

Verhalten von Zytostatika in der Umwelt, insbesondere in Abwässern, Gewässern und Kläranlagen

MURL: LUA 112-1781 WV 8/98, A.-Nr. 16141, 30.04.98

Abschlussbericht

01.05.1998 – 31.12.2000

Ausführende Forschungs- und Untersuchungsstellen • Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V., Duisburg (IUTA) • Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum, Arbeitsgruppe für Chromatographie und Schwingungsspektroskopie, Bochum (RUB)

Leitung des Untersuchungsvorhabens • Dr. S. Opiolka (IUTA)

Mitglieder des projektbegleitenden Arbeitskreises • Prof. Dr. K.G. Schmidt, Dipl.-Volksw. G. Schöppe, Dr. T. Kiffmeyer, M. Reinders, Dipl.-Ing. K. Morick, Dipl.-Ing. M. Schulte, Dipl.-Ing. S. Wohland (IUTA) • Prof. Dr. H.-J. Götze, Dipl.-Chem. R. Kohl, Dipl.-Chem. T. Teutenberg, Dr. M. Dolny (RUB) • Dr. B. von Danwitz, Dr. H.-D. Stock, Dipl.-Ing. R. Reupert, Dr. K. Zimmermann (LUA NRW)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Problemstellung und Zielsetzung	9
3	Ausgangssituation	13
3.1	Verbrauchsmengen und Eigenschaften von Zytostatika	13
3.1.1	In der Bundesrepublik eingesetzte Zytostatika	13
3.1.2	Verbrauchsmengen von Zytostatika	14
3.2	Toxizität von Zytostatika	20
3.3	Umweltrelevanz von Zytostatika	22
3.3.1	Belastung des Wassers	23
3.3.2	Belastung des Bodens	25
3.3.3	Belastung der Luft	25
3.4	Analytik von Zytostatika	26
3.4.1	Bestimmung in Körperflüssigkeiten	26
3.4.2	Bestimmung in Umweltproben	28
4	Verhalten von Zytostatika in der Umwelt	29
4.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	29
4.2	Untersuchung des biologischen und abiotischen Abbauverhaltens	34
4.2.1	Auswahl des Testverfahrens	34
4.2.2	Verwendetes Testverfahren	35
4.2.3	Durchgeführte Abbauprobversuche	42
4.2.4	Analytik im Rahmen der Abbauprobversuche	44
4.2.5	Ergebnisse der Abbauprobversuche	47
4.2.6	Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.7	Statistische Auswertung der Anreicherungsversuche	65
4.3	Adsorption am Klärschlamm	67
4.3.1	Allgemeines	67
4.3.2	Probenahme	68
4.3.3	Probenvorbehandlung	70

4.3.4	Dotierung des gefriergetrockneten Klärschlamm	70
4.3.5	Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten	72
4.3.6	Extraktion dotierter Klärschlammproben	76
4.3.7	Ergebnisse der Extraktionsmessungen	77
4.3.8	Diskussion der Ergebnisse	82
4.4	Verdampfung von Zytostatika in der Atmosphäre	84
4.4.1	Sättigungskonzentration	84
4.4.2	Bestimmung des Dampfdrucks	85
4.4.3	Verdampfungszeit	87
5	Eintragspfade von Zytostatika in die Umwelt	91
5.1	Belastungen von Abwässern und Oberflächengewässern mit Cyclophosphamid und Ifosfamid	95
5.2	Belastungen von Klärschlamm mit Etoposid, Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat	96
5.3	Belastungen von Emissionen und Raumluft mit Cyclophosphamid	97
5.4	Qualitätssicherung	100
6	Ökotoxikologische Bewertung	101
7	Entwicklung von Vermeidungsstrategien	108
8	Anhang	111

1 Zusammenfassung

Von der Produktion in pharmazeutischen Betrieben über die Herstellung applikationsfertiger Zytostatika-Zubereitungen in medizinischen Einrichtungen bis zur bestimmungsgemäßen Anwendung am Patienten existieren Freisetzungspotenziale von Zytostatika in die Umweltkompartimente Wasser, Boden und Luft. Die überwiegend stationäre Anwendung dieser Humanpharmaka, die Metabolisierungsraten sowie die zum Teil hoch belasteten Ausscheidungen der Patienten lassen die Krankenhausabwässer als den dominierenden Eintragspfad in das Umweltkompartiment Wasser erscheinen. Zielsetzung des vorliegenden Untersuchungsvorhabens war daher die Bestimmung des Verhaltens von Zytostatika in der Umwelt, insbesondere in Abwässern, Oberflächengewässern und Kläranlagen. Darüber hinaus wurden mögliche Einträge in die Atmosphäre über die Emissionen aus Krankenhausapotheken sowie Einträge in den Boden über Klärschlamm als Sekundärkontaminant untersucht.

Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens sind insgesamt elf Zytostatika ausgewählt worden, die unter verschiedenen Aufgabenstellungen näher betrachtet wurden. Die Auswahl der Substanzen erfolgte anhand von Literaturdaten über deren physikalisch-chemische, toxikologische, teratogene oder mutagene Eigenschaften sowie über geschätzte Verbrauchsmengen. Die ausgewählten Zytostatika waren Carmustin, Chlorambucil, Cisplatin, Cyclophosphamid, Cytarabin, Etoposid, 5-Fluorouracil, Ifosfamid, Melphalan, Methotrexat und Vinblastin. Neben den Originalsubstanzen wurden die Metaboliten von Chlorambucil, Melphalan und Methotrexat bei ausgewählten Aufgabenstellungen in die Untersuchungen einbezogen.

Der substanzspezifische quantitative Nachweis von Zytostatika in Laborproben und insbesondere in Realproben erforderte entsprechend leistungsfähige Anreicherungs- und Bestimmungsverfahren. Die Entwicklung dieser Verfahren war ein wesentlicher und zeitaufwendiger Arbeitspunkt im vorliegenden Untersuchungsvorhaben. Für alle oben aufgeführten Zytostatika wurden unterschiedliche Methoden zur Festphasen- und/oder Flüssig/Flüssig-Extraktion getestet und optimiert. Als Nachweisverfahren für

die quantitative Bestimmung in Labor- und Realproben wurden HPLC-UV, HPLC mit Fluoreszenz-Detektion sowie GC-MS, GC-MS/MS und HRGC-HRMS eingesetzt. Die Validierung der Nachweisverfahren für die Analyse von Cyclophosphamid und Ifosfamid in wässrigen Realproben erfolgte durch die erfolgreiche Teilnahme am Ringversuch „Arzneimittel-Wirkstoffe in der aquatischen Umwelt“, der von der Bundesländer-Arbeitsgemeinschaft Chemikaliensicherheit (BLAC) durchgeführt wurde.

Um das Verhalten der ausgewählten Zytostatika in der Umwelt zu ermitteln, wurden u.a. Laboruntersuchungen zur Simulation des biologischen und abiotischen Abbaus von Zytostatika in einer Modellkläranlage unter Verwendung eines synthetischen Abwassers durchgeführt. Die betrachteten Zytostatika waren in diesem Fall Carmustin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Cytarabin, Etoposid, 5-Fluorouracil, Melphalan, Methotrexat und Vinblastin sowie die Metaboliten von Chlorambucil, Melphalan und Methotrexat.

Die Abbauprobungen zeigten, dass insbesondere bei den Zytostatika Carmustin, Chlorambucil, Melphalan und Vinblastin neben den biologischen Prozessen weitere Abbaumechanismen einen erheblichen Beitrag zur Eliminierung dieser Substanzen aus dem synthetischen Abwasser liefern. Der konzentrationsabhängige Abbau von 5-Fluorouracil wurde nachgewiesen, ebenso wie die Bildung des persistenten und zytostatisch aktiven Metaboliten 7-Hydroxy-Methotrexat während des biologischen Abbaus der Originalsubstanz. Chlorambucil, Cyclophosphamid, Cytarabin und Etoposid waren innerhalb eines Bewertungszeitraums von 21 Tagen nicht abbaubar.

Die Untersuchungen zum Abbauverhalten von Zytostatika in einer Modellkläranlage zeigten, dass es neben abbaubaren Zytostatika auch solche gibt, die kommunale Kläranlagen passieren und bis in die Vorfluter gelangen können.

Für die Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten an Klärschlamm wurden die Zytostatika Etoposid, 5-Fluorouracil und Methotrexat sowie der Metabolit 7-Hydroxy-Methotrexat ausgewählt. Die Versuche wurden im Labor durchgeführt unter Verwendung von gefriergetrockneten und mit Zytostatika-Lösungen dotiertem Klärschlamm aus einer kommunalen Kläranlage.

Es wurde keine Adsorption der Substanzen 5-Fluorouracil und Methotrexat an den Schlammteilchen nachgewiesen. Für den Metabolit 7-Hydroxy-Methotrexat ergab sich dagegen ein positiver Befund bei der Extraktion des dotierten Schlamms. Die

Adsorption an Schwebstoffen sowie die Kontamination von Böden durch ausgetragenen Klärschlamm erscheint damit möglich.

Neben dem Verhalten in wässrigen Matrices und im Klärschlamm wurde auch das Verhalten von Zytostatika in der Atmosphäre betrachtet. Ein wesentlicher Arbeitspunkt war hier die Bestimmung des Dampfdrucks der Zytostatika Carmustin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Etoposid und 5-Fluorouracil. Der Dampfdruck ist u.a. eine wichtige Größe, um das Verteilungsverhalten zwischen den Kompartimenten Wasser und Luft sowie zwischen der Partikel- und Gasphase innerhalb der Atmosphäre beurteilen zu können.

Auf den gemessenen Dampfdrücken basierende Berechnungen zeigten, dass pulverförmig vorliegende zytostatikahaltige Partikel von der Fest- in die Gasphase übergehen können. Die Zeitdauer dieses Vorgangs ist stark abhängig vom Partikeldurchmesser. Die rechnerische Abschätzung zeigt, dass z.B. ein 1 µm großes Partikel aus Cyclophosphamid bei einer Umgebungstemperatur von 20 °C in einer Zeit von 44 Sekunden verdampft, ein 10 µm großes Partikel benötigt dagegen die 100-fache Zeit. Reale Messungen der beim Umgang mit diesen Substanzen entstehenden Partikelgrößen sind bisher nicht bekannt.

Des Weiteren wurden Eintragspfade in Abwässer, Oberflächengewässer, Kläranlagen und die Atmosphäre ermittelt, die insbesondere auf den bestimmungsgemäßen Umgang mit Zytostatika zurückzuführen sind. Die Quantifizierung des Eintrags in die unterschiedlichen Umweltkompartimente erfolgte anhand einer eintragspfadorientierten Probenahmestrategie.

Ausgehend von Krankenhäusern und medizinischen Einrichtungen mit onkologischen Stationen wurden Einzelproben genommen von:

- Hauptsammlern der Krankenhausabwässer,
(Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid),
- Kläranlagenzuläufen,
(Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid),
- Kläranlagenabläufen,
(Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid),

- Vorflutern,
(Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid)
- Klärschlämmen,
(Bestimmung von Etoposid, Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat)
- Emissionen von Krankenhausapotheken,
(Bestimmung von Cyclophosphamid).

Mit Zytostatika belastete Realproben wurden sowohl in der Matrix Wasser als auch in der Matrix Luft gefunden. Die untersuchten Klärschlämme zeigten keine positiven Befunde.

Bei den detektierten Zytostatika handelte es sich um Cyclophosphamid und Ifosfamid. In der Matrix Wasser lagen die Konzentrationen der positiven Proben bei zwei von drei beprobten Hauptsammlern der Krankenhausabwässer im Bereich von ca. 30 ng/l bis 50 ng/l Cyclophosphamid und ca. 500 ng/l bis 2300 ng/l Ifosfamid. In einem Kläranlagenzulauf wurden ca. 50 ng/l bis 100 ng/l Cyclophosphamid und in je einem Ablauf und Vorfluter jeweils ca. 40 ng/l Ifosfamid detektiert. An jedem Messpunkt wurden insgesamt sechs Einzelproben genommen.

In der Matrix Luft betragen die Konzentrationen in den Emissionsproben 0,027 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ gasförmiges Cyclophosphamid. Innerhalb der Raumluft von Krankenhausapotheken mit Zytostatika-Zubereitung wurden Konzentrationen im Bereich von 0,006 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 0,223 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ partikuläres und von 0,017 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 3,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ gasförmiges Cyclophosphamid bestimmt.

Die Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosfamid wurden auf der Basis der ermittelten Konzentrationen in den Realproben sowie auf der Basis von ökotoxikologischen Daten über die Wirkung dieser Zytostatika auf aquatische Organismen einer Bewertung unterzogen. Dies war erforderlich, um das Gefährdungspotential der eingetragenen Substanzmengen auf die betrachteten aquatische Organismen beurteilen und ggf. die Notwendigkeit zur Entwicklung von Vermeidungsstrategien ableiten zu können.

Die ermittelten Werte des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{\text{OW}}$ waren für beide Substanzen kleiner als drei, so dass kein signifikantes Potenzial zur Bioakkumulation zu erwarten ist. Die Ergebnisse zur Abbaubarkeit der Substanzen zeigten, dass sie nicht biologisch abbaubar sind. Aufgrund der geringen Bakterientoxizität

dürfte damit die Funktionsfähigkeit biologischer Kläranlagen nicht behindert werden. Die Daten zur akuten Fisch- und Daphnientoxizität zeigten eine geringe akute Toxizität der beiden Zytostatika gegenüber Vertretern der aquatischen Biozönose. Auch bei Berücksichtigung von Unsicherheitsfaktoren lag zwischen den in Standardtests ermittelten Konzentrationen und den in realen Proben nachgewiesenen Konzentrationen eine hinreichende Spanne. Bei den Biotestverfahren handelte es sich jedoch nicht um substanzspezifische Tests, so dass relevante Endpunkte der entsprechenden Substanzen nicht erfasst wurden. Letztendlich sollte die Verminderung des Eintrags von Zytostatika in die Umwelt als der geeignete Ansatz erscheinen, um negative Auswirkungen auf aquatische Ökosysteme zu minimieren.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Zielsetzung des Untersuchungsvorhabens ist die Bestimmung des Verhaltens von Zytostatika in der Umwelt, insbesondere in Abwässern, Oberflächengewässern und Kläranlagen.

Zytostatika sind Humanpharmaka, die zur Chemotherapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden. Zytostatika hemmen die Vermehrung von Tumorzellen durch Eingriffe in Stoffwechselfvorgänge oder Störungen der Zellteilung. Ein großer Teil dieser Humanpharmaka haben jedoch selbst krebserzeugende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften. Da die Angriffspunkte in normalen Zellen und Tumorzellen die gleichen sind, werden von der Therapie auch gesunde, vor allem die wachstumsintensiven Zellen und Zellverbände geschädigt. Der Umgang mit diesen hochwirksamen Arzneimitteln erfordert daher mehr Umwelt- und Arbeitsschutzaspekte in allen Bereichen, d.h. von der Produktion in pharmazeutischen Betrieben bis zur Anwendung am Patienten. Derzeit ist nicht zu verhindern, dass Zytostatika auch bei bestimmungsgemäßen Umgang in die Umwelt gelangen, wie zum Beispiel während der Zubereitung von Applikationen innerhalb von Krankenhausapotheken und öffentlichen Apotheken sowie insbesondere durch die Ausscheidungen der mit Zytostatika behandelten Patienten. Da der Trend in der Onkologie derzeit in Richtung höherer Zytostatikadosen geht und gleichzeitig immer mehr Patienten diesen Arzneimitteln behandelt werden, kommt dem Problem der Umweltbelastung durch Zytostatika eine wachsende Bedeutung zu.

Prinzipiell existieren von der Produktion in pharmazeutischen Betrieben über die Herstellung applikationsfertiger Zytostatika-Zubereitungen in medizinischen Einrichtungen bis zur bestimmungsgemäßen Anwendung am Patienten unterschiedliche Freisetzungspotenziale von Zytostatika in die Umweltkompartimente Wasser, Boden und Luft. Aufgrund der überwiegend stationären Anwendung dieser Humanpharmaka und unter Berücksichtigung der bekannt geringen Metabolisierungsraten wird der

Eintrag in die Umwelt über Krankenhausabwässer als der dominierende Eintragspfad angesehen.

Einen Anhaltspunkt über die zu erwartenden Konzentrationen von Zytostatika im Abwasser von Krankenhäusern mit onkologischen Stationen liefern Schätzungen, z.B. im Rahmen eines Untersuchungsvorhabens des Umweltbundesamtes aus dem Jahr 1996. Unter Einbeziehung von zum Teil geschätzten Daten über Verbrauchsmengen, Metabolisierungsraten, Bettenzahl und Wasserverbrauch wurden Konzentrationen verschiedener Zytostatika im Abwasser von drei Krankenhäusern berechnet [UBA95-075]. Einen Auszug der Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

Zytostatikum	Geschätzte mittlere Konzentration (ng/l)		
	Universitätsklinikum	Kreiskrankenhaus	Klinik für Tumorbiologie
Carmustin	45,8		
Chlorambucil	0,022	0,036	
Cisplatin	58,8	24,9	
Cyclophosphamid	721	362	9040
Cytarabin	140	8,59	
Etoposid	482	340	
5-Fluorouracil	3960	4415	112800
Ifosfamid	1539	486	
Melphalan	8,39	3,32	
Methotrexat	414	46,4	800
Vinblastinsulfat	0,46	0,28	

Tab. 1: Geschätzte mittlere Konzentration ausgewählter Zytostatika im Abwasser von drei Krankenhäusern

Das Ziel des vorliegenden Untersuchungsvorhabens lag in der Bestimmung des Verhaltens von Zytostatika in Abwässern, Oberflächengewässern und Kläranlagen. Dar-

über hinaus sollten die möglichen Einträge in die Umweltkompartimente Luft und Boden betrachtet werden.

Um das Verhalten ausgewählter Zytostatika in der Umwelt zu bestimmen, wurden folgende Teilziele definiert:

- Bestimmung des Abbauverhaltens von Zytostatika und ausgewählten Metaboliten in einer Modellkläranlage
- Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten an Klärschlamm von Zytostatika und ausgewählten Metaboliten
- Bestimmung der Eintragswege in die Umweltkompartimente zwischen Produktion und Anwendung
- Quantifizierung der Belastungen von Realproben der Matrices Wasser, Klärschlamm und Luft
- Ökotoxikologische Bewertung der Ergebnisse bzgl. der Bedeutung für aquatische Organismen
- Gegebenenfalls Entwicklung von Vermeidungsstrategien zum Eintrag von Zytostatika in die Umwelt
- Weiterentwicklung der Spurenanalytik von Zytostatika in komplexen Matrices

In den folgenden Kapiteln wird auf die einzelnen Punkte im Detail eingegangen. Es wurden u.a. Laboruntersuchungen zur Simulation des Abbauverhaltens von Zytostatika, die in die Umwelt eingetragen wurden, in einer Modellkläranlage unter Verwendung eines synthetischen Abwassers durchgeführt. Mit einer entsprechenden Versuchsplanung und -durchführung wurde neben dem biologischen Abbau auch die gesamte Eliminierungsrate aufgrund weiterer Abbaumechanismen bestimmt.

Für die Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten an Klärschlamm wurden die Zytostatika Etoposid, 5-Fluorouracil und Methotrexat ausgewählt. Die Versuche erfolgten im Labor unter Verwendung von gefriergetrocknetem und mit Zytostatikalösungen dotiertem Klärschlamm aus einer kommunalen Kläranlage.

Zusätzlich zum Eintrag und Verbleib von Zytostatika in wässrigen Matrices und im Klärschlamm wurde der mögliche Eintrag in die Atmosphäre untersucht. Ein wesent-

licher Arbeitspunkt war hier die Bestimmung des Dampfdrucks einzelner Zytostatika. Der Dampfdruck ist eine wichtige Größe, um das Verteilungsverhalten in den Kompartimenten beurteilen zu können.

Es wurden die Eintragspfade ins Abwasser, Oberflächenwasser, in Kläranlagen und in die Atmosphäre ermittelt, die trotz bestimmungsgemäßen Umgangs mit Zytostatika bestehen. Die Quantifizierung des Eintrags von Zytostatika in die unterschiedlichen Umweltkompartimente erfolgte anhand einer eintragspfadorientierten Probenahmestrategie. Ausgehend von Krankenhäusern und medizinischen Einrichtungen mit onkologischen Stationen wurden Einzelproben genommen von:

- Hauptsammlern der Krankenhausabwässer,
- Kläranlagenzuläufen,
- Kläranlagenabläufen,
- Vorflutern,
- Klärschlämmen,
- Emissionen von Krankenhausapotheken.

Die ermittelten Ergebnisse wurden einer Bewertung auf der Basis von ökotoxikologischen Daten über die Wirkung von Zytostatika auf aquatische Organismen unterzogen. Diese Bewertungen waren erforderlich, um das Gefährdungspotenzial der eingetragenen Substanzmengen auf die betrachteten aquatische Organismen beurteilen und um ggf. die Notwendigkeit zur Entwicklung von Vermeidungsstrategien ableiten zu können.

Der substanzspezifische quantitative Nachweis von Zytostatika insbesondere in Realproben erforderte entsprechend leistungsfähige Anreicherungs- und Bestimmungsverfahren. Die Entwicklung dieser Verfahren war ein wesentlicher und zeitaufwendiger Arbeitspunkt im vorliegenden Untersuchungsvorhaben. Die Entwicklungsphasen und Ergebnisse zur analytischen Bestimmung von Zytostatika in unterschiedlichen Matrices sind im Anhang dieses Berichts ausführlich beschrieben. Der Hauptteil des Berichts beschränkt sich deshalb auf die Darstellung des Verhaltens von Zytostatika in der Umwelt, wodurch die Übersichtlichkeit über die verschiedenen Untersuchungsergebnisse und Zusammenhänge verbessert wird.

3 Ausgangssituation

3.1 Verbrauchsmengen und Eigenschaften von Zytostatika

3.1.1 In der Bundesrepublik eingesetzte Zytostatika

In der Roten Liste® 1998 sind 98 % der in Deutschland erhältlichen Fertigarzneimittel mit ihren Zusammensetzungen, Anwendungsgebieten, Dosierungen und Nebenwirkungen laut Herstellerangaben aufgeführt [RL98]. Darunter befinden sich 71 als Zytostatika und Metastasehemmer eingesetzte Substanzen. Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens sind 63 chemisch definierte Einzelsubstanzen, ohne Mistelauszüge, enzym- und organhaltige Präparate und Homöopathika von Bedeutung. Die chemisch definierten Zytostatika werden in der Roten Liste®, wie in Tabelle 2 dargestellt, in acht verschiedene Gruppe eingeteilt.

In weiteren Literaturstellen finden sich teilweise abweichende Einteilungen und Zuordnungen. Insbesondere werden die Platinverbindungen häufig den Alkylantien oder den sonstigen Zytostatika zugerechnet [Mun94, Lov94, FHR96, KL91, CM94]. Die Vincaalkaloide (Vinblastin, Vinchristin, Vindesin und Vinorelbin) werden aufgrund ihres Wirkungsmechanismus von einigen Autoren zusammen mit den Epidophyllotoxinen (Etoposid und Teniposid) in der Gruppe der Mitosespindelgifte zusammengefasst [Mun94, ADKA94, CL96].

Die Rote Liste® erfasst nach eigenen Angaben 98 % der in der Bundesrepublik erhältlichen Fertigarzneimittel. Eine Reihe weiterer zytostatisch wirksamer, hier nicht erfasster Substanzen befindet sich teilweise noch in den klinischen Testphasen bzw. im Zulassungsverfahren. Andere Substanzen sind zwar (noch) zugelassen, werden aber in der Bundesrepublik nicht mehr vertrieben.

Substanzgruppe	Zytostatika (Wirkstoffe)
Alkylantien	Bendamustin, Busulfan, Carmustin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Lomustin, Melphalan, Nimustin, Prednison, Thiotepa, Treosulfan, Trofosfamid
Antimetaboliten	Cladribin, Cytarabin, Fludarabin, Fluorouracil, Gemcitabin, Mercaptopurin, Methotrexat, Tioguanin
Alkaloide	Vinblastin, Vinchristin, Vindesin, Vinorelbin
Antibiotika	Aclarubicin, Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Farmorubicin, Idarubicin, Mitomycin
Platin-Verbindungen	Carboplatin, Cisplatin
Hormone	Aminoglutethimid, Buserelin, Ethinylestradiol, Flutamid, Formestan, Fosfestrol, Goserelin, Leuprorelin, Medroxyprogesteron, Tamoxifen, Triptorelin
Interferone	Interferon alpha-2a, Interferon alpha-2b
Sonstige	Amsacrin, Dacarbazin, Docetaxel, Estramustin, Etoposid, Hydroxycarbamid, Miltefosin, Mitoxantron, Paclitaxel, Pentostatin, Porfimer, Procarbazin, Teniposid, Topotecan, Tretinoin

Tab. 2: Einteilung chemisch definierter Zytostatika [RL98]

3.1.2 Verbrauchsmengen von Zytostatika

Eine der wenigen öffentlich zugänglichen Quellen für Verbrauchsdaten von Humanpharmaka in Deutschland ist der jährlich erscheinende Arzneiverordnungs-Report [Sch97]. Die im Arzneiverordnungs-Report 1997 veröffentlichten Daten stützen sich auf eine ca. 4 Millionen Verordnungen umfassende Stichprobe, die im Vorjahr (1996) durchgeführt wurde. Sie nennt die Umsatzdaten der 2000 am häufigsten verordneten Fertigarzneimittel, auf die ca. 90 % aller Verordnungen entfallen. Die Gruppe der Zytostatika gehört nicht zu den 20 verordnungstärksten Indikationsgruppen, sondern zählt zu den umsatzstarken Spezialpräparaten mit kleinen Verordnungsvolumina (0,2 % aller Verordnungen). Die statistischen Daten beziehen sich dabei nicht auf den Wirkstoff, sondern auf die Handelspräparate. Da die häufig ver-

wendeten zytostatischen Substanzen von bis zu 14 verschiedenen Herstellern unter eigenen Handelsnamen sowie in verschiedenen Darreichungsformen und Packungsgrößen vertrieben werden, wird der Gesamtverbrauch einer bestimmten Grundsubstanz statistisch nicht erfasst.

In dem Segment der 2000 am häufigsten verordneten Arzneimittel finden sich auch Zytostatika-Präparate. In Tabelle 3 sind die Verbrauchs- und Umsatzdaten dieser Substanzen sowie die Veränderungen zum Vorjahr wiedergegeben.

Rang	Präparat	Handelsname	Verordnungen 1996 [Tsd]	Veränderung [%]	Umsatz 1996 [Mio DM]	Veränderung [%]
371	Mistelauszug	Iscador	559,2	-11,7	32,5	+3,9
1165	Mistelauszug	Helixor	182,9	-5,9	10,7	+2,2
1913	Methotrexat	Methotrexat Medac	86,7	+24,0	10,6	+29,6
1987	Methotrexat	Methotrexat Lederle	81,0	-12,4	8,7	+34,4
Summe:			909,9	-8,1	62,5	+10,8
Anteil an der Indikationsgruppe:			51,1 %	----	15,2 %	---
Gesamte Indikationsgruppe:			1782	+11,7	411	+102,6

Tab. 3: Verordnungen und Umsätze von Zytostatika 1996 [Sch97]

Die Mistelpräparate werden trotz Zweifeln an der Wirksamkeit weiterhin sehr häufig verordnet [GAK96]. Methotrexat wird außer als Zytostatikum zunehmend auch als Immunsuppressivum bei der Behandlung der rheumatischen Arthritis eingesetzt [RL98, CM94].

Erst in den letzten Jahren zugelassen wurden die Substanzen Paclitaxel und Mitomycin. Sie wurden 1996 im gesamten Bundesgebiet 29.500 bzw. 21.600 mal verordnet; der Umsatz betrug dabei 32,8 bzw. 19,9 Mio. DM.

In der gesamten Indikationsgruppe der Zytostatika sind die Verordnungszahlen zwischen 1995 und 1996 (wie auch in den Vorjahren) deutlich angestiegen. Die Steigerung betrug 1996 gegenüber dem Vorjahr 12 %, (1994 18 % [SP95]). Das sind die mit Abstand größten Verbrauchssteigerung aller Indikationsgruppen. Der Umsatz hat sich dabei 1996 sogar verdoppelt [GAK96].

Die Zunahme bei den Verschreibungen von Zytostatika ist einerseits eine Folge der - hauptsächlich aufgrund der steigenden Lebenserwartung - allgemeinen Zunahme der Tumorerkrankungen [HW94, Dho91]. Andererseits hält in der Onkologie der Trend zur hochdosierten Chemotherapie mit anschließender Knochenmarkstransplantation an [Mun94, CL96, Lov94, SHP97].

Aus den Daten über die Verordnungszahlen lassen sich jedoch keine genauen Verbrauchsmengen errechnen, da nicht zwischen den einzelnen Präparaten und Darreichungsformen mit teilweise sehr verschiedenen Wirkstoffmengen unterschieden wird.

Die Gesamtjahresproduktion aller Zytostatika in der Bundesrepublik wird auf ca. 5 t geschätzt [UBA96-060]. Zahlen über die in Deutschland im einzelnen verbrauchten Mengen an Zytostatika sind jedoch nur schwer zu erhalten. Zur Verfügung stehen z.B. Daten aus einer 1992 durchgeführten Befragung von 19 Krankenhausapotheken, welche die Daten der in 1991 verkauften Zytostatika bereitstellten [Lüd95]. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 4 dargestellt.

Klinik	Verbrauchsmengen [g/Jahr]							
	Cis-platin	Cyclo-phos.	Cytara-bin	Etopo-sid	Estra-mustin	5-Fluoro-uracil	Ifosfa-mid	Metho-trexat
1	3,4	----	----	---	----	2070	----	433
2	31,2	962	----	2620	2464	77	----	8,8
3	6	40	----	----	540	125	50	5,8
4	32,8	319,5	111	----		437	250	50,7
5	3,7	205	----	----	27	337,5	280	30
6	13,9	361	24	----	----	175	120	21,6
7	267	356,4	----	70,8	----	493,5	170	55,4
8	223,2	536,6	117,2	----	680	360	----	534,4
9	400,2	3200	1800	662,2	----	891,5	6500	762
10	2,7	325,5	792,8	36,1	----	1,3	26,4	47,3
11	45,7	366,9	706,4	91,5	----	224	306,5	108,2
12	43,4	481,4	----	577,5	----	341	5770	20
13	109	1112	472	7	----	2140	940	150
14	16,3	139,7	----	13,6	----	599,5	6	11,1
15	5,9	444	10,5	60		640	550,8	3,5
16	49	251,4	226,4	38	481,6	217,5	331,5	32,5
17	1	67,7	18,8	4,5	----	42,5	----	0,4
18	73,7	1048	491,1	157	----	1700	2093	147,5
19	124,9	1007	1486	297,5	173,5	686	1515	547,5
Summe	1453	11224,1	6256,2	4635,7	4366,1	11558,3	18909	2969,7

Tab. 4: Zytostatika-Verbrauchsdaten in von 19 Krankenhäusern im Jahr 1991 [Lüd95].

Die Daten zeigen die großen Unterschiede in den Verbrauchsmengen bei verschiedenen Krankenhäusern. Nur acht Substanzen werden in Mengen von mehr als 100 g/Jahr in mindestens einem der Krankenhäuser eingesetzt. Von diesen Wirkstoffen gehören zwei in die Gruppe der Alkylantien (Cyclophosphamid und Ifosfamid). Aber auch die Substanzen Cisplatin, Estramustin und Etoposid haben alkylierende Wirkungen. Aus der Literatur ist bekannt das Cisplatin DNA-Brüche und Vernetzungen bewirkt [Mun94, KL91, BHD97, Gre92, WLL96, OKB96]. Estramustin ist eine von dem Hormon Estradiol abgeleitete Substanz. Die Modifikationen am Molekül versetzen die Substanz in die Lage, ebenfalls alkylierend zu wirken [Mun94, Fis93, Dor94]. Estramustin ist das wichtigste Medikament bei der Therapie von Prostatakarzinomen, und wird dementsprechend in urologischen Abteilungen in großen Mengen eingesetzt. Etoposid ist schließlich ein erst vor wenigen Jahren eingeführtes Pflanzenalkaloid, welches in geringer Konzentration als Topoisomerasell-Inhibitor wirkt, in höheren (therapeutischen) Dosen jedoch vorwiegend alkylierende Eigenschaften aufweist [Mun94, KL91, Dor94, Vep95, Rem98]. Die Ergebnisse der Umfrage entsprechen den Angaben in medizinischen und pharmazeutischen Lehrbüchern über Anwendungsbreite und Dosierung von Zytostatika. Die genannten acht Substanzen sind Bestandteil der meisten Kombinationstherapien und werden, verglichen mit z.B. den antibiotisch wirkenden Zytostatika oder Hormonen in verhältnismäßig großen Mengen pro Tag und Patient verwendet [Iss97, Cal93, Dev93, Ske91, Haa96, Bra96, SB96, Mug91, Gro94, Har98, Hic93, Tan92, RP94, PG94, BH95, Ste94].

