

# Online-Anreicherung – LC-MS/MS

Analytik von sauren und basischen Arzneimitteln in Wasser



In Deutschland sind für die Humanmedizin über 8.700 Arzneimittel-Präparate mit rund 3000 verschiedenen Wirkstoffen zugelassen. Die im Jahr 2006 verkaufte Menge an Humanarzneimitteln betrug 31.000 t [1], dazu kommen noch ca. 800 t Arzneimittel aus der Veterinärmedizin [2]. Teile dieser Medikamente gelangen auf unterschiedlichen Wegen in Grund- und Oberflächenwässer, in denen bereits über hundert verschiedene Wirkstoffe nachgewiesen werden konnten.

Unter den zwanzig am häufigsten verordneten Medikamenten befinden sich allein drei Präparate des Betablockers Metoprolol. Insgesamt wurden in Deutschland von den Wirkstoffen Atenolol, Sotalol und Metoprolol mehr als 170 t im Jahr 2006 verschrieben. [1]

Bei vielen Medikamenten verlässt nur ein geringer Teil des Wirkstoffs den Körper in unveränderter Form, der Rest wird in Form von Metaboliten ausgeschieden. Bei Metoprolol z.B. werden vom Kör-

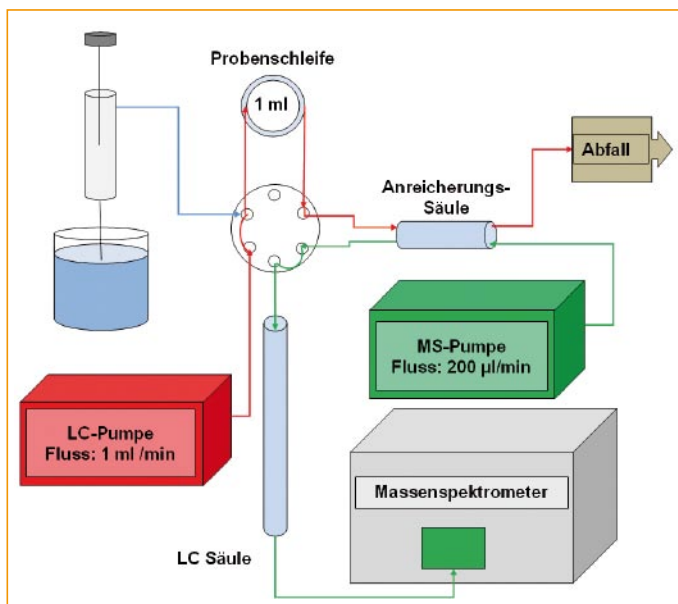


Abb. 1: Schematische Darstellung des Equan-Systems

In der hier beschriebenen Methode werden unter anderem Betablocker, Antiepileptika und Lipidsenker sowie ausgewählte Arzneimittel-Metaboliten untersucht. Betablocker zählen zu den verordnungstärksten Medikamentengruppen.

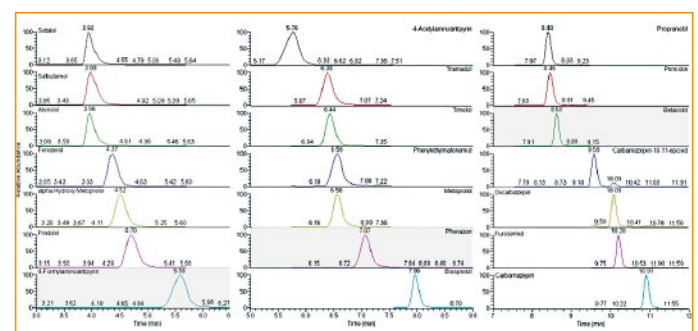


Abb. 2: Basische und neutrale Arzneimittel

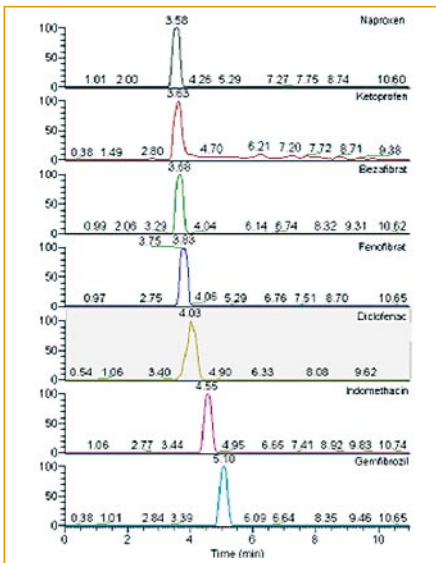


Abb. 3: Saure Arzneimittel

per etwa 5 % unverändert und ca. 95 % metabolisiert ausgeschieden, insbesondere als  $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol. Diese Stoffwechselprodukte sind in der Regel wesentlich polarer als ihre Ausgangssubstanzen und können durch ihre daraus resultierende bessere Wasserlöslichkeit bei der Trinkwassergewinnung zu einem Problem werden. Die Analytik von Arzneimitteln und deren Metaboliten in Gewässern für die Trinkwassergewinnung ist daher zunehmend von Bedeutung. Mit der Zahl der zu untersuchenden

Proben steigt der Bedarf für schnellere Analytik mit einem möglichst geringen Aufwand für Probenvorbereitung und Messung.

