

Abschlussbericht zum Projektauftrag Nr. 31206

Berichtszeitraum: 1. Juni 2001 – 17. Dezember 2002

**„Vergleichende Untersuchungen zur Anreicherung von Arzneiwirkstoffen und ihrer
Hauptmetaboliten aus Wässern
mit Membranen“**

Auftragnehmer:

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

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

E-mail: mg@chemie.upb.de

Projektpartner:

? Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie (ISAS)
Bunsen-Kirchhoff- Straße 11
44139 Dortmund

Ansprechpartner: Dr. Jürgen Nolte

INHALTSVERZEICHNIS

- 1 Einleitung und Zielsetzung**
- 2 Untersuchungsmethodik: Entwicklung der Testsysteme**
 - 2.1 Auswahl der Arzneiwirkstoffe
 - 2.2 Auswahlkriterien für Membrantypen
 - 2.3 Messmethodik
- 3 Experimentelle Durchführung und Ergebnisse**
 - 3.1 Biologische Festmembranen (ISAS Dortmund)**
 - 3.1.1 Experimentelles
 - 3.1.2 Analytik
 - 3.1.3 Allgemeine Versuchsparameter
 - 3.1.4 Membranauswahl und -eigenschaften
 - 3.1.5 Reproduzierbarkeit der Permeation
 - 3.1.6 Einfluss anderer Wasserinhaltsstoffe
 - 3.1.6.1 Oberflächenaktive Stoffe und Komplexbildner
 - 3.1.6.2 Huminstoffartige Verbindungen
 - 3.1.7 Vergleich mit technischen Membranen
 - 3.1.8 Eliminierungsoptimierung durch zusätzliche Adsorption
 - 3.2 Flüssigmembransysteme (Universität Paderborn)**
 - 3.2.1 Bulk-Flüssigmembranen
 - 3.2.1.1 Carrier-freie Systeme
 - 3.2.1.2 Basischer Carrier
 - 3.2.1.3 Saurer Carrier
 - 3.2.1.4 Metallchelate-Carrier
 - 3.2.2 Trägergestützte Flüssigmembranen (SLM)
- 4 Synthese von Hauptmetaboliten**
- 5 Zusammenfassung und Ausblick**

1. Einleitung und Zielsetzung

Durch Applikation und Exkretion von Humanarzneimitteln gelangen persistente Wirkstoffe und Metaboliten durch Direkteinleitungen oder aus Kläranlagenabläufen über den Weg der Fließgewässer in das Grund- und letztlich auch Trinkwasser. Diese Erkenntnisse resultieren u.a. aus den Berichten des Bund/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit (BLAC-Kommission 1998 und 1999 [1]. Zwar wird auf Grund der gegenwärtigen Datenlage das humantoxikologische Gefährdungspotenzial als relativ gering angesehen [2, 3, 4], im Sinne des vorbeugenden Gewässerschutzes erfordert aber die gesundheitliche und ökologische Relevanz der Arzneistoffeinträge in aquatische Umweltkompartimente nachhaltig wirksame Maßnahmen, um etwaige Risiken rechtzeitig zu erkennen und abzuwehren. Zu diesen Maßnahmen gehören:

? Eine zuverlässige Analytik zur Überwachung der Arzneiwirkstoff- und Metabolitenbelastung von Wässern, insbesondere im Zusammenhang mit der Abwasserreinigung und Trinkwassergewinnung.

? Eine zuverlässige Technologie zur Eliminierung von Arzneistoffeinträgen aus besonders belasteten Abwässern und Rohwässern.

Entwicklungsbedarf in Analytik und Technologie resultiert aus grundsätzlichen methodischen Defiziten fest-flüssig-extraktiver bzw. sorptiver Trenn- und Anreicherungsverfahren, die bei der analytischen Probenvorbereitung sowie in Teilprozessen der Abwassertechnologie angewendet werden [4, 5].

So sind mit Hilfe der Festphasenextraktion im Rahmen der Probenvorbereitung zur Bestimmung von Arzneistoffspuren mit chromatographischen Methoden (GC, HPLC, LC/MS) in Wasser (Konzentrationsbereich: ng - µg/L) bestenfalls Anreicherungsfaktoren in der Größenordnung von 100 erreichbar. Dabei lässt sich die Effektivität der Extraktionsschritte durch Auswahl geeignet chemisch modifizierter Festphasen, also durch Anpassung von Polarität und Art der Wechselwirkungen an strukturchemische Parameter des Analyten, nur in Grenzen optimieren.

Eine vergleichbare Optimierung der Sorptionseffektivität ist bei der adsorptiven Aktivkohlebehandlung von Abwässern und Rohwässern, die in der traditionellen Wasseraufbereitung durch Ionenaustauschverfahren ergänzt werden, nicht möglich.

Alternativ oder in Ergänzung zu den klassischen Extraktions- und Sorptionsverfahren bietet die *Stofftrennung mit Fest- und Flüssig-Membranen* prinzipielle Vorteile, die u.a. in der großen Flexibilität der Membraneigenschaften begründet sind [6, 7]. Die außerordentliche

Vielfalt biologischer Membranvorgänge, die Stofftransporte mit hoher Effektivität und Selektivität steuern, sind Leitbild für die Entwicklung neuartiger Membransysteme und -prozesse.

Aus diesem Grunde finden Membranverfahren ständig neue Einsatzgebiete, wie die folgenden Beispiele verdeutlichen:

- *Abwasserbehandlung* (Umkehrosmose zur Behandlung von Deponiesickerwässern; Galvanik, Abtrennung von VOCs)
- *Medizin* (Dialyse, Plasmafiltration, extrakorporale Blutwäsche),
- *Pharmaindustrie/Biotechnologie* (Reinigung von Fermentationsprodukten: Antibiotika)
- *Analytik* (Dialyse in Verbindung mit Fließinjektionsanalytik, Blotting-Techniken in Festphasen-Immunoassay-Analytik).

Damit ist das Anwendungspotenzial von Membranverfahren sowohl in der Wasseraufbereitung als auch im Bereich der analytischen Probenvorbereitung noch längst nicht ausgeschöpft [8, 9]. Bestrebungen in europäischen Nachbarstaaten, die klassische Aktivkohlebehandlung in der Trinkwasseraufbereitung durch Membranverfahren (z.B. Nanofiltration) zu ersetzen oder zu ergänzen, verdeutlicht die Aktualität der Zielsetzungen dieses Projektes. Generell ist das Anwendungspotenzial von Membranverfahren sowohl in der Wasseraufbereitung als auch im Bereich der analytischen Probenvorbereitung noch längst nicht ausgeschöpft, und offenkundig sind die bisher angewandten, synthetischen Membranen nicht in der Lage, Arzneistoffspuren aus Wässern effektiv abzutrennen [8 – 11]. Daher wurden im vorliegenden Projekt alternative, verschiedenartige Membranmaterialien- und -systeme ausgewählt, entwickelt und ihre Permeations- bzw. Stofftransporteigenschaften in Testsystemen unter Laborbedingungen untersucht. Optimierungsstrategien sollten zu effektiven Membransystemen führen, die in der Lage sind, ökotoxikologisch relevante Arzneiwirkstoffe und ihre Hauptmetaboliten aus wässrigen Proben abzureichern.

Neben Zielsetzungen für die Wasseranalytik berücksichtigt daher dieses Vorhaben auch die mögliche Anwendbarkeit der untersuchten Membrantypen bei der Behandlung pharmakabelasteter Abwässer und Oberflächenwässer sowie der Aufbereitung von Trinkwasser.

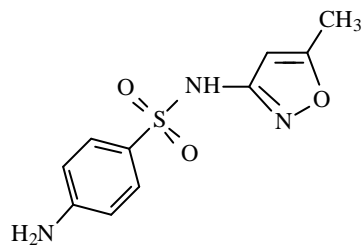
2. Untersuchungsmethodik: Entwicklung der Testsysteme

2.1 Auswahl der Arzneiwirkstoffe

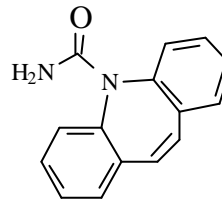
Für die Membranversuche wurden Arzneiwirkstoffe ausgewählt, die nahezu ubiquitär in relativ hohen Konzentrationen in Gewässern auftreten und auf der Basis von Abschätzungen des „potentiellen Umwelteintrages bedeutender Wirkstoffe“ und daraus ableitbarer Abwasserkonzentrationen [2, 4, 5] als ökologisch relevant gelten:

- **Sulfamethoxazol** (Antibiotikum, Abk. **SFM**)
- **Carbamazepin** (Antiepileptikum, **CBZ**)
- **Diclofenac** (Antiphlogistikum, **DCF**)
- **Ibuprofen** (Antiphlogistikum, **IBU**)

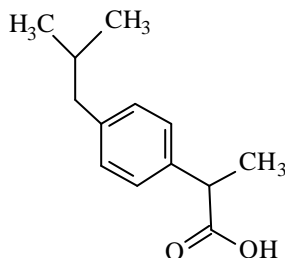
Diese Wirkstoffe sind durch polare basische (Carbamazepin), basische und saure (Sulfamethoxazol, Diclofenac) sowie saure Gruppen (Ibuprofen) charakterisiert (**Abb. 1**), woraus sich die auszuwählenden, grundlegenden Typen für prinzipiell geeignete Fest- und Flüssigmembransysteme ergeben.



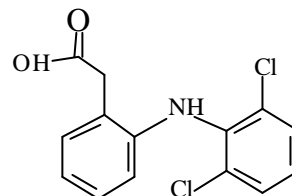
Sulfamethoxazol



Carbamazepin



Ibuprofen



Diclofenac

Abb. 1 Strukturen der Leitwirkstoffe

Auch die im Rahmen des Projektes zu synthetisierenden **Hauptmetaboliten** (s. Kap. 4) der ausgewählten Pharmaka sind ebenfalls in aquatischen Kompartimenten nachgewiesen worden [2]. Dazu zählen folgende Verbindungen:

- **Carbamazepin**-N-glucuronid
- 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin

- **Sulfamethoxazol**-N1-glucuronid
- N4-Acetyl-sulfamethoxazol

- 4-Hydroxy-**diclofenac**

- **Ibuprofen-Metabolite:**
- (+)2,4'-(2-Hydroxy-2-methylpropyl)-phenylpropionsäure (frei und konjugiert)
- (+)2,4'-(2-Hydroxy-2-carboxypropyl)-phenylpropionsäure (Konjugat)

2.2 Auswahlkriterien für Membrantypen

Als wesentliche Kriterien für die Auswahl einer Membran bei einem speziellen Trennproblem gelten die *Permeationseigenschaften* sowie der *Trennmechanismus*. Im Falle technischer Anwendungen sind ebenso *Stabilität* (mechanisch, chemisch) und *Kompatibilität* (Fouling-Effekte) wichtige Faktoren.

Folgende Trennmechanismen sind bei **synthetischen Festmembranen** als Flach- oder Hohlfasermembran unterscheidbar [7]:

- Siebwirkung auf Grund unterschiedlicher Molekülgröße
- Trennung auf Grund von Ladungsunterschieden (Elektrolyte / Nichteletrolyte)
- Trennung auf Grund von Löslichkeitsunterschieden in der Membranphase (z.B. Unterschiede in der Polarität; bzw. Lipo- und Hydrophilie)

Hohlfasermembranen, die primär als Kapillarfilter wirken, können nach chemischer Oberflächenmodifikation ebenso durch Ionenaustauschreaktionen und Metallchelatformung Trenneffekte bewirken.

Zu fordern sind im technischen Anwendungsbereich nach Möglichkeit hohe Stoffdurchsätze für die permeierenden Komponenten bei hoher Rückhaltung für die anzureichernden

Komponenten. Die Permselectivität der meisten synthetischen Fest-Membranen ist aber im Gegensatz zu *biologischen Fest-Membranen* erheblich geringer [3]. Zu diesen Membrantypen werden anatomisch-medizinisch verschiedene Körperhäute, wie z.B. Därme, und Lipidmembranen gezählt, die viele Zellen und ihre Organellen umschließen und physiologische Verteilungsräume voneinander trennen. In dieser Studie kamen als biologische Membranen ausschließlich **Naturdärme vom Schaf, Schwein und Rind** zum Einsatz, die in ihren Selektivitätseigenschaften den technischen Membranen überlegen sein können.

Bestimmte biologische Membranen sind in der Lage, über aktiven Transport – also gegen den Konzentrationsgradienten – oder „facilitated diffusion“ mit Hilfe von Carrier strukturspezifische Resorptionsprozesse zu erreichen. Prinzipiell analoge Carrier-Transportsysteme sind mit **Flüssig-Membranen**, „frei“ als **Bulk-Flüssigmembranen** oder als **trägergestützte Flüssigmembranen** (*Supported Liquid Membrane, SLM*), konstruierbar, die in der Technologie und auch in der Analytik zur Extraktion von Metallionen sowie schwacher organischer Säuren und Basen erprobt wurden. Die Variabilität der Zusammensetzung der Dreiphasensysteme von Flüssigmembranen ist hoch, so dass anwendungsbezogen hohe Transportraten und Selektivitäten erreichbar sind.

Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden die folgenden Membrantypen ausgewählt und von den Projektpartnern (ISAS Dortmund und Univ. Paderborn) arbeitsteilig erprobt:

ISAS:

- **Biologische Festmembranen** (Kap. 3.1)

Univ. Paderborn:

- **Flüssigmembranen (Bulk- und trägergestützte Systeme)** (Kap. 3.2).

Zusätzlich wurden an der Universität Paderborn **Metaboliten-Synthesen** durchgeführt. Es war geplant, je nach präparativem Aufwand in der Endphase des Projektes auch das Permeations- bzw. Transportverhalten dieser Verbindungen zu untersuchen.

Literatur

- [1] Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC), *Arzneimittel in der Umwelt – Konzept für ein Untersuchungsprogramm*, Hrsg.: Umweltbehörde Hamburg, Oktober 1999.
- [2] *Rückstände von Arzneimitteln in Wasserproben – Befunde und deren Bewertung aus Sicht der Trinkwasserversorgung*, Hrsg.: DVGW Bonn 1999
- [3] H. Stötzer, *Grundlagen der Arzneimittelttoxikologie*, Stuttgart, New York 1983
- [4] *Untersuchungen zu wasserwerks- und trinkwasserrelevanten Pharmaka als Grundlage für deren toxikologische Bewertung*, Abschlußbericht W 13/97 DVGW, Oktober 2000
- [5] N. Zullei-Seibert et. al, *Arzneimittelwirkstoffe und hormonelle Substanzen in der mittleren Ruhr – Vorkommen und Verhalten bei der künstlichen Grundwasseranreicherung*, Ruhrwassergüte 2000
- [6] K. Dorfner, *Ion Exchangers*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1991
- [7] R. W. Baker, *Membrane Technology and Applications*, McGraw- Hill, New York 2000
- [8] N. Megersa, J.A. Jönsson, *Trace enrichment and sample preparation of alkylthio-S-triazine herbicides in environmental waters using a supported liquid membrane technique in combination with high-performance liquid chromatography*, *Analyst*, 123 (1998), 225-231.
- [9] J. Namiesnik, T. Gorecki, *Passive Sampling in Environmental Analysis*, LC?GC Europe, September (2000), 678-683.
- [10] Chimuka, L.; Mathiasson, L.; Jönsson, J.A. (2000), *Anal. Chim. Acta*, 416:77-86.
- [11] Jönsson, J.A.; Mathiasson, L. (2001), *Advantages in Chromatography*, New York, 41:53-92.

3. Experimentelle Durchführung und Ergebnisse

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden Stammlösungen der aufgeführten Arzneiwirkstoffe im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mg/L in Feed-Lösungen der folgenden unterschiedlichen Membransysteme verwendet:

? *Zweikammerzellen für Flachmembranen:*

- **Biologische Festmembranen** (Kap. 3.1)
- **Technische Festmembranen** (Kap.3.1.7)
- **Trägergestützte Flüssigmembranen** (Kap. 3.2.2)

? *Dreiphasenrührzellen für Flüssig-Bulkmembranen* (Kap. 3.2.1)

Nach Konditionierung von Feed- und Permeat- bzw. Strip-Phase (z.B. Einstellung eines pH-Gradienten) und Einstellung der entsprechenden Betriebsparameter (z.B. Rührgeschwindigkeit, Temperatur) sind die Transportraten der Komponenten in Parallelansätzen i.d.R. über einen Zeitraum von 4 h (Flüssigmembranen) bzw. 24 h (Festmembranen) ermittelt worden. Dazu wurden in entsprechenden Zeitintervallen Aliquote aus den wässrigen und z.T. aus den organischen Phasen entnommen und die Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe bestimmt (HPLC-UV, LC/MS).