In der Regel wird heute die sogenannte Kombinationschemotherapie durchgeführt, wobei zwei bis vier Zytostatika aus verschiedenen Wirkgruppen gleichzeitig verabreicht werden. Nach einem behandlungsfreien Intervall wird die Therapie mit einer Zytostatikagruppe anderer Zusammensetzung fortgeführt [SHP97, Dor94, Cal93, Ske91, Hei96]. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Vertreter der einzelnen Zytostatikagruppen in verschiedenen Stadien des Zellwachstums eingreifen und auf diese Art und Weise einen größeren Anteil von Tumorzellen zerstören, als bei der Monotherapie. Häufig eingesetzte Zytostatika-Kombinationen und ihre Indikationen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Therapie- schema	Zytostatika-Kombination	Haupt- anwendungs- gebiet
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid	Ovarial-Karzinom
AC	Doxorubicin, Cyclophosphamid	Ovarial-Karzinom
PE	Cisplatin, Etoposid	Bronchial-Karzi- nom
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil	Mamma-Karzinom
MMM	Mitomycin, Methotrexat, Mitoxantron	Mamma-Karzinom
ACE	Adriamycin, Cyclophosphamid, Etoposid	Bronchial-Karzi- nom
ACO	Cisplatin, Vinchristin, Etoposid	Darmkrebs
PEB	Cisplatin, Etoposid, Bleomycin	Hodentumore
PEI	Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid	Weichteilsarkome
PIV	Cisplatin, Etoposid, Vinblastin	Darmkrebs
FAM	Fluorouracil, Adriamycin, Mitomycin	Darmkrebs
CEP	Semustin, Etoposid, Prednison	Magenkrebs
COP	Cyclophosphamid, Vinchristin, Adriamycin	Leukämien
MAV	Mitoxantron, Cytarabin, Etoposid	Leukämien
COPP	Cyclophosphamid, Vinchristin, Procarbacin, Predni- son	Hodkin-Krankheit
ABVD	Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin	Blasen-Karzinom
ADOC	Adriamycin, Cisplatin, Etoposid, Vinchristin	Magenkrebs
COMP	Cyclophosphamid, Adriamycin, Methotrexat, Predni- son	maligne Lympho- me
EVAP	Etoposid, Cytarabin, Cisplatin, Prednison	maligne Lympho- me
COAP	Cyclophosphamid, Vinchristin,	Blasenkarzinom

Tab. 5: Häufig verwendete Therapieschemata in der Chemotherapie [SHP97, Hei96].

3.2 Toxizität von Zytostatika

Die unmittelbar auftretenden dosislimitierenden toxischen Nebenwirkungen von Zytostatika sind seit Jahrzehnten bekannt und in den einschlägigen Lehrbüchern der Medizin, Pharmakologie und Toxikologie ausführlich beschrieben [RL98, Mun94, ADKA94, CL96, FHR96, KL91, Str91, Küt96, Mut96, MS94].

Sofort auftretende Nebenwirkungen (Sekunden bis Stunden):

Hypotension, Schock, Fieber, Exanthem, Spasmus, Paravasatnekrose, Phlebitis, Uratnephropathie, Tumorlyse-Syndrom, Nausea, Erbrechen, Krampfanfälle.

Früh auftretende Nebenwirkungen (Tage bis Wochen):

Leukopenie, Thrombopenie, Hämolytische Anämie, Blutungsanämie, Stomatitis, Muskositis, Diarrhö, Paralytischer Ileus, Hämorrhagische Zystitis, Hyperkalzämie, Hypophosphatämie, Ototoxizität, Haarausfall, Pneumonitis, Enzephalopathie.

Spät auftretende Nebenwirkungen (Monate):

Anämie, Kardiopathie, Periphere Polyneuropathie, Leukoenzephalopathie, Gonodale Unterfunktion, Pneumopathie, Hepatopathie, Raynaud-Syndrom, Hämolytisch urämisches Syndrom, Haut- und Nagelveränderungen.

Langzeitschäden (Jahre):

Sterilität, Vorzeitige Menopause, Sekundärleukämien, Zweitneoplasien, Osteoporose, Wachstumsstörungen, Psychosoziale Störungen.

Das aus dem unspezifischen Wirkmechanismus der Zytostatika resultierende mutagene und kanzerogene Potenzial dieser Substanzen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [Mun94, ADKA94, CL96, FHR96, HW94, BHD97, Gre92, OKB96, Fis93, Ske91, Str91, Küt96, Mut96, MS94, HHG95, SH80, SK86, BS95, YLE95, FHJ95, RNJ94, AT95, SS96, GWC96, OKB96, JSW96, SFD96, FP96, HK95, SG83, FD95]. Dabei muss beachtet werden, dass die Wirkung von Zytostatika vielfach auf den menschlichen Stoffwechsel abgestimmt ist, und sich durch Mutagenität-Tests an Bakterienstämmen nur bedingt simulieren lässt [FD95, WR96, RH96]. Die kanzerogene Wirkung beim Menschen folgt aus dem Auftreten sogenannter Sekundärtumo-

ren bei Chemotherapiepatienten [RL98, Mun94, ADKA94, CL96, Loc94, Ske91, Str91, MS94, SH80, SK86, BS95]. Als Sekundärtumoren bezeichnet man dabei zusätzliche, von der Ersterkrankung unabhängige Krebserkrankungen, bei denen es sich in der Mehrzahl um Leukämien handelt. Bislang existieren vorwiegend Einzelberichte [GSS96, TKW84, BLD83, Hen83, GPG82, CD82, BBP80, BAB82, BLS82, BHL84, CKC82, FFE97, YLE95, BSP94, JME93, BS93, MMJ93, BHH97] und nur wenige systematische Langzeitstudien mit größeren Patientenzahlen [LSB93, KDS86, MHM96, BS95]. Das Risiko eines Chemotherapiepatienten, an einem Sekundärtumor zu erkranken, wird im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit 2 % bis 10 % angegeben.

Von der International Agency for Research on Cancer (IARC) wurden bislang 26 Zytostatika untersucht und wie folgt eingestuft:

Group 1: Carcinogenic to humans

Chlorambucil	[305-03-3]	IARC26
Cyclophosphamide	[50-18-0] [6055-19-2]	IARC26
Semustine	[13909-09-6]	IARCS7
Melphalan	[148-82-3]	IARC9, IARCS7
Myleran	[55-98-1]	IARCS7
Tamoxifen	[10540-29-1]	IARC66
Thiotepa	[52-24-4]	IARC50
Treosulfan	[299-75-2]	IARC26, IARCS7
MOPP and other combined chemotherapy including alkylating agents		IARCS7
Etoposide in combination with cisplatin and bleomycin	[33419-42-0]	IAR79

Group 2A: Probably carcinogenic to humans

Adriamycin	[23214-92-8]	IARC10, IARCS7
BCNU (Carmustin)	[154-93-8]	IARC26, IARCS7
CCNU (Lomustin)	[13010-47-4]	IARC26, IARCS7
Cisplatin	[15663-27-1]	IARC26, IARCS7
Procarbazine Hydrochloride	[366-70-1]	IARC26, IARCS7
Etoposide	[33419-42-0]	IARC76

Teniposide	[29767-20-2]	IARC76
------------	--------------	--------

Group 2B: Possibly carcinogenic to humans

Amsacrin	[54301-15-4]	IARC76
Bleomycin	[11056-06-7]	IARC26, IARCS7
Dacarbazine	[4342-03-4]	IARC26, IARCS7
Daunomycin	[20830-81-3]	IARC10, IARCS7
Mitomycin C	[50-07-7]	IARC10, IARCS7
Mitoxantron		IARC76

Group 3: Unclassifiable as to carcinogenicity to humans

Actinomycin D	[50-76-0]	IARC10, IARCS7
5-Fluorouracil	[51-21-8]	IARC26, IARCS7
Hydroxyurea		IARC76
Isophosphamide	[3778-73-2]	IARC26, IARCS7
6-Mercaptopurine	[50-44-2]	IARC26, IARCS7
Methotrexate	[59-05-2]	IARC26, IARCS7
Prednimustine	[29069-24-7]	IARC50
Prednisone	[53-03-2]	IARC26, IARCS7
Vinblastine sulfate	[143-67-9]	IARC26, IARCS7
Vincristine sulfate	[2068-78-2]	IARC26, IARCS7

Kein Zytostatikum wurde in die Gruppe 4 - The agent (mixture) is probably not carcinogenic to humans - eingestuft.

3.3 Umweltrelevanz von Zytostatika

Das von Zytostatika ausgehende Gefährdungspotenzial für die Umwelt und damit indirekt auch für den Menschen wird erst seit relativ kurzer Zeit intensiver untersucht [UBA96-060, UBA95-075]. Häufiger sind Untersuchungen mit arbeitsmedizinischen Fragestellungen von Personen, die beruflich während Produktion, Zubereitung und Applikation mit diesen Substanzen Kontakt haben [SRP93, Mac94, FHJ95, SCR94, NVS94, RNJ94, SA96, PSH88, SVH97, SPS88, SVA94, NVS94, ESP94, SPF96,

SFA94, EHP97, SCR94, DMD95, DLD93, SWA97, SP90, SVH97, STA94]. Diese Untersuchungen umfassten u.a. die Bestimmung der Zytostatika Cyclophosphamid, Ifosfamid, 5-Fluorouracil und Methotrexat im Blut und Urin der Betroffenen. Bis auf wenige Ausnahmen waren die Befunde positiv. Die genannten Untersuchungen geben keinen Aufschluss darüber, in welcher Form, d.h. fest, flüssig oder gasförmig und über welche Route, z.B. oral, durch Inhalation oder dermal die genannten Stoffe in den Körper gelangten. In jedem Fall muss aber davon ausgegangen werden, dass bei einer nachgewiesenen Kontamination von Beschäftigten auch ein Eintrag der entsprechenden Substanzen in die Umwelt erfolgt war.

3.3.1 Belastung des Wassers

Das originäre Anwendungsgebiet von Zytostatika liegt im Bereich von Krankenhäusern und Universitätskliniken. Die Applikation, in der Regel durch Infusionen oder Injektionen, erfolgt in Deutschland überwiegend stationär in den Kliniken. Zytostatika gelangen somit durch Ausscheidungen der Patienten in größerem Umfang ins Klinikabwasser. Dies gilt auch für die zugehörigen Metaboliten, die vielfach ebenfalls zytostatisch aktiv sind und in einigen Fällen die eigentlich therapeutisch wirksame Spezies darstellen [CL96, FHR96, Fis93, Str91, Mut96]. Die Gruppe der Zytostatika stellt dabei einen Teilaspekt der insgesamt durch den Eintrag von Pharmaka in die aquatische Umwelt entstehenden Problematik dar [UBA96-060, UBA95-075, HBB85, Lee98, Her95, AB89, GBE96, GB95, Das94, HHL95]. Insbesondere wird vermutet, dass einige Zytostatika zu der in verschiedenen Studien nachgewiesenen Mutagenität von Krankenhausabwässern beitragen [GKW96, AHN90]. Im Unterschied zu anderen umweltrelevanten Arzneimittelgruppen, wie z.B. Hormone, Analgetika oder Antirheumatika, sind die absoluten Verbrauchsmengen bei Zytostatika zwar deutlich geringer, jedoch weisen Zytostatika eine sehr viel größere Toxizität auf [RL98]. Erstmals konnte 1985 in England im Rahmen einer Untersuchung über das Vorkommen von Pharmaka in der aquatischen Umwelt Methotrexat mittels Immunoassay im Abwasser einer großen onkologischen Klinik nachgewiesen werden [MBB85]. Ebenfalls in England wurde 1990 das zytostatisch eingesetzte Antibiotikum Bleomycin im Kläranlagenabfluss, im Fluss- sowie im Trinkwasser nachgewiesen [AHN90]. Die Alkylantien Cyclophosphamid und Ifosfamid wurden 1996 in verschiedenen Teilströmen

einer Freiburger Klinik detektiert [SKH97]. Auch im Zu- und Ablauf der an diese Klinik angeschlossenen kommunalen Kläranlage wurden beide Substanzen gefunden. Ein biologischer Abbau fand nicht statt. In Tabelle 6 sind Untersuchungen zum Vorkommen von Zytostatika in Oberflächengewässern zusammengestellt.

Wenig ist bekannt über die Verteilung und Stabilität von Zytostatika in Abwasser, Schlamm und Boden sowie die aerobe und anaerobe Abbaubarkeit in Kläranlagen und die Wirkung auf aquatische Organismen. Einzelne Zytostatika wurden in Laborexperimenten auf ihre biologische Abbaubarkeit hin untersucht. Dabei erwiesen sich die Substanzen Cyclophosphamid und Ifosfamid, Cisplatin und Mitomycin im Sinne der jeweils verwendeten Testmethode als nicht abbaubar. Cytarabin ist demnach wenig, Fluorouracil und Methotrexat vollständig abbaubar. Im Fall von Methotrexat erfolgt ein Primärabbau durch Umwandlung in den ebenfalls zytostatischaktiven Metabolit 7-Hydroxy-Methotrexat. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über veröffentlichte Abbauprobversuche.

Zytostatikum	Jahr	Probenahmeort	Konzentration	Zitat
Methotrexat	1985	Abfluss einer onkologischen Klinik	1 µg/l	[MBB85]
Bleomycin	1990	Kläranlagenabfluss Flusswasser Trinkwasser	11-19 ng/ml 5-17 ng/ml 5-13 ng/ml	[AHN90]
Cyclophosphamid	1996	Kläranlagenzu- und ablauf Klinikabwasser	bis 60 ng/l 4,5 µg/l	[SKH97]
Ifosfamid	1996	Kläranlagezu- und ablauf Klinikabwasser	bis 60 ng/l 1,9 µg/l	[SKH97]

Tab. 6: Literaturdaten zum Nachweis von Zytostatika in aquatischen Umweltkompartimenten

Zytostatikum	Jahr	Testverfahren	Abbaurrate	Zitat
Cyclophosphamid Ifosfamide	1996	closed bottle test (OECD 301 D)	0 % 0 %	[KSB96]
Cisplatin Cyclophosphamid Cytarabin Fluorouracil Methotrexat	1998	OECD Screening Test OECD Screening Test	0 % 0 % 60 % 100 % 98 %	[KGJ98]

Tab. 7: Literaturdaten zum Abbauverhalten von Zytostatika

3.3.2 Belastung des Bodens

Durch Ausbringen kontaminierter Klärschlämme, über den Wasserpfad oder aus Deponien kann eine Belastung von Böden durch Zytostatika erfolgen. Bislang sind keine Daten zur Bodenbelastung bzw. zum Verhalten von Zytostatika in Böden bekannt.

3.3.3 Belastung der Luft

In der Literatur wird bisher über Emissionen von Zytostatika in die Atmosphäre aus pharmazeutischen Produktionsbetrieben oder Fortluftanlagen von zentralen Krankenhausapotheken nicht berichtet, weder über Messergebnisse noch über Schätzungen.

Einige Untersuchungen befassen sich mit Arbeitsplatzmessungen zur Bestimmung der Massenkonzentration von partikelgebundenen Zytostatika in der Raumluft [WWC83, DEF86, SBS92, SAB92, SRP93, STA94, SKA94, SFA94]. Es werden Luft- und Wischproben, der Urin des Personals und die Schutzfunktion der Handschuhe

untersucht. Die Probenahmen erfolgten in den zentralen Apotheken und auf den Stationen von Krankenhäusern sowie in pharmazeutischen Produktionsbetrieben.

Für Luftproben wurden für partikelförmig vorliegende Zytostatika folgende Bestimmungsgrenzen angegeben, die aufgrund der unterschiedlichen Probenahmetechniken und Analysenschritte stark voneinander abweichen: Cyclophosphamid 3 – 30 ng/m³, Fluorouracil 0,065 – 2200 ng/m³, Methotrexat 70 - 5400 ng/m³.

Für die Bereiche der Krankenhausapotheken und onkologischen Stationen wurden z.B. folgende Konzentrationen von Zytostatika in der Raumluft ermittelt:

- Cyclophosphamid: 3 ng/m³ – 2 µg/m³
- Methotrexat: 300 ng/m³

Die Konzentrationen innerhalb von pharmazeutischen Produktionsbetrieben waren bis zu drei Zehnerpotenzen größer.

- 5-Fluorouracil: 75 µg/m³
- Methotrexat: 0,8 – 182 µg/m³

Bei diesen Untersuchungen wurden über Probenahmefilter ausschließlich partikelförmig vorliegende Zytostatika in der Raumluft gesammelt und anschließend analysiert. Daten über gasförmig vorliegende Zytostatika lagen bisher nicht vor.

3.4 Analytik von Zytostatika

3.4.1 Bestimmung in Körperflüssigkeiten

Während der Chemotherapie ist die regelmäßige Bestimmung der vom Patienten aufgenommenen Zytostatikamenge seit den sechziger Jahren üblich [Her97, EE85, ME87, Men96, EE97, Sil85]. Dieses sogenannte Patientenmonitoring ist besonders wichtig, da für einen optimalen Behandlungserfolg die Wirkstoffkonzentration möglichst dicht an der oberen Konzentrationsgrenze liegen sollte, die von der Toxizität der jeweiligen Verbindung vorgegeben wird [CL96, SHP97, Dor94, Cal93, Ske91, Hei96].

Der jeweils im Körper verfügbare Anteil der insgesamt aufgenommenen Substanzmenge hängt jedoch von einer Vielzahl von Faktoren ab (u.a. Gesundheitszustand, Alter, Geschlecht des Erkrankten) und variiert von Patient zu Patient stark [Ske91, Haa96, Bra96]. Die Bestimmung von Zytostatika in Körperflüssigkeiten und Gewebeproben zur Anpassung der verabreichten Dosen und Begrenzung der toxischen Nebenwirkungen wird daher routinemäßig durchgeführt [CL96, Fis93, Har98, Hic93]. Auch dienen diese Verfahren zur Untersuchung des pharmakokinetischen Verhaltens und des Metabolismus der Substanzen. Demzufolge gibt es eine große und stetig wachsende Zahl in der Literatur veröffentlichter Verfahren für die Bestimmung zytostatischer Wirkstoffe aus physiologischen Matrices. Allerdings existieren keine einheitlichen Vorschriften und die meisten in der Literatur vorgestellten Verfahren sind nicht oder nur unzureichend validiert. Ein Überblick der bis 1989 veröffentlichten chromatographischen Bestimmungsverfahren gibt [Tja90].

In neuerer Zeit werden mit diesen analytischen Verfahren auch Untersuchungen bei beruflich exponierten Personen (Klinik- und Apothekenpersonal) im Rahmen des Arbeitsschutzes durchgeführt [FHJ95, RNJ94, SA96, PSH88, SVH97, SPS88, SVA94, NVS94, ESP94, SPF96, SFA94, DLD93, SWA97, SP90, SVH97]. Da die hierbei nachzuweisenden Konzentrationen jedoch im allgemeinen niedriger sind als die bei Chemotherapiepatienten, eignen sich dafür nur nachweisstarke Bestimmungsmethoden.

Bei den heute eingesetzten Bestimmungsmethoden handelt es sich überwiegend um chromatographische Methoden (einschließlich Elektrophorese). Immunoassays sind im allgemein weniger nachweisstark [EE85, ME87, Her97, PC90, Sil85]. Die Probenvorbereitung dient bei biologischen Proben hauptsächlich der Aufreinigung, d.h. der Abtrennung störender Matrixbestandteile. Insbesondere müssen Proteine denaturiert und Makromoleküle vor der eigentlichen Analyse entfernt werden. Die Denaturierung erfolgt in den meisten Verfahren chemisch durch den Zusatz von Säuren oder Basen bzw. organischer Lösungsmittel [Sil85, Rad94, KI94, BL93, OBL96, Bla91]. Die Analyten werden im allgemeinen durch Flüssig/flüssig-Extraktion abgetrennt [AH81, KI94, OBL96, Bla91, VTH88, APB95]. In der neueren Literatur ist die Probenvorbereitung zunehmend mittels Festphasen-Extraktion beschrieben [OMA94, IARC26, SKS96, VTH88, APB95, HCM94, KI94, LW92, CCG95].

3.4.2 Bestimmung in Umweltproben

Der großen Anzahl von Bestimmungsverfahren im Rahmen des Patientenmonitoring steht nur eine verhältnismäßig geringe Zahl in der Literatur veröffentlichter Methoden für den Nachweis und die Quantifizierung von Zytostatika in der Umwelt gegenüber. Die geringen zu erwartenden Substanzkonzentrationen sind auch hier nur durch nachweisstarke Bestimmungsverfahren in Verbindung mit effektiven Spurenanreicherungsverfahren erfassbar. Alle beschriebenen Bestimmungen erfolgten aus wässrigen Proben (Oberflächenwasser, Kläranlagenzu- und -ablauf) [HBB85, AHN90, SKH97, KSB96, KGJ98]. Mit einer 1998 veröffentlichten Anreicherungs- und Bestimmungsmethode konnten insgesamt zehn Zytostatika aus Oberflächenwasser bestimmt werden [KGJ98]. Diese Arbeit war der Ausgangspunkt für die weiteren Entwicklungen im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsvorhabens.

4 Verhalten von Zytostatika in der Umwelt

Das Verhalten von Zytostatika in den Kompartimenten Wasser, Boden und Luft wird in den folgenden Kapiteln näher untersucht. Dabei werden zunächst die physikalisch-chemischen Eigenschaften der im vorliegenden Untersuchungsvorhaben betrachteten Zytostatika zusammengestellt. Aus den Daten lassen sich bereits wichtige Aussagen ableiten über das Verhalten dieser Substanzen in der Umwelt.

Der Schwerpunkt des vorliegenden Untersuchungsvorhabens liegt bei der Betrachtung des Umweltkompartiments Wasser und des Verhaltens ausgewählter Zytostatika in diesem Medium. In Kapitel 4.2 wird daher der biologische und abiotische Abbau von Zytostatika innerhalb einer Modellkläranlage beschrieben. Insbesondere Zytostatika, die kommunale Kläranlagen unverändert und ohne signifikanten Abbau passieren, können von aquatischen Organismen aufgenommen werden. Ein weiterer Eintrag in die Umwelt kann über Adsorption von Zytostatika an Klärschlamm erfolgen. Die entsprechenden Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von zwei ausgewählten Zytostatika und eines Metaboliten sind in Kapitel 4.3 dargestellt. Im Hinblick auf das Kompartiment Luft werden in Kapitel 4.4 Messergebnisse zum Dampfdruck von insgesamt sechs Zytostatika und die daraus abgeleiteten Verdampfungszeiten von Zytostatika-Partikeln in der Atmosphäre dargestellt.

4.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Anhand physikalisch-chemischer Eigenschaften und daraus abgeleiteter Parameter lassen sich bereits wichtige Aussagen über das Verhalten von Substanzen in der Umwelt treffen. So sind Aussagen über die Verteilung und Mobilität innerhalb der Kompartimente und den Stofftransfer zwischen den Kompartimenten sowie zur Bioakkumulation in aquatischen Organismen möglich.

Im folgenden werden einige wichtige Parameter und daraus abgeleitete Verteilungskoeffizienten vorgestellt, die eine Charakterisierung des Verhaltens von Substanzen in der Umwelt erlauben.

Wasserlöslichkeit S : Die Wasserlöslichkeit gibt die maximale Konzentration an, in der eine Substanz in Gewässern molekular gelöst vorliegen kann. Gut wasserlösliche Substanzen z.B. sind in der Regel mobil und adsorbieren nicht an Schwebstoffen und Sedimenten in Oberflächengewässern. Die Wasserlöslichkeit ist ein Maß für die Hydrophilität einer Substanz und korreliert daher negativ mit solchen Parametern, die ein Maß für die Lipophilität darstellen, wie z.B. der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient P_{OW} oder der auf den organischen Kohlenstoffgehalt bezogene Adsorptionskoeffizient K_{OC} . Bei extrem lipophilen Substanzen sind alle drei Größen schwer messbar und die in der Literatur angegebenen Korrelationen dienen der gegenseitigen Prüfung und Abschätzung der Daten. Die Wasserlöslichkeit dient des weiteren zusammen mit dem Dampfdruck zur Berechnung des Luft-Wasser-Verteilungskoeffizienten H , der zur Abschätzung der Flüchtigkeit aus Oberflächengewässern notwendig ist.

Dampfdruck p_d : Der Dampfdruck ist ein Maß für die Flüchtigkeit einer Substanz, d.h. für deren Übergang aus der Fest- oder Flüssigphase in die Gasphase. Zusammen mit der Wasserlöslichkeit ist die Kenntnis des Dampfdrucks eine Voraussetzung zur Berechnung des Luft-Wasser-Verteilungskoeffizienten H . Dieser wird zur Abschätzung der Flüchtigkeit von Substanzen aus Oberflächengewässern benutzt. Des weiteren ist die Verdampfung von Substanzen, die als Partikel in der Atmosphäre vorliegen, maßgeblich vom Dampfdruck abhängig. Für Humanpharmaka besteht keine Pflicht zur Ermittlung und Bekanntgabe dieses Parameters. Dementsprechend sind nur unzureichende Literaturangaben zu finden. Im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsvorhabens wurden daher einige Dampfdrücke ausgewählter Zytostatika experimentell bestimmt.

Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient H : Die Verteilung von Substanzen durch Verdampfung aus Oberflächengewässern und feuchtem Boden wird näherungsweise durch den Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient H (auch Henry-Konstante) beschrieben. Die dimensionslose Henry-Konstante ist eine Funktion von Sättigungsdampf-

druck p_d [Pa], Molmasse M [g/mol], Wasserlöslichkeit S [kg/m³] und Temperatur T [K] der betrachteten Substanz. Die angegebene Zahlenwertgleichung gilt näherungsweise für zwar gut, aber nicht unbegrenzt wasserlösliche Substanzen [Klö95].

$$H = \frac{p_d M}{8314 S T} \quad (1)$$

Existiert in der Gasphase eine geringere Konzentration als es dem Gleichgewichtszustand entspricht, verdampfen mehr Moleküle aus der Wasserphase in die Gasphase. Mit Hilfe der Henry-Konstanten und einfachen Modellen kann die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für die Abnahme der Konzentration einer im Oberflächenwasser gelösten Substanz berechnet werden. Aus diesen Modellen ist eine Einteilung in drei Flüchtigkeitsklassen hervorgegangen, bezogen auf eine mittlere Wassertiefe von einem Meter [Klö95]:

Schwerflüchtige Substanzen ($t_{1/2} > 1$ Jahr): $H < 4 \times 10^{-6}$

Substanzen mittlerer Flüchtigkeit ($t_{1/2}$ ca. 1 Tag bis 1 Jahr): $4 \times 10^{-6} < H < 4 \times 10^{-2}$

Leichtflüchtige Substanzen ($t_{1/2} < 1$ Tag): $H > 0,04$

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{OW}$: Das Verteilungsverhalten von Substanzen zwischen organischer und wässriger Phase wird durch den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$ beschrieben. Dabei wird vorausgesetzt, dass Octanol die Eigenschaften von organischer Materie und der Lipidphase von aquatischen Organismen repräsentiert. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ist ein Maß für die Verfügbarkeit von Substanzen im Bodenwasser und der Tendenz zur Bioakkumulation. Werte von $\log P_{OW} > 3$ deuten auf eine geringere Verfügbarkeit im Bodenwasser und eine größere Tendenz zur Bioakkumulation hin.

Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient kann aus Molekülkrementen näherungsweise berechnet werden. Darüber hinaus wurden log/log-Beziehungen zur Wasserlöslichkeit S und zum Adsorptionskoeffizienten K_{OC} aufgestellt [IL89, Kar81].

$$\log P_{ow} = (3,05 - \log S) / 1,29 \quad (2)$$

In dieser Zahlenwertgleichung ist die Wasserlöslichkeit S in [kg/m³] einzusetzen.

Des weiteren existieren gute Korrelation zu den Biokonzentrationsfaktoren BCF in Fisch, Muscheln und anderen Wassertieren, besonders wenn die Biokonzentrationsfaktoren auf den Fettgehalt der Tiere bezogen werden.

Adsorptionskoeffizient K_{oc} für Boden und Sediment: Das Verteilungsverhalten einer Substanz zwischen der Bodenmatrix und dem Bodenwasser beeinflusst das Transportverhalten entscheidend. Substanzen, die durch Adsorption im Boden fixiert sind, können nicht weiter durch den Wasserkreislauf transportiert werden. Auch die Verteilung zwischen Schwebstoffen bzw. Sediment und der wässrigen Phase wird in Oberflächengewässern durch das Adsorptionsverhalten bestimmt. Da die meisten organischen Substanzen relativ hydrophob sind, erfolgt im wesentlichen eine Anlagerung an den organischen Anteilen im Boden. Um den Einfluss des organischen Gehaltes des jeweiligen Bodens zu eliminieren, wird der Adsorptionskoeffizient K_{oc} auf den Massenanteil an organischem Kohlenstoff im Boden bezogen.

Der Adsorptionskoeffizient K_{oc} korreliert sehr gut mit dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten P_{ow} [Kar81].

$$\log K_{oc} = 0,989 \log P_{ow} - 0,346 \quad (3)$$

Oder vereinfacht

$$K_{oc} \approx 0,4 P_{ow} \quad (4)$$

Biokonzentrationsfaktor BCF: Der Biokonzentrationsfaktor gibt das Verhältnis der Konzentration einer Substanz im Wasser als umgebendes Medium zur Konzentration im Organismus an. Prinzipiell beschreibt der Faktor das Verteilungsverhalten einer Substanz zwischen der wässrigen Phase und den fettähnlichen Bestandteilen im betrachteten Organismus. Insofern wurden eine Reihe von Untersuchungen zur Korrelation zwischen dem Biokonzentrationsfaktor und dem Octanol-Wasser-Verteilungs-

koeffizienten durchgeführt. Für Fische wird z.B. folgender Zusammenhang angegeben [HC86, CSM82]:

$$\log BCF = \log P_{ow} - 1,32 \quad (5)$$

Oder vereinfacht

$$BCF = 0,048 P_{ow} \quad (6)$$

Wie bereits mit Gleichung 2 gezeigt, korrelieren die Wasserlöslichkeit S und der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient. Insofern kann auch ein Zusammenhang zwischen der Wasserlöslichkeit und dem Biokonzentrationsfaktor hergeleitet werden. Experimentelle Untersuchungen zur Bioakkumulation von chlorierten Pestiziden in Muscheln führten zur Bestätigung dieser Annahme [Ern77].

Ergebnisse zu den oben aufgeführten Parametern sind nicht für alle der hier betrachteten Zytostatika bekannt. Insbesondere existierten zu Beginn des Untersuchungsvorhabens keine öffentlich zugänglichen Messwerte zum Dampfdruck der Substanzen. In der folgenden Zusammenstellung sind daher die im Rahmen des Untersuchungsvorhabens ermittelten Messwerte von Dampfdrücken ausgewählter Zytostatika bereits berücksichtigt. Darüber hinaus wurden in der folgenden Tabelle die in der Literatur verfügbaren Daten zusammengestellt und die entsprechenden Verteilungskoeffizienten nach den oben angegebenen Gleichungen berechnet.

	Molekulargewicht M [g/mol]	Wasserlöslichkeit S [mg/l]	Dampfdruck p _d [Pa]	Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient H	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient log P _{ow}	Adsorptionskoeffizient für Boden und Sediment K _{oc}	Biokonzentrationfaktor BCF
Chlorambucil	304,23	<i>praktisch unlöslich</i>	0,00012	1,1x10 ⁻⁸	1,47	150	8
Methotrexat	454,46	<i>praktisch unlöslich</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vinblastin	810,99	<i>praktisch unlöslich</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Etoposid	588,58	80	0,0026	7,85x10 ⁻⁶	3,21	681,24	78,46
Cisplatin	300,1	2530	0,0018	8,76x10 ⁻⁸	2,05	48,23	5,39
Carmustin	214,04	5000	0,019	3,34x10 ⁻⁷	1,82	28,61	3,18
Melphalan	305,2	11000	4x10 ⁻⁸	1,72x10 ⁻¹¹	-0,52	355	0,24
Fluorouracil	130,08	12500	0,0014	5,98x10 ⁻⁹	1,51	14,17	1,56
Cyclophosphamid	261,07	40000	0,0033 / 20°C	8,84x10 ⁻⁹	1,12	5,81	0,63
			0,0058 / 25°C	5,7x10 ⁻¹⁰	0,63	52	1,8
Ifosfamid	261,07	100000	0,00096	1,03x10 ⁻⁹	0,81	2,88	0,31
Cytarabin	243,22	200000			-2,18	0,0026	3,2x10 ⁻⁴

fett-kursiv: **Messwerte**
normal: Rechenwerte

Tab. 8: Physikalisch-chemische Parameter und Verteilungskoeffizienten [HSDB]

4.2 Untersuchung des biologischen und abiotischen Abbauverhaltens

4.2.1 Auswahl des Testverfahrens

Die Untersuchungen des biologischen und abiotischen Abbauverhaltens von insgesamt zehn Zytostatika erfolgten in einer Modellkläranlage im Labor. Prinzipiell besitzen die Ergebnisse dieser sogenannten Simulationstests die größte Aussagekraft aller standardisierten Testverfahren.