Bei der hier beschriebenen Methode werden für die Bestimmung der Arzneimittel 10 ml der zu untersuchenden Probe filtriert und mit internen Standards versetzt. Die Anreicherung und das Zudotieren von Pufferlösungen erfolgt vollautomatisch mit Hilfe eines LC PAL Autosamplers (CTC Analytics). Auf diese Weise reduziert sich der Aufwand für Probenvorbereitung bei gleichzeitiger Reinigung und Aufkonzentrierung der Proben auf ein Minimum.

### Probenvorbereitung

Für die Untersuchung einer Wasserprobe auf die in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen werden 10 ml Probenvolumen benötigt, die über einen Spritzenfilter (Porengröße 0,2  $\mu$ m) in ein Vial gegeben werden.

Anschließend werden als interne Standards Sotalol-d<sub>6</sub>, Carbamazepin-d<sub>10</sub> und Diclofenac-d<sub>4</sub> zugegeben. Weitere Probenvorbereitungsschritte sind nicht notwendig, die Anreicherung der Analyten erfolgt online über das in Abbildung 1 dargestellte EQuan System (Thermo Fisher Scientific).

Die Analytik erfolgt in zwei automatisierten Schritten: im ersten Analysen-Lauf werden die basischen und neutralen Arzneimittel gemessen. Der LC PAL gibt 1 ml der Probe in eine Proben-

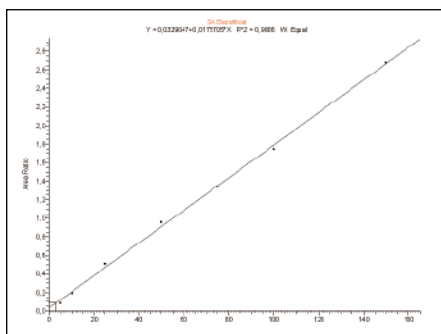


Abb. 4a: Bezafibrat

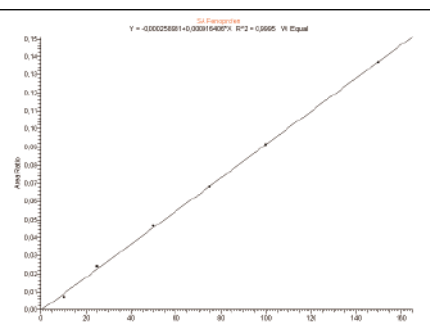


Abb. 4b: Fenopropfen

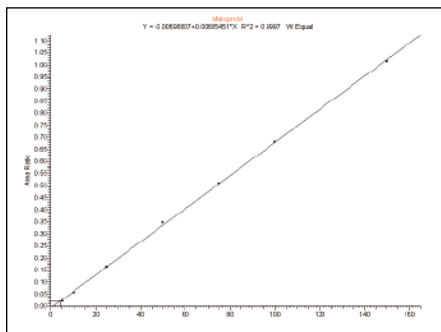


Abb. 4c: Metoprolol

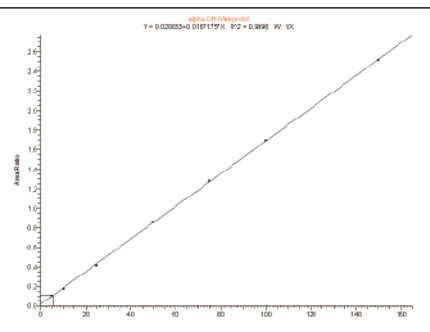


Abb. 4d:  $\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol

**Tabelle 1: Analyzierte Arzneimittel und Metaboliten**

Basische/ neutrale Arzneimittel und Metaboliten		Saure Arzneimittel
Atenolol	Propranolol	Naproxen
Betaxolol	Salbutamol	Ketoprofen
Bisoprolol	Sotalol	Indomethacin
Carbamazepin	Timolol	Gemfibrozil
Fenoterol	Tramadol	Bezafibrat
Furosemid	<b>Metaboliten</b>	Fenoprofen
Metoprolol	4-Acetylaminoantipyrin	Diclofenac
Oxcarbazepin	Carbamazepin-10,11-epoxid	
Phenazon	4-Formylaminoantipyrin	
Pindolol	$\alpha$ -Hydroxy-Metoprolol	
Primidon	Phenylethylmalonamid	