3.1 Biologische Festmembranen (ISAS Dortmund)

3.1.1 Experimentelles

Versuchsaufbau

Für diese Studie kamen als biologische Membranen ausschließlich Naturdärme zum Einsatz, die in dem nachfolgend skizzierten Versuchsaufbau eingesetzt wurden (**Abb. 2**). Die Versuchskammern können aus verschiedenen Kunststoffen ~~und~~ oder Edelstahl gefertigt sein; für Studien mit verschieden polaren Analyten ist jedoch zur Minimierung von Wandeffekten Teflon als Werkstoff gewählt worden. Er hat eine definierte Oberfläche mit einem geringen Weichmacheranteil und verhält sich von der Oberflächenstruktur her eher neutral. Die Membranfläche wurde variiert. Das Füllvolumen einer Kammer richtet sich nach der Membrangröße und liegt zwischen 150 und 450 mL. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten waren die Kammern während der Versuche mit Deckeln verschlossen.

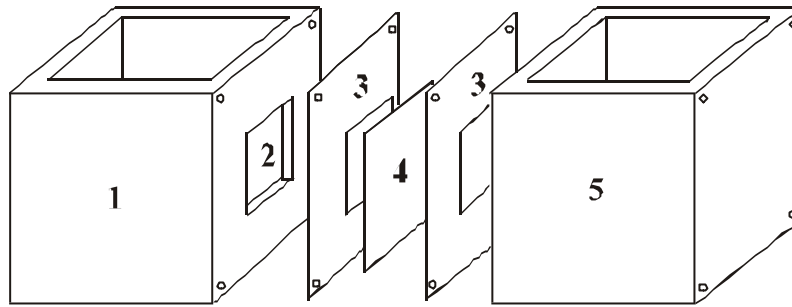


Abb. 2: Zweikammer-System für Flachmembranen

- 1 Kammer, Probenseite (Feed) 2 Fensteröffnung 3 Teflon-Dichtung
 4 Membrane 5 Kammer, Permeatseite

(In den Abbildungen zu Kap. 3.1 bedeutet **F** immer Feedseite; **P** immer Permeatseite.)

Zur Vermeidung eines Konzentrationsgefälles innerhalb einer Kammer und zur Beschleunigung der Permeation wurden beide Zellen mit Miniaturrührern bestückt, Rührgeschwindigkeit 500 U/min^{-1} . Für die überwiegende Anzahl der Versuche betrug die Dosierungskonzentration für die vier Pharmaka Sulfamethoxazol, Carbamazepin, Diclofenac und Ibuprofen jeweils 5 mg/L .

Darmtypen

Folgende Darmtypen wurden als Membranen eingesetzt:

- a. Schafdünndarm, getrocknet, ohne innere Schleimhaut
 Typ: Nova ESS Kal 55/30
 Nova ESS Sheets 50x50
- b. Blinddarm Rind, gesalzen; 25x70 cm
 Typ: Goldschlägerhäutchen (deutscher und argentinischer Herkunft)
- c. Schweinedünndarm A91M
- d. Schweinemastdarm mit innerer Fettschicht
 Typ: Schweinefettenden "spezial grün"

Die Därme sind Handelsprodukte der Fa. Jürging GmbH, Versmold.

Folgende *technische Membranen* wurden getestet:

- a. Celluloseester-Dialysemembran
 Typ: Thomapor, mit asymmetrischen Poren; MWCO 1000; 47 mm
 Fa. Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg
- b. Membranfilter $0,45 \mu\text{m}$
 Typ: Celluloseacetat OE67, hydrophil; 47 mm
 Fa. Schleicher & Schüll, Dassel

c. Hohlfaserdialysemembran

Typ: Hemoflow F7HPS, Polysulfon

Fa. Fresenius Medical Care, Bad Homburg

Geräte**HPLC-UV**

HPLC:	Gynkotheke M300
Säule:	Nucleosil 100 C ₁₈ ; 125 x 4 mm; 5 µm
Laufmittel:	60 mM NaH ₂ PO ₄ -Puffer/Acetonitril (55:45 v/v)
UV-Detektor	Spectra 100

LC/MS: *LCQ, ThermoFinnigan*

Säule:	Purosphere – RP18Ec; 150 x 1 mm, 5 µm
Laufmittel:	30 mmol NH ₄ Ac 40 %; AcN 60 % pH 5,9 isokratisch
Flow:	51 µL (Split 200 µL/51 µL)

3.1.2 Analytik (HPLC, LC/MS)

Der Nachweis der Analyte erfolgte mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion. Zur Absicherung der Ergebnisse und zur Ermittlung analytischer Detailfragen wurde die Mikro-HPLC/Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt.

Die chemisch-physikalischen Strukturmerkmale der Analyte sprechen für den bevorzugten Einsatz der Liquid-Chromatographie als Trenntechnik, die in Kombination mit der ESI-Massenspektrometrie sicher die Methode der Wahl ist. Erfahrungen aus früheren Arbeiten veranlassten uns, die Abhängigkeit der Retention und der Ionisierung vom pH-Wert zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden wässrige Proben der Arzneistoffe bei verschiedenen pH-Werten direkt in die Ionenquelle infundiert und chromatographische Trennungen mit unterschiedlich polaren Laufmitteln erprobt.

In der **Abb. 3** wird für einen vorgegebenen Acetonitril-Anteil von 40 % (v/v) deutlich, welches Ausmaß der pH-Wert des Laufmittels auf die Retentionszeit R_t und damit auf die Trennung der Analyte hat. So verachtfacht sich der R_t -Wert für Ibuprofen durch die Absenkung des pH-Wertes von 7 auf 5. Deshalb sollte die HPLC-Trennung ohne pH-Gradienten gefahren werden. Der pH-Wert der Probenlösung hat auch einen deutlichen Einfluss auf die Ionisierungsausbeute unter ESI-Bedingungen. Während Sulfamethoxazol und Ibuprofen bezogen auf die Signalintensität relativ pH-unabhängig sind, zeigen Carbamazepin und Diclofenac eine deutlich höhere Empfindlichkeit bei pH 7 als bei 5.

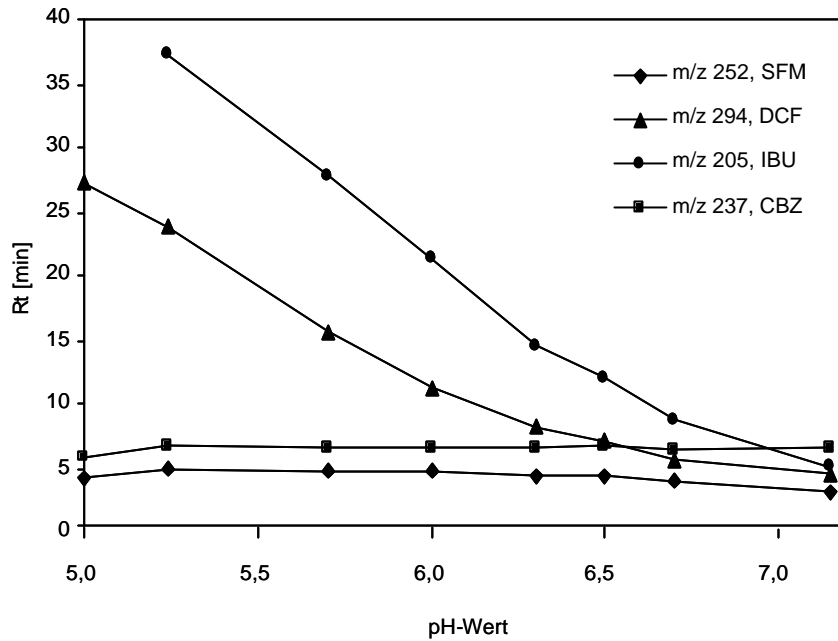


Abb. 3: Einfluss des pH-Wertes auf die Retention der Analyte

Anfängliche Studien zur Langzeitstabilität der Analyte ergaben, dass Diclofenac mit zunehmender Standzeit der Proben Oligomere bildet, ein Umstand, der besonders bei der Quantifizierung zu berücksichtigen sein wird (**Abb. 4**).

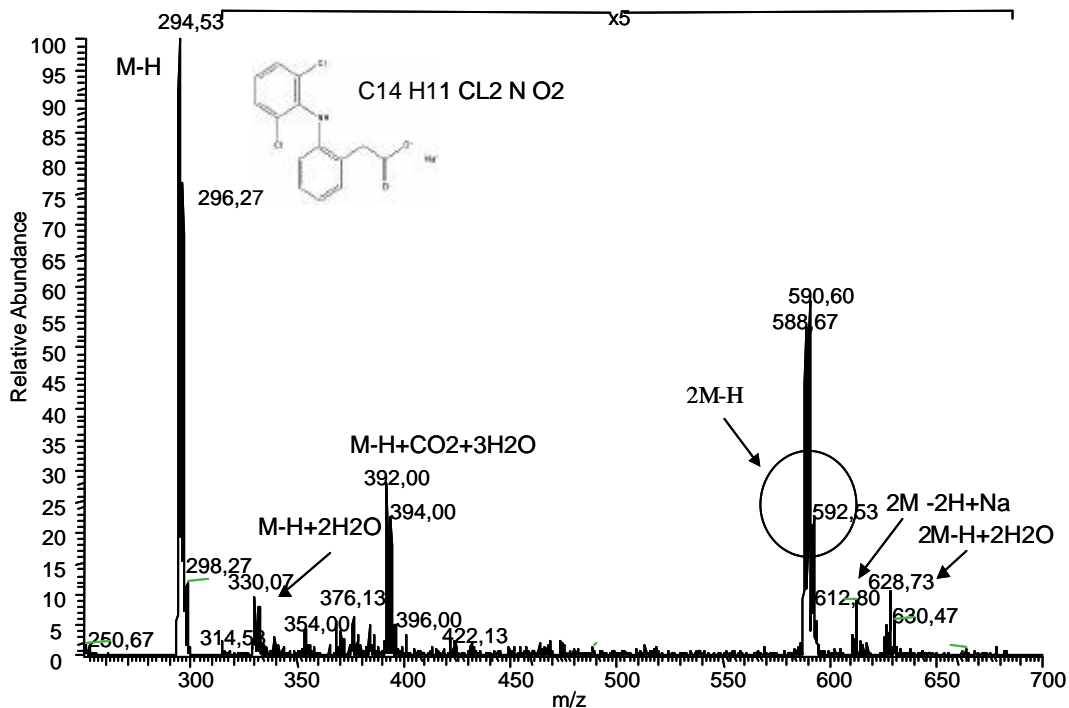


Abb. 4: Massenspektrum des Diclofenac-Dimers

3.1.3 Allgemeine Versuchsparameter

In den ersten Untersuchungsserien wurde das Permeationsverhalten der Wirkstoffe in Abhängigkeit von Rührgeschwindigkeit, Temperatur, Membranfläche, Konzentration und pH-Wert untersucht.

Bevor jedoch die einzelnen Aufgabenpunkte abgearbeitet und die Arbeitsoptima fixiert wurden, war die Frage zu beantworten, wie sich die vier Leitsubstanzen relativ zueinander verhalten. Dazu wurden bei vorgegebenem Kammerensystem mit kleinster Fensterfläche die Parameter in grob variiert und Permeationsversuche mit allen vier Analyten sowohl einzeln als auch kombiniert durchgeführt. Als Membrane wurde der Rinderblinddarm (Goldschlägerhäutchen) eingesetzt. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass trotz deutlich unterschiedlicher Strukturmerkmale die Transportraten der einzelnen Analyte so ähnlich sind (**Abb. 5**), dass es vertretbar ist, für die weiteren Versuche die Messwerte eines Messpunktes als gemeinsamen Mittelwert zu präsentieren. Dadurch ist die Übersichtlichkeit ohne Informationsverlust begünstigt. In Sonderfällen werden die Einzelwerte präsentiert.

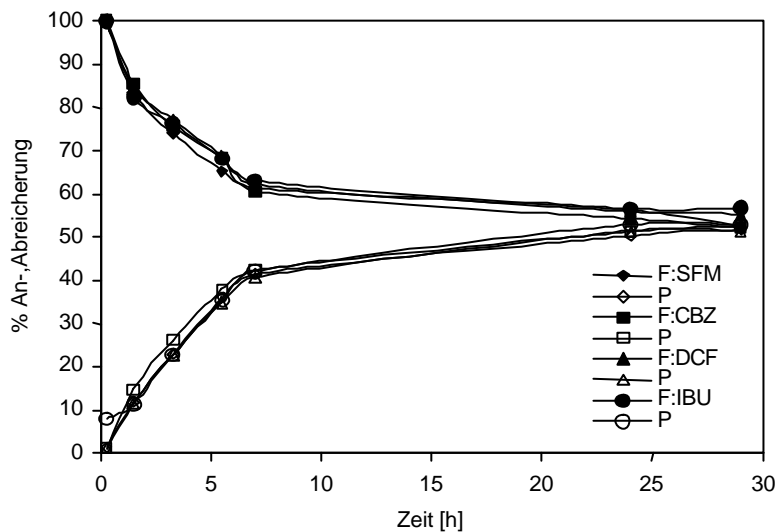


Abb. 5: Permeationsverlauf der vier Analyte beim Goldschlägerhäutchen
Kleinstes Membranfenster; Rührgeschwindigkeit 500 U/min

Zur Untersuchung der Dynamik der Permeation in Abhängigkeit von der **Rührgeschwindigkeit** wurden in der Membranzelle beide Kammern mit Miniaturrührern bestückt und die jeweiligen wässrigen Phasen sowohl jeweils einzeln als auch gleichzeitig bei unterschiedlichen Umdrehungsgeschwindigkeiten gerührt. Erwartungsgemäß erzielt man die besten Ergebnisse, wenn beide Phasen gleichmäßig gerührt werden. Die Rührgeschwindigkeit spielt besonders bei kleinen Membranflächen eine wichtige Rolle und

der Kurvenverlauf geht in einen Sättigungswert über. Bei größeren Flächen verlieren die Geschwindigkeitsänderungen an Wirkung.

Die weiteren Untersuchungen wurden alle mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 U/min bearbeitet, solange andere Bedingungen nicht ausdrücklich erwähnt sind.

Auch die **Probentemperatur** hat einen deutlichen Einfluss auf das Permeationsverhalten. Mit steigender Temperatur steigt auch die Eigendynamik der Moleküle und die Permeation wird beschleunigt. Am Versuchsanfang wirkt sie sich noch nicht merklich aus, nachdem aber ca. 30 % abgereichert sind, ist der Effekt deutlich (**Abb. 6**). Zur Absicherung der Aussagen wurde parallel zu den Kammerversuchen die Stabilität der Arzneiwirkstoffe bei jeder Testtemperatur im Bereich von 5 bis 50 °C für den Versuchszeitraum kontrolliert. Zersetzungserscheinungen wurden dabei nicht beobachtet.

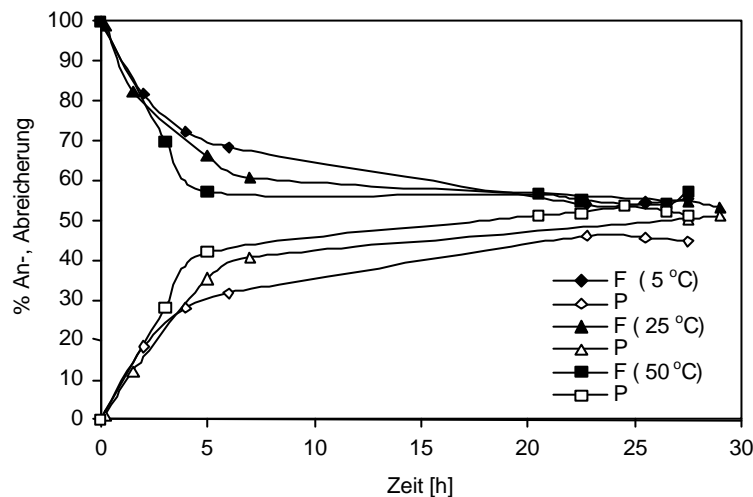


Abb. 6: Einfluss der Temperatur auf die Permeation

Die **Anfangskonzentrationen** der Analyte - eingesetzt wurden 10; 5 und 1 mg/L - beeinflussen die Permeationskinetik nicht. Erneut zeigen alle Wirkstoffe in diesem Konzentrationsbereich ein sehr ähnliches Transportverhalten.

Der Zusammenhang zwischen Transportrate und **Membranfläche** wurde mit Kammerfenstern der Größe 3,6; 8,1; 15,2; 25 und 140 cm² ermittelt. Der Bezug verläuft allerdings nicht linear, obwohl er für die ersten vier Größen in erster Näherung als solcher angesehen werden kann. Damit ist die Fläche als ein entscheidender Faktor für die Transportraten festgehalten und wird in der **Abb. 7** am Beispiel der Fenstergrößen 3,6 und 15,2 cm² belegt. Bei Flächen größer 25 cm² scheint sich die Geometrie der Zelle besonders auszuwirken.

Da bei den vergleichenden Arbeiten mit den technischen Membranen diese nicht in jeder Größe verfügbar sind, mussten zwangsläufig bei den weiteren Versuchen unterschiedliche Größen zum Einsatz kommen, wodurch ein direkter Vergleich der Permeationsraten in den einzelnen Abbildungen erschwert ist.