Bei anderen Testverfahren mit geschlossenen, relativ kleinen Gefäßen, in denen mit statischen Methoden auf leichte und inhärente Abbaubarkeit getestet wird, findet der biologische Abbau unter im Vergleich zu den realen Verhältnissen erschwerten Be-

dingungen statt. Während positive Ergebnisse solcher Tests bedeuten, dass die Substanz mit einiger Sicherheit auch unter realen Bedingungen abbaubar sein wird, muss bei negativen Resultaten mit einem Test der nächsthöheren Stufe untersucht werden.

Demgegenüber hat der Einsatz einer Modellkläranlage als Testsystem folgende Vorteile:

- Die Prüfsubstanz ist hier nicht die einzige Nährstoffquelle und muss, wie unter Freilandbedingungen, in ungünstiger Konkurrenz mit anderen, im Überschuss vorliegenden Substanzen abgebaut werden.
- Verglichen mit anderen Testverfahren steht eine relativ große Menge aktiver Biomasse (Belebtschlamm) zur Verfügung. Eine Störung des Abbauprozesses durch die bakterizide Wirkung der Zytostatika wird dabei weitgehend ausgeschlossen.
- Die Kontaktzeiten zwischen Mikroorganismen und der Prüfsubstanz betragen nur einige Stunden und entsprechen damit denen in kommunalen Kläranlagen.
- Die Abbauversuche können durch Einsatz der entwickelten Anreicherungsverfahren mit niedrigeren, d.h. realistischeren Substanzkonzentrationen durchgeführt werden. Dies ist bei Tests in geschlossenen Behältern, wo maximal einige Milliliter Probe pro Tag entnommen werden können, nicht möglich.
- Eine für die Simulationstests erforderliche, substanzspezifische Analytik stand für die untersuchten Substanzen zur Verfügung.

4.2.2 Verwendetes Testverfahren

Das zur Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit der Zytostatika eingesetzte Testverfahren wurde 1973 von der OECD als "OECD Confirmatory Test" zur Untersuchung der Bioabbaubarkeit oberflächenaktiver Stoffe von synthetischen Tensiden eingeführt. In modifizierter Form, als "OECD Coupled Units Test", wurde es in die OECD-Richtlinien als Simulationstest für beliebige Substanzen aufgenommen [Bar78]. In Deutschland ist der OECD Confirmatory Test als sogenannter Bestätigungstest Bestandteil der seit 1977 geltenden Tensid-Verordnung [TensidV]. Er wird ergänzend zum Auswahltest (OECD Screening Test) zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden in Wasch- und Reinigungsmitteln verwendet. Auch in die Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser- und Schlammuntersuchung wurde

dieses Testverfahren für Tenside [RAS96] und allgemein für wasserlösliche und nichtflüchtige Substanzen aufgenommen [DEVL24].

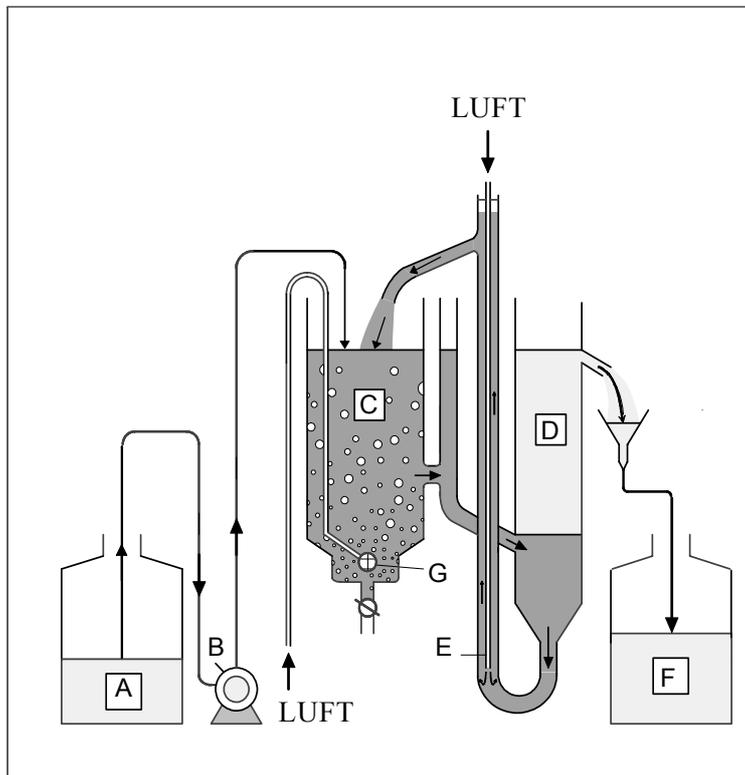
Wesentliche Unterschiede zwischen den genannten Verfahren bestehen lediglich in dem zur Bestimmung der Substanzkonzentrationen vor und nach dem Durchlaufen der Modellkläranlage verwendeten analytischen Messverfahren. Für die Konzentrationsbestimmung der Tenside nach der Tensid-Verordnung werden nasschemische Verfahren, beim Coupled Units Test unspezifische Analysemethoden (CSB bzw. DOC-Abnahme) verwendet. Die Deutschen Einheitsverfahren lassen hingegen sowohl Summenparameter als auch spezifische Analyseverfahren ausdrücklich zu. In dem vorliegenden Untersuchungsvorhaben wurden die im Anhang beschriebenen substanzspezifischen Analyseverfahren eingesetzt.

4.2.2.1 Durchführung des Bestätigungstests

Die Abbauversuche wurden entsprechend der zitierten Vorschriften durchgeführt. Versuchsdurchführung und -auswertung sind dort detailliert beschrieben und werden hier nur verkürzt wiedergegeben. Insoweit die genannten Verfahren in Einzelheiten voneinander abweichen oder alternative Versuchsparameter zulassen, wird die jeweils gewählte Variante beschrieben. Die Bestimmung der Zytostatikakonzentrationen im Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage erfolgte mittels flüssigchromatographischer Verfahren mit und ohne vorherige Anreicherung. Die genauen Arbeitsvorschriften dazu sind im Anhang wiedergegeben.

Die Modellkläranlage

Der Bestätigungstest wird in einer Modellkläranlage im Labormaßstab (Labor-Belbtschlammanlage, OECD Confirmatory Test Unit) unter Verwendung eines synthetischen Abwassers durchgeführt. Abbildung 1 zeigt die vom Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen zur Verfügung gestellte Anlage.



A	Vorratsgefäß (Zulauf)	B	Dosiereinrichtung	C	Belebungsgefäß
D	Absetzbecken	E	Mammutpumpe	F	Sammelgefäß
G	Fritte		Abwasser		Belebtschlamm

Abb. 1: Prinzipskizze der Modellkläranlage [Bar78]

Die Anordnung besteht aus Vorratsgefäß A für das synthetische Abwasser, Dosiereinrichtung B, Belebungsgefäß C, Absetzgefäß D, Mammutpumpe E für die Rückförderung des abgesetzten Belebtschlammes und Sammelgefäß F für den Ablauf. Die eigentliche Belebungsanlage besteht aus durchsichtigem Hart-PVC und hat ein Volumen von ca. 5 l. Das Absetzgefäß D wird in der Höhe so fixiert, dass die Füllmenge des Belebungsgefäßes C 3 l beträgt.

Vorratsgefäß A und Sammelgefäß F bestehen aus PVC und haben ein Volumen von je 30 L. Die Belüftung, die der Sauerstoffzufuhr und der Durchmischung des Abwassers dient, erfolgt mit der Fritte G, die in das Belebungsgefäß C bis zu dessen konisch zulaufenden Boden eintaucht. Die Luftzufuhr wird so eingestellt, dass ein Absetzen des Schlammes im Belebungsbecken verhindert und ein Mindestgehalt an Sauerstoff von 2 mg/l aufrechterhalten wird. Das dotierte synthetische Abwasser wird von der Dosiereinrichtung (Membranpumpe) in die Anlage gepumpt. Die Flussrate

beträgt in den zitierten Verfahren entweder 1 l/h (DIN 38412, Teil 26 und TensV) oder 0,5 l/h (DIN 38412, Teil 24). Die OECD-Richtlinien lassen beide Werte zu. Um den Substanzverbrauch gering zu halten, wurde bei den Versuchen mit höheren, direkt bestimmbareren Zytostatikakonzentrationen die Flussrate auf 0,5 l/h eingestellt. Bei den Versuchen unter Einbeziehung der Anreicherung wurde eine Flussrate von 1 l/h gewählt. Im Vorratsgefäß werden dementsprechend täglich 24 bzw. 12 Liter des im nächsten Abschnitt beschriebenen synthetischen Abwassers angesetzt und mit der gewünschten Menge an Zytostatika versetzt. Die Ausgangskonzentration der zu untersuchenden Substanz im Zulauf geht in Gleichung (7) als C_0 ein. Im Ablauf wird täglich die nicht abgebaute Menge an Zytostatika als Konzentration C_t bestimmt. Die Abmessungen der Modellkläranlage garantieren, dass die Aufenthaltszeit des Abwassers, und damit auch die der zu untersuchenden Substanz, in der Modellkläranlage der durchschnittlichen Verweilzeit des Abwassers in kommunalen Kläranlagen entspricht.

Zusammensetzung des synthetischen Abwassers

Für den Zulauf der Modellkläranlage wird ein synthetisches Abwasser verwendet. Dazu werden in 1000 ml Trinkwasser gelöst:

160 mg	Pepton aus Casein
110 mg	Fleischextrakt
30 mg	Harnstoff $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$
7 mg	Natriumchlorid NaCl
4 mg	Calciumchlorid $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
2 mg	Magnesiumsulfat $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Das so bereitete Abwasser entspricht in seiner Zusammensetzung einem typischen, überwiegend aus privaten Haushalten stammenden Abwasser. Es enthält anionische Salze und organische Stoffe, die der Ernährung der Mikroorganismen dienen.

Vor dem Beginn eines Abbauesversuches wird die Anlage mit synthetischem Abwasser gefüllt und mit 3 ml Impfsuspension aus dem Ablauf eines kommunalen Klärwerks (Ruhrklärwerk Ölbachtal) angeimpft. Während der ca. fünf- bis zehntägigen Einarbei-

tungszeit, die der Anpassung der Mikroorganismen an die veränderten Umweltbedingungen dient, bildet sich der für den Abbau erforderliche Belebtschlamm.

4.2.2.2 Kontrolle der Prüfeinrichtung mit einem Abbaustandard

Zur Kontrolle des störungsfreien biologischen Abbaus im Verlauf des Tests wurde der Sauerstoffgehalt im Belebungsgefäß zweimal wöchentlich mittels eines herkömmlichen Schnelltests (Merck) bestimmt. Die zitierten Vorschriften sehen des weiteren zweimal wöchentlich die Überprüfung des chemischen Sauerstoff-Bedarfs (CSB) bzw. des Gehalts an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) sowie des Glühverlustes bzw. der Trockensubstanz des Belebtschlammes vor. Da diese Kontrollen nicht durchgeführt werden konnten, wurde statt dessen eine gut abbaubare Substanz als sogenannter weicher Abbaustandard verwendet. Die Kontrolle der Abbauleistung mittels solcher Abbaustandards ist bei den Tests auf leichte Abbaubarkeit obligat [OECD301A, OECD301B, OECD301C, OECD301D, OECD301E, OECD301F] und wird auch in der Tensid-Verordnung beschrieben. Als Abbaustandards werden verschiedene Substanzen mit bestätigter guter Abbaubarkeit vorgeschlagen u. a. Anilin, Natriumacetat, Natriumbenzoat [ORCD301A, DEVL22], Diethylenglykol oder Ethylenglykol [DEVL25].

Anilin wurde in der vorliegenden Untersuchung als Abbaustandard ausgewählt, weil es mit den beschriebenen chromatographischen Methoden erfassbar ist. Die Substanz lässt sich mittels reversed-phase Chromatographie von den untersuchten Substanzen trennen und mit UV- oder auch Fluoreszenzdetektion bestimmen. Die Bestimmungsgrenze liegt bei der UV-Detektion bei ($\lambda_{\max} = 205 \text{ nm}$) bei $1 \mu\text{g/l}$ und bei der Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{Ex}} = 235 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$) bei $5 \mu\text{g/l}$. Die Substanz wurde dem Zulauf in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/l}$ zugesetzt. Die Konzentration im Zu- und Ablauf wurde in allen Abbaueversuchen direkt, d. h. ohne Anreicherung bestimmt, da die verwendeten Anreicherungsverfahren nicht für diese Substanz optimiert wurden. Die Abbaurate des Abbaustandards sollte nach Ablauf der Einarbeitungszeit $\geq 80\%$ sein.

4.2.2.3 Auswertung der Abbauprüfungen für Zytostatika

Während der Abbauprüfung für Zytostatika wurde einmal täglich die Konzentration der Zytostatika im Zu- und Ablauf bestimmt. Dabei ist eine absolute Konzentrationsbestimmung anhand von Kalibriergeraden nicht notwendig; benötigt wird nur das relative Konzentrationsverhältnis zwischen Zu- und Ablauf.

Bei einigen Versuchsreihen wurden einzelne, jedoch nie mehr als zwei aufeinanderfolgende Messungen ausgelassen. Alle Konzentrationsmessungen wurden mindestens dreimal, bei Abweichungen einzelner Werte vom Mittelwert von mehr als 8 % bis zu sechsmal, durchgeführt. Der Mittelwert der Peakhöhen der chromatographischen Signale wurde in Gleichung (7) eingesetzt. Die tägliche Abbaurate A_t wird aus den Mittelwerten der gemessenen Peakhöhen nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100 = A_t [\%] \quad (7)$$

A_t	Abbaurate zur Zeit t in Prozent
C_0	mittlere Ausgangskonzentration (Peakhöhe) der untersuchten Substanz im Zulauf zum Zeitpunkt t
C_t	mittlere Konzentration (Peakhöhe) der untersuchten Substanz im Ablauf zum Zeitpunkt t

Die tägliche Abbaurate A_t wird in einem Diagramm über der Zeit t aufgetragen. Typischerweise bleibt die Abbaurate am Anfang relativ niedrig (lag-Phase), steigt dann, während sich die zum Abbau der Prüfsubstanz befähigten Bakterien vermehren, mehr oder weniger schnell an und pendelt sich schließlich auf einem konstanten Wert ein. Die Einarbeitungszeit beträgt etwa 5 bis 7 Tage und ist beendet, wenn sich Belebtschlammflocken gebildet und die Abbauraten von Prüfsubstanz und Abbaustandard ein Plateau erreicht haben. Der anschließende Bewertungszeitraum umfasst mindestens 21 Tage.

Als Abbaurate A der Prüfsubstanz wird der Mittelwert der täglichen Abbauraten A_t in dem Zeitraum, in dem dieser Wert - innerhalb der Fehlergrenzen - konstant ist, angegeben. Eine Substanz gilt als abbaubar, wenn ihre Abbaurate innerhalb des dreiwöchigen Bewertungszeitraums eine Abbaurate A von mehr als 80% erreicht. Abbil-

Abbildung 2 zeigt die typischen Abbaukurven von Substanzen mit unterschiedlichem Abbauverhalten.

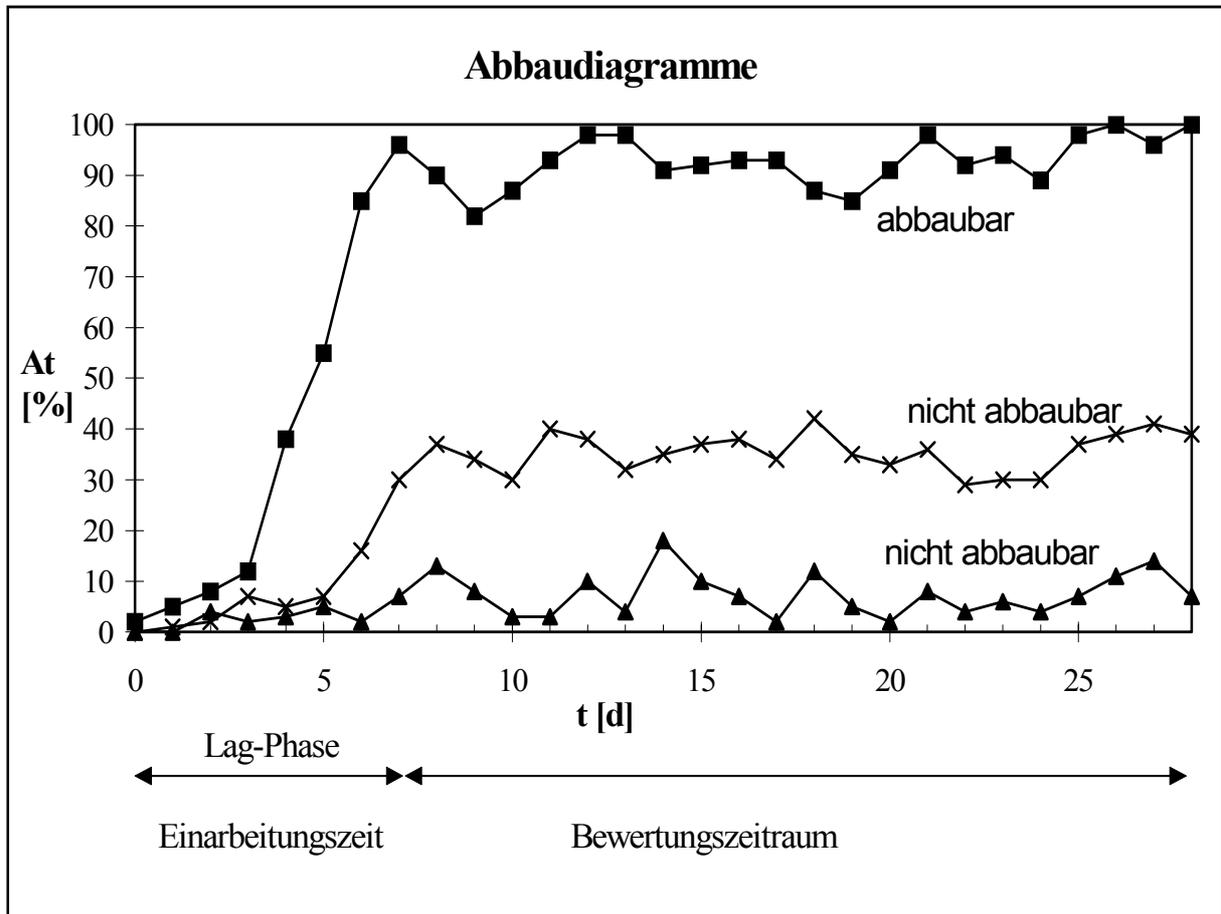


Abb. 2: Abbaudiagramme von Substanzen mit unterschiedlichem Abbauverhalten

4.2.2.4 Berücksichtigung abiotischer Prozesse

Es ist zu beachten, dass die Zytostatikakonzentration bereits im Zulauf durch Hydrolyse bzw. chemische Reaktionen mit anderen Bestandteilen des synthetischen Abwassers, UV-Strahlung oder Adsorption an den Behälterwänden vermindert werden kann. Die gleichen Prozesse finden natürlich auch im Ablaufsammelgefäß statt. Um zwischen diesen abiotischen Substanzverlusten und der eigentlichen biologischen Abbaurrate unterscheiden zu können, wurde die in Gleichung (7) eingehende Zytosta-

tikakonzentration im Zulauf (C_0) immer zur gleichen Zeit wie die im Ablauf bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt war der Zulauf also bereits ca. 24 Stunden alt.

Auch die Zytostatikakonzentrationen im frisch angesetzten Zulauf (C_0 neu) wurde regelmäßig bestimmt. Aus dem Vergleich dieser Größen $((C_0 \text{ neu} - C_0) / C_0 \text{ neu})$ lassen sich Aussagen über die Stabilität der Substanzen, das Ausmaß der abiotischen Eliminierung im Zulauf und gegebenenfalls über Produkte der Hydrolyse bzw. Photolyse ableiten.

Parallel zu den Abbauversuchen wurden Vergleichslösungen der Testsubstanzen jeder Gruppe (höhere Konzentration) in destilliertem Wasser in Glasgefäßen angesetzt und neben der Kläranlage aufbewahrt (gleiche Temperatur und Lichtverhältnisse). Um jede mikrobielle Aktivität auszuschließen, wurde diesen Lösungen Quecksilber(II)chlorid (100 mg/l) zugesetzt. Die Substanzgehalte dieser Lösungen wurden ebenfalls täglich bestimmt. Prinzipiell kann jedoch mit dem verwendeten Untersuchungsverfahren nicht zwischen biologischem Abbau und abiotischen Eliminierungsprozessen innerhalb der Modellkläranlage unterschieden werden. Dort kann die Substanzminderung durch Adsorption am Belebtschlamm bzw. durch die intensivere Licht- und Sauerstoffeinwirkung infolge der Belüftung und Umwälzung gegebenenfalls größer sein als im Zulauf.

4.2.3 Durchgeführte Abbauversuche

Das Abbauverhalten von vier Zytostatika (Cyclophosphamid, Cytarabin, 5-Fluorouracil und Methotrexat) wurde bereits in einer früheren Arbeit mit dem beschriebenen Simulationstest untersucht. Jedoch stand für diese Messungen nur eine HPLC-Anlage mit isokratischer Pumpe und UV-Festwellenlängendetektor zur Verfügung.

Darüber hinaus existierten zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch keine ausreichend leistungsfähigen Anreicherungsverfahren für die untersuchten Zytostatika. Die erwähnten Abbauversuche mussten daher mit relativ hohen Substanzkonzentrationen durchgeführt werden. Wegen des begrenzten zeitlichen Rahmens der zitierten Arbeit musste zudem die Versuchsdauer auf maximal zwei Wochen verkürzt werden.

Um die unter diesen Bedingungen erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden diese vier Zytostatika ebenfalls in die durchgeführten Abbauprobungen mit dem Bestätigungstest einbezogen. Für Cisplatin konnten die Bestimmungsgrenzen auch durch Optimierung der Anreicherung nicht soweit gesenkt werden, dass eine Untersuchung des Abbauverhaltens mittels des Bestätigungstests möglich war. Da bei Abbauprobungen mit dem Auswahltest (OECD-Screening-Test) die entwickelten Anreicherungstechniken nicht genutzt werden können, ist eine Untersuchung des Abbauverhaltens des Cisplatins in niedrigeren Konzentrationen nicht möglich. Die übrigen neun Zytostatika wurden für die Abbauprobungen in vier Gruppen gleichzeitig anreicherbarer und chromatographisch erfassbarer Substanzen eingeteilt. Tabelle 9 zeigt die Gruppeneinteilung der Zytostatika für die Abbauprobungen und die eingesetzten Substanzkonzentrationen.

Gruppe	Zytostatika	Substanzkonzentrationen [mg/l]	
		Versuche ohne Anreicherung	Versuche mit Anreicherung
1	Cyclophosphamid	---	1
	Cytarabin	1	1
	Fluorouracil	10	2,5
2	Chlorambucil	10	0,25
	Etoposid	1,5	0,5
	Methotrexat	20	0,5
3	Melphalan	5	0,25
	Vinblastin	0,5	0,1
4	Carmustin	25	0,25

Tab. 9: Konzentrationen und Einteilung der Zytostatika in Gruppen für die Abbauprobungen

Außer von den analytischen Erfordernissen wurde die Gruppeneinteilung noch von weiteren praktischen Gesichtspunkten beeinflusst. Die Substanzen Melphalan und

Chlorambucil sowie ihre Hydrolyseprodukte haben identische UV-Spektren, daher wurden diese Substanzen verschiedenen Gruppen zugeordnet.

Carmustin ist seit 1997 nicht mehr als Feinchemikalie im Handel erhältlich und musste statt dessen vom Hersteller des Fertigarzneimittels (Bristol Meyers Squibb, München) bezogen werden. Die Substanz stand daher erst im April 1998 zur Verfügung und wurde gesondert untersucht.

Alle Zytostatikagruppen wurden zunächst ohne Anreicherung in direkt messbaren, also relativ hohen Konzentrationen (50-fache Bestimmungsgrenze der HPLC) untersucht. Nur auf diesem Weg können UV- bzw. fluoreszenzaktive Metaboliten, für die die Anreicherungsverfahren nicht optimiert wurden, sicher erfasst werden. Im Falle von Cyclophosphamid wurde wegen der hohen Bestimmungsgrenze (80 mg/l) auf Abbauprüfungen mit direkt messbaren Konzentrationen verzichtet. Aus früheren Abbauprüfungen ist bekannt, dass diese Substanz unter diesen Bedingungen keinem Abbau unterliegt, und dass auch keine mit der vorhandenen Analytik erfassbaren Metabolite auftreten [KGJ98].

Die den Abbauprüfungen zugrunde liegenden Vorschriften empfehlen eine Testsubstanzkonzentration von 10 mg/l [DEVL26]. Dies entspricht also eher den ohne Anreicherung durchgeführten Versuchsreihen. Allerdings scheint es mit Hinblick auf die unter realen Bedingungen zu erwartenden Zytostatikakonzentrationen und vor allem angesichts der potentiellen Bakterientoxizität dieser Substanzen geraten, auch Versuche mit niedrigeren Konzentrationen durchzuführen. Dieses Vorgehen wird auch in anderen Literaturquellen empfohlen [UBA95-075, Fis93, Wel84]. In einem zweiten Abbauprüfung wurden daher jeweils Substanzkonzentrationen eingesetzt, die dem 50-fachen der mit dem optimierten Anreicherungsverfahren erfassbaren Konzentration entsprachen. Die gewählten Konzentrationen gestatten es in beiden Versuchsreihen, den gegebenenfalls stattfindenden Abbauprozess bis in den entscheidenden oberen Prozentbereich ($A \geq 80\%$) mit genügender Sicherheit zu verfolgen.

4.2.4 Analytik im Rahmen der Abbauprüfungen

Bei den Versuchen mit hohen Substanzkonzentrationen wurden 10 ml des gut durchgemischten Zu- bzw. Ablauf über einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert, und 20 µl des Filtrats direkt flüssigchromatographisch analysiert. Bei den Versuchsreihen mit

niedrigen Konzentrationen wurden 500 ml Zu- bzw. Ablauf am jeweiligen Festphasensorbens angereichert, und die Eluate für die HPLC-Analytik verwendet.

Die chromatographischen Parameter waren bei den Versuchen mit hoher und niedriger Substanzkonzentration identisch. In den Tabelle 10 und 11 sind die Bedingungen für die Analytik der Zytostatikgruppen wiedergegeben.

Nr.	Substanzen	Sorbens	Konditionierung	Proben pH-Wert	Waschschritt	Elution
1	Cytarabin Fluorouracil	ENV+ Säulen	3ml MeOH, 3ml PP pH 6,0	pH 6,0	----	1ml H ₂ O, 2×1ml MeOH
2	Chlorambucil Etoposid Me- thotrexat	C18 Polar Plus Scheiben	2ml MeOH, 3ml PP pH 4,8	pH 4,8	1ml H ₂ O	3×1ml MeOH 2×1ml M1
3	Cyclophosph. Melfalan Vinblastin	DVB Scheiben	2ml MeOH, 3ml PP pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3×1ml ACN 2×1ml M1
4	Carmustin	SDB1 Säulen	2ml MeOH, 3ml PP pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	5×1ml ACN

PP = Phosphatpuffer, M1 = ACN/CH₂Cl₂ 50:50 (v/v)

Tab. 10: Bedingungen der Festphasenanreicherung im Rahmen der Abbaueversuche

Aufgrund der starken Partikelbelastung des Kläranlagenzu- und -ablaufs wurden, soweit möglich, scheibenförmige Anreicherungsmaterialien eingesetzt, auch wenn dies bedeutete, dass bei einigen Substanzen (z. B. Carmustin und Cyclophosphamid) etwas höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Die Eluate können, falls erforderlich, tiefgekühlt mindestens vier Wochen ohne Änderung der Analytkonzentration aufbewahrt werden.

Die direkte, bzw. im Anschluss an die Anreicherung durchgeführte chromatographische Trennung wurde mit Phosphatpuffer-Acetonitril-Gradienten durchgeführt.

Zusätzlich zu den jeweiligen Zytostatika und dem Abbaustandard Anilin sollten mit der gewählten Methode auch Metaboliten bzw. Zersetzungsprodukte der untersuchten Substanzen erfassbar sein. Letztere können polarer oder unpolarer sein als die Muttersubstanzen. Daher beginnen alle eingesetzten Gradienten, unabhängig vom Elutionsverhalten der jeweiligen Zytostatika, mit rein wässrigen Eluenten. Danach steigt der Acetonitrilgehalt bis auf 80% an.

Nr.	Substanzen	Detektion	Retentionszeit	Gradient
1	Fluorouracil Cytarabin Anilin	UV: 267 nm UV: 283 nm Flu: 235/340 nm	5,7 min 7,6 min 9,7 min	0-4 min: 100-95% PP, pH 3,0 4-6 min: 95% PP, pH 3,0 6-10 min: 95-20% PP, pH 3,0 10-12 min: 20% PP, pH 3,0
2	Anilin Methotrexat Etoposid Chlorambucil	Flu: 230/330 nm UV: 307 nm Flu: 230/330 nm UV: 255 nm	8,0 min 8,7 min 11,2 min 13,6 min	0-2 min: 100-90% PP, pH 3,0 2-10 min: 90-20% PP, pH 3,0 10-12 min: 20% PP, pH 3,0
3	Anilin Melphalan Vinblastin Cyclophosph.	UV: 205 nm Flu: 250/350 Flu: 250/350 nm UV: 200 nm	8,7 min 14,0 min 15,1 min 16,1 min	0-2 min: 100-90% PP, pH 3,5 2-4 min: 90% PP, pH 3,5 4-12 min: 90-40% PP, pH 3,5 12-13 min: 40%-20% PP, pH 3,5 13-15 min: 20% PP, pH 3,5
4	Anilin Carmustin	UV: 230 nm Flu: 235/340 nm	8,2 min 15,3 min	0-10 min: 100-25% PP, pH 3,0 10-12 min: 25-20% PP, pH 3,0 12-14 min: 20% PP, pH 3,0

PP = Phosphatpuffer: 0,01 M KH_2PO_4 , pH-Wert mit Phosphorsäure eingestellt

Tab. 11: Bedingungen der Flüssigchromatographie im Rahmen der Abbauersuche

4.2.5 Ergebnisse der Abbauversuche

Im folgenden werden die Ergebnisse der Abbauversuche für die einzelnen Substanzen in Abbaudiagrammen dargestellt. Die Werte der täglichen Abbauraten wurden auf ganze Prozentwerte gerundet. Die in den Versuchsvorschriften geforderte Rundung auf 0,1% Genauigkeit scheint angesichts der Standardabweichungen des Analysenverfahrens nicht sinnvoll.

An Tagen, an denen die Bestimmungen im Ablauf eine geringfügig größere Konzentration einer Substanz ergaben als im Zulauf, wurde die tägliche Abbaurate A_t gleich 0% gesetzt. Gleiches gilt für die Vergleichslösungen der untersuchten Zytostatika in destilliertem Wasser. Dieses, durch die Messungenauigkeiten verursachte Verhalten, trat insbesondere bei der Abbauuntersuchung von Cyclophosphamid unter Einbeziehung der Anreicherung auf. Die größte derartige Abweichung zwischen C_0 (alt) und C_t betrug + 7% bezogen auf die Konzentration im Zulauf.

