

Abschlußbericht zum Projektauftrag Nr. 41374

Berichtszeitraum: 1. August 2003– 30. Juni 2004

„Anwendung von Flüssig- und Festmembransystemen zur Stoffbilanzierung und Behandlung Pharmaka-belasteter Wässer“

Auftragnehmer:

- Prof. Dr. Manfred Grote
Fakultät für Naturwissenschaften
Department Chemie
- Anorganische und Analytische Chemie -
Universität Paderborn
Warburgerstraße 100
33098 Paderborn

Tel. 05251/60-2191, Fax -/ 60-3549

E-mail: magrote@zitmail.uni-paderborn.de

Projektpartner:

- Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie (ISAS)
(seit dem 15.4.04: ISAS – Institute For Analytical Sciences)

Bunsen-Kirchhoff- Straße 11
44139 Dortmund

Ansprechpartner: Dr. Jürgen Nolte

- Institut für Wasserforschung (IfW)
Zum Kellerbach 46
58239 Schwerte

Ansprechpartnerinnen: Dipl.-Ing. Ninette Zullei-Seibert
Dr. Birgit Kuhlmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Pharmakologie und biologische Abbaubarkeit der Leitstoffe

2. Untersuchungsmethodik

2.1 Synthese von Hauptmetaboliten

2.2 Analytik

3. Untersuchungen mit Membransystemen

3.1 Natürliche Festmembranen

3.2 Trägergestützte Flüssigmembransysteme (SLM)

3.2.1 Trägergestützte Flachmembranen

3.2.2 PP-Beutel als SLM-Module

3.3 Durchführung der SLM-Extraktionen

3.3.1 Anwendung der SLM-Beutelmodule - Analyse von Oberflächenwasser

4. Untersuchung von Abbau- und Umwandlungsprozessen der Leitstoffe und Metaboliten in Modellsystemen

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Batch-Versuche

4.1.2 Säulen-Versuche

4.1.3 Bestimmungsmethoden

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Batch-Versuche mit Wirkstoffen

4.2.2. Batchversuche mit Hauptmetaboliten

4.2.3 Säulenversuche

4.2.4 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

4.3 Diskussion

5. Zusammenfassung und Ausblick

Anhang (Literaturzusammenstellung)

1. Einleitung und Zielsetzung

In aquatischen und terrestrischen Umweltkompartimenten sind Rückstände von Arzneimitteln aus human- und tiermedizinischen Anwendungen sowie deren Metaboliten, wenn auch nur in Spurengehalten, nachweisbar. Diese können durch Direkteinleitungen, häufig diffuser Art, oder aus Kläranlagenabläufen über den Weg der Fließgewässer in das Grund- und letztlich auch Trinkwasser gelangen.

Die ökotoxikologischen Auswirkungen von Arzneiwirkstoffen und ihren Metaboliten auf aquatische Lebensgemeinschaften sind nicht für alle gewässerrelevanten Spezies hinreichend untersucht. Folglich müssen im Sinne des vorbeugenden Gewässerschutzes Einträge von Arzneistoffen minimiert werden. Auch das Umweltbundesamt und Interessenverbände wie der DVGW fordern eine weitergehende Vermeidung der Trinkwasserbelastung durch Pharmaka.

Obwohl Analyseverfahren für die wichtigsten Wirkstoffe vorliegen, besteht insbesondere für schwierigere Matrices noch erheblicher Standardisierungs- und Optimierungsbedarf. Praxis-taugliche Methoden zur Metabolitenbestimmung fehlen weitgehend. Nur mit geeigneten Nachweismethoden lassen sich jedoch belastbare Bewertungsgrundlagen schaffen, um etwaige Risiken rechtzeitig zu erkennen und abzuwehren.

Im Vorprojekt „*Vergleichende Untersuchungen zur Anreicherung von Arzneiwirkstoffen und ihrer Hauptmetaboliten aus Wässern mit Membranen*“ (Projektauftrag Nr. 31206, Abschlussbericht v. Dezember 2002) wurde in den ausgewählten und optimierten

- Fest-Membransystemen auf der Basis natürlicher Flachmembranen (Tierdärme) sowie
- Flüssigmembransystemen (Dreiphasen-Bulk-Membrane und trägergestützte Systeme),

ein erheblich erweitertes Anwendungspotenzial zur Abtrennung und Anreicherung von Pharmakastoffen sowohl in der Wasseraufbereitung als auch im Bereich der analytischen Probenvorbereitung entwickelt.

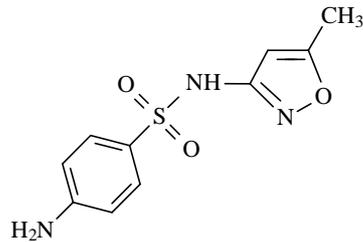
Deshalb war beabsichtigt, im Folgeprojekt die Anwendbarkeit der Verfahren auf Realwässer im Labormaßstab und in Feldversuchen für ausgewählte, als umweltrelevant eingestufte Arzneiwirkstoffe unterschiedlicher Indikationsklassen („Leitstoffe“) zu untersuchen, unter Einbeziehung von Hauptmetaboliten, soweit diese präparativ zugänglich waren. Relevante Matrixeinfüsse (Abwasser, Oberflächenwasser, Trinkwasseraufbereitung) sollten systematisch untersucht und ihre Auswirkungen bewertet werden.

Es war geplant, unter den Aspekten der Optimierung von Abwasserklärprozessen und des Grundwasserschutzes sowie der Sicherung der Trinkwassergewinnung einen Beitrag zur

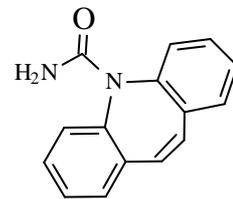
Gefährdungsabschätzung und Risikominimierung für diese Stoffe in der aquatischen Umwelt zu leisten.

1.1 Pharmakologie und biologische Abbaubarkeit der Leitstoffe

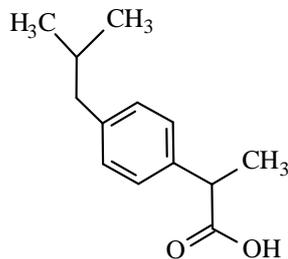
Als Leitstoffe (s. Abb. 1) wurden **Ibuprofen** und **Diclofenac** (Antiphlogistica), **Carbamazepin** (Antiepileptikum) und **Sulfamethoxazol** (Antibiotikum) ausgewählt, die im folgenden näher charakterisiert werden.



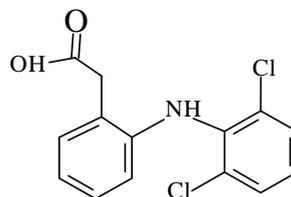
Sulfamethoxazol (SFM)



Carbamazepin (CBZ)



Ibuprofen (IBU)



Diclofenac (DCF)

Abb. 1: Strukturformeln und Symbole der eingesetzten Arzneiwirkstoffe („Leitstoffe“)

Ibuprofen

Ibuprofen (IBU), ein Analgetikum und Antipyretikum, wird zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, Schmerzen und Fieber eingesetzt. Die jährliche weltweite Produktion wird auf mehrere tausend Tonnen pro Jahr geschätzt (Buser et al. 1999). In Deutschland betrug der Verbrauch im Jahr 2001 etwa 336 Tonnen (Umweltbundesamt 2003). Von den relativ hohen therapeutischen Dosen von 200 mg/Tag bis 400 mg/Tag als Analgetikum und 400 mg/Tag

bis 2400 mg/Tag als Antirheumatikum werden ca. 70-80% insgesamt in freier und konjugierter Form sowie in Form von Metaboliten wieder vom Menschen ausgeschieden (Mutschler et al. 2001). Nur etwa 1 % des Ibuprofens wird unverändert mit dem Urin ausgeschieden (Martindale 1997). Das Wirkstoffmolekül, eine 2-Arylpropionsäure mit asymmetrischem Kohlenstoffatom, wird als Sonderform stereoselektiver Metabolisierung chiral invertiert, d.h. R-Ibuprofen wird im Organismus in das therapeutisch wirksamere S-(+)-Enantiomer umgewandelt (Hutt und Caldwell 1983, Mutschler 1992). Im menschlichen Körper bildet Ibuprofen Carboxyl-Derivate (Anteil: 43 %) und mit einem Anteil von 26% Hydroxy-Ibuprofen (Symbol: OH-IBU), die als Hauptmetabolite ausgeschieden werden (Stumpf et al. 1998).

Die Metabolite werden hauptsächlich im Abwasser und im Oberflächenwasser gefunden (Sacher et al. 1998, Daughton und Ternes 1999, BLAC 2003). Der Wirkstoff wurde im Oberflächenwasser und unter denitrifizierenden Bedingungen bei der Uferfiltration gut abgebaut, während in Grundwasser-Modellsystemen geringere Eliminierungsraten beobachtet wurden. Weitere zusammenfassende Angaben zur Metabolisierung des Ibuprofens und der anderen Leitstoffe sind der Tabelle 1a und 1b (s. Anhang) zu entnehmen.

Diclofenac

Diclofenac wird als Antirheumatikum eingesetzt und gehört zu den nicht-steroidalen Antiphlogistika. Die orale Tagesdosis liegt bei 50 mg bis 150 mg (Mutschler et al. 2001). In Deutschland wurden im Jahr 2001 etwa 81 Tonnen Diclofenac verbraucht (Umweltbundesamt 2003). Im menschlichen Organismus wird Diclofenac durch Hydroxylierung der aromatischen Ringe oder Konjugation mit Glucuronsäure an der Seitenkette schnell metabolisiert (Stierlin und Faigle 1979). Die Hauptmetaboliten sind 4'-Hydroxydiclofenac (40 %), 5-Hydroxydiclofenac (5-20 %), 3'-Hydroxy-diclofenac (5-20 %) und 4',5-Dihydroxydiclofenac (5-20 %). Ungefähr 15 % der Dosis werden als Konjugat ausgeschieden (Todt und Sorokin 1988).

Diclofenac ist vorwiegend im Abwasser und Oberflächenwasser nachweisbar (Sacher et al. 1998, Daughton und Ternes 1999, BLAC 2003), was mit der nachgewiesenen, nur sehr geringen biologische Abbaubarkeit im Oberflächenwasser korreliert (Buser et al. 1998). Ternes et al. (2002) führten Batchversuche mit natürlichem Oberflächenwasser, Grundwasser und verschiedenen Filtermaterialien nach dem MITI-Test (OECD 302 C) durch. In allen Versuchen wurde Diclofenac nach 28 Tagen nicht abgebaut.

Die Auswertung weiterer Literaturdaten (s. Tabelle 1a und 1b im Anhang) ergab, dass Abbauprobe in Modellsystemen mit natürlichem Oberflächenwasser, Grundwasser und ver-

schiedenen Filtermaterialien zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten, während Batch-Versuche nach OECD-Methoden übereinstimmend keinen Abbau des Diclofenacs ergaben.

Carbamazepin

Carbamazepin gehört zur Wirkstoffgruppe der Antiepileptika. Die Verbrauchsmenge betrug in Deutschland im Jahr 2001 etwa 83 Tonnen (Umweltbundesamt 2003). Die ärztlich verordnete Tagesdosis liegt im Bereich von 600 mg bis 2400 mg. Nur ungefähr 1 % bis 2 % des Wirkstoffs werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden (Mutschler et al. 2001). Der Hauptmetabolit im menschlichen Körper ist Carbamazepin-10,11-epoxid, welches weiter durch Hydrolyse zum pharmakologisch inaktiven *trans*-10,11-Dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepin (35 %) und 9-Hydroxymethyl-10-carbamylacridan umgewandelt wird (ARGE Elbe 2003).

In einer Parallelreaktion wird aus dem Carbamazepin durch eine phenolische Oxidation Hydroxycarbamazepin gebildet, das etwa zu 25 % im Urin enthalten ist und nach einer Phase-II-Reaktion hauptsächlich als O-Glucuronid ausgeschieden wird (Ternes 1998, Ternes 2000, ARGE Elbe 2003). Carbamazepin kann aber auch wegen der reaktiven Aminogruppe direkt in Carbamazepin-N-glucuronid umgewandelt werden. Im menschlichen Körper wird somit der größte Anteil des applizierten Wirkstoffes in zahlreiche, z.T. pharmakologisch aktive Metabolite umgewandelt, die schließlich über Exkretionen in das Abwasser gelangen.

Möhle et al. (1999a) führten Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit des Carbamazepins in einem geschlossenen Versuchsreaktor durch. Für Carbamazepin wurde eine Konzentrationsabnahme nur innerhalb der ersten 15 Minuten beobachtet, danach blieb die Konzentration konstant. Die Autoren folgerten daraus, dass die Eliminierung vor allem auf Adsorption zurückzuführen ist. Auch in Langsamsandfilter-Modellsystemen zeigte Carbamazepin nur eine geringe Eliminierbarkeit. Im aeroben oder anaeroben Grundwasser-Modellsystemen sowie in Batchversuchen wurde ebenfalls kein Abbau beobachtet. (weitere Angaben s. Tabelle 1b im Anhang). Bei der Uferfiltration wird das mit dem Oberflächenwasser eingetragene Carbamazepin unter denitrifizierenden und auch unter streng anaeroben, methanproduzierenden Randbedingungen dagegen zu 50 bis 80% vermindert.

Sulfamethoxazol

Von Sulfamethoxazol, einem antibiotisch wirksamen Sulfonamid, wurden im Jahr 1995 ca. 76 t ärztlich verordnet (Hirsch et al. 1999). Zur Behandlung von Harn- und Atemwegsinfek-

tionen wird eine tägliche Dosis von 1600 mg bis 2400 mg SFM mit 80 mg bis 160 mg Trimethoprim kombiniert. Die Resorption erfolgt sehr schnell (Mutschler et al. 2001) bei einem hohen Metabolisierungsgrad von ~ 80 %. Etwa 15 % des Sulfamethoxazols werden durch N1-Glukuronidierung metabolisiert. Der wichtigste Metabolit ist das N4-Acetylsulfamethoxazol, das zu 61 %, bezogen auf die applizierte Wirkstoffmenge, ausgeschieden wird (Grünenthal GmbH 1999). Die Acetylderivate der Sulfonamide haben keine bakteriostatischen Eigenschaften (Mutschler et al. 2001). Nach den bisherigen Studien zur biologische Abbaubarkeit in aquatischen Kompartimenten ist Sulfamethoxazol als äußerst persistent einzustufen. Die ergaben u.a. Untersuchungen von Al-Ahmad et al. (1999) und Kümmerer (2000) mit dem OECD Closed Bottle Test (CBT) (OECD 301 D) untersucht. Sulfamethoxazol konnte dabei auch nach 40 Tagen nicht biologisch abgebaut werden. Dementsprechend konnte der Wirkstoff im Oberflächenwasser (Rhein) und im Rhein-Uferfiltrat noch mit einer mittleren Konzentration von 0,040 µg/L bzw. 0,011 µg/L nachgewiesen werden (Färber et al. 2004). Streng anaerobe (methanbildende) Verhältnisse führen dagegen z.B. bei Uferfiltrationsstrecken zu einer vollständigen Konzentrationsverminderung.

Eine ergänzende Literaturzusammenstellung zur Abbaubarkeit der Leitstoffe in Batch- und Säulenversuchen, bei der Uferfiltration, unter dem Einfluss von UV-Strahlung und Ozon sowie in Kläranlagen findet sich im **Anhang** dieses Berichtes.

Tabelle 1a: Pharmakologie und Abbaubarkeit der Leitstoffe (Tab. 1b s. Anhang)

	Diclofenac	Ibuprofen	Carbamazepin	Sulfamethoxazol
Chemische Bezeichnung	2-(2,6-Dichloranilin-5)-phenyl-essigsäure	(R,19)-2-(4-Isobutylphenyl)-propion-säure	5H-Dibenzo[b,f]azepin-5-carboxamid	4-Amino-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)-benzolsulfonamid
Indikationsgruppe	Analgetikum Antirheumatikum	Analgetikum Antirheumatikum	Antiepileptikum	Antibiotikum (Sulfonamid)
Verbrauchsmenge (t/Jahr)	81 ¹⁾	336 ¹⁾	83 ¹⁾	76 ²⁷⁾
Orale Tagesdosis (mg/Tag)	50-150 ²⁾	200-2400 ²⁾	600-2400 ²⁾	1600-2400 ²⁾
Anteil (%) der Ausscheidung des Wirkstoffes	15 ³⁾ (Konjugat) 0,2-18 ³⁷⁾	1 ⁶⁾ 11-15 ³⁷⁾	1-2 ²⁾ 1,4-2,2 (renal) ³⁷⁾ 10-15 (faecal) ³⁷⁾	15-20 (renal) ^{15), 37)}
Metabolite im menschlichen Körper (% Ausscheidung)	4'-Hydroxy-diclofenac (40 %) ^{3), 37)} 5'-Hydroxy-diclofenac (5-20 %) ³⁾ (6-14 % renal) ³⁷⁾ 3'-Hydroxy-diclofenac (5-20 %) ³⁾ (6-14 % renal) ³⁷⁾ 4',5-Dihydroxy-diclofenac (5-20 %) ³⁾ (6-14 % renal) ³⁷⁾	Carboxy-Ibuprofen (43 %) ⁷⁾ (16 % renal) ³⁷⁾ Carboxy-Ibuprofen (Konjugat) (19 % renal) ³⁷⁾ Hydroxy-Ibuprofen (26 %) ⁷⁾ (9 %) ³⁷⁾ Hydroxy-Ibuprofen (Konjugat) (17 % renal) ³⁷⁾	Carbamazepin-10,11-epoxid (0,1-2 % renal) ³⁷⁾ (Hauptmetabolit) Trans-10,11-Dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepin (35 %) ^{11), 12)} (25 % renal) ³⁷⁾ 9-Hydroxymethyl-10-carbamyl-acridan (3,6 % renal) ³⁷⁾ Hydroxycarbamazepin (als Glucuronide) (25 %) ^{11), 12)} (18 % renal) ³⁷⁾ Carbamazepin-N-glucuronid (11 % renal) ³⁷⁾	N4-Acetyl-Sulfamethoxazol (61 % renal) ^{15), 37)} N1-Gucuronid (15 % renal) ³⁷⁾

1) Umweltbundesamt (2003)

2) Mutschler et al. (2001)

3) Todt et al. (1988)

6) Martindale (1997)

7) Stumpf et al. (1998)

11) ARGE Elbe (2003)

12) Ternes (1998)

15) Grüenthal GmbH (1999)

37) Schrey et al. (1999)

(Vollständige Zitierung s. Anhang)

2. Untersuchungsmethodik

Die Studien zum Transportverhalten in Fest- und Flüssigmembransystemen sowie zum Abbauverhalten in Batch- und Säulenversuchen wurden mit den als Leitstoffen selektierten Arzneiwirkstoffen Diclofenac (DCF), Ibuprofen (IBU), Carbamazepin (CBZ) und Sulfamethoxazol (SFM) durchgeführt:

Zusätzlich wurde auch das Abbauverhalten der folgenden Hauptmetaboliten unter Batchbedingungen untersucht, um eine Abschätzung bisheriger Bilanzierungsfehler zu ermöglichen:

- **N-4-Acetyl-sulfamethoxazol** (Ac-SFM)
- **Sulfamethoxazol-N1-glucuronid** Glucu-SFM)
- **4-Hydroxy-ibuprofen** (OH-IBU)
- **10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin** (Diol-CBZ).

