle 32 MIP : Peakflächen von E1, E2 und EE2 und internen Standards inkl. Kalibrationsfunktion 95
Tabelle 33 SPEDex 5000: Peakflächen von E1, E2 und EE2 und internen Standards inkl. Kalibrationsfunktion 96
Tabelle 34 Kartuschenscreening: Peakkenndaten für E1 bei unterschiedlichen Kartuschen 96
Tabelle 35 Kartuschenscreening: Peakkenndaten für E2 bei unterschiedlichen Kartuschen 97
Tabelle 36 Kartuschenscreening: Peakkenndaten für EE2 bei unterschiedlichen Kartuschen 97
Tabelle 37 Kartuschenscreening: Analytsignal für CN und C8 Kartuschen bei verd. KA 97
Tabelle 38 Waschschrittoptimierung: mittlere Peakflächen der QC-Proben (5ng/mL) 98

Tabelle 39 Charakterisierung: Peakflächen E1 der Kalibrationsstandards..... 99
Tabelle 40 Charakterisierung: Peakflächen E2 der Kalibrationsstandards..... 99
Tabelle 41 Charakterisierung: Peakflächen EE2 der Kalibrationsstandards..... 100

11. Anhang

- **Flusswege der Pfropfenelution**

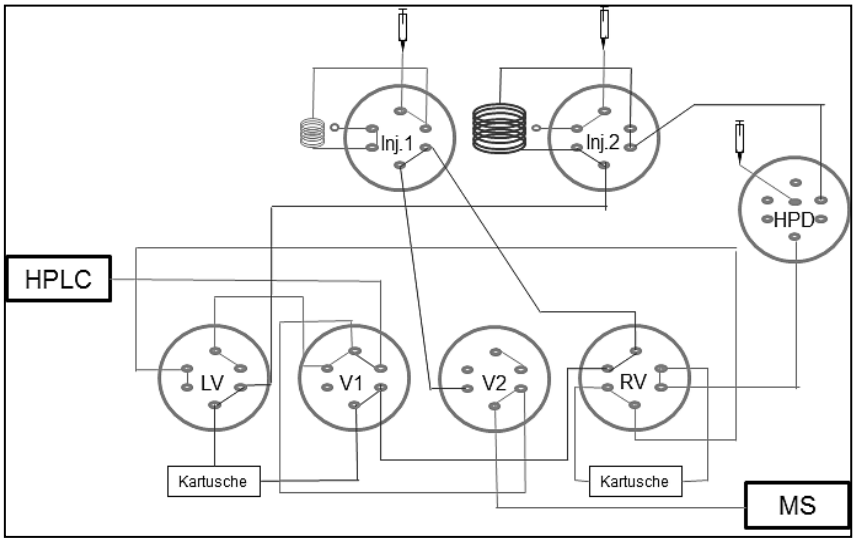

Abbildung 58 Flusswege: Konditionierung in der Pfropfenelution

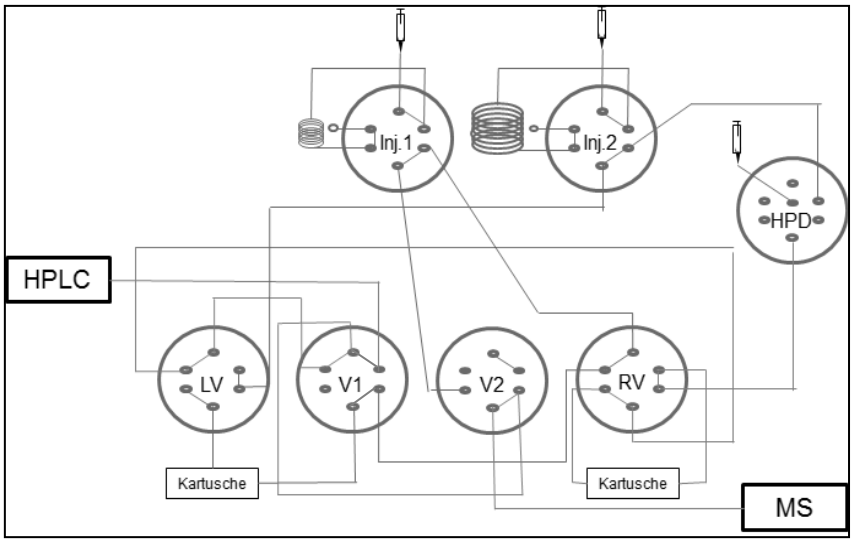

Abbildung 59 Flusswege: Elution in der Pfropfenelution

- **Flusswege bei der Nutzung von 2 seriellen Kartuschen**

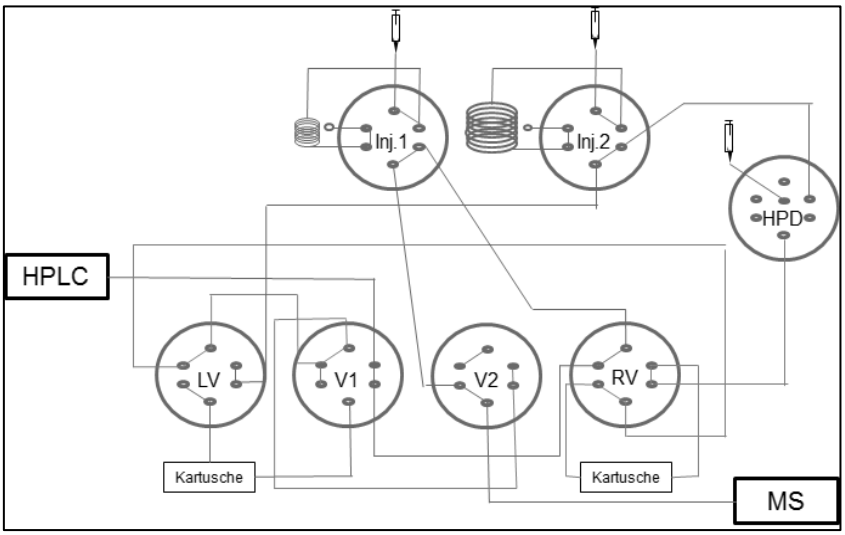

Abbildung 60 Flusswege: Konditionierung Kartusche (l) bei Verwendung von seriellen Kartuschen

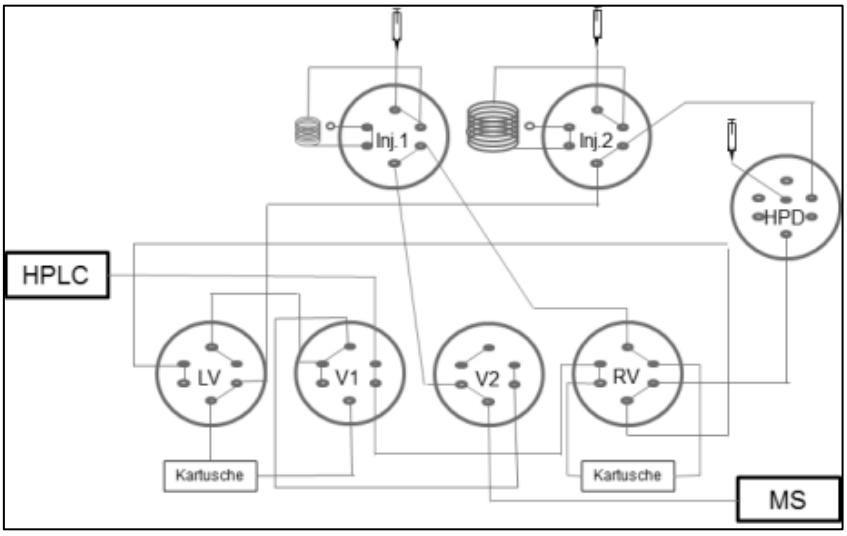

Abbildung 61 Flusswege: Konditionierung Kartusche (r) bei Verwendung von seriellen Kartuschen

