



forschen.
vernetzen.
anwenden.

Innovationsreport 2020

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 19681 N

Entwicklung eines hochselektiven und ultrasensitiven Verfahrens zur quantitativen Bestimmung ausgewählter Hormone in Wasser auf Basis der Fluoreszenzdetektion

Laufzeit:

01.09.2017 – 31.01.2020

Beteiligte Forschungsstelle(n):

Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V.
Bereich Forschungsanalytik & Miniaturisierung

Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Schlussbericht

zu IGF-Vorhaben Nr. 19681 N

Thema

Entwicklung eines hochselektiven und ultrasensitiven Verfahrens zur quantitativen Bestimmung ausgewählter Hormone in Wasser auf Basis der Fluoreszenzdetektion

Berichtszeitraum

01.09.2017 bis 31.01.2020

Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

Forschungseinrichtung(en)

1: Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA)

2: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Duisburg, 20.07.2020

Dr. Thorsten Teutenberg

Düsseldorf, 10.07.2020

Dr. Björn Fischer

Ort, Datum

Name und Unterschrift aller Projektleiterinnen und Projektleiter der
Forschungseinrichtung(en)

Gefördert durch:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Ziel des Projektes	10
2. Allgemeine theoretische Grundlagen	12
2.1 Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters.....	12
3. Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen unter Berücksichtigung der definierten Ziele	14
3.1 Aufbau und Entwicklung des Fluoreszenzdetektors.....	14
3.1.1 Auswahl geeigneter UV-LED zur Anregung.....	14
3.1.2 Installation eines Linienfilters zur Rauschreduzierung	17
3.1.3 Entwicklung einer optofluidischen Kopplungseinheit.....	18
3.1.4 Kantenfilter zur Abtrennung des Anregungslichtes	19
3.1.5 Allgemeiner Aufbau	21
3.2 Optimierung des chromatografischen Verfahrens und Entwicklung eines selektiven Anreicherungs- und Aufkonzentrierungsverfahrens	24
3.2.1 Einleitung	24
3.2.2 Entwicklung des Online-SPE-RP-LC-MS/MS-Referenzverfahrens	25
3.2.3 Entwicklung des GC-MS/MS-Referenzverfahrens	28
3.2.4 Entwicklung eines selektiven Anreicherungsverfahrens	29
3.2.5 Clean-Up Verfahren I – Molecular Imprinted Polymers (MIP)	30
3.2.6 Clean-Up Verfahren II – Matrixabtrennung durch Silika.....	31
3.2.7 Zusammenfassung des entwickelten Referenzverfahrens.....	35
3.3 Kopplung von Chromatografie und Fluoreszenzdetektor zur Ermittlung der instrumentellen Bestimmungsgrenze der Zielanalyten.....	39
3.4 Auswertung von Fluoreszenzspektren bei Koelution	47
3.5 Identifizierung potenzieller Störkomponenten mittels Non-Target-Analytik	48
3.6 Validierung des Gesamtverfahrens	53
4. Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	55
5. Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	57
5.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses	57
5.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA	

5.3	Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen 57	
5.4	Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.....	57
5.5	Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts.....	60
6.	Verwendung der Zuwendung.....	61
6.1	Forschungsstelle (IUTA e. V.).....	61
6.1.1	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	61
6.1.2	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)	61
6.1.3	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans).....	61
6.2	Forschungsstelle (HHU)	61
6.2.1	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	61
6.2.2	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)	61
6.2.3	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans).....	61
7.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zustand der europäischen Oberflächengewässer, die EE2 Konzentrationen von 0,035 ng L ⁻¹ (gelb) und 0,35 ng L ⁻¹ (rot) überschreiten.....	11
Abbildung 2:	Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters unter Ausnutzung der Totalreflexion.	13
Abbildung 3:	UV/VIS-Spektren der Hormone E1, E2 und EE2.....	14
Abbildung 4:	Emissionsprofile der UVC-LEDs <i>Crystal IS Optan</i> (schwarze Kurve) und <i>LG Innotek 6060</i> (blaue Kurve) im Vergleich.	15
Abbildung 5:	Darstellung der Emissionsprofile vor und nach Einsatz eines Linienfilters mit zentraler Bandpasswellenlänge bei 280 nm zur Reduzierung der Halbwertsbreite der UVC-LED LG Innotek 6060.	17
Abbildung 6:	Schnittzeichnung der entwickelten optofluidischen Kopplungseinheit.....	18
Abbildung 7:	Mikro-Computertomographie (μCT) Aufnahme. Zu sehen ist der Querschnitt der optofluidischen Kopplungseinheit zur Qualitätskontrolle der Bohr- und Fräspositionen.	19
Abbildung 8:	Messung der mobilen Phase im Flüssigkern-Lichtwellenleiter bei Wasser/Acetonitril 70:30 v/v (schwarzer Kurvenverlauf) und 50:50 v/v (roter Kurvenverlauf) bei Nutzung der UVC-LED LG Innotek 6060 mit Linien- und Kantenfilter.....	20
Abbildung 9:	Oben: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzdetektors mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, Unten: UVC-LED und Linienfilter (links), Flüssigkern-Lichtwellenleiter und optofluidische Kopplungseinheit (mitte), Quarzlinse und Faseradapter zur Abnahme der Fluoreszenzemission (rechts).	21
Abbildung 10:	„Rund-zu-linear“ Mehrkern-Lichtwellenleiter der Firma Thorlabs Inc., https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=7719 , Stand der letzten Abrufung: 12.06.2020.	22
Abbildung 11:	Totalionenstrom-Chromatogramm einer 1000-fach angereicherten und mit 10 ng der Zielanalyten dotierten Oberflächenwasserprobe (Rhein bei Duisburg). HPLC Trennung mittels a) einer Chromolith Fast Gradient-Säule (50 x 2,0 mm, Merck KGaA) sowie b) Raptor Biphenyl-Säule (50 x 2,1 mm, 2,7 μm, Restek GmbH). Analyten: 1) E2, 2) EE2, 3) E1. Injektionsvolumen: 50 μL. Die grau schraffierte Fläche kennzeichnet den Bereich, in dem vorwiegend Matrixverbindungen eluieren. Die Verbindung E1 ist unter Verwendung der monolithischen Säule nicht detektierbar.	27
Abbildung 12:	Totalionenstrom-Chromatogramme einer Kläranlagenablaufprobe dotiert mit 1 ng L ⁻¹ der Zielanalyten E1, E2, EE2. A) Ohne MIP clean-Up, B) mit MIP clean-Up. Gemessen mittels online-SPE-HPLC-MS/MS.	31
Abbildung 13:	Links: Methanolisches Extrakt einer Oberflächenwasserprobe nach Elution der C-18 Speedisk. Rechts: Gleiches Extrakt in n-Hexan-Ethylacetat (60:40 v/v) nach Silika clean-Up.....	32
Abbildung 14:	Totalionenstrom-Chromatogramm der Zielanalyten (1) E2, (2) EE2, (3) E1 aus der online-SPE-HPLC-MS/MS Messung. A) Chromatogramm ohne clean-Up. B) Chromatogramm mit clean-Up. Im Chromatogramm B sind deutlich weniger Störsignale (Matrix) sowie ein geringeres Rauschen im Bereich der Zielanalyten zu erkennen.	32

Abbildung 15: MRM-Massenübergang m/z 295,1 \rightarrow 269,1 von EE2 in einer mit 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ dotierten Oberflächenwasserprobe.	33
Abbildung 16: Extrahierte MRM-Chromatogramme der Zielanalyten einer mit 1 ng L^{-1} dotierten Oberflächenwasserprobe. Gegenübergestellt sind die jeweiligen Massenübergänge einmal ohne clean-Up durch Silika (A) sowie mit Silika-clean-Up (B). Durch ein zusätzliches clean-Up mit Silika lässt sich ein deutlich besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielen.	34
Abbildung 17: Zusammenfassung des Anreicherungsverfahrens sowie der Referenzmethoden online-SPE-HPLC-MS/MS und online-SPE-GC-MS/MS.	36
Abbildung 18: Detektion von 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (A) und 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B) für das EE2 dotiert in 1 L Oberflächenwasserprobe. Gemessen mittels GC-MS/MS (Shimadzu TQ8040).	38
Abbildung 19: UV-Chromatogramm Hormon-Mix; Analyten: E1, α E2, β E2, EE2; Injektionsvolumen: 100 μL ; HPLC: Dionex P580, ASI-100, UVD 340U; Stationäre Phase: Restek Raptor Biphenyl 2,7 μm , 50 x 2,1 mm; Temperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$; Mobile Phase: A: Wasser, B: 30-50 % Acetonitril in 4 min; Flussrate: 0,8 mL min^{-1} ; Druck: 276 bar.	40
Abbildung 20: Fluoreszenzspektren von EE2 nach chromatografischer Trennung, Konzentration der Injektionslösung: 25 ng mL^{-1} , Injektionsvolumen: 100 μL . Aufsteigende Peakflanke bei 140 s (blau), 142 s, 143 s, 144 s (schwarze Kurven) und 145 s (rot, Fluoreszenzmaximum) im Chromatogramm. Linke Abbildung: Rohdaten. Rechte Abbildung: Basislinienkorrigiert durch Differenzbildung zum Spektrum der reinen mobilen Phase bei 138 s.	41
Abbildung 21: Optimaler Integrationsbereich der Fluoreszenzspektren (gelbe Fläche).	42
Abbildung 22: Chromatogramme mit Fluoreszenzdetektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter; Analyten: E1, α E2, β E2, EE2; Injektionsvolumen: 100 μL ; HPLC: Dionex P580, ASI-100; Stationäre Phase: Restek Raptor Biphenyl 2,7 μm , 50 x 2,1 mm; Temperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$; Mobile Phase: A: Wasser, B: 30-50% Acetonitril in 4 min; Flussrate: 0,8 mL min^{-1} ; Druck: 276 bar.	43
Abbildung 23: Chromatogramme mit Fluoreszenzdetektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter; Analyten: E1, α E2, β E2, EE2; Injektionsvolumen: 100 μL ; HPLC: Dionex P580; Stationäre Phase: Restek Raptor Biphenyl 2,7 μm , 50 x 2,1 mm; Temperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$; Mobile Phase: A: Wasser, B: 30-50% Acetonitril in 4 min; Flussrate: 0,8 mL min^{-1} ; Druck: 276 bar.	44
Abbildung 24: Lineare Regressionsanalyse der Hormonkalibration mittels Fluoreszenzdetektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter. Links: Auftragung der Signalintensität gegen die Konzentration. Rechts: Auftragung der integrierten Peakfläche gegen die Konzentration.	45
Abbildung 25: Fluoreszenzchromatogramm einer mit Hormonen dotierten Oberflächengewässerprobe (Konzentration 1 ng mL^{-1}) aus dem Rhein.	47
Abbildung 26: Bestimmung der Retentionszeiten anhand eines hoch konzentrierten Standards (10 ng mL^{-1}) für die Zielanalyten, sowie Festlegung der Retentionszeitfenster mit \pm 30 s von dem Peakmaximum des entsprechenden Analyten zur Featureanalyse in einer Realprobe. Das Chromatogramm der Rheinprobe inklusive Aufarbeitung ist eine skalierte Darstellung des gesamten Totalionenstrom-Chromatogramms der Probe.	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der technischen Spezifikationen der UVC-LEDs <i>Crystal IS Optan</i> (schwarze Kurve) und <i>LG Innotek 6060</i> und Berechnung der maximal nutzbaren UV-Leistung im Flüssigkern-Lichtwellenleiter.	16
Tabelle 2:	MRM-Übergänge für die Hormone und deren interne Standards.	25
Tabelle 3:	Auflistung der untersuchten Trennsäulen inklusive spezifischer Kenndaten. ...	26
Tabelle 4:	MRM-Übergänge für die Hormone und deren Standards nach Derivatisierung durch BSTFA.	28
Tabelle 5:	Bestimmungsgrenzen der Hormone mittels Fluoreszenzdetektion im Kalibrierstandard nach Probenanreicherung um den Faktor 10.000.	46
Tabelle 6:	Zusammenfassung der HRMS-Daten bei Verwendung der Biphenyl- und Chromolith FastGradient-Trennsäule nach Probenvorbereitung inklusive. clean-Up.	50
Tabelle 7:	Anzahl der detektierten Features in verschiedenen Proben.	51
Tabelle 8:	Treffer der Features in der Datenbank PubChem.	52
Tabelle 9:	Erreichte Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) des Gesamtverfahrens inklusive offline-SPE und clean-Up mittels Silika-clean-Up.	54
Tabelle 10:	Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.	58

Griechische Formelzeichen

α	Alpha
β	Beta
λ	Lambda (Wellenlänge)
μ	Mikro
θ_G	Grenzwinkel der Totalreflexion
n	Brechungsindex

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCT	Mikro-Computertomografie
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μW	Mikrowatt
ACN	Acetonitril
bar	Druck in SI-Einheiten
BG	Bestimmungsgrenze
CCD	Charge-coupled Device
cm	Zentimeter
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
EE2	17α-Ethinylestradiol
ESI	Elektrospray-Ionisation
EU-WRRL	Europäische Wasserrahmenrichtlinie
FEP	Perfluor(ethylen-propylen)
FK-LWL	Flüssigkern-Lichtwellenleiter
FLD	Fluoreszenzdetektor
FWHM	Full width at half maximum
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSS	Hochleistungsschnellschnittstahl
ID	Innendurchmesser
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
L	Liter
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatografie)
LED	Light-emitting Diode
M ²	Beugungsmaßzahl
min	Minute
MIP	Molecular Imprinted polymer
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MS	Massenspektrometrie; Massenspektrometer
mW	Milliwatt
ng	Nanogramm
NWG	Nachweisgrenze
OD	Outer Diameter (Außendurchmesser)
Online-SPE	Online-Solid Phase Extraction (Online-Festphasenextraktion)
PAL	Prep and Load
pg	Picogramm
PNEC	Predicted no Effect Concentration
psi	Pound-force per Square Inch
PTFE	Polytetrafluorethylen
rad	Radiant
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
s	Sekunde

S/R	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
Teflon-AF	Poly[4,5-difluoro-2,2-bis(trifluoromethyl)-1,3-dioxole-co-tetrafluoroethylene]
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UQN	Umweltqualitätsnorm
UV/VIS	Ultraviolet-visible

1. Einleitung und Ziel des Projektes

Östrogene gehören zu den Hormonen, welche essentielle Botenstoffe sind, die in fast allen mehrzelligen Lebewesen vorkommen und lebenswichtige Abläufe wie den Energie- und Mineralhaushalt sowie die Reproduktion steuern. Hormone werden sowohl auf natürlichem Wege durch den Menschen ausgeschieden (ca. 25 bis 100 µg pro Tag), gelangen aber auch durch intensive Tierhaltung wie z. B. Schweinezucht in Oberflächengewässer. Die in die Kläranlagen eingetragenen Hormone werden jedoch nicht ausreichend eliminiert, sodass Kläranlagen als Punktquellen für den Eintrag von Östrogenen in die Umwelt anzusehen sind. Insbesondere bei der Einleitung in kleine Gewässer erfolgt nur eine geringe Verdünnung des Abwassers, sodass Effekte auf die aquatische Umwelt auftreten. Hormonell wirksame Substanzen werden unter anderem mit Störungen bei der Organentwicklung, der Verringerung der männlichen Fruchtbarkeit und dem vermehrten Auftreten bestimmter Krebsformen in Verbindung gebracht. Die natürlichen Östrogene Estron (E1) und 17β-Estradiol (E2), sowie der Wirkstoff der Antibabypille, das synthetische Östrogen 17α-Ethinylestradiol (EE2), haben einen PNEC (predicted no effect concentration, Schwellenwert für Umwelteffekte) von 6, 2 und 0,1 ng L⁻¹. Vor diesem Hintergrund hat die Europäische Kommission innerhalb der Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL) für Oberflächengewässermonitoring eine notwendige Nachweisgrenze (NWG) von 0,4 ng L⁻¹ (E1 und E2) bzw. 0,035 ng L⁻¹ (EE2) festgelegt^{1,2}. Für EE2 liegt der abgeleitete Vorschlag für die Umweltqualitätsnorm (UQN) ebenfalls bei 35 pg L⁻¹. Allerdings wurde sehr schnell deutlich, dass es mit den herkömmlichen instrumentellen analytischen Verfahren nicht möglich ist, in diesem geringen Konzentrationsbereich zu analysieren. Die in Abbildung 1 dargestellte Modellierung der EE2-Konzentrationen in Europäischen Gewässern verdeutlicht allerdings das Gefährdungspotenzial der Hormone. In 12% der Flusskilometer wird die vorgeschlagene Umweltqualitätsnorm für EE2 überschritten. Simulationen des Bayerischen Landesamtes für Umwelt ergaben insbesondere für den Rotmain Konzentrationen im Bereich der UQN. Modellierungsergebnisse für Nordrhein-Westfalen deuten sogar auf 84% Überschreitungen der UQN für EE2 hin³. Die experimentelle Validierung dieser Modellierungsdaten war aufgrund fehlender Messdaten der instrumentellen Analytik nicht möglich, da ausreichend empfindliche Messmethoden fehlen. Dies wirkt sich neben der unzureichenden Bewertung europäischer Gewässer direkt auf die Abwasserreinigung aus, da erweiterte

¹ EU 2015/495, Durchführungsbeschluss (EU) 2015/495 der Kommission vom 20. März 2015 zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates.

² Beschluss der Kommission zur Durchführung des Beschlusses (EU) 2018/840 vom 5. Juni 2018 zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für die unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung des Durchführungsbeschlusses der Kommission (EU) 2015/495.

Abwasserreinigungsverfahren wie Ozonung oder Aktivkohleadsorption im Hinblick auf eine ausreichende Elimination der Östrogene zurzeit nur bedingt beurteilt werden können.



Abbildung 1: Zustand der europäischen Oberflächengewässer, die EE2 Konzentrationen von $0,035 \text{ ng L}^{-1}$ (gelb) und $0,35 \text{ ng L}^{-1}$ (rot) überschreiten³.

Um das messtechnische Problem zu adressieren, wurde das IGF-Projekt „Fluoreszenz-Hormone“ initiiert. Die Zielstellung lag in der Entwicklung eines ultrasensitiven und im Vergleich zur Massenspektrometrie kostengünstigen Fluoreszenzdetektors für die Flüssigkeitschromatografie, der eine Erfassung der genannten Östrogene im relevanten Konzentrationsbereich erlaubt. Dafür ist insbesondere die Abtrennung der Zielanalyten von der Matrix von großer Bedeutung, um Matrixstörungen zu minimieren. Vor diesem Hintergrund musste ein Referenzverfahren zur Anreicherung und hochselektiven Aufreinigung von Realproben entwickelt werden, mit dessen Hilfe eine Elimination des störenden Signaluntergrundes vorgenommen werden kann. Für die Aufreinigung und Anreicherung wurde eine Verfahrenskombination aus Offline- und Online-SPE gewählt. Die instrumentelle Referenzanalytik wurde auf Basis der Tandem-Massenspektrometrie entwickelt, sowohl in Kombination mit der Flüssigkeits- als auch der Gaschromatografie.

³ Johnson, A.C., et al., Do Concentrations of Ethinylestradiol, Estradiol, and Diclofenac in European Rivers Exceed Proposed EU Environmental Quality Standards? *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(21): 12297-12304.

2. Allgemeine theoretische Grundlagen

2.1 Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters

Der in diesem Projekt zu entwickelnde Fluoreszenzdetektor basiert auf einer Durchflusszelle, die als Flüssigkern-Lichtwellenleiter ausgelegt ist. Dabei handelt es sich im Prinzip um eine Kapillare, in der analog zu einem optischen Lichtleiter aus z. B. Quarzglas, das Prinzip der Totalreflexion ausgenutzt wird, um einen nahezu verlustfreien Lichttransport zu ermöglichen. Als Voraussetzung für die Totalreflexion muss der lichtleitende Kern der Faser einen höheren Brechungsindex aufweisen, als das ihn umschließende Mantelmaterial. Bei handelsüblichen Quarzfasern, bei denen sowohl der Faserkern als auch das Mantelmaterial aus Quarzglas bestehen, wird das Quarzglas des Mantels mit seltenen Erden dotiert. Dadurch lässt sich der Brechungsindex des Fasermantels verringern.

Bei einem Flüssigkern-Lichtwellenleiter wird der Brechungsindex des lichtleitenden Faserkerns hingegen durch die innenliegende Flüssigkeit bestimmt. Im Falle der Kopplung mit der HPLC kommen gängige Lösungsmittel wie z. B. Wasser, Acetonitril und Methanol zum Einsatz, welche Brechungsindizes zwischen $n = 1,32$ und $n = 1,35$ aufweisen. Daraus folgt, dass eine Totalreflexion am Mantelmaterial, also der Innenwand der Kapillare, nur auftreten kann, wenn das Kapillarmaterial einen Brechungsindex kleiner $n = 1,32$ besitzt. Vor diesem Hintergrund können als Flüssigkern-Lichtwellenleiter Polymerkapillaren aus dem Material Teflon AF 2400 eingesetzt werden, welches einen Brechungsindex von $n = 1,29$ besitzt. Der sogenannte Grenzwinkel der Totalreflexion kann nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz anhand des Verhältnisses der beiden Brechzahlen ermittelt werden.

$$\theta_G = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

θ_G : Grenzwinkel der Totalreflexion

n_1 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums

n_2 : Brechungsindex des optisch dünneren Mediums

Für Wasser mit einem Brechungsindex von $n = 1,33$ ergibt sich ein Grenzwinkel von $75,9^\circ$. Daraus resultiert ein Akzeptanzwinkel von $\theta_A = 14,1^\circ$ ($90^\circ - 75,9^\circ$), d. h. Licht, welches in einem Winkel zwischen 0° und $14,1^\circ$ auf die Kapillarinnenwand trifft, wird unter Totalreflexion gebrochen und weitgehend verlustfrei durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter transportiert (siehe Abbildung 2).