Diese Hauptmetaboliten sind an der *Universität Paderborn* synthetisiert worden (Kap. 2.1). Dort wurden auch Untersuchungen mit Flüssigmembransystemen durchgeführt (Kap. 3.2).

Das *Institute For Analytical Sciences* (ISAS) in Dortmund führte die Studien zu den „natürlichen“ biologischen Flachmembranen in Dialysekammersystemen (Kap. 3.1) sowie Batch-Abbauversuche mit den Metaboliten durch (Kap. 4.2.2). Am ISAS wurden ebenfalls Techniken im Labormaßstab auf ihre Anwendbarkeit zur Wasserbehandlung getestet.

Das *Institut für Wasserforschung* (IfW) in Schwerte untersuchte schwerpunktmäßig in Batch- und Säulenversuchen unter Einsatz natürlicher Filtermaterialien das Abbauverhalten der Leitstoffe (Kap. 4).

Alle drei Projektpartner entwickelten in enger Abstimmung Analysenmethoden auf der Basis von HPLC/UV, LC/MS und GC/MS zur Bestimmung der Ausgangssubstanzen und ihrer Metaboliten, oder wandten geeignete Standardmethoden an.

2. 1 Synthese von Hauptmetaboliten

Die kommerziell nicht erhältlichen Verbindungen waren z.T. in zeitaufwendigen, vielstufigen, stereochemisch anspruchsvollen Synthesen zu präparieren:

Anschließend wurde ohne weitere Aufreinigung die Acetylierung der Hydroxid-Gruppen (Abb. 3) des Zuckers mit Acetanhydrid, Dimethylaminopyridin in abs. Pyridin durchgeführt (ca. 60 % Ausbeute). Im abschließenden Schritt erfolgte die Bromierung des anomeren Zentrums mit Acetylbromid in abs. Chloroform (Ausbeute 98 %).

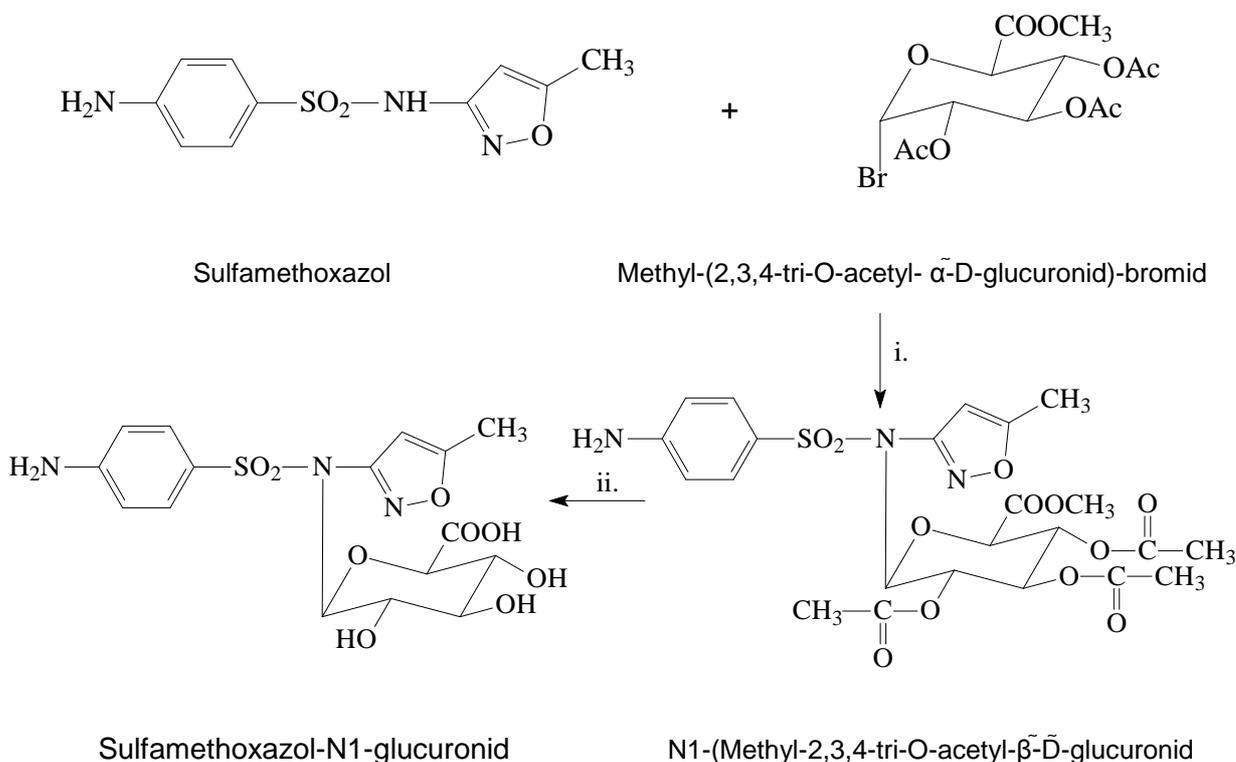


Abb. 4: Kopplung von Sulfamethoxazol mit dem Bromzucker. i) Zweiphasensystem: Chloroform / Natronlauge, Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, 50 °C; ii.) Natriummethanolat, Methanol, Kohlenstoffdioxid, Raumtemperatur

Der geschützte Bromzucker wurde an SFM in einem Zweiphasensystem mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Phasentransferkatalysator gekoppelt (Ultraschallbad, 50°C; Ausbeute ~ 80 % d.Th.). Die Entschützung des Zuckers mit Natriummethanolat in abs. Methanol und die anschließende Neutralisation des Reaktionsansatzes mit Kohlenstoffdioxid (Abb. 4) lieferte den gewünschten Metaboliten Glucu-SFM in hohen Ausbeuten (ca. 80 % d.Th.).

Leider ließ sich dieser erfolgreiche Reaktionsweg nicht auf die Kopplung des Bromzucker- mit CBZ zum **Carbamazepin-N-glucuronid** übertragen.

4-Hydroxy-Ibuprofen (OH-IBU)

Die ersten 5 Zwischenprodukte wurden in einem Testansatz unter Verwendung von 50 mg Ibuprofen erhalten.

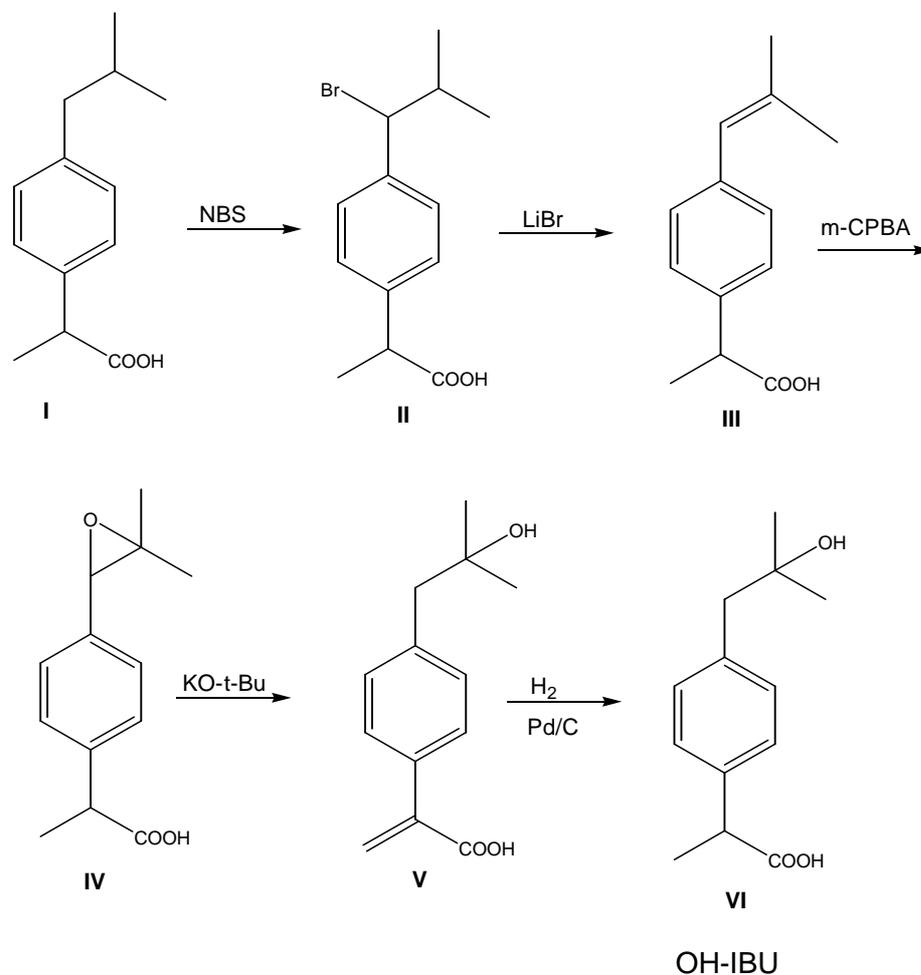


Abb. 5 Synthesestufen zur Darstellung des 4-Hydroxy-Ibuprofens (Racemat)

Nachfolgendes *Scaling-up* im Gramm-Maßstab ermöglichte schließlich die Hydrierung der aufgereinigten V. Stufe mit Pd/Aktivkohle (Abb. 5), so dass auch die Synthese des 4-Hydroxy-Ibuprofens (VI) erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Das Produkt liegt als Racemat vor. Auf eine weitere präparative Trennung der Enantiomeren wurde verzichtet.

10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin (Diol-CBZ)*(cis-10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-5H-dibenz[b, f]azepin-5-carboxamid)*

Die zunächst erprobten vielstufigen Methoden nach Patentvorschriften der Pharmaindustrie versagten. Schließlich gelang die Oxidation des CBZ zum Diol nach der klassischen einstufigen Oxidation mit Kaliumpermanganat / Magnesiumsulfat in Methanol/Wasser unter Kühlung ($< 5^\circ \text{C}$). Die säulenchromatographische Aufarbeitung des Rohproduktes ergab ca. 20% des Diol-CBZ (Abb. 6). Ein Teil des nicht umgesetzten Eduktes wurde dabei zurückgewonnen, das weiteren Umsetzungen zur Verfügung steht.

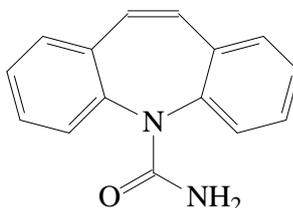


Abb. 6: Struktur des 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin

Die Synthese des **4-Hydroxydiclofenac** (Abb. 7) erwies sich als besonders aufwendig und schwierig.

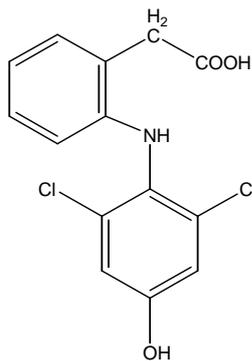


Abb. 7: Struktur des 4-Hydroxydiclofenac

Zwar wurde der ursprünglich 12-stufige Syntheseweg nach einer alternativen Route auf 7 Stufen verkürzt, allerdings ließ sich das gewünschte Produkt im Reaktionsgemisch nur in Spuren massenspektroskopisch nachweisen.

Die Strukturen der isolierten Metabolite Ac-SFM, Glucu-SFM, Diol-CBZ und OH-IBU wurden durch ^{13}C -, ^1H -NMR (Vergleich mit berechneten Kernresonanzdaten) sowie IR, EI-MS und LC-ESI-MS-Messungen und Literaturdaten bestätigt.

Nach erfolgter Anpassung der für die Wirkstoffanalytik entwickelten HPLC-UV und LC-MS-Methoden (s. Kap. 4.2..2) auf die Metabolitenbestimmung werden in der Schlussphase des Projektes mit den synthetisierten Produkten Abbaueversuche im Batch-Modus durchgeführt.

2.2 Analytik

Zum Nachweis der Analyte nach Trennung bzw. Anreicherung in Fest- und Flüssigmembransystemen sowie bei den Batch- und Säulenversuchsansätzen am IfW reicht das Nachweisvermögen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion aus. Zur Absicherung der Ergebnisse und zur Aufklärung analytischer Detailfragen bei Einsatz der Realwasserproben sowie zum Erhalt strukturanalytischer Informationen (Molekulargewichte, charakteristische Fragmente) über mögliche Metaboliten, wurden Analysemethoden für die (Mikro-) HPLC/Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) entwickelt bzw. weiterentwickelt und eingesetzt.

Die chemisch-physikalischen Strukturmerkmale der Analyte und der Umstand, dass außer den entwickelten Anreicherungstechniken mit Flüssigmembranen oder SPE keine weiteren Probenvorbereitungsschritte angewandt werden sollen, sprechen für einen bevorzugten Einsatz der Liquid-Chromatographie als Trenntechnik, die in Kombination mit der ESI-Massenspektrometrie sicher eine leistungsstarke Methode ist. Bei pH-Wert-Änderungen der Probe kann es allerdings, besonders bei Ibuprofen und Diclofenac, zu Retentionszeitverschiebungen kommen und dadurch eine sichere Zuordnung mit LC/MSⁿ deutlich erschwert werden.

Nachteilig ist diese Methode auch bei den Versuchen, Metabolite zu identifizieren, obwohl man zwar einen wichtigen Hinweis auf das wahrscheinliche Molekulargewicht erhält, dafür aber - im Vergleich zur GC/MS-Technik mit Elektronenstoß-Ionisation - nur wenige spezifische Fragmentationen zur Strukturaufklärung. GC/MS benötigt zwar einen zusätzlichen Probenvorbereitungsschritt in Form der Derivatisierung, den man aber wegen der Aussagekraft der Massenspektren und der noch größeren Nachweisstärke gerne in Kauf nimmt. Deshalb sind in Ergänzung zu den Methodenentwicklungen mit LC/MS in Dortmund und Paderborn

die Arbeiten zur Ermittlung optimaler - und damit relativ universeller - Derivatisierungsverfahren und Verfahrenskombinationen verstärkt durchgeführt und abgeschlossen worden. Zum Beispiel werden die Analyte mittels Diazomethan in Methyl-Derivate überführt; allerdings nicht Carbamazepin, das aber auch underivatisiert aus der Trennsäule eluiert und als scharfes Signal problemlos bestimmt werden kann.

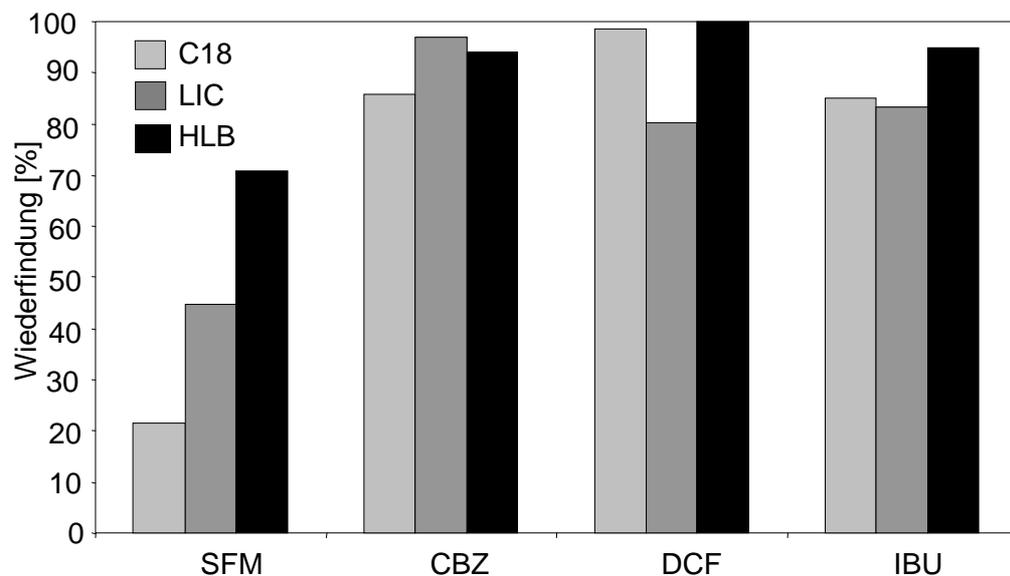


Abb. 8: Wiederfindungen der Wirkstoffe nach Anreicherung an SPE-Materialien (C₁₈, LiChrolut EN, OASIS-HLB)

Bei dem Anreicherungsmaterial wurde nach eingehenden Tests das von der Fa. Waters vertriebene OASIS-HLB Material bevorzugt, da es letztlich etwas bessere Wiederfindungsraten für die Analyte, besonders für Sufamethoxazol, ergab als LiChrolut (Abb. 8).

Begleitend zu den Säulen- und Batchversuchen wurden am IfW weitere Parameter, wie z.B. pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoff, Temperatur, DOC und Koloniezahl bestimmt, um die chemischen und mikrobiologischen Randbedingungen zu charakterisieren (s. Kap. 4.1.3).

3. Untersuchungen mit Membransystemen

3.1. Natürliche Festmembranen

Einfluss huminstoffartiger Verbindungen (Tangentialfluss-Ultrafiltration)

Die vorangegangenen Versuche des Vorprojektes hatten ergeben, dass das Migrationsverhalten der Pharmaka bei den Naturmembranen (Goldschlägerhäutchen) durch Humin-/Fulvinsäuren und huminstoffartige Verbindungen (HUS) sehr wohl beeinflusst werden kann. Dabei war auffällig, dass - im Gegensatz zu einigen technischen Membranen – bei Zugabe von HUS die Permeationskinetiken für alle Analyte stets einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Diese sind jedoch vom HUS-Typs abhängig. Neben den Kammerversuchen waren die Membranen auch unter Tangentialfluss-Ultrafiltrationsbedingungen (TF-UF) eingesetzt worden.

Abb. 9 verdeutlicht den Einfluss der Huminstoff-Konzentration auf das Permeationsverhalten. Die Huminstoffe, dotiert bis zu ca. 150 mg/L, stammen aus dem Venner Moor. Diese Maximalkonzentration an HUS erscheint relativ hoch, entspricht aber der natürlicher Braunwässer. Besonders bei den Wirkstoffen mit freier Carbonsäuregruppe (IBU, DCF) wird ein Einfluss durch Wechselwirkung mit dem Huminstoff wahrscheinlich.