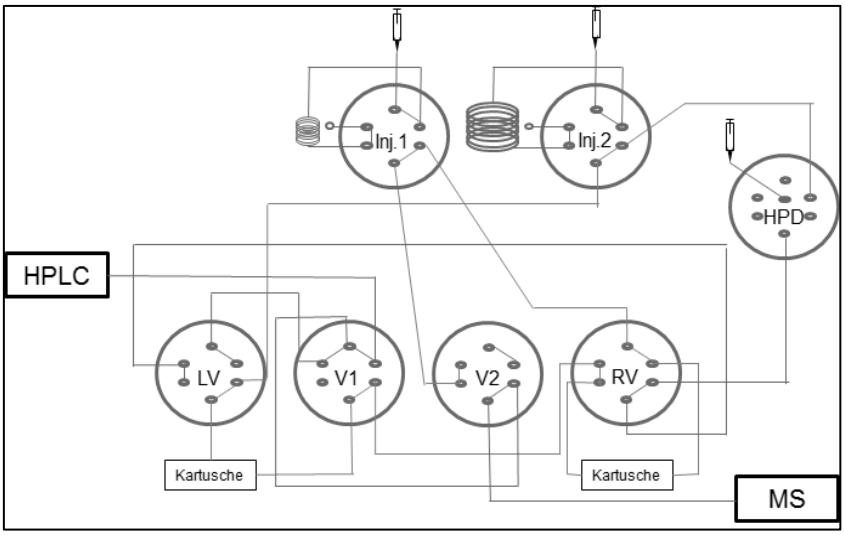

Abbildung 62 Flussweg: Überführung bei Verwendung serieller Kartuschen

- **SPEDex 5000 Reinigungs- und Extraktionsschritte**

Step	Step Description	Setpoint
1	**Condition SPE Disk**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	20 mL
	Vent Purge Time	60 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	3
	Saturation Time	3 sec
	Soak Time	60 sec
	Drain Time	15 sec
2	**Condition SPE Disk**	
	Dispense Solvent	Reagent Water
	Solvent Volume	20 mL
	Vent Purge Time	60 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	3
	Saturation Time	3 sec
	Soak Time	60 sec
	Drain Time	15 sec
3	**Load Sample**	
	Sample Flow Rate	2
	Done Loading Sample Delay	5 sec
4	**Air Dry Disk Timer**	
	Dry Time	300 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	6
	Nitrogen Blanket	Off
5	**Elute Sample Container**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	5 mL
	Vent Purge Time	60 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	2
	Nitrogen Blanket	Off
	Saturation Time	1 sec
	Soak Time	30 sec
	Elute Time	45 sec
6	**Elute Sample Container**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	5 mL
	Vent Purge Time	15 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	2

Abbildung 63 SPEDex 5000 Extraktionsschritte Teil 1

	Nitrogen Blanket	Off
	Saturation Time	1 sec
	Soak Time	30 sec
	Elute Time	45 sec
7	**Elute Sample Container**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	5 mL
	Vent Purge Time	15 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	2
	Nitrogen Blanket	Off
	Saturation Time	1 sec
	Soak Time	30 sec
	Elute Time	45 sec
8	**Elute Sample Container**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	5 mL
	Vent Purge Time	15 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	2
	Nitrogen Blanket	Off
	Saturation Time	1 sec
	Soak Time	30 sec
	Elute Time	45 sec
9	**Elute Sample Container**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	5 mL
	Vent Purge Time	15 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	6
	Nitrogen Blanket	Off
	Saturation Time	1 sec
	Soak Time	30 sec
	Elute Time	60 sec

Abbildung 64 SPEDex 5000 Extraktionsschritte Teil 2

Step	Step Description	Setpoint
1	**Clean System**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	10 mL
	Vent Purge Time	10 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	6
	Drain Time	10 sec
2	**Clean Elute Tubing Line**	
	Dispense Solvent	Methanol
	Solvent Volume	10 mL
	Vent Purge Time	10 sec
	Vacuum Pump Flow Rate	6
	Elute Time	10 sec

Abbildung 65 SPEDex 5000 Reinigungsschritte

- **Ermittelte Retentions- und Totzeiten in der Säulenscreening-Versuchsreihe**

Tabelle 31 Retentions- und Totzeiten beim Säulenscreeningexperiment

Trennsäule	Totzeit	Mittlere t_R E1	Mittlere t_R E2	Mittlere t_R EE2
Raptor Biphenyl 5 cm	0.511	7.494	6.443	7.071
Sunshell-RP-AQUA	0.502	7.325	6.755	7.391
Chromolith Fastgradient	0.522	6.674	6.053	6.707

- **Bestimmter Gradientenverlauf im Verweilzeitexperiment**

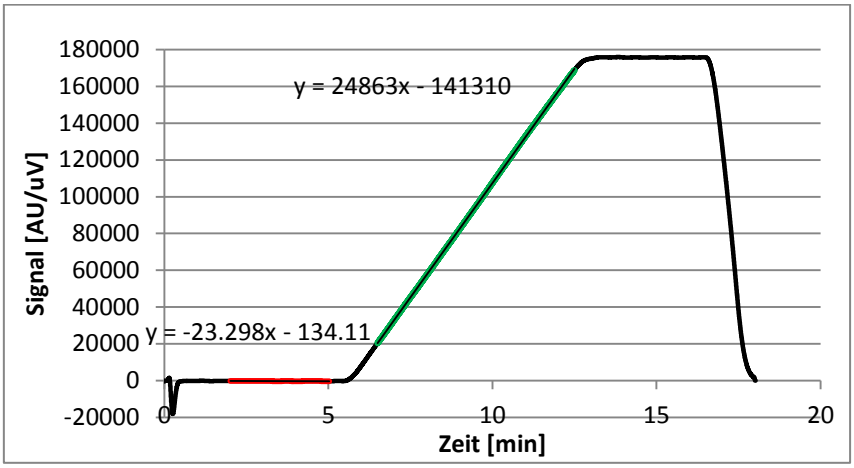

Abbildung 66 Signal- bzw. Gradientverlauf bei der Verweilvolumsbestimmung im LC-Modus (1)