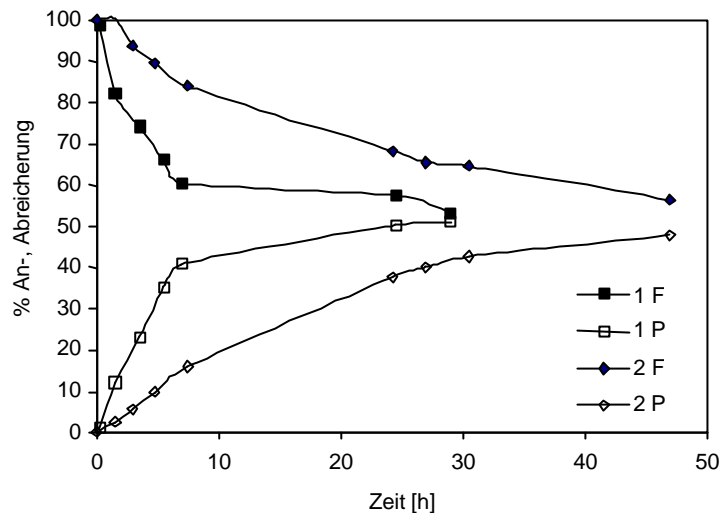


Abb. 7: Einfluss der Membranfläche auf die Transportrate
 1 = 3,6 cm²; 2 = 15,2 cm²

Vom **pH-Wert** wurde eine deutliche Einflussnahme auf den Stofffluss erwartet, weil die Analyte dissoziationsfähig sind. Deshalb wurden die Testbedingungen dahingehend variiert, dass bei Versuchsbeginn in beiden Kammern die gleichen bzw. unterschiedliche pH-Werte in verschiedenen Abstufungen vorlagen. Die nachfolgend angegebenen pH-Wert-Paare beziehen sich immer nur auf die Startbedingung des jeweiligen Versuches: (Feed- / Permeatseite): 10 / 4; 9 / 7; 9 / 4; 8 / 8; 7 / 9; 7 / 7; 7 / 4; 4 / 4; 4 / 7; 4 / 9; 7 / 9.

Das Ergebnis war einerseits ernüchternd und gleichzeitig erfreulich, denn es erfolgt sehr schnell ein pH-Ausgleich zwischen beiden Kammern. Unterschiede in den Transportraten der Pharmaka waren nicht zu beobachten, auch dann nicht, wenn beide Seiten nur sauer oder basisch eingestellt waren. Überraschend ist, dass der pH-Wert auf die beiden Wirkstoffe mit den freien Carbonsäuregruppen, Diclofenac und Ibuprofen, keine ersichtliche Auswirkung hatte. Offensichtlich ist es unbedeutend, ob die Analyten dissoziiert oder undissoziiert vorliegen.

3.1.4 Membranauswahl und –eigenschaften

Die unter **Experimentelles** (Kap. 3.1.1) aufgeführten Darmtypen, alle erhältlich als Lebensmittelzubehör, wurden unter gleichen Bedingungen getestet. Diese Studien wurden schwerpunktmäßig in der Vorstudie abgehandelt und in diesem Zeitraum noch um den Schweinedünndarm ergänzt. Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse festhalten: Der Schweinemastdarm ist aufgrund der Fettschicht erwartungsgemäß völlig ungeeignet und auch der Schweinedünndarm weist eine deutlich eingeschränkte Permeationskinetik auf. Unter dem Gesichtspunkt der Kinetiken sind Schafdarm und Goldschlägerhäutchen gleichermaßen geeignet. Da der Schafdarm aber aus Einzelstücken mittels seines eigenen Eiweißanteils als Bindemittel zu größeren Flächeneinheiten zusammengepresst wird, und die Gefahr bestehen könnte, dass sich während des Einsatzes in aquatischen Systemen die Verbindungsstellen lösen, wurde dem Goldschlägerhäutchen der eindeutige Vorzug gegeben, und wenn nicht ausdrücklich erwähnt, bei allen weiteren Versuchen eingesetzt. Inzwischen ist jedoch ein Vertrieb der Rinderdärme wegen BSE innerhalb der EU untersagt und sie müssen aus anderen Ländern, wie z.B. Argentinien, bezogen werden. Aus diesem Grund könnte der Schafdarm vielleicht wieder interessant werden.

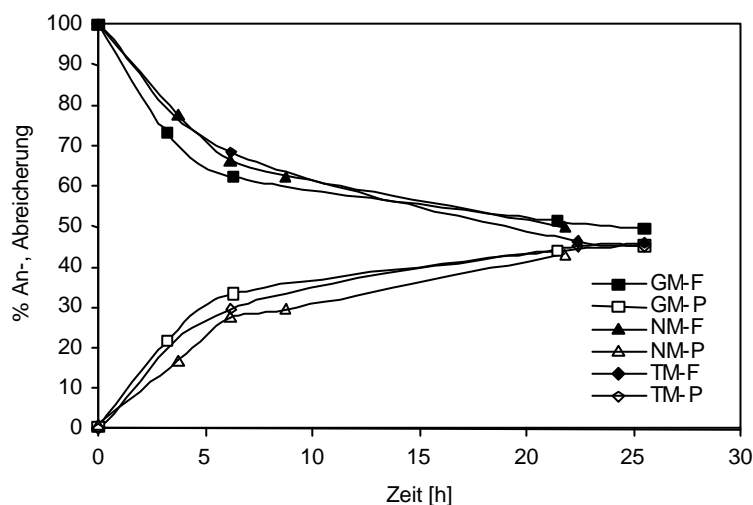


Abb. 8: Vergleich unterschiedlich behandelter Membranstücke

GM = 3 Monate in Natronlauge gestresst

NM = Neues Stück, Ersteinsatz

TM = Getrocknetes Stück

Das Goldschlägerhäutchen wird gesalzen gehandelt und vergrößert seine Oberfläche nach dem Wässern etwa auf das Doppelte. Um einen Erfahrungswert darüber zu erhalten, wie

lange diese Membran unter extremen Bedingungen einsatzfähig bleibt, wurde ein Stück des Darms für 3 Monate in eine Natronlauge mit einem pH-Wert von 10 eingelegt. Es wurde dieser pH-Wert als Extremwert gewählt, weil im Kläranlagenzulauf üblicherweise ein Wert zwischen 8 und 9 gemessen wird. Nach Ende der Lagerungszeit wurde die Darmprobe der Lauge entnommen, gewässert und in das Kammersystem eingespannt. Ein Vergleich zwischen diesem gestressten mit einem neuen Membranstück zeigt keine signifikanten Verhaltensunterschiede (**Abb. 8**).

In der gleichen Abbildung ist auch ein Membranstück berücksichtigt, das zuvor bei Raumtemperatur getrocknet worden war. Empfindlich sind die Darmstücke allerdings gegenüber starken Säuren (Salzsäure, pH 2), in denen sie sich in relativ kurzer Zeit auflösen. Dieser spezielle Darm ist mechanisch ausgesprochen stabil, was auf Grund seiner ursprünglichen technischen Nutzung, dem Blattgoldtreiben, nahe liegt.

3.1.5 Reproduzierbarkeit der Permeation

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist unter zwei Aspekten zu betrachten; zum einen ist es die Reproduzierbarkeit der Messwerte, die mit der gleichen Membrane unter gleichen Bedingungen erzielt wurde (A), und zum anderen die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messreihen, die zwar unter gleichen Versuchsbedingungen aber mit unterschiedlichen Membranstücken erzielt wurde (B).

Zu A: Die Reproduzierbarkeit der mit einer Membrane erzielten Messwerte aus vier parallelen Versuchsansätzen sind - wie zuvor schon gezeigt - hervorragend (**Abb. 3**). Die Standardabweichungen sind in der **Tabelle 1** wiedergegeben und gelten für 4 bzw. 5 Wiederholungsmessungen. Bei diesen Versuchsreihen wurden auch Untersuchungen zur Relevanz der Membranseiten einbezogen. In der Tabelle sind die beiden Seiten durch 1V und 1R gekennzeichnet. Nach ersten Erkenntnissen scheint die Seitenauswahl dabei unerheblich zu sein.

Zu B: Aus der Tabelle 1 wird anhand der prozentualen F- und P- Werte für Membrane 1 und 2 ersichtlich, dass zwischen zwei verschiedenen Membranabschnitten durchaus Unterschiede bestehen können. Die Tendenz weiterer Versuche mit anderen Membranstücken und -typen, z.B. getrocknete Membranen, bestätigen aber eher die Werte der Membran 1.

Tabelle 1: Reproduzierbarkeit unter verschiedenen Bedingungen

Membrane 1 und 2, V = Vorderseite, R = Rückseite; n = 4

F = feedseitig, P = permeatseitig, ? = Standardabweichung

	Zeit (h)	F (%)	? (%)	P (%)	? (%)
Mem 1V	3	80,0	3,2	17,3	1,5
	6	72,1	2,1	30,9	1,7
	24	51,4	3,9	46,4	1,4
	27	48,3	2,7	47,9	1,8
Mem 1R	3	78,5	6,8	14,2	3,1
	6	67,0	6,7	27,8	4,3
	24	49,5	3,5	45,0	3,2
	27	49,3	3,7	45,9	3,1
Mem 2V	3	63,8	2,3	33,4	2,1
	6	53,1	1,5	44,5	1,8
	24	49,6	2,1	49,0	1,2
	27	48,9	1,7	48,7	1,9

3.1.6 Einfluss anderer Wasserinhaltsstoffe

3.1.6.1 Oberflächenaktive Stoffe und Komplexbildner

Zur Ermittlung des Einflusses oberflächenaktiver Stoffe wurde SDS (Natriumlaurylsulfat) als ionisches und Polysorbat 80 als nichtionisches Tensid eingesetzt. Während bei einem relativ hohen Zusatz von 1 oder 2 % die Tenside die Permeationskinetik einzelner Pharmaka, besonders von Carbamazepin und Diclofenac, beeinflussen, ist ein derartiger Effekt bei Zugaben im Promillebereich bereits so weit minimiert, dass er für Realproben mit noch geringer zu erwartenden Konzentrationen bedeutungslos ist.

Für die Untersuchungen zum Einfluss komplexierender Substanzen wurden EDTA und β -Cyclodextrin in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Hierbei war die Beeinflussung der Analyte noch geringer als bei den Tensiden, so dass keine Störungen der Permeation zu erwarten sind.

Gemäß des aus der präparativen Chemie bekannten Aussalzeffektes durch Anionen wird auch bei der Permeation ein uniformes Verhalten der Analyte durch eine Salzfracht begünstigt.

Zur Klärung der Frage, ob unterschiedliche Wasserinhaltsstoffe untereinander synergistische Wirkung haben, wurden SDS, Polysorbat, EDTA und Natriumsulfat gemeinsam dotiert. Aus **Abb. 9** ist zu entnehmen, dass lediglich Diclofenac eine minimale Beeinflussung zeigt, ohne jedoch signifikant zu sein.

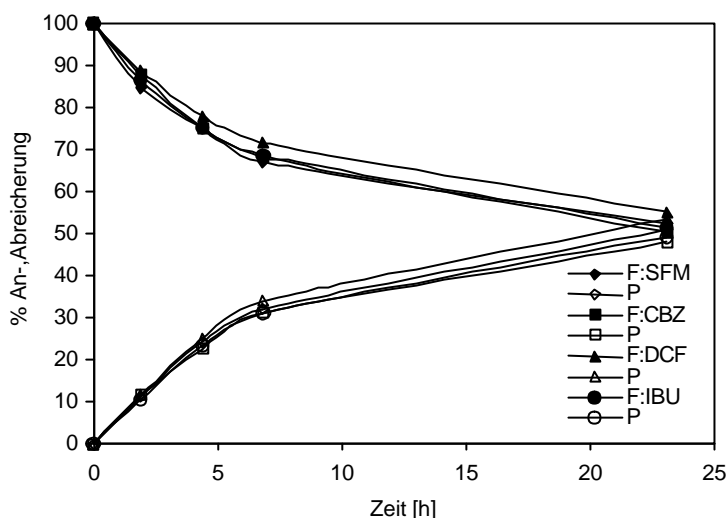


Abb. 9: Einfluss von Tensiden, Komplexbildnern und Salzfracht
0,1 % EDTA + 0,1 % SDS + 0,1 % Polysorbat + 1 % Na₂SO₄

3.1.6.2 Huminstoffartige Verbindungen

Da bekanntermaßen Humin-/Fulvinsäuren und huminstoffartige Verbindungen (HUS) teils erhebliche Einflüsse auf das Migrationsverhalten anderer Wasserinhaltsstoffe, organische wie anorganische, in Wässern oder der Sickerpassage haben können, musste auch im Zusammenhang mit Arzneistoffen der Frage nach dem Ausmaß möglicher Wechselwirkungen nachgegangen werden.

Diese Untersuchungen wurden mit zwei verschiedenen Huminstoffen durchgeführt, zum einen mit einem angereicherten HUS-Standard Hohlohsee 13, bei dem der Molmassenbereich <1000 Dalton durch Ultrafiltration abgereichert worden war, und zum anderen einem Huminstoff, der frisch aus dem Venner Moor geschöpft worden war. Für beide Huminstoffproben betrug die Konzentration 10 mg/L.

Als erstes wurde das Permeationsverhalten des Standards ohne Wirkstoffzusätze 48 Stunden lang untersucht. In diesem Zeitraum nahm auf der Feed-Seite die Konzentration um 20 % ab, während sie auf der Permeat-Seite aber nur auf knapp 15 % anstieg. Die Differenz

lässt sich leicht erklären, da durch die Braunfärbung der Membrane angezeigt wird, dass sich HUS auf ihr abgelagert haben bzw. in den Poren retardiert werden. Ablagerungseffekte auf der Membranoberfläche scheinen primär zu verlaufen, da eine Anfangsverzögerung des Kurvenanstiegs auf der Permeat-Seite zu beobachten war.

Als nächstes wurden HUS mit den einzelnen Testsubstanzen zusammen dosiert und mit dem Permeationsverhalten der Pharmaka ohne HUS-Zusatz verglichen. Da sich alle vier Pharmaka auch in Anwesenheit von HUS absolut gleich verhalten, werden in der **Abb. 10** die Einzelwerte wieder zusammengefasst als Mittelwert dargestellt.

Auf der Feed-Seite beobachtet man tendenziell den gleichen Verlauf, aber die Kurve für die Pharmaka/HUS-Kombination verläuft geringfügig versetzt. Der Grund für diese Differenz liegt an dem UV-Absorptionsanteil, den die HUS bei der Messwellenlänge von 270 nm zur Gesamtabsorption beitragen. Da dieser auf der Permeat-Seite aufgrund der geringen Permeation des Huminstoffes kaum eine Rolle spielt, verlaufen dort die beiden Kurven fast deckungsgleich. Gleichzeitig dokumentiert dieser Verlauf aber auch die - wenn überhaupt - geringe Wechselwirkung mit dem Hohlohsee Standard, und dass eben ein erheblicher Anteil des Materialtransportes außer durch Poren auch durch die Zellwände abläuft.

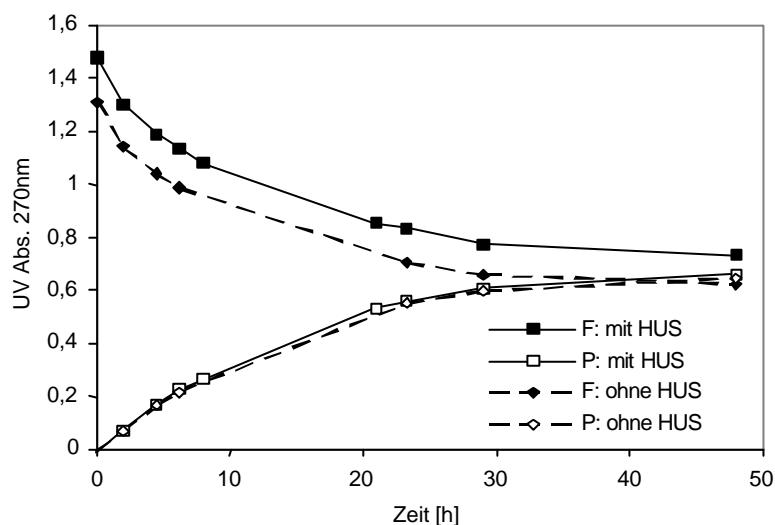


Abb. 10: Wechselwirkung mit Huminstoff Hohlohsee

Abb. 11 zeigt für die Permeatseite Wiederholungen der beiden Kurven aus Abb. 8, die aus anderen Versuchsansätzen stammen und die um das Ergebnis der Untersuchungen mit dem Huminstoff aus dem Venner Moor ergänzt worden sind. Diese zusätzliche Kurve verläuft wesentlich flacher.