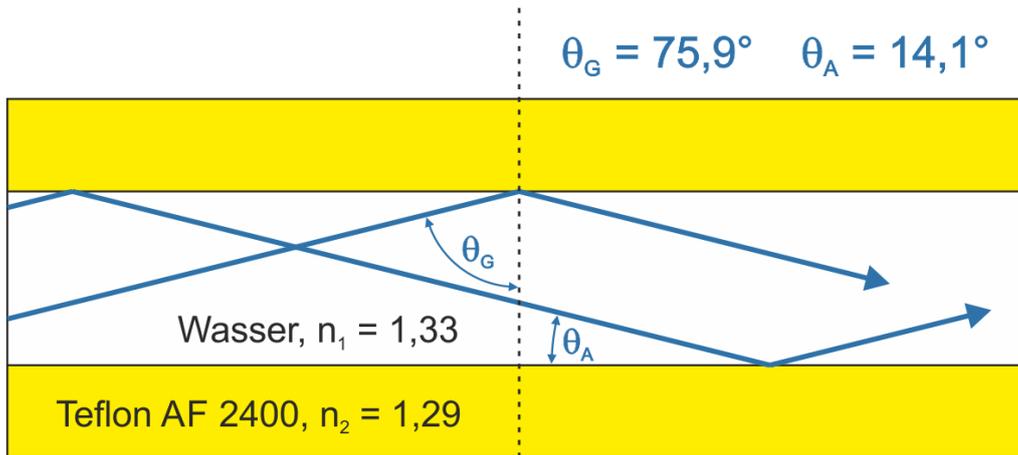


Abbildung 2: Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters unter Ausnutzung der Totalreflexion.

Durch den Einsatz eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters als analytische Durchflusszelle lässt sich der Lichtweg und damit das für die optische Messung zur Verfügung stehende Probenvolumen stark erhöhen. Dadurch lassen sich in der Regel hohe Signalverstärkungen erreichen. Gleichzeitig kann aufgrund der kapillaren Bauform gewährleistet werden, dass das Zellvolumen in einem für die Flüssigkeitschromatografie anwendbaren Bereich von wenigen Mikrolitern liegt. Die Technik kann für verschiedene spektroskopische Methoden, wie z. B. die UV/VIS-, Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie eingesetzt werden.

3. Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen unter Berücksichtigung der definierten Ziele

3.1 Aufbau und Entwicklung des Fluoreszenzdetektors

3.1.1 Auswahl geeigneter UV-LED zur Anregung

Die für dieses Projekt relevanten Hormone E1, E2 und EE2 besitzen Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 212 bis 224 nm und 281 nm (siehe Abbildung 3). Da viele chromophore Substanzen eine Absorption < 230 nm aufweisen ist dieser Wellenlängenbereich sehr unspezifisch. Vor diesem Hintergrund sollte die Fluoreszenzanregung der Hormone bei einer Wellenlänge von 281 nm erfolgen.

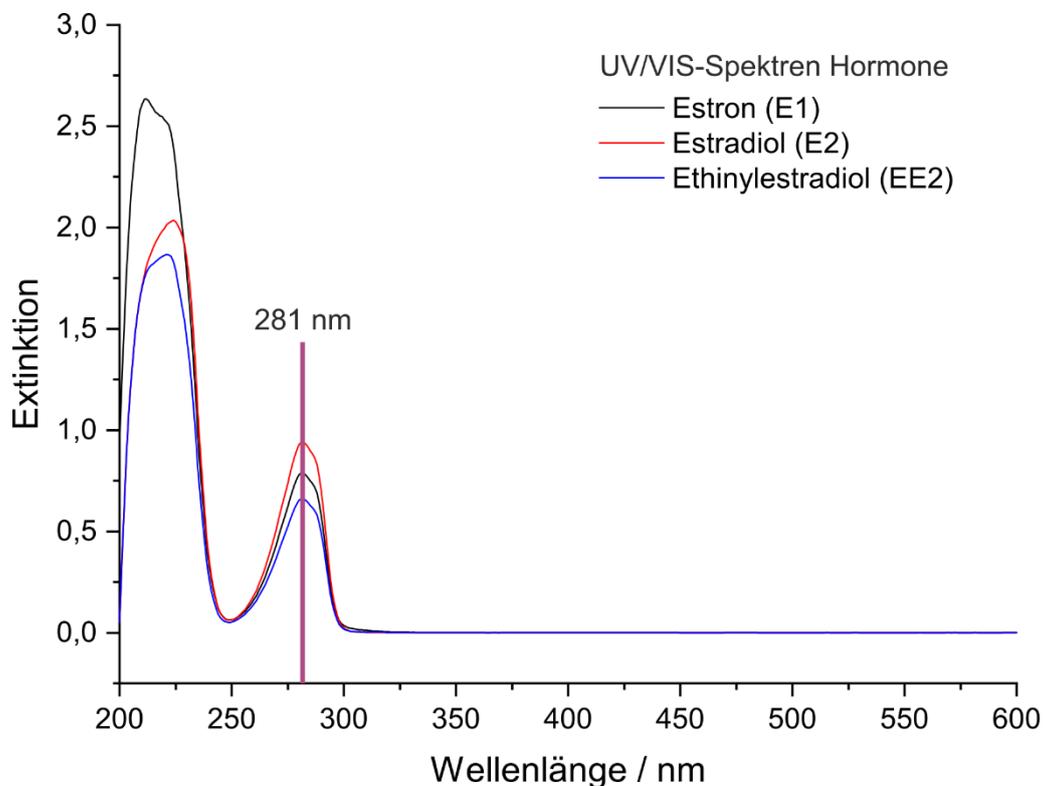


Abbildung 3: UV/VIS-Spektren der Hormone E1, E2 und EE2.

Nach eingehender Marktanalyse konnten zwei UVC-LEDs identifiziert werden, die laut Spezifikationen ein passendes Emissionsprofil aufweisen. Dabei handelt es sich um die Modelle *Crystal IS Optan* und *LG Innotek 6060*, die beide mit einer zentralen Emissionswellenlänge von 280 nm und einer maximalen Intensität von 3 mW angeboten werden. Die UVC-LEDs wurden nach zwei Kriterien geprüft, die maßgeblichen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Fluoreszenzdetektors nehmen. Dazu wurden zum einen die Emissionsprofile der LEDs gemessen. Im speziellen wurden die Symmetrie und Bandbreite der Emissionsspektren analysiert. Zum anderen wurde die Leistung pro Fläche bei Fokussierung des UV-Lichts berechnet, um die tatsächlich nutzbare Lichtleistung zu

ermitteln, die in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter eingekoppelt werden kann. Es hat sich herausgestellt, dass beide LED-Modelle Stärken und Schwächen aufweisen.

Die Abbildung 4 zeigt die Emissionsprofile der ausgewählten UVC-LEDs. Das gemessene Emissionsmaximum lag für beide LEDs bei 279,5 nm. Die Messungen erfolgten in beiden Fällen bei der maximal zur Verfügung stehenden Emissionsleistung von 3 mW. Das Modell *Crystal IS Optan* besitzt ein ausgesprochen symmetrisches Emissionsprofil (schwarzer Kurvenverlauf). Dies ist für den hier vorgestellten Transmissionsaufbau von Vorteil, da die Emission der LED bei 310 nm, also an der Stelle im Spektrum, an der die maximale Fluoreszenzemission der Hormone erwartet wird, relativ niedrig ist und somit eine optische Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenzemission durch den verwendeten Kantenfilter bei 306 nm problemlos erfolgen kann. Dadurch lässt sich ein niedriger Signaluntergrund realisieren, was anhand der in Abbildung 4 dargestellten Emissionsprofile nachvollzogen werden kann.

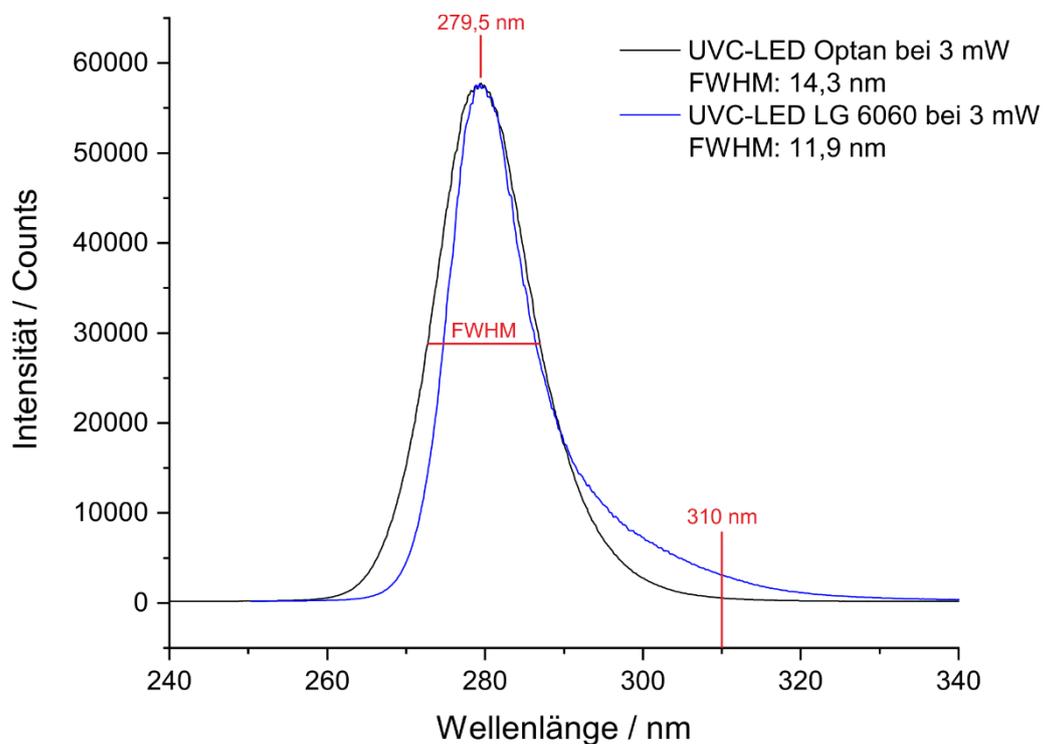


Abbildung 4: Emissionsprofile der UVC-LEDs *Crystal IS Optan* (schwarze Kurve) und *LG Innotek 6060* (blaue Kurve) im Vergleich.

Die *LG Innotek 6060* zeigt hingegen eine deutliche Asymmetrie mit lang abfallender Flanke zu höheren Wellenlängen. Dies führt zwangsläufig zu einem höheren Signaluntergrund ab 306 nm, da ein Teil des Anregungslichtes nicht mehr vollständig vom Kantenfilter geblockt und daher zusammen mit dem Fluoreszenzsignal detektiert wird. Bezüglich der Emissionsbandbreite zeigt die *LG Innotek 6060* allerdings eine geringere Halbwertsbreite (FWHM, Full width at half maximum) von 11,9 nm, während die Halbwertsbreite der *Crystal IS Optan* bei 14,3 nm liegt. Zur Berechnung der nutzbaren UV-Leistung im Flüssigkern-

Lichtwellenleiter wurden die Strahleigenschaften der LEDs berechnet. In Kombination mit den Spezifikationen der eingesetzten Quarzlinse konnte der minimale Fokusbereich und damit die zu erwartende Leistung im Flüssigkern-Lichtwellenleiter ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Auflistung der technischen Spezifikationen der UVC-LEDs *Crystal IS Optan* und *LG Innotek 6060* sowie Berechnung der maximal nutzbaren UV-Leistung im Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

	Crystal IS Optan	LG Innotek 6060
		
LED		
Wellenlänge	279,5 nm	279,5 nm
Leistung	3 mW	3 mW
Aktive Leuchtfläche	0,8 x 0,8 mm ²	0,37 x 0,37 mm ²
Diagonaler Durchmesser	1,13 mm	0,52 mm
Abstrahlwinkel	115°	121°
Numerische Apertur	0,84	0,87
Beugungsmaßzahl [M ²]	5366	2564
Strahlgüte [1/M ²]	0,0001864	0,0003902
Strahlparameterprodukt Gaußstrahl	8,9 x 10 ⁻⁵ rad mm	8,9 x 10 ⁻⁵ rad mm
Strahlparameterprodukt LED	0,4774 rad mm	0,2280 rad mm
Quarzlinse		
Strahldurchmesser	22,86 mm	22,86 mm
Strahlradius	11,43 mm	11,43 mm
Brennweite	35 mm	35 mm
Fernfelddivergenz	0,316 rad	0,316 rad
Nutzbare Leistung		
Fokusbereich	3,03 mm	1,45 mm
Fokusfläche	7,21 mm ²	1,65 mm ²
Leistung pro Fläche	0,416 mW/mm ²	1,818 mW/mm ²
Leistung im FK-LWL mit 200 µm ID	13 µW	57 µW

Der Vergleich der beiden LEDs hat gezeigt, dass das Modell *LG Innotek 6060* aufgrund der kleineren aktiven Leuchtfläche bei gleicher Emissionsleistung ein deutlich besseres

Strahlprofil zeigt. Dadurch lässt sich ein kleinerer Fokusbereich erzielen und die UV-Leistung, die in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter eingekoppelt werden kann, liegt etwa um den Faktor 4,3 höher als bei dem Modell *Crystal IS Optan*. Vor diesem Hintergrund wurde entschieden, den Aufbau des Fluoreszenzdetektors mit der *LG Innotek 6060* trotz des etwas schlechteren Emissionsprofils durchzuführen.

3.1.2 Installation eines Linienfilters zur Rauschreduzierung

Um das Emissionsprofil der LED *LG Innotek 6060* an den Flanken zu reduzieren, wurde ein Linienfilter der Fa. Semrock, Modell FF01-280/10-25 BrightLine® in den parallelisierten Strahlengang zwischen die beiden ersten Quarzlinsen eingesetzt. Die Abbildung 5 zeigt den Effekt des Filters auf das Emissionsprofil der UVC-LED.

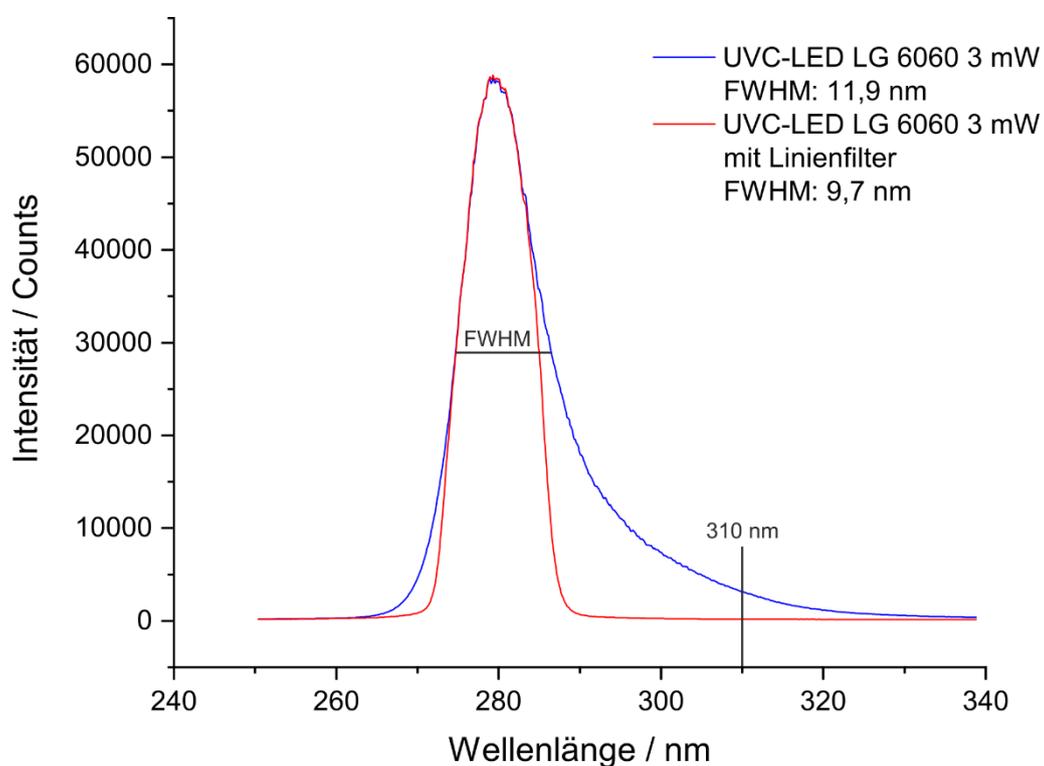


Abbildung 5: Darstellung der Emissionsprofile vor und nach Einsatz eines Linienfilters mit zentraler Bandpasswellenlänge bei 280 nm zur Reduzierung der Halbwertsbreite der UVC-LED LG Innotek 6060.

Der rote Kurvenverlauf zeigt das Emissionsprofil der UVC-LED bei Einsatz des Linienfilters. Im Vergleich zum ursprünglichen Emissionsprofil (blauer Kurvenverlauf) kann die Halbwertsbreite von 11,9 nm auf 9,7 nm reduziert werden. Insbesondere die lang abfallende Flanke im höheren Wellenlängenbereich kann gut unterdrückt werden, sodass das Untergrundsignal an der Stelle des Fluoreszenzmaximums bei 310 nm stark abgeschwächt wird. Die Ergebnisse zeigen, dass eine preiswerte UVC-LED in Kombination mit einem

schmalbandigen Linienfilter prinzipiell für den Fluoreszenzaufbau in Transmissionsanordnung geeignet ist.

3.1.3 Entwicklung einer optofluidischen Kopplungseinheit

Zur Einkopplung des UVC-Lichts in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter wurde eine optofluidische Kopplungseinheit entwickelt. Eine Schnittzeichnung ist in der Abbildung 6 dargestellt. Bei der Auswahl der Komponenten wurden ausschließlich Materialien verwendet, die keine bzw. nur eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz bei Kontakt mit dem UVC-Licht aufweisen. Die Kontaktstellen zwischen dem UVC-Licht und den Bauteilen beschränken sich auf die Materialien Edelstahl V2A, optisches Quarzglas, hochreines Teflon (Polytetrafluorethylen, PTFE) und Teflon-AF-2400 (Poly[4,5-difluoro-2,2-bis(trifluoromethyl)-1,3-dioxole-co-tetrafluoroethylene]). Zur Abdichtung der Kapillaren in der optofluidischen Kopplungseinheit wurden zudem kommerziell erhältliche Ferrules aus dem Copolymer FEP (Perfluor(ethylen-propylen)) verwendet, da dieses ebenfalls keine Eigenfluoreszenz bei Anregung im UVC-Bereich aufweist.

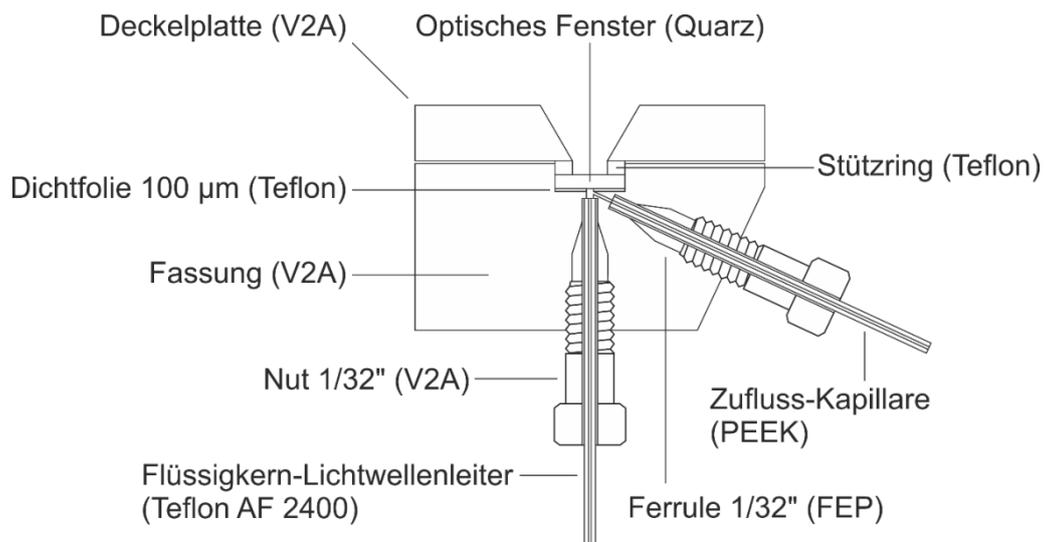


Abbildung 6: Schnittzeichnung der entwickelten optofluidischen Kopplungseinheit.

Die Fertigung von Fassung und Deckelplatte erfolgte in der feinmechanischen Abteilung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die zentrale Durchgangsbohrung, durch welche das UVC-Licht in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter eingekoppelt wird, besitzt einen Durchmesser sowie eine Tiefe von 500 µm. Einen kritischen Fertigungsschritt stellt die passgenaue seitliche Bohrung des Flüssigkeitskanals dar, welche in einem Winkel zur Oberfläche von 25° die zentrale Durchgangsbohrung an der Oberfläche treffen soll. Die seitliche Bohrung besitzt einen Durchmesser von 200 µm sowie eine Länge von 1,5 mm. Ein weiteres Problem stellte die Fräsung der Konen dar, deren Winkelmaß so angepasst werden musste, dass mit den FEP-Ferrules eine Quetschdichtung der Kapillaren erreicht werden konnte. Anfragen nach

passendem Werkzeug bei Herstellern von HPLC-Zubehör blieben erfolglos. Letztlich wurden HSS-Bohrer (HSS: Hochleistungs-Schnellschnittstahl) angeschliffen und somit die Bohrspitzen an das Winkelmaß der FEP-Ferrules angepasst. Die Abbildung 7 zeigt eine Mikro-Computertomographische (μ CT) Bildaufnahme im Querschnitt der Edelstahlfassung. Die Positionsgenauigkeit der Bohrungen sowie das Winkelmaß der Konen für die FEP-Ferrules konnte anhand der Aufnahmen überprüft werden.