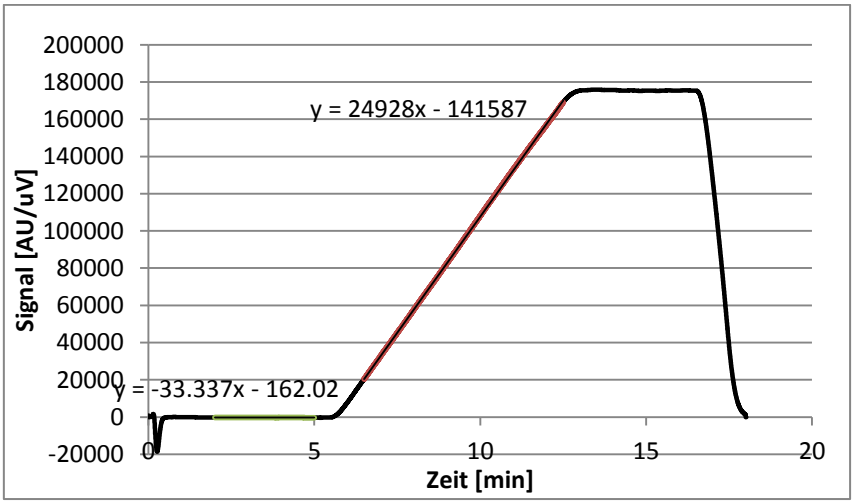

Abbildung 67 Signal- bzw. Gradientverlauf bei der Verweilvolumsbestimmung im LC-Modus (2)

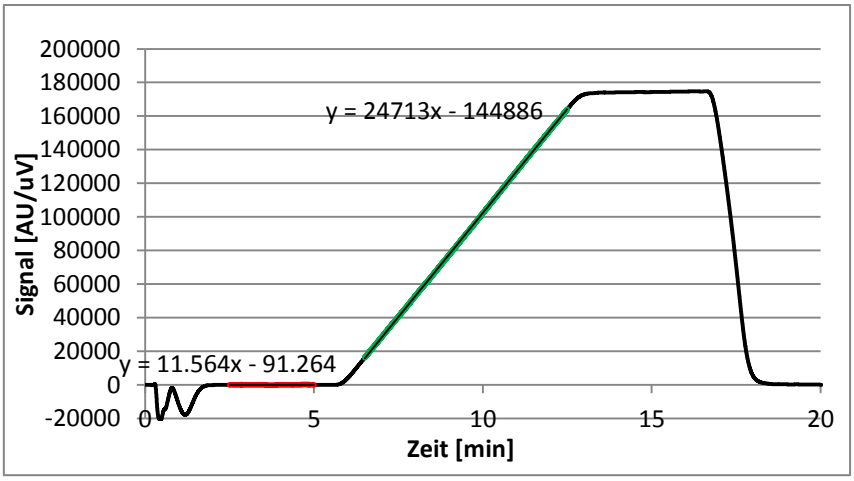

Abbildung 68 Signal- bzw. Gradientverlauf bei der Verweilvolumsbestimmung im online SPE-Modus (2)

- ## Versuchsreihe MIP-manuelle Probenvorbereitung

Tabelle 32 MIP : Peakflächen von E1, E2 und EE2 und internen Standards inkl. Kalibrationsfunktion

Peakflächen [cps]	QC	KA+MIP	KA+RC+MIP	KA
E1	7.15E+06	3.97E+06	3.78E+06	2.33E+06
E2	1.83E+06	7.50E+05	6.26E+05	4.19E+05
EE2	3.79E+05	1.73E+05	1.50E+05	9.15E+04
E1-d4	1.15E+06	5.90E+05	5.71E+05	4.15E+05
E2-d3	2.64E+05	1.20E+05	1.03E+05	7.25E+04
EE2-d4	2.40E+05	1.23E+05	1.07E+05	6.47E+04
Kalibrationsfunktion				
E1	y = 1,11 x + 0,0109 (R^2 0,9999)			
E2	y = 1,20 x + 0,00278 (R^2 0,9997)			
EE2	y = 0,306 x + 0,000474 (R^2 0,9996)			