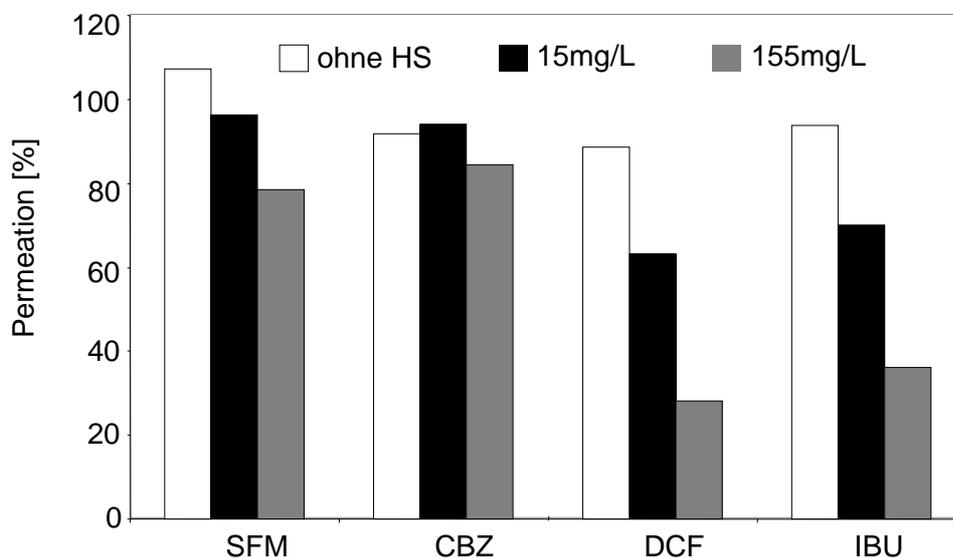


Abb. 9: Einfluss der HUS-Konzentration auf die Permeation der einzelnen Analyte TF-UF; Goldschlägerhäutchen (Pharmaka: 1 mg/L ; HUS, Venner Moor: 15 und 150 mg/L)

Des Weiteren wurden die natürlichen mit technischen Membranen verglichen. Aus Abb. 10 wird deutlich, dass - im Gegensatz zum Rinderdarm - sowohl die regenerierte Cellulose-Membran als auch die Polyethylensulfon-Membrane doch erhebliche Wechselwirkungen mit den Analyten eingehen wodurch bis zu 80 % zurückgehalten werden können.

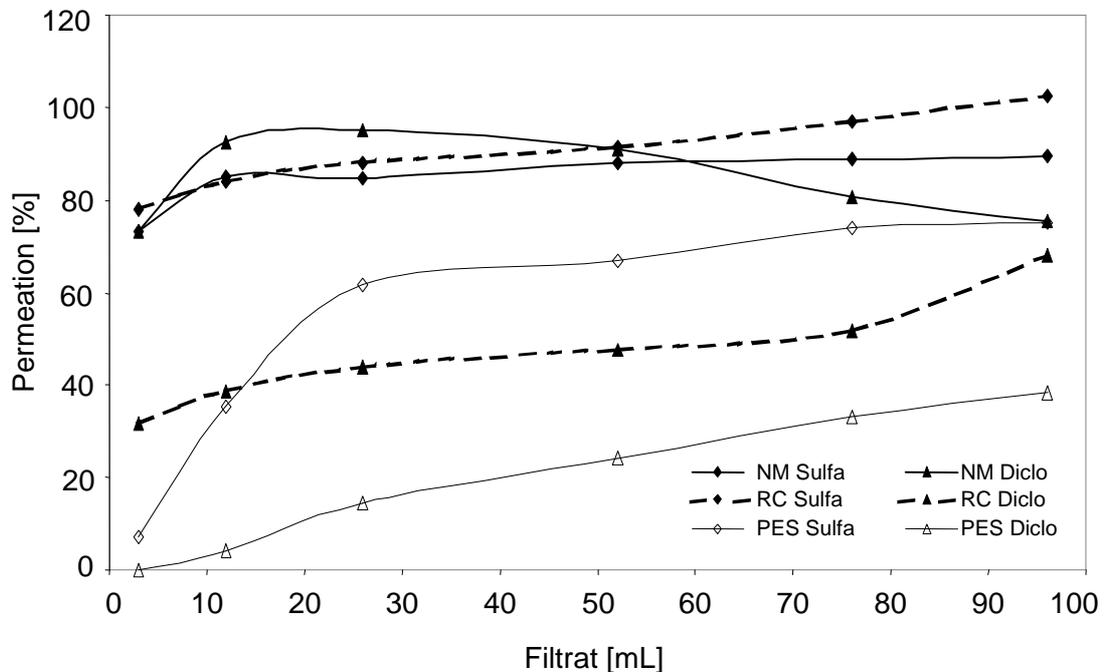


Abb. 10: Permeationsverlauf von Sulfamethoxazol (\diamond) und Diclofenac (\blacktriangle) an verschiedenen Membranen: TF-UF; Goldschlägerhäutchen (NM); regenerierte Cellulose (RC); Polyethylensulfon (PES); (Pharmaka : 1 mg/L)

Die unterschiedlichen Einflüsse lassen sich hierbei besonders gut an Sulfamethoxazol und Diclofenac erkennen, die bei der Naturmembrane keinen Rückhalteeffekt aufweisen. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt aber am PES-Material, wo für beide Analyte eine deutliche Konzentrationsabnahme zu beobachten ist, während bei der Cellulosemembran nur das Diclofenac retardiert wird.

Realwässer im Dialysekammer-System

Im Verlauf der Studie war der Einfluss verschiedener Wasserinhaltsstoffe auf die Permeationskinetik der einzelnen Analyte durch Dotierung in Reinstwässer untersucht worden. Als Fazit hatte sich dabei ergeben, dass bestimmte Wasserinhaltsstoffe, wie etwa Detergentien,

die Permeation geringfügig verzögern können, aber nur dann, wenn sie in unrealistisch hohen Konzentrationen ($> 1\%$ w/w) vorliegen. Ansonsten spielte die unterschiedliche Zusammensetzung der Wasserinhaltsstoffe keine erkennbare Rolle.

Während der Arbeiten mit Reinstwässern hatte sich gezeigt, dass im pH-Bereich von 3-10 keine Beeinträchtigung der Membranstabilität in einem Zeitraum von 2-3 Monaten festzustellen war.

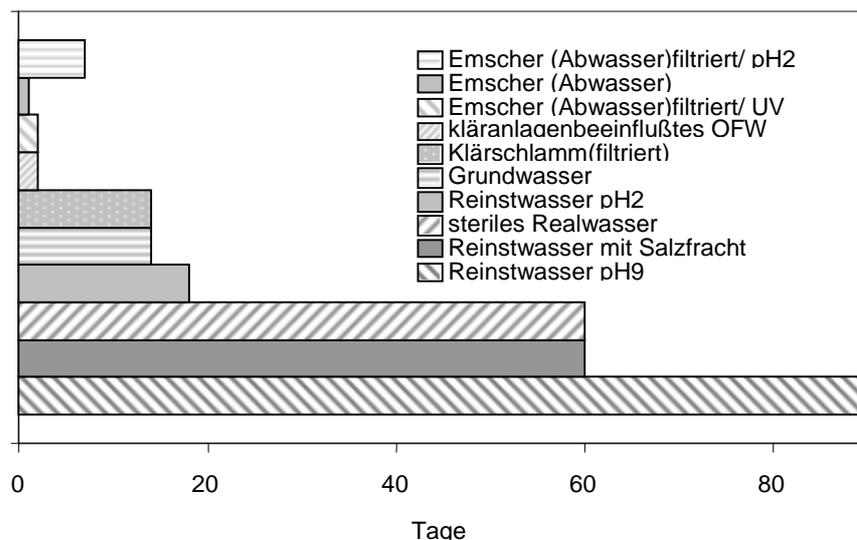


Abb. 11: Mindesthaltbarkeit der frischen Naturmembran (Goldschlägerhäutchen) in unterschiedlichen Wässern

In den Tests mit Realwässern stellte sich heraus, dass die eingesetzten Goldschlägerhäutchen als Naturmembran für alle Wässer geeignet waren, die keine oder nur eine geringe mikrobiologische Aktivität aufwiesen (Abb. 11). Bei sterilisiertem Grund- und Oberflächenwasser ist die Haltbarkeit gleich der mit Reinstwässern. In unsterilem Grundwasser und membranfiltriertem Klärschlamm, in dem die mikrobielle Aktivität nur noch sehr gering ist, kann eine Haltbarkeit von 2 bis 3 Wochen zu Grunde gelegt werden. Im Gegensatz dazu liegt die Nutzungszeit der Naturmembranen bei Abwasser und relativ stark abwasserbelastetem Oberflächenwasser bei maximal 1 Tag, und damit in einem unpraktikablen Bereich.

Versuche, die mikrobielle Aktivität der Wässer mit Hilfe zusätzlicher Membranfiltration (Porengröße $< 0,2\ \mu\text{m}$) oder durch Photolyse zu vermindern, zeigten nur geringe Erfolge. Durch Filtration bis in den Bereich von $0,1\ \mu\text{m}$ Porengröße und anschließender UV-Bestrahlung bei $254\ \text{nm}$ für die Dauer von 1 bis 5 min ergab sich keine entscheidende Verbesserung

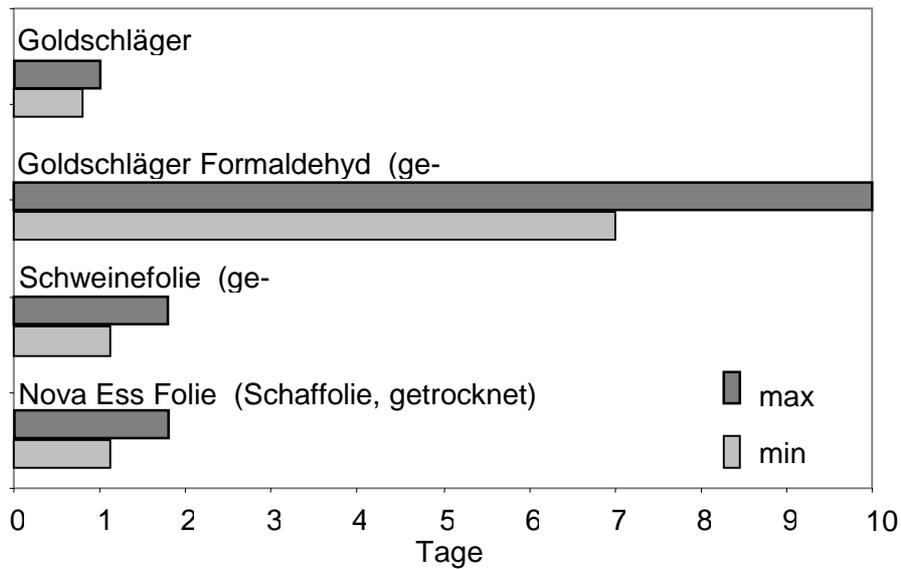


Abb. 12: Haltbarkeit verschiedener Naturmembranen in Abwasser

Erst eine Herabsetzung des pH Wertes auf 2, wie es zur Stabilisierung der Proben in der Wasseranalytik üblich ist, kann zu einer merklichen Verlängerung der Nutzungsdauer der Membran auf ca. 1 Woche führen, was allerdings für technische Anwendungsbereiche auch nicht ausreicht.

Da der Einsatz von Formaldehyd zur Stabilisierung von Zellulosefiltern schon seit den 60iger Jahren gute Erfolge zeigt, wurde versucht, die natürlichen Membranen mit einer 1 %-igen Formaldehydlösung in gleicher Weise zu vergüten. Formaldehyd kann in zweierlei Weise wirken: zum einen auf Grund seiner bakteriziden Wirkung, zum anderen wegen der Fähigkeit, Proteinmoleküle mit einander zu vernetzen. Die Unterschiede sind sehr deutlich in Rasterelektronenmikroskopaufnahmen einer formalinbehandelten Naturmembran im Vergleich zu einer getrockneten Membran zu erkennen (Abb. 13). Durch die Behandlung mit Formaldehyd ließ sich tatsächlich die Haltbarkeit auf maximal 10 Tage erhöhen, was Abb. 12 veranschaulicht. Da die Vernetzung offenbar reversibel ist, war eine weitere Verbesserung der Haltbarkeit nicht möglich.

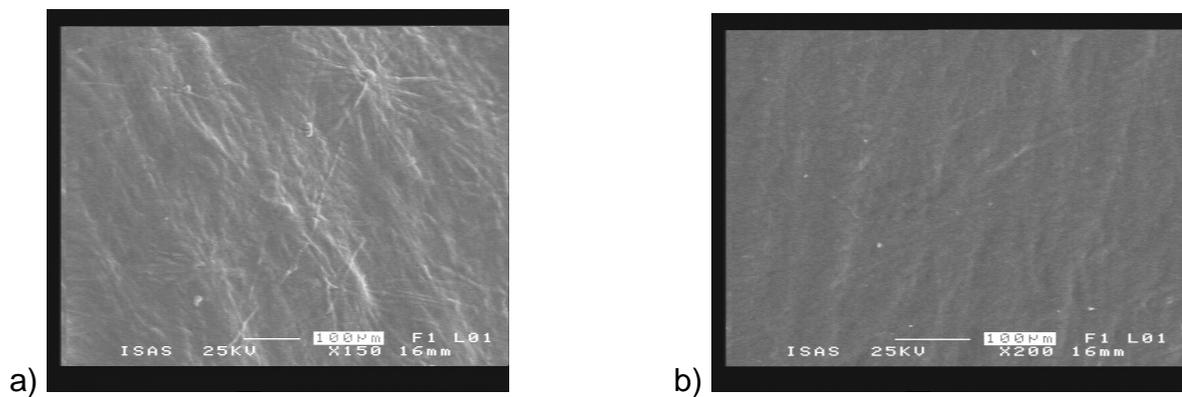


Abb.13 : Rasterelektronenaufnahmen einer Naturmembran (Goldschlägerhäutchen)
a) nach Formalinbehandlung, b) ohne Behandlung

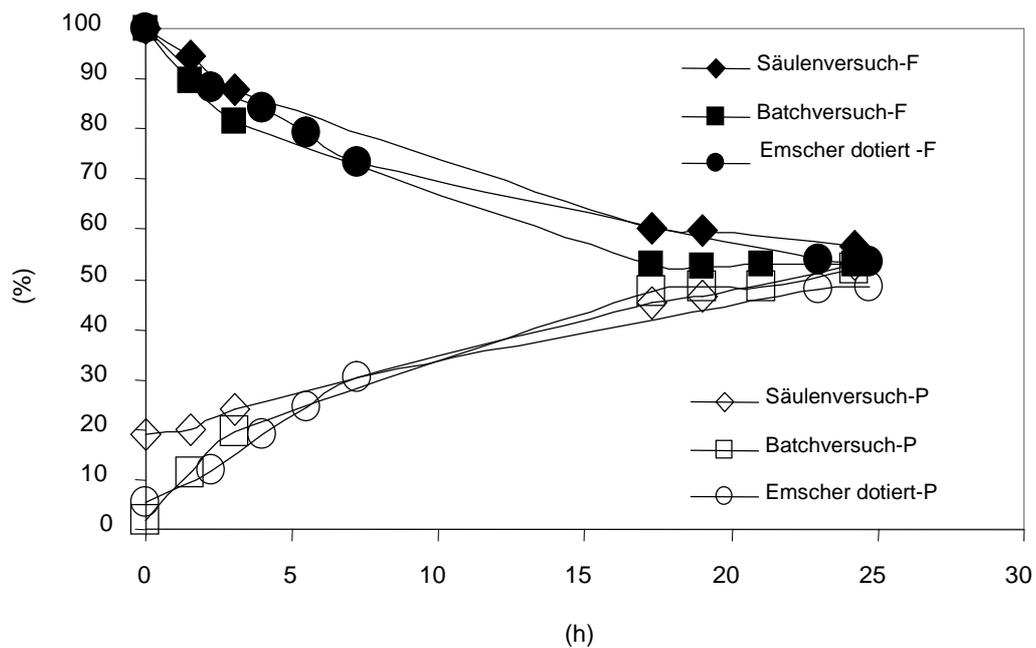


Abb. 14: Permeationsverhalten der Leitwirkstoffe an einer Formaldehyd-Naturmembran
(F: Feed, P: Permeat)

Zur Überprüfung, ob sich durch die Formalin-Behandlung die Eigenschaften der Membranen geändert hatten, wurde das Kammerensystem mit unterschiedlich mikrobiell belasteten Wässern - Ruhrwasser (Säulenversuch), kläranlagenbeeinflusstem Oberflächenwasser (Batchversuch), dotiertes Emscherwasser - beprobt. Die Mikroorganismen-Dichte während des

Batchversuches war allerdings geringer, da das kläranlagenbeeinflusste Oberflächenwasser 1:4 mit Basalmedium (entspr. OECD-Methode) verdünnt war. Offensichtlich hatte die Formalinbehandlung aber keinen signifikanten Einfluss auf das Permeationsverhalten der Goldschlägerhäutchen, was Abb. 14 demonstriert.

3.2 Trägergestützte Flüssigmembransysteme (SLM)

3.2.1 Trägergestützte Flachmembranen

Zur Fortsetzung der im Abschlußbericht des Vorprojektes beschriebenen Untersuchungen mit trägergestützten Flüssigmembransystemen wurde eine SLM- Zelle „Typ III“ konstruiert (Abb. 15), die gegenüber den vorhergehenden Prototypen ein größeres Feed-Volumen (500 mL) und ein kleineres Strip-Volumen (1,5 mL) aufweist, um höhere Anreicherungsfaktoren zu erreichen (vorhergehende Konstruktionen: Typ I 50 mL : 50 mL, Typ II 250 mL : 40 mL).



Abb. 15 SLM-Zelle Typ III (PTFE, Feed : Strip-Volumen = 500 : 1,5)

Präparation der SLM - Einfluss der Eintauchzeit

Zur Präparation der trägergestützten Flüssigmembran wurde Trägermaterial (Membran: 0,1 mm, 5,5 x 5,5 cm) mit der organischen Membran-Lösung (Octansulfonsäure in Dihexylether) getränkt. Dabei wurden die Eintauchzeiten des Trägermaterials in der organischen Phase von 1 h bis zu 4 h variiert. Die präparierten Membranen wurden nach dem Ende der Behandlung sofort in die SLM-Zelle eingebaut und dann die Transportraten mit den wirkstoffhaltigen Testlösungen ermittelt. Die Ergebnisse belegen (Abb. 16), dass die Extraktionsgrade tatsächlich von der Eintauchzeit des Trägermaterials abhängig sind. Die Extraktionsverläufe für DCF und IBU gleichen sich aber schon nach zwei- bis vierstündiger Eintauchzeit den Extraktionsgraden an, die nach 24 stündiger Vorbehandlung erzielt wurden.

Wie bereits bei den Versuch mit Dialysekammern vom Typ I (Feed-Strip-Volumen 1:1), werden auch in den Typ III-Systemen SFM und CBZ nur in Spuren transportiert.