Konnte mit dem jeweiligen chromatographischen Detektionsverfahren keine Substanz mehr im Ablauf nachgewiesen werden, so wurde eine Abbaurate von 100% angegeben. Für einzelne Tage, an denen keine Probennahme erfolgte, wurde die Abbaukurve interpoliert.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Abbaukurven des Abbaustandards Anilin verzichtet. Diese Substanz erreichte in allen durchgeführten Versuchen zwischen dem dritten und dem achten Tag eine tägliche Abbaurate A_t von über 80%. Die mittlere Abbaurate A lag in allen Versuchen zwischen 88 und 100%, so dass von einem störungsfreien Verlauf der Abbauprozesse ausgegangen werden kann.

4.2.5.1 Gruppe 1: Cytarabin und Fluorouracil

Abbauverhalten von Cytarabin

Da im Falle von Cytarabin bisher eine Verbesserung der Bestimmungsgrenze durch die Anreicherung nicht gelang, wurde diese Substanz in beiden Versuchen in der gleichen Konzentration (1 mg/l) eingesetzt. Im ersten Versuch wurden die Substanzgehalte im Zu- und Ablauf direkt, im zweiten Versuch nach Anreicherung an ENV+-

Festphasen bestimmt. Abbildung 3 zeigt die Abbaukurven von Cytarabin für die beiden durchgeführten Abbauprobungen.

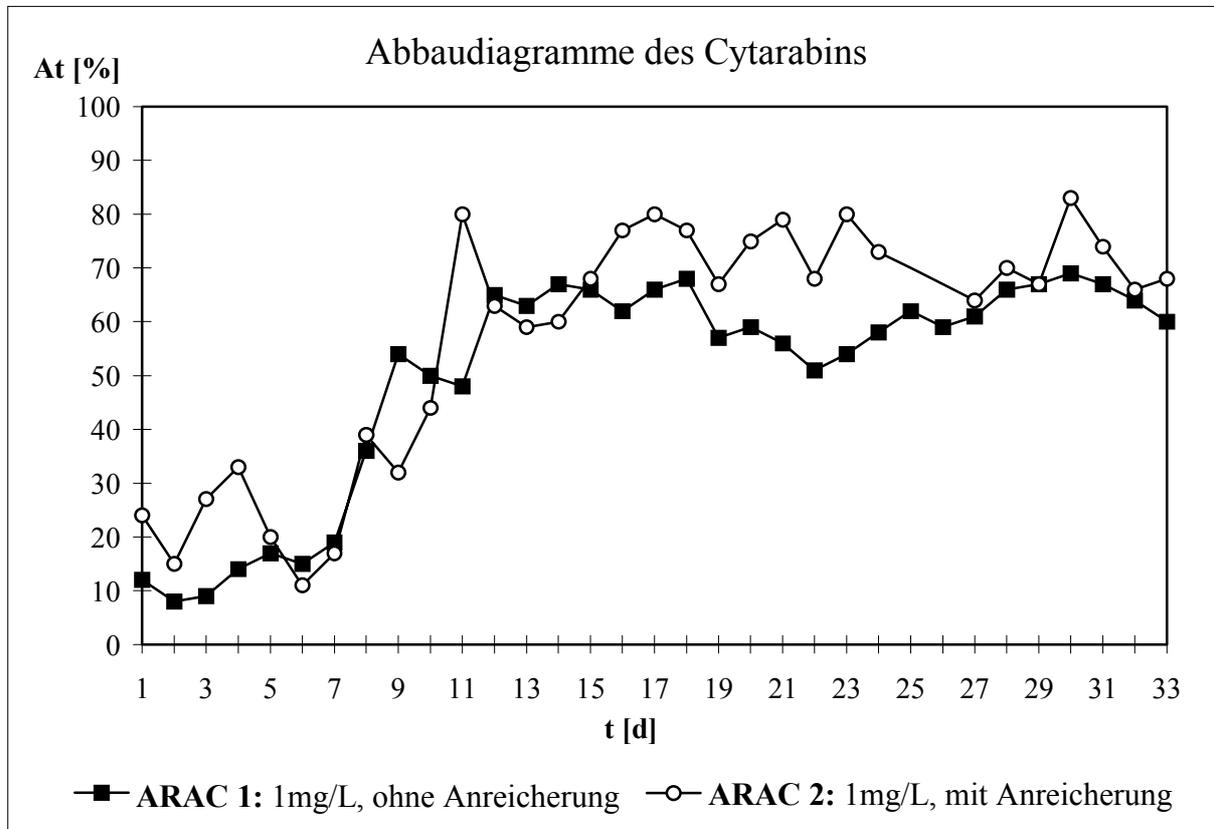


Abb. 3: Abbauverhalten von Cytarabin

Cytarabin wird in beiden Versuchen nur schlecht abgebaut. Die lag-Phasen sind relativ lang; eine annähernd konstante Abbaurrate wird erst nach 12 bzw. 10 Tagen erreicht. Die täglichen Abbauraten A_t schwankten im 21tägigen Bewertungszeitraum zwischen 51 und 71% bei den Versuchen ohne Anreicherung bzw. 59 und 80% bei der zweiten Versuchsreihe. Für die Abbaurrate A ergaben sich daraus Werte von 65% bzw. 74%. Die Abweichung zwischen den in beiden Versuchsreihen gefundenen Abbauraten geht nicht auf die Anreicherung zurück, da dieser Effekt die Bestimmung der Substanzkonzentration im Ab- und Zulauf gleichermaßen beeinflusst. Bei biologischen Untersuchungen, um die es sich bei den Abbauprüfungen handelt, sind solche Schwankungen generell nicht ungewöhnlich; sie bedeuten nicht unbedingt einen systematischen oder statistischen Fehler, sondern spiegeln die sich verändernden natürlichen Bedingungen wider. Allerdings zeigen die Diagramme deutlich, dass die Streuung von A_t um den Mittelwert A bei den Versuchen unter Einbeziehung der An-

reicherung wesentlich größer ist als bei direkter Konzentrationsbestimmung. Insgesamt wird die Bedingung für eine Einstufung dieser Substanz als abbaubar nicht erreicht.

Es konnten mit den zur Verfügung stehenden analytischen Verfahren keine Metaboliten nachgewiesen werden. Die Zersetzungsrate im Zulauf betrug in 24 Stunden durchschnittlich 13 (6-16) bzw. 17 (9-32) Prozent und lag damit deutlich höher als in der Vergleichslösung in destilliertem Wasser, wo im gleichen Zeitraum keine Konzentrationsänderung festgestellt werden konnte. Damit summiert sich der durch biologischen Abbau und abiotische Prozesse eliminierte Substanzanteil auf 70 bzw. 78% innerhalb von 24 Stunden. In der Vergleichslösung verminderte sich die Cytarabinkonzentration in 35 Tagen um insgesamt 8%.

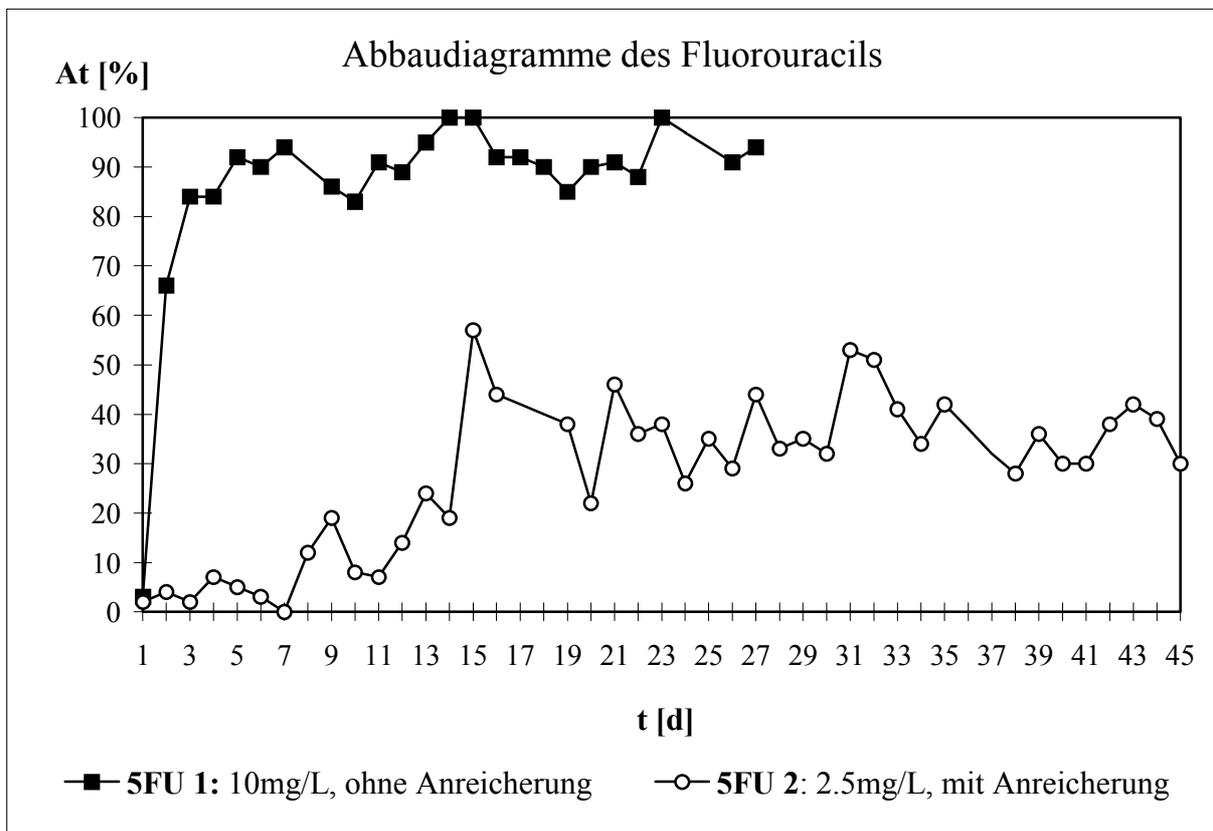


Abb.4: Abbauverhalten von Fluorouracil

Abbauverhalten von Fluorouracil

In Abbildung 4 sind die Abbaukurven der Substanz Fluorouracil für die beiden untersuchten Substanzkonzentrationen dargestellt.

Fluorouracil erreicht in der höheren Konzentration bereits am dritten Tag eine Abbaurate von durchschnittlich 92% und wird damit bereitwilliger abgebaut als der Abbaustandard Anilin, der eine Abbaurate $> 80\%$ erst am fünften Tag erreicht.

Deutlich davon abweichend sind die Ergebnisse der Versuche mit niedrigerer Fluorouracil-Konzentration. Die lag-Phase ist hier mit 15 Tagen die längste in einem Abbauversuch im Rahmen dieser Untersuchung beobachtete. Obwohl der anschließende Bewertungszeitraum auf 30 Tage ausgedehnt wurde, erreichte die Abbaurate nur 38%, was also nicht einmal halb so groß wie bei der ersten Versuchsreihe. Eine solche hohe Differenz ist in jedem Fall statistisch signifikant und hängt offenbar von der Substanzkonzentration ab. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde unmittelbar nach Beendigung des Abbauversuches mit der niedrigen Konzentration der Gehalt an Fluorouracil zunächst für sechs Tage auf 10 mg/l, also die direkt bestimmbare Konzentration erhöht. Anschließend wurde nach einer Pause von zwei Tagen, in der undotiertes synthetisches Abwasser durch die Anlage gepumpt wurde, für weitere fünf Tage wieder die niedrige Fluorouracilkonzentration eingesetzt. Der zweite Versuchsteil (10 mg/l) verlief ähnlich der ersten Versuchsreihe mit dieser hohen Zytostatikakonzentration: die tägliche Abbaurate stieg bereits am ersten Tag auf über sechzig Prozent an und erreichte ab dem dritten Tag einen relativ gleichbleibenden Wert von über 80%. Danach wurde das nun wieder in niedriger Konzentration zugesetzte Fluorouracil bereits vom ersten Tag an und bis zum Ende des Versuchs quantitativ abgebaut. Der Versuch wurde nach insgesamt 58 Tagen aus Zeitgründen abgebrochen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei bestimmten Substanzen die Abbaubarkeit an eine Mindestkonzentration gebunden ist [Fis93, Wag73]. Warum dies so ist, ist bislang nicht geklärt. Die kurze lag-Phase beim Abbau hoher Fluorouracilkonzentrationen lässt vermuten, dass die für diese biologischen Prozesse verantwortlichen Mikroorganismen bereits in der Impfsuspension vorhanden sind, oder aber eine sehr kurze Generationszeit haben und sich dementsprechend schnell vermehren. Mögli-

cherweise wird der teilweise Abbau des Fluorouracils bei niedrigeren Konzentrationen durch eine andere Spezies bewirkt oder geht auf abiotische Prozesse in der Modellkläranlage zurück, die im Zu- bzw. Ablauf nicht stattfinden. Eine rein physikalische Adsorption an die Partikel des Belebtschlammes erscheint angesichts der Wasserlöslichkeit der Substanz (13 g/l) unwahrscheinlich. Denkbar ist jedoch eine Bindung an Mikroorganismen nach dem gleichen Mechanismus, der auch der zytostatischen Wirkung des Fluorouracils zugrunde liegt. Die Substanz würde dann in Bakterienmasse eingebaut. In jedem Fall muss die Einstufung dieses Zytostatikums als abbaubar aufgrund früherer Untersuchungen relativiert werden.

Die abiotische Verminderung der Fluorouracilkonzentration im Zulauf beträgt nur 0-7% und durchschnittlich 4% bei der hohen Substanzkonzentration und im Mittel 5% (0-11%) bei niedrigen Konzentrationen. Der insgesamt eliminierte Substanzanteil steigt damit gegenüber der Abbaurate nur geringfügig auf 93 bzw. 41% an. In der in destilliertem Wasser angesetzten Vergleichsprobe trat innerhalb von 24 Stunden keine Konzentrationsänderung auf. Nach vier Wochen betrug die Abnahme 4%. Abbauprodukte ließen sich mit UV- bzw. Fluoreszenzdetektion nicht nachweisen.

4.2.5.2 Gruppe 2: Chlorambucil, Etoposid und Methotrexat

Abbauverhalten von Chlorambucil

In Abbildung 5 sind die Abbaukurven von Chlorambucil für die beiden untersuchten Substanzkonzentrationen dargestellt.

Chlorambucil erwies sich in den durchgeführten Versuchen als biologisch schlecht abbaubar. Die relativ schnell nach 8 bzw. 9 Tagen erreichten Abbauraten lagen bei $A = 44\%$ bei hoher Konzentration bzw. 61% bei kleineren Substanzkonzentrationen. Die täglichen Abbauraten schwankten dabei zwischen 37 und 53% bzw. 52 und 72%.

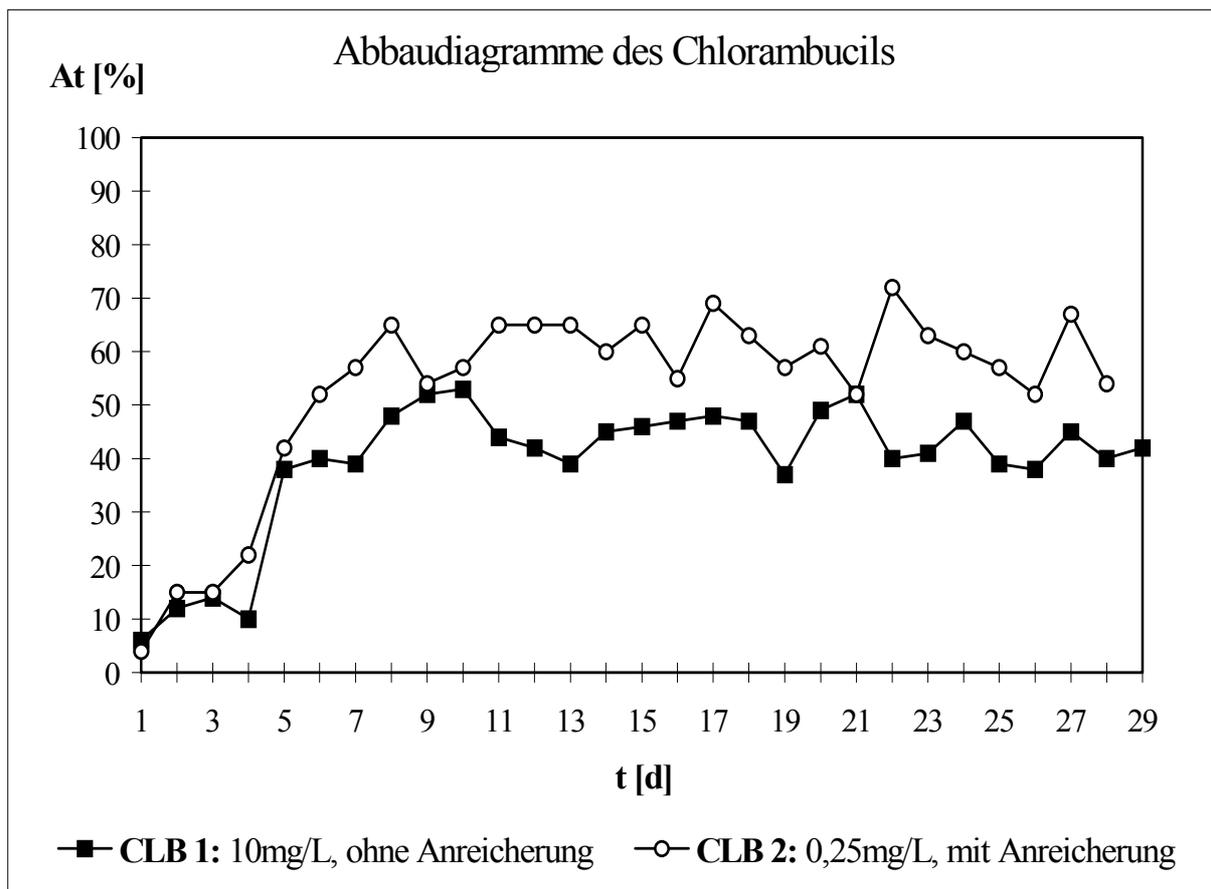


Abb. 5: Abbaudiagramme von Chlorambucil

Überlagert wird das Abbaugeschehen von der Hydrolyse dieser Substanz. In wässriger Lösung werden die beiden Chloratome des Chlorambucils gegen Hydroxylgruppen ausgetauscht, und es entstehen die Mono- und Dihydroxyformen (MOH-CLB und DOH-CLB). Die UV-Spektren beider Metaboliten gleichen dem des Chlorambucils (und des Melphalans). Die Retentionszeiten liegen bei dem verwendeten Gradienten bei 9,6 min (MOH-CLB) und 12,0 min (DOH-CLB). Beide Metaboliten sind bereits kurz nach Ansetzen des Zulaufs (30 min) nachweisbar.

Die durchschnittliche Abnahme der Konzentration der Muttersubstanz im Zulauf binnen 24 Stunden lag bei 65% bei der niedrigeren bzw. 67% bei der hohen Konzentration. Ob diese Abnahme ausschließlich auf Hydrolyse zurückgeht, kann nicht überprüft werden, da eine Quantifizierung der Hydrolyseprodukte nicht möglich ist. Bei den Vergleichslösungen in destilliertem Wasser beträgt die Chlorambucilabnahme nur durchschnittlich 28% in 24h. Außerdem wird in destilliertem Wasser im Verhältnis mehr MOH-CLB gebildet als im Zulauf.

Durch die abiotischen Prozesse im Zulauf, einschließlich der dort stattfindenden Hydrolyse, und den biologischen Abbau in der Kläranlage werden insgesamt durchschnittlich 82% des in höherer Konzentration zugesetzten Chlorambucils und 86% bei niedriger Substanzkonzentration eliminiert.

Im Ablauf der Modellkläranlage lässt sich bei den Versuchen mit hoher Ausgangskonzentration ab dem zweiten Tag zusätzlich eine weitere nicht identifizierte Substanz mit einem der Muttersubstanz entsprechenden UV-Spektrum nachweisen (CLB*, $t_r = 7,3$ min). Dieser Metabolit des Chlorambucils kann in Chlorambucillösungen in destilliertem Wasser bzw. in mit Quecksilberchlorid versetzten synthetischen Zulauf auch nach längerer Zeit (60 Tage) bei Raumtemperatur und Lichteinwirkung nicht beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bildung dieser Substanz auf die biologische Aktivität der Mikroorganismen zurückgeht. Aufgrund des Retentionsverhaltens der Substanz kann ausgeschlossen werden, dass es sich um den im menschlichen Körper gebildeten Hauptmetabolit Phenylelessigsäurelost handelt.

Für die durch Hydrolyse im Zulauf entstandenen Metabolite lässt sich formal ebenfalls eine Abbaurate gemäß Gleichung (7) berechnen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass alle drei Substanzen im Gleichgewicht miteinander vorliegen und möglicherweise erst in der Belebtschlammanlage gebildet werden.

Festzuhalten ist,

- dass die Eliminierung der Muttersubstanz Chlorambucil während der Abbauprobe zu ungefähr gleichen Anteilen auf abiotische Prozesse, insbesondere Hydrolyse, und den biologischen Abbau zurückgeht,
- die Hydrolyse des Chlorambucils in der Modellkläranlage einschließlich Zu- und Ablauf schneller und nach anderem Muster abläuft als bei fehlender mikrobieller Aktivität,
- die in den Versuchsvorschriften definierte biologische Abbaurate A des Chlorambucils bei etwa 40-60%, abhängig von der Konzentration, liegt,
- insgesamt bei den durchgeführten Abbauprüfungen durch abiotische Eliminierung und biologischen Abbau bei beiden Konzentrationen mehr als 80% des eingesetzten Chlorambucils aus dem Abwasser entfernt werden,

- sowohl Chlorambucil als auch beide Hydrolyseprodukte durchgehend im Ablauf der Modellkläranlage nachweisbar sind
- und ein nicht zu identifizierender Metabolit des Chlorambucils in der Kläranlage gebildet wird.

Die Untersuchung der Vergleichslösungen ergab, dass die Hydrolyse bis zur vollständigen Umsetzung zur Dihydroxyform fortschreitet. In destilliertem Wasser beträgt bei Aufbewahrung im Licht bei Raumtemperatur die Halbwertszeit etwa 4 Tage, in dem Quecksilberchlorid versetzten Zulauf lag sie bei 3 Tagen.

Über die zytostatische Aktivität der Hydrolyseprodukte des Chlorambucils konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Ebenfalls nicht untersucht ist, ob und in welchem Umfang die Hydrolyse unter geeigneten Bedingungen reversibel ist. Da Chlorambucil ausschließlich oral verabreicht wird und die Bioverfügbarkeit bei mehr als 90% liegt [RP94, Dor94, RL98], kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hydrolyseprodukte an der therapeutischen Wirkung und/oder den Nebenwirkungen beteiligt sind.

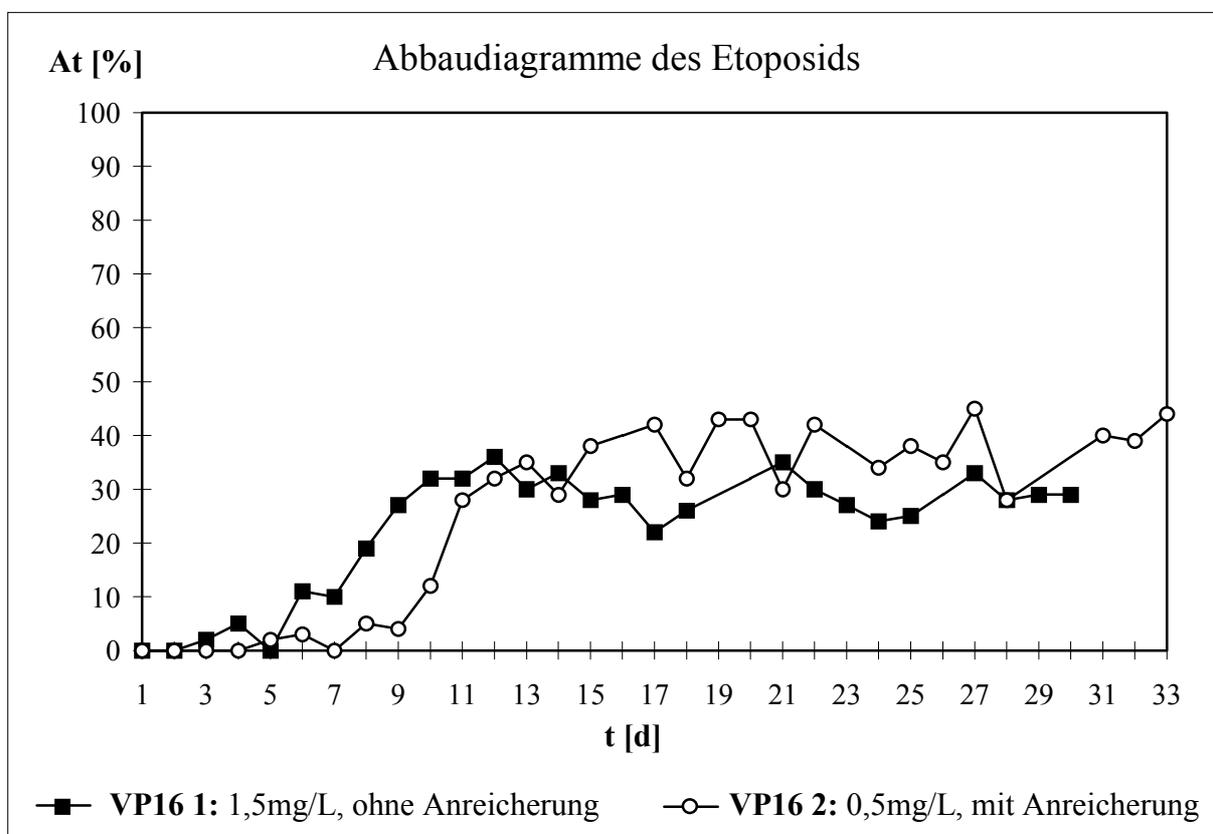


Abb. 6: Abbaudiagramme von Etoposid

Abbauverhalten von Etoposid

Abbildung 6 zeigt die Abbaukurven von Etoposid für die beiden untersuchten Substanzkonzentrationen.

Etoposid erreicht abhängig von der eingesetzten Substanzkonzentration innerhalb von 9 bzw. 11 Tagen eine konstante Abbaurate von 29% (22-35%) bei der höheren Substanzkonzentration und 36% (28-45%) bei größerer Verdünnung. Damit gilt die Substanz im Sinne der OECD-Richtlinien als nicht (ausreichend) abbaubar. Abbauprodukte des Etoposids konnten mit der zur Verfügung stehenden Analytik nicht nachgewiesen werden.

Die tägliche Konzentrationsabnahme im Zulauf lag im Mittel bei 4% (0-6%) bzw. 5% (0-9%) bei den Versuchen unter Berücksichtigung der Anreicherung. Sie unterscheidet sich damit nur wenig von der Zersetzungsrate dieser Substanz in destilliertem Wasser (0-1% in 24 Stunden). Die abiotische Eliminierung spielt also beim Etoposid nur eine untergeordnete Rolle und erhöht den insgesamt aus dem Abwasser entfernten Substanzanteil nur auf 32 bzw. 39%. Während der gesamten Versuchsdauer verringerte sich die Zytostatikakonzentration in der Vergleichslösung lediglich um 3 %.

Abbauverhalten von Methotrexat

In Abbildung 7 sind die Abbaukurven von Methotrexat für die beiden mit und ohne Anreicherung untersuchten Substanzkonzentrationen dargestellt.

Das Abbauverhalten von Methotrexat hängt nur in geringem Umfang von der eingesetzten Substanzkonzentration ab. Die Abbaurate A erreicht bei dem mit größeren Konzentrationen durchgeführten Abbauersuch einen Wert von 90% bei täglichen Abbauraten zwischen 82-100%. Bei den Versuchen unter Einbeziehung der Anreicherung betrug die Abbaurate 87% (75-100%). Die lag-Phase betrug in beiden Versuchsreihen 8 Tage.

Das Ausmaß des durch abiotische Prozesse verursachten Substanzabbaus ist beim Methotrexat verhältnismäßig gering. Die Konzentration im Zulauf wurde im Mittel um 4% (0-7%) bei der ersten Versuchsreihe und 7% (2-10%) bei niedrigeren Konzentrationen vermindert. Die Eliminierungsrate erreicht dadurch insgesamt 90 bzw. 88%.

Ab dem vierten, bei kleineren Substanzkonzentrationen ab dem siebenten Tag tritt im Ablauf ein Metabolit des Methotrexats auf, der in früheren Arbeiten als 7-Hydroxy-Methotrexat (7-Hydroxy-Methotrexat) identifiziert werden konnte [KGJ98].

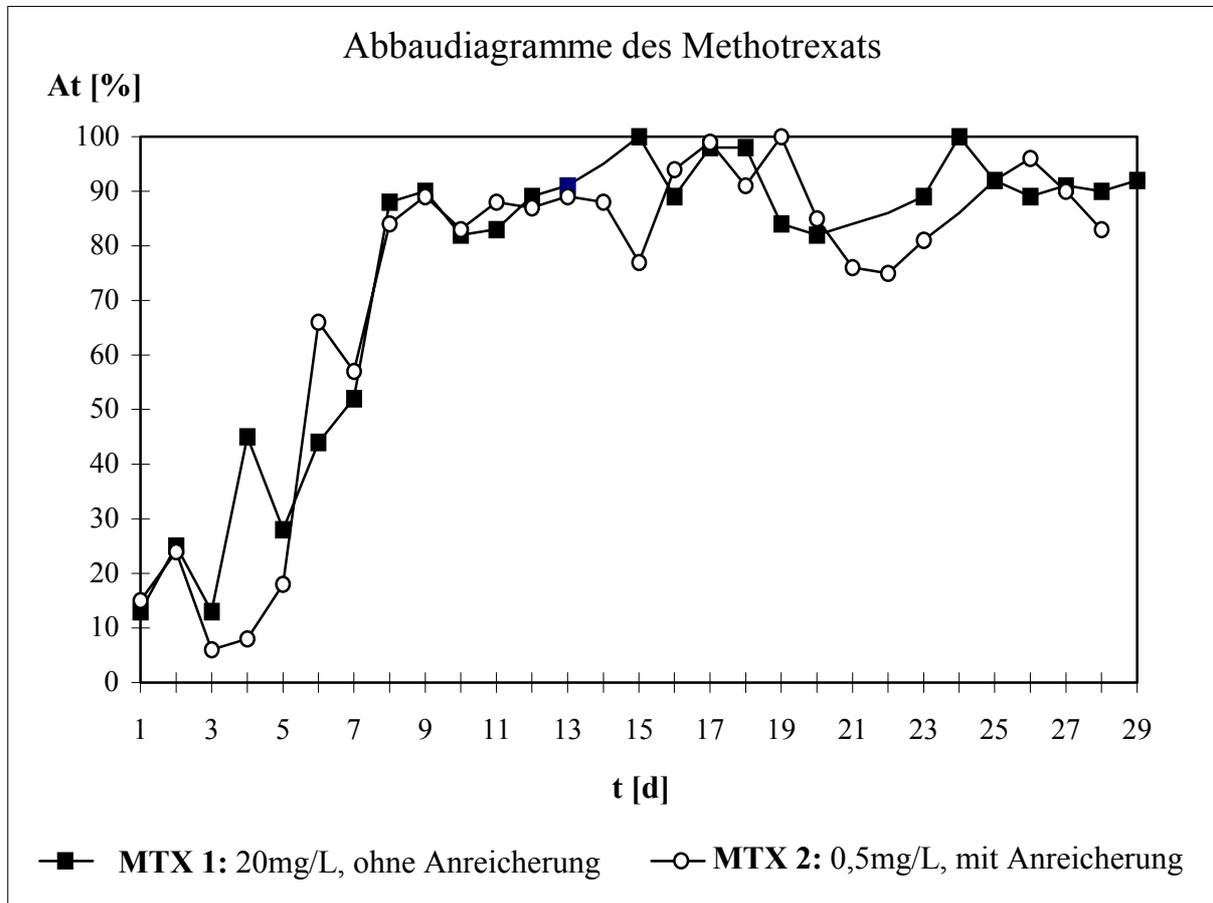


Abb. 7: Abbaudiagramme von Methotrexat

Dieses Abbauprodukt konnte auch bei dem Versuch mit geringerer Methotrexatkonzentration nachgewiesen werden. Durch die Anreicherung, die in diesem Fall mit C18 Polar Plus-Extraktionsdisks durchgeführt wurde, kann also auch dieser Metabolit miterfasst werden. 7-Hydroxy-Methotrexat bildet sich bekanntermaßen unter Lichteinfluss auch ohne die Tätigkeit von Bakterien, allerdings geht dieser Prozess so langsam vonstatten, dass im Zulauf und im Kontrollansatz mit destilliertem Wasser nach einem Tag noch kein 7-Hydroxy-Methotrexat nachgewiesen werden kann. Da 7-Hydroxy-Methotrexat nicht als Reinsubstanz zur Verfügung stand, war eine Quantifizierung der gebildeten Menge nicht möglich. Es ist also prinzipiell nicht auszu-

schließen, dass auch andere, unter Bildung nicht nachgewiesener Produkte ablaufende Abbauprozesse zur Verminderung der Methotrexatkonzentration beitragen.