- ## SPEDex 5000-Versuchsreihe

Tabelle 33 SPEDex 5000: Peakflächen von E1, E2 und EE2 und internen Standards inkl. Kalibrationsfunktion

Peakflächen [cps]	QC	Rhein	KA
E1	7.85E+06	3.25E+06	1.92E+06
E2	2.12E+06	6.00E+05	4.21E+05
EE2	4.51E+05	1.29E+05	6.99E+04
E1-d4	1.77E+06	7.15E+05	4.12E+05
E2-d3	4.43E+05	1.42E+05	6.20E+04
EE2-d4	3.74E+05	1.14E+05	5.87E+04
Kalibrationsfunktion			
E1	y = 0,91 x +0,00817 (R^2 0,9999)		
E2	y = 0,968 x -0,00603 (R^2 0,9998)		
EE2	y = 0,269 x -0,00406 (R^2 0,9999)		

- ## Signalintensitäten und -breiten des Kartuschenscreening-Experiments

Tabelle 34 Kartuschenscreening: Peakkenndaten für E1 bei unterschiedlichen Kartuschen

E1	Peakhöhe [counts]	Peakbreite [min]	Peakbreite (50% der Höhe) [min]	Peakfläche [cps]
CN	1,58E+06	6,76E-01	8,44E-02	9,85E+06
C2	6,36E+05	1,64	1,21E-01	7,77E+06
C8	1,38E+06	7,75E-01	1,14E-01	1,05E+07
C18	3,76E+05	2,66	3,27E-01	9,62E+06
Resin GP	3,20E+05	3,16	4,38E-01	1,06E+07
Resin SH	1,21E+05	3,80	1,54	1,08E+07

Tabelle 35 Kartuschenscreening: Peakkenndaten für E2 bei unterschiedlichen Kartuschen

E2	Peakhöhe [counts]	Peakbreite [min]	Peakbreite (50% der Höhe) [min]	Peakfläche [cps]
CN	4,18E+05	5,68E-01	7,42E-02	2.39E+06
C2	1,30E+05	1,46	1,35E-01	1.78E+06
C8	3,46E+05	7,21E-01	1,18E-01	2.70E+06
C18	8,69E+04	2,88	3,27E-01	2.32E+06
Resin GP	8,51E+04	2,05	4,02E-01	2.48E+06
Resin SH	2,83E+04	5,13	2,10	3.35E+06

Tabelle 36 Kartuschenscreening: Peakkenndaten für EE2 bei unterschiedlichen Kartuschen

EE2	Peakhöhe [counts]	Peakbreite [min]	Peakbreite (50% der Höhe) [min]	Peakfläche [cps]
CN	8,39E+04	6,62E-01	8,02E-02	5,35E+05
C2	2,81E+04	1,42	1,57E-01	3,98E+05
C8	7,18E+04	5,54E-01	1,24E-01	5,67E+05
C18	2,29E+04	2,92	3,36E-01	5,09E+05
Resin GP	2,10E+04	2,87	3,61E-01	5,43E+05
Resin SH	7,38E+03	3,99	1,75	5,86E+05

Tabelle 37 Kartuschenscreening: Analytsignal für CN und C8 Kartuschen bei verd. KA

Verd. KA Peakhöhe [counts]	CN	C8
E1	4.31E+05	3.25E+05
E2	7.00E+04	3.67E+04
EE2	1.43E+04	1.03E+04

- ## Rohdaten der Waschschrittoptimierung

Tabelle 38 Waschschrittoptimierung: mittlere Peakflächen der QC-Proben (5ng/mL)

Mittlere Peakflächen [cps]	H_2O	5% ACN	10% ACN
E1	1.33E+07	1.04E+07	7.56E+05
E2	3.09E+06	3.27E+06	4.80E+05
EE2	8.62E+05	9.14E+05	9.32E+05