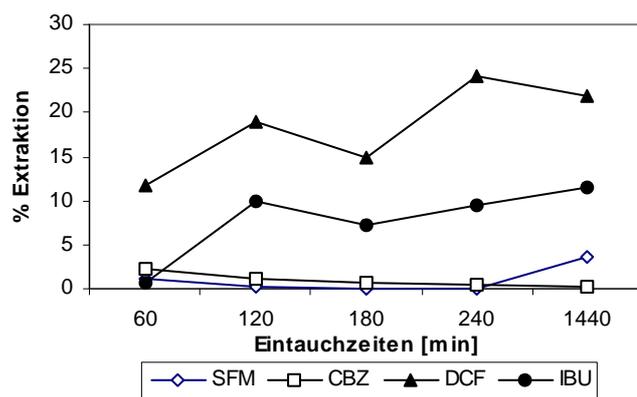


Abb. 16: Einfluss der Eintauchzeiten der Trägermembran auf die Extraktionsgrade (SLM-Zelle Typ III; Membran-Phase: 0,025g/L Octansulfonsäure Natriumsalz in Dihexylether, Feed: Arzneiwirkstoffe jeweils 10 μ g/L in 0,1 mol/L HCl, Strip: 0,1 mol/L NaOH; 4 h)

Einfluss des Lösemittels

Zur erfolgreichen Membran-Permeation sollte der PP-Träger vollständig benetzt sein. Ein Maß für die Benetzbarkeit der Trägeroberfläche ist der Benetzungsdruck. Die Stützmembran ist zwar in der Regel wasserabstoßend, wird aber bei genügend hohen Differenzdrücken von den wässrigen Phasen benetzt. Der Benetzungsdruck nimmt mit wachsendem Durchmesser der Poren und mit sinkender Grenzflächenspannung ab. Mit der verwendeten PP-Membran

lässt sich nach der Belegung mit dem eingesetzten oberflächenaktiven Carrier im System Octansulfonsäure/Dihexylether ein ausreichender Benetzungsdruck erreichen.

Dagegen ist das polarere Lösemittel Decanol, mit dem in Bulk-Systemen hohe Extraktionsgrade für SFM und CBZ erzielt wurden, nicht trägergestützt einsetzbar. Offensichtlich übt es keinen genügend hohen Benetzungsdruck auf das mikroporöse Gewebe aus, so dass Wasser durch die Membran-Schicht auf die Strip-Seite diffundiert und keine Strip-Lösung angelegt werden kann.

Anreicherungs-faktoren E_e

Nach Optimierung weiterer Betriebsparameter (u.a. Rührgeschwindigkeit in der Feed-Phase, Extraktionszeit) wurden in der neuen Kammer Typ III Wirkstoffkonzentrationen bis in den Spurenbereich vorgelegt (0,1 – 20 $\mu\text{g/L}$ pro Wirkstoff, Feed-Volumen 500 mL). Nach einer Extraktionszeit von ca. 4 h wurden die Strip-Phasen analysiert. Es stellte sich heraus (Abb. 17), dass in Abhängigkeit von der Analytkonzentration für DCF und IBU hohe Anreicherungs-faktoren ($E_e > 70$) erzielbar sind. Deutliche Anreicherungseffekte traten noch unterhalb 1 $\mu\text{g/L}$ auf.

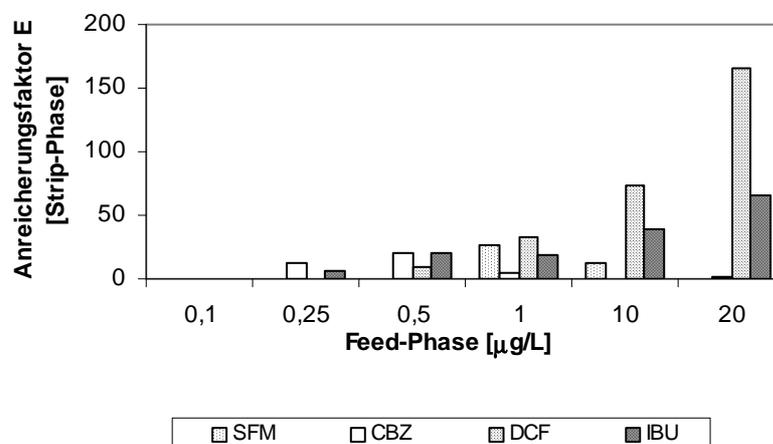


Abb. 17: Anreicherungs-faktoren E_e als Funktion der Wirkstoffkonzentrationen in der Feed-Phase (SLM-Zelle Typ III, Bedingungen s. Tab. 3)

3.2. PP-Beutel als SLM-Module

Neben den Flachmembranmodulen wurde erstmalig eine „Beutel-Geometrie“ für die Trägermembranen entwickelt. Prinzipiell sollten dadurch noch höhere Anreicherungsfaktoren erreicht werden. PP-Beutel wurden aus geeignet zugeschnittenem Flachmembran-Trägermaterial durch eine eigens entwickelte Folienschweißtechnik hergestellt.



Abb. 18 Prototyp der SLM-Beutel (Becher aus PTFE und Glas zur Aufnahme der wässrigen Feed- bzw. Probelösung)

Zunächst wurden Prototypen der Beutel mit unterschiedlichen Durchmessern und Längen hergestellt. Zur Durchführung der Arzneistoffanreicherung wird die entsprechend vorbehandelte SL-Membran in die Feed-Lösung eingetaucht, mechanisch fixiert, mit der Strip-Lösung gefüllt und der Rührvorgang gestartet (Abb. 18). Nach 4 h wurde die Strip-Probe entnommen und mit der HPLC analysiert.

In der Tabelle 2 sind die Extraktionsbedingungen und erzielten Anreicherungsfaktoren aufgeführt.

Tabelle 2: Anreicherungsfaktoren und Extraktionsbedingungen mit SLM-Beutel-Technik (Flüssigmembran: Octansulfonsäure in Dihexylether)

SLM-Beutel	Feed: 0,1 mol/L HCl	Strip: 0,1 mol/L NaOH	E_e	
Beutel 1 Dimension	DCF IBU	<i>Volumen: 400 mL</i>	<i>Volumen: 6 mL</i>	
		0,2 mg/L	13,0 mg/L	65
		0,2 mg/L	12,2 mg/L	61
Beutel 2 Dimension	DCF IBU	<i>Volumen: 400 mL</i>	<i>Volumen: 0,2 mL</i>	
		0,2 mg/L	50,9 mg/L	254
		0,2 mg/L	56,1 mg/L	280

Die ermittelten Daten belegen, dass mit den SL-Membranbeuteln noch höhere Anreicherungseffekte als mit den Flachmembranen zu erreichen sind. Die weiteren Untersuchungen zielten auf eine weitere Optimierung der Membrangeometrie und Folienschweißtechnik. Um die Extraktionseffektivität der PP-Beutel zur Anwendung auf Wasserproben mit zu erwartenden Arzneistoffgehalten im ng- μ g/L-Bereich noch zu steigern, wurde die Membrane weiter miniaturisiert unter gleichzeitiger Erhöhung des Volumenverhältnisses zwischen Feed und Strip-Phase.

Zur Herstellung der PP-Beutel wurde eine Technik entwickelt, die pro Arbeitsgang die Produktion von maximal 10 PP-Beuteln ermöglicht. Der Innendurchmesser des offenen Beutels (als SLM-Modul) beträgt $\sim 2,5$ mm. Das optimale Aufnahmevolumen für Strip-Lösung liegt im Bereich von 200 - 500 μ L.



Abb. 20 Mehrfachextraktionseinheit mit SLM-Beutelmodulen

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

Dazu wurden die getränkten PP-Beutel mit der Strip-Lösung gefüllt und an der Abdeckung für das Probenaufnahmegefäß (600-mL-Becher) fixiert. Die Extraktion erfolgte in sechs Parallelansätzen unter Rühren der Feed-Phase (Wasserprobe) mit einem PTFE-Magnetührstab auf einem Mehrfach-Rührgerät (Abb. 20).

3.3 Durchführung der SLM-Extraktionen

Die Zusammensetzung der Flüssigmembran- und Strip-Phase sowie die pH-Konditionierung der Feedphase war wie folgt:

- Membran-Phase: 0,025g/L Octansulfonsäure in Dihexylether
- Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH (300 – 400 μ L)
- Feed-Phase/Wasserprobe: 500 mL 0,1 mol/L HCl bzw. Ansäuern auf pH 1

Mit Hilfe der aus den Versuchsdaten berechneten Kenngrößen maximaler Anreicherungsfaktor $E_{e(\max)}$, Anreicherungsfaktor und Extraktionseffektivität E bzw. E (%) wurden die Bedingungen optimiert.

Tabelle 3: Einfluss des Strip-Volumens auf die Anreicherung
(Extraktionszeit: 4 h, Feed- Phase: 500 mL, 1 μ g/L je Arzneiwirkstoff
in 0,1 mol/L HCl, n = 6)

Strip-Volumen [μ L]	C_s [mg/L]	E [%]	E_e
IBU			
400	1,17	93,6	1170
300	1,90	107,9	1900
DCF			
400	1,07	85,6	1070
300	1,80	115	1800

Berücksichtigt wurden die Einflüsse von Eintauchzeit (PP-Imprägnierung), Extraktionszeit, Strip-Volumina und die Flüssigmembran-Zusammensetzung.

3.3.1 Anwendung der SLM-Beutelm Module - Analyse von Oberflächenwasser

Die entwickelte Anreicherungs methode mit SLM-Beutelm odulen wurde erstmalig auf die Bestimmung von DCF und IBU in kläranlagenbeeinflusstem Oberflächenwasser - mit und ohne Wirkstoff-Dotierung - nach folgender allgemeiner Verfahrensweise angewendet:

- Einstellen des pH-Wertes der Wasserprobe (undotiert und dotiert) mit konz. HCl auf pH 1
- Durchführung der SLM-Extraktion mit je zwei 500 mL-Aliquoten
- SLM-System: Octansulfonsäure in Dihexylether // 300 μ L 0,1 mol/L NaOH
- Extraktion unter Rühren (370 U/min) für 4 h
- Neutralisierung der Strip-Lösung mit 30 μ L 1 mol/L HCl
- Analyse des Konzentrats mit HPLC-UV-MS/MS

Grundsätzlich belegt der Vergleich der gemessenen Konzentrationen in den jeweiligen Strip-Lösungen bzw. Messproben (mg/L-Bereich) mit den berechneten Konzentration in den Wasserproben (ng/L-Bereich) das besonders hohe Anreicherungspotential der verwendeten SLM-Beutelm odule (Tab. 4). Die Anreicherungsfaktoren liegen nach nur einstufiger Extraktion um 1500.

Tabelle 4: Bestimmung der Arzneistoffe in Oberflächenwasser mit SLM-Beutelm odulen

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

Eine erste Abschätzung der Wiederfindung führt bei Ibuprofen zu durchschnittlich 97 % und beim Diclofenac zu ca. 150 %. Vergleichsanalysen mit kommerziellen Festphasen (OASIS HLB) ergaben deutlich niedrigere Wiederfindungen (< 50%).

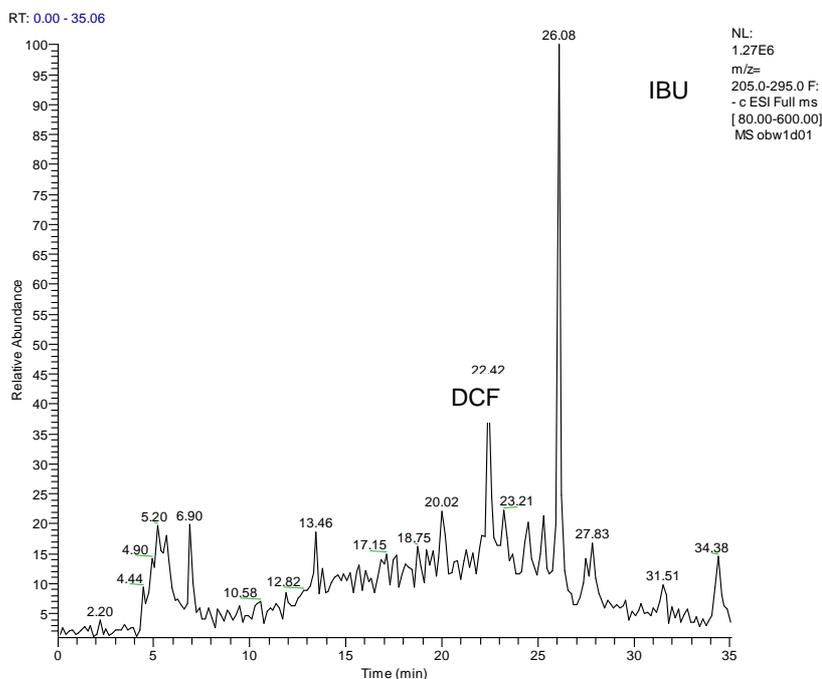


Abb. 21: LC-MS-Chromatogramm der SLM Strip-Phase: Anreicherung mit Beutelmodul aus dotierter Oberflächenwasserprobe (s. Tab. 4).

Bedingt durch die selektiven Transporteigenschaften (u.a. Ausschluß huminstoffartiger Verbindungen) wird neben hoher Anreicherung ein überzeugender Clean-up Effekt erreicht (Abb. 21).

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

Versuche mit den Hauptmetaboliten und anderen Solventkombinationen zeigen Perspektiven auf, SL-Membranen als Drei- oder als Zweiphasensysteme auch für hochpolare Komponenten einzusetzen.

4. Untersuchung von Abbau- und Umwandlungsprozessen der Leitstoffe und Metabolien in Modellsystemen

Die Aufgabe des IfW in diesem Projekt waren Untersuchungen zum Abbauverhalten der Modellstoffe in verschiedenen Matrices mit unterschiedlichen Randbedingungen. Anhand der Ergebnisse soll die Möglichkeit des Einsatzes biologischer Filterstufen bei der Reinigung arzneimittelhaltiger Abwässer geprüft werden. Hierzu wurden standardisierte Batch- und Säulenversuche durchgeführt.

Ziel der Batchversuche war es, die Abbaubarkeit der Leitstoffe in Versuchsansätzen mit Grundwasser und Oberflächenwasser als Inokulum zu untersuchen sowie biologische und chemische Abbaureaktionen voneinander zu unterscheiden. Batchversuche sind hierzu besonders geeignet, da sie unter definierten und reproduzierbaren Randbedingungen sowohl Hinweise auf die grundsätzliche Abbaubarkeit als auch auf das Abbauvermögen einer Biozönose ermöglichen. Das Verhalten von Stoffen in naturnahen technischen Systemen kann auf diese Weise allerdings nur unzureichend ermittelt werden.

Die unter naturnahen Bedingungen durchgeführten Säulenversuche dienen dazu, Wechselwirkungen zwischen Gas-, Wasser- und Festphase, hydraulische Effekte und die Ausbildung von Mikrohabitaten in die Betrachtungen einzubeziehen. Zusätzlich wurden verschiedene Randbedingungen, die einen Einfluss auf Abbau- und Umwandlungsprozesse haben, variiert.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Batch-Versuche

Die Batch-Versuche wurden in Anlehnung an die OECD-Richtlinien (MITI-Test, OECD 1993) durchgeführt. Prinzip dieser Tests ist es, die potentielle Abbaubarkeit eines Stoffes unter günstigen Bedingungen zu ermitteln. Hierbei werden die zu untersuchenden Stoffe als einzige C-Quelle einem Basalmedium zugesetzt und mit einem Inokulum (häufig Klärschlamm) angeimpft. Die Endpunktbestimmung erfolgt in den meisten Fällen indirekt, also zum Beispiel über die DOC-Abnahme oder die CO₂-Produktion.

In den am IFW durchgeführten Batch-Versuchen wurde das Basalmedium unter sterilen und unsterilen Bedingungen mit Grundwasser und einem kläranlagenbeeinflussten Oberflächenwasser angeimpft und die Testsubstanzen Carbamazepin, Diclofenac, Ibuprofen und Sulfa-

methoxazol in einer Konzentration von 1 mg/L zudosiert. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 22 dargestellt.

Die vier Ansätze wurden über einen Zeitraum von vier Wochen hindurch in wöchentlichen Abständen beprobt. Die Untersuchung auf die zudosierten Wirkstoffe und deren mögliche Abbau- und Umwandlungsprodukte lag bei den Projektpartnern, weitere Parameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Nitrat, Nitrit, Sulfat, Ammonium, DOC) wurden versuchsbegleitend über das IfW bei der Westfälische Wasser- und Umweltanalytik (WWU) ermittelt. Um Langzeiteffekte erkennen zu können, wurden die vorhandenen unsterilen Ansätze nach 10 Wochen erneut über einen Zeitraum von 11 Wochen hinweg beprobt.

In den Tabellen 5 und 6 sind die Zusammensetzung des Basal-Mediums und die Ansätze für die Batch-Versuche zusammengestellt.