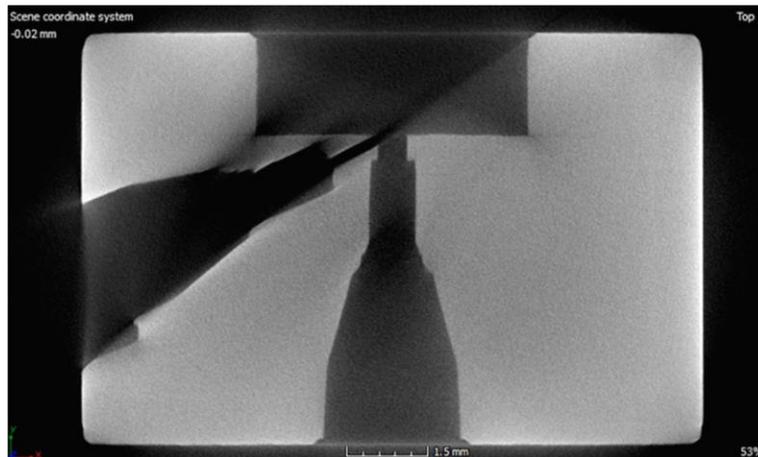


Abbildung 7: Mikro-Computertomographie (μ CT) Aufnahme. Zu sehen ist der Querschnitt der optofluidischen Kopplungseinheit zur Qualitätskontrolle der Bohr- und Fräspositionen.

Aus insgesamt acht hergestellten Fassungen wurden zwei für den experimentellen Aufbau ausgewählt, die keinerlei Beschädigungen und nur geringe Abweichungen von den technischen Vorgaben aufwiesen.

3.1.4 Kantenfilter zur Abtrennung des Anregungslichtes

Vor der spektralen Detektion muss das Anregungslicht von dem Fluoreszenzsignal optisch getrennt werden. Dazu wurde ein Kantenfilter der Fa. Semrock Modell FF01-300/LP-25 BrightLine® zwischen die dritte und vierte Quarzlinse in den Strahlengang platziert. Bei dem Filter handelt es sich um einen Langpassfilter, der die Anregungswellenlänge bei 279,5 nm blockiert und nach Herstellerangabe ab 306 nm eine Transmission von $> 50\%$ erlaubt. Ab 308 nm aufwärts liegt die Transmission bereits über 85%.

Die Abbildung 8 zeigt das Spektrum der mobilen Phase im Flüssigkern-Lichtwellenleiter von Wasser/Acetonitril im Verhältnis 70:30 v/v (schwarzer Kurvenverlauf) und 50:50 v/v (roter Kurvenverlauf). Bei einer Wellenlänge von 279,5 nm liegt das Emissionsmaximum der UVC-LED, welches durch den eingesetzten Kantenfilter vollständig unterdrückt wird. Der Kantenfilter öffnet ab 302 nm und zeigt bei 306 nm eine Transmission von etwa 60%. Bei 309 nm kann ein Maximum beobachtet werden. Die Position im Spektrum stimmt exakt mit der OH-Streckschwingung im Raman-Spektrum des Wassers bei $3425 \text{ rel. cm}^{-1}$, bezogen auf

eine Anregungswellenlänge von 279,5 nm, überein. Zudem wurde beobachtet, dass die Intensität der Bande im Falle eines Lösungsmittelgradienten der mobilen Phase mit abnehmendem wässrigen Anteil ebenfalls abnimmt. Eine weitere Bande kann bei 334,5 nm identifiziert werden. In relativen Wellenzahlen umgerechnet liegt dieser Übergang bei 5908 cm^{-1} . Hierbei könnte es sich um die zweite Ordnung des Raman-Überganges der symmetrischen CH_3 -Steckschwingung von Acetonitril handeln (Erste Ordnung liegt bei 2942 cm^{-1}). Auch hier kann ein Zusammenhang zwischen dem Anteil an Acetonitril und der Intensität der Bande beobachtet werden. Die Intensität der Bande nimmt mit zunehmendem organischen Anteil zu.

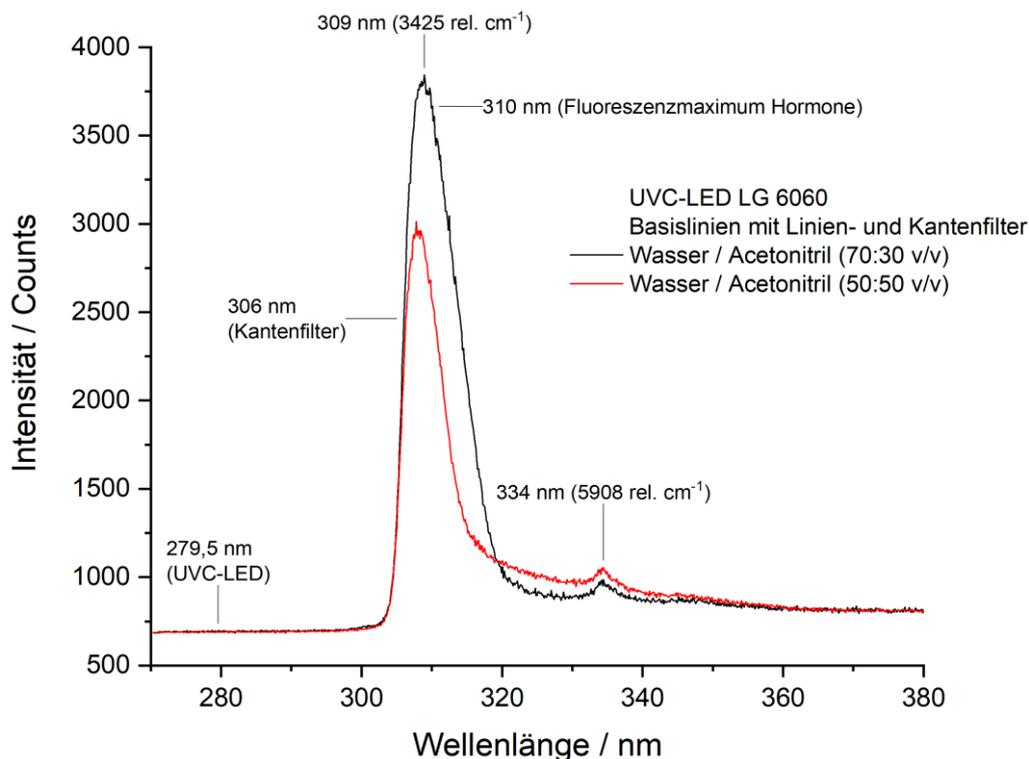


Abbildung 8: Messung der mobilen Phase im Flüssigkern-Lichtwellenleiter bei Wasser/Acetonitril 70:30 v/v (schwarzer Kurvenverlauf) und 50:50 v/v (roter Kurvenverlauf) bei Nutzung der UVC-LED LG Innotek 6060 mit Linien- und Kantenfilter.

Die maximale Fluoreszenzemission der Hormone wird bei 310 nm erwartet und liegt damit sehr ungünstig im Maximum der Raman-Bande des Wassers. Dennoch ist eine Auswertung und Bestimmung der Fluoreszenzintensität durch die Integration der Spektren im relevanten Spektralbereich problemlos möglich (siehe Kapitel 3.3, Abbildung 21).

Hinsichtlich der optischen Justierung der Lichtwege kann die Raman-Bande des Wassers allerdings sehr gut genutzt werden, da sie einen idealen Indikator für die Intensität des im Flüssigkern-Lichtwellenleiter generierten Streulichts darstellt. Wenn die Lichtwege hinsichtlich einer Maximierung der Raman-Bande bei 309 nm optimiert werden, kann davon

ausgegangen werden, dass auch die Fluoreszenzanregung maximiert wird. Zudem kann die Signalintensität der Raman-Bande als Prüfwert zur Gerätekontrolle genutzt und die Einsatzbereitschaft des Detektors im Vorfeld einer Messung kontrolliert werden.

3.1.5 Allgemeiner Aufbau

Im Rahmen der Projektarbeiten wurde der Demonstrator eines hochsensitiven Fluoreszenzdetektors auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters (FK-LWL) aufgebaut. Die finale Version des Demonstrators zeigt die Abbildung 9.

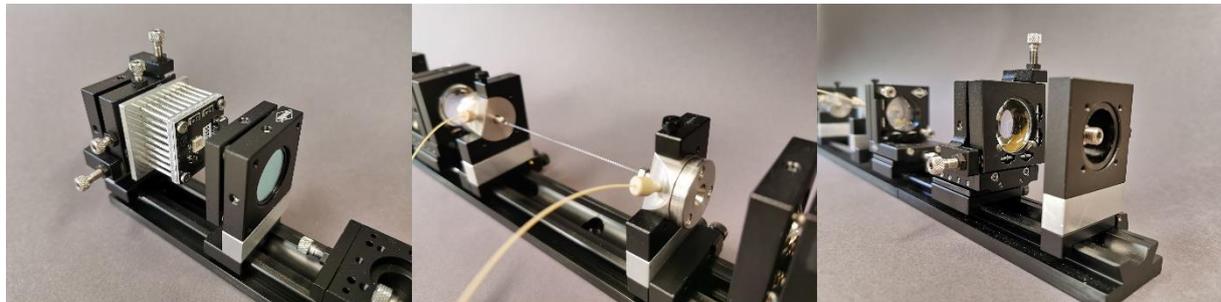
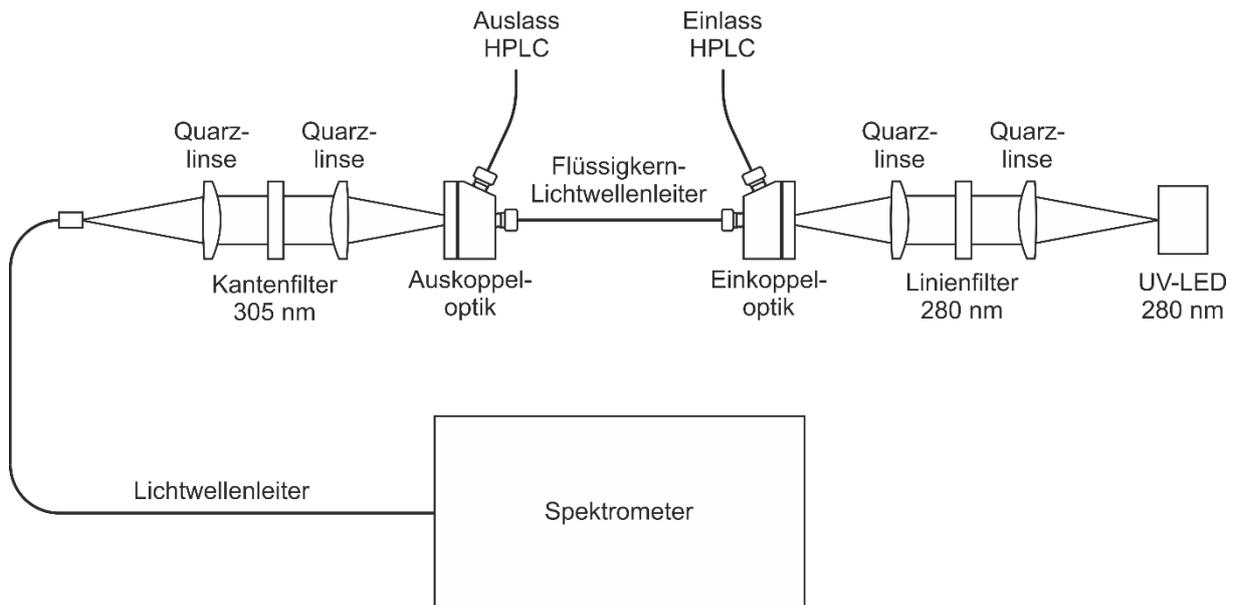


Abbildung 9: Oben: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzdetektors mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, Unten: UVC-LED und Linienfilter (links), Flüssigkern-Lichtwellenleiter und optofluidische Kopplungseinheit (mitte), Quarzlinse und Faseradapter zur Abnahme der Fluoreszenzemission (rechts).

Zur Strahlführung wurden Komponenten der Firma OWIS verwendet, die auf einer Führungsschiene mittels Schwalbenschwanzsystem zueinander ausgerichtet werden können. Zur optischen Anregung der Hormone wurde als Lichtquelle eine UV-LED mit einer zentralen Emissionswellenlänge von 280 nm verwendet. Um die Leistungsstabilität der LED konstant zu halten, wurde ein Aluminiumkühlkörper adaptiert, der eine ausreichende Passivkühlung bei Raumtemperatur gewährleistet. Das divergent vom Leuchtkörper der LED

abstrahlende UV-Licht wurde zunächst mittels Linse gesammelt und parallelisiert. In dem Aufbau wurden plankonvexe Linsen aus Quarzglas der Firma Thorlabs mit einem Durchmesser von 25,4 mm und einer Brennweite von 35 mm verwendet. Die Linsen besitzen eine Oberflächenvergütung mit beidseitiger Antireflexbeschichtung, welche für einen Spektralbereich zwischen 245 und 400 nm optimiert ist.

Das parallelisierte UV-Licht wurde zunächst durch einen Linienfilter der Firma Semrock geleitet, der die spektrale Halbwertsbreite der LED auf 10 nm reduziert. Anschließend wurde das Licht mit einer zweiten Quarzlinse in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter fokussiert. Dazu wurde eine spezielle optofluidische Kopplungseinheit entwickelt, mit der sowohl die mobile Phase der HPLC als auch das UV-Licht im Flüssigkern-Lichtwellenleiter zusammengeführt werden kann. Bei dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter handelt es sich um eine Kapillare aus Teflon AF 2400 der Firma Biogeneral, welche mit einem Innendurchmesser von 200 μm und einer Länge von 120 mm ein Volumen von $< 4\mu\text{L}$ aufweist. Innerhalb des Flüssigkern-Lichtwellenleiters werden die chromatografisch getrennten Substanzen zur Fluoreszenz angeregt. Sowohl das Anregungslicht als auch die zu höherer Wellenlänge hin verschobene Fluoreszenzemission werden unter Ausnutzung der Totalreflexion durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter geleitet und verlassen diesen nach dem Prinzip einer optischen Faser divergent. Das austretende Licht wurde über eine dritte Quarzlinse abgenommen und parallelisiert durch einen Kantenfilter der Firma Semrock geleitet. Dieser lässt das frequenzverschobene Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen ab 306 nm aufwärts passieren, während niedrigere Wellenlängen blockiert werden. Auf diese Weise kann das Anregungslicht der LED von dem Fluoreszenzsignal separiert werden. Das Fluoreszenzlicht, welches im Falle der Hormone ein Maximum bei 306 nm aufweist, wurde mittels einer vierten Quarzlinse in einen „Rund-zu-linear“ Mehrkern-Lichtwellenleiter der Firma Thorlabs fokussiert (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: „Rund-zu-linear“ Mehrkern-Lichtwellenleiter der Firma Thorlabs Inc., https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=7719, Stand der letzten Abrufung: 12.06.2020.

Dabei handelt es sich um ein Faserbündel aus insgesamt sieben Fasern, von denen auf der einen Seite sechs Fasern konzentrisch um eine Zentralfaser angeordnet sind. Jede Faser besitzt dabei einen Kerndurchmesser von 105 μm , die Stirnfläche aller sieben Fasern misst

einen nutzbaren Durchmesser von 355 μm . Auf der anderen Seite des Faserbündels sind die sieben Fasern hingegen linear angeordnet. Auf diese Weise lässt sich aufgrund des erhöhten Faserdurchmessers auf der runden Seite deutlich mehr Licht einkoppeln, während die lineare Anordnung der Fasern den Eingangsspalt des Monochromators ersetzt. Die Lichtausbeute kann dadurch um etwa den Faktor 5 erhöht werden.

Zur Detektion wird ein Kymera 328i Spektrograph der Firma Andor verwendet, welcher mit einer Andor CCD-Kamera iDus 420 bestückt ist. Die Kamera ist mit einer für den tiefen UV-Bereich optimierten rückseitigen Belichtung des CCD-Sensors ausgestattet. Dies führt zu einer relativ hohen Quanteneffizienz von etwa 60% bei 300 nm.

3.2 Optimierung des chromatografischen Verfahrens und Entwicklung eines selektiven Anreicherungs- und Aufkonzentrierungsverfahrens

3.2.1 Einleitung

Für die Entwicklung eines selektiven Anreicherungs- und Aufreinigungsverfahrens zur ultrasensitiven Bestimmung der drei Hormone Estron (E1), 17 β -Estradiol (E2) und 17 α -Ethinylestradiol (EE2) in Wasser wurden zwei Referenzmethoden zur Bewertung der Aufbereitungsschritte etabliert, da zu Beginn des Projektes noch kein Fluoreszenzdetektor zur Verfügung stand. Die Referenzmethoden beruhen auf verschiedenen Offline- und Online-Probenvorbereitungsmethoden sowie der Tandemmassenspektrometrie in Kombination mit der Flüssigkeits- und Gaschromatografie (LC- und GC-MS/MS).

Um ein möglichst sensitives LC-MS/MS-Referenzverfahren zu etablieren, wurden zunächst Optimierungen an den Elektrospray (ESI) Quellparametern vorgenommen sowie verschiedene Lösemitteladditive zur Steigerung der Ionisationseffizienz untersucht. Durch Einsatz eines Triplequadrupol-Massenspektrometers konnten hoch selektive Massenübergänge der Zielkomponenten ausgewählt werden. Um die notwendige Sensitivität im Pikogramm pro Liter Bereich zu erreichen, wurden geeignete Festphasenmaterialien ausgewählt und systematisch auf die Anreicherung als auch Abtrennung von Matrixkomponenten untersucht.

Aufgrund des technischen Risikos, die erforderlichen NWG nicht erreichen zu können, wurde auch ein Analyseverfahren mittels GC-MS/MS nach Derivatisierung der Hormone etabliert. Durch den Übergang in die Gasphase ist eine weitere Abtrennung von störenden Matrixkomponenten wie z. B. Huminsäuren o. ä. möglich. Hierbei wurde für alle Messungen eine chromatografische Säule vom Typ Rxi-5Sil-MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m df, Restek GmbH, Deutschland) inklusive einer 10 m Vorsäule verwendet.

Nach der Etablierung der beiden Referenzverfahren wurde eine selektive Probenvorbereitung entwickelt. Diese basiert auf einer Offline-Anreicherung von 1 L Probe mittels Festphasenextraktion. Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bereits bekannt, dass eine Anreicherung der Zielanalyten über eine C-18-Kartusche als sehr gut geeignet angesehen werden kann. Um eine Probe nach EU-Wasserrahmenrichtlinie aufzuarbeiten, darf diese jedoch nicht filtriert werden, damit an Partikeln adsorbierte Analyten miterfasst werden. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit, dass es besonders bei großen Probenvolumina schnell zum Verstopfen der sonst häufig eingesetzten 3 und 6 mL Kartuschen kommen kann und die weitere Aufarbeitung der Probe nicht möglich ist. Vor diesem Hintergrund wurden neben verschiedenen selektiven Festphasen auch unterschiedliche Kartuschenformate untersucht. Da bei unfiltrierten Oberflächengewässerproben mit einem hohen Matrixanteil zu

rechnen ist, wurde in einem letzten Schritt ein geeignetes Clean-Up Verfahren zur Abtrennung von Matrixkomponenten entwickelt. Hierbei wurden sowohl hoch selektive *Molecular Imprinted Polymer* (MIP) Kartuschen zur Adsorption der Analyten als auch reines Silika (Normalphasenchromatographie zum Rückhalt der Matrixbestandteile) ausgewählt.

3.2.2 Entwicklung des Online-SPE-RP-LC-MS/MS-Referenzverfahrens

Als Massenspektrometer wurde eine QTRAP 6500+ (AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Ionisierung erfolgte im negativen Elektrospray-Ionisations (ESI) Modus. Die Optimierung der Quellenparameter zur Maximierung der Intensität der Zielanalyten ergab folgende Einstellungen: Quelltemperatur 650 °C, Curtain Gas 25 psi, Collision Gas „high“, Ionenquellen Gase GS1 42 psi und GS2 44 psi. Die weiteren Quellenparameter sowie die selektiven MRM-Übergänge sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: MRM-Übergänge für die Hormone und deren interne Standards.

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

Um Matrixstörungen kompensieren zu können, wurden immer alle vier MRM-Übergänge gemessen und deren Intensitätsverhältnisse zur Identifizierung von Matrixstörungen

berechnet. Die Quantifizierung erfolgte mit den mit ** gekennzeichneten MRM-Übergängen, wobei der mit * gekennzeichnete MRM-Übergang zur Kontrolle der Ergebnisse verwendet wurde. Zur Trennung der Analyten wurde ein Lösungsmittelgradient über 21 Minuten angewendet und sowohl Wasser / Methanol als auch Wasser / Acetonitril als mobile Phase getestet. Bei der Verwendung von Acetonitril konnte im Vergleich zum Methanol eine um ca. 25% höhere Signalintensität beobachtet werden. Vor diesem Hintergrund wurde für alle weiteren Experimente Acetonitril eingesetzt. Der finale Gradient startet bei 10% Acetonitril und steigt über 15 min auf 50%. Im Anschluss wird die Trennsäule für 3 min bei 99% Acetonitril gespült und bei 10% Acetonitril für weitere 3 min equilibriert. Der Fluss wurde auf 0,4 mL min⁻¹ eingestellt. Als Trennsäulen wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Phasen untersucht.