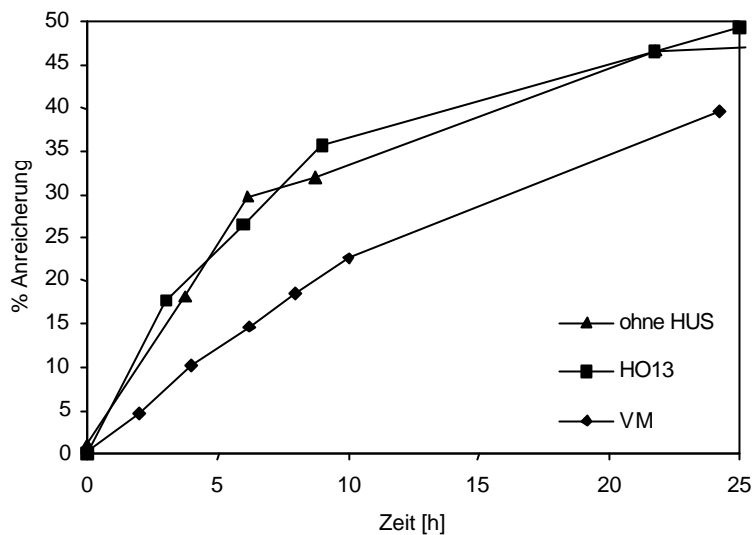


Abb. 11: Vergleich der Wechselwirkungen der Pharmaka mit Huminstoffen aus dem Hohlohsee und Venner Moor

In **Abb. 12** bestätigt der Gleichlauf der Kurven der Einzelwerte, dass es auch bei diesen Versuchen berechtigt ist, die Mittelwerte als repräsentativ anzugeben. Dieses Verhalten ändert sich in Abhängigkeit von dem Membranmaterial (siehe 3.1.7.).

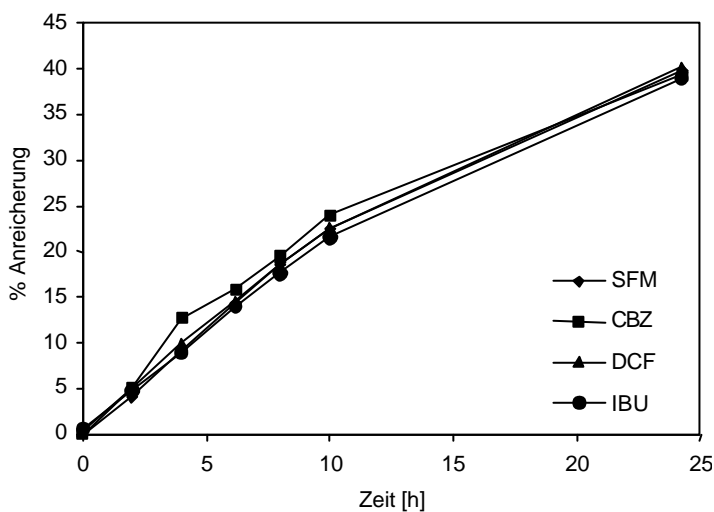


Abb. 12: Permeation der einzelnen Analyte in Gegenwart von Huminstoff aus dem Venner Moor

3.1.7 Vergleich mit technischen Membranen

Um eine Vorstellung zu bekommen, wo die Membranen aus natürlichem Material im Vergleich mit technischen Membranen für den Pharmakatransport einzuordnen sind, wurden auch Dialyseflach-, Hohlfaser- und Mikrofiltermembranen getestet, die im Bereich der

Medizintechnik eingesetzt werden. Alle drei Typen lassen nur eine Permeation durch ihre Poren zu. Das erfordert für den Einsatz bei Lösungen mit Schwebstoffen – besonders im Fall der Hohlfasern – einen entsprechenden Aufwand, um die Oberflächen vor Verstopfungen zu schützen, was ein eindeutiger Nachteil gegenüber den Därmen ist. Resümierend lässt sich festhalten, dass technische Membranen mit geeigneter Porengröße bezogen auf das Permeationsverhalten mit oben gemachter Einschränkung grundsätzlich tauglich sind. Während das Membranfilter mit der Porengröße $0,45\ \mu\text{m}$ einen Stofffluss vergleichbar mit den natürlichen Membranen aufwies, können andere erhebliche Wechselwirkungen mit den Analyten eingehen, was am Beispiel der Dialysemembranen DWCO1000 (gestrichelte Kurvenverläufe in **Abb. 13**) demonstriert wird.

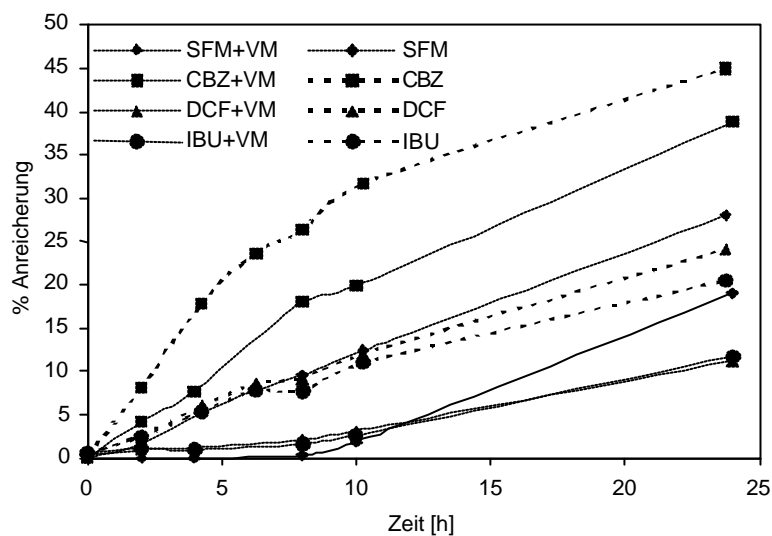


Abb. 13: Wechselwirkung der Analyte mit einer Celluloseester-Membrane mit und ohne Huminstoff Venner Moor

Da diese Membranen nur mit kleiner Fläche zu beziehen waren, musste bei diesen Versuchen auf das Kammersystem mit dem kleinsten Fenster zurückgegriffen werden, was eine Verzögerung des Stoffflusses zur Folge hat.

In dieser Abbildung wird deutlich, dass Carbamazepin einen ähnlichen Kurvenverlauf wie bei den natürlichen Membranen aufweist, die drei anderen Pharmaka relativ zueinander zwar ähnliche Kurven haben, aber mit deutlich geringerer Steigung. Bei der Zugabe von HUS Standard Hohlohsee sind die Kurvenverläufe nicht anders als in dieser Abbildung dargestellt. Das ändert sich bei der Zugabe von HUS aus dem Venner Moor. Der Transport von Carbamazepin ist vergleichbar dem ohne HUS, die anderen drei Analyte zeigen jedoch eine deutliche Beeinflussung. Sie haben in den ersten zehn Stunden (bei dieser Membranfläche)

fast kein Permeationsvermögen. Beim Sulfamethoxazol steigt die Permeation dann in den nächsten 15 Stunden auf 20 % an, während Diclofenac und Ibuprofen - die beiden Wirkstoffe mit den freien Carbonsäuregruppen - gerade mal den halben Wert in diesem Zeitraum erreichen und damit im Vergleich zum Goldschlägerhäutchen weniger gut abgereichert werden.

3.1.8 Eliminierungsoptimierung durch zusätzliche Adsorption

Da die Fest-Membranen selbst nur einen Konzentrationsausgleich bewirken können, ist es naheliegend, eine weitere Verbesserung des Abreicherungseffektes durch ein zusätzlich herbeigeführtes Konzentrationsgefälle zu erreichen. Dieses kann beispielsweise durch einen ergänzenden Extraktionsschritt auf der Permeatseite erreicht werden. In Anlehnung an die an der Universität Paderborn parallel laufenden Studien zum Einsatz von Flüssigmembranen wurde auch hier eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit Octanol (20 ml) durchgeführt. Zum anderen wurde eine Festphasen-Extraktion (SPE) mit Aktivkohle (5 g) angewandt. In beiden Fällen wurde der Inhalt der Permeat-Kammer im geschlossenen Kreislauf mittels Schlauchpumpe in ein Becherglas überführt, das mit den Extraktionsmitteln überschichtet war. Alternativ dazu wurde auch das Permeat auf eine mit Aktivkohle gefüllte Säule gegeben und das Filtrat zurückgepumpt. Alle Extraktionsansätze ergaben sehr zufriedenstellende Ergebnisse. So ließ sich mit Octanol die Abreicherung auf 70-80 % steigern, mit Aktivkohle sogar um weitere 10 % verbessern, wie in **Abb. 14** wiedergegeben.

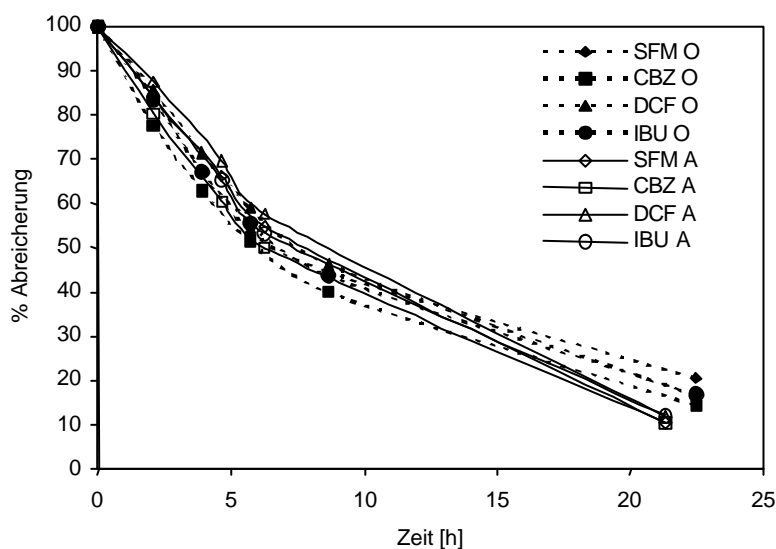


Abb. 14: Verbesserung der Abreicherung durch zusätzliche Extraktion mit Octanol (O) und Aktivkohle (A)

Für eine großtechnische Anwendung drängt sich allerdings für den Einsatz der Flüssigextraktion die Frage nach der Behandlung oder Entsorgung der dann relativ großen Lösungsmittelmengen auf. Eine weitere Eliminierung der Pharmaka auf der Permeatseite durch eine UV- oder Ozon- Behandlung ist gleichermaßen denkbar.

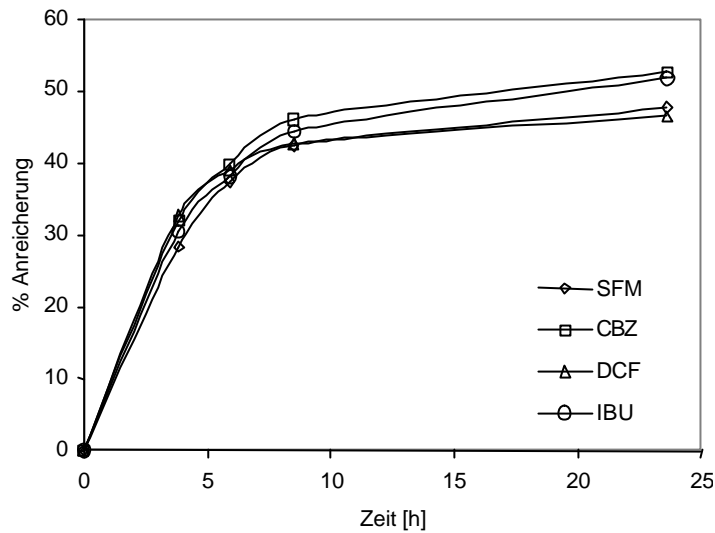


Abb. 17: Anreicherung der Analyte aus einer Klärschlamm-Probe mittels Goldschlägerhäutchen

Abschließend wurde das Verfahren mit einer Klärschlammprobe nach Filterung der Schwebstoffe unter Laborbedingungen getestet. Da, wie **Abb. 17** belegt, die Permeation der Analyte sich trotz der komplexen Matrix nicht anders verlief als bei den Versuchsansätzen mit Reinstwasser, kann man hoffen, dass diese Technik nicht nur in der Abwasserreinigung sondern auch in der Wasserbehandlung allgemein Anwendung finden kann.

3.2 Flüssig-Membransysteme

3.2.1 Bulk-Flüssigmembranen

Experimentelle und analytische Bedingungen

Es wurden zur Durchführung der Arzneiwirkstoff-Extraktionen Drei-Phasen-Rührzellen unterschiedlicher Größe verwendet (**Abb. 18**, **Tab. 2**). Die Zellen sind komplett aus Glas gefertigt und bestehen aus zwei Kammern, welche jeweils die wässrige Feed- und Strip-Phase aufnehmen, die durch die organische flüssige Membran-Phase miteinander in Kontakt stehen. Das größte Kompartiment dient zur Aufnahme der Feed-Phase. Die Strip-Phase befindet sich in der kleinsten Zellkammer.

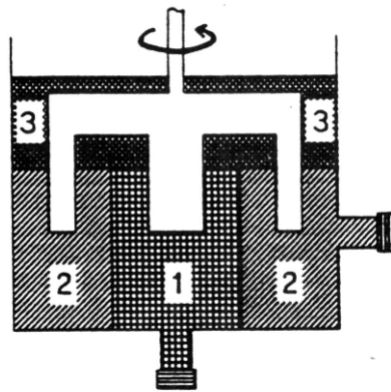


Abb. 18. Schematischer Aufbau der Dreiphasen-Flüssigmembranzellen
(1: Strip-Phase, 2: Feed-Phase, 3: Membran-Phase)

Die äußere Wandung ist am oberen Ende mit einer NS 100-Schliffverbindung ausgestattet und mit einem passenden Glasdeckel vor Verdunstung bei Verwendung relativ flüchtiger Lösemittel geschützt. Die drei Phasen wurden mit einem aus PTFE hergestellten Rührblatt, das von oben mit einem KPG-Rührmotor gekoppelt ist, synchron und kontinuierlich, i.d.R. bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 60 U min^{-1} gerührt, so dass die Transportreaktionen nicht durch Diffusion, sondern durch Konvektion kontrolliert sind.

Die Kenngrößen der Rührzellen sind in **Tab. 2** aufgeführt.

Tab. 2: Kenngrößen der Bulk-Flüssigmembran-Zellen

Feed-Phase / Strip-Phase / Membran		Rührzelltyp
Phasenvolumina (cm ³)	32 / 25 / 20	*Zelle 1 („klein“)
Volumenverhältnisse	1:0,62:0,78	
Phasenvolumina (cm ³)	70 / 50 / 35	Zelle 2 („groß“)
Volumenverhältnisse	1:0,71:0,5	

* Wenn nicht anders angegeben, wurde Zelle 1 verwendet

Die Konstruktion der Zellen gewährleistet Probennahmen während des Betriebes ohne Unterbrechung mit Hilfe von Mikroliterspritzen aus beiden wässrigen Phasen sowie aus der Membranphase. Es wurden i.d.R. nach 5, 15 und 30 min, sowie nach 1, 2 und 4 h oder noch längerer Reaktionszeit jeweils 0,5 mL Aliquot entnommen und anschließend mit der HPLC-UV oder LC-MS die Konzentrationen der einzeln oder kombiniert vorliegenden Wirkstoffe analysiert. Überwiegend wurden die Wirkstoffe kombiniert vorgelegt und das simultane Extraktions- und Strip-Verhalten verfolgt.

HPLC-UV - Chromatographie

Die quantitative Bestimmung von Sulfamethoxazol, Carbamazepin, Diclofenac und Ibuprofen in den Aliquoten der Feed- und Strip-Lösungen wurde im ersten Projektstadium überwiegend mit der folgenden Geräte-Kombination durchgeführt

Entgaser : Degasys-DG-1310 (GynkoteK/Dionex)
 Pumpe : P 580 Isocratic (GynkoteK/Dionex)
 Autosampler : GINA 50 (GynkoteK/Dionex)
 Säule : LiChroCART RP 18, 5 µm, 250 x 4 mm (Merck)
 Säulenofen : T-6300 Column Thermostat (Merck)
 Detektor : 655A-Variable Wavelength UV Monitor (Merck/Hitachi)
 Auswertung : GynkoteK Chromatographie-Daten System, PCD Version 550;
 Peakflächenmethode

Chromatographische Bedingungen (isokratisch):

Flussrate: 1,0 ml/min
 Detektion: 225 nm
 Mobile Phase: 50 % (v/v) 30 mmol/L NaH₂PO₄·H₂O in bidest. H₂O, 50 % CH₃CN (v/v)

LC/MS

Entsprechend der Projektplanung wurden parallel zu den HPLC-UV-Messungen die dabei angewandten chromatographischen Bedingungen auf das LC-MS-System (LCQ-Advantage, ThermoFinnigan), das mit simultaner UV-PAD-Detektion ausgestattet ist, übertragen und dem ESI/Ion-Trap-System angepasst, um wässrige Proben im Spurenkonzentrationsbereich einschließlich realer Abwässer analysieren zu können.

Der synthetisierte Hauptmetabolit N4-Acetyl-Sulfamethoxazol wurde zu gegebener Zeit in die Methodenentwicklung einbezogen (**Abb. 19**). Ergänzend diente die MS/MS-Detektion zur strukturanalytischen Bestätigung von Zwischen- und Endprodukten (Kap. 4).