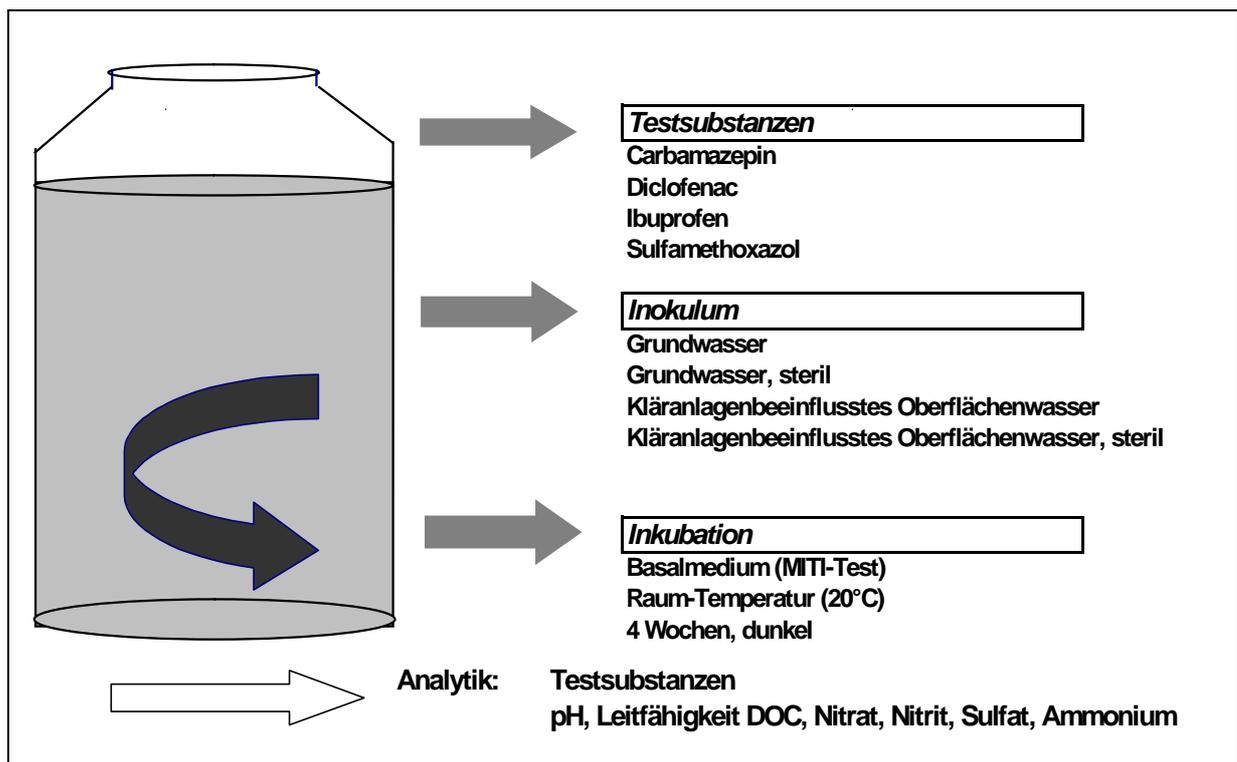


Abb. 22: Ablauf der Batchversuche (nach PREUSS et al. 1999)

Tabelle 5: Zusammensetzung des Basalmediums

Lösung A	Lösung B	Lösung C	Lösung D
21,75 g/L K_2HPO_4 8,5 g/L KH_2PO_4 44,6 g/L $Na_2HPO_4^*$ 12 H_2O 1,7 g/L NH_4Cl	22,5 g/L $MgSO_4^*$ 7 H_2O	27,5 g/L $CaCl_2$	0,25 g/L $FeCl_3^*6$ H_2O

Tabelle 6: Ansatz der Batchversuche

Ansatz	GW-steril	GW-unsteril	OW-steril	OW-unsteril
Inokulum	2.400 ml steriles Grundwasser	2.400 ml Grundwasser	2.400 ml steriles Oberflä- chenwasser	2.400 ml Oberflächen- wasser
Basalmedium	36 ml Lsg. A 36 ml Lsg. B 36 ml Lsg. C 36 ml Lsg. D	36 ml Lsg. A 36 ml Lsg. B 36 ml Lsg. C 36 ml Lsg. D	36 ml Lsg. A 36 ml Lsg. B 36 ml Lsg. C 36 ml Lsg. D	36 ml Lsg. A 36 ml Lsg. B 36 ml Lsg. C 36 ml Lsg. D
Autoklaviertes, bidest. Wasser	10.656 ml	10.656 ml	10.656 ml	10.656 ml
Modellstofflösung (12 mg/l je Stoff)	1.200 ml	1.200 ml	1.200 ml	1.200 ml

4.1.2 Säulenversuche

Diese Versuche wurden in einer weitgehend standardisierten halbtechnischen Säulen-Versuchsanlage durchgeführt, die bereits in einer Vielzahl von Projekten und zur Untersuchung unterschiedlicher Fragestellungen am IfW eingesetzt wurde. Die Anlage besteht aus Glassäulen, die mit verschiedenen natürlichen Filtermaterialien gefüllt und mit natürlichen Wässern (aerobes oder anaerobes Grundwasser, Oberflächenwasser) betrieben werden können (Abbildung 23).



Material:	Glas
Höhe:	100 cm
Durchmesser:	22 cm
Filterhöhe:	80 cm
Filtergeschwindigkeit:	5 cm/h

Abb. 23: Halbtechnische Versuchsanlage mit drei Sandfiltern und technische Daten

Als Filtermaterial diente ein Rheinsand, der auch für technische Langsandsandfilter verwendet wird. Die Filter werden grundsätzlich vor Beginn einer Dosierung über mehrere Wochen hinweg mit dem jeweiligen Versuchswasser betrieben, um sie hydraulisch einzufahren sowie chemisch und vor allem mikrobiologisch zu konditionieren. Sie werden von unten nach oben gefahren. Das verwendete Oberflächenwasser stammt aus der Ruhr und wird über einen Kiesfilter vorfiltriert. Das in diesem Projekt eingesetzte Grundwasser ist ein künstlich angereichertes Grundwasser aus der Wassergewinnung Hengsen der Wasserwerke Westfalen. Die wichtigsten Charakteristika beider Wässer sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Beschaffenheit der verwendeten Wässer (Analyse vom 25.11.03)

Parameter	Grundwasser	Oberflächenwasser nach Kiesfiltration
pH-Wert	7,47	7,91
Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	391	402
Sauerstoff (mg/l)	3,7	3,6
Chlorid (mg/l)	34	36
Sulfat (mg/l)	44	43
Nitrat (mg/l)	18	16,9
Nitrit (mg/l)	<0,01	0,02
Ammonium (mg/l)	<0,05	<0,05
DOC (mg/l)	0,8	1,7
Natrium (mg/l)	23	27
Magnesium (mg/l)	6,3	6,4
Kalium (mg/l)	3,2	3,9
Calcium (mg/l)	52	52
Koloniezahl/ml	16	150
Aluminium ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<10	<10
Mangan ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<2	<2
Eisen ($\mu\text{g}/\text{l}$)	29	<10
Chrom ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<2	<2
Nickel ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<2	<2
Kupfer ($\mu\text{g}/\text{l}$)	10	<5
Zink ($\mu\text{g}/\text{l}$)	23	<5
Cadmium ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<0,3	<0,3
Quecksilber ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<0,1	<0,1
Blei ($\mu\text{g}/\text{l}$)	<1	<1

Versuchsreihe 1

Zunächst wurden drei parallel gefahrene Sandfilter verwendet. Eine der Säulen wurde mit Grundwasser betrieben, die anderen beiden mit Oberflächenwasser. Nach der Einlaufphase wurden dem Zulauf der Säulen kontinuierlich die vier Testsubstanzen in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ zudosiert. Gleichzeitig wurde bei einer der mit Oberflächenwasser betriebenen Säulen der Salzgehalt des Betriebswassers auf etwa 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ erhöht, um den Einfluß ei-

ner höheren Salzfracht, wie sie für ein kläranlagenbeeinflusstes Oberflächenwasser typisch ist, auf das Verhalten der Testsubstanzen zu überprüfen.

Die Säulen wurden in den ersten 7 Werktagen nach Beginn der Dosierung täglich, danach in wöchentlichen Abständen beprobt. Jeweils wöchentlich wurde eine Probe zur Analyse an das ISAS geschickt. Am IfW wurden zur Versuchskontrolle alle vier Testsubstanzen bestimmt.

Als Vor-Ort-Parameter wurden pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoff und die Filtergeschwindigkeit werktäglich gemessen. Proben für die Begleitparameter DOC, Nitrat, Nitrit, Sulfat und Ammonium wurden dreimal, für die mikrobiologischen Bestimmungen (KBE, Esterasen) zweimal in der Woche genommen.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden alle Säulenzu- und -abläufe sowie zur Erstellung einer Zeitreihe in regelmäßigen Abständen der Ablauf der mit Grundwasser betriebenen Säule beprobt.

Versuchsserie 2

In einer zweiten Versuchsserie sollten Randbedingungen geschaffen werden, die den mikrobiellen Abbau fördern. Einer mit Sand gefüllten und mit Oberflächenwasser betriebenen Säule wurden über einen längeren Zeitraum als in der 1. Versuchsserie (9 gegenüber 4 Wochen) die 4 Modellstoffe zudosiert.

Eine zweite, ebenso mit Sand gefüllte Säule wurde mit Oberflächenwasser im Kreislauf betrieben, um die Kontaktzeiten zu erhöhen und die mikrobielle Aktivität zu fördern. Nach einer Einlaufphase von 3 Wochen wurde mit der Dosierung begonnen. Zunächst wurden 9 Tage lang pro Tag etwa 5 mg der vier Modellstoffe zudosiert, anschließend wurde die Dosierung reduziert auf etwa 0,9 mg/Tag, nach 13 Tagen wurde die Dosierung gestoppt. Die Säule wurde noch 5 weitere Wochen betrieben und beprobt.

Außer den versuchsbegleitenden Kontrollmessungen am IfW wurde wöchentlich eine Probe jeder Säule am ISAS sowohl auf die Leitstoffe als auch auf Metabolite untersucht.

Die Bestimmung der Vor-Ort- und Begleitparameter erfolgte im Wesentlichen in der gleichen Frequenz wie bei der Versuchsserie 1. Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden auf die Ermittlung der Koloniezahlen eingeschränkt.

Die Versuchsbedingungen der Versuchsserien 1 und 2 sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Versuchsbedingungen bei den Säulenversuchen

Säule	Filtermaterial	Betriebswasser	Dosierung	Versuchszeit	Betriebsweise
1	Sand	Grundwasser	100 µg/l je Modellstoff	4 Wochen	Durchfluss
2	Sand	Oberflächenwasser ¹	100 µg/l je Modellstoff	4 Wochen	Durchfluss
3	Sand	Oberflächenwasser ¹	100 µg/l je Modellstoff + 400 mg/l KCl	4 Wochen	Durchfluss
4	Sand	Oberflächenwasser ¹	100 µg/l je Modellstoff	9 Wochen	Durchfluss
5	Sand	Oberflächenwasser ¹	ansteigend bis ca. 3 mg/l je Modellstoff	10 Wochen	Kreislauf

¹ nach Kiesfiltration

4.1.3 Bestimmungsmethoden

Arzneistoffe

Die am ISAS eingesetzten Methoden zur Bestimmung der Arzneimittelwirkstoffe sind in Kapitel 2 dargestellt. Versuchsbegleitende Kontrollmessungen zu Carbamazepin, Diclofenac und Ibuprofen mittels GC/MS wurden in Zusammenarbeit mit der WWU über das IfW erhoben.

Vor-Ort- und Begleitparameter

Die Bestimmung der Begleitparameter erfolgte weitgehend in Anlehnung an DIN-Verfahren. Die Esterasenaktivität wurde mit dem Verfahren nach OBST und HOLZAPFEL-PSCHORN 1988 bestimmt, die molekularbiologischen Methoden sind Verfahren, die am IfW entwickelt und bereits in mehreren Forschungsvorhaben mit Erfolg eingesetzt wurden (KILB et al. 1998). Die Esteraseaktivität als Summenparameter eignet sich zur Bestimmung der generellen mikrobiologischen Aktivität in den Testfiltern. Auf diese Weise sollte der Einfluss der zudosierten Arzneimittel auf die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen untersucht werden, also stimulierende und hemmende Wirkungen erfasst werden.

Tabelle 9: Methoden zur Bestimmung der versuchsbegleitenden Parameter

Parameter	Methode
pH-Wert	Elektrochemisch, in Anlehnung an DIN 38 404-C5
Leitfähigkeit	Elektrochemisch, in Anlehnung an DIN EN 27888
Sauerstoff	Elektrochemisch, in Anlehnung an EN 25814
Temperatur	Elektrochemisch
DOC	In Anlehnung an EN 1484
Chlorid	Ionenchromatographie, in Anlehnung an EN ISO 10304-1
Sulfat	Ionenchromatographie, in Anlehnung an EN ISO 10304-1
Nitrat	Ionenchromatographie, in Anlehnung an EN ISO 10304-1
Nitrit	Ionenchromatographie, in Anlehnung an EN ISO 10304-1
Koloniezahl	Nach Trinkwasserverordnung Anl.1
Esteraseaktivität	Enzymatisch
Mikrobielle Diversität	PCR/DGGE

Bei der eingesetzten molekularbiologischen Methode wird durch PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifizierte 16S rDNA mit einer speziellen Elektrophoretetechnik (DGGE, Denaturierende Gradientengelelektrophorese) aufgetrennt. Auf diese Weise lassen sich Muster der bakteriellen Besiedlung von Standorten erstellen, die miteinander verglichen werden können. In der Tabelle 9 sind die verwendeten Methoden aufgelistet.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Batch-Versuche mit Wirkstoffen

Bei den unter sterilen Bedingungen gehaltenen Ansätzen war nach 4 Wochen keine Veränderung der eingesetzten Wirkstoff-Konzentrationen zu verzeichnen. Dagegen konnte in den beiden unsterilen Ansätzen (Grund- und Oberflächenwasser) nach 4 Wochen ein geringer Rückgang von Sulfamethoxazol beobachtet werden. Zugleich wurde im Oberflächenwasser auch ein Abbau von Ibuprofen detektiert.

Um zusätzliche Erkenntnisse über den weiteren Abbauverlauf zu erhalten, wurden die vorhandenen Versuchsansätze nach insgesamt 14 Wochen erneut über 11 Wochen hinweg beprobt. Die Gesamtergebnisse sind in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

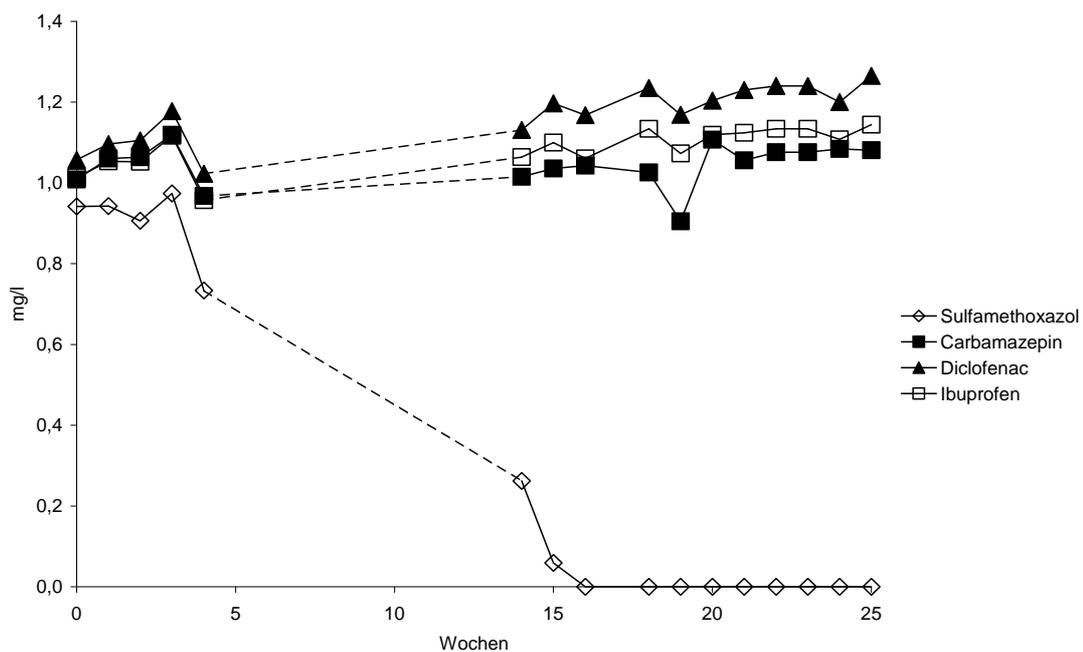


Abb. 24: Ergebnisse der Batch-Versuche mit unsterilem Grundwasser

In unsterilem Grundwasser nahmen die Sulfamethoxazol-Konzentration weiter ab. Dieser Stoff war nach 16 Wochen nicht mehr nachweisbar. Die anderen Modellsubstanzen zeigten sich gleichbleibend persistent.

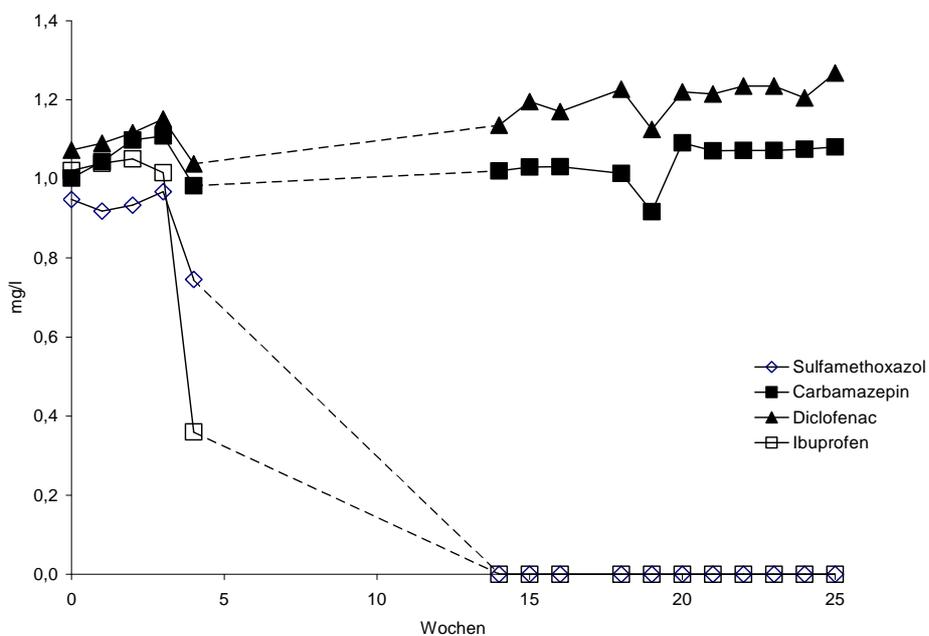


Abb. 25: Ergebnisse der Batch-Versuche mit unsterilem Oberflächenwasser

In dem Ansatz mit unsterilem Oberflächenwasser lagen nach 14 Wochen die Ibuprofen- und die Sulfamethoxazol-Konzentration unterhalb der analytischen Bestimmungsgrenze. Die Konzentration von Diclofenac und Carbamazepin war unter den Versuchsbedingungen auch nach 25 Wochen unverändert.

4.2.2. Batchversuche mit Hauptmetaboliten

Analog zu den Ansätzen des IfW wurden im ISAS Batchversuche mit den in Paderborn synthetisierten Metaboliten durchgeführt, um deren Abbauverhalten mit dem der Ausgangswirkstoffe zu vergleichen und Kenntnisse über das Verhalten von Strukturanaloga zu komplettieren. Bei einer vergleichenden Bewertung ist jedoch zu berücksichtigen, dass auf Grund geänderter chemischer und mikrobiologischer Zusammensetzung der Wasserproben und des Anteils an Kläranlagenablauf sowie jahreszeitlich bedingter Unterschiede, Differenzen zu den vorhergehenden Wirkstoff-Versuchen auftreten können.

Es wurden eingesetzt:

N-4-Acetyl-sulfamethoxazol (Ac-SFM), Sulfamethoxazol-N1-glucuronid (Glucu-SFM), 4-Hydroxy-ibuprofen (OH-IBU) und 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin (Diol-CBZ) (Strukturen s. Abb. 2 - 5).

Um bei den Sulfamethoxazol - Metaboliten Konkurrenzreaktionen auszuschließen und eindeutige Massenbilanzierungen zu ermöglichen, wurden zwei Parallelansätze mit getrennten Dotierungen von Grundwasser und kläranlagenbeeinflusstem Oberflächenwasser an Ac-SFM und Glucu-SFM angesetzt. Jeder Ansatz enthielt neben dem jeweiligen SFM-Metaboliten die anderen Komponenten OH-IBU und Diol-CBZ.