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Trennsäulen inklusive spezifischer Kenndaten.

Bezeichnung	Länge / mm	ID / mm	Partikelgröße / µm	Typ
Zorbax SB-C-18	150	4,6	5,0	Vollporös
Zorbax Eclipse XDB-C18	100	4,6	3,5	Vollporös
Chromolith FastGradient	50	2,0	-	Monolith
Sunshell RP-Aqua (C28)	50	2,1	2,6	Core-Shell
Raptor Biphenyl	50	2,1	2,7	Core-Shell
Raptor Biphenyl	100	2,1	2,7	Core-Shell

Die Trennleistung der verschiedenen Säulen wurde durch eine reale Gewässerprobe als auch eine Kläranlagenablaufprobe überprüft. Dazu wurde jeweils ein Liter der Probe über eine C-18 Speedisk-Kartusche (Bakerbond Speedisk C-18, Avantor, Deutschland) angereichert und mit 5 x 5 mL Methanol eluiert. Zusätzlich wurden 10 ng der Zielanalyten E1, E2 und EE2 zu den Proben dotiert.

Um eine robuste und routinetaugliche Methode zu entwickeln, sind eine chromatografische Trennung der Analyten mit einer Mindestauflösung von R = 1,5 sowie eine Abtrennung der Matrix ausschlaggebend. Da durch Einsatz der Online-SPE ein Drucklimit von 300 bar gegeben ist, sollte die Säule einen möglichst geringen Rückdruck haben, um eine Flussrate von 0,4 mL min⁻¹ einstellen zu können. Die hier definierten Kriterien dienen als Maßstab für den Vergleich der verschiedenen Säulen. Als am besten geeignet zeigte sich die Raptor Biphenyl-Säule mit einer Länge von 50 mm (Abbildung 11). Wurde eine identische Säule mit

einer Länge von 100 mm verwendet, resultierte ein zu hoher Gegendruck, sodass eine Kopplung mit der Online-SPE nicht möglich war. Die schlechteste Trennleistung zeigte die Chromolith FastGradient-Säule. Bei Verwendung dieser Säule konnte, wie in Abbildung 11 gezeigt, die Matrix nicht ausreichend von den Zielanalyten abgetrennt werden.

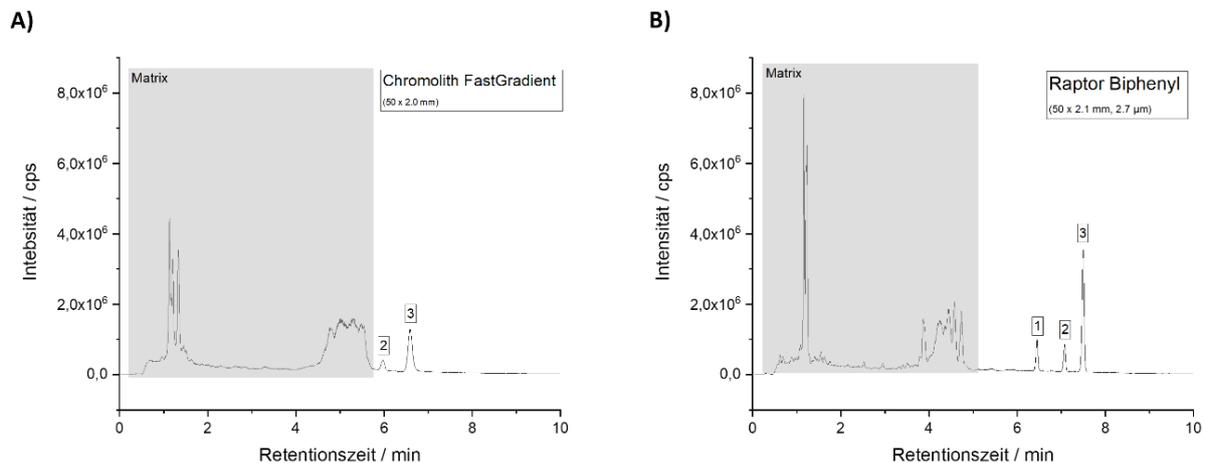


Abbildung 11: Totalionenstrom-Chromatogramm einer 1000-fach angereicherten und mit 10 ng der Zielanalyten dotierten Oberflächenwasserprobe (Rhein bei Duisburg). HPLC Trennung mittels a) einer Chromolith Fast Gradient-Säule (50 x 2,0 mm, Merck KGaA) sowie b) Raptor Biphenyl-Säule (50 x 2,1 mm, 2,7 µm, Restek GmbH). Analyten: 1) E2, 2) EE2, 3) E1. Injektionsvolumen: 50 µL. Die grau schraffierte Fläche kennzeichnet den Bereich, in dem vorwiegend Matrixverbindungen eluieren. Die Verbindung E1 ist unter Verwendung der monolithischen Säule nicht detektierbar.

Vor diesem Hintergrund wurde für die weitere Optimierung die Raptor Biphenyl-Säule mit einer Länge von 50 mm gewählt. Um die Empfindlichkeit der Referenzmethode zu steigern, wurde zusätzlich eine Online-Festphasenanreicherung (Online-SPE, Chronect µSPE, Axel Semrau GmbH & Co. KG, Sprockhövel, Deutschland) mit einem Injektionsvolumen von 1,0 mL eingesetzt. In einem ersten Screening wurden verschiedene Festphasenmaterialien wie z. B. Resin-SH, Resin-GP, C-18, Cyano (CN) und C-8 untersucht. Ähnlich zu den Auswahlkriterien der chromatografischen Trennsäulen wurden die Zielkriterien für die Auswahl der Kartuschen auf die Adsorptionsaffinität der Analyten, sowie in Verbindung mit der analytischen Trennsäule (Raptor Biphenyl) auf die Auflösung und Matrixabtrennung festgelegt. Die Materialien Resin-SH, Resin-GP sowie C-18 führten sowohl zu einer geringen Wiederfindung als auch einer schlechteren Trennung der Zielanalyten. Das CN-Material (10 x 1 mm, 7 µm) zeigte bei einer Wiederfindung von 90% eine weiterhin gute Trennung der Analyten sowie eine gute Matrixabtrennung in Verbindung mit der Raptor Biphenyl-Säule. Um weitere störende Matrixkomponenten abtrennen zu können, wurde ein Waschschrift mit 5%-iger Acetonitrillösung etabliert. Je nach Probenmatrix (Oberflächenwasser oder Kläranlagenablauf) werden dabei 0,5 bzw. 1,0 mL Waschlösung verwendet.

3.2.3 Entwicklung des GC-MS/MS-Referenzverfahrens

Parallel zur Online-SPE-RP-LC-MS/MS-Methode wurde ein Referenzverfahren mittels Gaschromatografie gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (TQ8040, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) entwickelt. Es sollte untersucht werden, ob die Probenvorbereitung vereinfacht und die Sensitivität der Zielanalyten verbessert werden kann. Hierzu wurde die Probe nach der Offline-SPE in einer Mischung aus Pyridin und N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) zur Derivatisierung aufgenommen. Da BSTFA die Trennsäule irreversibel schädigen kann, wurde ein optimales Verhältnis zwischen Pyridin und BSTFA ermittelt. Die Derivatisierung wurde für 30 min bei 70 °C durchgeführt, wobei 50 µL Pyridin und 50 µL BSTFA verwendet wurden. Die optimalen Parameter für die Injektion lagen bei einer Temperatur von 270 °C (konstant), einem Splitless-Liner mit Glasfritte und einem Injektionsvolumen von maximal 3 µL. Ein höheres Injektionsvolumen führte zur Verschlechterung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses durch die in der Probe vorhandenen Matrixkomponenten. Das Temperaturprogramm wurde so gewählt, dass eine ausreichende Trennung der Analyten sowie eine Abtrennung der Matrix gewährleistet ist (Start bei 150 °C mit einer Rate von 25 °C min⁻¹ bis 200 °C, weiter steigend mit einer Rate von 10 °C min⁻¹ bis 300 °C, halten für 3 min). Die Detektorspannung wurde konstant auf 2,5 kV eingestellt und das MS hoch empfindlich getuned (Modus: „highSense“). Die Ionenquelle wurde auf 250 °C und das Interface auf 315 °C geheizt. Die Analyten wurden analog zur LC-MS/MS Methode im MRM-Modus gemessen (Tabelle 4).

Tabelle 4: MRM-Übergänge für die Hormone und deren Standards nach Derivatisierung durch BSTFA.

Analyt	Q1 <i>m/z</i>	Q3 <i>m/z</i>	Collision Energy / eV
E1_1	342,2	257,2	18,0
E1_2	342,2	218,2	18,0
E1_3	342,2	244,2	18,0
E1_d4_1	346,2	261,2	15,0
E1_d4_2	346,2	205,2	30,0
E1_d4_3	346,2	246,1	18,0
E2_1	416,3	285,2	18,0
E2_2	416,3	129,1	21,0
E2_3	285,2	205,1	18,0
E2_d3_1	419,3	285,2	15,0
E2_d3_1	419,3	131,2	21,0
E2_d3_1	419,3	232,2	24,0
EE2_1	425,2	193,1	21,0

EE2_2	425,2	167,1	27,0
EE2_3	425,2	231,1	18,0
EE2_d4_1	429,3	233,2	27,0
EE2_d4_2	429,3	169,1	18,0
EE2_d4_3	429,3	195,2	15,0

3.2.4 Entwicklung eines selektiven Anreicherungsverfahrens

Um eine für die Fluoreszenzdetektion ausreichende NWG zu realisieren wurde ein möglichst selektives Anreicherungsverfahren basierend auf einer Festphasenextraktion entwickelt und durch die Referenzverfahren bewertet. Hierfür wurden verschiedene Festphasenkartuschen ausgewählt. Zunächst wurden eine HLB- (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) sowie eine Strata XL- (Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland) Kartusche mit einem Volumen von 6 mL und einer Sorbensmasse von je 150 mg verwendet. Darüber hinaus wurden C-18 Kartuschen im Diskformat (J.T. Baker® BAKERBOND Speedisk®, Avantor Performance Materials B.V., Arnheim, Niederlande) vergleichend untersucht. Zunächst wurden die Adsorptionseigenschaften gegenüber den Zielanalyten an den verschiedenen Materialien ermittelt und die Wiederfindung bestimmt. Bei nicht durch Matrixkomponenten belastetem hochreinen Wasser, das mit den Zielanalyten dotiert wurde, ist kein signifikanter Unterschied bei der Wiederfindung über alle verwendeten Kartuschen festzustellen. Die Wiederfindungen lagen alle in einem Bereich zwischen 90% und 95%. Hiernach fiel die erste Wahl auf die HLB-Kartusche, die aufgrund der geringeren Kosten, einer geringeren Lösemittelmenge und einer einfacheren Handhabung, den anderen Festphasen überlegen ist.

Bei Messungen von Realproben zeigte sich ein deutlicher Unterschied der verschiedenen Kartuschenformate. Ein erheblicher Nachteil der HLB und Strata XL Kartuschen ist, dass diese bei höherer Partikelbelastung verstopfen. Da sowohl bei Oberflächengewässern als auch Abwässern Schwebstoffe nicht auszuschließen sind und die eher hydrophoben Hormone an Partikeln adsorbieren, würde eine vorgeschaltete Filtration zu Minderbefunden führen. Vor diesem Hintergrund ist eine Analyse nach EU-Wasserrahmenrichtlinie ohne eine vorherige Filtration durchzuführen. Durch das Diskformat der C-18 Speedisk ist ein Verstopfen der Kartusche bei Oberflächenwasser als auch bei Kläranlagenabläufen nicht zu beobachten. Zudem beträgt die Zeit, die für die Anreicherung von 1 L Probe benötigt wird, nur ca. 10 min. Im Vergleich dazu dauert die Anreicherung bei Verwendung der HLB- und Strata XL-Kartuschen im herkömmlichen Format ca. 40 bis 60 min.

Die erzielten Wiederfindungen der Speedisk Kartusche lagen ebenfalls bei 90-95% und sind damit vergleichbar zu HLB und Strata XL. Vor diesem Hintergrund wurde für die Offline-

Festphasenextraktion im weiteren Projektverlauf die Speedisk C-18 gewählt. Trotz der optimierten Offline-SPE-Methode sowie einer hoch selektiven Online-SPE-RP-LC-MS/MS- oder auch GC-MS/MS-Methode, zeigten sich weiterhin Matrixstörungen auf den einzelnen Massenübergängen, welche eine Detektion je nach Probenmatrix im pg L^{-1} -Bereich für das EE2 unmöglich machten. Um auch EE2 nach den Anforderungen der EU-Wasserrahmenrichtlinie mit einer NWG von 35 pg L^{-1} bestimmen zu können, wurden verschiedene Clean-Up Verfahren zur Matrixabtrennung untersucht.

3.2.5 Clean-Up Verfahren I – Molecular Imprinted Polymers (MIP)

Die Anreicherung von jeweils 1 L Gesamtwasserproben erfolgte wie zuvor beschrieben über die C-18-Speedisk. Die anschließende Aufreinigung erfolgte über kommerziell erhältliche MIP-Östrogen-Kartuschen (AFFINISEP, Petit-Couronne, Frankreich). Nach Konditionierung und Equilibrierung der Kartuschen mit Acetonitril und Wasser erfolgte die Aufgabe von 3,0 mL des angereicherten Extraktes. Im Anschluss wurden zunächst Matrixbestandteile durch Waschen mit 3 mL Wasser und 3 mL Wasser/Acetonitril (60:40) eluiert und verworfen. Nach dem Trocknen der Kartuschen durch den Luftstrom wurden die Analyten mit 3 mL Methanol eluiert. Zur Analyse mittel LC-MS musste im Anschluss ein Lösemittelwechsel von Methanol zu Wasser durch evaporieren bei $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock unter einem Stickstoffstrom durchgeführt sowie die wässrige Probe über einen PET Spritzenvorsatzfilter ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert werden.

Für die Berechnung der Wiederfindung sowie der Bestimmung von Blindwerten wurden Standards mit einer Konzentration von je 5 ng mL^{-1} der Zielanalyten E1, E2 und EE2 sowie LC-MS Wasser als Blindwertprobe verwendet. Die Wiederfindung bei Nutzung der MIP-Kartuschen liegt bei 60%. Unter Nutzung eines internen deuterierten Standards kann durch rechnerische Korrektur eine Wiederfindung von $> 95\%$ erreicht werden.

Aufgrund des Herstellungsverfahrens von MIP-Kartuschen können geringe Blindwerte auftreten, welche eventuell in dem hier zu erreichenden Konzentrationsbereich zu erheblichen Störungen führen können. Vor diesem Hintergrund wurde besonderes Augenmerk auf die Blindwertproben gelegt. 17β -Estradiol und 17α -Ethinylestradiol konnten in den Blindwertproben nicht nachgewiesen werden. Lediglich für Estron wird ein Analytsignal mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R) von 2 registriert, was jedoch unterhalb einer NWG von einem $\text{S/R} = 3$ liegt. Die Ergebnisse der Messung von Kläranlagenabläufen sind in der nachfolgenden Grafik gezeigt (Abbildung 12).

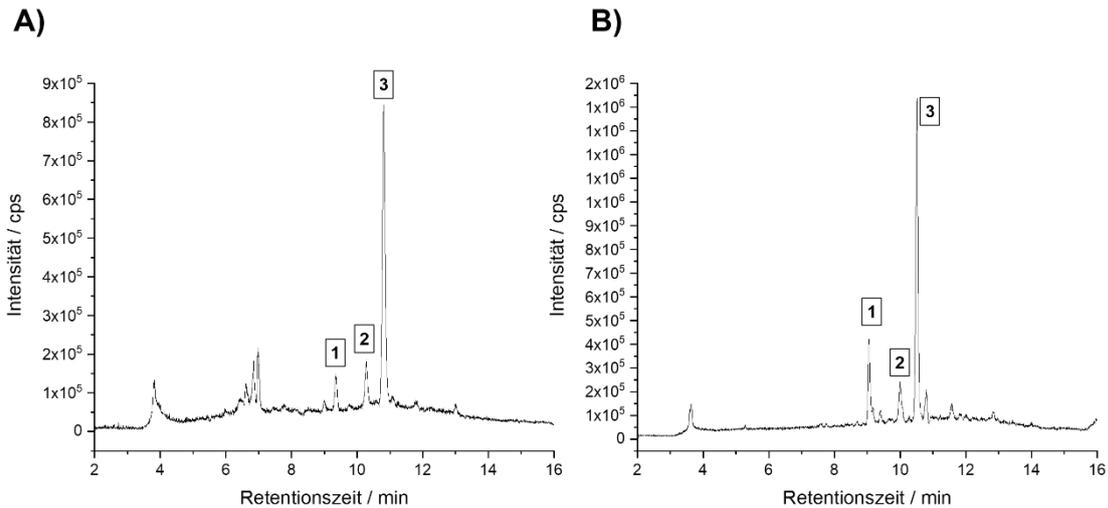


Abbildung 12: Totalionenstrom-Chromatogramme einer Kläranlagenablaufprobe dotiert mit 1 ng L^{-1} der Zielanalyten E1, E2, EE2. A) Ohne MIP Clean-Up, B) mit MIP Clean-Up. Gemessen mittels Online-SPE-HPLC-MS/MS.

Durch den MIP-Aufreinigungsschritt konnten die im Chromatogramm A auftretenden Matrixinterferenzen bei der Messung von Kläranlagenabläufen sowie Oberflächenwasser signifikant reduziert werden.

3.2.6 Clean-Up Verfahren II – Matrixabtrennung durch Silika

Neben den hoch selektiven und entsprechend kostenintensiveren MIP-Kartuschen wurden Silika-Kartuschen zur weiteren Matrixabtrennung untersucht. Hierzu wurden Kartuschen mit einem Volumen von 6 mL und einer Silikamenge von 500 mg eingesetzt. Nach Konditionierung und Equilibrierung der Kartuschen mit Ethylacetat sowie n-Hexan:Ethylacetat (90:10 v/v) erfolgte die Aufgabe des angereicherten Extrakts von 2,0 mL in n-Hexan:Ethylacetat (90:10 v/v). Nach dem Trocknen durch den Luftstrom wurden die Analyten mit 8,0 mL n-Hexan:Ethylacetat (60:40 v/v) eluiert und erneut eingedampft sowie zur Analyse in LC-MS Wasser aufgenommen und über einen PET-Spritzenaufsatzfilter ($0,45 \mu\text{m}$) filtriert. Rein optisch ist hier bereits ein deutlicher Unterschied zur nicht weiterbehandelten Probe erkennbar (Abbildung 13).

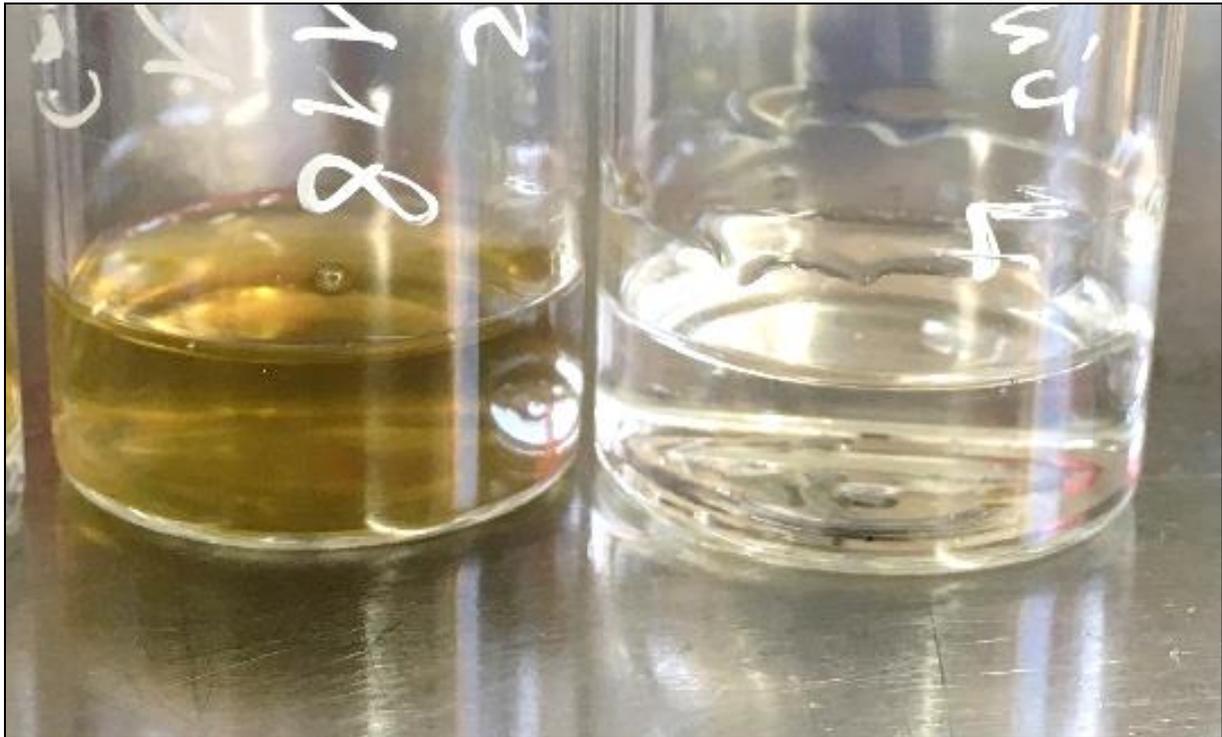


Abbildung 13: Links: Methanolisches Extrakt einer Oberflächenwasserprobe nach Elution der C-18 Speedisk. Rechts: Gleiches Extrakt in n-Hexan-Ethylacetat (60:40 v/v) nach Silika Clean-Up.