schleife, aus der sie mit dem Eluenten A (Wasser mit 1 % Methanol und 0,1 % Ameisensäure) auf eine C8-Anreicherungssäule überführt wird. Ist die Anreicherung abgeschlossen, schaltet ein 6-Wege-Ventil am LC PAL um und leitet nun statt des Eluenten A den LC-Gradi-

enten in entgegen gesetzter Richtung von der Anreicherungssäule auf die analytische Säule. Um diese Form der Anreicherung zu ermöglichen wurde das LC-System mit zwei Pumpen ausgestattet.

Ist die Messung der basischen Arzneimittel für alle Proben abge-

schlossen, wird im zweiten Schritt durch den LC PAL zu allen Proben und Standards Ammoniumacetat-Puffer für die analog erfolgende Anreicherung der sauren Arzneimittel zudosiert. Der verwendete Anreicherungs-Eluent B ist in diesem Fall eine wässrige Ammoniumacetat-Lösung (2 mmol/l).

### LC-MS/MS

Die Durchführung der LC-MS/MS Analytik erfolgte mit Geräten der Firma Thermo Fisher Scientific, einem Surveyor HPLC-System und einem TSQ Quantum Access Massenspektrometer.

Für die Messung der basischen und neutralen Arzneimittel wird eine Gradienten-Methode mit den Eluenten C (Wasser mit 1 % Methanol und 0,1 % Ameisensäure) und D (Methanol) verwendet, für die sauren Arzneimittel mit den Eluenten D (Methanol) und E (wässrige Ammoniumacetat-Lösung 2 mmol/l). Die analytische Säule ist eine C18-Phase mit den Dimensionen 50 mm x 2,0 mm x 4  $\mu$ m, die Flussrate beträgt 200  $\mu$ l/min.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgt mit Elektrospray für die basischen und neutralen Arzneimittel im positiven, für die sauren Arzneimittel im negativen Modus. Vorläufer-Ionen sind im Positiv-Mode die protonierten  $[M+H]^+$ , im Negativ-Mode die deprotonierten  $[M-H]^-$  Molekül-Ionen. Die Identifizierung der Substanzen erfolgt über mindestens zwei spezifische Massenübergänge in Verbindung mit der Retentionszeit.

Für die basischen Arzneimittel wurde die Messmethode aufgrund der Anzahl der Analyten in 4 Segmente unterteilt.

Die Kalibrierung der Methode erfolgt, angepasst an die erwartete Konzentration in den Proben, mit sieben Standardlösungen über einen Messbereich von z. B. 5 – 150 ng/l. Die Flächen der für die Quantifizierung der Substanzen ausgewählten Massenübergänge werden dafür auf die Flächen der

entsprechenden internen Standards bezogen. Eine Kalibrierung der Analysenmethoden erfolgt vor jeder Messreihe und wird durch die Messung von Kontrollproben überprüft.

In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Wasserprobe ist eine Kalibration über das Standard-Additions-Verfahren sinnvoll. Abbildung 2 zeigt Kalibriergeraden für einige der untersuchten Substanzen. Die Kalibrierungen sind in den betrachteten Konzentrationsbereichen linear, die Daten wurden nicht gewichtet.

Die mit dieser Methode erreichten Bestimmungsgrenzen liegen je nach Substanz und untersuchter Matrix zwischen 5 und 10 ng/l.

Die hier beschriebene Methode ist somit gut geeignet, die am häufigsten verschriebenen Arzneimittel mit geringen Aufwand und guter Empfindlichkeit in der Matrix Wasser zu analysieren.

### Literatur

- [1] Salomon, M.: Pharmazeutische Wirkstoffe und Umweltschutz. UWSF – Z Umwelt Chem Ökotox 19 (3) 155–167 (2007):
- [2] Aktuelle Studie: Verbrauchsmengen von Tierarzneimitteln, UBA-Symposium – Arzneimittel in der Umwelt, Berlin 29./30.09.2004

### ► KONTAKT

**Bibiana Preuß**  
Lebensmittelchemikerin  
Team Organische Analytik

**Elke Baumeister**  
Team Organische Analytik

**Dipl.-Ing. Frank Brille**  
**Dr. Heinz-Günther Preis**  
Bergisches Wasser- und Umweltlabor  
der BTV-GmbH  
Wuppertal  
preuss@bwlabor.com  
www.bwlabor.com