Die Batchansätze standen lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Flaschen einmal pro Woche geschüttelt und anschließend die Stopfen nur lose aufgelegt. Kontrollmessungen des Sauerstoffgehaltes zeigten auch bei den Langzeitversuchen (nach 6 Monaten) einen gleich bleibenden Gehalt von ca. 8 mg/L O₂ an.

Metabolitenabbau im Oberflächenwasser und Grundwasser

Nach 10 Tagen begann der Abbau von Ac-SFM im Oberflächenwasser, der dann innerhalb einer Woche beendet war. Im gleichen Zeitraum entstand in fast stöchiometrischer Menge der Wirkstoff SFM, der wiederum dann innerhalb von weiteren 6 Wochen vollständig abgebaut wurde (Abb. 26).

Nach 16 Tagen konnte eine beginnende Abnahme der OH-IBU-Konzentration festgestellt werden, die dann innerhalb der folgenden 7 Wochen unter die Nachweisgrenze sank. Während dieser Zeit war die Bildung von Ibuprofen nicht zu beobachten.

Die Konzentration von Diol-CBZ blieb bis zur 9. Woche nahezu konstant hoch. Zu dem Zeitpunkt, als alle anderen Substanzen im Batchversuch auf einen Wert unterhalb der Detektionsgrenze gefallen waren, stieg der Meßwert für Diol-CBZ innerhalb von 2 Wochen um 50% an, um dann etwa auf diesem Niveau zu bleiben. Dieser Effekt ist auch schon in anderen Batch- und Säulenversuchen aufgefallen, sogar in Versuchen, bei denen kein CBZ als Wirkstoff enthalten war. Da eine Erhöhung der Diol-CBZ-Konzentration prinzipiell ausgeschlossen ist, wird angenommen, dass der beschriebene Effekt durch ein chromatographisch nicht getrenntes Abbauprodukt verursacht wird. Massenspektrometrische Untersuchungen lassen strukturelle Ähnlichkeit mit einem CBZ-Derivat vermuten, bleiben aber noch spekulativ.

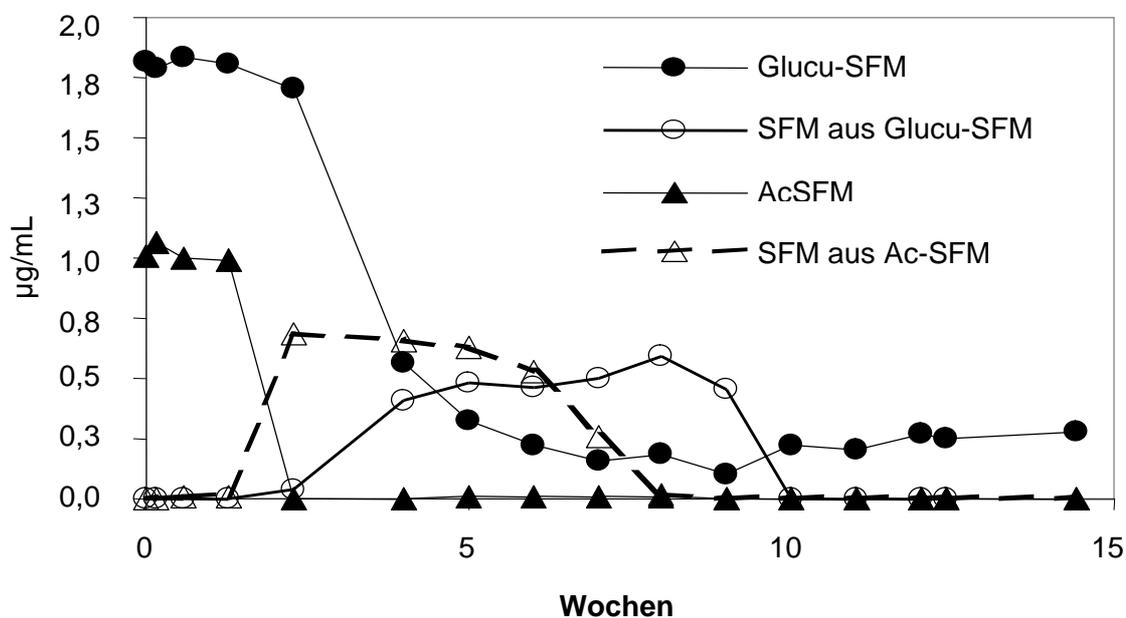


Abb.26: Abbau der Sulfamethoxazol-Metaboliten Ac-SFM und Glucu-SFM in Oberflächenwasser (Batchansatz)

Nach 10 Tagen beginnt der Abbau von Glucu-SFM, so dass nach 28 Tagen etwa 55 % des Glucuronids nachweisbar sind. Damit verläuft der Abbau deutlich langsamer als beim Ac-SFM. Auch aus dem Glucuronid des Sulfamethoxazols wird in fast stöchiometrischem Verhältnis der freie Wirkstoff SFM gebildet, der wiederum simultan abgebaut wird.

In Abb. 26 wird der zeitlich versetzte Abbau von Ac-Sulfa und Glucu-SFM zum SFM im Oberflächenwasser in zwei Parallelversuchen deutlich.

In den beiden mit Grundwasser angesetzten Batchversuchen – Glucu-SFM in einem separaten und die übrigen Metaboliten in dem anderen Abbauegefäß - gab es in den ersten Wochen keine nachweisbaren Veränderungen der Arzneistoffkonzentrationen (Abb. 27). Dies blieb bei dem Ansatz mit der Metaboliten-Mischung bis zum Abschluss der Tests so. In dem Ansatz mit dem Glucuronid hingegen setzte dann der Abbau ein, der mit einem Konzentrationsanstieg des Sulfonamidwirkstoffes SFM gekoppelt war. So waren nach 12 Wochen 75% des Glucu-SFM abgebaut. Rein stöchiometrisch hätte dieses einen Anstieg der SFM-Konzentration auf ca. 0,5 µg/mL zur Folge haben müssen. Infolge des synchron ablaufenden Abbaus des Wirkstoffes wurden aber nur maximal 0,35 µg/mL SFM erreicht.

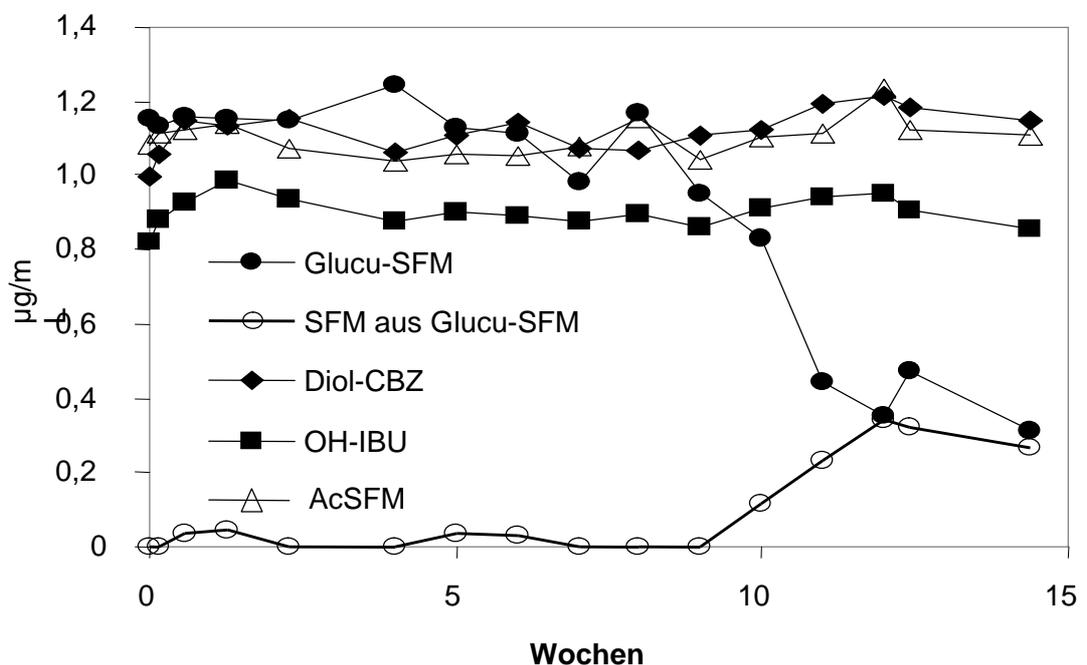


Abb. 27: Verhalten der Pharmaka-Metabolite in Grundwasser (Batchansatz)

4.2.3 Säulenversuche

Versuchsserie 1

In dieser ersten Versuchsserie wurde das Verhalten der Modellstoffe in verschiedenen betriebenen Sandfiltern untersucht. Jeweils 100 µg/l Carbamazepin, Diclofenac, Ibuprofen und Sulfamethoxazol wurden über 4 Wochen hinweg kontinuierlich dem Zulauf eines mit Grundwasser und zweier mit vorfiltriertem Oberflächenwasser betriebenen Filtern zudosiert. Einer der beiden mit Oberflächenwasser betriebenen Filter wurde zudem mit einer erhöhten Salzfracht belastet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass von den vier dotierten Substanzen im Versuchszeitraum nur Ibuprofen abgebaut wird – und dies nur in den mit Oberflächenwasser betriebenen Säulen. In der Abbildung 28 ist die relative Konzentration an Ibuprofen in den drei Versuchsfiltersäulen dargestellt. Für diese Abbildung wurden die am IfW versuchsbegleitend bestimmten Ergebnisse verwendet, da diese vor allem zu Versuchsbeginn dichter sind als die parallelen Messungen des ISAS.

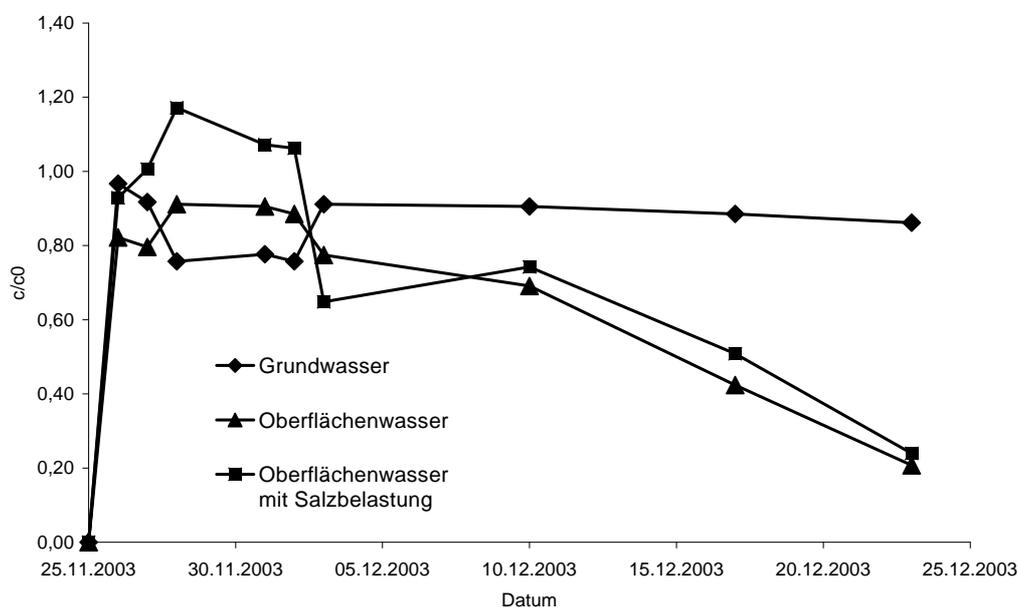


Abb. 28: Verlauf der relativen Ibuprofen-Konzentration in Versuchsfiltersäulen als Funktion der Zeit

Im Unterschied zu den orientierenden Batch-Versuchen begann der Abbau des Wirkstoffs Ibuprofen bereits nach etwa einer Woche. Der Verlauf der Konzentrationsänderung ent-

spricht wie erwartet einer typischen Abbaufunktion ohne zusätzliche Sorptionseinflüsse. Die gegenüber den Batchversuchen verkürzte Lag-Phase ist unter anderem auf die versuchsbedingt höhere Bioaktivität im „Säulenreaktor“ zurückzuführen.

Versuchsserie 2

Durchflussbetrieb

In der zweiten Versuchsserie wurde erneut ein mit Oberflächenwasser betriebener Sandfilter untersucht, dem nach entsprechender Einarbeitung über einen Zeitraum von 10 Wochen 100 µg/l je Modellsubstanz zudosiert wurde. Ansonsten wurden die Versuchsbedingungen der ersten Serie beibehalten. Über den gesamten Versuchszeitraum hinweg konnte allerdings kein Abbau der Leitstoffe detektiert werden (Abbildung: 29).

Dieses zunächst widersprüchliche Ergebnis ließ sich unter Berücksichtigung der chemischen Begleitparameter schlüssig deuten. Während in der 1. Versuchsserie die Werte für Nitrat, Nitrit und Ammonium durch die Filterpassage unverändert blieben, stiegen in der zweiten Versuchsserie die Gehalte an Nitrit und Ammonium im Säulenablauf deutlich an. Der Nitratgehalt wurde korrespondierend hierzu durch die Filterpassage vermindert (Abbildung 30).

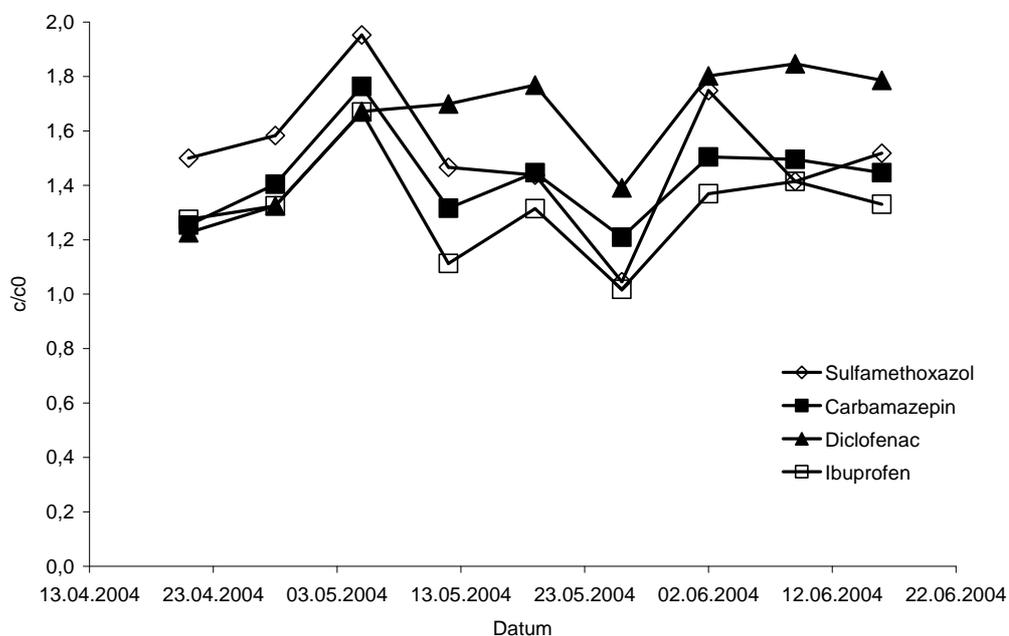


Abb. 29: Relative Leitstoff-Konzentrationen der im Durchfluss betriebenen Säule¹

¹ Im Versuchsverlauf kam es mehrfach zu technischen Störungen, so dass insgesamt die dosierten Wirkstoffkonzentrationen über den geplanten lagen.

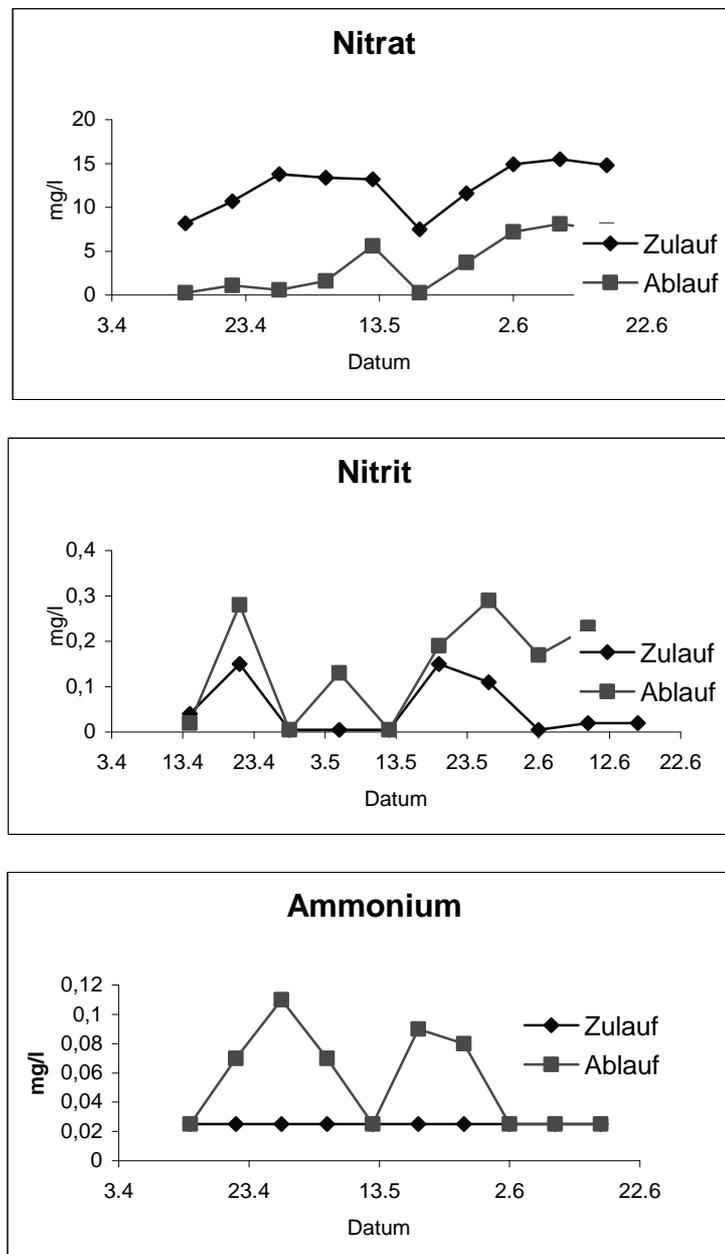


Abb. 30: Nitrat- Nitrit- und Ammonium-Konzentrationen der im Durchfluss betriebenen Säule

Dies lässt darauf schließen, dass in dem mit Oberflächenwasser im Durchfluss betriebenen Sandfilter eine unbekannte Kohlenstoffquelle abgebaut wurde, deren Verstoffwechslung

energetisch günstiger war als die Umsetzung eines der Modellstoffe. Gleichzeitig lässt dies die Folgerung zu, dass die Modellstoffe nicht co-metabolisiert werden.