- ## Rohdaten der Methodencharakterisierung

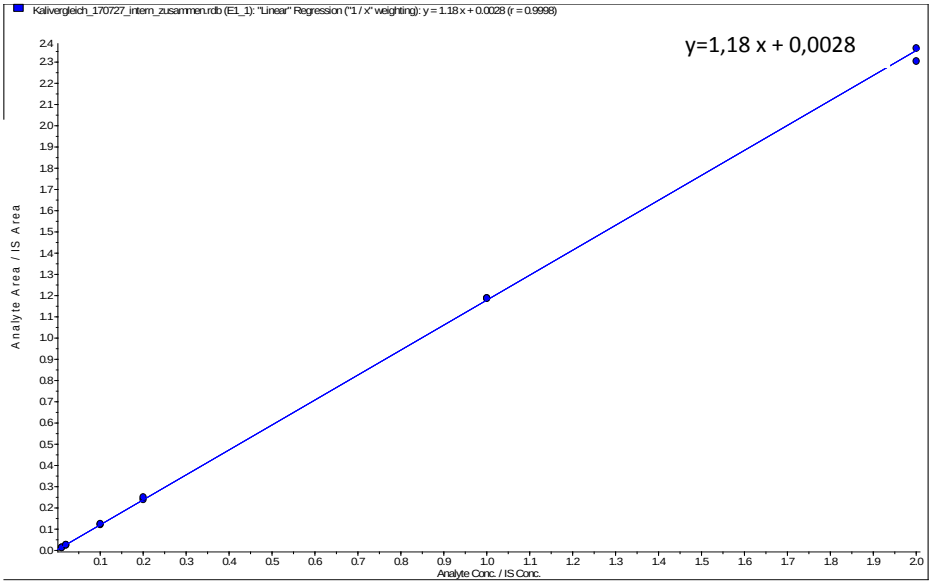

Abbildung 69 Charakterisierung: Kalibrationsfunktion E1 der zusamengeführte LC/online SPE Daten

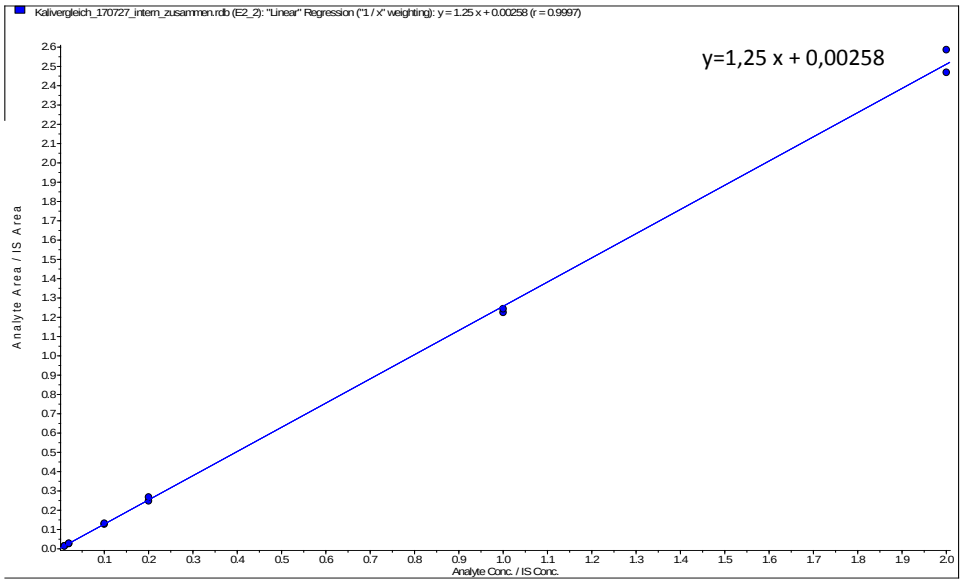

Abbildung 70 Charakterisierung: Kalibrationsfunktion E2 der zusamengeführte LC/online SPE Daten