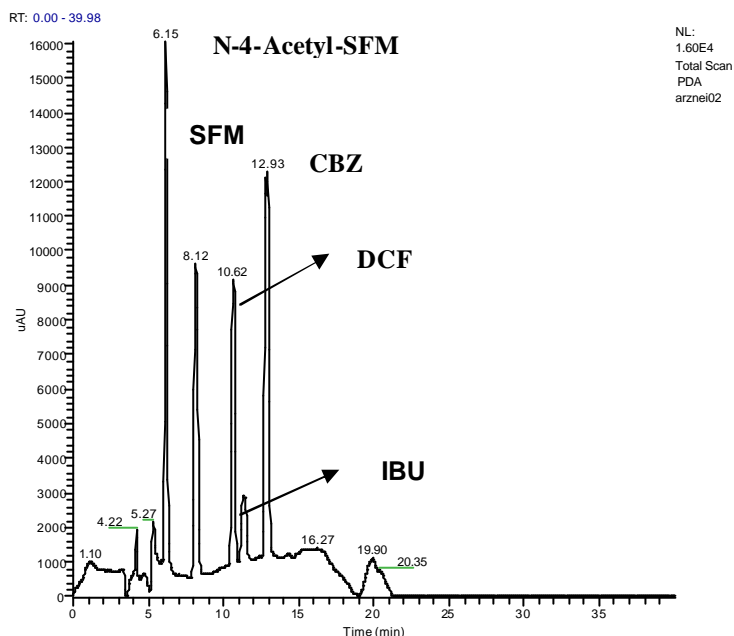


Abb. 19: Chromatogramm eines Wirkstoff-Metabolit-Gemisches

(LCQ-Advantage-System, PDA)

Laufmittel A: 10 mmol/L Ammoniumacetat, Laufmittel B: CH₃CN,

Fluss: 0,6 mL/min, Nucleosil 100 C₈ ec, 5 µm I.D., 250 x 5 mm

3.2.1.1 Carrier-freie Systeme

Die Effektivität der Arzneiwirkstoff-Extraktion aus der wässrigen Feed-Phase in eine organische Bulk-Membranphase, die ausschließlich aus einem reinen Lösemittel besteht, ist eine Funktion zahlreicher Parameter. Dazu zählen z.B. die Größe des Verteilungs-

koeffizienten ($\log K_{ow}$) des Wirkstoffes bzw. Analyten zwischen wässriger und organischer Membranphase, die Zusammensetzung der Strip-Phase (Acceptorphase) und die Dimension der Membran. Komponenten mit hohem $\log K_{ow}$ sollten einerseits leicht von der Membranphase aufgenommen werden, andererseits kann dann die Reextraktion in die Strip-Lösung schwierig werden, was zu niedriger Transporteffektivität führt. Entsprechend sind bei niedrigen $\log K_{ow}$ -Werten nur niedrige Extraktionsgrade zu erwarten.

Diese allgemein gültigen Abschätzungen finden wir bei den Ergebnissen der Versuchsreihen bestätigt, die zunächst ohne Carrier-Zusatz mit reinen Lösemitteln unterschiedlicher Polarität als organischer Membran durchgeführt wurden. Eingesetzt wurden folgende Lösemittel mit abgestufter Polarität:

Decanol, Decan/Decanol-Gemisch (u.a. 11:1, v/v) und *Dihexylether* (Abk. DHE).

Der **Tabelle 3** ist zu entnehmen, dass Sulfamethoxazol und Carbamazepin die vergleichsweise niedrigsten (berechneten) $\log K_{ow}$ aufweisen, so dass nur im polaren Decanol nach 4 h hohe Extraktionsgrade zu erreichen sind, während in den unpolaren Systemen die Extrahierbarkeit sehr gering bleibt. Außerdem ist zu erwarten, dass beide Wirkstoffe nur schwierig zu stripfen sein werden.

Tab. 3: Berechnete pK_a and $\log K_{ow}$ Werte und ¹Extraktionsgrade (%) in Dreiphasen-Bulk-Flüssigmembran-Systemen

(Feed-Phase: Arzneiwirkstoffe in Wasser, Strip Phase: 0,1 mol/L HCl, 4 h)

Wirkstoff	pK_a	$\log K_{ow}$	Decanol	Decan/Decanol (11:1, v/v)		² DHE
				E (%)		
Sulfamethoxazol	2,0 (a_1)	-0,38	87,0	10,3	5,1	
	5,7 (a_1)					
Carbamazepin	13,94	2,67	98,9	14,5	31,0	
Diclofenac	4,18	5,44	~100	~100	97,7	
Ibuprofen	4,41	3,72	~100	~100	~100	

*ACD-Physico-Chemical Laboratory, Citation formats for Internet sources [Internet]. Available

from <http://www.acdlabs.com/products/phys_chem_lab/pka/exp.html> [Accessed 21.05.2001].

¹Extraktionsgrad E (%) bezieht sich auf die Anfangskonzentration (entspr. 100 %) des einzelnen

Wirkstoffes in der Feed-Phase; ²DHE: Dihexylether

Ein völlig anderes Extraktionsverhalten zeigen die beiden Carbonsäuren Diclofenac und Ibuprofen, die mit allen eingesetzten polaren und unpolaren organischen Solventien effektiv extrahiert werden, so dass auch mit hohen Transportraten von der Feed- zur Strip-Seite zu rechnen ist.

Am Beispiel des Carbamazepins wird in **Abb. 20** besonders deutlich, wie sich die Polaritätsunterschiede auch auf die Kinetik der Extraktion auswirken, da eine deutlich höhere Extraktionsausbeute und –rate mit der polaren Decanol-Phase zu erzielen ist.

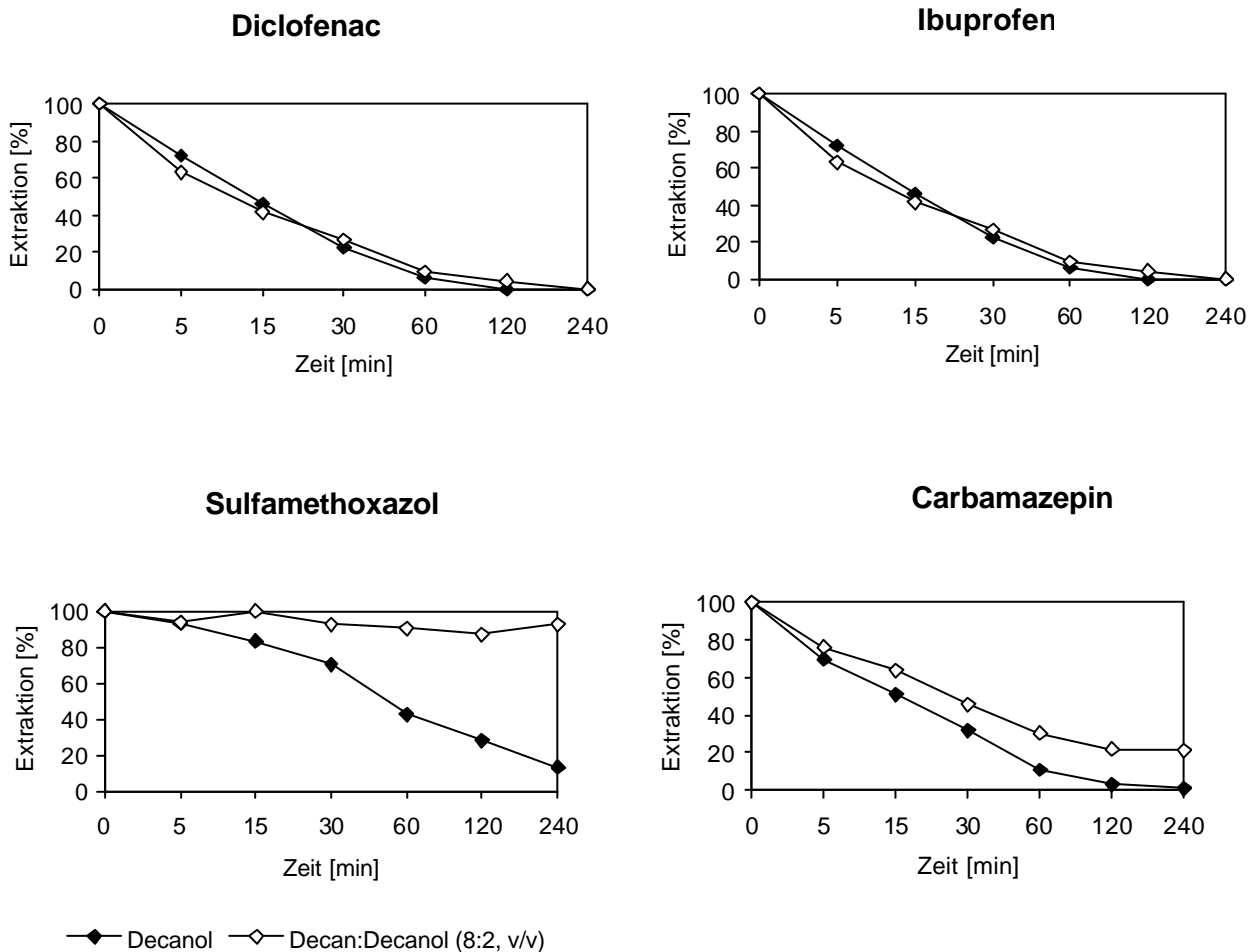


Abb. 20: Einfluss der Lösemittel-Zusammensetzung (Decan/Decanol) auf die Arzneiwirkstoff-Extraktion von der Feed- in die Membran-Phase (Feed-Phase: Wasser, Strip Phase: 0,1 mol/L HCl)

Es stellte sich heraus (**Abb. 21**), dass durch die Verlängerung der Versuchszeit keine gravierende Verbesserung der Transportraten eintritt. Zwar ist beim Sulfonamid die Gleichgewichtseinstellung sowohl beim Extraktions- als auch beim Rückextraktionsschritt, nach vier Stunden noch nicht abgeschlossen, in der verbleibenden Reaktionszeit steigt der zusätzliche Anteil aber nur um ca. 10 %. (Sulfamethoxazol: :81,6 % extrahiert, 26,4 % gestrippt).

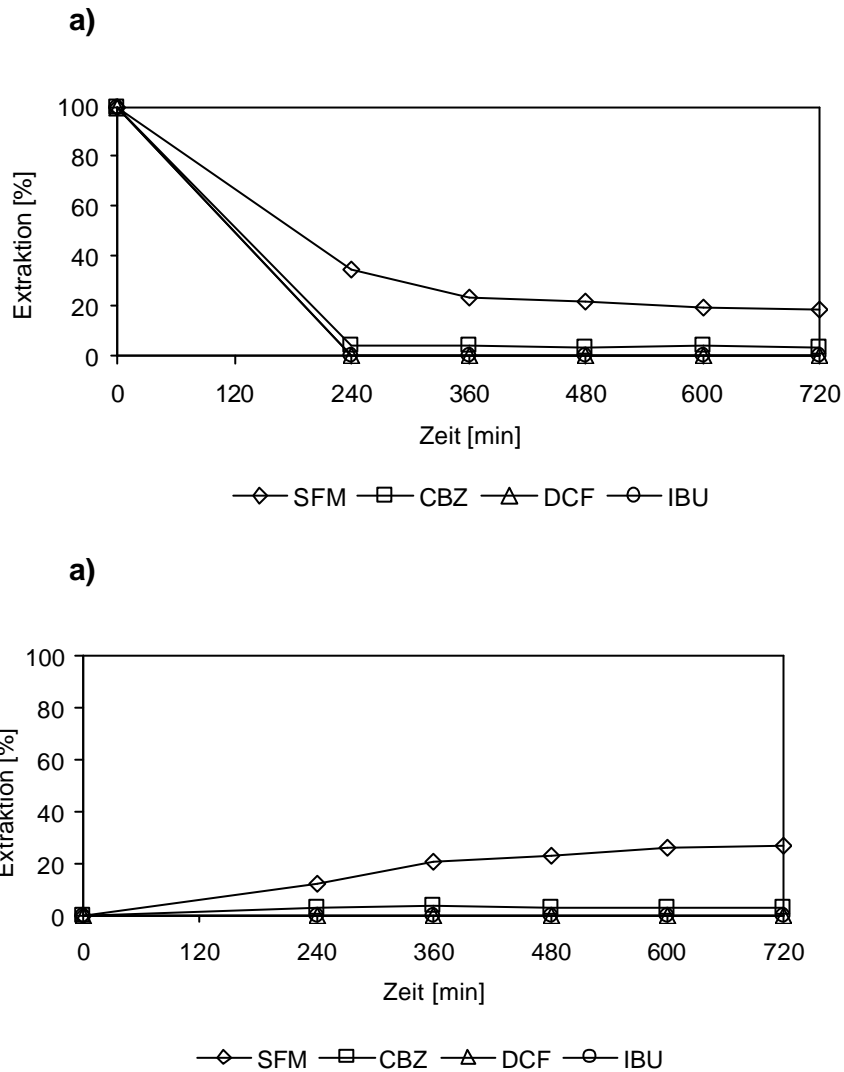


Abb. 21: Langzeitextraktion **a)** von der Feed- **b)** in die Strip-Phase
(Feed-Phase: Wasser, Membran-Phase: Decanol, Strip-Phase:
0,1 mol/L HCl).

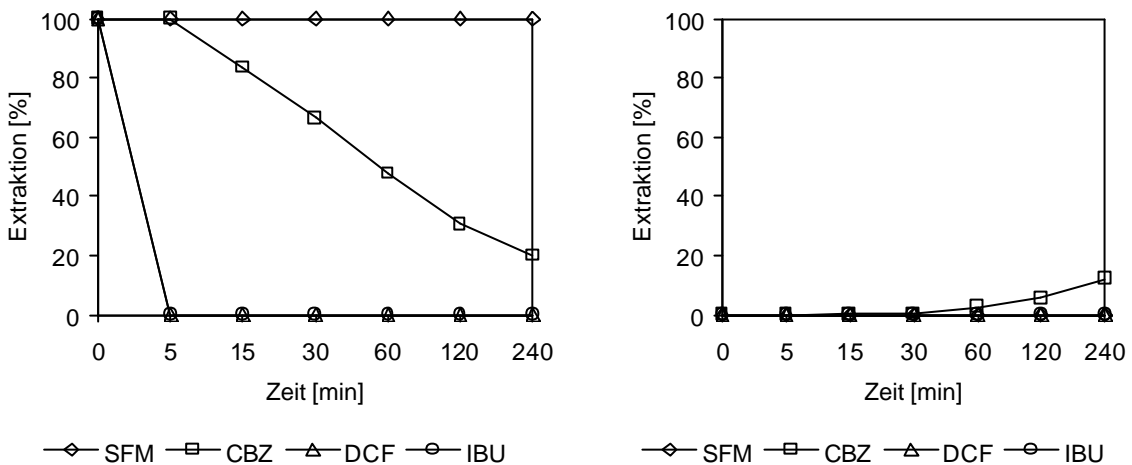
3.2.1.2 Carrier-modifizierte Membransysteme

Prinzipiell sollten in Flüssigmembran-Systemen mit Hilfe von Carriern (basische, acide oder metallkomplexbildende, flüssige Ionenaustauscher, gelöst in einem organischen, mit Wasser nicht mischbarem Solvens) die anzureichernden polaren Arzneiwirkstoffspezies effektiver aus der wässrigen Feed-Seite durch die Flüssig-Membranphase zur Strip-Seite transportiert werden, da neben Verteilungsmechanismen zusätzliche Ionenpaarbildungsreaktionen wirksam werden. Unsere Untersuchungen bestätigen diese Erwartung, wobei ein geeigneter pH-Gradient zwischen beiden wässrigen Phasen zur Aufrechterhaltung eines gekoppelten Transportes beiträgt, mit deutlicher Steigerung der Transporteffektivität.

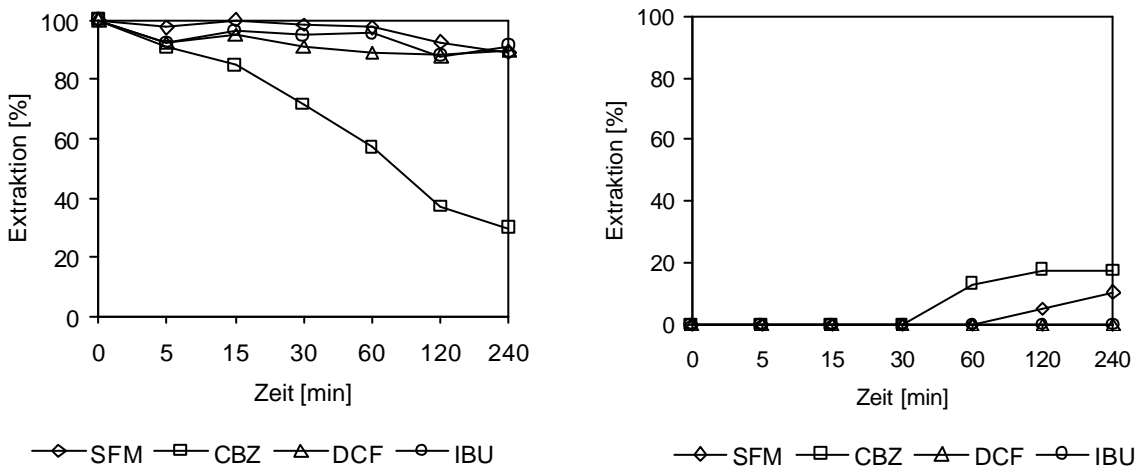
3.2.1.2.1 Basischer Carrier

Die Konzentrationsprofile in **Abb. 22** demonstrieren die Wirkung des basischen Carriers Trioctylamin (TOA), gelöst in Decan-Decanol (Membran-1), im Vergleich zu dem Carrier-freien System (Membran-2).