Kreislaufbetrieb

Bei der im Kreislauf betriebenen Säule mit wesentlich höheren Kontaktzeiten und Wirkstoffkonzentrationen wurde nach 8 Wochen ein deutlicher Rückgang der Gehalte an Ibuprofen, Diclofenac und Sulfamethoxazol verzeichnet. Sulfamethoxazol wurde sogar bis unter die Nachweisgrenze abgebaut. Allein Carbamazepin erwies sich auch unter diesen, für einen mikrobiellen Abbau günstigen, Bedingungen als nur wenig abbaubar. (Abbildung 31)

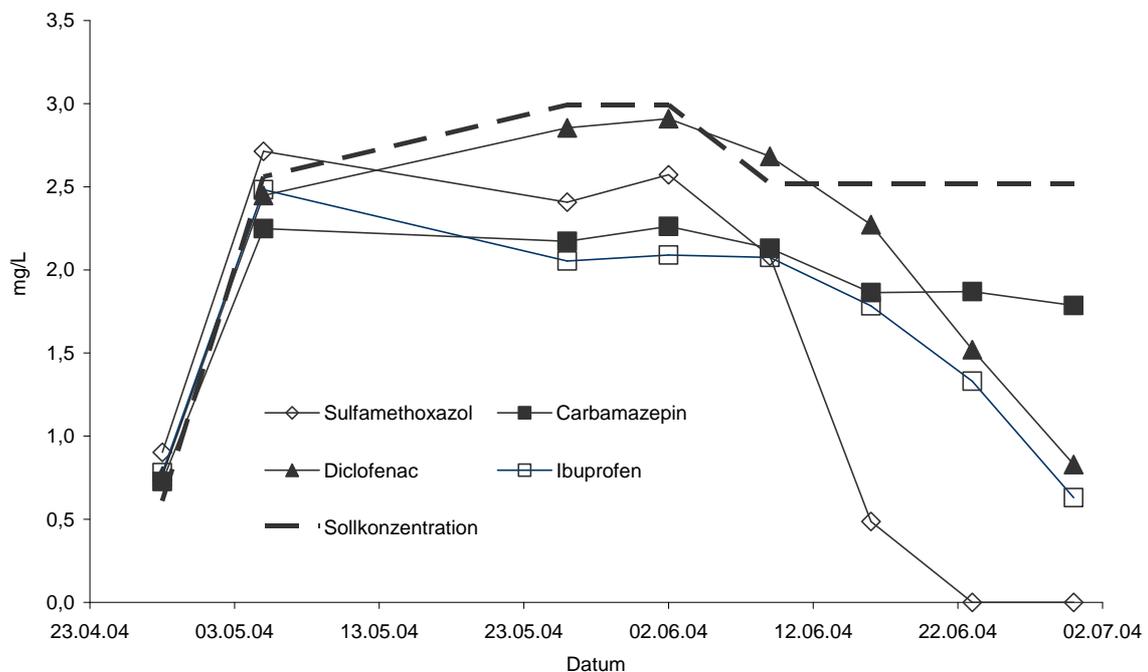


Abb. 31: Verlauf der Modellstoffkonzentrationen und der Sollkonzentration in dem im Kreislauf betriebenen Filter

Untersuchungen auf Metaboliten, die zum Ende des Versuchs hin durchgeführt wurden, zeigten die Bildung von OH-IBU und Diol-CBZ an; was auf oxidative Abbauprozesse der Leitstoffe Ibuprofen und Carbamazepin schließen lässt.

4.2.4 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

Die im Zulauf der mit Grundwasser betriebenen Filtersäule gemessenen Koloniezahlen lagen im Mittel bei 13 KBE/ml. Im Zulauf der mit Oberflächenwasser betriebenen Filter wurden zwischen 100 und 1000 KBE/ml ermittelt. Durch die Filterpassage wurden die Koloniezahlen in allen Säulen etwas vermindert.

Die höhere Bioaktivität bei den mit Oberflächenwasser betriebenen Filter lässt sich auch an der Esteraseaktivität ablesen. In der Abbildung 32 ist die im Ablauf der Filtersäule gemessene Esteraseaktivität als FDA-Umsatz dargestellt. Eine Hemmung durch die Dosierung der Arzneistoffe lässt sich nicht erkennen (Beginn der Dosierung 25.11.). Betrachtet man nur die Daten nach dem Beginn des Ibuprofen-Abbaus (etwa 5.12.) so lässt sich in den beiden mit Oberflächenwasser betriebenen Säulen in der Tendenz ein leichtes Ansteigen der Esteraseaktivität erkennen. Ob es sich hier tatsächlich auf die eine Erhöhung der mikrobiellen Aktivität als Folge des Abbaus von Ibuprofen handelt oder ob die Werte in der Schwankungsbreite der Methode liegen, kann nach den vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

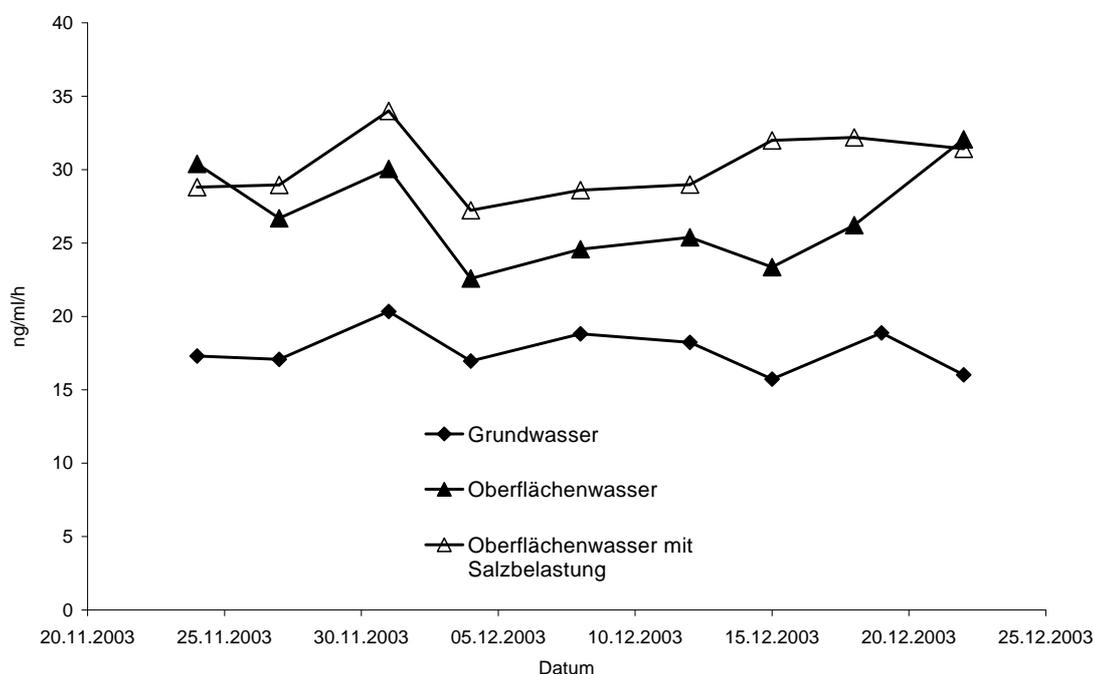
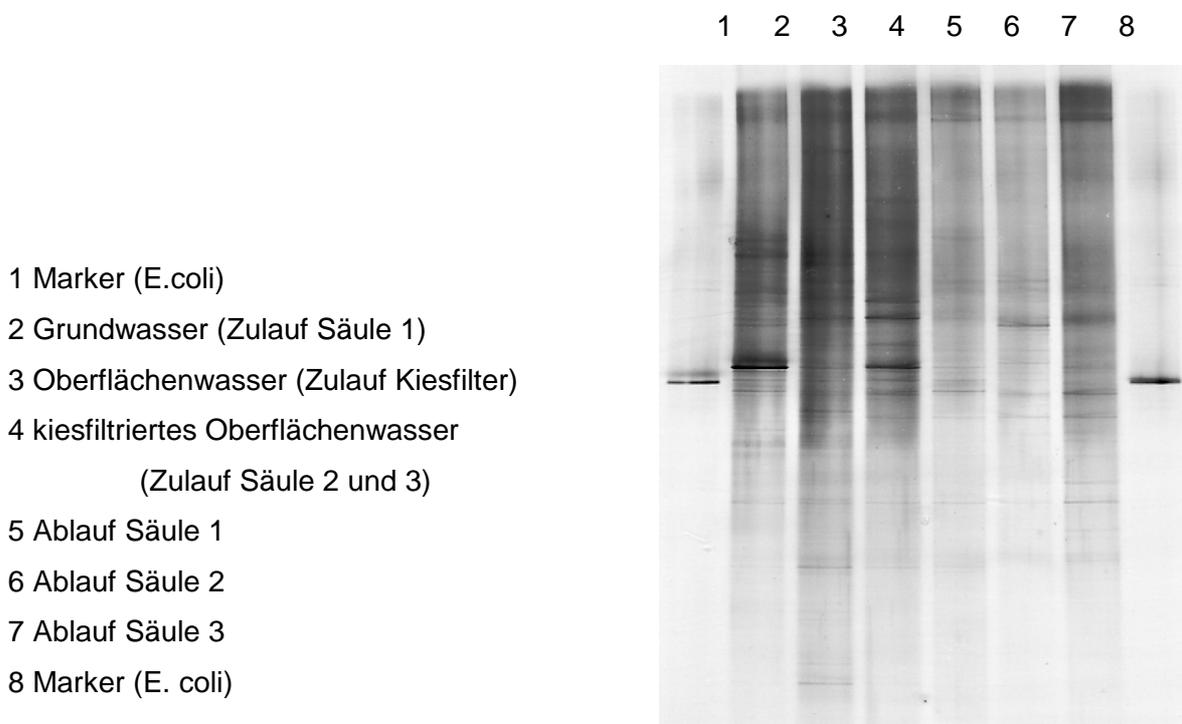


Abb. 32: Esteraseaktivität als FDA-Umsatz in den Abläufen der mit Grund- und Oberflächenwasser betriebenen Filter der 1. Versuchsserie

In der Abbildung 33 ist das DGGE-Gel mit den Säulenzu- und -abläufen dargestellt



- 1 Marker (E.coli)
- 2 Grundwasser (Zulauf Säule 1)
- 3 Oberflächenwasser (Zulauf Kiesfilter)
- 4 kiesfiltriertes Oberflächenwasser
(Zulauf Säule 2 und 3)
- 5 Ablauf Säule 1
- 6 Ablauf Säule 2
- 7 Ablauf Säule 3
- 8 Marker (E. coli)

Abb. 33: DGGE-Gel mit amplifizierter DNA aus Proben der Filterzu- und abläufe der 1. Versuchsserie

Im Idealfall entspricht jede Bande in einer Spur einer Spezies, in der Praxis kommt es aber zu Überlagerungen. Trotz dieser Einschränkung sind Zahl und Intensität der Banden ein Maß für die mikrobielle Diversität in einer Probe. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurde der so genannte Sørensen-Index berechnet. Hierzu werden die Zahl der Banden in den beiden Spuren, die miteinander verglichen werden sollen, ins Verhältnis gesetzt zu der Zahl der den beiden Spuren gemeinsamen Banden. Sørensen-Indices über 0,6 lassen auf eine sehr hohe Ähnlichkeit der Proben schließen, solche zwischen 0,4 und 0,6 zeigen eine mittlere Ähnlichkeit. Bei Werten von unter 0,3 wird davon ausgegangen, dass die Proben sich nicht ähneln.

Mit einem Sørensen-Index von 0,69 zeigten die beiden mit Oberflächenwasser betriebenen Säule eine recht hohe Ähnlichkeit. Ein Vergleich dieser beiden Filterabläufe mit dem des mit Grundwasser betriebenen Testfilter ergab Sørensen-Indices von 0,46 bzw. 0,53, also eine mittlere Ähnlichkeit.

Die acht Proben die als Zeitreihe in regelmäßigen Abständen über 4 Wochen hinweg genommen wurden, wiesen untereinander nur eine mittlere Ähnlichkeit auf.

4.3 Diskussion

Die Abbaubarkeit der Modellstoffe wurde in Batch- und Säulenversuchen unter unterschiedlichen Randbedingungen getestet. Die Untersuchungen haben die bisherigen Erfahrungen bestätigt, dass allein die mikrobiologischen Prozesse entscheidend für die Konzentrationsverminderung der untersuchten Arzneistoffe sind, während Sorption und chemischer Abbau keine Rolle spielen. Carbamazepin erwies sich einem biologischen Abbau auch dann nur wenig zugänglich (<20%), wenn ein Milieu geschaffen wurde, das optimale Bedingungen für mikrobielle Stoffwechselaktivitäten bietet. Für die anderen Stoffe lassen sich Randbedingungen definieren, unter denen ein Abbau möglich ist:

Diclofenac

Abbau in:

- sehr aktivem Milieu, bei hohen Konzentrationen, mit langen Kontaktzeiten und einer Adaptation von mindestens 8 Wochen

Ibuprofen

Abbau in:

- Oberflächenwasser nach 3 Wochen Adaptation
- mit Oberflächenwasser betriebenen Sandfiltern bereits nach 1 Woche - aber nur, wenn keine leichter zugängliche Kohlenstoffquelle vorhanden ist
- sehr aktivem Milieu, bei hohen Konzentrationen, mit langen Kontaktzeiten und einer Adaptation von mindestens 8 Wochen

Sulfamethoxazol

Abbau in:

- Grund- und Oberflächenwasser nach 3 Wochen Adaptation
- sehr aktivem Milieu, bei hohen Konzentrationen, mit langen Kontaktzeiten und einer Adaptation von mindestens 6 Wochen.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse aller Versuche in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Übersicht über das Abbauverhalten bei unterschiedlichen Versuchsansätzen

	Batch-Versuche		Säulenversuche					
	Grundwasser	Kläranlagen beeinflusstes Oberflächenwasser	Grundwasser ³	Oberflächenwasser ³	Oberflächenwasser + Salz ³	Oberflächenwasser Langzeit	Oberflächenwasser + Kreislaufbetrieb ⁴	
Wirkstoffe¹								
Sulfamethoxazol								
Carbamazepin								
Ibuprofen								
Diclofenac								
Metaboliten²								
Diol-CBZ		keine gesicherte Aussage möglich						
Ac-SFM								
Glucu-SFM								
OH-IBU								

	= nicht untersucht
	= kein bzw. geringer Abbau
	= Abbau
	= Abbau bis unter die Nachweisgrenze
	= Bildung

¹ Dauer des Batchversuchs 22 Wochen

² Dauer des Batchversuchs 14 Wochen

³ Filtermaterial Sand, Filtergeschwindigkeit 5 cm/h, Dosierung 100 µg/l je Wirkstoff

⁴ Filtermaterial Sand, Filtergeschwindigkeit 5 cm/h, Dosierung bis ca. 3 mg/l je Wirkstoff

Die Ergebnisse zeigen, dass ein mikrobieller Abbau von Sulfamethoxazol, Ibuprofen und Diclofenac möglich ist, allerdings ein sehr stoffwechselaktives Milieu erfordern. Ob sich ein solches Milieu ausbildet, ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Die sich im Hinblick auf den Abbau von Ibuprofen widersprechenden Ergebnisse an den unterschiedlich lange betriebenen Oberflächenwasser-Säulen in den beiden Versuchsserien weisen darauf hin, dass auch Veränderungen von Milieubedingungen, die sich nur indirekt zeigen lassen, zu einem veränderten Abbauverhalten führen. In gleicher Weise sind auch die Widersprüche zu der Arbeit von PREUSS et.al. 2001 zu werten, die in einer sehr ähnlichen Versuchsanordnung einen guten Abbau von Diclofenac und Ibuprofen mit relativ kurzen Adaptationsphasen fand.

Auch molekularbiologische Untersuchungen, die im Rahmen eines anderen am IfW durchgeführten Forschungsvorhabens an parallel betriebenen Filtern durchgeführt wurden, zeigten

deutliche Unterschiede in den Besiedlungsmustern. Hier wurde davon ausgegangen, dass bei der Ausbildung der Besiedlung in den Filtern neben messbaren Faktoren auch die Zufallsgröße, welche Organismen sich zuerst ansiedeln, eine Rolle spielt (JARGSTORF 2004). Sufamethoxazol, das im Allgemeinen als schlecht abbaubar gilt und von FÄRBER et al. 2004 als mögliche Tracersubstanz für allgemeine Antibiotikabelastungen von Wässern vorgeschlagen wird, wurde in den hier beschriebenen Bedingungen im Batch-Versuch sogar in dem biologisch weniger aktiven Grundwasser abgebaut, im Säulenversuch allerdings nur unter optimalen Bedingungen.

Literatur

- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (1993): OECD Guidelines for the testing of chemicals, Vol. 2., Part 3, 302C, Paris.
- Obst, U., Holzappel-Pschorn, A. (1988) : Enzymatische Tests für die Wasseranalytik. R. Oldenbourg Verlag, München.
- Kilb, B., Kuhlmann, B., Eschweiler, B., Preuß, G., Ziemann, E., Schöttler, U. (1998): Darstellung der mikrobiellen Besiedlungsstruktur verschiedener Grundwasserhabitats durch Anwendung molekularbiologischer Methoden. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 26, 349-354.
- Preuß, G., Willme, U., Ziemann, E., Zullie-Seibert, N. (1999): Abbauverhalten ausgewählter Arzneimittel in Batchkulturen mit natürlichem Oberflächen- und Grundwasser. in: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed), Jahrestagung 1999. Kurzreferate und Teilnehmerverzeichnis, 224-226.
- Preuß, G., Willme, U., Zullei-Seibert, N. (2001): Verhalten ausgewählter Arzneimittel bei der künstlichen Grundwasseranreicherung - Eliminierung und Effekte auf die mikrobielle Besiedlung. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 29 (5), 269-277.
- Jargstorf, A. (2004): Vergleichende Studie zur Anwendung biologischer und physikalisch-chemischer Parameter bei der Bestimmung der Grundwasserqualität. Diplomarbeit Universität Rostock
- Färber, H., Skutlarek, D., Alberti, J., Reupert, R. (2004): Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen. *GWA* 193, 24/1 – 24/16.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Nach Auswertung der Tests mit Realwässern ist festzustellen, dass die eingesetzten Naturflächmembranen, speziell das Goldschlägerhäutchen, in Wässern zur Abreicherung von Arzneiwirkstoffen einsetzbar sind, die keine oder nur eine geringe mikrobiologische Aktivität aufweisen. Zunehmende Aktivität fördert aber die Instabilität dieser Naturmembranen, weshalb sie damit für technische Klärprozesse nur nach Vorschaltung eines Desinfektions- oder Filtrationsschrittes bedingt geeignet sein könnten.