Auch in der Messung mittels Online-SPE-HPLC-MS/MS wird im Totalionenstrom-Chromatogramm der Zielanalyten die Abtrennung der Matrix deutlich (Abbildung 14).

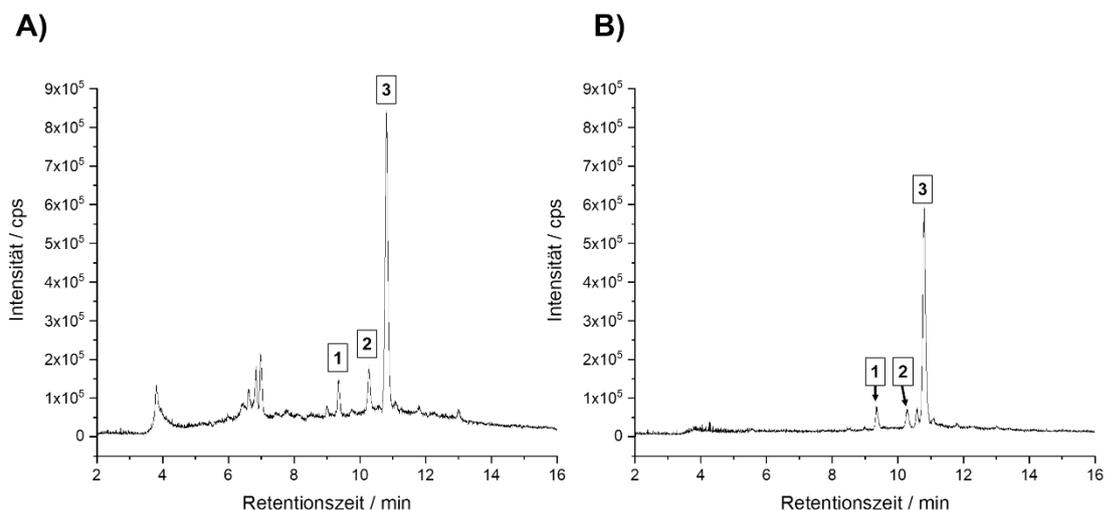


Abbildung 14: Totalionenstrom-Chromatogramm der Zielanalyten (1) E2, (2) EE2, (3) E1 nach Probenvorbereitung mittels Online-SPE-HPLC-MS/MS Messung. A) Chromatogramm ohne Clean-Up. B) Chromatogramm mit Clean-Up. Im Chromatogramm B sind deutlich weniger Störsignale (Matrix) sowie ein geringeres Rauschen im Bereich der Zielanalyten zu erkennen.

Um die einzelnen Massenübergänge der Analyten noch besser auf eine potentiell verbliebene Störung zu untersuchen, wurden die entsprechenden MRM-Übergänge der

Zielanalyten umfassend untersucht. Hierbei konnte besonders für das EE2 ein nahezu störungsfreier Übergang von m/z 295,1 \rightarrow 269,1 beobachtet werden (Abbildung 15).

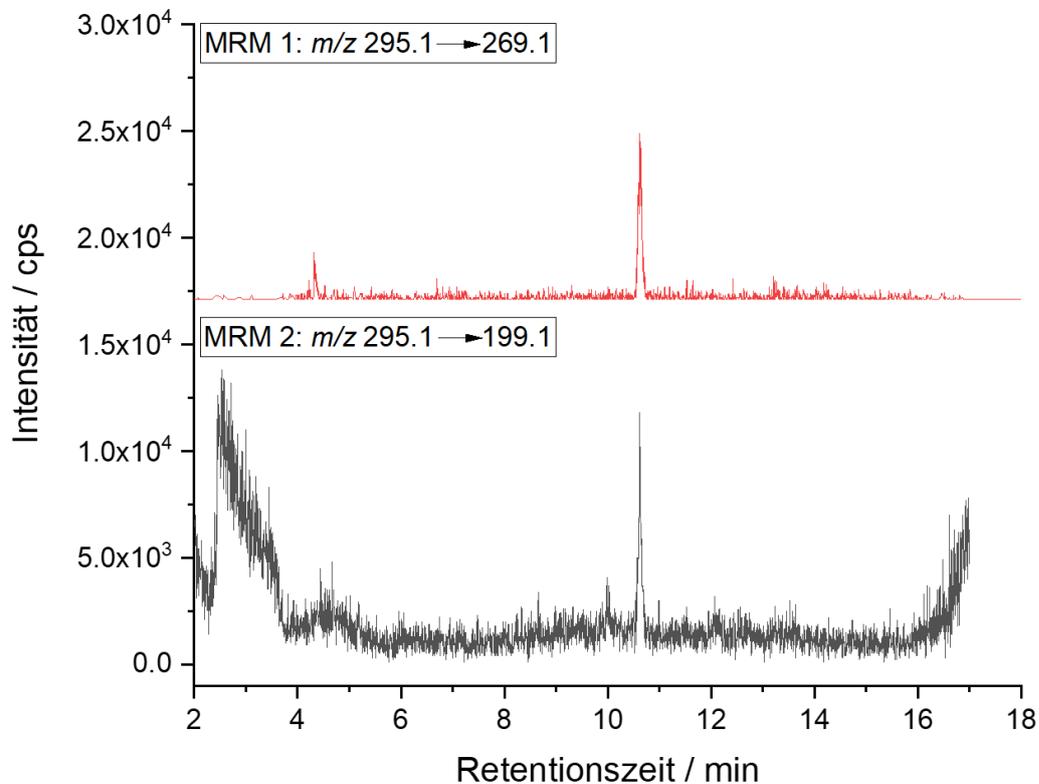


Abbildung 15: MRM-Massenübergang m/z 295,1 \rightarrow 269,1 und m/z 295,1 \rightarrow 199,1 von EE2 in einer mit 30 pg L^{-1} dotierten Oberflächenwasserprobe.

Auch für die Analyten E1 und E2 konnte besonders in der GC-MS/MS Methode durch das Clean-Up mittels Silika eine deutliche Verbesserung des S/R-Verhältnisses erzielt werden. Nachfolgend ist der Vergleich einer dotierten Oberflächenwasserprobe mit und ohne Silika Clean-Up am Beispiel der GC-MS/MS Messung gezeigt (Abbildung 16).

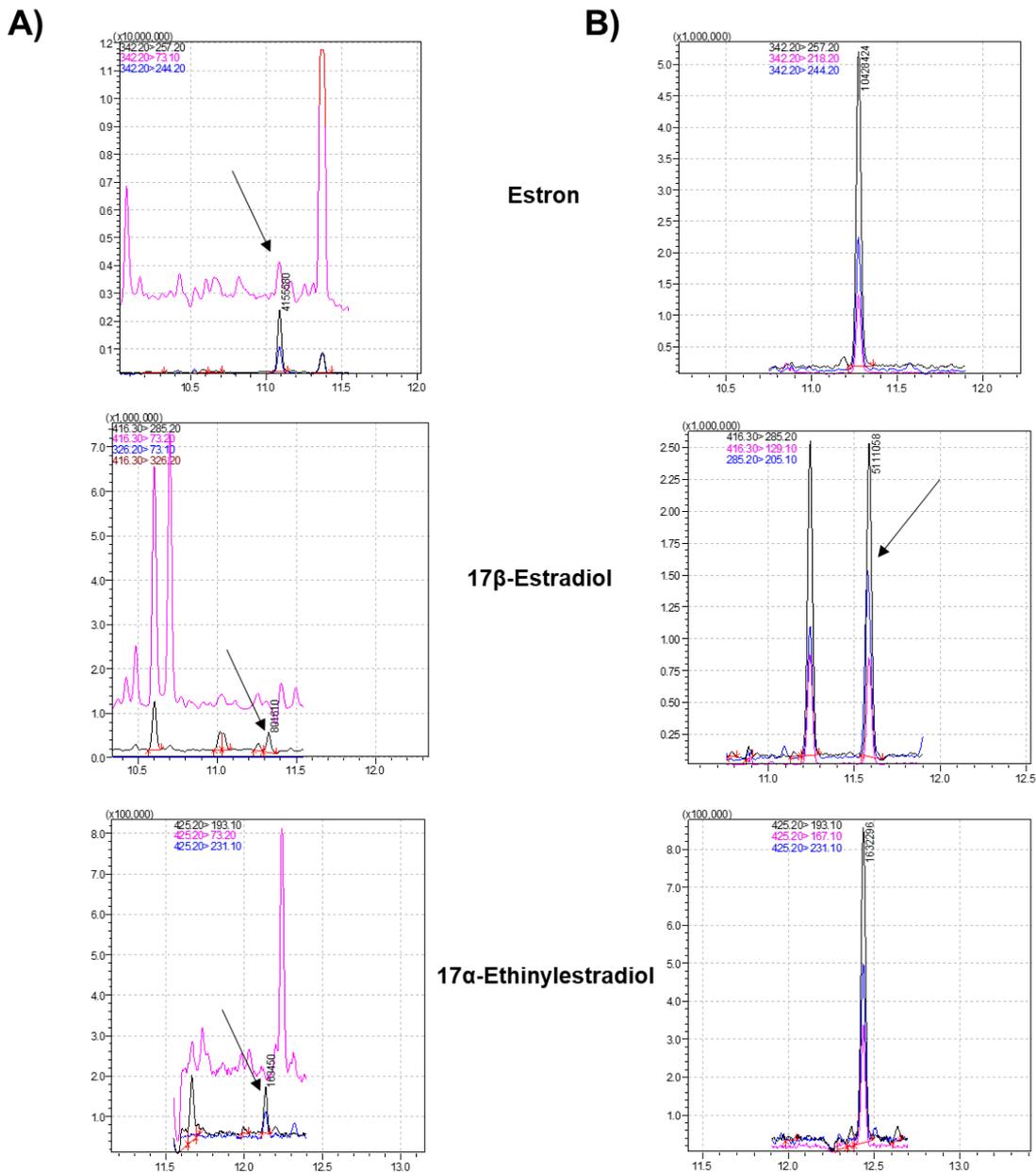


Abbildung 16: Extrahierte MRM-Chromatogramme der Zielanalyten einer mit 1 ng L^{-1} dotierten Oberflächenwasserprobe. Gegenübergestellt sind die jeweiligen Massenübergänge einmal (A) ohne Clean-Up durch Silika sowie (B) mit Silika-Clean-Up. Durch ein zusätzliches Clean-Up mit Silika lässt sich ein deutlich besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielen.

Aufgrund der besseren Wiederfindung von 80-100% wurde anstelle der MIP-Kartuschen ausschließlich Silika für die weiteren Versuche genutzt.

Um ein zeitintensives sowie fehleranfälliges und häufiges Evaporieren von Lösemittel zu vermeiden, wurde ein Workflow entwickelt, in dem die Elution der C-18 Speedisk sowie das Clean-Up in einem Schritt durchgeführt werden kann. Dazu wurden spezielle Kartuschenverbinder aus PTFE genutzt, um beide Kartuschen zu koppeln. Die Probe mit einem Volumen von 1 L wurde weiterhin zunächst über die C-18 Speedisk angereichert. Im

Anschluss wurde die Silika-Kartusche mithilfe der Adapter unter der C-18 Speedisk angeschlossen und mit verschiedenen Lösemitteln eluiert. Dabei wurden Methanol, Hexan, Ethylacetat, MTBE, Dichlormethan sowie das nach Herstellerangaben bei Silika zu verwendende n-Hexan:Ethylacetat (60:40 v/v) Gemisch geprüft. Hierbei zeigte sich die höchste Wiederfindung von > 70% für alle Zielanalyten bei Verwendung von n-Hexan:Ethylacetat (60:40 v/v). Alle anderen Lösemittel führten zu einer Wiederfindung von < 60%.

3.2.7 Zusammenfassung des entwickelten Referenzverfahrens

Die finale Anreicherungs-methode inklusive der beiden Referenzverfahren ist zusammenfassend in Abbildung 17 dargestellt.

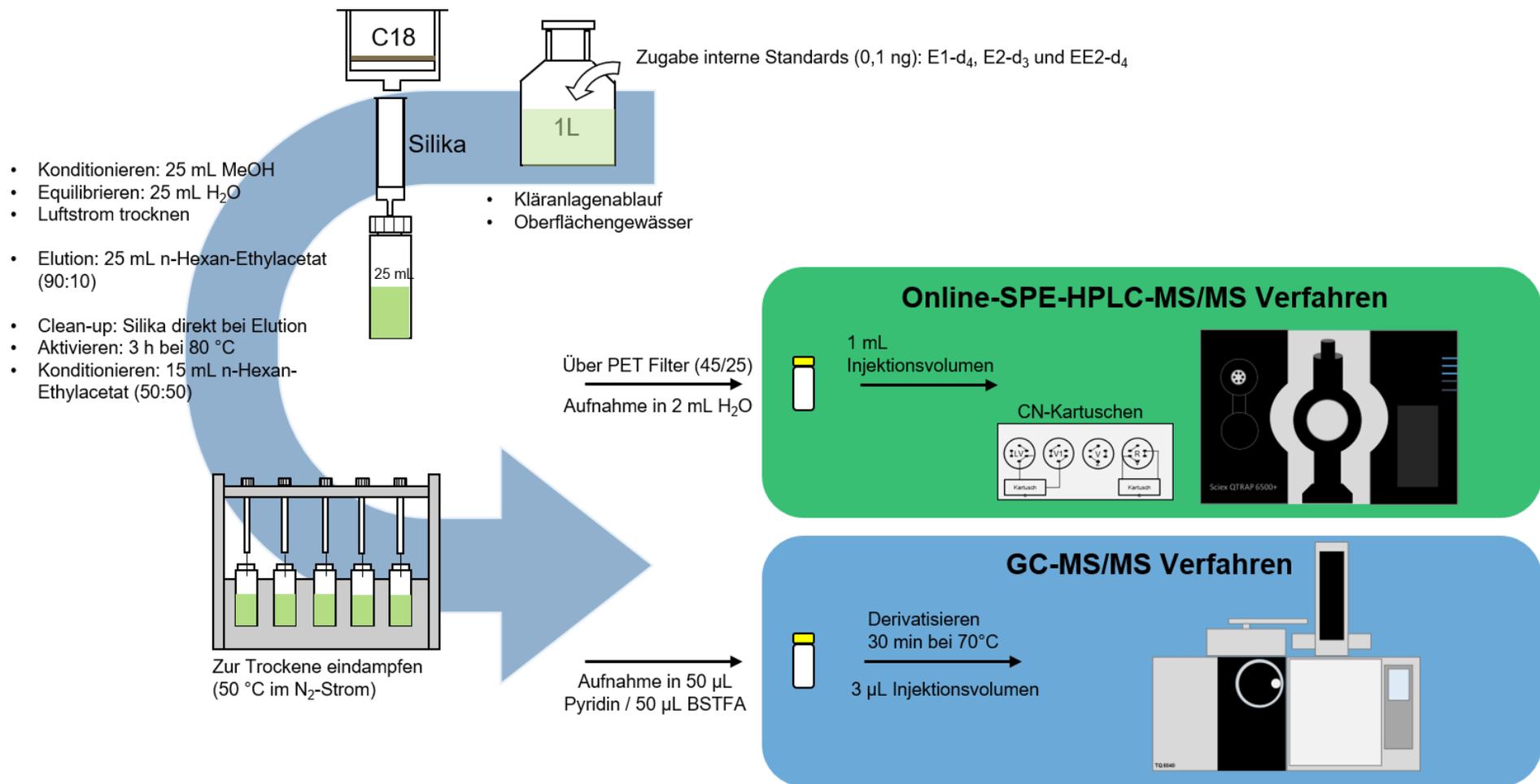


Abbildung 17: Zusammenfassung des Anreicherungsverfahrens sowie der Referenzmethoden Online-SPE-HPLC-MS/MS und Online-SPE-GC-MS/MS.

Mit der finalen Anreicherungs­methode als auch der beiden Referenzanalyseverfahren wurden abschließend Realproben gemessen und ermittelt, ob die erforderlichen NWG von 35 pg L⁻¹ für das EE2 sowie 400 pg L⁻¹ für E2 und E1 erreicht werden konnten. Für die Online-SPE-HPLC-MS/MS-Methode liegt der resultierende Arbeitsbereich unter Berücksichtigung der Anreicherungs­faktoren (Faktor 500 für die Offline-SPE x Faktor 20 für die Online-SPE = 10.000) für E1, E2 und EE2 zwischen 20 pg L⁻¹ und 2000 pg L⁻¹. Über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R) eines der kleinsten detektierbaren Standards (0,045 ng mL⁻¹) lassen sich rechnerisch unter Berücksichtigung aller Anreicherungs­faktoren NWG von 0,7 pg L⁻¹ für das EE2, 0,4 pg L⁻¹ für das E2 sowie 0,3 pg L⁻¹ für das E1 in Reinstwasser bestimmen. Aus dotierten Oberflächenwasserproben (200 pg L⁻¹) wurden ebenfalls über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis die entsprechenden NWG berechnet. Diese lagen bei 30 pg L⁻¹ für das EE2, 30 pg L⁻¹ für das E2 sowie 10 pg L⁻¹ für das E1 in einer Oberflächenwasserprobe. Analog lagen die ermittelten NWG bei 40 pg L⁻¹ für das EE2, 35 pg L⁻¹ für das E2 sowie 30 pg L⁻¹ für das E1 in einer Kläranlagenablaufprobe.

Zur Bestätigung wurden zusätzlich Oberflächenwasser- und Kläranlagenablaufproben gemessen. Hierbei lag die Konzentration in einer Oberflächenwasserprobe für das EE2 unterhalb der NWG (< 30 pg L⁻¹). Zur Verifizierung der ermittelten NWG wurde erneut eine zweite Teilprobe vor der gesamten Probenvorbereitung mit 30 pg L⁻¹ dotiert. Mit der finalen Methode konnten 30 pg L⁻¹ EE2 bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3,2 für den spezifischen Massenübergang m/z 295,1 → 269,1 im negativen ESI-Messmodus in einer Oberflächenwasserprobe nachgewiesen und die NWG somit zweifelsfrei bestätigt werden.

Für die GC-MS/MS-Methode wurden die entsprechenden NWG zunächst analog zur Online-SPE-LC-MS/MS-Methode über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis einer mit den Zielanalyten dotierten Oberflächenwasserprobe (100 pg L⁻¹) errechnet. Für EE2, E2 und E1 ergab dies eine NWG von 2 pg L⁻¹. Um die rechnerisch ermittelten NWG zu verifizieren, wurden erneut Oberflächenwasserproben mit einer Konzentration von 30 pg L⁻¹ bzw. 10 pg L⁻¹ dotiert und gemessen. Um sicher zu stellen, dass die Probe nicht ohne Dotierung bereits eine höhere Konzentration der Zielanalyten enthielt, wurden die Proben zunächst nativ gemessen. Die Ergebnisse konnten die rechnerisch ermittelten NWG bestätigen. Für EE2 konnte somit ebenfalls die Vorgabe der EU-WRRL erreicht werden. Entsprechende Chromatogramme im Bereich der erforderlichen NWG von 35 pg L⁻¹ sind in Abbildung 18 für das EE2 gezeigt.

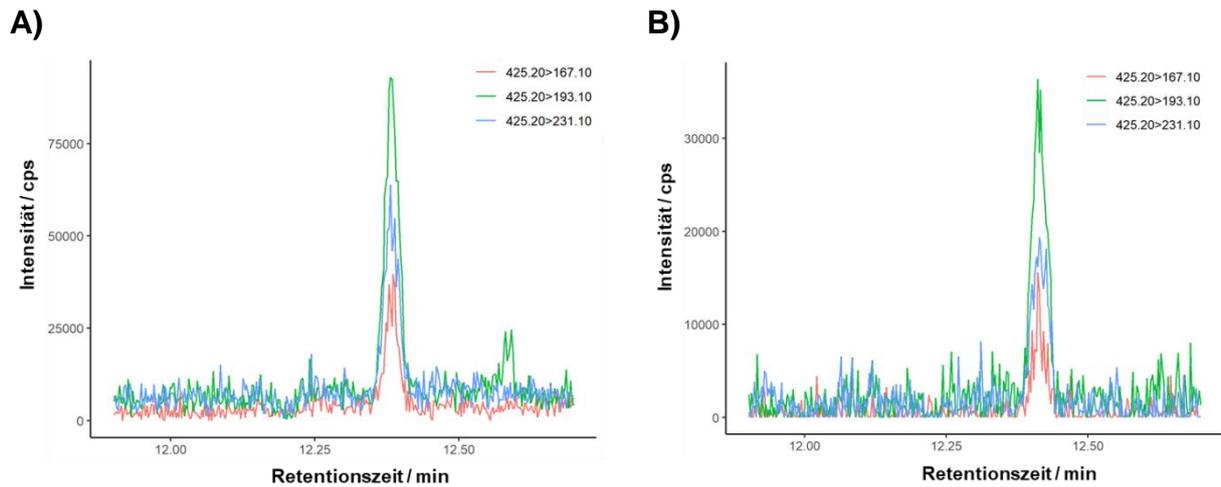


Abbildung 18: Detektion von 30 pg L^{-1} (A) und 10 pg L^{-1} (B) für das EE2 dotiert in 1 L Oberflächenwasserprobe. Gemessen mittels GC-MS/MS (Shimadzu TQ8040).

Mit dem in diesem Projekt entwickelten spezifischen sowie sensitiven Gesamtverfahren unter Anreicherung von 1 L Probe, einem direkten Silika-Clean-Up sowie der Detektion mittels Online-SPE-HPLC-MS/MS als auch GC-MS/MS ist es nun erstmalig möglich, die drei ausgewählten Hormone im erforderlichen Konzentrationsbereich nach Vorgabe der EU-WRRL zu bestimmen.