Membran-1: 0,025 g/L Trioctylamin in Decan-Decanol (80 % : 20 %, v/v)



Membran-2: Decan-Decanol (80 % : 20 %, v/v)



a)

b)

Abb. 22: Einfluss des basischen Carriers TOA auf den Arzneiwirkstoff-Transport

Extraktion **a)** von der Feed- **b)** in die Strip-Phase

(Feed-Phase: 0,1 mol/L NaOH, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl)

Danach beschleunigt sich die Wirkstoffextraktion erheblich (Halbwertszeit < 2 min), sofern ein pH-Gradient zwischen Feed- (alkalisch) und Strip-Phase (sauer) eingestellt ist. Carbamazepin ($t_{1/2} \sim 60$ min) und Sulfamethoxazol ($\sim 0\%$ Extraktion) zeigen dagegen keine Beeinflussung durch den basischen Carrier.

Die Rückextraktion führte bei Carbamazepin in der Strip-Phase nur zu einem Anteil von 12% der Ausgangs-Konzentration. Diclofenac konnte zwar bis über 98% extrahiert, aber nur spurenweise gestrippt werden. Somit begünstigt im Vergleich zum entsprechenden Carrier-freien System das basische Amin den Extraktionsschritt, doch die Reextraktionsgrade bleiben äußerst gering. Auffällig ist, dass SFM ohne Carrier bis zu 10 % extrahiert und gestrippt werden kann, während die Carrierdotierung den Transport völlig verhindert.

Ein Einfluss unterschiedlicher Strip-Reagenzien (2 mol/L HClO_4 und 1 mol/L HCl) auf das Transportverhalten ist nicht erkennbar, da die Extraktionsverläufe- und -ausbeuten für die einzelnen Arzneiwirkstoffe jeweils sehr ähnlich verlaufen (nicht abgebildet).

Tabelle 3a: Reproduzierbarkeit der Extraktion von Arzneiwirkstoffen

(Feed-Phase: Wasser, Membran-Phase: 0,025 g/L Trioctylamin in Decan-Decanol (80 % : 20 %, v/v) ;Strip-Phase: 2 mmol/L HClO_4)

Arzneiwirkstoff	Mittelwert der *Konzentrationen \bar{x} [mg/L]	Standardabweichung s [mg/L]	s_{rel} [%]
Sulfamethoxazol	8,32	0,41	4,9
Carbamazepin	1,84	0,03	1,6

*Konzentrationen in der Feed-Phase nach 4 h Extraktion, n=5

Tabelle 3b: Reproduzierbarkeit der Rück-Extraktion von Arzneiwirkstoffen

Arzneiwirkstoff	Mittelwert der *Konzentrationen \bar{x} [mg/L]	Standardabweichung s [mg/L]	s_{rel} [%]
Sulfamethoxazol	1,07	0,11	10,3
Carbamazepin	2,39	0,14	5,7

*Konzentrationen in der Strip-Phase nach 4 h Extraktion, n=5

Reproduzierbarkeit der Bulk-Membranmethode (TOA-Carrier)

Am Beispiel des TOA-Carriersystems wurde die Methodenpräzision der simultanen Extraktion und Rückextraktion bestimmt (**Tabelle 3**).

Dazu wurden Extraktionsversuche in der Dreiphasenrührzelle unter gleichen Bedingungen fünfmal wiederholt. Die berechneten Mittelwerte der Wirkstoff-Konzentration in der Feed- und Strip-Phase sowie der absoluten und relativen Standardabweichungen sind in Tab. 3a,b zusammengefasst. Die Daten belegen, dass mit dem gewählten Dreiphasensystem eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Extraktionsgrade erreicht wird.

3.2.1.3 Saurer Carrier

Im Vergleich zu Membranen mit basischem Carrier führt eine Dotierung mit saurem Carrier zu erheblich besseren Transporteigenschaften der Dreiphasensysteme (Abb. 23).

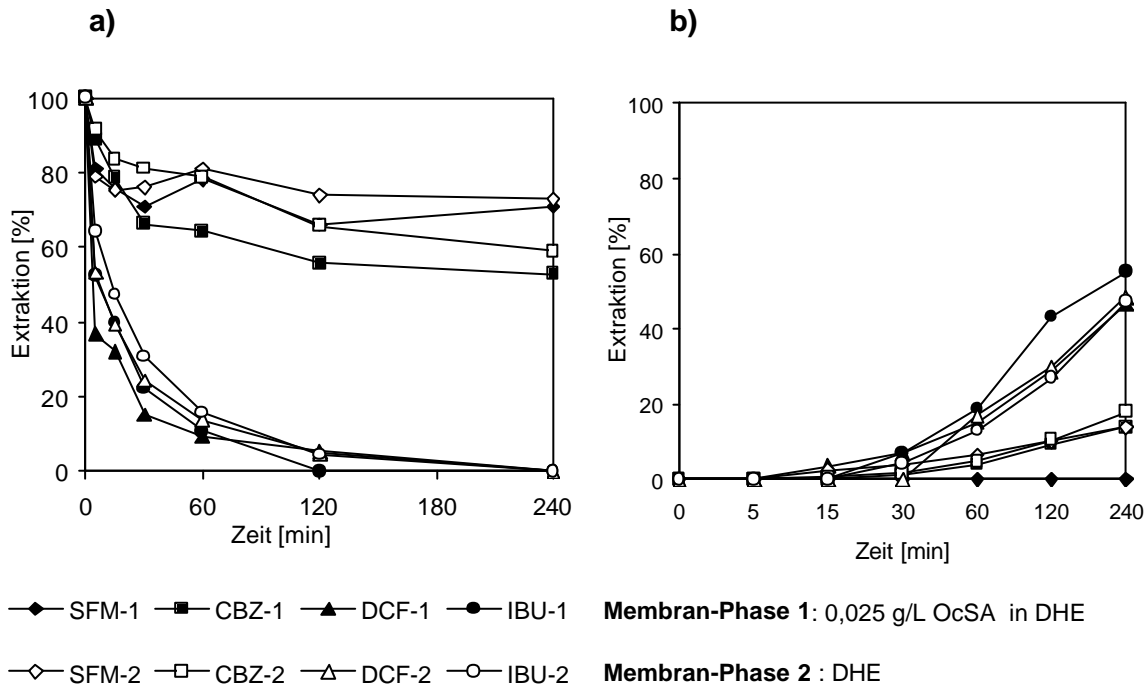
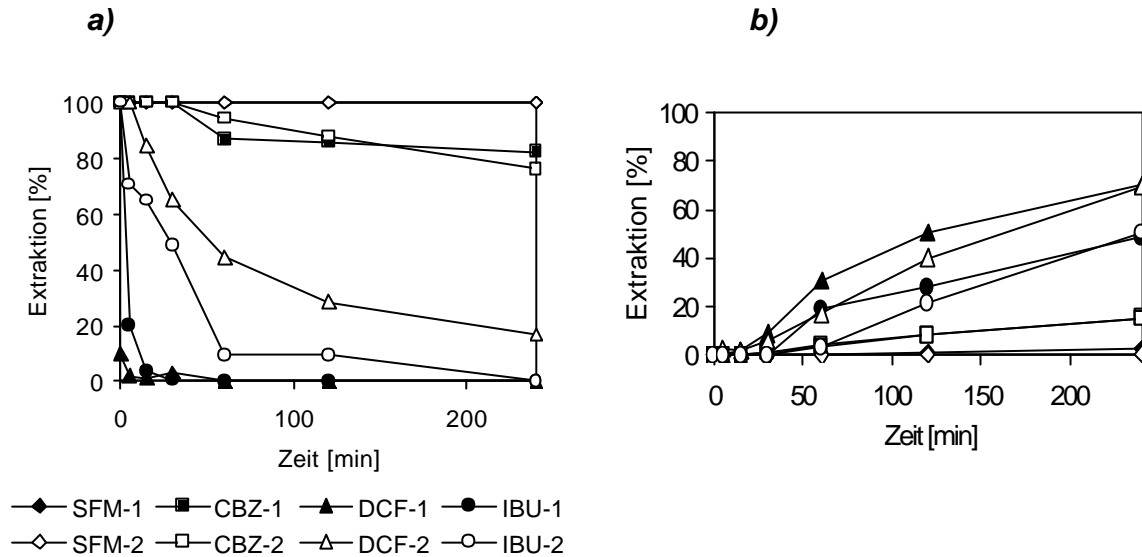


Abb. 24: Einfluss des sauren Carriers Octansulfonsäure auf den Arzneiwirkstoff-Transport; Extraktion **a)** von der Feed- **b)** in die Strip-Phase (Feed Phase: 0,1 mol/L HCl, Strip Phase: 0,1 mol/L NaOH)

Insbesondere die Kombination aus Octansulfonsäure (Abk. OcSA) und Dihexylether in Verbindung mit einem ausgeprägten pH-Gradienten zwischen Feed-Phase (sauer) und Strip-Phase (alkalisch) erhöht die Extraktionskinetik für Diclofenac und Ibuprofen drastisch, so dass in kurzer Zeit ($t_{1/2} < 5 \text{ min}$) eine vollständige Extraktion der beiden sauren Wirkstoffe aus der Feed- in die Membran-Phase erreicht wird, wie Abb. 24 demonstriert.



Feed-1: 0,1 mol/L HCl, **Feed-2:** Wasser

Abb. 25: Transport von Arzneiwirkstoffen mit saurem Carrier - Einfluss des pH-Gradienten

a) Extraktion von der Feed-Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase

(Membran-Phase: 0,025 g/L OcSA in Dihexylether, Strip-Phase:

0,1 mol/L Na_2CO_3)

Als wirksame Strip-Reagenzien haben sich verdünnte Natriumcarbonat-Lösungen und Natronlauge erwiesen. Dadurch ergaben sich optimale Phasen-Kombinationen, die sich auch erfolgreich auf trägergestützte Membransysteme übertragen ließen (Kap. 3.2.2).

Die Wirkung des pH-Gradienten zwischen Feed- und Strip-Phase wird besonders deutlich bei Anwendung eines *inversen* Gradienten: Wird die Feed-Lösung alkalisch und die Strip-Lösung sauer eingestellt, beobachtet man (**Abb. 25**) eine nahezu vollständige Blockade des Wirkstoff-Transportes. Damit wird auch bestätigt, dass Transportmechanismen über Ionenpaarbildung zwischen Carrier und den schwach sauren Wirkstoffen Diclofenac und Ibuprofen in dem Dreiphasensystem eine Rolle spielen.

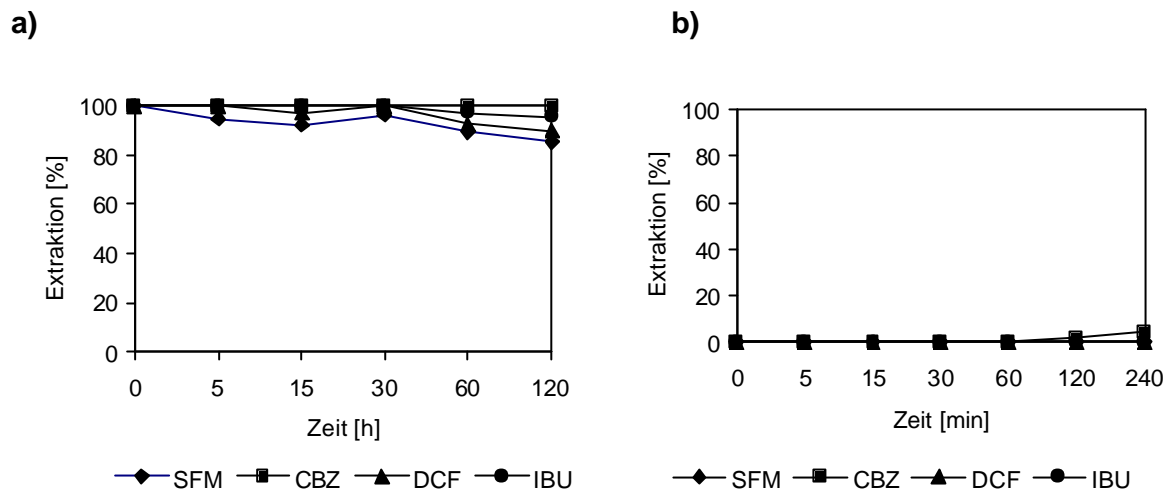


Abb. 25: Blockierter Wirkstofftransport mit saurem Carrier bei inversem pH-Gradient

a) Extraktion von der Feed-Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase

(Feed: 0,1 mol/L NaOH, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl, sonst. Bedingungen wie in

Abb. 24)

3.2.13.1 Einflüsse weiterer Betriebsparameter

Bei dem Membransystem mit saurem Carrier wurden weitere Versuchs- bzw. Zellparameter verändert, um optimale Bedingungen für den Wirkstofftransport herauszufinden.

Langzeitextraktion

Während der Langzeitversuche mit dem sauren Carriersystem erfolgten Probenahmen in Intervallen von 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden. Die Feed-Phase enthielt 10 mg/L aller vier Arzneiwirkstoffe gelöst in verd. Salzsäure, als Strip-Phase wurde verd. Natronlauge (jeweils 0,1 mol/L verwendet). Dabei stellte sich, wie bereits bei der reinen Decanol-Membran heraus, dass eine generelle Erhöhung der Extraktions- und Strip-Ausbeuten durch Verlängerung der i.d.R. üblichen Extraktionszeit über 4 h hinaus nicht zu erreichen ist. Diese Erkenntnis trifft für Bulk-Flüssigmembranen mit und ohne Carrier-Dotierung zu.

Wirkstoffkonzentration

In den bisherigen Versuchen mit Modelllösungen arzneistoffbelasteter Wässer wurde in den Feed-Phasen ausschließlich die relativ hohe Wirkstoffkonzentration von 10 mg/L eingesetzt, um deutliche Transport-Effekte zu erzielen. Zur Anpassung an die erheblich niedrigeren Konzentrationen von Realproben wurde die zehnfach verringerte Konzentration von 1 mg/L je Wirkstoff eingesetzt.

Bei der niedrigeren Konzentration werden alle vier Arzneiwirkstoffe vergleichsweise schneller von der Decanol-Membran-Phase extrahiert, dabei sogar das relativ problematische Sulfamethoxazol. Versuche mit Carrier-dotierter DHE-Membran zeigten ähnliche Transportraten sowohl bei niedriger als auch höher konzentrierten (bis zu 100 mg/L) Lösungen. Die Versuchsergebnisse gaben den Anstoß zur Konstruktion einer Anreicherungszone mit trägergestützter Membran (Kap. 3.2.2).

Rührgeschwindigkeit

Der Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Transportraten der einzelnen Komponenten ist uneinheitlich: Die von 60 auf $U\ 100\ \text{min}^{-1}$ erhöhte Rührgeschwindigkeit führte mit reinem Decanol und DHE/Octansulfonsäure als Membran zu einer Verdopplung der Strip-Ausbeute für Sulfamethoxazol und auch für Ibuprofen. Dagegen wurden schlechtere Transportraten für die Carbonsäuren beobachtet.

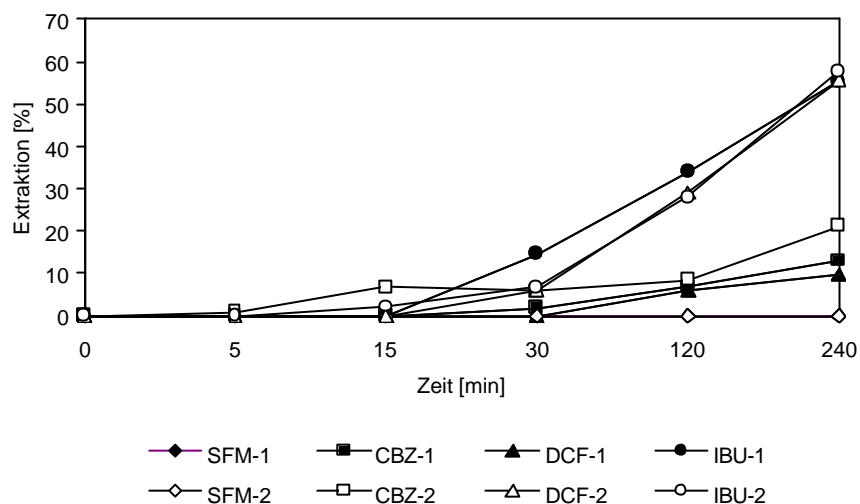
Zellgrösse

Die Kompartiment-Volumina der routinemäßig eingesetzten „kleinen“ Zelle (Feed: 32 mL, Membran: 20 mL, Strip: 25 mL) sind in der zusätzlich gebauten „großen“ Zelle in etwa verdoppelt (**Tabelle 2**). Vergleichende Untersuchungen ergaben, dass von einer Volumenvergrößerung nur das Sulfamethoxazol profitiert (Decanol-Phase, Steigerung der Strip-Ausbeute von ca. 15 auf 50%), während das Membransystem mit saurem Carrier die größere Effektivität in der kleineren Zelle erreicht.