Mit trägergestützten Flüssigmembransystemen lassen sich Spurengehalte der polaren, aciden Komponenten Ibuprofen und Diclofenac mit sehr hohen Anreicherungsfaktoren aus Oberflächenwässern abtrennen und mit chromatographischen Methoden quantifizieren. Damit zeigen sich Perspektiven auf, SL-Membranen als Drei- oder auch als Zweiphasensysteme für hochpolare Komponenten – auch in Gegenwart natürlicher Oligomere und Polymere (Huminstoffe) - zur selektiven Anreicherung einzusetzen. Es ist festzustellen, dass die SLM-Extraktion mit PP-Beuteln deutliche Vorteile gegenüber der klassischen Festphasenextraktion bietet (höhere Anreicherungsfaktoren, Clean-up Effekt, niedrige Verbrauchskosten und geringerer Zeitaufwand). Prinzipiell sind neben analytischen auch technische Anwendungen der SLM-Systeme denkbar.

Die durchgeführten Batch- und Säulenversuche zeigten unter „normalen“ Randbedingungen Ergebnisse zum Verhalten der Modellstoffe, die mit den bisherigen Erfahrungen aus der Praxis und anderweitigen Untersuchungen übereinstimmen. Die initiierte Erhöhung der mikrobiologischen Aktivität sowie die Verlängerung der Kontaktzeit im Kreislaufbetrieb ermöglichten dagegen einen Abbau der sonst persistenten Verbindungen. Wichtige neue Erkenntnisse wurden auch zur Bildung und zum Verhalten von Metaboliten gewonnen. Hohe mikrobiologische Aktivität führt auch hier zu einer Umsetzung der identifizierten Abbauprodukte, die allerdings nach frühestens 7 Tagen einsetzte.

Übertragen auf den herkömmlichen Kläranlagenbetrieb mit deutlich kürzeren Aufenthaltszeiten und dem Vorhandensein weiterer Kohlenstoffquellen bedeutet dies, dass die Wahrscheinlichkeit eines biologischen Abbaus während der konventionellen Abwasserreinigung gering ist. Gleichzeitig geben die Versuche erste Hinweise auf Möglichkeiten, die biologische

„Reaktoren“ als modulare Bestandteile einer bausteinorientierten Abwasserreinigung bieten können.

Um die erzielten Ergebnisse für die Abwasserreinigung gezielt nutzen zu können, sollten weitere Untersuchungen an einer modular konzipierten Versuchskläranlage angeschlossen werden, die sowohl eine biologisch optimierte Stufe mit anschließender Verminderung der Zahl der Mikroorganismen als auch eine Membranstufe enthalten sollte. Abbau und Neubildung von Metaboliten sowie die (intermediäre) Rückbildung von Wirkstoffen wären dabei zwingend zu berücksichtigen. Denn die Untersuchungen verdeutlichen, dass Massenbilanzierungen, die sich ausschließlich auf die „Eliminierung“ applizierter und ausgeschiedener Arzneiwirkstoffe stützen – ohne Einbeziehung von Metaboliten mit u.U. höherer human- und ökotoxikologischer Relevanz -, zwangsläufig fragmentarisch sind.

Paderborn, 17.12.2004

gez. Prof. Dr. M. Grote

LSF Langsamsandfilter

- 1) Umweltbundesamt (2003)
- 2) Mutschler et al. (2001)
- 3) Todt et al. (1988)
- 4) Buser et al. (1998)
- 5) Preuß et al. (2001)
- 6) Martindale (1997)
- 7) Stumpf et al. (1998)
- 8) Buser et al. (1999)
- 9) Lindner et al. (2003)
- 10) Zwiener et al. (1999)
- 11) ARGE Elbe (2003)
- 12) Ternes (1998)
- 13) Möhle et al. (1999a)
- 14) Stamatelatou et al. (2003)
- 15) Grünenthal GmbH (1999)
- 16) Al-Ahmad et al. (1999)
- 17) Poiger et al. (2001)
- 18) Tixier et al. (2003)
- 19) Packer et al. (2003)
- 20) Andreozzi et al. (2003)
- 21) Mersmann et al. (2003)
- 22) Ternes et al. (2002)
- 23) Ternes (2000)
- 24) Carballa et al. (2003c)
- 25) Khan et al. (2004)
- 26) Carballa et al. (2003b)
- 27) Hirsch et al. (1999)
- 28) Ternes et al. (2003a)
- 29) Dohmann (2004)
- 30) Gnirrs et al. (2003)
- 31) Kümmerer (2000)
- 32) Färber et al. (2004)
- 33) Heberer (2002a)
- 34) Heberer (2002b)
- 35) Carballa et al. (2003a)
- 36) Carballa et al. (2004)
- 37) Schrey et al. (1999)
- 38) Schmidt (2004)

- Al-Ahmad, A., Daschner, F. D., Kümmerer, K. (1999): Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37 (2), 158-163
- Alexy, R., Lange, F. T., Metzinger, M., Wenz, M., Sommer, A., Kümmerer, K. (2003): Verbrauch und Umweltkonzentrationen von Antibiotika. In: *Wasserchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Jahrestagung 2003. Kurzreferate.* Stade, 143-147.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Paxeus, N. (2003): Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319-1330
- ARGE Elbe (Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe). (2003): *Arzneistoffe in der Elbe.*
- AWWR Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke an der Ruhr, Ruhrverband. (1996): Untersuchungen zu Medikamentenrückständen in der Ruhr - Vorkommen und Identifizierung von Clofibrinsäure und anderen Medikamentenrückständen. In: *Ruhrwassergüte 1995.* Eigenverlag, Essen, 84-86.
- Baxendale, J. H., Wilson, J. A. (1957): Photolysis of hydrogen peroxide at high light intensities. *Transactions of the Faraday Society* 53, 344-356
- Biffel, W., Proksch, E., Haberl, R., Gehringer, P., Urban, W., Szinowatz, W. (1993): *Wasserwirtschaft Wasservorsorge. Forschungsarbeiten: Einsatz von Strahlung und Ozon in der Abwassertechnik zur Reduktion biologisch schwer abbaubarer Abwasserinhaltsstoffe.* Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wien.
- BLAC Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit. (2003): *Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Bericht vom 6. November 2003.* Hamburg.
- Buser, H. R., Poiger, T., Müller, M. D. (1998): Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science & Technology* 32 (22), 3449-3456
- Buser, H. R., Poiger, T., Müller, M. D. (1999): Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug Ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental Science & Technology* 33 (15), 2529-2535
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., Garcia, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Terres, T. A. (2003a): Verhalten von Pharmazeutika und Personal Care Products in einer Kläranlage im Nordwesten Spaniens (Galicien). In: *POSEIDON Symposium. Presentation of Project Results. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse.* Braunschweig, 04.-05.11.2003. 66

- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M. (2003b): Entfernung von Pharmazeutika und Personal Care Products mit Hilfe von physiko-chemischen Prozessen in städtischem Abwasser. In: POSEIDON Symposium. Presentation of Project Results. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. Braunschweig, 04.-05.11.2003. 73
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M. (2003c): Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPS) from municipal wastewaters by physico-chemical processes. *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry* 2 (2), 1-5
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T. A. (2004): Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* 38, 2918-2926
- Clara, M., Mc Ardell, C., Alder, A. C., Göbel, A., Joss, A., Keller, E., Kreuzinger, N., Plüss, H., Siegrist, H., Strenn, B. (2003): Einfluss des biologischen Reinigungsverfahrens illustriert anhand von Massenbilanzen ausgewählter Mikroverunreinigungen. In: POSEIDON Symposium. Presentation of Project Results. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. Braunschweig, 04.-05.11.2003. 50
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N. (2004): Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research* 38, 947-954
- Daughton, C. G., Ternes, T. A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107 (6), 907-937
- Dohmann, M. (2004): Massnahmen zur Verringerung der Gewässerbelastung durch Arzneimittelrückstände und Umweltchemikalien. In: Dohmann, M. (ed.), *Gewässerschutz-Wasser-Abwasser* Bd. 193: 37. Essener Tagung für Wasser- und Abfallwirtschaft vom 24.-26.03.2004. Gesellschaft zur Förderung der Siedlungswasserwirtschaft an der RWTH Aachen e. V., Aachen, 25-1-25/12.
- Färber, H., Skutlarek, D., Alberti, J., Reupert, R.-R. (2004): Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen. In: Dohmann, M. (ed.), *Gewässerschutz-Wasser-Abwasser* Bd. 193: 37. Essener Tagung für Wasser- und Abfallwirtschaft vom 24.-26.03.2004. Gesellschaft zur Förderung der Siedlungswasserwirtschaft an der RWTH Aachen e. V., Aachen, 24-1-24/16.
- Frechen, F.-B. (2004): Bedeutung der Membrantechnik für die künftige kommunale Abwasserbehandlung. In: Dohmann, M. (ed.), *Gewässerschutz-Wasser-Abwasser* Bd. 193: 37. Essener Tagung für Wasser- und Abfallwirtschaft vom 24.-26.03.2004. Gesellschaft zur Förderung der Siedlungswasserwirtschaft an der RWTH Aachen e. V., Aachen, 11-1-11/12.

- Gans, O., Sattelberger, R., Scharf, S. (2002): Ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe in Zu- und Abläufen kommunaler österreichischer Kläranlagen. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser, Band 98. Wiley-VCH, Weinheim, 165-176.
- Gnirrs, R., Lesjean, B., Buisson, H., Zuehlke, S., Duennbier, U. (2003): IMF - Membranbelebungsverfahren: Kosteneffektive Abwasserreinigung mit dem Membranbelebungsverfahren für dezentrale Standorte. In: Kompetenzzentrum Wasser Berlin (ed.), Conference Wasser Berlin 2003.
- Greunig, H.-J. (1996): UV-Oxidation zur Grundwasser-, Deponie-Sickerwasser- und Industrie-Abwasserreinigung. Wasser & Boden 48 (5), 17-21
- Grünenthal GmbH. (1999): Fachinformation zu Supracombin (Kombinationspräparat aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim). Aachen.
- Heberer, T. (2002a): Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. Journal of Hydrology 266, 175-189
- Heberer, T. (2002b): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters 131, 5-17
- Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K., Kratz, K.-L. (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The Science of the Total Environment 225, 109-118
- Hopf, W. (1968): Anwendung von Ozon und Aktivkohle bei der Trinkwasseraufbereitung. In: Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen (ed.), Gewässerschutz - Wasser - Abwasser Bd.2. Krupinski, Mondorf, 133-142.
- Joss, A., Alder, A. C., Göbel, A., Goosse, P., Keller, E., McArdell, C., Siegrist, H. (2004): Verbesserte Abwasserreinigung durch Membranen: Wegweisender Technologiedurchbruch oder Luxuslösung? In: EAWAG Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung Abwasserreinigung und Gewässerschutz (ed.), Jahresbericht 2003. Eigenverlag, Dübendorf, Schweiz, 19-20.
- Khan, S. J., Ongerth, J. E. (2004): Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. Chemosphere 54, 355-367
- Kolb, M., Müller, B., Funke, B. (1987): Entfärbung von textilem Abwasser mit Ozon. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser - 69.Band - 1987. Verlag Chemie, Weinheim, 217-224.
- Koppe, P., Herkelmann, H., Sebesta, G. (1976): Die Behandlung des Abwassers einer Zellstoff- und Papierfabrik mittels Ozon und Belebtschlammverfahren. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser - 46.Band - 1976. Verlag Chemie, Weinheim, 221-240.
- Kümmerer, K. (2000): Abbau von Arzneimitteln in Testsystemen und Möglichkeiten zur Emissionsreduktion. In: Schriftenreihe Wasserforschung Bd. 6: Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen. Berlin, 165-178.

- Lindner, K., Knepper, T. P., Müller, J., Karrenbrock, F., Rörden, O., Juchem, H., Brauch, H.-J., Sacher, F. (2003): IAWR Rhein-Themen. Band 5: Bestimmung und Beurteilung der mikrobiellen Abbaubarkeit von organischen Einzelstoffen bei umweltrelevanten Konzentrationen in Gewässern. Abschlußbericht. Eigenverlag,
- Martindale, M. (1999): Analgetics, anti-inflammatory drugs and antipyretics - Ibuprofen. In: Parfitt, K. (ed.), *The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, London,
- Merkel, W. (2004): Arzneimittelrückstände in der aquatischen Umwelt. *gwf Wasser Abwasser* 145 (5), 326-335
- Mersmann, P., Scheytt, T., Heberer, T. (2003): Säulenversuche zum Transportverhalten von Arzneimittelwirkstoffen in der wassergesättigten Zone. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 30 (5-6), 275-284
- Möhle, E., Metzger, J. W., Kempter, C., Kern, A. (1999a): Untersuchungen zum Abbau von Pharmaka in kommunalen Kläranlagen mit HPLC-Electrospray-Massenspektrometrie. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 27 (614), 430-436
- Möhle, E., Horvath, S., Merz, W., Metzger, J. W. (1999b): Bestimmung von schwer abbaubaren organischen Verbindungen im Abwasser - Identifizierung von Arzneimittelrückständen. In: *Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker* (ed.), *Vom Wasser* Band 92. Wiley-VCH, Weinheim, 207-224.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001): *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Packer, J. L., Werner, J. J., Latch, D. E., McNeill, K., Arnold, W. A. (2003): Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences* 65 (4), 342-351
- Poiger, T., Müller, M. D., Buser, H. R. (2001): Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (2), 256-263
- Preuß, G., Willme, U., Zullei-Seibert, N. (2001): Verhalten ausgewählter Arzneimittel bei der künstlichen Grundwasseranreicherung - Eliminierung und Effekte auf die mikrobielle Besiedlung. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 29 (5), 269-277
- Reicherter, U. F., Sontheimer, H. (1973): Untersuchungen zur Anwendung von Ozon bei der Wasser- und Abwasserreinigung. In: *Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker* (ed.), *Vom Wasser* - 41. Band - 1973. Verlag Chemie, Weinheim, 369-380.
- Reissig, H., Jentsch, T., Fischer, R. (1991): Untersuchungen zum Abbau von Farbstoffen der textilveredelnden Industrie mittels UV-Strahlung und Ozon bzw. Wasserstoffperoxid. In: *Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen* (ed.), *Gewässerschutz - Wasser - Abwasser* Nr.125. GFA, Aachen, 275-304.
- Ried, A., Mielke, J. (2002): Ozonanwendungen im Bereich Prozeß- und Abwasseraufbereitung. In: *Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker* (ed.), *Vom Wasser*, Band 98. Wiley-VCH, Weinheim, 117-132.

- Ried, A., Mielke, J., Kampmann, M., Ternes, T. A., Herrmann, N., Teiser, B. (2003): Entfernung von persistenten und endokrinen Stoffen aus Kläranlagenabläufen. In: POSEIDON Symposium. Presentation of Project Results. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. Braunschweig, 04.-05.11.2003. 76
- Ruck, W. (1993): Die Ozonung von biologisch gereinigtem Abwasser. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser - 80. Band - 1993. Verlag Chemie, Weinheim, 253-272.
- Sacher, F., Lochow, E., Bethmann, D., Brauch, H. J. (1998): Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser. Band 90. Wiley-VCH, Weinheim, 233-243.
- Scherb, K., Bauer, H. (1978): Der Einsatz von Ozon zur Nachbehandlung von biologisch vorgereinigtem Abwasser. In: Bayerische Landesanstalt für Wasserforschung (ed.), Moderne Abwasserreinigungsverfahren. R. Oldenbourg Verlag, München und Wien, 195-202.
- Schmidt, C. K. et al. (2004): Assessing the impact of different redox conditions and residence times on the fate of organic micropollutents during river bank filtration. In: 4th International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, Minneapolis, Minnesota. Tagungsbericht.
- Schrey, P., Wilhelm, M. (1999): Arzneimittel-Literaturstudie. Teil I. In: DVGW Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e. V. (ed.), DVGW-Schriftenreihe Wasser Nr. 94 Rückstände von Arzneimitteln in Wasserproben – Befunde und deren Bewertung aus Sicht der Trinkwasserversorgung. Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, 1-70
- Schröder, H. F. (2003): Abwasserreinigungsverfahren zur verbesserten Elimination pharmazeutischer und endokrin wirksamer Reststoffe. In: Track, T., Kreysa, G. (eds.), Spurenstoffe in Gewässern. Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen. Wiley-VCH GmbH & Co., DEHEMA, Weinheim, 153-172.
- Siegrist, H. (2003): Mikroverunreinigungen - Abwasserentsorgung vor neuen Anforderungen? EAWAG news 57d (9), 7-10
- Stamatelatos, K., Frouda, S., Founzoulakis, M. S., Drilla, P., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2003): Pharmaceuticals and health care products in wastewater effluents: The example of carbamazepine. Water Science and Technology: Water Supply 3 (4), 131-137
- Stierlin, H., Faigle, J. W. (1979): Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. Xenobiotica 9, 611-621
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Haberer, K., Seel, P., Baumann, W. (1996): Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser Band 86. VCH, Weinheim, 291-303.

- Stumpf, M., Ternes, T. A., Haberer, K., Baumann, W. (1998): Isolierung von Ibuprofen-Metaboliten und deren Bedeutung als Kontaminanten der aquatischen Umwelt. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Vom Wasser Band 91. VCH, Weinheim, 291-304.
- Ternes, T. A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat. Res.* 32 (11), 3245-3260
- Ternes, T. A. (2000): Arzneimittelrückstände in deutschen Abwässern und Gewässern. *WAP* (1), 12-18
- Ternes, T. A. (2001): Vorkommen von Pharmaka in Gewässern. *Wasser & Boden* 53 (4), 9-14
- Ternes, T. A., Meisenheimer, M., Brauch, H. J., Haist-Gulde, B., Sacher, F., Preuß, G., Willme, U., Zullei-Seibert, N., Mc Dowell, D. (2002): Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment: A first approach. *Environmental Science and Technology* 36 (17), 3855-3863
- Ternes, T. A., Stüber, J., Herrmann, N., Mc Dowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. (2003a): Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research* 37 (7), 1976-1982
- Ternes, T. A., Mc Dowell, D., Huber, M. M., von Gunten, U. (2003b): Abbau von Pharmaka durch Ozonung: Identifizierung von Oxidationsnebenprodukten für Carbamazepin und diclofenac. In: POSEIDON Symposium. Presentation of Project Results. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. Braunschweig, 04.-05.11.2003. 57
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., Müller, S. R. (2003): Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naxoprofen in surface waters. *Environmental Science and Technology* 37 (6), 1061-1068
- Todt, P. A., Sorkin, E. M. (1988): Diclofenac sodium - A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 35, 244-285
- Umweltbundesamt. (2003): Umweltsicherheit von Arzneimitteln. In: Jahresbericht 2002. Eigenverlag, Berlin, 32-38.
- Weber, L., Ternes, T. A., Janex-Habibi, M.-L., von Gunten, U. (2003): Entfernung von PPCPs im Wasserwerk: Eine Bewertung der Aufbereitungsprozesse. In: POSEIDON Symposium. Presentation of Project Results. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse. Braunschweig, 04.-05.11.2003. 59
- Zwiener, C., Hesse, S., Frimmel, F. H. (1999): Beurteilung der biologischen Eliminierbarkeit von Arzneimittelrückständen in Wasser. In: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (ed.), Jahrestagung 1999. Kurzreferate und Teilnehmerverzeichnis. 59-61.