3.3 Kopplung von Chromatografie und Fluoreszenzdetektor zur Ermittlung der instrumentellen Bestimmungsgrenze der Zielanalyten

Für die Referenz-Fluoreszenzdetektion (RF-20A XS, Shimadzu GmbH, Deutschland) wurde dieselbe chromatografische Methode sowie Probenvorbereitung (Anreicherung und Clean-Up) aus der beschriebenen Gesamtmethode mittels Online-SPE-LC-MS/MS verwendet (siehe Abschnitt 3.2). Da der Fluoreszenzdetektor nicht mit der Online-SPE gekoppelt ist, muss ein maximaler Anreicherungsfaktor von 1.000 durch die Offline-SPE berücksichtigt werden. Um einen objektiven Vergleich des Referenz-FLD mit dem im Projekt entwickelten Demonstrator zu ermöglichen, mussten zunächst die instrumentellen NWG des Detektionsverfahrens bestimmt werden. Dazu wurden die Substanzen E1, E2 und EE2 als Standards in Wasser (LC-MS Qualität) angesetzt und analysiert. Um die Substanzen eindeutig zu identifizieren wurde zunächst die Retentionszeit der Einzelstandards bestimmt und dann in einem Mix aus allen drei Substanzen eine Kalibration gemessen.

Parallel dazu wurde eine chromatografische Methode zur schnellen Trennung der drei Hormone E1, E2 und EE2 entwickelt und auf ein Dionex P580 HPLC-System der HHU übertragen. Die HPLC wurde mit dem optischen Aufbau des neuen Fluoreszenzdetektors gekoppelt und Konzentrationsreihen der Hormone gemessen, um die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen zu ermitteln.

Bei Nutzung des kommerziell erhältlichen Shimadzu RF-20A XS FLD ergeben sich die NWG zu 100 ng mL^{-1} für das E1 sowie 50 ng mL^{-1} für EE2 und E2. Der lineare Arbeitsbereich liegt inklusive des Anreicherungsfaktors von 1.000x bei 1.000 ng L^{-1} bis 100 ng L^{-1} für das E1 ($R^2=0,976$) sowie 1.000 ng L^{-1} bis 50 ng L^{-1} für EE2 ($R^2=0,992$) und E2 ($R^2=0,993$). Bei allen Messungen mit Realproben wurden trotz Anwendung des Clean-Up inklusive Lösemittelwechsel Störungen detektiert, welche bei der Massenspektrometrie auf Grund der Messung im MRM-Modus nicht sichtbar sind.

Die Abbildung 19 zeigt das UV-Chromatogramm der Hormone E1, α E2, β E2 und EE2 bei einer Konzentration von 100 ng mL^{-1} und einem Injektionsvolumen von $100 \mu\text{L}$. Alle Hormone eluieren in einem Zeitfenster von 56 s zwischen 111 s und 167 s von der Säule. Dabei liegen die Hormone E1 und EE2 basisliniengetrennt vor, α E2 und β E2 können hingegen nur angetrennt werden. Die UV-Detektion diente bei der Entwicklung des Fluoreszenzdetektors als Referenzmethode. Allerdings liegt die Nachweisgrenze des hier eingesetzten UV-Detektors (Dionex UVD 340U) bei 50 ng mL^{-1} , sodass vergleichende Messungen gegenüber dem neu entwickelten Fluoreszenzdetektor im relevanten Konzentrationsbereich $< 1 \text{ ng mL}^{-1}$ nicht möglich sind.

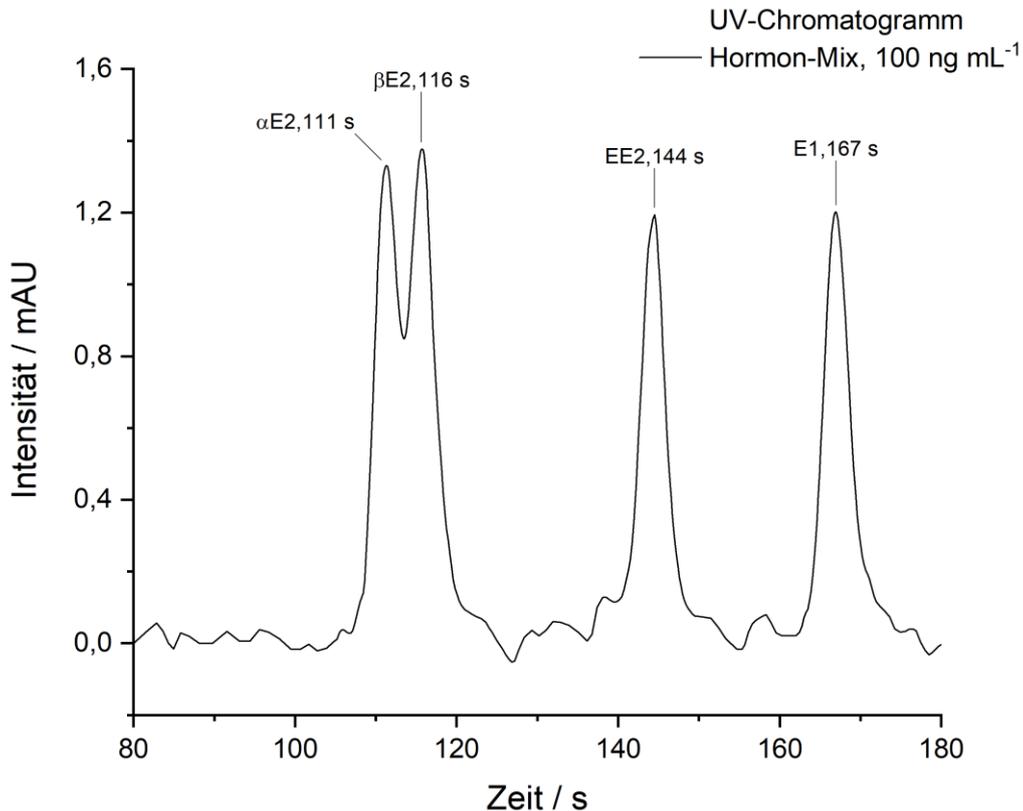


Abbildung 19: UV-Chromatogramm des Hormon-Mix; Analyten: E1, αE2, βE2, EE2; Injektionsvolumen: 100 µL; HPLC: Dionex P580, ASI-100, UVD 340U; Stationäre Phase: Restek Raptor Biphenyl 2,7 µm, 50 x 2,1 mm; Temperatur: 40 °C; Mobile Phase: A: Wasser, B: 30-50 % Acetonitril in 4 min; Flussrate: 0,8 mL min⁻¹; Druck: 276 bar.

Anhand des UV-Chromatogramms können zunächst die Basispeakbreiten bestimmt werden. Diese liegen hier bei etwa 10 Sekunden. Die Peakbreite gibt vor, wie hoch die maximale Belichtungszeit des CCD-Detektors für die Aufnahme der Fluoreszenzsignale eingestellt werden kann, um noch ausreichend Datenpunkte über einen Peak für die spätere Integration der Fluoreszenzspektren zur Konzentrationsbestimmung zu erhalten. Da in der Regel mindestens 10 Datenpunkte über einen chromatografischen Peak gesetzt werden müssen, wurde die maximale Belichtungszeit des Fluoreszenzdetektors auf 1 s eingestellt. Die Datenaufnahmerate entspricht demnach 1 Hertz.

Für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des neuen Fluoreszenzdetektors wurde eine Konzentrationsreihe der Hormone zwischen 10 pg mL⁻¹ und 50 ng mL⁻¹ gemessen. Die Abbildung 20 zeigt exemplarisch die aufgenommenen Fluoreszenzspektren zum Zeitpunkt der Elution des Hormons EE2 mit einer Konzentration von 25 ng mL⁻¹. Zur besseren Übersicht werden nur die Spektren der aufsteigenden Peakflanke von der Basislinie (blau) bis zur maximalen Fluoreszenzemission (rot) dargestellt. Die Belichtungszeit pro Spektrum beträgt genau 1 Sekunde. Das blaue Spektrum wurde im Chromatogramm bei 140 s aufgenommen. Es folgen die drei schwarzen Spektren bei 142 s,

143 s und 144 s. Das Spektrum bei 141 s liegt genau zwischen dem blauen und dem unteren schwarzen Spektrum und wurde ebenfalls zugunsten der besseren Darstellbarkeit ausgelassen. Das Fluoreszenzmaximum wird durch das rote Spektrum dargestellt und liegt bei 145 s. Die linke Seite der Abbildung 20 zeigt die Rohdaten der Spektren. Das blaue Spektrum bei 140 s liegt an der unteren linken Flanke des Elutionspeaks und zeigt aufgrund der noch sehr geringen Konzentration an EE2 eine hohe Übereinstimmung mit dem Spektrum der reinen mobilen Phase (siehe dazu Abbildung 8).

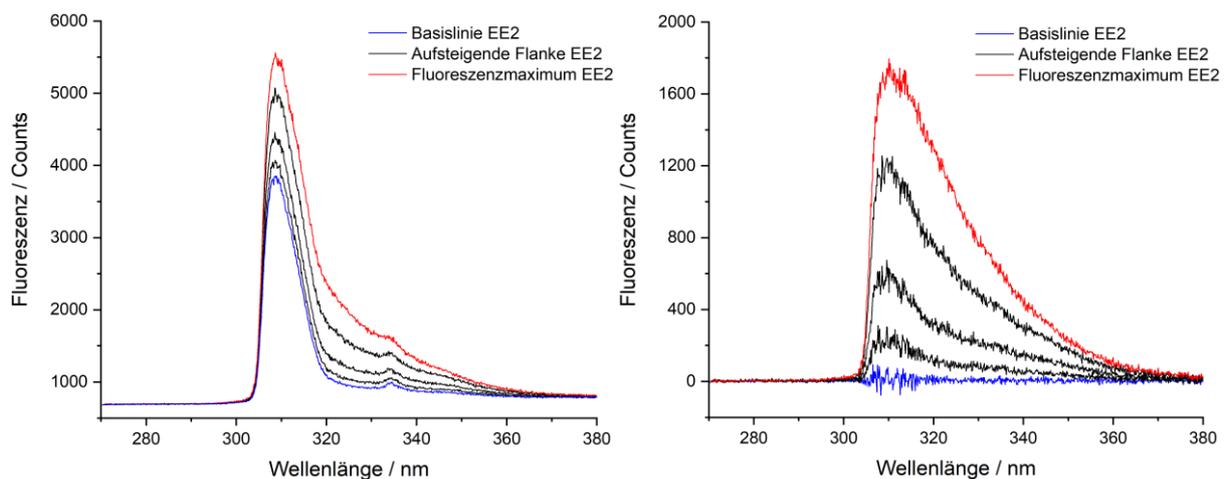


Abbildung 20: Fluoreszenzspektren von EE2 nach chromatografischer Trennung, Konzentration der Injektionslösung: 25 ng mL^{-1} , Injektionsvolumen: $100 \mu\text{L}$. Aufsteigende Peakflanke bei 140 s (blau), 142 s, 143 s, 144 s (schwarze Kurven) und 145 s (rot, Fluoreszenzmaximum) im Chromatogramm. Linke Abbildung: Rohdaten. Rechte Abbildung: Basislinienkorrigiert durch Differenzbildung zum Spektrum der reinen mobilen Phase bei 138 s.

Die rechte Seite der Abbildung 20 zeigt die basislinienkorrigierten Fluoreszenzspektren. Dazu wurden von allen Rohspektren das Spektrum der reinen mobilen Phase kurz vor dem Peak bei 138 s subtrahiert. Zur weiteren Auswertung und Intensitätsberechnung der Fluoreszenzemission wurde ein bestimmter Bereich der Spektren integriert. Dabei hat sich herausgestellt, dass es von Vorteil ist, nicht den gesamten Peak zu integrieren. Insbesondere der Bereich um das Signalmaximum zwischen 307 nm und 316 nm weist ein erhöhtes Signalrauschen auf. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an dem Untergrundsignal der Raman-Bande von Wasser bei 309 nm. Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen führte die Integration des gesamten Fluoreszenzpeaks zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Durch eine vertiefte Datenanalyse konnte ein optimaler Integrationsbereich zur Auswertung der Fluoreszenzspektren ermittelt werden. Dazu wurden 300 Pixel des CCD-Sensors in einem Spektralbereich von 317 nm bis 355 nm integriert (siehe Abbildung 21). Der Bereich ab 355 nm aufwärts wurde nicht mehr integriert, da hier vor allem bei sehr niedrigen

Konzentrationen die Fluoreszenzemission nicht mehr detektierbar ist. Dies würde zu einem erhöhten Anteil an integriertem Untergrundrauschen führen, wodurch das Signal-zu-Rauschverhältnis verschlechtert werden würde.

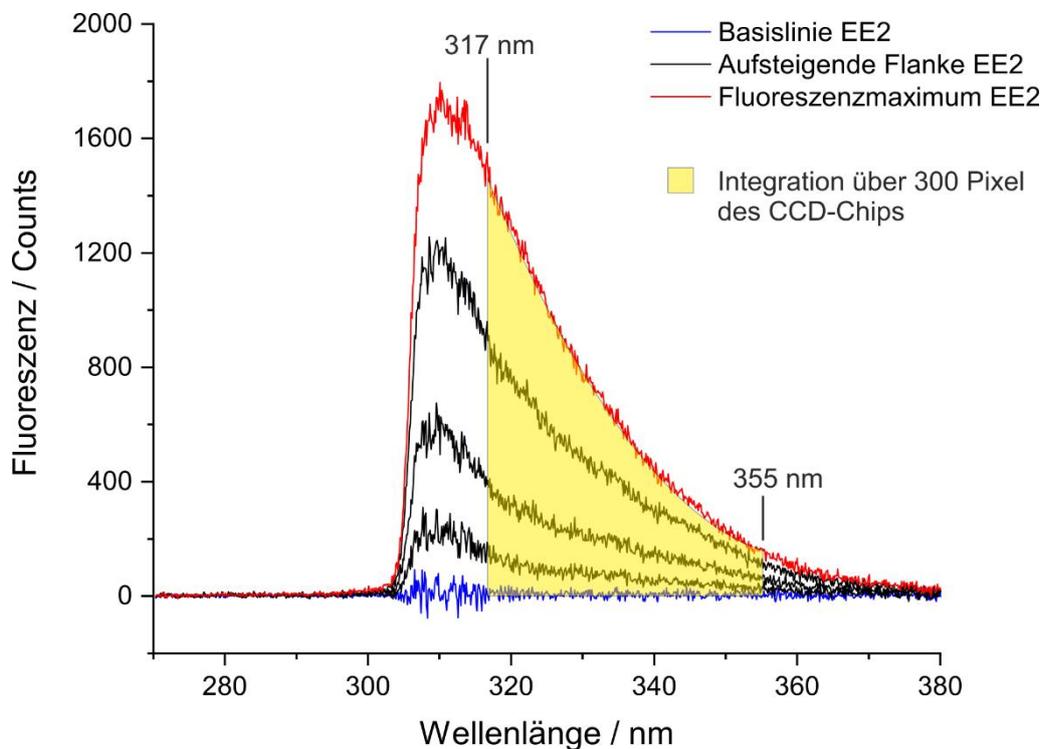


Abbildung 21: Optimaler Integrationsbereich der Fluoreszenzspektren (gelbe Fläche).

Die Werte für die integrierten Fluoreszenzspektren wurden anschließend auf eine Zeitachse aufgetragen, um so die Fluoreszenzchromatogramme zu erhalten. Die entsprechende Kalibrationsreihe der Hormone ist in der Abbildung 22 dargestellt. Die Messpunkte bei einer Konzentration von 10, 25 und 50 pg mL^{-1} wurden in dieser Darstellung ausgelassen, da sie unterhalb der Bestimmungsgrenze des Detektors liegen.

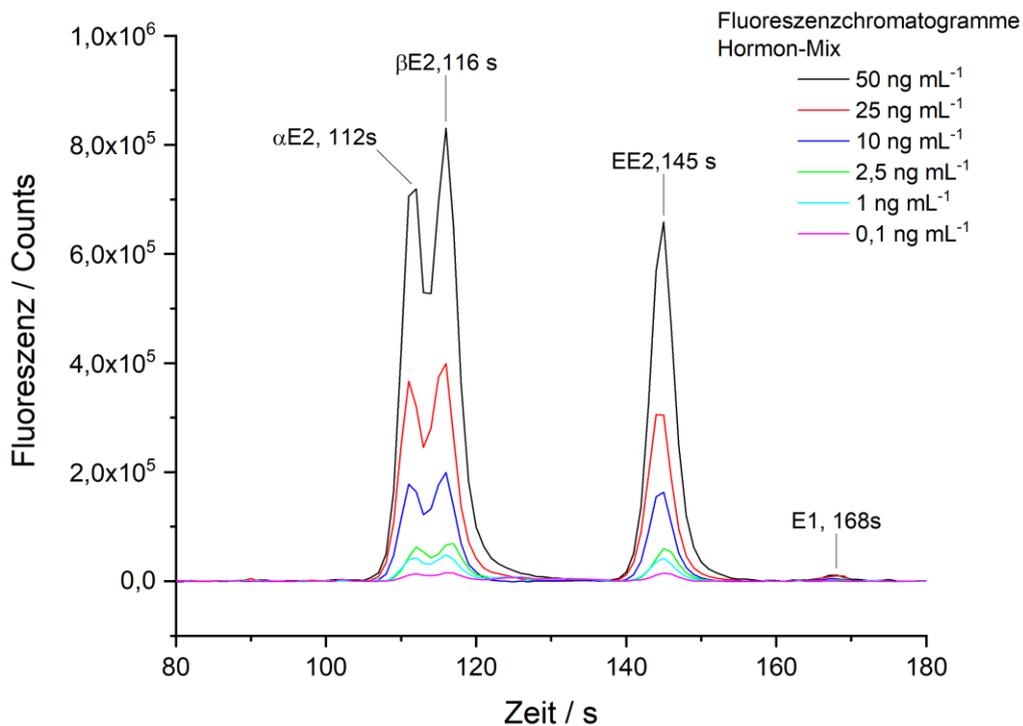


Abbildung 22: Chromatogramme mit Fluoreszenzdetektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter; Analyten: E1, αE2, βE2, EE2; Injektionsvolumen: 100 µL; HPLC: Dionex P580, ASI-100; Stationäre Phase: Restek Raptor Biphenyl 2,7 µm, 50 x 2,1 mm; Temperatur: 40 °C; Mobile Phase: A: Wasser, B: 30-50% Acetonitril in 4 min; Flussrate: 0,8 mL min⁻¹; Druck: 276 bar.

In den Fluoreszenzchromatogrammen können die Hormone αE2, βE2 und EE2 eindeutig identifiziert werden. Die Retentionszeiten stimmen mit etwa 1 s Zeitversatz (der Fluoreszenzdetektor wurde unmittelbar hinter den UV-Detektor gekoppelt) mit dem UV-Chromatogramm aus Abbildung 19 überein. E1 hingegen zeigt eine deutlich reduzierte Fluoreszenzemission. Dies ist vermutlich auf einen intramolekularen Quenchprozess zurückzuführen, der durch den Einfluss der Carbonylgruppe am Fünfring als Antiauxochrom induziert wird. Die Bestimmungsgrenze von E1 liegt um den Faktor 50 höher als die von αE2, βE2 und EE2. In der folgenden Auswertung wird E1 nicht weiter berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Detektionsgrenzen sind in der Abbildung 23 die Fluoreszenzchromatogramme mit einer Konzentration von 25, 50 und 100 pg mL⁻¹ dargestellt. Zu Vergleichszwecken wird auch nochmal eine höhere Konzentration mit 1 ng mL⁻¹ gezeigt. In allen Chromatogrammen ist das Fluoreszenzchromatogramm einer Blindinjektion der reinen mobilen Phase bei chromatografischen Startbedingungen dargestellt (roter Kurvenverlauf).