7-Hydroxy-Methotrexat ist der Hauptmetabolit bei der Chemotherapie mit Methotrexat. Bei Hochdosistherapie werden bis zu 70% der verabreichten Menge als 7-Hydroxy-Methotrexat ausgeschieden [LK80]. Die Substanz ist nach dem gleichen Mechanismus, wenn auch in geringerem Ausmaß als die Muttersubstanz, zytostatisch aktiv [RP94, LK80, JSC76]. Die Affinität des 7-Hydroxy-Methotrexat zur Dihydrofolatreduktase ist jedoch noch ca. 200mal größer als die des natürlichen Substrats. 7-Hydroxy-Methotrexat wird außerdem, aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit, für Nierenschäden bei der Methotrexat-Therapie verantwortlich gemacht. Aus den genannten Gründen sind die human- und ökotoxikologischen Eigenschaften dieses Metaboliten ebenfalls von Interesse. Frühere Experimente haben zudem gezeigt, dass ein biologischer Abbau dieser Substanz unter den Testbedingungen des OECD-Confirmatory-Tests nicht stattfindet [KGJ98].

4.2.5.3 Gruppe 3: Cyclophosphamid, Melphalan und Vinblastin

Abbauverhalten von Cyclophosphamid

Abbildung 8 zeigt die Abbaukurve von Cyclophosphamid, das aufgrund der hohen Bestimmungsgrenze als einzige der ausgewählten Substanzen nur in niedriger Konzentration unter Einsatz der Festphasenanreicherung untersucht wurde.

Ein biologischer Abbau von Cyclophosphamid findet in der untersuchten Konzentration nicht oder nur in sehr geringem Umfang statt. Der 21-tägige Bewertungszeitraum beginnt in diesem Fall am 7. Tag, an dem der Abbaustandard Anilin eine konstante Abbaurate $\geq 80\%$ erreicht. Die mittlere Abbaurate von Cyclophosphamid liegt in diesem Zeitraum bei 4% bei täglichen Abbauraten zwischen 0 und 11 Prozent. Insgesamt bestätigt sich die aufgrund früherer Untersuchungen mit wesentlich höheren Substanzkonzentrationen vorgenommene Einstufung des Cyclophosphamids als nicht abbaubar.

Die abiotische Substanzverminderung im Zulauf bzw. in destilliertem Wasser war ebenfalls gering und betrug 8% (2-6%) im Zulauf und 1% (0-4%) in der Vergleichs-

probe. Insgesamt werden damit nur 12% der im Zulauf vorhandenen Zytostatikamenge aus dem Abwasser eliminiert.

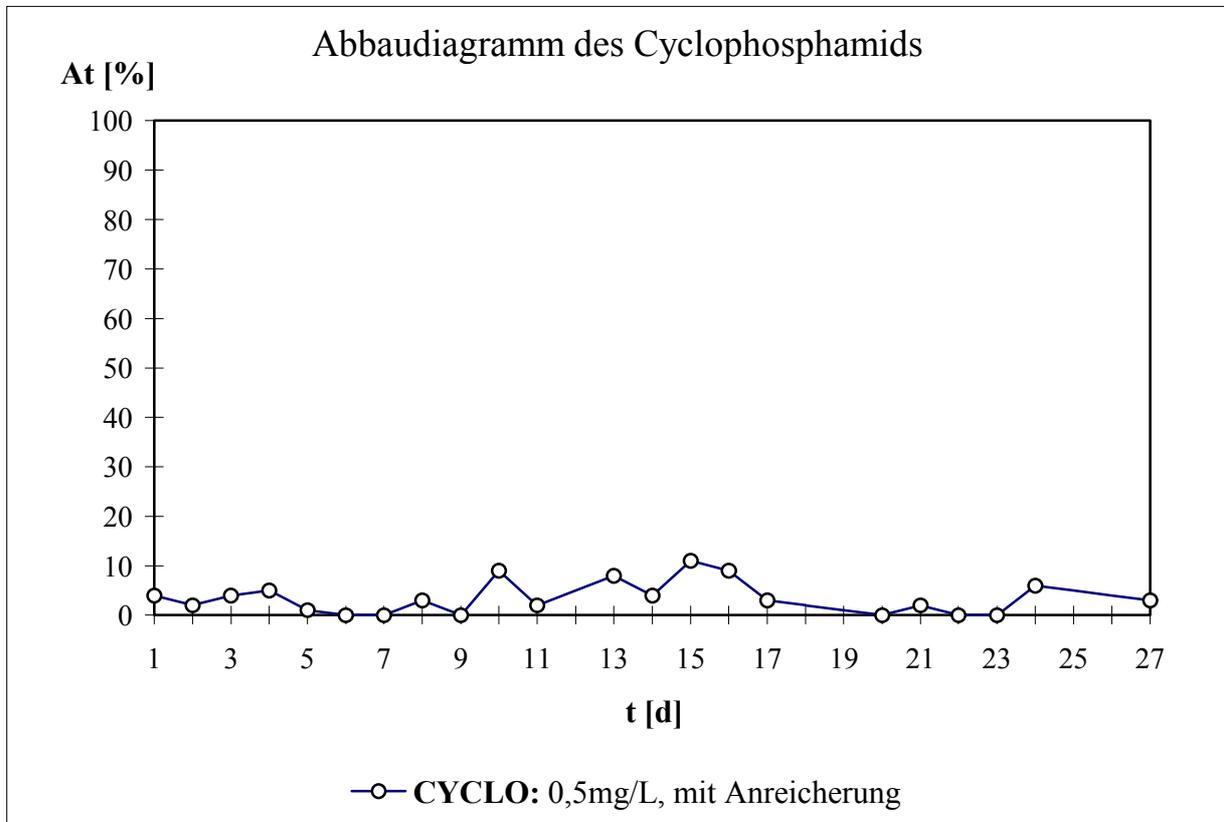


Abb. 8: Abbaudiagramm von Cyclophosphamid

Abbauverhalten von Melphalan

Abbildung 9 zeigt die Abbaukurven von Melphalan für die beiden untersuchten Substanzkonzentrationen.

Die Rate des biologischen Abbaus von Melphalan beträgt bei der höheren Substanzkonzentration 87% (78-100%) und 98% (73-100%) im Versuch mit niedriger Konzentration. Ein weitgehend gleichbleibender Wert der täglichen Abbaurate A_t wird in beiden Versuchsreihen bereits nach relativ kurzen lag-Phasen von drei bzw. sechs Tagen erreicht. Melphalan hydrolysiert, wie auch Chlorambucil, unter Austausch der Chloridionen gegen Hydroxylgruppen und Bildung der Monohydroxy- und Dihydroxyspezies (MOH-L-PAM und DOH-L-PAM). Die Reaktion läuft schneller ab als beim Chlorambucil. Im Zulauf sind nach einem Tag nur noch rund 14% (8-17%) bzw., bei

der kleineren Melphalankonzentration, 21% (13-28%) der Ausgangsmenge nachweisbar. Während der gesamten Versuchsdauer waren Monohydroxy- und Dihydroxymelphalan im Ablauf nachweisbar. Die Konzentrationen schwankten jedoch von Tag zu Tag stark. Eine quantitative Auswertung der Signale war wegen fehlender Standardlösungen nicht möglich. Dihydroxymelphalan ist als Hauptmetabolit von Melphalan noch drei Wochen nach oraler Gabe der Substanz im Urin nachweisbar [AT].

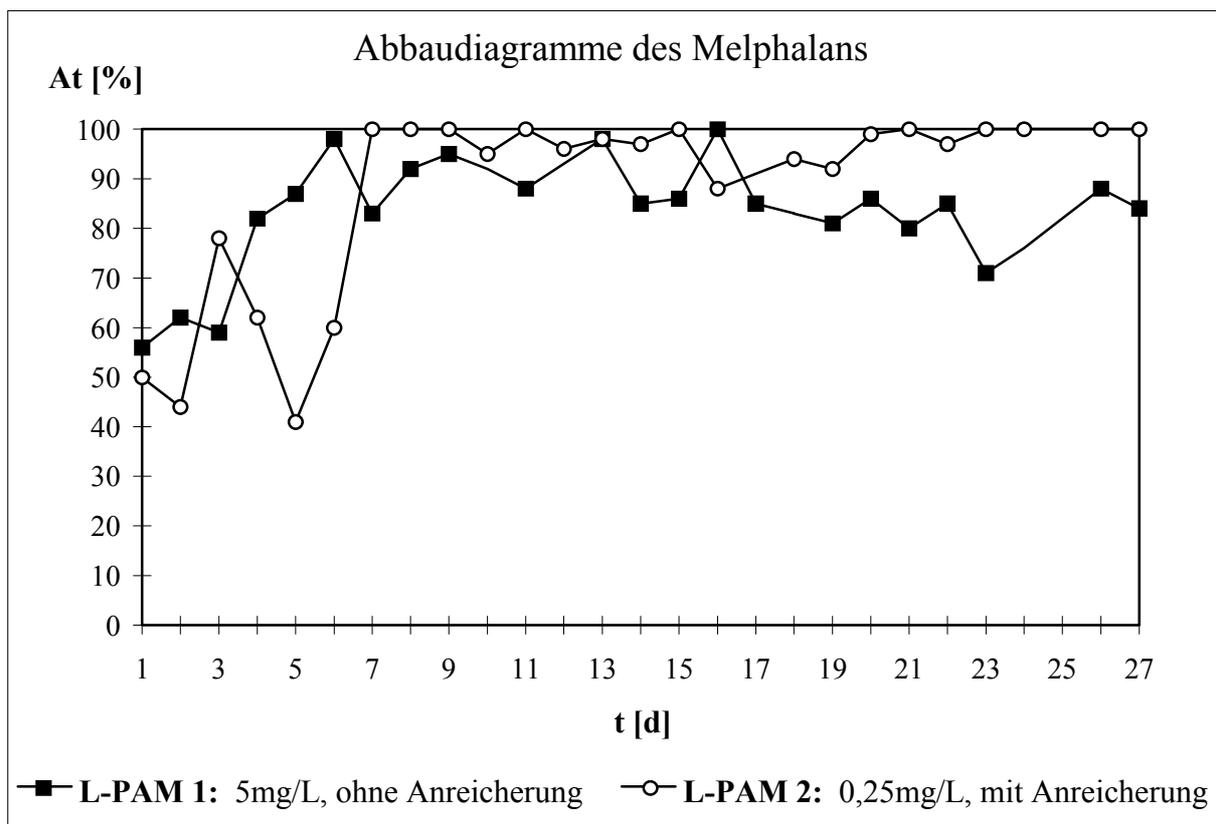


Abb. 9: Abbaudiagramme des Melphalans

Das Ausmaß der Hydrolyse im Zulauf entspricht dem in destilliertem Wasser (82% (76-86%) in 24 Stunden. Auch die relativen Anteile von Muttersubstanz und Mono- bzw. Dihydroxymelphalan in Zulauf und Vergleichsproben sind vergleichbar.

Durch diese ausgeprägte abiotische Zersetzung wurde die Bestimmung der eigentlichen Abbaurate erschwert, da im Ablauf nur noch sehr geringe Melphalankonzentrationen vorhanden waren. Insgesamt wurde Melphalan in beiden Versuchen durch abiotische Eliminierung und biologischen Abbau zusammengenommen fast vollständig aus dem Abwasser entfernt. Die Eliminierungsraten erreichten 98 bzw. 100%.

Abbauverhalten von Vinblastin

Abbildung 10 zeigt die Abbaukurven von Vinblastin für die beiden untersuchten Substanzkonzentrationen.

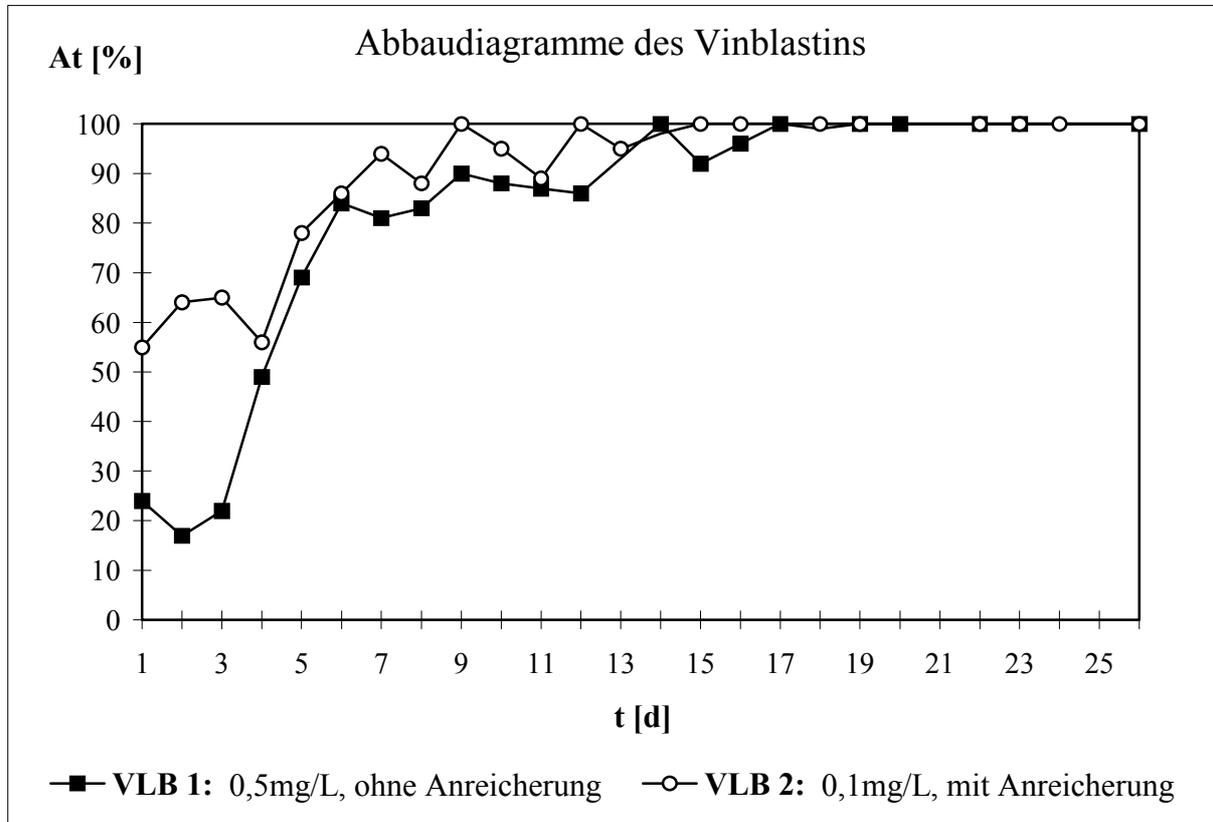


Abb. 10: Abbaudiagramme von Vinblastin

Vinblastin wird in beiden Konzentrationen schnell und quantitativ abgebaut. Die Einarbeitungsphasen sind mit fünf Tagen in beiden Versuchen relativ kurz. Die Abbauraten erreichten Werte von 94% (86-100%) bei den direkt messbaren Konzentrationen und 97% (90-100%) bei den niedrigen Substanzkonzentrationen.

Bei der ersten Versuchsreihe konnte nach dem 14. Tag, im zweiten Versuch vom 16. Tag an kein Vinblastin mehr im Ablauf nachgewiesen werden. UV- oder fluoreszenzaktive Abbauprodukte der untersuchten Substanz traten nicht auf. Im Gegensatz zu dem eigentlichen Abbauverhalten konnten bei der Substanzeeliminierung im Zulauf deutliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen beobachtet werden. Die Konzentrationsabnahme im Zulauf erreichte Mittelwerte von 60% (56-63%) bei hohen Konzentrationen, aber nur 33% (24-40%) beim zweiten Abbauversuch. Beide Werte liegen deutlich über den Zersetzungsraten von Vinblastin in destilliertem Was-

ser (8% in 30 Tagen). Woher diese Unterschiede rühren, konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht festgestellt werden. Durch die abiotische Eliminierung erhöht sich der insgesamt aus dem Abwasser entfernte Substanzanteil bei beiden Versuchen auf 98% der eingesetzten Vinblastinkonzentration.

4.2.5.4 Gruppe 4: Carmustin

Abbildung 11 zeigt die Abbaukurven von Carmustin für die beiden mit und ohne Anreicherung durchgeführten Abbauprüfungen.

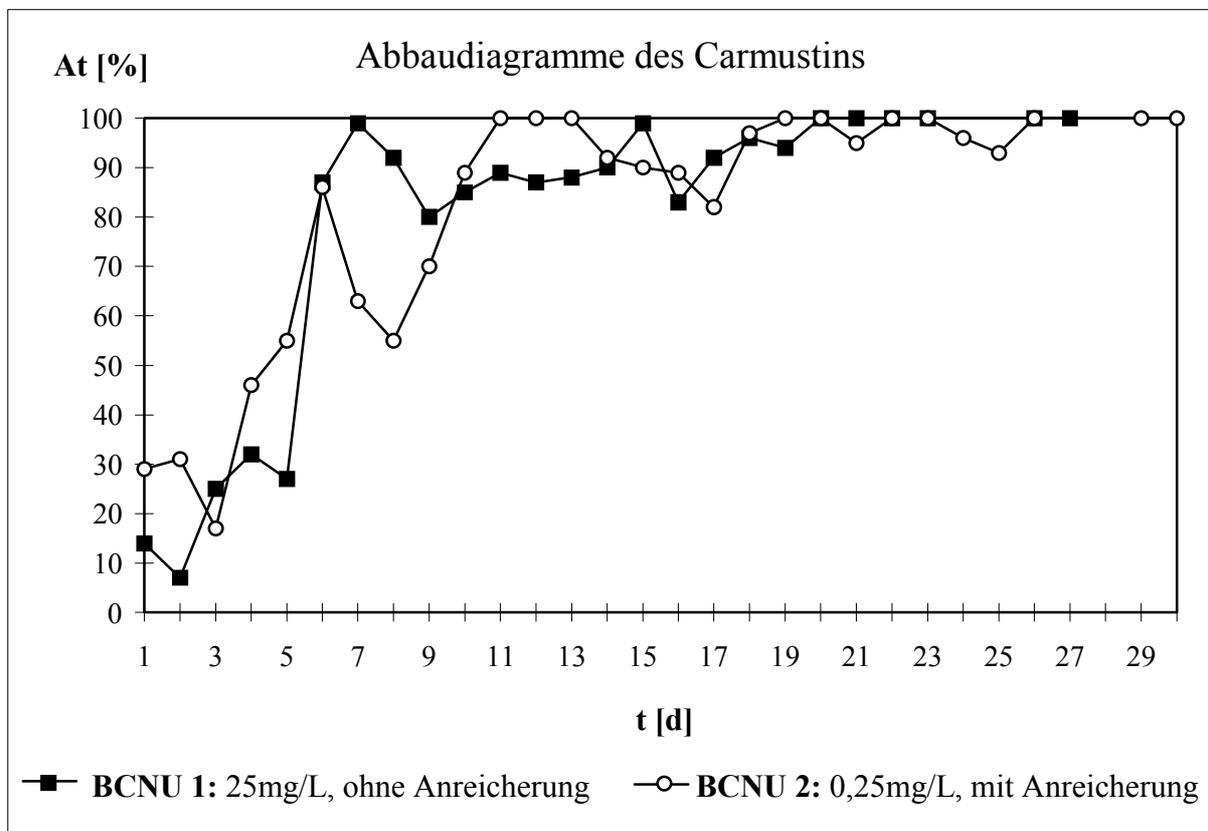


Abb. 11: Abbaudiagramme von Carmustin

Carmustin baut sich in beiden eingesetzten Substanzkonzentrationen verhältnismäßig schnell und vollständig ab. Es wurden ähnliche Abbauraten von 93% (80-100%) (hohe Konzentration) und 96% (82-100%) (niedrige Konzentration) ermittelt. Die lag-Phasen unterschieden sich dagegen mit sechs bzw. elf Tagen deutlich. Bemerkenswert sind auch die hohen Zersetzungs- bzw. Adsorptionsraten im Zulauf bei beiden

Versuchsreihen. Sie lagen zu Beginn der Versuche bei ca. 70% (68% bei hoher, 71% bei niedriger Konzentration). Im weiteren Verlauf der Abbauprüfungen nahmen die Zersetzungsraten aber allmählich ab bis auf Mittelwerte von 46 bzw. 39% der täglich zugesetzten Menge in der letzten Woche. Im Vergleich dazu lagen die Zersetzungsraten der Carmustinlösung in destilliertem Wasser nur bei durchschnittlich 11% (8-13%) in 24 h. Die Eliminierung des Carmustins aus dem Abwasser wird also sowohl durch biologische als auch abiotische Prozesse bewirkt und ist mit 97% (91-100%) und 98% (87-100%) als quantitativ zu bezeichnen.

UV- bzw. fluoreszenzaktive Abbauprodukte der Substanz waren mit den verwendeten Analyseverfahren nicht nachweisbar.

4.2.6 Diskussion der Ergebnisse

Mit dem gewählten Testverfahren und unter Verwendung spezifischer Analyseverfahren wird der Primärabbau erfasst, d.h. die Abnahme der Ausgangssubstanz. Nicht erfasst wird der ultimative Abbau zu anorganischen Endprodukten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch in Fällen, in denen keine Abbauprodukte nachgewiesen werden konnten, stabile und gegebenenfalls toxische Metaboliten gebildet werden.

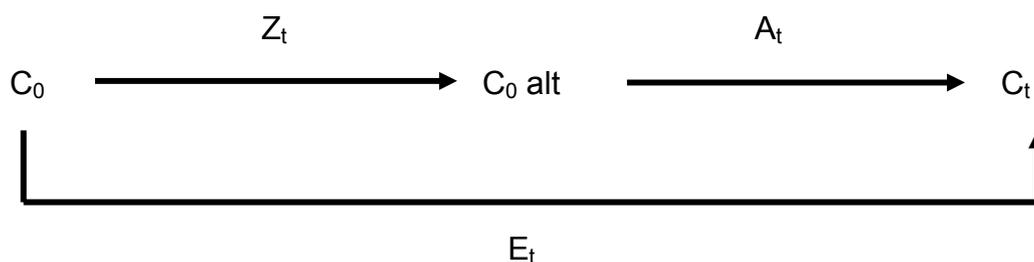
Die verwendete Testanordnung erlaubt keine Unterscheidung zwischen biologischen und abiotischen Prozessen *innerhalb* der Kläranlage. Prinzipiell ist den vorliegenden Ergebnissen nicht zu entnehmen, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß, ein biologischer Abbau durch eine – u.U. reversible - Adsorption der Prüfsubstanzen an den Klärschlamm vorgetäuscht wird.

Wie alle anderen standardisierten Testverfahren zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit wurde auch die hier verwendete Methode für die Abbauprüfung von Stoffen entwickelt, die in relativ großen und im wesentlichen gleichbleibenden Mengen in die Kläranlagen gelangen, wie es z. B. bei Tensiden der Fall ist. Adaptionszeiten von mehreren Tagen bzw. Wochen mit einer stetigen und konstanten Zufuhr von Zytostatika sind in der Realität jedoch nicht zu erwarten, so dass die tatsächlich erreichten Abbauraten wesentlich niedriger sein können als die mit dem beschriebenen Testverfahren ermittelten Werte.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche zeigen außerdem deutlich, dass zwischen biologischem Abbau in der Modellkläranlage und Substanzeeliminierung aufgrund

sonstiger Prozesse unterschieden werden kann und muss. Obwohl in den zitierten Versuchsvorschriften, wie allgemein in der entsprechenden Literatur, auf diese Problematik nicht eingegangen wird, scheint es sinnvoll, außer der Abbaurrate A weitere Größen zu definieren und zu bestimmen. Analog zu der entsprechend den verwendeten Abbauvorschriften definierten täglichen Abbaurrate A_t wird daher im weiteren mit der Zersetzungsrate Z_t die relative Konzentrationsminderung im Zulauf bzw. Ablauf angegeben, die nicht durch Vorgänge *in* der Kläranlage verursacht wird. Dazu wurde, wie bereits beschrieben, die Zytostatikakonzentration C_0 des frisch dotierten Zulaufs bestimmt. Nach ca. 24h, unmittelbar im Anschluss an die Bestimmung der Konzentration im Ablauf, wurde dann die Konzentration im Zulauf erneut als C_{0alt} gemessen.

Die hier als Eliminierungsrate E_t bezeichnete Größe gibt die relative Änderung der Konzentration zwischen dem frisch angesetzten Zulauf und dem Ablauf der Modellkläranlage wieder. Es bestehen die folgenden Zusammenhänge:



$$Z_t[\%] = \frac{C_0 - C_{0alt}}{C_0} 100 \quad (8)$$

$$A_t[\%] = \frac{C_{0alt} - C_t}{C_{0alt}} 100 \quad (9)$$

$$E_t[\%] = \frac{C_0 - C_t}{C_0} 100 \quad (10)$$

In Tabelle 12 sind die über den Bestimmungszeitraum gemittelten Werte für die Abbauraten A , die Zersetzungsraten Z und die Eliminierungsraten E angegeben.

Zytostatika	hohe Konzentration (ohne Anreicherung)				niedrige Konzentration (mit Anreicherung)		
	Z [%]	A [%]	E [%]	Metaboliten	Z [%]	A [%]	E [%]
Carmustin	52	93	97	keine	44	96	98
Chlorambucil	67	44	82	MOH, DOH, CLB*	65	61	86
Cyclophosph.	---	---	---	---	8	4	12
Cytarabin	13	65	70	keine	17	74	78
Etoposid	4	29	32	keine	5	36	39
Fluorouracil	4	92	93	keine	5	38	41
Melphalan	86	87	98	MOH, DOH	79	98	100
Methotrexat	4	90	90	7-OH-MTX	7	87	88
Vinblastin	60	94	98	keine	33	97	98

Tab. 12: Zersetzungs-, Abbau- und Eliminierungsraten der Abbauversuche

Wie aus obenstehender Tabelle ersichtlich, leisten die unter dem Begriff Zersetzung zusammengefassten Vorgänge insbesondere bei den Zytostatika Carmustin, Chlorambucil, Melphalan und Vinblastin einen erheblichen Beitrag zur Eliminierung dieser Substanzen aus dem synthetischen Abwasser. Diese Konzentrationsverringering im Zu- bzw. Ablauf kann durch verschiedene Prozesse verursacht werden:

- physikalische Phänomene, insbesondere Adsorption am PVC-Material der Sammelgefäße, aber auch Verdampfung,
- chemische Umwandlungen wie Hydrolyse, Photolyse sowie Reaktionen mit den Nährsubstanzen oder Salzen des synthetischen Abwassers,
- biologischer Abbau durch vorwiegend anaerobe Bakterien.

Die Bedingungen im Zu- bzw. Ablauf entsprechen dabei in mancher Hinsicht denen in realen Abwassersystemen. Auch hier sind aerobe und anaerobe Mikroorganismen vorhanden, wenn auch nicht in so großer Dichte, wie es in Kläranlagen und speziell den Belebungsbecken der Fall ist. Da der Sauerstoffgehalt geringer ist, werden an-

aerobe Spezies gegenüber Aerobiern begünstigt. Adsorption ist an den Oberflächen des Kanalsystems wie auch an Partikeln möglich. Und naturgemäß finden auch chemische Prozesse, insbesondere Hydrolyse, statt. Daher gibt das Verhalten einer Substanz im Zulauf auch wichtige Anhaltspunkte für die Stabilität und Lebensdauer einer Verbindung unter realen Bedingungen. Während die Kontaktzeit der im Abwasser vorhandenen Substanzen mit den Mikroorganismen in der Kläranlage nur einige Stunden beträgt, ist die Aufenthaltszeit im Abwassersystem an sich nicht zeitlich begrenzt. Die entsprechenden Eliminierungsprozesse schreiten laufend weiter bis zur vollständigen Beseitigung der Substanz. Auch wenn eine Substanz, wie beispielsweise Chlorambucil, im Abbautest gemäß der vorgeschriebenen Versuchsauswertung nur eine Abbaurrate von ca. 40-60% erreicht, erscheint die damit verbundene Einstufung als „nicht abbaubar“ angesichts der beträchtlichen Hydrolyseneigung dieser Verbindung wenig sinnvoll. Mit dem Auftreten messbarer Mengen an Chlorambucil im Oberflächenwasser ist nach den vorliegenden Versuchsergebnissen nicht zu rechnen. Gleiches gilt für das ebenfalls hydrolytisch zersetzte Melphalan.

4.2.7 Statistische Auswertung der Anreicherungsversuche

Bei den durchgeführten Abbauversuchen handelt es sich um biologische Untersuchungen, die naturgemäß eine größere Schwankungsbreite aufweisen als rein chemische Experimente. Veränderungen der Abbaurrate von Tag zu Tag sind nicht unbedingt auf Messfehler zurückzuführen, sondern können auch die sich verändernde Abbauleistung des biologischen Systems wider spiegeln. Dem trägt der mit einundzwanzig Tagen relativ lange Bewertungszeitraum, über den die tägliche Abbaurrate gemittelt wird, Rechnung. Zudem wird eine Wiederholung der Abbauversuche in den meisten Vorschriften gefordert.

Die Versuchsergebnisse werden jedoch, außer durch die natürlichen Gegebenheiten, auch durch die statistischen Fehler des Untersuchungsverfahrens, d. h. der chromatographischen Analyse und gegebenenfalls des Anreicherungsverfahrens, beeinflusst. Die Bestimmung von C_0 , C_{0alt} und C_t (als Peakhöhen) wurde daher mindestens dreimal, bei Abweichungen einzelner Werte vom Mittelwert von mehr als 8%, bis zu sechsmal durchgeführt. Die Fehler von Z_t , A_t und E_t lassen sich durch Ableitung der diese Größen definierenden Gleichungen (8) bis (10) berechnen gemäß:

$$\Delta Z_t = \left| \frac{\partial Z_t}{\partial C_0} \right| \Delta C_0 + \left| \frac{\partial Z_t}{\partial C_0 alt} \right| \Delta C_0 alt = C_0 alt C_0 + C_0 \Delta C_0 alt \quad (11)$$

$$\Delta A_t = \left| \frac{\partial A_t}{\partial C_t} \right| \Delta C_t + \left| \frac{\partial A_t}{\partial C_0 alt} \right| \Delta C_0 alt = C_0 alt \Delta C_t + C_t \Delta C_0 alt \quad (12)$$

$$\Delta E_t = \left| \frac{\partial Z_t}{\partial C_t} \right| \Delta C_t + \left| \frac{\partial E_t}{\partial C_0} \right| \Delta C_0 = C_0 \Delta C_t + C_t \Delta C_0 \quad (13)$$

Die maximalen relativen Fehler ergeben sich für die Versuche ohne Anreicherung zu:

$$\frac{\Delta Z_t}{Z_t} [\%] = \frac{\Delta A_t}{A_t} [\%] = \frac{\Delta E_t}{E_t} [\%] = 3\% + 3\% = 6\% \quad (14)$$

und für die Versuche unter Einbeziehung der Anreicherung gilt:

$$\frac{\Delta Z_t}{Z_t} [\%] = \frac{\Delta A_t}{A_t} [\%] = \frac{\Delta E_t}{E_t} [\%] = 6\% + 6\% = 12\% \quad (15)$$

Die Fehler der Zersetzungsrate Z, der Abbaurate A sowie der Eliminierungsrate E berechnen sich als Fehler der Mittelwerte der entsprechenden täglich bestimmten Werte:

$$\Delta Z = \sqrt{\frac{\sum (\Delta Z_t)^2}{n^2}} \quad (16)$$

$$\Delta A = \sqrt{\frac{\sum (\Delta A_t)^2}{n^2}} \quad (17)$$

$$\Delta E = \sqrt{\frac{\sum (\Delta E_t)^2}{n^2}} \quad (18)$$

n := Anzahl der Messungen des täglichen Wertes während des Bewertungszeitraums

Mit den Abweichungen ΔZ_t , ΔA_t und ΔE_t werden die Abweichungen der jeweiligen Werte vom angegebenen Mittelwert bezeichnet. Als absolute Fehler der Zersetzungs-, der Abbau- und der Eliminierungsrate ergeben sich damit bei den Versuchen

unter Einbeziehung der Anreicherung Werte von 2 bis 4%. Bei den Abbauprüfungen mit direkt messbaren Zytostatikakonzentrationen liegen sie zwischen 0 und 3%. Die ermittelten Abbauraten, ebenso wie die Zersetzungs- und Eliminierungsraten wurden somit mit ausreichender Genauigkeit ermittelt.