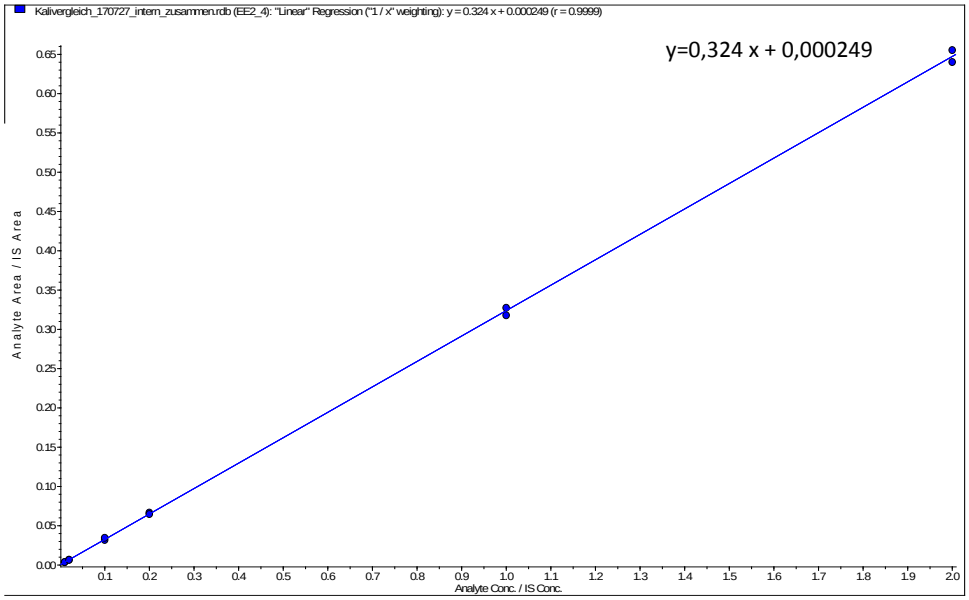

Abbildung 71 Charakterisierung: Kalibrationsfunktion EE2 der zusamengeführte LC/online SPE Daten

Tabelle 39 Charakterisierung: Peakflächen E1 der Kalibrationsstandards

LC-Modus			Online SPE		
Konz. E1 [ng/mL]	**Peakfläche [cps]**	**Peakfläche$_{interner\ Std}$ [cps]**	**Konz. E1 [ng/mL]**	**Peakfläche [cps]**	**Peakfläche$_{interner\ Std}$ [cps]**
0	1,32E+05	9,46E+06	0	1,37E+05	9,65E+06
0,05	2,49E+05	9,32E+06	0,05	2,59E+05	1,00E+07
0,1	1,14E+06	9,11E+06	0,1	1,26E+06	1,03E+07
0,5	2,13E+06	8,48E+06	0,5	2,54E+06	1,06E+07
1	9,86E+06	8,30E+06	1	1,21E+07	1,02E+07
5	1,84E+07	7,77E+06	5	2,36E+07	1,02E+07

Tabelle 40 Charakterisierung: Peakflächen E2 der Kalibrationsstandards

LC-Modus			Online SPE		
Konz. E2 [ng/mL]	**Peakfläche [cps]**	**Peakfläche$_{interner\ Std}$ [cps]**	**Konz. E2 [ng/mL]**	**Peakfläche [cps]**	**Peakfläche$_{interner\ Std}$ [cps]**
0	3,10E+04	2,11E+06	0	3,37E+04	2,25E+06
0,05	5,85E+04	2,08E+06	0,05	6,60E+04	2,37E+06
0,1	2,63E+05	1,99E+06	0,1	3,28E+05	2,40E+06
0,5	4,87E+05	1,82E+06	0,5	6,60E+05	2,57E+06
1	2,30E+06	1,85E+06	1	3,17E+06	2,51E+06
5	4,30E+06	1,66E+06	5	6,15E+06	2,44E+06

Tabelle 41 Charakterisierung: Peakflächen EE2 der Kalibrationsstandards

LC-Modus			Online SPE		
Konz. EE2 [ng/mL]	**Peakfläche [cps]**	**Peakfläche$_{interner\ Std}$ [cps]**	**Konz. EE2 [ng/mL]**	**Peakfläche [cps]**	**Peakfläche$_{interner\ Std}$ [cps]**
0	7,00E+03	1,95E+06	0	7,49E+03	2,19E+06
0,05	1,15E+04	1,92E+06	0,05	1,46E+04	2,19E+06
0,1	6,49E+04	1,88E+06	0,1	7,13E+04	2,25E+06
0,5	1,12E+05	1,73E+06	0,5	1,54E+05	2,32E+06
1	5,39E+05	1,70E+06	1	7,35E+05	2,25E+06
5	1,00E+06	1,53E+06	5	1,40E+06	2,19E+06

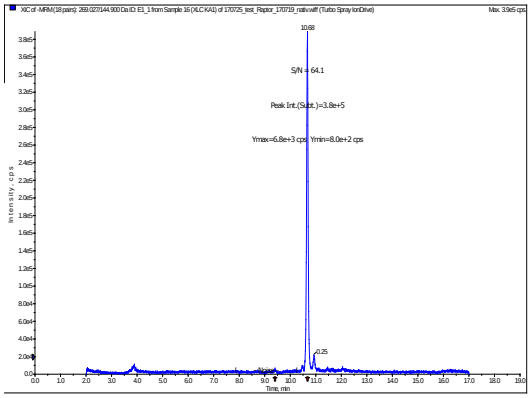

Abbildung 72 Charakterisierung: Chromatogramm E1_1 Nativbestimmung Kläranlagenablauf