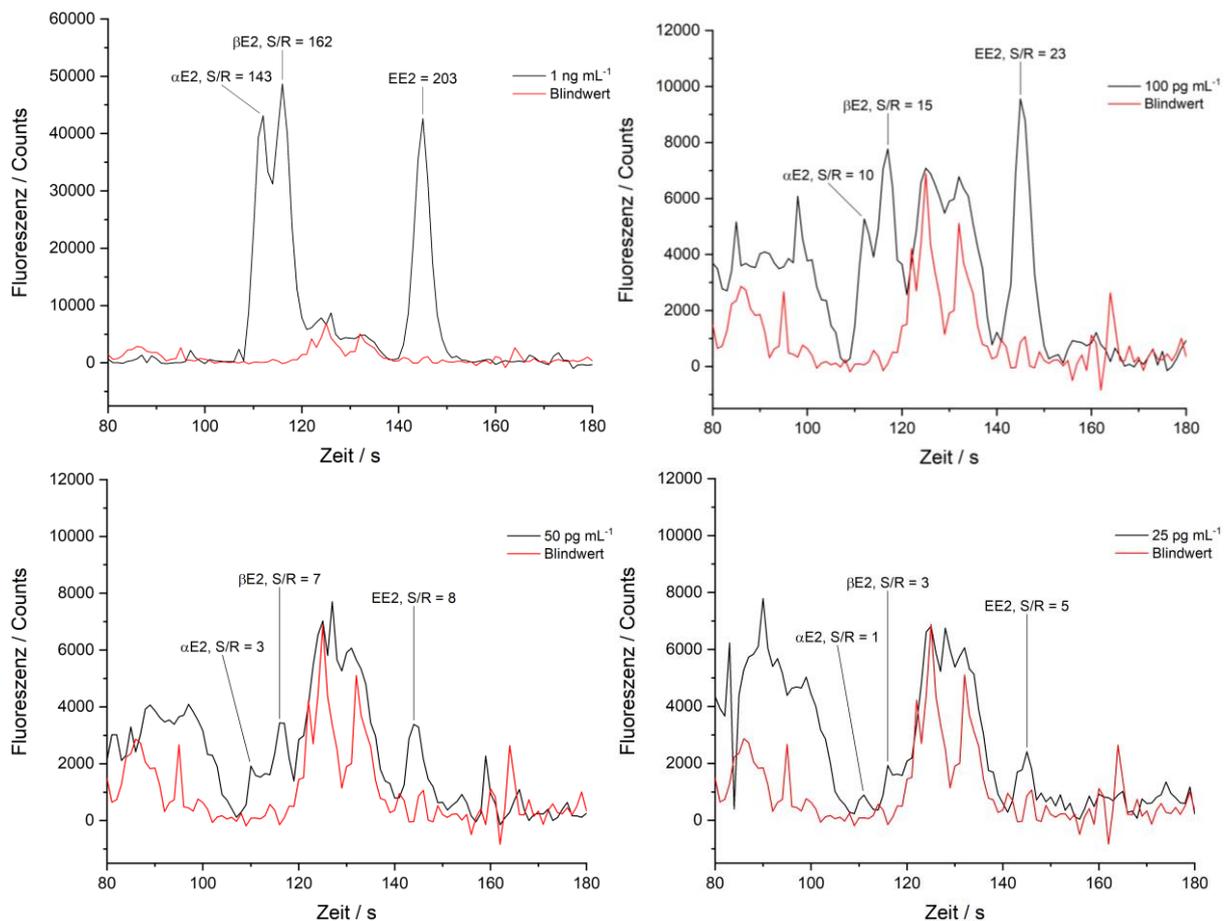


Abbildung 23: Chromatogramme mit Fluoreszenzdetektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter; Analyten: E1, αE2, βE2, EE2; Injektionsvolumen: 100 μL; HPLC: Dionex P580; Stationäre Phase: Restek Raptor Biphenyl 2,7 μm, 50 x 2,1 mm; Temperatur: 40 °C; Mobile Phase: A: Wasser, B: 30-50% Acetonitril in 4 min; Flussrate: 0,8 mL min⁻¹; Druck: 276 bar.

Zur Bestimmung der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/R) wurden die Signalintensitäten ins Verhältnis zur Standardabweichung des Untergrundrauschens gesetzt. Die Bestimmungsgrenze kann sicher mit 100 pg mL⁻¹ angegeben werden. Bei dieser Konzentration betragen die S/R-Verhältnisse für αE2 10, für βE2 15 und für EE2 23. Die Nachweisgrenze liegt für αE2 mit S/R = 3 bei 50 pg mL⁻¹, für βE2 und EE2 mit S/R = 3 bzw. 5 sogar bei 25 pg mL⁻¹.

Zur Überprüfung der Linearität des Fluoreszenzdetektors wurde eine Regressionsanalyse der Kalibrationsreihe zwischen 100 pg mL⁻¹ und 50 ng mL⁻¹ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 24 dargestellt.

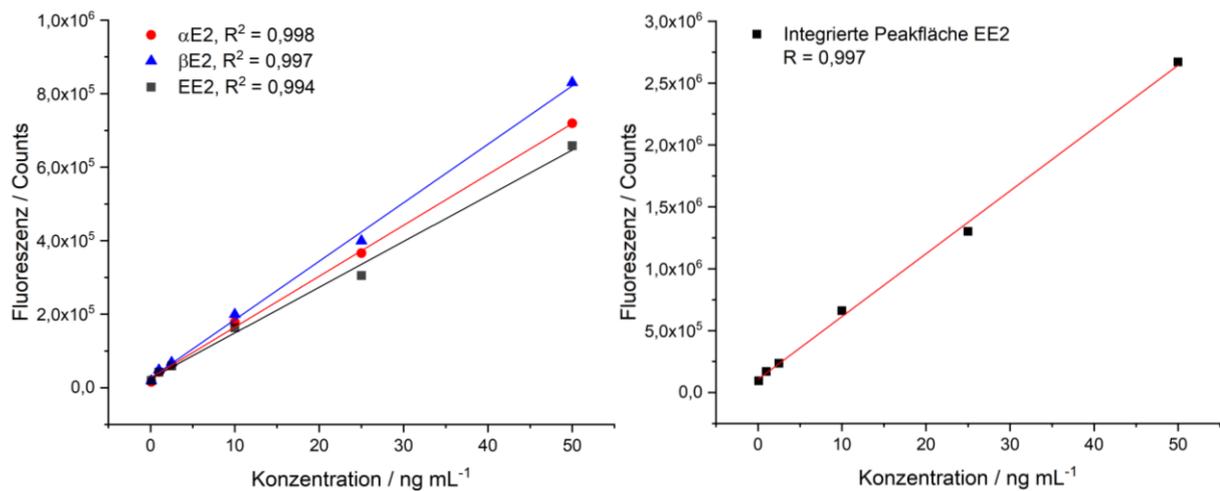


Abbildung 24: Lineare Regressionsanalyse der Hormonkalibration mittels Fluoreszenzdetektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter. Links: Auftragung der Signalintensität gegen die Konzentration. Rechts: Auftragung der integrierten Peakfläche gegen die Konzentration.

Auf der linken Seite der Abbildung 24 wurde die Signalhöhe gegen die Konzentration aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß liegt für α E2 bei $R^2 = 0,998$, für β E2 bei $R^2 = 0,997$ und für EE2 bei $R^2 = 0,994$. Auf der rechten Seite der Abbildung 24 wurde die integrierte Peakfläche von EE2 gegen die Konzentration aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß konnte auf $R^2 = 0,997$ leicht verbessert werden. Aufgrund des nicht basisliniengetrennten Doppelpeaks von α E2 und β E2 wurde für diese beiden Analyten keine Peakfläche bestimmt.

Die Tabelle 5 fasst die mit dem neuen Fluoreszenzdetektor erreichten Bestimmungsgrenzen für die Hormone zusammen. Dabei werden die Ergebnisse mit den definierten Projektzielen sowie dem Referenz-Fluoreszenzdetektor Shimadzu RF-20Axs verglichen. Im Vergleich zum Shimadzu RF-20Axs konnte eine Verbesserung der Bestimmungsgrenze um den Faktor 500 erreicht werden. Für die Hormone E2 und EE2 wurde eine Bestimmungsgrenze von 100 pg mL^{-1} erreicht. Wird die Probenanreicherung um den Faktor 10.000 (Faktor 500 für die offline-SPE x Faktor 20 für die online-SPE) berücksichtigt, kann eine Bestimmungsgrenze von 10 pg L^{-1} angenommen werden. Für E1 konnte das Projektziel aufgrund der schwachen Fluoreszenzemission nicht erreicht werden. Die Bestimmungsgrenze liegt nach Probenanreicherung mit 500 pg L^{-1} geringfügig über der im Projektvorhaben definierten Zielkonzentration von 400 pg L^{-1} .

Tabelle 5: Bestimmungsgrenzen der Hormone mittels Fluoreszenzdetektion im Kalibrierstandard nach Probenanreicherung um den Faktor 10.000.

Hormon	Bestimmungsgrenze / pg L ⁻¹		
	Projektziel nach EU-Wasserrahmenrichtlinie	Im Projekt entwickelter Fluoreszenzdetektor	Referenzdetektor (Shimadzu RF-20Axs)
E1	400	500	10.000
βE2	400	10	5.000
EE2	35	10	5.000

3.4 Auswertung von Fluoreszenzspektren bei Koelution

Ein Problem bei der Messung von realen Umweltproben ist die hohe Matrixbelastung, die auch bei entsprechender Probenvorbereitung nicht vollständig eliminiert werden kann. Im Folgenden wird die Messung einer Probe aus dem Rhein gezeigt, die mit 1 ng mL^{-1} der Hormone E1, E2 und EE2 dotiert wurde. Parallele Messungen mittels LC-MS/MS haben gezeigt, dass im Zeitfenster der Hormonelution bis zu 68 koeluierende Verbindungen detektiert wurden (siehe die Ausführungen in Abschnitt 3.5). Die Abbildung 25 zeigt das relevante Zeitfenster zwischen 80 und 180 s, in denen die Hormone von der Trennsäule eluieren. Der schwarze Kurvenverlauf zeigt das Chromatogramm der dotierten Rheinprobe. Im Vergleich zum Chromatogramm der Blindprobe (blauer Kurvenverlauf) können keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenzemission beobachtet werden. Der rote Kurvenverlauf zeigt die Messung bei Injektion des Kalibrierstandards mit ebenfalls 1 ng mL^{-1} . Die Fluoreszenzsignale für αE2 , βE2 und EE2 können eindeutig identifiziert werden.

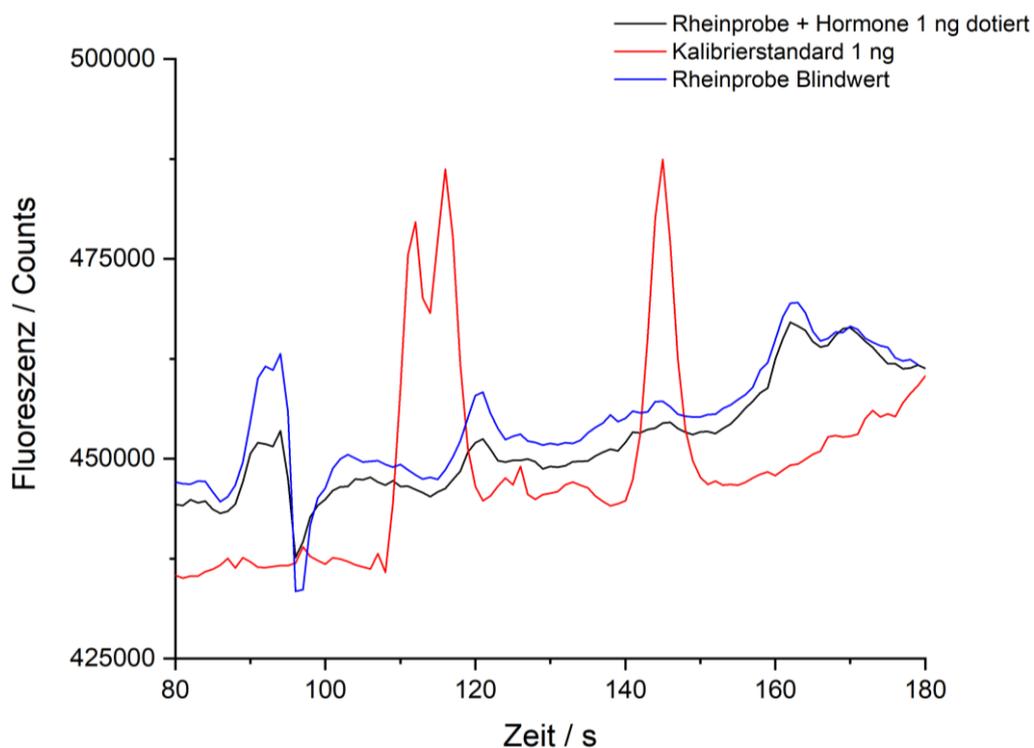


Abbildung 25: Fluoreszenzchromatogramm einer mit Hormonen dotierten Oberflächengewässerprobe (Konzentration 1 ng mL^{-1}) aus dem Rhein.

Es wird davon ausgegangen, dass Fremdstoffe (Matrix), die zeitgleich mit den Hormonen eluieren, aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen zur Fluoreszenzauslöschung (Quenching) führen. Vor diesem Hintergrund wurden Messungen auf Basis der Non-Target-Analytik mittels LC-HRMS durchgeführt.

3.5 Identifizierung potenzieller Störkomponenten mittels Non-Target-Analytik

Da trotz der hoch selektiven Probenvorbereitung sowie Chromatografie bei der massenspektrometrischen Detektion Störungen auf ausgewählten Massenspuren als auch bei der Fluoreszenzdetektion in realen Proben auftreten, sollte in diesem Arbeitspaket untersucht werden, ob eindeutige Störkomponenten zu den jeweiligen Retentionszeitfenstern der Zielanalyten identifiziert werden können. Da eine direkte Identifizierung durch einen Fluoreszenzdetektor nicht möglich ist, wurde die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS, High-Resolution Mass Spectrometry) als Referenzverfahren eingesetzt.

Die entwickelte Detektionsmethode wurde dazu auf ein Flugzeitmassenspektrometer (LC-MS-QToF, Agilent Technologies Deutschland GmbH) übertragen und es wurden Oberflächenwasserproben als auch Standards untersucht. Die Proben wurden wie in Abschnitt 3.2 beschrieben aufgearbeitet und mit den entsprechenden chromatografischen Methoden analysiert. Parallel zu den Oberflächenwasserproben wurde zunächst ein Standard (10 ng mL^{-1}) analysiert, um die Retentionszeiten der Analyten bestimmen zu können. Im Anschluss wurden Oberflächenwasserproben im Auto-MS/MS Modus gemessen. Hierbei werden bei den Signalen mit einer Intensität $> 5.000 \text{ counts per second (cps)}$ automatisch MS/MS-Experimente mit einer Kollisionsenergie von 20 eV durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass zu den Molekülonen ausreichend spezifische Produktionen generiert und detektiert werden können, mit welchen im Anschluss ein Datenbankabgleich zur Identifizierung durchgeführt werden kann.

Mit diesem Ansatz sollte die aktuell entwickelte Methode zur sensitiven Bestimmung von EE2 erneut auf Störungen überprüft und gleichzeitig der Einfluss des Clean-Up Verfahrens auf die weitere Abtrennung von Matrixbestandteilen quantitativ durch eine Featureanalyse näher untersucht werden. Darüber hinaus wurde ein Vergleich zwischen der Biphenyl- und der Chromolith-FastGradient Säule durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über ursprünglich vorhandene Störkomponenten zu erlangen und ggf. noch weitere Optimierungen an der Gesamtmethode vornehmen zu können.

Die Auswertung der MS-Daten erfolgte mittels des Open-Source Tools R. Hierzu wurden sowohl eigene Auswerteskripte entwickelt als auch auf das vorhandene Tool patRoos zur Peakerkennung zurückgegriffen. Zum Filtern der detektierten Masse-zu-Ladungsverhältnisse wurden entsprechende Filterkriterien gewählt. Zum einen wurden die insgesamt detektierten Signale unbekannter Herkunft, sog. Features, in den jeweiligen Retentionszeitfenstern detektiert und zwischen den Säulen sowie mit und ohne Clean-Up verglichen. Als weiteres Kriterium wurde ein Filter mit einem zulässigen Fehler von $m/z \pm 0,1$ ähnlich zu der Genauigkeit eines MS-Systems mit Einheitsauflösung gewählt. Somit ist es möglich, neben der Gesamtzahl an Features in dem jeweiligen Retentionszeitfenster auch die Anzahl der

den Zielanalyten ähnlichen Verbindungen zu sehen. Beim Methodentransfer auf das LC-MS-QToF System wurden zunächst die Retentionszeiten der Zielanalyten bestimmt. Auf dieser Basis wurden Retentionszeitfenster definiert, die in Abbildung 26 farbig markiert und den jeweiligen Zielanalyten zugeordnet sind.

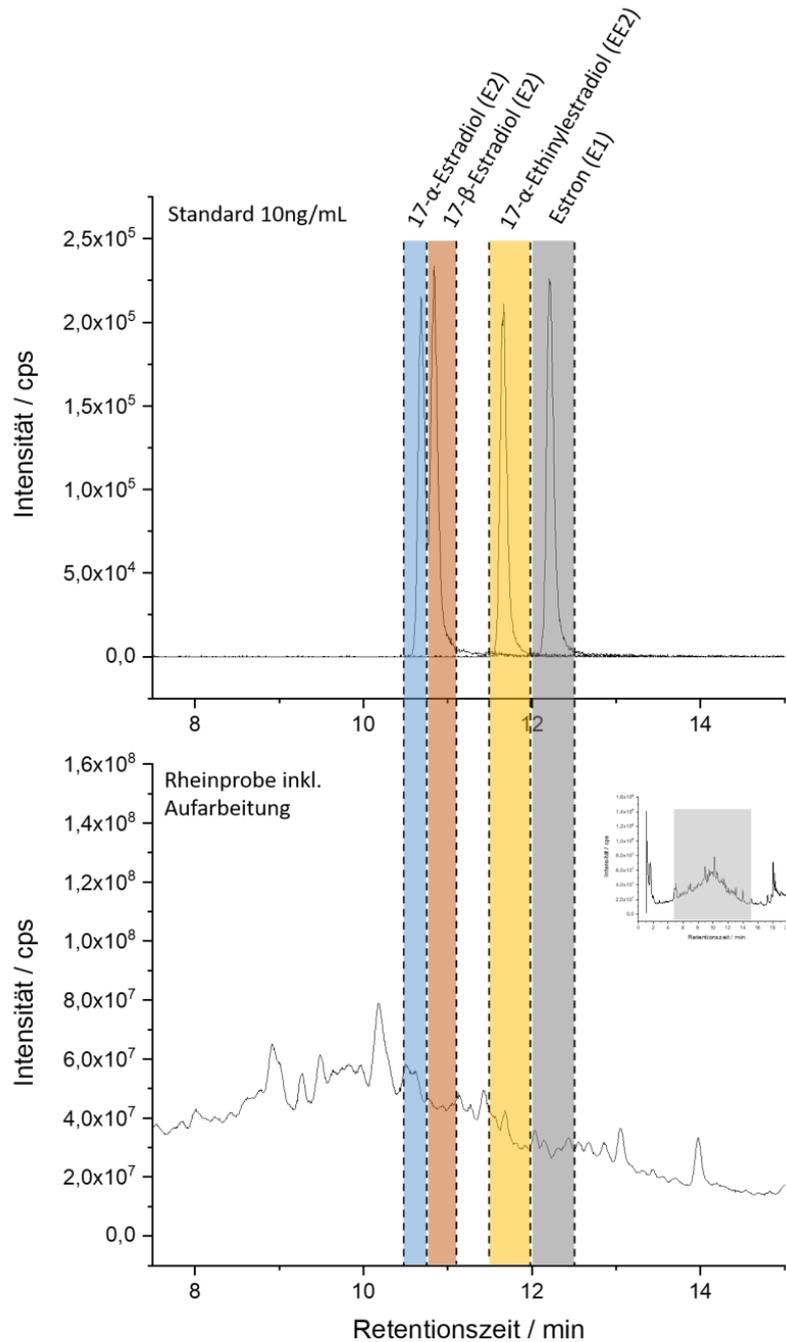


Abbildung 26: Bestimmung der Retentionszeiten anhand eines hoch konzentrierten Standards (10 ng mL⁻¹) für die Zielanalyten, sowie Festlegung der Retentionszeitfenster mit ± 30 s von dem Peakmaximum des entsprechenden Analyten zur Featureanalyse in einer Realprobe. Das Chromatogramm der Rheinprobe inklusive Aufarbeitung ist eine skalierte Darstellung des gesamten Totalionenstrom-Chromatogramms der Probe.

Als Retentionszeitfenster wurden ± 30 s zum Peakmaximum gewählt. Die Ergebnisse für beide Säulen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Es zeigte sich deutlich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Säulen im Hinblick auf die Anzahl an Features zu den entsprechenden Retentionszeitfenstern zu verzeichnen ist. Hier liegt die Anzahl bei beiden Säulen bei 1000 – 1200 Features. Auch die Anzahl an Features mit einer Abweichung zum Analyten von max. 0,1 m/z unterscheidet sich nicht signifikant. Die hier detektierten Features, welche im Bereich von $\pm 0,1$ m/z liegen, weisen zudem keinen Gaußähnlichen Kurvenverlauf auf und können daher auch nicht als echtes Analytsignal interpretiert werden, sondern sind auf das Rauschen zurückzuführen. Somit sind keine Stoffe vorhanden, welche zur selben Retentionszeit wie die Zielanalyten eluieren und ein ähnliches m/z -Verhältnis aufweisen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der HRMS-Daten bei Verwendung der Biphenyl- und Chromolith FastGradient-Trennsäule nach Probenvorbereitung inklusive Clean-Up.

Biphenyl

Analyt	m/z	RT / min	RT -30 s / RT +30 s /		Fetaures Total	Features bis $m/z \pm 0,1$
			min	min		
Estron	269,1541	12,21	11,71	12,71	1161	1
17 α -Estradiol	271,1698	10,69	10,19	11,19	1225	1
17 β -Estradiol	271,1698	10,84	10,34	11,34	1232	1
17 α -Ethinylestradiol	295,1698	11,67	11,17	12,17	1134	3

Chromolith FastGradient

Analyt	m/z	RT / min	RT -30 s / RT +30 s /		Fetaures Total	Features bis $m/z \pm 0,1$
			min	min		
Estron	269,1541	10,70	10,27	11,27	1096	0
17 α -Estradiol	271,1698	9,91	9,41	10,41	1026	0
17 β -Estradiol	271,1698	10,37	9,87	10,87	1080	0
17 α -Ethinylestradiol	295,1698	10,90	10,4	11,40	1017	4

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2, Abbildung 11 gezeigt, liegt der wesentliche Unterschied der beiden Säulen in der Trennung von Matrix und Analyten, wodurch bei der Biphenylphase folglich ein höheres S/R-Verhältnis erreicht werden kann.

Auffällig ist jedoch das Feature m/z 293, welches in allen Proben inklusive der Blindwertproben detektiert wurde und die gleiche Masse wie eines der Isotope von EE2

besitzt. Dies führt in dem hier gewählten Ansatz der Analyse von spezifischen Massenübergängen nicht zu einem direkten analytischen Problem. Da es jedoch in jeder Probe vorhanden ist, könnte dies auf eine systematische Verunreinigung aus dem Labor hinweisen und sollte zukünftig weiter untersucht werden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Substanz das Fluoreszenzspektrum von EE2 beeinflusst.