4.3 Adsorption am Klärschlamm

4.3.1 Allgemeines

Bei dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Testverfahren zur Simulation des biologischen Abbauverhaltens bedeutet das Ergebnis "abbaubar", dass mindestens 80 % der untersuchten Substanz unter den Testbedingungen in dem Abwasser nicht mehr nachweisbar waren. Dieser Primärabbau erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit auch unter realen Bedingungen, dennoch kann prinzipiell weder die Bildung von Metaboliten noch eine Ad- oder Absorption der Muttersubstanz insbesondere an Klärschlamm ausgeschlossen werden. Beide Effekte würden gegebenenfalls einen biologischen Abbau der Muttersubstanz vortäuschen. Bei den nach bisherigen Erkenntnissen als (teilweise) abbaubar eingestuft Substanzen sind daher weitere Untersuchungen erforderlich, um die Ergebnisse der Abbauprüfungen richtig interpretieren zu können. Dabei ist besonders das Ad- bzw. Absorptionsverhalten dieser Zytostatika an Klärschlamm, aber auch die Bildung sowie die toxikologischen und ökotoxikologischen Eigenschaften von Zytostatikametaboliten während des Aufenthalts im Abwassersystem bzw. in der Kläranlage von Interesse.

Für die Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten an Klärschlamm wurden die Zytostatika 5-Fluorouracil und Methotrexat ausgewählt, da sich beide Substanzen in früheren Untersuchungen als vollständig abbaubar im Sinne des OECD-Confirmatory Tests erwiesen haben. Der Abbau des 5-Fluorouracil stellte sich dabei als konzentrationsabhängig heraus, wohingegen beim Methotrexat die Bildung des persistenten 7-Hydroxy-Methotrexat mit dem biologischen Abbau der Muttersubstanz erfolgt.

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden im Labor unter Verwendung eines realen mit Zytostatikallösungen dotierten Klärschlamm durchgeführt.

4.3.2 Probenahme

Da der Klärschlamm mit einer Zytostatikalösung dotiert werden sollte, musste ausgeschlossen werden, dass Kliniken, deren Abflüsse Zytostatika enthalten, an die ausgewählte Kläranlage angeschlossen waren. Nach einer Recherche eignete sich hierfür insbesondere die Kläranlage in Gruitzen.

Das ankommende Schmutzwasser wird zunächst durch den Rechen geleitet, der grobe Abfallstoffe zurückhält. Der Sandfang als nächster Reinigungsschritt lässt das Abwasser langsamer fließen, wodurch mitgeführte Sandpartikel und Kies absinken. Vor dem Belebungsbecken befindet sich ein Vorklärbecken, in dem Stoffe, die schwerer als Wasser sind, bei weiter verminderter Fließgeschwindigkeit absinken und ebenso wie die aufschwimmenden Stoffe, die leichter als Wasser sind, abgepumpt und beseitigt werden können. Die mechanische Abwasserreinigung ist hiermit abgeschlossen, das Abwasser enthält jetzt nur noch etwa 2/3 seiner Gesamtverschmutzung in gelöster und kolloidaler Form. Das vorgereinigte Abwasser fließt in das Belebungsbecken, wo es mit Druckluft oder mechanischen Vorrichtungen belüftet wird. Nach der eigentlichen biologischen Reinigungsstufe schließt sich ein Nachklärbecken an, in dem der Schlamm sedimentiert und auf diese Art vom gereinigten Abwasser abgetrennt wird. Das gereinigte Abwasser fließt dann in den Vorfluter (Düsel). Der Überschussschlamm wird teilweise wieder in das Belebungsbecken zurückgeführt, ein Teil wird entfernt und mit dem Vorklärschlamm in die Schlammbehandlungsanlage geleitet. Der aus Vor- und Nachklärung anfallende Schlamm wird zunächst in einem Rohschlammeindicker mechanisch durch Schwerkraft entwässert. Der eingedickte Schlamm verbleibt dann mehr als zwanzig Tage bei 37 °C im sog. Faulbehälter, in dem der Schlamm unter anaeroben Bedingungen stabilisiert wird, wobei hauptsächlich Methan, CO₂ und Wasser entstehen. Der anaerob stabilisierte Faulschlamm wird nochmals entwässert und getrocknet, so dass ein Feststoffgehalt von 25 - 40 Gew.-%, in einigen Fällen auch bis zu 65 Gew.-% erreicht werden kann. Da der abgezogene Schlamm gefriergetrocknet werden sollte, wurde Schlamm aus dem Faulschlammeindicker entnommen, weil auf diese Weise der Energieaufwand beim Trocknen so gering wie möglich gehalten wurde. Die Probenahme erfolgte

vormittags am 12. September 1998 bei sonnigem Wetter, die Temperatur betrug etwa 20°C.

Es handelte sich hierbei um die Entnahme einer Einzelprobe. Der Schlamm wurde in einen PE-Kanister gefüllt und nach dem Transport bei 4°C aufbewahrt. Der pH-Wert des Schlammes betrug 7,5. Abbildung 12 zeigt eine Kläranlage, die in etwa der Kläranlage in Gruiten entspricht.

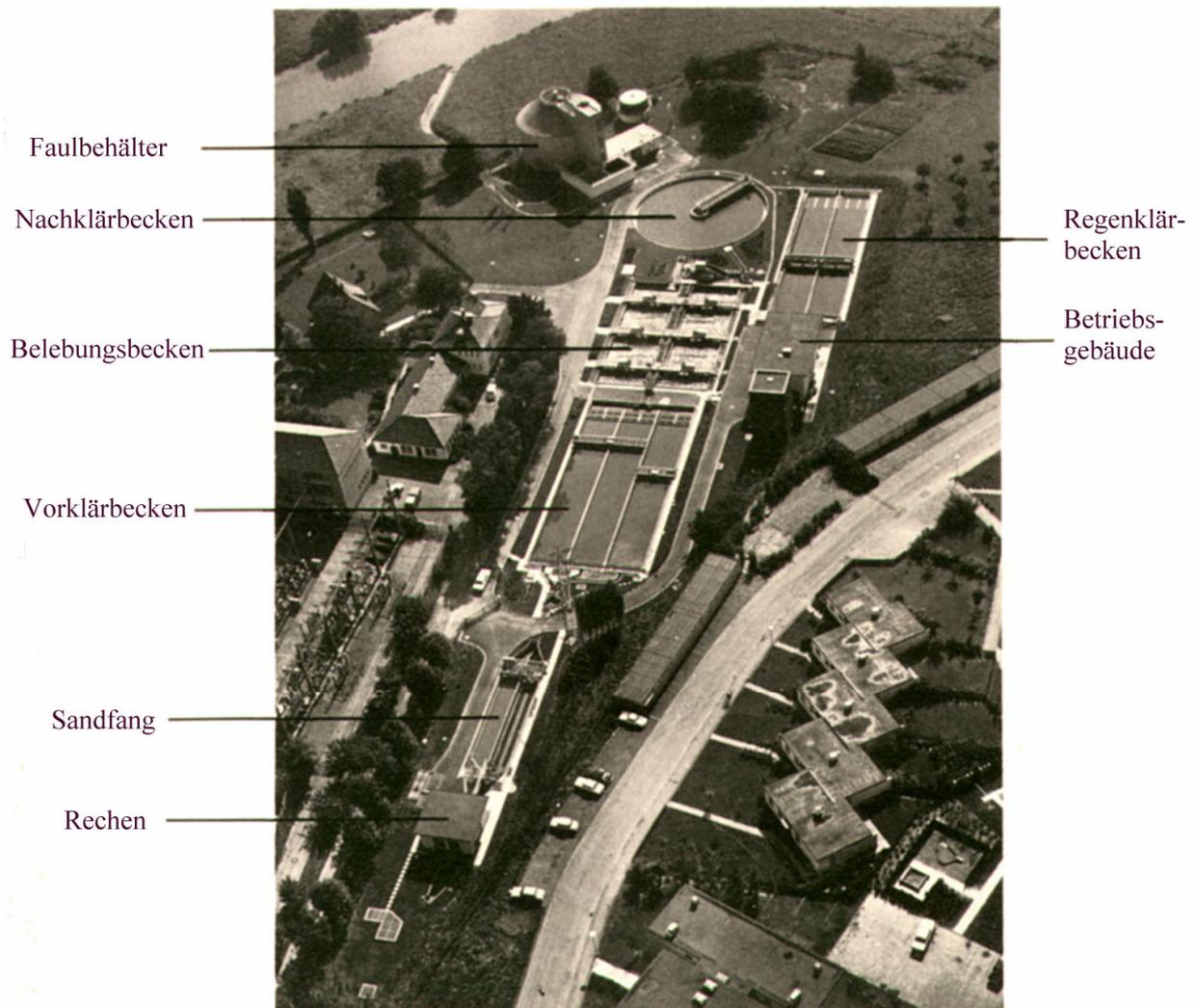


Abb. 12: Foto der Kläranlage Schwerte

4.3.3 Probenvorbehandlung

Der bei 4°C gelagerte Schlamm wurde zunächst gefriergetrocknet. Hierbei wird das Wasser durch Anlegen eines Vakuums bei -50°C entfernt. Dabei kommt es zur Desintegration der Zellen, d.h. die in der Bakterienmasse eingeschlossenen Substanzen liegen jetzt partikulär im Gemisch mit anderen Schlamminhaltsstoffen vor. Der auf diese Weise gefriergetrocknete Schlamm ist staubförmig, muss aber für eine weitergehende Analyse noch homogenisiert werden, weshalb die Probe mit einer Mahlvorrichtung zerkleinert wird.

4.3.4 Dotierung des gefriergetrockneten Klärschlammes

Die Dotierung des gefriergetrockneten Klärschlammes erfolgte in allen Untersuchungen mit einer Stammlösung, die das entsprechende Zytostatikum in bidestilliertem Wasser enthielt. Da die Menge des zur Verfügung stehenden getrockneten Schlammes begrenzt war, wurden jeweils 0,50g auf einer Analysenwaage abgewogen, in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und mit jeweils 10 ml einer Stammlösung versetzt. Rechnet man mit einer Dichte von 1g/cm^3 , so ergibt dies einen Feststoffgehalt der Suspension von 4,8%. Geht man zusätzlich von der Annahme aus, dass der getrocknete Schlamm durch Wasseraufnahme aus der Umgebung bereits 10% an Feuchtigkeit enthält, so ergibt dies einen Feststoffgehalt von 4,3%. Da gefriergetrockneter Schlamm stark hygroskopisch ist und eine Wasseraufnahme durch die in der Luft enthaltene Feuchtigkeit während des Abwiegens und der Lagerung nicht zu vermeiden ist, ist diese Annahme durchaus gerechtfertigt [Wei97]. Die Suspension wurde anschließend unter intensivem manuellen Schütteln homogenisiert. Die Erlenmeyerkolben wurden mit Alufolie bedeckt, um so Flüssigkeitsverluste aufgrund von Verdunstung zu minimieren und auf einem Reagenzglasschüttler bei 200 U/min geschüttelt, so dass eine gute Durchmischung der Probe gewährleistet war. An den Wänden haftende Partikel wurden der Suspension in regelmäßigen Zeitabständen durch manuelles Schütteln wieder zugeführt.

Die Konzentration des Adsorptivs in der Suspension richtete sich zunächst nach den analytischen Nachweisverfahren. Da mit der HPLC-UV/DAD-Analyse ein substanzspezifisches Nachweisverfahren gewählt wurde, konnte, im Gegensatz zu den unspezifischen Summenbestimmungsverfahren für organische Wasserinhaltsstoffe, wie

der Bestimmung des CSB oder TOC, die Konzentrationsänderung des Adsorptivs in der Suspension über die Zeit verfolgt werden. Um eindeutige Aussagen über das Adsorptionsverhalten machen zu können, enthielten die angesetzten Stammlösungen i.d.R. das Zytostatikum in einer Konzentration von 20 mg/l, was gleichzeitig der Konzentration in der Suspension entsprach, da der Klärschlamm direkt mit einer Stammlösung aufgeschlämmt und dotiert wurde.

Die Entnahme einer Probe erfolgte für einen Ansatz nur einmal, um in allen Reaktionsgefäßen die gleichen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Mit dieser Versuchsplannung lassen sich auch eventuelle Reaktionsunterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen ermitteln.

Es wurden pro Messreihe mehrere Ansätze gleichzeitig angesetzt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur bei etwa 22°C +/- 2°C durchgeführt.

Nach Beendigung eines Schüttelversuchs wurde 1 ml der nochmals durch manuelles Schütteln homogenisierten Suspension mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und in ein 1,5 ml safe-lock Gefäß gefüllt und fünf Minuten bei 13000 U/min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. In allen Fällen bildete sich eine gut absetzbare Feststoffphase. Der wässrige Überstand, der je nach Versuchsdauer schwach gelb bis honigfarben gefärbt war, wurde mit einer Einmalspritze abgezogen und anschließend zur Abtrennung partikulärer Bestandteile durch einen 0,45 µm Einmalfilter filtriert. Der auf diese Weise erhaltene Überstand konnte dann direkt in die HPLC injiziert und analysiert werden. Darüber hinaus wurde der pH-Wert des wässrigen Überstands mit pH-Teststäbchen bestimmt.

Während jeder Versuchsreihe wurde ein Kontrollansatz, der 10 ml der Zytostatikallösung ohne Matrix enthielt, unter identischen Bedingungen, d.h. gleichen Licht- und Temperaturverhältnissen, neben den Reaktionsansätzen während der gesamten Versuchsdauer positioniert. Von diesem Kontrollansatz wurden auf die gleiche Weise Aliquote von 1 ml entnommen und aufgearbeitet, um zwischen Hydrolyse, Photolyse und Elimination der Primärschubstanz unterscheiden zu können. Die Untersuchungen wurden im sauren pH-Bereich bei etwa pH fünf durchgeführt, da aus der Literatur bekannt ist, dass die Adsorptionskapazität von Sedimenten unter diesen Bedingungen in der Regel am größten ist [ZM90].

4.3.5 Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten

4.3.5.1 Kurzzeit-Adsorptionsmessungen

Bei den Kurzzeit-Adsorptionsmessungen wurde der Schüttelversuch etwa dreißig Minuten nach der Dotierung des gefriergetrockneten Schlammes mit einer Zytostatikalösung beendet. Der Vergleichsansatz und der Ansatz für die Adsorptionsmessung wurden unter identischen Bedingungen aufgearbeitet. Dabei wurde die Konzentration des Vergleichsansatzes auf 100% normiert und mit der Konzentration des Adsorptionsansatzes verglichen. Um jegliche biologische Aktivität auszuschließen, wurde den dotierten Klärschlammproben Natriumazid zugesetzt. Natriumazid ist ein Inhibitor, der jegliche metabolische Aktivität (methanogen, hydrolytisch und acetogen) der Biomasse hemmt, indem es den Elektronentransfer auf Cytochrom b unterbindet [NKF96].

4.3.5.2 Langzeit-Adsorptionsmessungen

Bei den Langzeit-Adsorptionsmessungen wurden die Schüttelversuche für 5-Fluorouracil nach einem Tag (24 h), drei Tagen (72 h) und fünf Tagen (120 h) und für Methotrexat nach einem Tag (24 h), drei Tagen (72 h), fünf Tagen (120 h) und acht Tagen (192 h) beendet. Es wurden pro Versuchsreihe vier bzw. fünf Ansätze gleichzeitig angesetzt, wovon ein Ansatz den Kontroll- bzw. Vergleichsansatz darstellte, der 10 ml der reinen Zytostatikalösung ohne Matrix enthielt. Nach Beendigung der Langzeit-Messung wurde der Schlamm des zuletzt beprobten Ansatzes aufgearbeitet und extrahiert. Auf diese Weise war feststellbar, ob es sich bei der beobachteten Elimination um Adsorption oder Abbau handelt. Den Ansätzen der Langzeit-Adsorptionsmessungen wurde kein Natriumazid hinzugefügt, da die bakterielle Aktivität nicht unterdrückt werden sollte.

4.3.5.3 Ergebnisse der Adsorptionsmessungen

Ergebnisse der Adsorptionsmessungen für 5-Fluorouracil

Beim 5-Fluorouracil ist nach Durchführung der Kurzzeit-Adsorptionsmessungen keine signifikante Konzentrationsänderung des Adsorbaten gegenüber der Vergleichslösung festzustellen. Die ermittelten Konzentrationsunterschiede liegen jeweils im Bereich der Messunsicherheit des analytischen Verfahrens.

Es ist in diesem Zusammenhang wichtig, den Vergleichsansatz unter identischen Bedingungen aufzuarbeiten, um den Einfluss der Filtration und der Zentrifugation herauszumitteln.

Die Schüttelversuche zur Ermittlung der Langzeit-Adsorption wurden für 5-Fluorouracil jeweils dreimal durchgeführt. Die ermittelten Eliminationsraten sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Kontaktzeit	1. Messreihe	2. Messreihe	3. Messreihe
Elimination nach 24h	59%	60%	72%
Elimination nach 72h	96%	90%	87%
Elimination nach 120h	100%	100%	100%

Tab. 13: Eliminationsraten von 5-Fluorouracil in Abhängigkeit der Versuchsdauer

Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, beträgt die Eliminationsrate für 5-Fluorouracil bereits nach 24h in allen Ansätzen über 50%, nach drei Tagen sind im Mittel bereits 90% der ursprünglichen Menge eliminiert, und nach fünf Tagen konnte kein 5-Fluorouracil in der Probenlösung nachgewiesen werden. Eine Hydrolyse oder Photolyse der Primärschubstanz ist jedoch auszuschließen, da keine signifikante Konzentrationsänderung im Vergleichsansatz beobachtet wurde.

Die für das System ermittelte Bestimmungsgrenze lag für 5-Fluorouracil bei 0,1 mg/l. Um an die Schlammteilchen adsorbiertes 5-Fluorouracil nachzuweisen, wurden die Schlammproben wie beschrieben aufgearbeitet und extrahiert.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den wässrigen Überstand einer mit 5-Fluorouracil dotierten Klärschlammprobe nach einem (Abb. 13) bzw. drei (Abb. 14) Tagen.

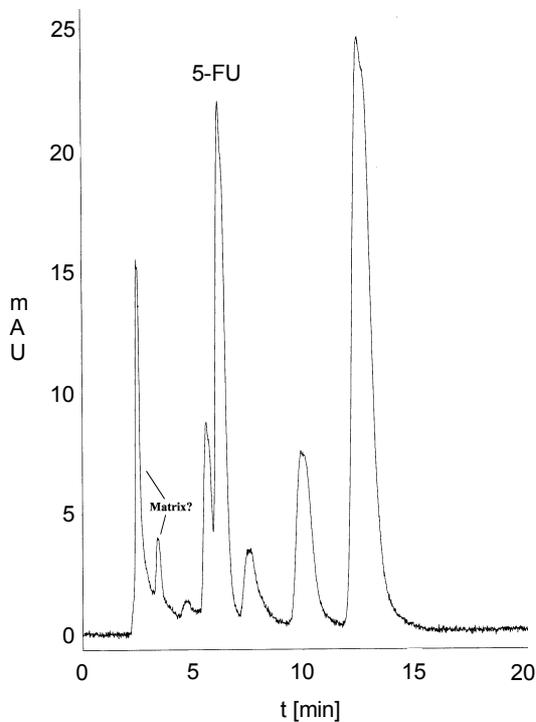


Abb. 13: Klärschlammprobe nach einem Tag

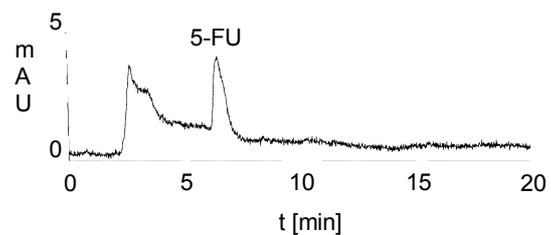


Abb. 14: Klärschlammprobe nach drei Tagen

Bei den in Abb. 13 nicht zugeordneten Peaks könnte es sich um kurzzeitig auftretende Metabolite des 5-Fluorouracil handeln, da beim Vergleich der UV-Spektren eine gewisse Übereinstimmung hinsichtlich der Absorptionsmaxima festzustellen war. Diese Vermutung konnte wegen fehlender Referenzsubstanzen nicht verifiziert werden. In der Literatur existieren jedoch Hinweise auf die Bildung aktiver Metabolite [SBB90, NPB94]. Hierbei handelt es sich um die Substanzen 5-Fluoro-5,6-dihydrouracil (FuH_2), 5-Fluorouridin (Furd) und 5-Fluoro-2'-deoxyuridin (Fdurd). Ebenso wird deutlich, dass die Matrixbelastung nach mehrtägigem Schütteln drastisch verringert ist. Dies ist möglicherweise auf die Inkorporation der in der getrockneten Substanz vorliegenden partikulären Bestandteile in die Bakterienmasse zurückzuführen, die den Bakterien als Nährstoffe dienen. Während das Filtrat am ersten Tag eine dunkelgelbe Färbung aufwies, war das Filtrat nach mehrtägigem Schütteln

nur noch schwach gelb gefärbt, was ebenfalls auf eine biologische Aktivität hindeutet.

Ergebnisse der Adsorptionsmessungen für Methotrexat

Ebenso wie beim 5-Fluorouracil ist beim Methotrexat nach dreißigminütigem Schütteln keine signifikante Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase zu beobachten. Die ermittelten Konzentrationsunterschiede liegen im Bereich der Messgenauigkeit des analytischen Verfahrens. Deshalb wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Konzentrationsabnahme nach jeweils einem, drei, fünf und acht Tagen verfolgt. Wie beim 5-Fluorouracil wurden die Schüttelversuche jeweils dreimal durchgeführt. Die ermittelten Eliminationsraten sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Kontaktzeit	1. Messreihe	2. Messreihe	3. Messreihe
Elimination nach 24 h	36%	24%	18%
Elimination nach 72 h	45%	31%	29%
Elimination nach 120 h	90%	91%	92%
Elimination nach 192 h	100%	100%	100%

Tab. 14: Eliminationsraten von Methotrexat in Abhängigkeit der Versuchsdauer

Ebenso wie beim 5-Fluorouracil findet eine vollständige Eliminierung der Primärsubstanz statt. Jedoch ist nach fünf Tagen noch eine messbare Konzentration von Methotrexat in der Probenlösung nachzuweisen, und erst nach acht Tagen beträgt die Eliminationsrate 100%. Die Bestimmungsgrenze für Methotrexat wurde unter den gegebenen Bedingungen zu 0,2 mg/l ermittelt. Eine Eliminationsrate von 100% bedeutet demzufolge, dass weniger als 0,2 mg/l Methotrexat in der Probelösung vorliegen. Auch hier ist eine Hydrolyse oder photochemische Zersetzung der Primärsubstanz auszuschließen, da die Methotrexat-Abnahme im Kontrollansatz nach acht Tagen nur etwa 7% betrug.

Mit der Elimination des Methotrexat geht aber die Bildung des persistenten 7-Hydroxy-Methotrexat einher. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Umwandlung

von Methotrexat zu 7-Hydroxy-Methotrexat durch Aldehyd-Oxidase erfolgt [EBL86]. Sowohl während der biologischen Elimination durch Bakterien als auch bei Metabolisierung im menschlichen Körper entsteht 7-Hydroxy-Methotrexat als Hauptmetabolit. Bei Anwendung der Hochdosistherapie werden bis zu 70% der verabreichten Methotrexatmenge als 7-Hydroxy-Methotrexat ausgeschieden [LK80]. Die Substanz ist nach dem gleichen Mechanismus, wenn auch in geringerem Ausmaß als die Muttersubstanz, zytostatisch aktiv [JSC76, LK80].

4.3.6 Extraktion dotierter Klärschlammproben

Das verwendete Extraktionsverfahren basiert im wesentlichen auf einem Verfahren zur Bestimmung von PAK in Schlamm mittels HPLC [RB94].

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Schlammmenge wurden anstatt 5 g nur 0,05 g Schlamm extrahiert. Dies ist zulässig, da die ursprüngliche Konzentration des Zytostatikums in der Probelösung über dem hundertfachen der Bestimmungsgrenze und über dem 10^7 -fachen der in der Umwelt zu erwartenden Konzentration lag. Bei der Extraktion einer realen Klärschlammprobe sollte daher die zu extrahierende Schlammmenge größer sein, um so eine Anreicherung der zu extrahierenden Komponenten im Extraktionsmittel zu erzielen.

Zunächst wurden aus den zuletzt beprobten Ansätzen Aliquote von 1 ml entnommen und in ein 1,5 ml safe-lock Gefäß pipettiert und anschließend fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde dann mit einer Einmalspritze entfernt und verworfen. Da die Konzentration des 5-Fluorouracil in der wässrigen Phase nach fünf Tagen unterhalb der Bestimmungsgrenze lag, wurde die Probe drei Stunden an der Luft getrocknet, danach mit einem Milliliter eines organischen Lösemittels versetzt und kurz geschüttelt (Vortex). Danach wurde die Probe für etwa eine Stunde im Ultraschallbad bei 40°C extrahiert. Nach Ablauf der halben Extraktionszeit wurde die Probe nochmals kurz geschüttelt. Nach Beendigung der Extraktion wurde die Probe wiederum fünf Minuten zentrifugiert, der organische Überstand mit einer Einmalspritze abgenommen und durch einen 0,45 µm Einmalfilter filtriert. Da der Wassergehalt von Schlamm etwa 95% beträgt und sich das Wasser nur unter aufwendigen Methoden vollständig entfernen lässt, erfolgte die Trocknung der dotierten

Schlammproben unter dem Aspekt, dass bei einer Extraktion keine falsch-positiven Befunde erhalten werden konnten.

Wenn die Konzentration des Zytostatikums in der wässrigen Phase unterhalb der Bestimmungsgrenze liegt, kann davon ausgegangen werden, dass bei einer Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel nur eine Extraktion der festen Phase erfolgt. Es handelt sich hiermit um eine Fest-Flüssig-Extraktion.

Zwar enthält der an der Luft getrocknete Schlamm immer noch eine bestimmte Menge an Wasser, jedoch kann bei einem positiven Befund einer Extraktion davon ausgegangen werden, dass nur die feste Phase extrahiert worden ist. Liegt die Konzentration des Zytostatikums in der Suspension dagegen über der für das System ermittelten Bestimmungsgrenze, so muss der Schlamm vor der Extraktion mehrmals mit wenigen Millilitern Wasser gewaschen werden, um die möglicherweise im Zwischenraum- bzw. Kapillarwasser enthaltene Stoffmenge nicht zu erfassen.

Vor der Extraktion von Methotrexat aus den zuletzt beprobten Ansätzen musste der Schlamm deshalb mit destilliertem Wasser gewaschen werden. In der Lösung war kein Methotrexat nachweisbar, jedoch lag der Hauptmetabolit 7-Hydroxy-Methotrexat in der Lösung in nachweisbarer Konzentration vor. Da der an der Luft getrocknete Schlamm noch mindestens 100 µl an Wasser enthielt, musste zunächst sichergestellt sein, dass bei der Extraktion nicht das 7-Hydroxy-Methotrexat aus der Lösung extrahiert wurde. Deshalb wurde die Probe mehrmals mit 1 ml Wasser versetzt und für zwei Minuten auf einem Vortexmischer geschüttelt, anschließend fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und der wässrige Überstand mit einer Einmalspritze abgenommen. Nach zweimaligem Waschen konnte kein 7-Hydroxy-Methotrexat in der wässrigen Phase nachgewiesen werden, die weitere Aufarbeitung entsprach nun dem für 5-Fluorouracil beschriebenen Verfahren.

4.3.7 Ergebnisse der Extraktionsmessungen

4.3.7.1 Extraktion von 5-Fluorouracil

Bei keinem der durchgeführten Extraktionsversuche konnte Fluorouracil aus dem Schlamm extrahiert werden. Hierbei ist anzumerken, dass für feste Matrices in der

Literatur zwei prinzipiell unterschiedliche Fragestellungen verfolgt werden. Bei der einen Fragestellung geht es um die Risikoabschätzung durch mit Gefahrstoffen belastete Böden, Schlämme und Abfallgemische in der Umwelt. Als Extraktionsmittel wird hierbei Wasser eingesetzt, um reale Umweltbedingungen zu simulieren. Bei der anderen Fragestellung geht es um den Gesamtgehalt einer Probe an umwelttoxischen Stoffen, wobei Lösungsmittel verwendet werden, in der die zu extrahierenden Komponenten besser löslich sind als in Wasser. Die Ergebnisse der verschiedenen Verfahren müssen deshalb immer kritisch gegenübergestellt und bewertet werden. Da 5-Fluorouracil in polaren Lösungsmitteln besser löslich ist als in unpolaren, konnte von einem positiven Befund durch eine Extraktion mit z. B. Chloroform nicht ausgegangen werden, was durch die Ergebnisse zusätzlich bestätigt werden konnte. Weder mit Wasser noch mit organischen Lösungsmitteln konnte eine oberhalb der Bestimmungsgrenze festzustellende Konzentration an 5-Fluorouracil aus der dotierten Klärschlammprobe extrahiert werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass 5-Fluorouracil zu einem Teil zu niedermolekularen Verbindungen abgebaut bzw. irreversibel an die Matrix gebunden wird, oder dass die an die Schlammpartikel adsorbierte Menge unterhalb einer Konzentration von 0,1 mg/l liegt. Sollte eine irreversible Bindung an die Matrix stattgefunden haben, so würde es sich dabei nicht um Adsorption, sondern vielmehr um Chemisorption handeln.

Abbildung 15 illustriert, auf welche Art 5-Fluorouracil eliminiert bzw. metabolisiert werden kann [YVG82].

Da nach Abschluss der Laboruntersuchungen an gefriergetrocknetem Klärschlamm eine Adsorption von 5-Fluorouracil aufgrund der experimentellen Daten und theoretischer Überlegungen ausgeschlossen werden konnte, wurden im weiteren Verlauf des Untersuchungsvorhabens die Substanzen Methotrexat, 7-Hydroxy-Methotrexat und Etoposid nach den im Anhang beschriebenen Arbeitsanweisungen für Realproben untersucht.

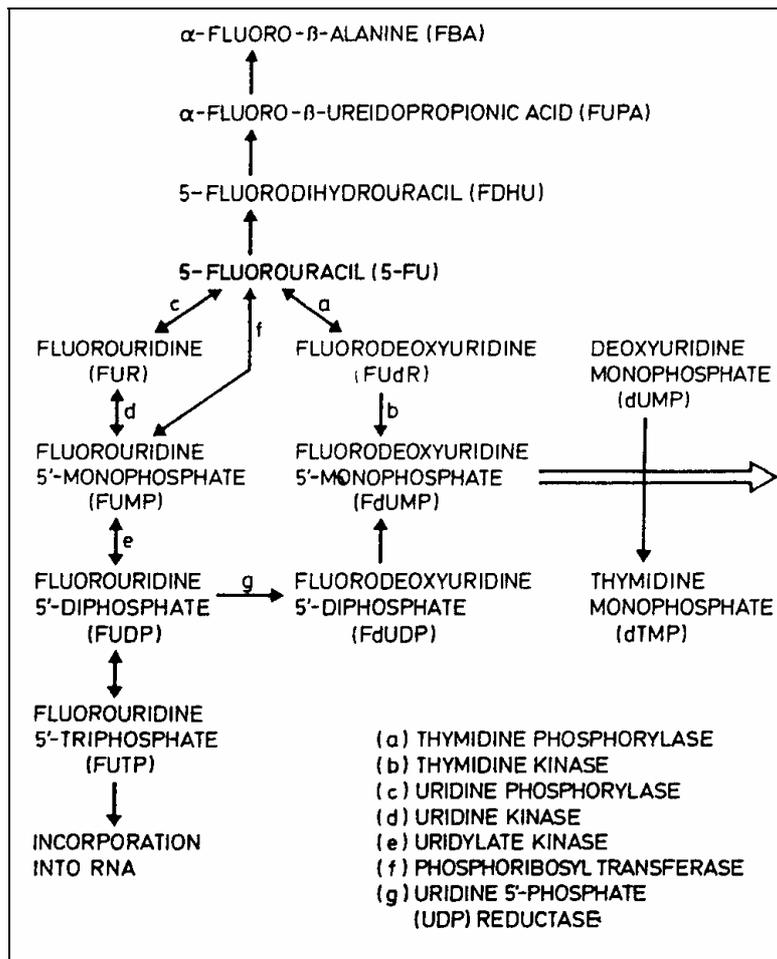


Abb. 15: Metabolismus von 5-Fluorouracil

4.3.7.2 Extraktion von Methotrexat

Bei der Extraktion der mit Methotrexat dotierten Klärschlammproben konnte in keinem der verwendeten Extraktionsmittel eine oberhalb der Bestimmungsgrenze liegende Konzentration an Methotrexat nachgewiesen werden. Dafür konnte sowohl mit Methanol als auch mit Wasser das 7-Hydroxy-Methotrexat extrahiert werden. Die Abb. 16 und 17 zeigen ein typisches Chromatogramm, das nach der Extraktion mit Methanol erhalten wurde. Um die Komplexität der Matrix zu verdeutlichen, wurden die bei den Wellenlängen 200 nm sowie 307 nm aufgenommenen Chromatogramme gegenübergestellt.