Einfluss von Huminstoffen

Auch bei den Flüssigmembran-Systemen wurde, wie bei den biologischen Fest-Membranen (Kap. 3.1.6.2), die Beeinflussung der Wirkstofftransporte durch Huminstoffe in der Feed-Phase untersucht. Dazu wurde ebenfalls der angereicherte HUS-Standard Hohlohsee 13 der wässrigen Feed-Phase zugesetzt. Mit dieser Lösung wurden unter bereits erprobten, effektiven Membran-Bedingungen (Dihexylether und *saurer Carrier*, pH-Gradient Feed/Strip) Transportversuche durchgeführt und die Ergebnisse mit denen unter Huminstoff-freien Bedingungen verglichen.

Durch den Huminstoff-Zusatz hatte die Feed-Phase eine leicht gelbliche Färbung angenommen, die während der vierstündigen Extraktionszeit unverändert blieb. Sowohl Membran- als auch Strip-Phase blieben farblos. Dieser Eindruck wurde durch Photometrie (C1 / C3-Bestimmung bei 254 und 434 nm nach DIN) bestätigt. Danach werden unter den bisher angewandten Flüssig-Membranbedingungen keine Huminstoffe transportiert.



Feed-1: 18 mg/L Huminstoffe in 0,1 mol/L HCl, **Feed-2:** 0,1 mol/L HCl

Abb. 26: Einfluss von Huminstoffen in der Feed Phase auf den Wirkstofftransport in die Strip-Phase (Membran-Phase: 0,025g/L Octansulfonsäure in Dihexylether, Strip - Phase: 0,1 mol/L NaOH.)

Es zeigt sich aber (**Abb. 26**), dass die organischen makromolekularen Wasserinhaltsstoffe den Transport bestimmter Pharmaka in die Strip-Phase beeinträchtigen. So sind nach 4 h Reaktionszeit im Vergleich zur unbelasteten Wasserprobe die Strip-Ausbeuten für Carbamazepin geringfügig von 21 auf 13 %, für Diclofenac aber drastisch von ~70 auf 10% gesunken, während Ibuprofen weitgehend unbeeinflusst ist. Sulfamethoxazol wird unter beiden Bedingungen nicht reextrahiert.

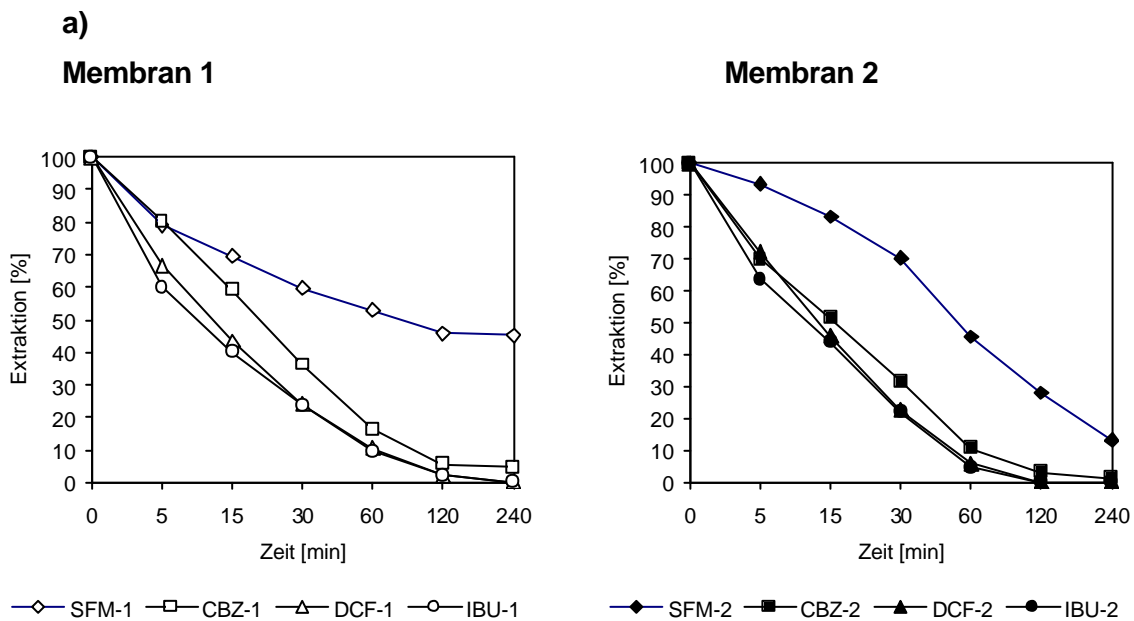
3.2.1.4 Metallchelate-Carrier

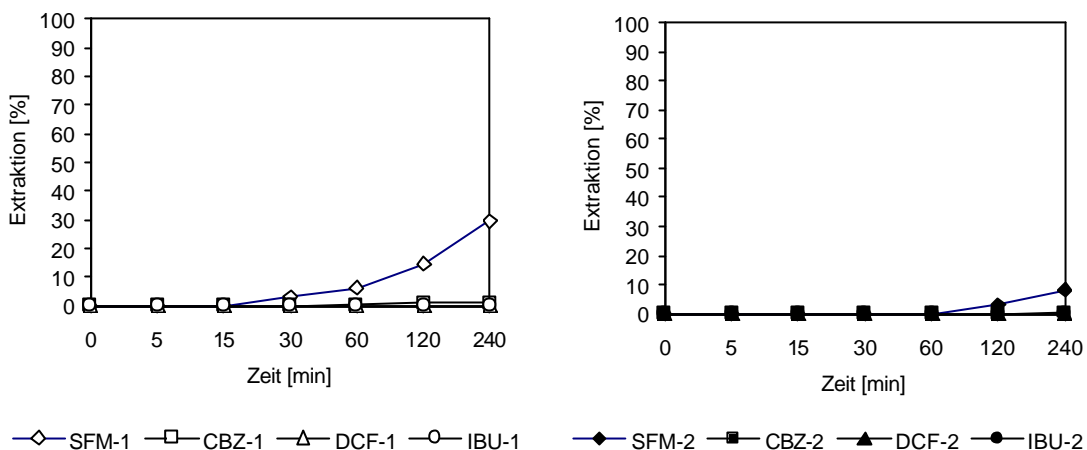
Aus hydrometallurgischen und analytischen Anwendungen ist bekannt, dass sich Metallionen aus wässriger Lösung mit Hilfe koordinationsfähiger Solvent-Extraktanden durch ein Dreiphasen-Flüssigmembransystem transportieren lassen. In einer alternativen Anwendung dieses Prinzips, wobei in organischer Phase lösliche Metallsalze bzw. Metallkomplexe eingesetzt werden, sollten diese gegenüber koordinationsfähigen Wirkstoffmolekülen eine (reversible) Carrierfunktion übernehmen können. Zur Überprüfung dieses Konzeptes wurden erste orientierende Untersuchungen mit Metallsalzen der Ethylhexansäure (Metalloctoate), gelöst in Decanol durchgeführt:

- ? Kupfer(II)-2-ethylhexanoat (Cu(II)EHEX) und
- ? Calcium(II)-2-ethylhexanoat (Ca(II)EHEX).

Einfluss von Cu(II)EHEX

Als Feed-Phase wurde eine wässrige Lösung aller vier Arzneiwirkstoffe eingesetzt. Die **Membran 1** bestand aus einer Lösung von Kupfer(II)-2-ethylhexanoat in Decanol. Als Strip-Phase wurde 0,1 mol/L HCl verwendet. Zum Vergleich wurde reines Decanol im System der **Membran 2** eingesetzt (**Abb. 27**).





Membran-1: 0,1 g/L Cu(II)EHEX in Decanol, **Membran-2:** Decanol

Abb. 27: Einfluss des Carriers Kupfer(II)-2-ethylhexanoat:

a) Extraktion von der Feed Phase b) Rückextraktion in die Strip-Phase
(Feed Phase: Wasser, Strip-Phase: 0,1 mol/L HCl).

Kupfer(II)-2-ethylhexanoat wirkt sich markant auf das Transportverhalten des Sulfamethoxazols aus: Einerseits wird die Extraktionskinetik verlangsamt, andererseits werden bis zu 30% der Feedkonzentration von verd. Salzsäure gestrippt. Bei allen bisherigen Untersuchungen war das Sulfonamid entweder überhaupt nicht oder nur spurenweise in Strip-Lösungen nachweisbar.

Ergänzende Analysen (Plasma-Emission) der wässrigen Phasen des Flüssigmembransystems auf Cu(II)-Gehalte geben Hinweise auf die Carrier-Funktion der Kupferionen, die durch Dekomplexierungsreaktionen und Ligandenaustausch ermöglicht wird.

Verzögerungseffekte zeigen sich auch, aber nur in sehr abgeschwächter Form, bei der Extraktion der anderen Wirkstoffe, die in keinem Fall aus der Membranphase re-extrahierbar waren.

Einfluss von Ca(II)EHEX

Unter gleichen Bedingungen wie das Cu(II)EHEX-Membransystem wurde als Metallionen-beladener Carrier auch das Calcium-Salz Ca(II)EHEX eingesetzt (1 g/L in Decanol).

Damit wurden für Sulfamethoxazol mit ~82 % nach 4h bessere Extraktionsgrade als mit dem Cu(II)-Salz erreicht. Im Vergleich zur metallfreien Decanol-Phase ist der Verzögerungseffekt durch Ca(II)EHEX auf die Extraktion nur minimal. Dagegen lässt sich der extrahierte Wirkstoff aus der Membranphase nur zu ca. 19 % stripfen (aus der Cu(II)-Phase: 30 %).

Zusätzliche Flüssigmembran-Versuche wurden mit verschiedenen *Antiinfektiva*-Wirkstoffen (*Chlortetracyclin*, *Trimethoprim* und *Sulfadiazin*, **Abb. 28**) durchgeführt, wobei die wässrigen Phasen mit HPLC-UV und MS/MS-Detektion (Ameisensäure/Acetonitril-Gradient) analysiert wurden.

Speziell Tetracycline, die mit Erdalkalitionen stabile Metallchelate bilden, sollten durch eine Flüssigmembran-Phase (Decanol), die Calcium(II)-2-ethylhexanoat enthält, in Verbindung mit einem geeigneten Feed-/Strip-Gradienten extrahierbar sein. Es stellte sich aber heraus, dass die Extraktion des Chlortetracyclins und Sulfadiazins vom Calcium-Octanoat nicht gefördert wird und sich der Übergang des Trimethoprim in die Membranphase – im Vergleich zu einer reinen Decanol-Phase - verzögert. Ein Strip-Effekt war nur beim Sulfadiazin zu beobachten, was sich somit ähnlich wie Sulfamethoxazol verhält.

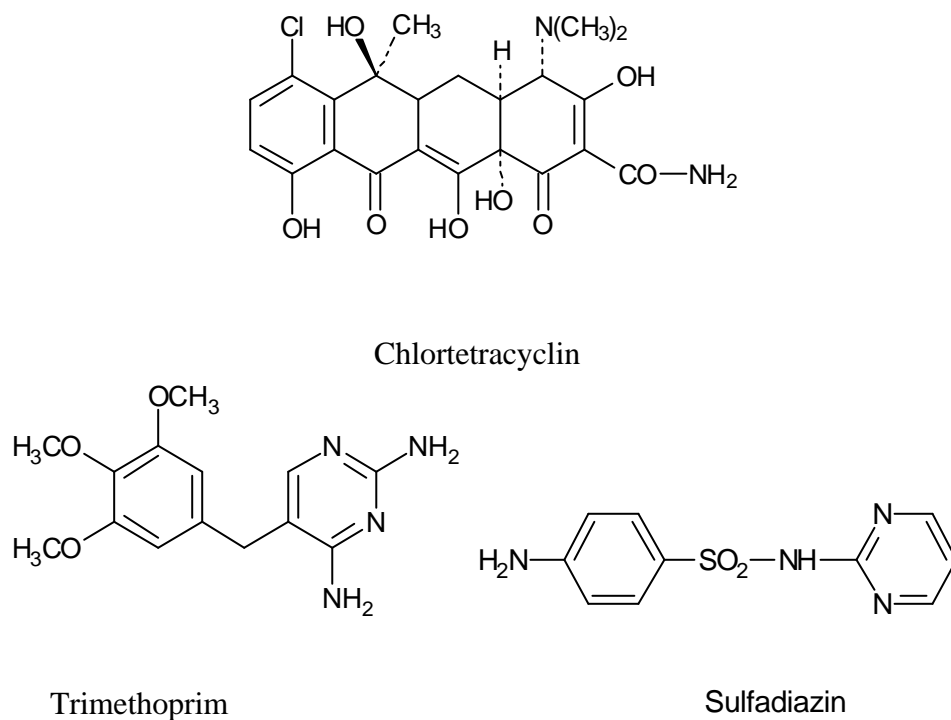


Abb. 28: Strukturformeln der eingesetzten Antiinfektiva

Ergänzende Versuche mit Metallkomplex-modifizierten Membran-Systemen könnten dennoch zu einer vorteilhaften Ausnutzung der Metallaffinitäten von Wirkstoffen führen.

3.2.2 Trägergestützte Flüssig-Membranen (SLM)

Die belegte gute Wiederholbarkeit von Transportraten und Extraktionsgraden der Bulk-Flüssigmembransysteme war eine wesentliche Voraussetzung für die geplante Übertragung auf trägergestützte Systeme

Dazu wurden ausgewählte organische Flüssigmembranphasen an poröse, hydrophobe Festmembranen immobilisiert, wodurch *trägergestützte Flüssigmembranen* (Supported Liquid Membranes, SLM) erhalten wurden.

Eine besondere Voraussetzung ist dabei die hinreichend große Benetzbarkeit des Trägerpolymers durch das organische Lösemittel bzw. das Carrier-System. Eine Stützmembran ist in der Regel wasserabstoßend, wird aber bei genügend hohem Differenzdruck von den wässrigen Phasen benetzt.

Als Träger wurden mikroporöses Polypropylen (PP) und Teflon-Materialien (PTFE) unterschiedlicher Porosität erprobt, wobei sich PP in den SLM-Systemen bezüglich Membranstabilität und Permeationseigenschaften als vorteilhaft erwies.

Die SLM-Untersuchungen wurden in Zweikammer-PTFE-Zellen mit gleichem (jeweils 150 mL) und für Anreicherungsversuche ungleichem Kammervolumen (Feed: 250 mL, Strip: 30 mL, Abb. 31) durchgeführt. Zur Präparation der trägergestützten Flüssigmembran wurde das PP-Trägermaterial (i.d.R. Enka/Membrana 2E –PP; Fläche 5,5 x 5,5 cm, Dicke: 90 µm, mittlerer Poren-Durchmesser 0,1 µm) mehrere Stunden in der organischen Membran-Lösung getränkt und dann zwischen beide Zellkammern arretiert. Als organische Phase wurde überwiegend Dihexylether mit und ohne Octansulfonsäure-Zusatz eingesetzt. Die Zusammensetzung der Feed- und Strip-Phasen orientierte sich an den vorhergehenden Versuchen mit den Bulk-Membranen.

Wie Abb. 29 zeigt, wurden Betriebsbedingungen gefunden, die ein im Vergleich zu den Bulk-Systemen erheblich effektiveres Transportverhalten ermöglichen, bei reduzierten Permeationszeiten und geringem Lösemittelaufwand.

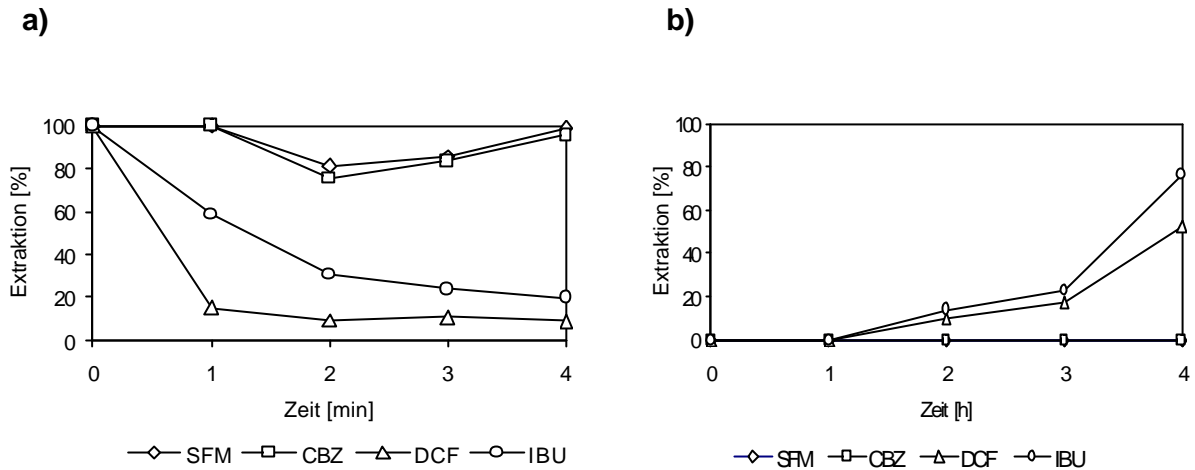


Abb. 29: Permeation der Arzneiwirkstoffe durch eine trägergestützte Membran (SLM) Extraktion a) von der Feed- b) in die Strip-Phase
(Feed: 0,1 mol/L HCl, PP-Membran: mit Octansulfonsäure in Dihexylether, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH), nur Feed-Phase gerührt

Dabei verhalten sich die Wirkstoffe ähnlich wie in der Dreiphasen-Rührzelle, d.h. die Carbonsäuren Diclofenac und Ibuprofen werden im Vergleich zum Carbamazepin und Sulfamethoxazol am schnellsten zur Stripseite transportiert.