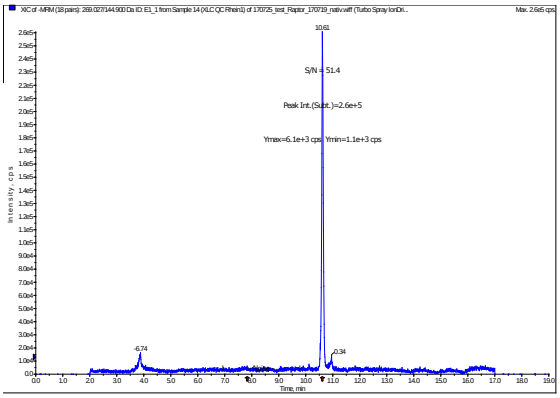

Abbildung 73 Charakterisierung: Chromatogramm E1_1 Nativbestimmung Rhein

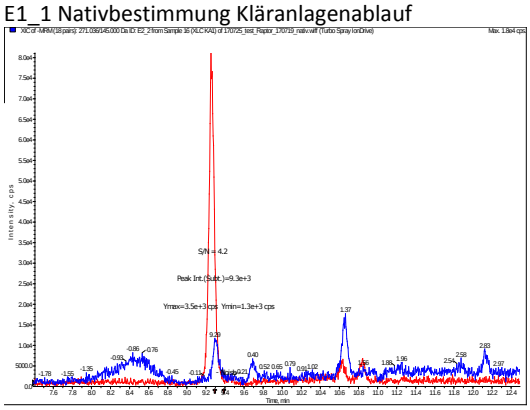

Abbildung 74 Charakterisierung: Chromatogramm E2_2 Nativbestimmung Kläranlagenablauf (rot interner Standard)

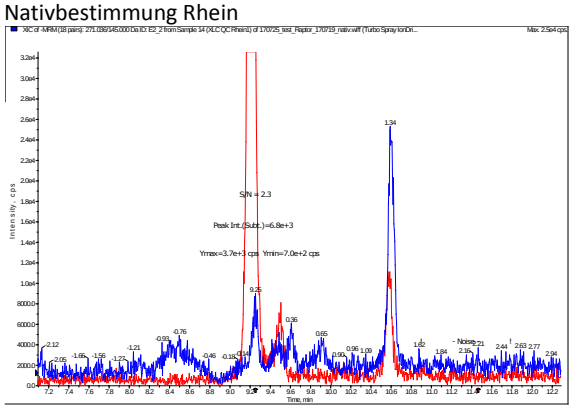

Abbildung 75 Charakterisierung: Chromatogramm E2_2 Nativbestimmung Rhein (rot interner Standard)

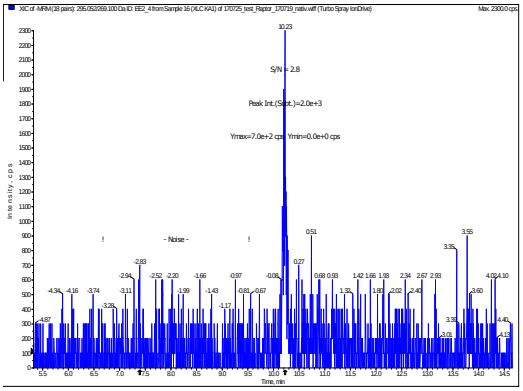

Abbildung 76 Charakterisierung: Chromatogramm EE2_4 Nativbestimmung Kläranlagenablauf

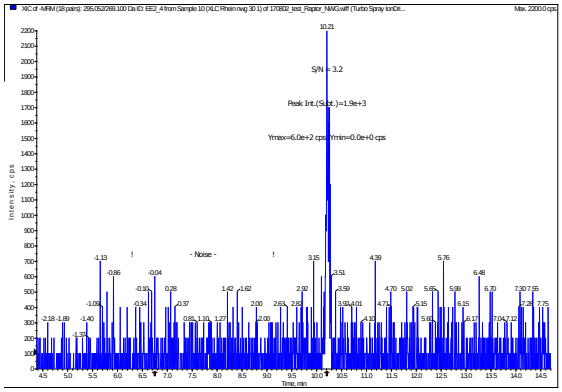

Abbildung 77 Charakterisierung: Chromatogramm EE2_4 Nativbestimmung Rhein