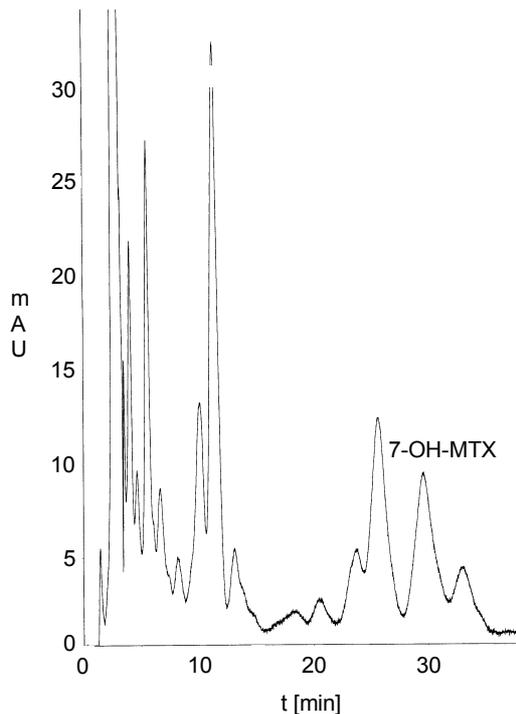


Abb. 16: Extraktion mit Methanol,
Wellenlänge 200 nm

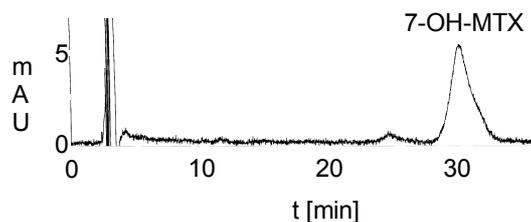


Abb. 17: Extraktion mit Methanol,
Wellenlänge 307 nm

Nur bei einer Wellenlänge von 307 nm ist eine präzise Quantifizierung von 7-Hydroxy-Methotrexat möglich. Die Abbildungen machen deutlich, dass eine vollständige Basislinientrennung von Substanzen, die nur im unteren Wellenlängenbereich zwischen 200 nm und 220 nm UV-aktiv sind, schlecht erreicht werden kann. Insbesondere im Spurenbereich wird die Problematik noch verstärkt, da es dann häufig vorkommen kann, dass kleinere Peaks direkt auf einer Flanke eines größeren Peaks liegen und so eine Quantifizierung unmöglich machen. Die einzige Chance, kleinere Peaks mit einer akzeptablen Standardabweichung zu quantifizieren, besteht, wenn der kleinere Peak vor dem größeren eluiert wird.

Ist dies aufgrund der chromatographischen Bedingungen nicht zu erreichen, so muss eine vollständige Basislinientrennung beider Peaks erreicht werden, was i.d.R. einer Auflösung größer 1,5 entspricht, in Extremfällen für ein Peakpaar mit einem Flächenverhältnis von 100 :1 sogar von $R = 3$. In der Realität weichen die Peakformen aber mehr oder weniger stark von der idealen Gaußform ab, und es kommt zu Peaktailing. Dabei wird häufig der kritische Wert von $T = 3$ überschritten, so dass eine korrekte Auswertung der Peakflächen ebenfalls nicht möglich ist. Insbesondere die starke Be-

lastung der Säule mit Matrixbestandteilen hat in vielen Fällen zu einer Verschlechterung des Trennergebnisses geführt, weshalb nach jeder Injektion ein ausgedehnter Spülschritt angeschlossen werden musste.

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen ein typisches Chromatogramm einer mit Methotrexat dotierten und mit Wasser extrahierten Klärschlammprobe. Es sind wiederum die Messungen bei den Wellenlängen 200 nm und 307 nm gegenübergestellt.

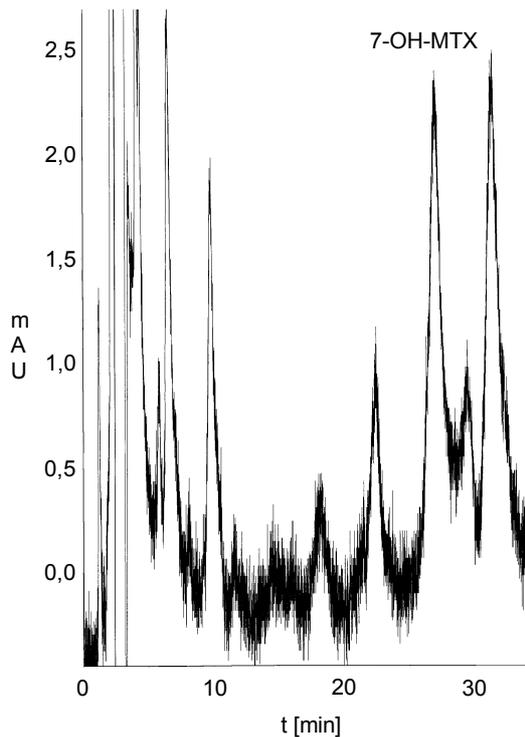


Abb. 18: Extraktion mit Wasser, Wellenlänge 200 nm

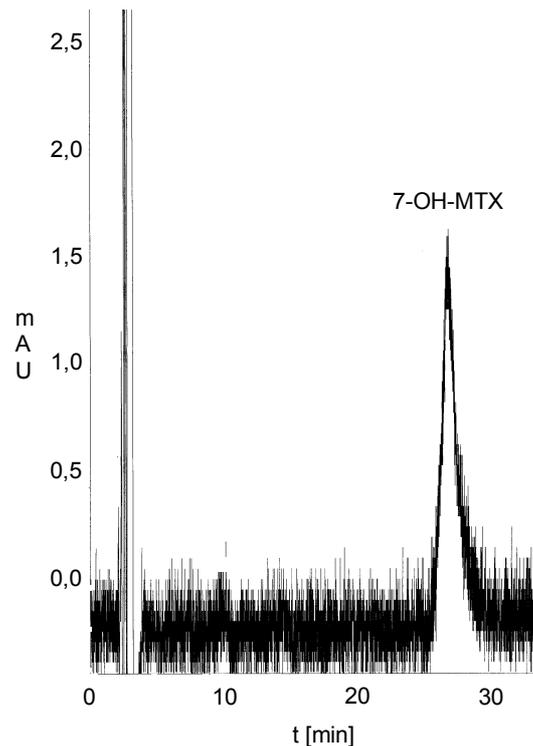


Abb. 19: Extraktion mit Wasser, Wellenlänge 307 nm

Beim Vergleich der Chromatogramme der mit Methanol und Wasser extrahierten Klärschlammproben wird ersichtlich, dass Methanol deutlich bessere Lösemitteleigenschaften besitzt, um das an den Schlamm adsorbierte 7-Hydroxy-Methotrexat zu extrahieren.

Ein generelles Problem bei der Extraktion organischer Spurenbestandteile aus verschiedenen Matrizes ist, dass gleichzeitig störende Matrixbestandteile ebenfalls extrahiert werden, so dass eine selektive Detektion des Analyten nicht möglich ist. Beim Methotrexat sowie seines Metaboliten konnte diese Schwierigkeit aber aufgrund der bei höheren Wellenlängen ausgeprägten UV-Aktivität umgangen werden, so dass in

allen Fällen ein eindeutiger Nachweis über die Retentionszeit in Verbindung mit dem UV-Spektrum der Substanz erhalten werden konnte. Die einzige Möglichkeit, dieses Problem bei Substanzen mit weniger aussagekräftigem UV-Spektrum zu umgehen, besteht prinzipiell in der Anwendung der Festphasenextraktion.

4.3.8 Diskussion der Ergebnisse

In den Adsorptionsversuchen konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Adsorption der Substanzen 5-Fluorouracil und Methotrexat an Schlammpartikel nach 30 Minuten nicht erfolgt, obwohl die Eliminationsrate beider Substanzen nach fünf bzw. acht Tagen 100% beträgt. Eine Hydrolyse bzw. Photolyse der Komponenten kann dabei ausgeschlossen werden, da die Messung des Kontrollansatzes, der das jeweilige Zytostatikum ohne Matrix enthielt und unter identischen Bedingungen gehandhabt und aufgearbeitet wurde, keine signifikante Konzentrationsabnahme der Primärsubstanz während des Bewertungszeitraumes ergab. Dies stützt im wesentlichen die Ergebnisse der Abbauuntersuchungen. Die beobachtete Elimination ist somit nicht auf eine Adsorption von 5-Fluorouracil an den Schlamm zurückzuführen.

Für das 7-Hydroxy-Methotrexat wurde ein positiver Befund bei der Extraktion des dotierten Schlammes erhalten. Um eine vorgetäuschte Adsorption von vornherein auszuschließen, wurde die entnommene Schlammsuspension zweimal mit je einem Milliliter destilliertem Wasser gewaschen, bis kein 7-Hydroxy-Methotrexat mehr im Überstand nachzuweisen war. Das erhaltene Signal kann somit nur von an Klärschlamm adsorbiertem 7-Hydroxy-Methotrexat herrühren.

Die Gegenüberstellung der Extraktion der dotierten Klärschlammprobe mit Wasser und Methanol zeigt, dass Methanol für das betrachtete System deutlich bessere Extraktionseigenschaften als Wasser besitzt. Mit unpolareneren Extraktionsmitteln wurden keine positiven Extraktionsbefunde erhalten. Dies kann einerseits an der schlechteren Löslichkeit des 7-Hydroxy-Methotrexat in diesen Lösungsmitteln, andererseits aber auch daran liegen, dass die Proben vor einer Injektion in die HPLC mit Argon bis auf wenige Mikroliter eingeeengt wurden, was möglicherweise Substanzverluste durch Verdampfen des Analyten zur Folge hat. Die Ergebnisse sind zunächst sorgfältig zu bewerten, da eine Adsorption an gefriergetrocknetem Schlamm erfolgte, der mit einer Zytostatikalösung definierter Konzentration aufgeschlämmt wurde. Der Feststoffgehalt des Klärschlammes entsprach den bei der Abwasserreinigung üblichen

Werten, jedoch ist die Ausbildung von Belebtschlammflocken, wie sie in Abwasserreinigungsanlagen anzutreffen sind, nicht zu erwarten. Das Adsorptionsverhalten derart aufbereiteter Schlämme kann sich demzufolge vom Adsorptionsverhalten nicht vorbehandelter Schlämme, die einer Kläranlage direkt entnommen wurden bzw. von Belebtschlamm allgemein unterscheiden.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass in diesem Fall das betreffende Zytostatikum die einzige Nährstoffquelle für die Bakterien darstellte. Im Realfall treten diese Stoffe aber in Konkurrenz zu den in deutlich höherer Konzentration vorliegenden organischen Bestandteilen des kommunalen Abwassers. Dies hat zur Folge, dass Spurenstoffe weniger selektiv erfasst werden, als es in dieser vereinfachten Versuchsanordnung der Fall ist.

Einen weiteren Aspekt stellt die Probenvorbereitung dar. Die beprobten Ansätze wurden drei Stunden unter einem gut ziehenden Abzug getrocknet, so dass 0,05g Schlamm im Maximalfall noch 100 µl an Wasser enthielten. Durch mehrmaliges Waschen einer solchen Schlammprobe wurde ausgeschlossen, dass die zu extrahierenden Komponenten im Zwickel- bzw. Kapillarwasser enthalten sind. Die Art der Trocknung hat einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das Analyseergebnis. Eine thermische Trocknung z.B. bei 105°C kann zur Folge haben, dass leicht zersetzliche Komponenten nicht erfasst werden.

Durch eine Gefriertrocknung kann bewirkt werden, dass sich Substanzen mit hohem Dampfdruck verflüchtigen und somit nicht erfasst werden. Alternativ hierzu bieten sich Verfahren an, bei denen die Originalschlammprobe extrahiert wird. Der Wassergehalt kann dann durch einmalige Gefriertrocknung einer definierten Schlammportion bestimmt werden, so dass eine Angabe der in der extrahierten Probe enthaltenen Komponenten bezogen auf die Trockensubstanz des Schlammes möglich ist.

Abschließend muss der Einfluss des Zeitintervalls, in dem der kontaminierte Schlamm behandelt wird (z. B. mechanische Schlammeindickung, Ausfäulung, etc.), auf das Extraktionsergebnis berücksichtigt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Bindungen mit zunehmender Zeit verfestigen können. Im Extremfall führt dies dazu, dass ein an Boden oder Schlamm adsorbierter Stoff nach einer bestimmten Zeit nicht mehr extrahierbar ist, es kommt zur Bildung sog. "Nicht-Extrahierbarer-Rückstände".

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Adsorption organischer Spurenbestandteile an Klärschlamm nicht auszuschließen ist, so dass unter Umständen eine Kontamination von Klärschlamm mit Zytostatika erfolgt.

4.4 Verdampfung von Zytostatika in der Atmosphäre

Während Produktion und Handhabung können pulverförmig vorliegende Zytostatika oder Lösungen von Zytostatika freigesetzt werden und in die Atmosphäre gelangen. Partikel werden in der Regel durch nasse oder trockene Deposition aus der Atmosphäre entfernt. Darüber hinaus können diese Partikel in Abhängigkeit des Dampfdruckes und weiterer Parameter in die Gasphase übergehen. Inwieweit diese Tatsache für den Eintrag in die Umwelt von Bedeutung ist, hängt im wesentlichen vom zeitlichen Verlauf des Verdampfungsvorganges ab.

In diesem Kapitel werden die Messwerte des Dampfdruckes ausgewählter Zytostatika und die daraus berechneten Verdampfungszeiten für feste Zytostatika-Partikel vorgestellt.

4.4.1 Sättigungskonzentration

Die Verdampfung bzw. Sublimation von festen bzw. flüssigen Substanzen hängt in erster Linie vom Dampfdruck der betreffenden Substanz ab. Jede Flüssigkeit und jeder feste Stoff hat bei gegebener Temperatur einen ganz bestimmten Dampfdruck [HW71]. Steht genügend Substanzmenge zur Verfügung, so wird sich in einem geschlossenen und verlustfreien System nach ausreichend langer Zeit die maximal erreichbare Dampfmassenkonzentration, d.h. die Sättigungskonzentration ρ_s der Substanz als Gleichgewicht einstellen. Die Sättigungskonzentration ist proportional zum Dampfdruck p_d . Weiterhin ist sie abhängig von der molaren Masse M_m , der allgemeinen Gaskonstanten R und der Temperatur T . Nachstehende Gleichung beschreibt vereinfacht den Zusammenhang unter der Annahme idealer Gase.

$$\rho_s = \frac{p_d M_m}{RT} \quad (19)$$

Werden parallel oder zeitlich hintereinander mehrere Substanzen freigesetzt, so erreicht unabhängig voneinander entsprechend den o.g. Bedingungen jeder einzelne Stoff seine individuelle Sättigungskonzentration. Nach dem Partialdruckgesetz von Dalton setzt sich die gesamte Dampfmassenkonzentration innerhalb eines Volumens additiv aus den Konzentrationen der einzelnen Komponenten zusammen.

4.4.2 Bestimmung des Dampfdrucks

In der Literatur [HSDB] sind für hochwirksame Arzneimittel nur sehr unzureichende Informationen zum Dampfdruck angegeben. So existieren nur Schätzwerte des Dampfdruckes für die Zytostatika Chlorambucil (0,00012 Pa bei 25 °C) und Chlor-naphazin (0,00026 Pa bei 25 °C). Zu den am häufigsten eingesetzten Zytostatika gehören u.a. Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil. Insbesondere für diese beiden Substanzen und die Zytostatika Carmustin, Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid wurde die Größe des Dampfdruckes experimentell ermittelt. Die Bestimmung ist Voraussetzung für die Berechnung sowohl der Sättigungskonzentration in der Gasphase als auch der Verdampfungszeiten von festen Partikeln unterschiedlicher Größe.

Im Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG bzw. der OECD Guideline 104 for the Testing of Chemicals werden die anerkannten und validierten Methoden zur Dampfdruckbestimmung von Feststoffen und Flüssigkeiten aufgelistet und beschrieben. Die hier vorgestellten Messwerte wurden im Einklang mit diesen Richtlinien mittels „Dampfdruckwaage“ bzw. „effusion method: vapor pressure balance“ ermittelt [HR59]. Der Versuchsaufbau zur Messung des Dampfdrucks ist detailliert im Anhang beschrieben.

Abbildung 20 zeigt die mittels Dampfdruckwaage ermittelten Messergebnisse. Auf der x-Achse ist der Kehrwert der Proben temperatur, auf der logarithmisch geteilten y-Achse der Dampfdruck aufgetragen. Die Messpunkte liegen auf der theoretischen Kurve, die durch die vereinfachte Clausius-Clapeyron-Gleichung beschrieben wird. Die Steigung der Geraden ist proportional zur molaren Verdampfungsenthalpie r :

$$\frac{1}{p} dp = \frac{r}{R T^2} dT \quad (20)$$

Die Bestimmung des Dampfdruckes wurde als Auftragsmessung von der Hüls Infracor GmbH (früher Hüls AG), Marl, durchgeführt. In dem Temperaturbereich von 20 °C bis 40 °C wurde in einer Schrittweite von 5 K oder 10 K gemessen. Der Dampfdruck für 5-Fluorouracil z.B. beträgt bei der Temperatur 20 °C (entsprechend 0,003413 K⁻¹) 0,0014 Pa und steigt bis 40 °C (bzw. 0,003195 K⁻¹) auf den Wert von 0,0039 Pa an. Die Dampfdrücke der anderen Substanzen liegen in derselben Größenordnung. Eine Ausnahme stellt das Zytostatikum Carmustin dar, das einen um den Faktor 10 bis 100 größeren Dampfdruck besitzt.

Die hier vorgestellten Messwerte basieren auf der Impulsmethode und weichen von der Kondensationsmethode weniger als 10 % ab.

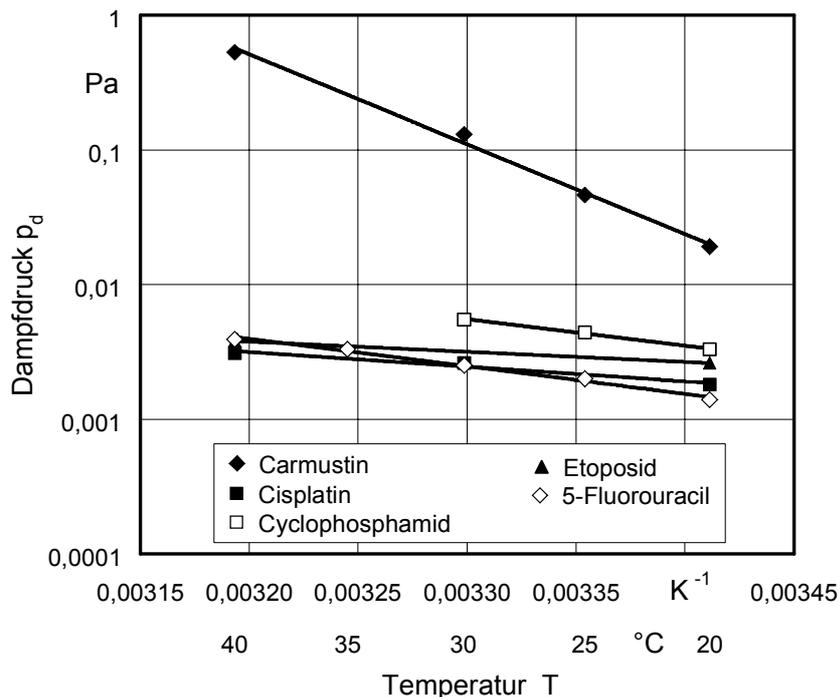


Abb. 20: Dampfdrücke ausgewählter Zytostatika

In einem geschlossenen und verlustfreien System erreicht jeder dieser Stoffe bei ausreichend vorhandener Substanzmenge über seiner Oberfläche die individuelle Sättigungskonzentration ρ_s . Die Gesamtkonzentration entspricht dann der Summe der Einzelkonzentrationen. Bei den Temperaturen von 20 °C und 40 °C werden über

den Dampfdruck p_d folgende Werte der Sättigungskonzentration ρ_s am Beispiel der Zytostatika Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil berechnet:

	Cyclophosphamid		5-Fluorouracil		Summenwert	
	$T = 20^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$	$T = 20^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$	$T = 20^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$
Dampfdruck p_d [Pa]	0,0033	0,009 ⁺	0,0014	0,0039	-	-
Sättigungs- konzentration ρ_s [mg/m ³]	0,36	0,9	0,08	0,20	0,44	1,1

⁺ extrapoliert

Tab. 15: Dampfdruck und Sättigungskonzentration von Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil

Über den zeitlichen Ablauf und die Zeitdauer bis zum Erreichen der Gleichgewichtskonzentration, also über die Dynamik des Vorgangs ist damit noch keine Aussage getroffen. Eine Abschätzung des Zeitverhaltens wird im folgenden Kapitel vorgenommen.

4.4.3 Verdampfungszeit

Die Verdampfung von Substanzen in Luft bei Normaldruck ist ein komplexer physikalischer Vorgang. Er hängt von einer Vielzahl sich teilweise gegenseitig beeinflussender Parameter ab. Die exakte Vorausberechnung des Vorgangs unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren ist nicht möglich. Um aber eine Vorstellung über die Zeitdauer des Vorgangs zu erhalten, wurde die Verdampfung von partikelförmigen Substanzen modellhaft näher betrachtet. Die nachstehenden Rechnungen wurden abgeleitet für frei schwebende Partikel im Raum, sie gelten aber auch näherungsweise für bereits im Filter abgeschiedene bzw. sich auf anderen freien Oberflächen befindliche Partikel. Verfolgt wird der zeitliche Verlauf der Größenänderung der Partikel.

Folgende Gleichung für die zeitliche Änderung des Durchmessers beim Verdampfen von Partikeln wird in [Hin82] beschrieben.

$$\frac{dd_P}{dt} = \frac{4 D_{AB} M_m}{R \rho_P d_P} \left(\frac{p_G}{T_G} - \frac{p_{d,P}}{T_P} \right) \quad (21)$$

Danach ist die zeitliche Änderung des Durchmessers dd_P/dt abhängig vom Diffusionskoeffizient D_{AB} der Gasmoleküle des Stoffes A im Gas B, von der molaren Masse M_m des Partikelmaterials, von der allgemeinen Gaskonstante R , von der Dichte des Partikelmaterials ρ_P , vom Partikeldurchmesser d_P , vom Partialdruck des bereits verdampften Partikelmaterials p_G , vom Dampfdruck an der Partikeloberfläche $p_{d,P}$, von der Umgebungstemperatur T_G und von der Temperatur an der Partikeloberfläche T_P .

Der Partialdruck p_G des verdampften Materials ist direkt abhängig von der bereits verdampften Masse, die sich gleichmäßig in dem umgebenden Volumen verteilt. Wird der Partialdruck p_G zu null gesetzt, d.h. das verdampfte Partikelmaterial hat keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration im Umgebungsraum, und werden Partikel- und Umgebungstemperatur als identisch betrachtet, erhält man durch Lösen der Differentialgleichung die Verdampfungszeit einzelner Partikel [Hin82].

$$t = \frac{d_P^2 \rho_P R T}{8 D_{AB} M_m p_d} \quad (22)$$

Zur Berechnung der Verdampfungszeit ist die Kenntnis des Diffusionskoeffizienten D_{AB} nötig. Dieser Koeffizient kann, wie in der Literatur angegeben [Sei86], berechnet werden,

$$D_{AB} = \frac{3 \pi}{32} \left(1 + \frac{M_{m,A}}{M_{m,B}} \right) \frac{k T}{\pi \sqrt{1 + \frac{M_{m,A}}{M_{m,B}}} \rho_B \left(\frac{\sigma_{AA} + \sigma_{BB}}{2} \right)^2} \sqrt{\frac{8 R T}{\pi M_{m,A}}} \quad (23)$$

wobei σ_{AA} und σ_{BB} die Durchmesser der Moleküle der jeweiligen Sorte beschreiben (Boltzmannkonstante $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Nm/K). Der mittlere Durchmesser der Luftmole-

küle und die mittlere molare Masse der Luft sind gegeben zu $\sigma_{BB} = 0,37 \text{ nm}$ und $M_{m,B} = 0,029 \text{ kg/mol}$ und p_B beschreibt in diesem Fall den Luftdruck. Der mittlere Moleküldurchmesser σ_{AA} einer festen oder flüssigen Substanz A kann näherungsweise wie folgt [Hin82] berechnet werden (Avogadrokonstante $N_{av} = 6,023 \cdot 10^{+23} \text{ 1/mol}$):

$$\sigma_{AA} = \sqrt[3]{\frac{M_{m,A}}{\rho_{P,A} N_{av}}} \quad (24)$$

Eine Zusammenfassung der berechneten Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle 16. In der Tabelle sind die Verdampfungszeiten für die untersuchten Zytostatika bei zwei verschiedenen Umgebungstemperaturen und Partikelgrößen dargestellt. Z.B. verdampft bei einer Größe von $10 \text{ }\mu\text{m}$ ein Cyclophosphamid-Partikel innerhalb von 4400 Sekunden (oder 73 Minuten) bei einer Umgebungstemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

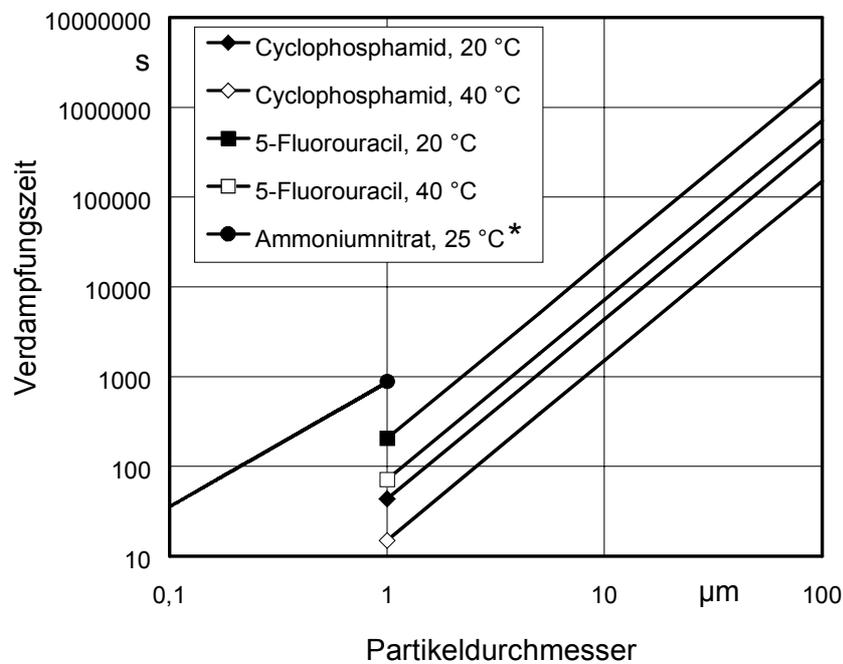
Substanzen	Dampfdruck (gemessen)		Sättigungskonzentration (berechnet für Gleichgewichtszustand)		Verdampfungszeit (berechnet für $20 \text{ }^\circ\text{C}$)	
	Pa		mg/m^3		s	
	$T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$	$T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$	$d_p = 1 \text{ }\mu\text{m}$	$d_p = 100 \text{ }\mu\text{m}$
Carmustin	0,019	0,530	1,7	44	12	$1,2 \times 10^5$
Cisplatin	0,0018	0,0031	0,22	0,36	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$
Cyclophosphamid	0,0033	0,009*	0,36	0,9	44	$4,4 \times 10^5$
Etoposid	0,0026	0,0038	0,63	0,86	51	$5,1 \times 10^5$
5-Fluorouracil	0,0014	0,0039	0,08	0,20	$2,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^6$

+: extrapoliert

Tab. 16: Dampfdruck, Sättigungskonzentration und Verdampfungszeit ausgewählter Zytostatika

Die experimentelle Überprüfung der Verdampfungszeiten von Zytostatika benötigt aus Sicherheitsaspekten einen hohen Aufwand. Entsprechende Daten stehen derzeit nicht zur Verfügung. In diesem Zusammenhang ist zum Vergleich auf ein Experiment von Dassios et al. [DP99] hinzuweisen, das für Ammoniumnitrat-Aerosole veröffent-

licht wurde. Die in der Veröffentlichung hergeleiteten Verdampfungszeiten wurden durch Experimente im Partikelgrößenbereich von 100 nm bis 220 nm bestätigt. Ein Vergleich mit den Verdampfungszeiten von Cyclophosphamid und Fluorouracil bei unterschiedlichen Partikelgrößen zeigt Abbildung 21.



Tab. 21: Vergleich berechneter Verdampfungszeiten mit Daten von Dassios et al.*

Die hier vorgestellten Ergebnisse zum Verhalten von Zytostatika in der Atmosphäre zeigen, dass die betrachteten Zytostatika in Abhängigkeit der Partikelgröße im Zeitraum von wenigen Stunden bei einem Durchmesser von 10 µm in der Atmosphäre verdampfen können. Die entstandene Gasphase ist mobiler als die Partikelphase und kann sich dementsprechend weiter verteilen.

Über den Abbau gasförmiger Zytostatika in der Atmosphäre liegen Daten für die Zytostatika Chlorambucil, Cyclophosphamid und Melphalan vor. Im wesentlichen handelt es sich dabei um Reaktionen mit photochemisch produzierten Hydroxylradikalen. Die Halbwertszeiten der Abbauprozesse liegen im Bereich von 1,7 Stunden bis 5,5 Stunden [MH93, Mey93].

5 Eintragspfade von Zytostatika in die Umwelt

Die Bestimmung des Verhaltens von Zytostatika in der Umwelt, insbesondere in Abwässern, Oberflächengewässern und Kläranlagen setzt auch die Kenntnis über die Eintragspfade voraus. Prinzipiell existieren Freisetzungspotenziale für Humanpharmaka während der Herstellung in pharmazeutischen Betrieben sowie der Zubereitung von Applikationen und deren Anwendung in medizinischen Einrichtungen.

Es existieren wenige Daten über Emissionen von Zytostatika während der Herstellung in pharmazeutischen Betrieben. Partikelförmiges Cyclophosphamid wurde z.B. in zwei Betrieben während der Herstellung im Bereich von $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $810 \mu\text{g}/\text{m}^3$ detektiert [Pyy88, Sor88, STA94, SFA94]. In Arbeitsbereichen, in denen Cyclophosphamid gewogen bzw. zu Tabletten formuliert wurden, lagen die Konzentrationen in der Raumluft bei $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $480 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [Pyy88].

Aktuelle Daten durch Beprobung der Abwässer und Emissionen von heutigen pharmazeutischen Betrieben konnten im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsprogramms nicht ermittelt werden. Zum einen werden Zytostatika von bundesdeutschen Firmen z.T. weltweit zugekauft und nicht selbst hergestellt. Zum anderen werden Zytostatika nicht kontinuierlich sondern chargenweise produziert. Im Fall von Cyclophosphamid z.B. kann die Produktion aufgrund der Haltbarkeit der Substanz auf eine Charge pro fünf Jahre reduziert werden.

Das originäre Anwendungsgebiet von Zytostatika liegt im Bereich von Krankenhäusern und Universitätskliniken. Die Zubereitung von Zytostatika-Applikationen kann zentral in der Krankenhausapotheke erfolgen oder dezentral auf den jeweiligen onkologischen Stationen sowie extern in öffentlichen Apotheken. Die Anwendung der Applikationen, in der Regel durch Infusionen oder Injektionen, erfolgt überwiegend stationär in den Kliniken. Es zeichnet sich jedoch ein zunehmender Trend zur ambulanten Versorgung in der Klinik und im häuslichen Bereich ab.