Zur Feed-Lösung zugesetzte Huminstoffe beeinträchtigen jedoch das Transportverhalten im SLM-System erheblich, was **Abb. 30** verdeutlicht.

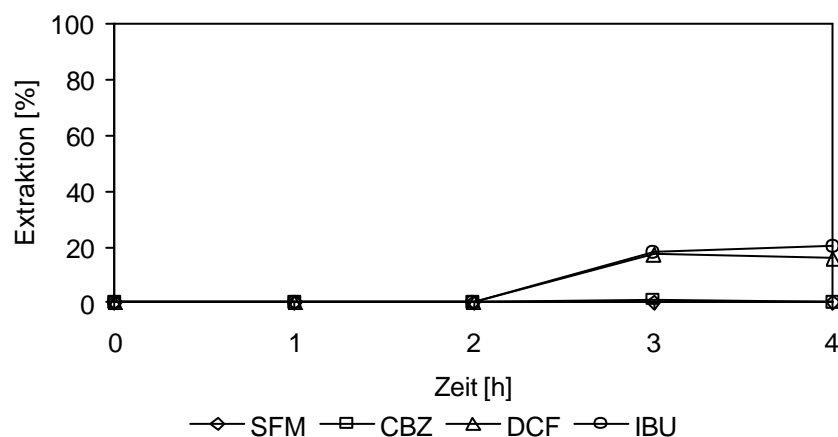


Abb. 30: Einfluss von Huminstoffen auf die Permeation der Arzneiwirkstoffe durch eine SLM: Konzentrationsverlauf in der Strip-Phase (Feed: Zusatz von 18 mg/L HUS – Standard, sonst Bedingungen wie in Abb. 29)

Bedingt durch die Huminstoff-Anteile nehmen die Stripausbeuten für IBU von 76,4 auf 20,3 % und für DCF von 52,4 auf 16 % ab.

Für das Permeationsverhalten ist von besonderer Bedeutung, ob ausschließlich die Feed-Lösung gerührt wird oder synchron auch die Strip-Phase. Unter Einsatz von zwei Flügelrührern kann erreicht werden, dass auch die allgemein schwieriger zu re-extrahierenden Wirkstoffe Sulfamethoxazol und Carbamazepin nach 4 h in größeren Anteilen (< 30 %) durch die SLM permeieren.

Anreicherungszone

Das Zweikammersystem bietet Möglichkeiten einer effektiven Anreicherungstechnik, was die Versuche mit dem Prototypen einer Zweikammer-Anreicherungszone belegen (**Abb. 31**).

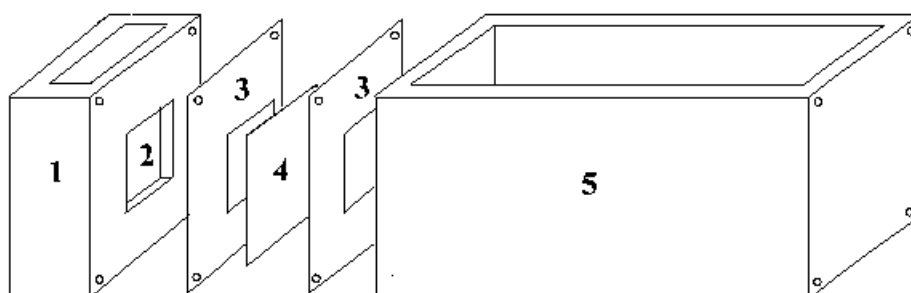


Abb. 31: Zweikammer-Anreicherungszone für trägergestützte Flüssigmembranen

- 1: PTFE-Kammer (Strip) 2: Fensteröffnung für Membrankontakt 3: Silicon-Dichtung
4: SL-Membran 5: PTFE-Kammer (Feed)
(Volumen der Feed-Phase: 250 mL, Volumen der Strip-Phase: 30 – 40 mL)

Wie die Konzentrationsprofile in Abb. 32 verdeutlichen, ist mit dieser Zelle eine selektive Abtrennung der Carbonsäuren Diclofenac und Ibuprofen von den Begleitkomponenten Sulfamethoxazol und Carbamazepin möglich, wobei die permeierenden Komponenten zwischen 30 und 60 min um den Faktor 2 und nach 4 h ungefähr um den Faktor 4,5 angereichert sind.

Durch Variation der Betriebsparameter – einschließlich der SLM-Zusammensetzung – sind die Permeationseffekte optimierbar.

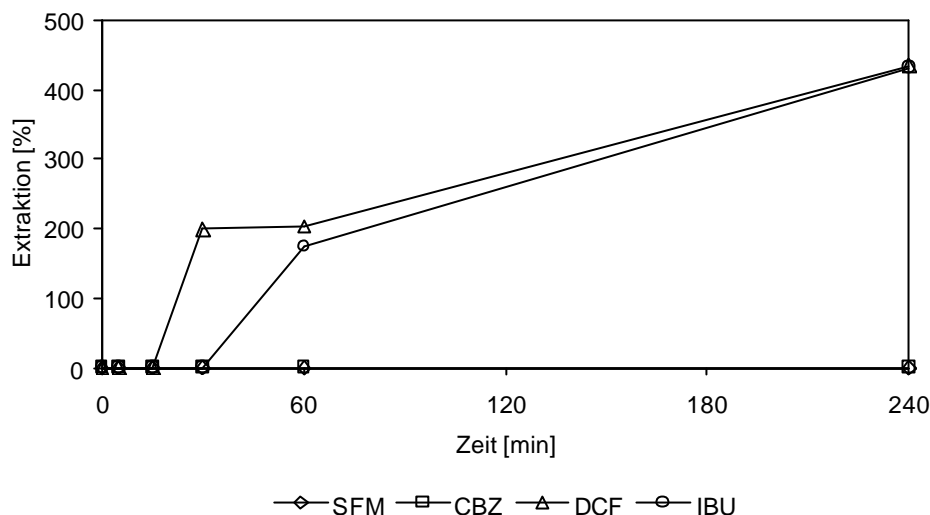


Abb. 32: Selektive Anreicherung von Diclofenac und Ibuprofen durch SLM-Technik
(Feed: 1 mg/L je Arzneiwirkstoff in 0,1 mol/L HCl, Membran: Octansulfonsäure in Dihexylether, Strip-Phase: 0,1 mol/L NaOH)

Die aus dieser Untersuchungsserie gewonnenen Erkenntnisse über trägergestützte Flüssigmembran-Kombinationen sollen für die Entwicklung neuer miniaturisierter 2-Phasen- und 3-Phasen-Membranmodule verwendet werden. Kombinationen mit Fest-Membran-Systemen des Projektpartners (ISAS Dortmund) könnten sowohl für analytische als auch technische Anwendungen vorteilhaft sein.

4. Synthese von Hauptmetaboliten

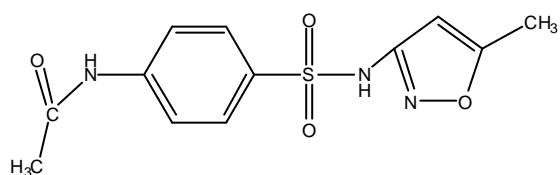
In dem vorliegenden Projekt war auch geplant, die *Hauptmetaboliten* der untersuchten *Arzneiwirkstoffe*, die ebenfalls in Oberflächenwässern nachweisbar sind, in die Permeationsstudien einzubeziehen. Diese Verbindungen (chemische Strukturen s. **Abb. 33**) sind kommerziell nicht erhältlich und müssen überwiegend in vielstufigen (bis zu 11 Stufen), z.T. stereochemisch anspruchsvollen Synthesen dargestellt werden, die in Verbindung mit notwendigen präparativen, chromatographischen Trennoperationen für die Zwischenprodukte sehr zeitaufwendig sind. Daher ließen sich die präparativen Ziele innerhalb des Projektzeitraumes nur zum Teil erreichen:

Die nur einstufig durchzuführende Synthese des N4-Acetyl-sulfamethoxazols wurde erfolgreich abgeschlossen und die Acylierungsreaktion auch auf weitere Sulfonamide (wie z.B. Sulfadiazin) übertragen. In Permeationssystemen mit natürlichen Membranen konnten erste Studien mit dem Metaboliten durchgeführt werden.

Die Präparation des Sulfamethoxazol-N1-glucuronids erforderte eine besondere Schutzgruppenstrategie für die Glucuronat-Derivate. Die inzwischen gelungene Kopplung des geschützten Zuckers an das Sulfamethoxazol und die nicht triviale Entschützung zum Endprodukt ist offensichtlich geglückt, wie LC/MS-Daten belegen.

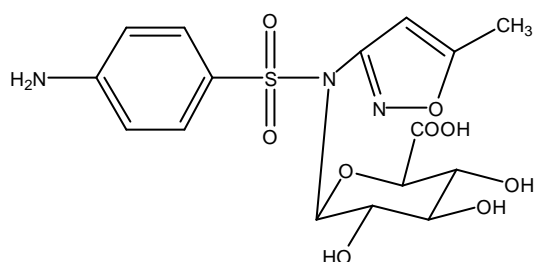
Carbamazepin-N-glucuronid sollte nach einer ähnlichen Kopplungsmethode darstellbar sein. Die Synthese des 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin ist jedoch, worauf Literaturstudien hinweisen, extrem aufwendig, so dass – in Abstimmung mit dem LUA NRW - auf eine Synthese im Rahmen dieses Projektes verzichtet wurde.

Die ersten 5 Zwischenprodukte zum 4-Hydroxy-Ibuprofen wurden in einem Testansatz erhalten. Die abschließende katalytische Hydrierung zum Endprodukt sollte ohne besondere präparative Probleme durchführbar sein.



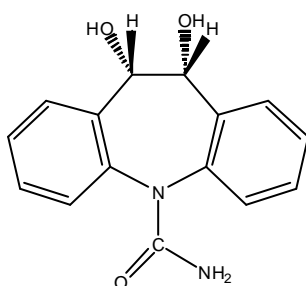
N-4-Acetylsulfamethoxazol

(1)



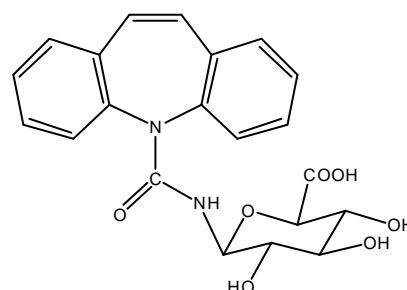
Sulfamethoxazol-N1-glucuronid

(2)



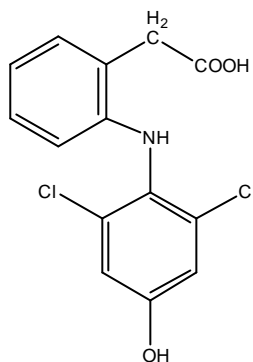
10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin

(3)



Carbamazepine-N-glucuronid

(4)



4-Hydroxy-diclofenac

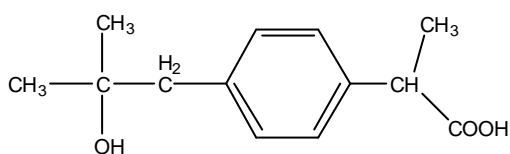
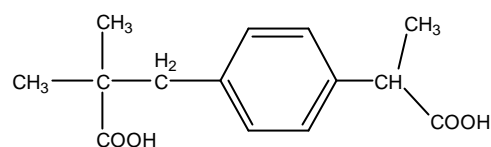
(5)(+)2,4'-(2-Hydroxy-2-methylpropyl)-
-phenylpropionsäure**(6)**(+)2,4'-(2-Hydroxy-2-carboxylpropyl)-
-phenylpropionsäure**(7)**

Abb. 33: Strukturen synthetisierbarer Hauptmetaboliten und Stand der Synthesen

1, 2: Synthese abgeschlossen; 3: geplant (wichtiges Vorprodukt neu im Handel),
4: in Vorbereitung (analog zu 2), 5: Stufen V von XI, 6: Stufen V von VI, 7: geplant

Die ersten 5 Stufen zur Synthese von 4-Hydroxydiclofenac wurden ebenfalls abgeschlossen. Die Ausführung der weiteren Stufen VI bis XI orientiert sich an klassische, organische Grundreaktionen, die im Rahmen eines Folgeprojektes abgeschlossen werden könnten.

Die ebenfalls geplante Synthese der Ibuprofen-Metabolite (+)2,4'-(2-Hydroxy-2-carboxylpropyl)-phenylpropionsäure und (+)2,4'-(2-Hydroxy-2-methylpropyl)-phenylpropionsäure stellt ebenfalls besondere stereospezifische Anforderungen, die im gegebenen Projektzeitraum zeitlich nicht erfüllbar waren.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die beschriebenen Untersuchungen zur Permeation der vier ökotoxikologisch relevanten Arzneiwirkstoffe durch natürliche, feste Flachmembranen umfassten antragsgemäß Schwerpunktstudien mit Darmstücken tierischen Ursprungs (hauptsächlich Goldschlägerhäutchen vom Rind) und einigen technischen Membranen zum direkten Vergleich. Die natürlichen Membranen erfüllen dabei nahezu alle Erwartungen, solange sie keine Fettschicht mehr enthalten. Ihre Tauglichkeit wird durch unterschiedliche Lagerungsbedingungen nicht beeinträchtigt. Im Laufe der Studien wurden mit dem an der Universität Paderborn synthetisierten Metaboliten N4-Acetyl-sulfamethoxazol die gleichen Permeationsversuche mit dem Goldschlägerhäutchen durchgeführt. Er verhält sich exakt so wie der Wirkstoff Sulfamethoxazol, und gibt damit Anlass zur Hoffnung, dass sich die positiven Ergebnisse nicht nur auf die Leitsubstanzen beschränken.

Durch die Eigenschaft der natürlichen Membranen, dass Stofftransport außer durch Poren bevorzugt auch durch die Zellwände erfolgt, sind sie technischen Membranen deutlich überlegen, weil die Tendenz zum Porenverschluss, verursacht durch Schwebeteilchen und Makromoleküle, weniger Wirkung zeigt. Die verwendeten Goldschlägerhäutchen sind mechanisch erstaunlich robust, chemisch widerstandsfähig und stehen in großen Mengen kostengünstig zur Verfügung.

Da die Permeation der Analyte sich in der komplexen Matrix einer Klärschlammprobe nicht anders verhielt als bei den Versuchsansätzen mit Reinstwasser, kann man hoffen, dass diese Technik nicht nur in der Abwasserreinigung sondern auch in der Wasserbehandlung allgemein Anwendung finden kann.

Eine ähnliche Schlussfolgerung erlaubt die Auswertung der Versuchsdaten, die mit Bulk-Flüssigmembranen in Dreiphasenrührzellen ermittelt wurden. Nach systematischer Erprobung verschiedener unpolarer und polarer Lösemittel, mit dotierten basischen, sauren und metallbeladenen Carriern und Feed/Strip-Gradienten wurden Möglichkeiten zur effektiven 2Phasenextraktion und zum 3Phasentransport gefunden. Entsprechend dem Projektplan gelang eine Übertragung optimaler Membrankombinationen auf trägergestützte Systeme, die eine effektive Ab- bzw. Anreicherung insbesondere der Carbonsäuren Diclofenac und Ibuprofen erlauben.

Kombinationen von Flüssig- mit Festmembranen, wodurch die jeweiligen Vorteile der unterschiedlichen Systeme für analytische und technische Anwendungsbereiche nutzbar wären, sind denkbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Vorgaben und Zielsetzungen des Projektes nahezu vollständig erreicht worden sind. Einschränkungen entstanden durch die teilweise äußerst aufwendige Präparation der Metaboliten. Die geplante stärkere Einbeziehung von Realabwasserproben in die Membranversuche wurde, nach Rücksprache mit dem LUA NRW, zugunsten einer ausführlicheren Optimierung der Permeations- bzw. Extraktionsbedingungen zurückgestellt.

Durch die weiterhin wichtige Berücksichtigung der Hauptmetaboliten bieten sich zusätzliche konkrete Ansätze zur Weiterführung des Projektes an, um die noch ungelöste Problematik möglicher Bilanzierungsfehler aufzuklären.

Paderborn, den 17. Dezember 2002

gez. Prof. Dr. M. Grote