Zusätzlich zu dem Vergleich der beiden Säulen wurde ein weiterer Vergleich mit und ohne Clean-Up mittels Silika durchgeführt. Hierbei wurden erneut HRMS-Messungen mit denselben Einstellungen der finalen Methode (siehe Abbildung 17) vorgenommen. Es lässt sich belegen, dass die Anzahl der insgesamt detektierbaren Features durch das Silika-Clean-Up um ca. 70% reduziert werden kann. Durch ein weiteres Filtern relevanter Signale durch Reduktion der Isotopen- und Adduktpeaks sowie der im Blindwert erhaltenen Signale sind lediglich ca. 68 Features wirklich relevante Substanzen, die mit den Zielanalyten in der Probe vorhanden sein können (Tabelle 7).

Tabelle 7: Anzahl der detektierten Features in verschiedenen Proben.

Probe	Totalanzahl		Intensive Features
	Features	Features nach Filter	> 10.000 counts
Blindwert	1041	0	0
Probe inklusive clean-Up	1579	675	68
Probe ohne clean-Up	5776	2304	550

Um die restlichen relevanten 68 Features identifizieren zu können, wurde zusätzlich für die Probe inklusive Clean-Up ein Datenbankabgleich durchgeführt. Da in diesen Versuchen im Auto-MS/MS Modus gearbeitet wurde, konnten so parallel Datenbanken mit MS² Spektren, welche unbedingt notwendig für eine zuverlässige Identifikation sind, genutzt werden. Bei den Datenbanken handelte es sich um PubChem, die eine allgemeine Chemikaliendatenbank ist und For-Ident, die überwiegend wasserrelevante Substanzen enthält. Die Ergebnisse mit einem Score-Faktor > 90% der PubChem-Datenbank sind in der nachfolgenden Tabelle 8 gezeigt. Die Suche bei For-Ident ergab keine Treffer.

Tabelle 8: Treffer der Features in der Datenbank PubChem.

ID Nummer	Score	Neutral-Masse	Formel	Name
18	0,980	317,283	C20H35N3	2-(4-octylpiperazin-1-yl)-1-phenylethanamine N-methyl-N-[2-piperazin-1-yl-1-(4-propylphenyl)ethyl]butan-1-amine
19	0,980	317,283	C20H35N3	
20	0,970	271,251	C20H35N3	1-(4-hexylphenyl)-N,N-dimethyl-2-piperazin-1-ylethanamine
11	0,960	271,251	C16H33NO2	[(2S,6R)-6-amino-2-butyldecyl] acetate
12	0,960	271,251	C16H33NO2	ethyl 2-amino-2-butyldecanoate
13	0,960	271,251	C16H33NO2	ethyl (2S)-2-amino-2-methyltridecanoate ethyl 2-(aminomethyl)-6,6-dimethyl-2-(2-methylpropyl)heptanoate
14	0,960	271,251	C16H33NO2	
15	0,960	271,251	C16H33NO2	ethyl 2-(aminomethyl)-2-(2-methylpropyl)nonanoate
16	0,960	249,181	C16H33NO2	ethyl 2-(aminomethyl)-2-methyldodecanoate carboxymethyl-bis(2-hydroxyethyl)-[2-(propan-2-ylamino)ethyl]azanium
1	0,950	249,181	C11H25N2O4	
2	0,900	249,181	C11H25N2O4	2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxycarbonylamino]ethyl-trimethylazanium

3.6 Validierung des Gesamtverfahrens

Mit den in Abschnitt 3.1 bis 3.5 beschriebenen Methoden konnte ein Anreicherungs- sowie Detektionsverfahren etabliert werden, um die ausgewählten Zielanalyten Estron, 17 β -Estradiol, und 17 α -Ethinylestradiol im pg L⁻¹-Bereich nachweisen zu können. Anhand von Oberflächenwasser- sowie Kläranlagenablaufproben wurde das Verfahren im Hinblick auf die zu erreichenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (BG) validiert. Dazu wurde im ersten Schritt eine Konzentration von 100 pg L⁻¹ zu einer Probe dotiert und dann über das S/R-Verhältnis die NWG und BG berechnet. Zusätzlich wurden dann Proben in dem Bereich der BG mit den Zielanalyten dotiert und erneut gemessen, um die errechneten Werte bestätigen zu können. Dies wurde sowohl für die beiden Referenzverfahren als auch für die Kopplung mit dem Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Aufgrund der in Abschnitt 3.4 und 3.5 dargestellten Problematik der Fluoreszenzunterdrückung bei hoher Matrixbelastung konnte der Fluoreszenzdetektor für reale Umweltproben nicht vollumfänglich validiert werden. Dennoch konnte die prinzipielle Anwendbarkeit im relevanten Konzentrationsbereich anhand von Kalibrierstandards demonstriert werden. Um den Fluoreszenzdetektor für matrixbelastete Umweltproben einsetzen zu können, kann die UVC-LED durch einen UV-Laser mit einer Emissionswellenlänge von 280 nm ersetzt werden. Aufgrund des besseren Strahlprofils und der dadurch verbesserten Fokussierbarkeit des Laserlichts, kann deutlich mehr UV-Licht in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter eingekoppelt werden und damit eine deutliche Erhöhung der Anregungsintensität erreicht werden. Das Lasermodell Oxxius der Fa. Photonic Solutions mit einer Wellenlänge von 280 nm bei 10 mW Ausgangsleistung würde im Vergleich zur eingesetzten UVC-LED *LG Innotek 6060* eine Intensitätssteigerung um den Faktor 190 liefern. Dies könnte den problematischen Quenchprozess zu einem gewissen Teil kompensieren. Zudem könnte der Aufreinigungsprozess durch die Offline- und Online-Festphasenextraktion weiterentwickelt und hinsichtlich einer noch selektiveren Hormonanreicherung optimiert werden.

Mit der finalen Offline-SPE- und Online-SPE-LC-MS/MS-Methode können Anreicherungsfaktoren von 5.000 bis 10.000 erreicht werden. Mit einem linearen Arbeitsbereich von 0,05 ng mL⁻¹ bis 10 ng mL⁻¹ für E1, E2 und EE2 werden die geforderten NWG unter Berücksichtigung des Anreicherungsfaktors (5.000) der EU-Wasserrahmenrichtlinie erreicht und konnten entsprechend über das S/R-Verhältnis aus einer mit 100 pg L⁻¹ dotierten Realprobe (KA-Ablauf als auch Rhein) bestimmt werden (Tabelle 9).

Für die Offline-SPE GC-MS/MS-Methode ergibt sich ein linearer Arbeitsbereich von 0,09 ng mL⁻¹ bis 9 ng mL⁻¹ für das E1, von 0,045 ng mL⁻¹ bis 4,5 ng mL⁻¹ für das E2 und von 0,0225 ng mL⁻¹ bis 9 ng mL⁻¹ für das EE2. Durch Experimente mit dotierten Realproben

konnte auch für die GC-MS/MS-Methode gezeigt werden, dass die erforderliche NWG durch eine Anreicherung um den Faktor 10.000 erreicht wird (Tabelle 9). Die Nachweis- als auch Bestimmungsgrenzen wurden für beide Verfahren im Rahmen der Validierung über eine mit 10 µg L⁻¹ dotierte Realprobe bestimmt und sind ebenfalls in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Erreichte Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) des Gesamtverfahrens inklusive Offline-SPE und Clean-Up mittels Silika-Clean-Up.

Online-SPE-LC-MS/MS	KA-Ablauf	KA-Ablauf	Rhein	Rhein
	BG (µg L⁻¹)	NWG (µg L⁻¹)	BG (µg L⁻¹)	NWG (µg L⁻¹)
E1	100	30	40	10
E2	110	30	100	30
EE2	130	40	110	30

GC-MS/MS	KA-Ablauf	KA-Ablauf	Rhein	Rhein
	BG (µg L⁻¹)	NWG (µg L⁻¹)	BG (µg L⁻¹)	NWG (µg L⁻¹)
E1	30	10	10	5
E2	30	10	10	5
EE2	50	20	10	5

4. Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Im Rahmen des IGF-Projektes wurde erfolgreich ein ultrasensitives und selektives Verfahren zur Bestimmung ausgewählter Östrogene in Wasser- und Abwasserproben auf Basis der Flüssigkeitschromatografie und Fluoreszenzdetektion nach Anforderungen der EU-Wasserrahmenrichtlinie entwickelt.

Im Vergleich mit modernen Hochleistungs-Massenspektrometern mit vergleichbarer Sensitivität können für den neuen Fluoreszenzdetektor um den Faktor 5-8 niedrigere Marktpreise abgeschätzt werden. Dies ist branchenübergreifend für alle KMU interessant, die auf eine sensitive Analytik angewiesen sind oder selbst als Analytikdienstleister auftreten. Im Bereich der pharmazeutischen Analytik konnte der Detektor im Rahmen von Freisetzungsuntersuchungen hochpotenter Wirkstoffe bereits erfolgreich getestet werden. Auch für Permeationsuntersuchungen zeichnet sich anhand erster Testmessungen ein hohes Einsatzpotential des neuen Detektors ab. Derzeit liegen die Anschaffungskosten für hochsensitive Massenspektrometer in einem Bereich von 300.000 bis 500.000 €. Die geschätzten Anschaffungskosten für den neu entwickelten Fluoreszenzdetektor nach Markteinführung werden zwischen 60.000 und 100.000 € beziffert und sind somit etwa um den Faktor fünf bis acht niedriger. Dies fördert nicht nur die Akzeptanz des neuen Analyseverfahrens, sondern ist insbesondere für kleinere Laboratorien von großem Vorteil, da im Vergleich zu sehr komplex zu bedienenden und teuren Massenspektrometern die Investitions- und Betriebskosten für ein solches Analysensystem wesentlich geringer sind. Neben den niedrigeren Anschaffungskosten zeichnet sich das neue System vor allem durch seine Robustheit aus. Im Gegensatz zu komplexen Massenspektrometern ist eine hohe Nachhaltigkeit des Fluoreszenzdetektors aufgrund eines geringeren Wartungsaufwandes gegeben. Zudem ist die Bedienung und Auswertung der Messdaten im Vergleich zur Massenspektrometrie deutlich vereinfacht, was insbesondere KMU eine flexiblere Personalstruktur ermöglicht.

Insbesondere im Falle des Ausbaus einer Kläranlage mit einer weitergehenden Reinigungsstufe oder der Entwicklung innovativer neuer Abwasserbehandlungsverfahren ist die Wahl der geeignetsten Methode von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Da diese Problematik im Hinblick auf die Östrogene bis jetzt nicht hinreichend beurteilt werden konnte, schafft dies große Unsicherheiten in den beteiligten Branchen (z. B. Ingenieurbüros, Anlagenbauer und -zulieferer). Somit profitieren durch die Entwicklung einer sensitiven

Messmethode zur Bestimmung der Östrogene nicht nur die Betreiber der 9.632 kommunalen Kläranlagen und analytischen Labore, sondern auch alle am Anlagenbau beteiligten Unternehmen. Mit Gesamtinvestitionen von ca. 4,8 Mrd. Euro in die Abwassertechnik stellte die Wasserwirtschaft 2014 einen der größten Auftraggeber für die Privatwirtschaft dar. Beim Abwasser werden 70% der Leistungen für Bau, Planung etc. an Fremdfirmen vergeben. Bei Planung, Fertigung und Vertrieb von erweiterten Abwasserreinigungsanlagen zur Spurenstoffelimination sind überwiegend kleine und mittlere Unternehmen beteiligt. Durch den Nachweis der Eliminationsrate für die genannten Hormone bietet sich diesen Unternehmen die Möglichkeit, die Leistungsfähigkeit ihrer Anlagen zu belegen. Darüber hinaus lassen sich Fehlinvestitionen in nicht geeignete Verfahren vermeiden und neue Absatzfelder im In- und Ausland erschließen.

5. Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

5.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder entstammen vorwiegend den Branchen der Analysen- und Labortechnik. Während der Projektlaufzeit wurden drei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt.

5.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA

Sowohl während der Projektlaufzeit als auch nach Abschluss des Projektes wurden bzw. werden wichtige Fachtagungen und Messen in Deutschland dazu genutzt, weitere potenziell interessierte Unternehmen über die Projekthalte und das Projektergebnis zu informieren. Diese Maßnahme wurde ebenfalls über zahlreiche Beratungsgespräche innerhalb der Projektlaufzeit an der Forschungseinrichtung umgesetzt.

5.3 Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung der Ergebnisse während der Projektlaufzeit erfolgte hauptsächlich in Form von Publikationen, Vorträgen und Postern auf Fachtagungen, Messen, Seminaren sowie bei regionalen branchenspezifischen Veranstaltungen. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen können der in Tabelle 10 aufgeführten Auflistung entnommen werden.

5.4 Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Aus aktuellem Anlass ist darauf hinzuweisen, dass einzelne der für 2020 geplanten Transfermaßnahmen voraussichtlich nicht wie geplant durchgeführt werden können. Aufgrund der Corona-Krise wurden viele Messen, Tagungen und Kongresse zunächst verschoben bzw. für das laufende Jahr komplett abgesagt. Einzelne Maßnahmen wurden im ersten Halbjahr 2020 aber bereits umgesetzt, diese sind in der Tabelle 10 kursiv dargestellt. Die Durchführung weiterer in der Tabelle 10 spezifizierten Maßnahmen ist derzeit ungewiss.

Tabelle 10: Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.

Datum/Zeitraum	Bereits umgesetzte Maßnahmen	Erläuterung
13.11.-14.11.2017	Posterbeitrag	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 12. Langenauer Wasserforums. Das LWF widmet sich den aktuellen Entwicklungen im Bereich der Wasser- und Umweltanalytik.
01.02.2018	Erste Sitzung des PBA	Es erfolgte eine Vorstellung des Projektes sowie bisheriger Arbeiten auf dem Gebiet der Hormonanalytik mit Gastvorträgen zum Stand der Technik.
21.02.2018	DIN-Sitzung	Vorstellung und Diskussion der Online-SPE-LC-MS/MS-Methode im Rahmen der 34. Sitzung des NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“.
19.06.2018	Fortbildungsveranstaltung	Methodenvorstellung im Rahmen des Phenomenex-Seminars „LC-MS: Einführung und Anwendung“.
15.09.2018	DIN-Sitzung	Vorstellung und Diskussion von Ergebnissen zu Anreicherung und Clean-Up im Rahmen der 35. Sitzung des NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“.
23.-24.10.2018	Fortbildungsveranstaltung	Methodenvorstellung im Rahmen des Klinkner & Partner-Seminars „LC-MS Kopplung“.
26.01.2019	Zweite Sitzung des PBA	Es erfolgte eine Präsentation der erzielten Ergebnisse sowie die Diskussion aktueller Neuerungen aus der analytischen Fachwelt.
30.01.2019	DIN-Sitzung	Diskussion unterschiedlicher Clean-Up-Schritte und Einfluss von Schwebstoffen in Oberflächengewässerproben im Rahmen der 36. Sitzung des NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“.
25.-28.03.2019	Vortrag im Rahmen der Anakon.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Anakon. Die Anakon ist die deutschsprachige Analytik-Tagung, die u. a. dem Gebiet der analytischen Trenntechniken und Spektroskopie großen Platz einräumt.
03.04.2019	Vortrag im Rahmen des AFWC 2019	Vortrag im Rahmen eines internationalen Anwendertreffens.
15.-16.05.2019	Fortbildungsveranstaltung	Präsentation beim PAL Anwendertreffen. Ausgerichtet von Axel Semrau.
14.06.2019	Fortbildungsveranstaltung	Methodenvorstellung im Rahmen des Phenomenex-Seminars „Einführung in die LC-MS“.
26.06.2019	DIN-Sitzung	Vorstellung und Diskussion von Ergebnissen zu Anreicherung und Clean-Up im Rahmen der 37. Sitzung des NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“.
04.07.2019	Fortbildungsveranstaltung	Präsentation der Ergebnisse beim Shimadzu Umweltseminar.

18./19.09.2019	Fortbildungsveranstaltung	Methodenvorstellung im Rahmen des Klinkner & Partner-Seminars „LC-MS Kopplung“.
22.-25.09.2019	Vortrag	Präsentation der Ergebnisse mit Fokus auf die GC und LC Analytik beim 8 th Late Summer Workshop, Haltern am See.
25.10.2019	Vorlesung „Physikalische Chemie für Pharmazeuten“	Vorstellung des Detektorprinzips und potentielle Einsatzmöglichkeiten in der pharmazeutischen Analytik.
11.-12.11.2019	Posterpräsentation	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 13. Langenauer Wasserforums. Das LWF widmet sich den aktuellen Entwicklungen im Bereich der Wasser- und Umweltanalytik.
13.11.2019	DIN-Sitzung	Vorstellung und Diskussion von Ergebnissen zu Realproben und Matrixstörungen im Rahmen der 38. Sitzung des NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“.
22.01.2020	Dritte Sitzung des PBA	Es erfolgte die Abschlusspräsentation und Diskussion aller erzielten Ergebnisse.
Datum/Zeitraum	Maßnahmen nach Projektende	Erläuterung
07.05.2020	<i>Vorlesung „Physikalische Chemie für Pharmazeuten“</i>	<i>Vorstellung des Detektorprinzips und potentielle Einsatzmöglichkeiten in der pharmazeutischen Analytik.</i>
03.-07.05.2020	<i>Posterbeitrag inkl. Kurzvortrag</i>	<i>Vorstellung der Projektergebnisse im Rahmen der SETAC Europe (Online-Konferenz).</i>
28.05.2020	<i>Vortrag / Webinar</i>	<i>Vorstellung der erzielten Ergebnisse und Präsentation der MS Methode anhand von realen Proben beim HPLC Praxistag.</i>
16.06.2020	<i>Vortrag</i>	<i>Vorstellung der erzielten Ergebnisse und Präsentation der MS Methode anhand von realen Proben beim Shimadzu Umweltseminar (Online-Konferenz).</i>
16.06.2020	<i>DIN-Sitzung (Online)</i>	<i>Vorstellung und Diskussion von Ergebnissen zu Realproben im Rahmen der 39. Sitzung des NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“.</i>
01.-12.06.2020	<i>Posterbeitrag (Online-Konferenz)</i>	<i>Vorstellung von Projektergebnissen auf der internationalen MS-Tagung ASMS 2020.</i>
August 2020	<i>Publikation</i>	<i>Veröffentlichung von Teilergebnissen in „Analytical and Bioanalytical Chemistry“.</i>
September 2020	<i>Publikation</i>	<i>Veröffentlichung der Detektorentwicklung in European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.</i>
19.10.2020	Fortbildungsveranstaltung	Methodenvorstellung im Rahmen des Klinkner & Partner – analytica Spezial Seminars „LC-MS Kopplung“.

5.5 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden die Transfermaßnahmen benannt. Hieraus geht hervor, dass seitens der Forschungseinrichtung zahlreiche Maßnahmen unternommen wurden und auch zukünftig unternommen werden, um eine breite Öffentlichkeit zu erreichen. Das Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. verfügt über ein großes interdisziplinäres wissenschaftliches Netzwerk und arbeitet im Rahmen von Innovationsprogrammen als auch der Normungstätigkeit im DIN eng mit kleinen und mittleren Unternehmen zusammen.

Aufgrund der teils langjährigen Erfahrungen und Arbeiten in Kooperation mit KMU besteht auch hier ein ausgezeichnetes Netzwerk, das einen optimalen Wissenstransfer in die Wirtschaft ermöglicht. Es wird angestrebt, im Rahmen einer weiteren FuE-Maßnahme über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand die technische Entwicklung des Demonstrators zu einem Prototypen zu forcieren.

Abschließend ist zu konstatieren, dass das ursprüngliche Transferkonzept in weiten Teilen entsprechend der im ursprünglichen Forschungsantrag dargelegten Strategie umgesetzt werden konnte und weiterhin wie geplant realisiert werden kann – unter dem Vorbehalt möglicher coronabedingter Terminänderungen bzw. Absagen.

6. Verwendung der Zuwendung

6.1 Forschungsstelle (IUTA e. V.)

6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurden Angestellte mit wiss. Ausbildung (HPA-A) über 29,40 Personenmonate eingesetzt (ursprünglich bewilligt: 28 Personenmonate).

Leider wurde der Mehrbedarf an Personenmonaten erst kurz vor Abschluss des Projektes erkennbar: um die (unvorhergesehenen) großen technischen Herausforderungen bei der Kopplung zwischen dem an der FE 2 entwickelten Demonstrator mit der an der FE 1 etablierten Referenzanalytik noch erfolgreich zu realisieren wurde ein weiterer Mitarbeiter hinzugezogen. Zu den Problemen sei hier nochmals verwiesen auf Abschnitt 3.6.

Erst durch den höheren Personaleinsatz war es möglich, dieses Hauptziel des Projektes auf der abschließenden Sitzung des Projektbegleitenden Ausschusses am 22.01.2020 präsentieren zu können.

Daher wurde versäumt, den zusätzlich notwendigen Personaleinsatz rechtzeitig anzuzeigen.

6.1.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

entfällt

6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

entfällt

6.2 Forschungsstelle (HHU)

6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurden die im Antrag vorgesehenen Einsatzzeiten erbracht. Im Einzelnen erfolgten die Arbeiten des Angestellten mit wiss. Ausbildung (A) über 27 Personenmonate (bewilligt 27 Personenmonate).

6.2.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Im Berichtszeitraum wurden **1 Stück CCD-Detektor** (27.836,48 €) und **1 Stück Monochromator** (17.297,84 €) nach Einzelansatz B des Finanzierungsplans von der HHU angeschafft. Diese Geräte waren für die Bearbeitung der AP 1 und 3 notwendig.

6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

Entfällt

7. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag, d. h. die geleisteten Arbeiten waren für den Projekterfolg notwendig und angemessen.