Die Eintragspfade in die Umwelt, insbesondere aus dem Bereich der medizinischen Einrichtungen zeigt Abbildung 27. Ausgehend vom bestimmungsgemäßen Einsatz

der Arzneimittel gelangen Zytostatika insbesondere über Patientenausscheidungen in das Abwasser der Krankenhäuser. Je nach Zytostatikum und individuellem Zustand der Patienten werden die verabreichten Zytostatika zu einem hohen Prozentsatz unmetabolisiert ausgeschieden, im Extremfall bis zu 100 %. Eine gesonderte Erfassung oder Behandlung der Abwässer erfolgt dabei z.Zt. nicht.

Im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsvorhabens wurden daher die Abwässer von drei Kliniken jeweils am Hauptsammler beprobt. Diesem Eintragspfad folgend, wurden die zugehörigen Zu- und Abläufe der kommunalen Kläranlagen und die Vorfluter untersucht. Klärschlämme wurden ebenfalls beprobt.

Ein weiterer Eintrag in die Umwelt, in diesem Fall in die Atmosphäre, kann während der Zubereitung von Zytostatika-Applikationen erfolgen. Die Abluft der eingesetzten Sicherheitswerkbänke kann gasförmige Zytostatika enthalten oder an der Arbeitsöffnung der Werkbank können partikel- und gasförmig vorliegende Zytostatika entweichen. Ist in dem Zubereitungsraum ein Fortluftsystem installiert, werden diese freigesetzten Zytostatika ohne weitere Behandlung direkt als Emissionen der Atmosphäre zugeführt; andernfalls werden sie diffus im Zubereitungsraum und ggf. darüber hinaus verteilt.

In einer Klinik wurden solche Emissionen aus der zentralen Zytostatika-Zubereitung ermittelt, als auch diffuse Quellen innerhalb der Zubereitungsräume einer weiteren Klinik festgestellt.

Mit Zytostatika belastete Abfälle sollten bei Einhaltung geltender Bestimmungen im Bereich der medizinischen Einrichtungen nicht in die Umwelt gelangen. Durch ein effizientes und Computer gestütztes Management während der Zubereitung von Zytostatika-Applikationen werden anfallende Restmengen minimiert. Darüber hinaus werden Verbrauchsmaterialien, die mit Zytostatika kontaminiert sein können, sowie nicht vollständig geleerte Infusionsbeutel einer getrennten Abfallentsorgung zugeführt. Diese besonders gekennzeichneten Abfallbehälter werden in Sonderabfallverbrennungsanlagen entsorgt.

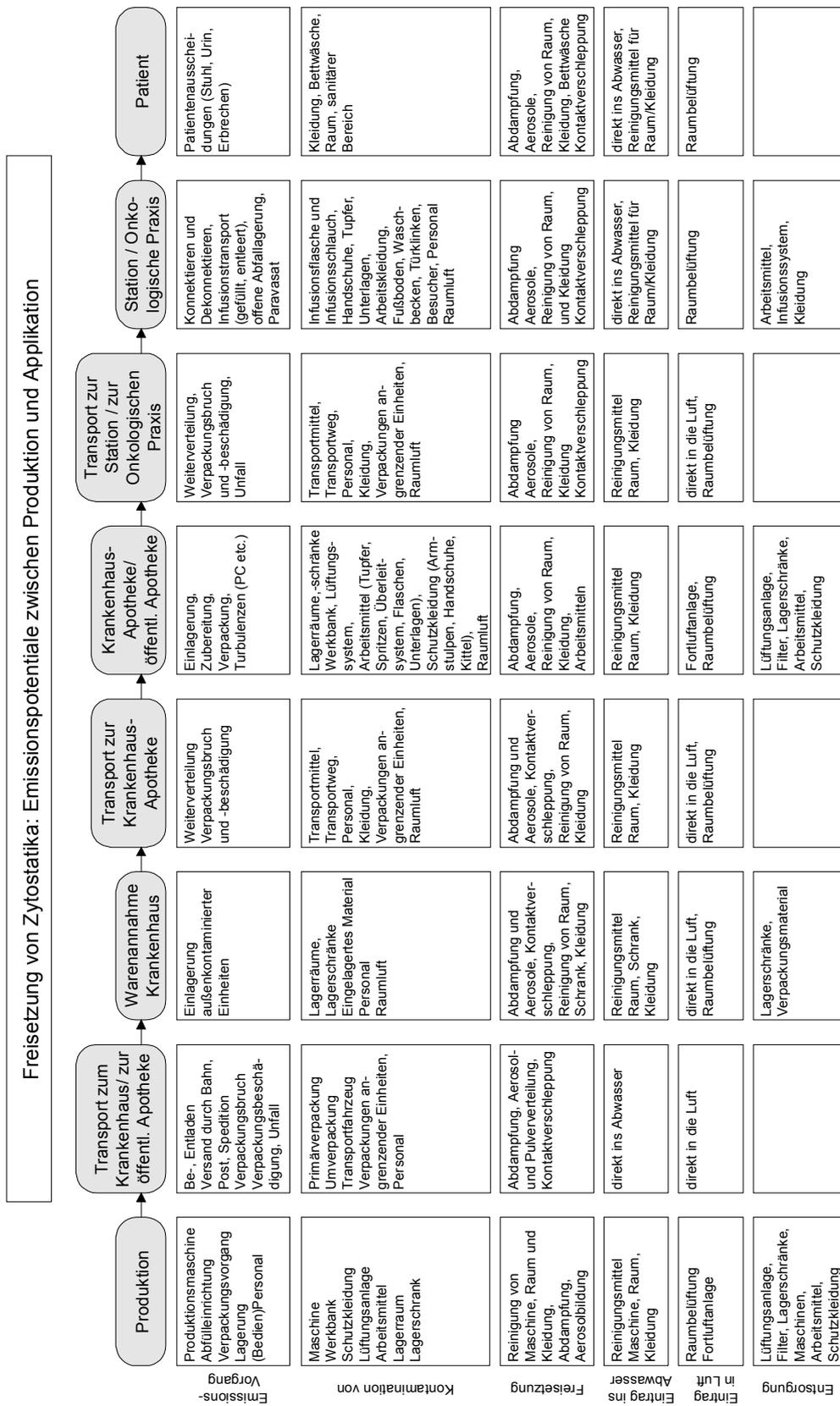


Abb. 22: Eintragspfade zwischen Produktion und Applikation

Der Eintragspfad von Zytostatika in die Umwelt auf dem Transportweg von der Herstellung in pharmazeutischen Betrieben bis zur Zubereitung in medizinischen Einrichtungen sollte ebenfalls vernachlässigbar sein. Von seiten der Hersteller und Lieferanten werden die Lieferungen zum Teil in zusätzliche Beutel eingeschweißt und außen mit Aufklebern als Zytostatika gekennzeichnet. In gut organisierten Kliniken gelangen diese Warensendungen direkt zur zuständigen Apotheke. Eventuell beschädigte Warensendungen können so direkt durch besonders geschultes Personal in den vorgesehenen Abfallbehältern entsorgt werden.

Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens wurden daher aus den oben aufgeführten Gründen zur Quantifizierung des Eintrags von Zytostatika in die Umwelt Einzelproben genommen von:

- Hauptsammlern von Krankenhausabwässern,
(Bestimmung von Cyclophosphamid, Ifosfamid),
- Kläranlagenzuläufen,
(Bestimmung von Cyclophosphamid, Ifosfamid),
- Kläranlagenabläufen,
(Bestimmung von Cyclophosphamid, Ifosfamid),
- Vorflutern,
(Bestimmung von Cyclophosphamid, Ifosfamid),
- Klärschlämmen
(Bestimmung von Etoposid, Methotrexat, 7-Hydroxy-Methotrexat),
- Emissionen von Krankenhausapotheken
(Bestimmung von Cyclophosphamid).

Die ermittelten Konzentrationen von Zytostatika in den einzelnen Umweltmatrizes werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

5.1 Belastungen von Abwässern und Oberflächengewässern mit Cyclophosphamid und Ifosfamid

Für die Probenahmen der Krankenhausabwässer wurden insgesamt drei Kliniken ausgewählt. Es handelte sich dabei um zwei Universitätskliniken mit jeweils ca. 1600 Betten und ein städtisches Krankenhaus mit ca. 400 Betten. Alle Kliniken besitzen ausgewiesene onkologische Stationen.

Die Probenahmen an den Hauptsammlern der Krankenhausabwässer, den Zu- und Abläufen der angeschlossenen kommunalen Kläranlagen sowie den zugehörigen Vorflutern erfolgten durch Personal der jeweils zuständigen staatlichen Umweltämter. An jedem Probenahmeort wurden insgesamt sechs Einzelproben genommen, die nicht homogenisiert wurden. Die Probenahmen erfolgten jeweils um ca. 10.00 Uhr an den Hauptsammlern, um ca. 12.00 Uhr in den Kläranlagen und um 13.00 Uhr an den Vorflutern.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Bestimmung. Die zugehörigen Methodenbeschreibungen sind im Anhang wiedergegeben.

An allen Probenahmeorten wurden positive Befunde ermittelt. Bei den detektierten Zytostatika handelte es sich um Cyclophosphamid und Ifosfamid. Die Konzentrationen der positiven Proben lagen bei zwei der drei beprobten Hauptsammlern der Krankenhausabwässer im Bereich von ca. 30 ng/l bis 50 ng/l Cyclophosphamid und ca. 500 ng/l bis 2300 ng/l Ifosfamid. In einem Kläranlagenzulauf wurden ca. 50 ng/l bis 100 ng/l Cyclophosphamid und in je einem Ablauf und Vorfluter jeweils ca. 40 ng/l Ifosfamid detektiert. Die Ergebnisse im einzelnen zeigt die Tabelle 18.

Die Konzentrationen von Ifosfamid sind an allen Messorten größer als die von Cyclophosphamid. Hier spiegelt sich der verstärkte Einsatz von Ifosfamid in der Chemotherapie wieder. Die Konzentrationen an den einzelnen Messorten können aufgrund der Probenahme von Einzelproben in keinen direkten Zusammenhang zueinander gesetzt werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass bei Universitätsklinik 1 vom Hauptsammler des Klinikabwassers bis zum Vorfluter (Ausnahme Kläranlagenzulauf) Ifosfamid nachgewiesen wurde.

	Massenkonzentration [ng/l]		
	Universitätsklinik 1	Universitätsklinik 2	Städtische Klinik
Hauptsammler der Klinikabwässer	Ifosfamid 500 - 2300	< 25	Cyclophosphamid 30 – 50 Ifosfamid 1200
Kläranlagen- zulauf	< 25	Cyclophosphamid 50 - 100	< 25
Kläranlagen- ablauf	Ifosfamid 40	< 25	< 25
Vorfluter	Ifosfamid 40	< 25	< 25

Tab. 18: Massenkonzentration von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Abwässern und Oberflächengewässern

5.2 Belastungen von Klärschlamm mit Etoposid, Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat

Die Probenahmen der Klärschlämme erfolgten an insgesamt drei kommunalen Kläranlagen. Diese Kläranlagen behandeln die Abwässer der drei Kliniken, an denen die im vorherigen Kapitel beschriebenen Abwasserproben genommen wurden. Auch hier erfolgten die Probenahmen durch Personal der jeweils zuständigen staatlichen Umweltämter. An jedem Probenahmeort wurden insgesamt sechs Einzelproben von ausgefaultem und eingedicktem Klärschlamm genommen, die nicht homogenisiert wurden.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels flüssigchromatographischer Trennung und Bestimmung mittels DAD- bzw. Fluoreszenz-Detektor. Die zugehörigen Methodenbeschreibungen befinden sich im Anhang.

Die untersuchten Klärschlämme zeigten keine positiven Befunde für die Zytostatika, Etoposid, Methotrexat und den Metaboliten 7-Hydroxy-Methotrexat. Dies ist insbesondere auf die hohen Bestimmungsgrenzen der angewendeten Methoden für die untersuchten Zytostatika zurückzuführen. Wesentliche Verbesserungen zum Nachweis sind durch den Einsatz einer HPLC-MS/MS zu erwarten, die jedoch während der Laufzeit des Untersuchungsvorhabens nicht zur Verfügung stand.

5.3 Belastungen von Emissionen und Raumluft mit Cyclophosphamid

Für die Probenahmen der Emissionen aus und der Raumluft in Krankenhausapotheken wurden zwei Kliniken ausgewählt. Es handelte sich dabei um eine Universitätsklinik und ein städtisches Krankenhaus. In beiden Kliniken erfolgte die Zubereitung von Zytostatika-Applikationen entsprechend der allgemeinen Praxis und unter Einhaltung der üblichen Sicherheitsmaßnahmen.

Im Zubereitungsraum der Universitätsklinik wurde eine Sicherheitswerkbank entsprechend DIN 12950 eingesetzt. Oberhalb der Werkbank war ein Fortluftsystem installiert, durch das die Abluft der Sicherheitswerkbank ohne weitere Behandlung oder Verdünnung direkt in die Atmosphäre geführt wurde. Innerhalb dieses Fortluftsystems erfolgte die Probenahme für die Emissionsmessungen. Darüber hinaus wurden innerhalb des Raumes an unterschiedlichen Probenahmeorten die Raumluftkonzentrationen von Cyclophosphamid ermittelt.

Im Zubereitungsraum der städtischen Klinik befand sich eine Sicherheitswerkbank entsprechend DIN 12980. Die Luftführung erfolgte hier im Umluftbetrieb. In diesem Zubereitungsraum wurden an unterschiedlichen Probenahmeorten die Raumluftkonzentrationen von Cyclophosphamid ermittelt.

Die Probenahmen von Emissionen und Raumluft erfolgte durch entsprechend geschultes Fachpersonal der an diesem Untersuchungsvorhaben beteiligten Laboratorien. An jedem Probenahmeort wurden mindestens vier Einzelproben genommen. Die Probenahmen erfolgten 1) am Wochenende ohne Zytostatika-Zubereitung, aber laufender Werkbank, 2) während der Zubereitung und ausschließlicher Verwendung von Cyclophosphamid als Trockensubstanz und 3) während des Routinebetriebs.

Die Analyse der Proben auf den Gehalt an Cyclophosphamid erfolgte mittels gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Bestimmung. Die zugehörigen Methodenbeschreibungen sind im Anhang wiedergegeben.

In den Emissionsproben der Matrix Luft betragen die Konzentrationen $0,027 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ gasförmiges Cyclophosphamid. Innerhalb der Raumluft wurden Konzentrationen im Bereich von $0,006 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $0,223 \mu\text{g}/\text{m}^3$ partikuläres und von $0,017 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $3,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ gasförmiges Cyclophosphamid bestimmt. Die Ergebnisse sind im Detail in den folgenden Tabellen dargestellt.

Bei den Emissions- und Raumluftmessungen wurden während des Routinebetriebs und der ausschließlichen Zubereitung von Cyclophosphamid Konzentrationen ermittelt, die in der gleichen Größenordnung liegen wie die Konzentrationen, die während der Messungen ohne Zubereitung an der Werkbank ermittelt wurden.

Die Emissionsmessungen am Fortluftsystem der Universitätsklinik liefern ausschließlich positive Befunde für gasförmig vorliegendes Cyclophosphamid. Partikuläres Cyclophosphamid wurde nicht detektiert, da der Hauptluftstrom innerhalb des Fortluftsystems aus der gefilterten Abluft der Werkbank besteht. Gasförmig vorliegendes Cyclophosphamid wird, der Theorie entsprechend, offensichtlich nicht durch die Filter der Werkbank zurückgehalten und gelangt ungehindert in die Atmosphäre.

Bei den Raumluftmessungen ist bemerkenswert, dass die Konzentrationen von gasförmigem Cyclophosphamid in der Regel deutlich größer sind, als von partikulärem Cyclophosphamid. Auch die Belastungen in der Raumluft können als diffuse Quellen in die Atmosphäre gelangen.

	Massenkonzentration [µg/m ³]	
	Universitätsklinik	
	Partikelphase	Gasphase
Ohne Zubereitung mit laufender Sicherheitswerkbank	< 0,003	13
Zubereitung nur Cyclophosphamid (30 x 400 bis 700 mg)	< 0,003	< 0,012
Routinezubereitung (Anteil Cyclophosphamid 2000 mg)	< 0,003	0,027

Tab. 19: Massenkonzentration von Cyclophosphamid in den Emissionen aus Zubereitungsräumen für Zytostatika

	Massenkonzentration [µg/m ³]			
	Universitätsklinik		Städtische Klinik	
	Partikelphase	Gasphase	Partikelphase	Gasphase
Ohne Zubereitung mit laufender Sicherheitswerkbank	< 0,003	0,6	0,006 – 0,065	0,045 – 0,145
Zubereitung nur Cyclophosphamid (30 x 400 bis 700 mg)	< 0,003	3,9	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Zubereitung nur Cyclophosphamid (100 x 1000 mg)	nicht bestimmt	nicht bestimmt	< 0,003	0,11
Routinezubereitung (Anteil Cyclophosphamid 2000 mg)	0,017 – 0,223	0,017	nicht bestimmt	nicht bestimmt

Tab. 20: Massenkonzentration von Cyclophosphamid in der Raumluft von Zubereitungsräumen für Zytostatika

5.4 Qualitätssicherung

Allgemein: Die Quantifizierung der Gehalte dotierter und realer Proben erfolgte über externe bzw. interne Standards, die Absicherung der entwickelten Anreicherungs- und Bestimmungsverfahren anhand dotierter bzw. aufgestockter Proben durch Wiederholungsmessungen. Einzelheiten zur Qualitätssicherung sind im Rahmen der jeweiligen Methodenentwicklung im Anhang beschrieben.

Ringversuch: Zur Absicherung des Bestimmungsverfahrens für Cyclophosphamid und Ifosfamid in wässrigen Realproben haben beide Untersuchungsstellen erfolgreich an einem vom Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft organisierten Ringversuch im Rahmen des BLAC Untersuchungsprogramms „Arzneimittel in der Umwelt“ teilgenommen. Dabei wurden die folgenden Proben mit der jeweiligen Analysemethode untersucht:

Probe	Zu erreichende Bestimmungsgrenze
Standardprobe gelöst in Methanol/1-15% ACN	1 µg/l
Oberflächenwasser (aufgestockt)	25 ng/l
kommunales Abwasser	50 ng/l
kommunales Abwasser (aufgestockt)	50 ng/l

6 Ökotoxikologische Bewertung

Die Bewertung von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln hinsichtlich der von ihnen ausgehenden Umweltgefährdung erfolgt in der Europäischen Gemeinschaft anhand bestimmter vereinheitlichter Grundprinzipien. Dagegen liegen für Humanpharmaka bislang keine etablierten und standardisierten Bewertungsverfahren vor. Lediglich für neue Tierarzneimittel wurde eine Richtlinie zur Durchführung eines Environmental Risk Assessments 1996 verabschiedet [CVMP/055/96].

Eine orientierende Risiko- und Gefährdungsabschätzung für Zytostatika kann daher nur in Anlehnung z.B. an ein für die Chemikalienbewertung entwickeltes Schema erfolgen [UBA90]. Bei Humanpharmaka handelt es sich jedoch um biologisch sehr aktive Substanzen, die mittels ihrer biologischen Aktivität Krankheiten heilen oder verhindern sollen. Dies beinhaltet, dass sie hergestellt werden, um mit spezifischen biologischen Systemen, z.B. Rezeptoren oder spezifischen Enzymen zu reagieren. Diese spezifischen Wirkungen machen eine zusätzliche qualitative Risikobewertung notwendig.

Für Pharmaka und Chemikalien sind mehrere Stoffeigenschaften bei einer Risikoabschätzung zu berücksichtigen. Wasserlösliche Substanzen z.B. sind mobil und treten deshalb in oberirdischen Gewässern und im Grundwasser auf, lipophile Substanzen können in Organismen bioakkumulieren. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, inwieweit die betrachteten Substanzen an Schwebstoffen, im Sediment oder Klärschlamm angereichert werden. Die biologische Abbaubarkeit ist relevant im Hinblick auf eine langfristige Anreicherung in der Umwelt und in Organismen (Biomagnifikation) und damit verbundenen potentiellen chronischen Wirkungen. Die Bioverfügbarkeit ist ebenso von Bedeutung wie die Einbeziehung der Metaboliten.

Das Bewertungsverfahren für Chemikalien basiert auf einem Vergleich der Exposition mit der Wirkung, wobei geprüft wird, ob der Quotient aus „Predicted Environmental Concentration“ (PEC) und „Predicted No Effect Concentration“ (PNEC) größer

oder kleiner als 1 ist. Von einem Risiko für die Umwelt wird ausgegangen, wenn der Quotient größer als 1 ist, also mit dem Auftreten wirkungsauslösender Konzentrationen in der Umwelt gerechnet werden muss.

a) Exposition und Verbleib in der Umwelt

Zu berücksichtigen sind die Umweltkompartimente: Wasser, Schwebstoffe, Sediment, Boden, Luft. Für die betrachtete Substanz werden qualitative (Expositionspfade) und quantitative (Frachten und Stoffströme) Betrachtungen angestellt. Bei Humanpharmaka erfolgt ein wesentlicher Eintrag der Wirkstoffe und ihrer Metabolite mit den Ausscheidungen der Patienten. Zu betrachten ist deshalb vor allem der Eintrag in die Kläranlagen über die Krankenhausabwässer. Eine weitere Verteilung erfolgt über die Einleitung der in kommunalen Kläranlagen gereinigten Abwässer in Gewässer und ggf. über den Klärschlamm. Zusätzlich sind Produktionsquellen und die Entsorgung (fest: Deponien, flüssig: Abwasser) zu berücksichtigen. Der Luftpfad spielt bei der Zubereitung von Zytostatika-Applikationen vor der Verabreichung eine Rolle (staub- und gasförmige Immissionen).

b) Wirkung

Die Wirkungsabschätzung zielt darauf ab, ein Maß für die toxischen Effekte auf die Organismen des Ökosystems zu finden. Dazu werden entsprechende Wirkkonzentrationen in standardisierten Laborbiotests ermittelt. Da kein einzelnes Testsystem alle möglichen Wirkungen auf Flora und Fauna erfassen kann, wird eine Biotestbatterie eingesetzt. Die Kombination von Testspezies und Testmethoden in einer Biotestbatterie soll die Nachteile des einzelnen Tests kompensieren. In der Regel werden akute Tests mit Fischen, Daphnien, Algen und Mikroorganismen eingesetzt. Anhand von Unsicherheitsfaktoren wird die bei Laborbiotests vorhandene Variabilität der Daten, der Übergang von akuten auf chronische Toxizitätsdaten und die Möglichkeit von Kombinationswirkungen berücksichtigt. Auf Basis von Labordaten liegt dieser Faktor mindestens bei 10.

Als Basisdaten sind folgenden Angaben erforderlich:

- akute Fischtoxizität, LC₅₀ (96h)
- akute Daphnientoxizität EC₅₀ (48h)
- akute Algentoxizität EC₅₀ (72h)
- Wachstumshemmung bei Mikroorganismen EC₅₀
- Abbau:
- biologischer Abbau,
- abiotischer Abbau (Ad- und Desorption für nicht leichtabbaubare Substanzen).

Das Chemikaliengesetz gibt bei Verkaufsmengen > 100 t/Jahr oder > 500 t/kumulativ die Vorlage weiterer Daten vor: Bioakkumulation an einer Fischart, längerfristige Fischtoxizität (mindestens 14 Tage, NOEC-Bestimmung), die längerfristige Daphnientoxizität (21 Tage, Reproduktion, Mortalität), Ergebnisse aus einem Pflanzentest, aus einem Regenwurmtest, aus einem Test auf potenzielle Abbaubarkeit, wenn der Stoff nicht biologisch leicht abbaubar ist, und falls erforderlich, einen Adsorptions-Desorptionstest.

Für jedes Umweltkompartiment ist eine separate Risikoabschätzung erforderlich. Sie besteht aus drei wesentlichen Schritten: Beurteilung der Daten, Auswahl angemessener Abschätzungsfaktoren und Bestimmung von PNEC's für die infrage stehenden Kompartimente.

Zur Berechnung von PEC werden im allgemeinen nur Modelle herangezogen, bei der PNEC-Berechnung wird bei akuten Tests generell der Unsicherheitsfaktor 100 und bei längerfristigen Tests generell der Unsicherheitsfaktor 10 verwendet.

Hinsichtlich einer Risikoabschätzung von Pharmaka ist festzustellen, dass bislang Daten über die ökotoxikologischen Wirkungen von Pharmaka nur in verschwindend geringer Zahl vorliegen; und auch vielfach die chemische Analytik noch nicht in der Lage ist, umweltrelevante Konzentrationen, auch der Metabolite nachzuweisen. Somit fehlen wesentliche Elemente zur Durchführung einer umfassenden Risikoabschätzung für die meisten derzeit verwendeten Zytostatika.

Von den im vorliegenden Untersuchungsvorhaben betrachteten Zytostatika wird lediglich für die Substanzen Cyclophosphamid und Ifosfamid eine Risikoabschätzung vorgenommen, da nur für diese beiden Substanzen eine, wenn auch geringe Anzahl von Angaben zur Ökotoxizität vorliegt. Diese sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Im allgemeinen wird PEC aus dem Gesamtverbrauch der betrachteten Substanz und der Gesamtabwassermenge bei Eintrag in den Wasserpfad abgeschätzt. Zytostatika fallen jedoch in der Regel punktförmig in höheren Konzentrationen in Form von Klinikabwässern an, da sie anders als z.B. Acetylsalicylsäure nicht zur allgemeinen Selbstmedikation freigegeben sind. Für eine Risikoabschätzung werden deshalb in diesem Fall die relevanteren Konzentrationsangaben aus Messungen realer Proben herangezogen.

	Cyclophosphamid	Ifosfamid	Literaturstelle
Physikalisch-chemische Eigenschaften			
Wasserlöslichkeit	40.000 mg/l	100.000 mg/l	[HSDB]
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (log P _{ow})	1,12 -0,49	0,81 -0,9	[Klö95] [Ste96]
Adsorptionskoeffizient für Boden und Sediment	5,81 12,85	2,88 7,76	[Klö95] [Ste96]
Biokonzentrationsfaktor	0,63 11,81	0,31 7,41	[Klö95] [Ste96]

Tab. 21a: Physikalisch-chemische Eigenschaften, ökotoxikologische Daten, Abbaubarkeit in aquatischen Umweltkompartimenten und Konzentrationen in Realproben von Cyclophosphamid und Ifosfamid.

	Cyclophosphamid	Ifosfamid	Literaturstelle
Ökotoxizität			
Akute Fischtoxizität <i>Salmo gairdneri</i> NOEC (96 h) LC 50 (96 h) (OECD 203)	> 984 mg/l	> 555 mg/l > 1.000 mg/l	[Cyc93, lfo93]
Akute Daphnientoxizität <i>Daphnia magna</i> NOEC (48 h) EC 50 (48 h) (OECD 202)	> 987 mg/l	100 mg/l 162 mg/l	[Cyc93, lfo93]
Bakterientoxizität <i>Pseudomonas putida</i> EC 10 (16 h) DEV/DIN 38412 T 8	> 10.000 mg/l	> 10.000 mg/l	[Cyc93, lfo93]
	Keine antimikrobielle Aktivität gegenüber anaeroben gram-negativen oder -positiven Bakterien sowie Hefen		[Ham84]
	Keine Wachstumshemmung bei <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida alba</i> bei 9 mg/l	Keine Wachstumshemmung bei <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida alba</i> bei 9 mg/l	[KW88, KW91]
	Bakteriostatisch bei 2 g/l, bakterizid ab 3 g/l für <i>Salmonella typhimurium</i>		[JW90]

Tab. 21b: Physikalisch-chemische Eigenschaften, ökotoxikologische Daten, Abbaubarkeit in aquatischen Umweltkompartimenten und Konzentrationen in Realproben von Cyclophosphamid und Ifosfamid.

	Cyclophosphamid	Ifosfamid	Literaturstelle
Abbaubarkeit			
Abbau (28 d) OECD 301 E	< 1%	< 1%	
Closed bottle-Test	0 %	5-7 %	[Ste96]
Zahn-Wellens-Test	Keine Elimination	Keine Elimination	[Ste96]
Kläranlagen- Simulationstest	< 5 % keine Toxizität	< 5% keine Toxizität	
Nachweis in aquatischen Umweltkompartimenten			
Hauptsammler von Klinikabwässern	bis 50 ng/l	bis 2300 ng/l	s. Kapitel 5.1
Kläranlagenzulauf	bis 100 ng/l	< 25 ng/l	s. Kapitel 5.1
Kläranlagenablauf	< 25 ng/l	40 ng/l	s. Kapitel 5.1
Vorfluter	< 25 ng/l	40 ng/l	s. Kapitel 5.1
Kläranlagenzu- und -ablauf	bis 60 ng/l	bis 60 ng/l	[Ste96]
Klinikabwasser	4,5 ng/l	1,9 ng/l	[Ste96]

Tab. 21c: Physikalisch-chemische Eigenschaften, ökotoxikologische Daten, Abbaubarkeit in aquatischen Umweltkompartimenten und Konzentrationen in Realproben von Cyclophosphamid und Ifosfamid.

Die vorliegenden Daten lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Da der Wert des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$ für beide Substanzen < 3 ist, ist davon auszugehen, dass es kein signifikantes Potenzial zur Bioakkumulation gibt [UBA90].

Alle vorhandenen Ergebnisse zur Abbaubarkeit der Stoffe zeigen, dass sie nicht biologisch abbaubar sind, d.h. dass eine mögliche Elimination in einer Kläranlage nicht auf Abbau zurückzuführen ist. Aufgrund ihrer geringen Bakterientoxizität wird die Funktionsfähigkeit biologischer Kläranlagen bei Einleitung in die Anlage nicht behindert.

Die Daten zur akuten Fisch- und Daphnientoxizität weisen auf eine geringe akute Toxizität der beiden Zytostatika gegenüber Vertretern der aquatischen Biozönose hin. Auch bei Berücksichtigung von Unsicherheitsfaktoren liegt zwischen den in Standardtests ermittelten Konzentrationen und den in realen Proben nachgewiesenen Konzentrationen eine hinreichende Spanne. Bei den Biotestverfahren handelte es sich jedoch nicht um substanzspezifische Tests, so dass relevante Endpunkte der entsprechenden Substanzen nicht erfasst wurden.

Letztendlich sollte die Verminderung des Eintrags von Zytostatika in die Umwelt als der geeignete Ansatz erscheinen, um negative Auswirkungen insbesondere auf aquatische Ökosysteme zu begrenzen.

7 Entwicklung von Vermeidungsstrategien

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten um das Auftreten von Zytostatika in den Umweltkompartimenten zu vermeiden:

- Vermeidung des Einsatzes und
- Vermeidung des Eintrags in die Umwelt.

Die Vermeidung des Einsatzes ist nicht möglich, da

- Zytostatika i.d.R. nicht unnötig eingesetzt werden, sondern notwendiger Bestandteil der Krebstherapie sind,
- in den letzten Jahren die Forschung zwar neue Ansätze entwickelt, damit aber keine Durchbrüche bei der Krebsbehandlung erzielt hat, womit auch der weitere Einsatz notwendig ist,
- der Verbrauch weiterhin stetig zunimmt aufgrund der steigenden Anzahl von Krebserkrankungen.

Aus diesen Gründen wird auf die Vermeidung des Einsatzes von Zytostatika nicht weiter eingegangen. Jedoch kann vermutlich längerfristig durch neue Therapieansätze eine Verminderung der Anwendungsmengen von Zytostatika erreicht werden. Dies ist zurückzuführen auf:

- die Entwicklung von zielgerichteten Krebsmitteln (z.B. Capazitabine). Diese Substanzen reagieren mit einem Enzym, welches nur in Krebszellen vorkommt, und blockieren somit selektiv den Stoffwechsel der Krebszellen.
- die Anwendung der Microdialyse. Dadurch kann die Konzentration von Zytostatika direkt im Krebsherd gemessen werden, so dass bereits am Anfang der Chemo-Therapie festgestellt wird, ob das Medikament im betroffenen Organ wirkt.
- die Anwendung der Genanalyse. Dadurch ist z.B. bei Brustkrebs feststellbar, ob betroffene Patienten auf ein bestimmtes Medikament ansprechen.

Diese therapeutischen Maßnahmen führen zu einer Reduzierung der eingesetzten Mengen von Zytostatika. Deren bestimmungsgemäße Anwendung wird aber weiterhin zu einem Eintrag in die Umwelt führen. Im folgenden werden daher technische und organisatorische Maßnahmen vorgestellt, die zu einer Vermeidung bzw. Verminderung des Eintrags von Zytostatika in die Umwelt führen.

Die in den vorherigen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse zum Verhalten von Zytostatika in der Umwelt sowie die Auswertung von Literaturdaten legen den Schluss nahe, dass der wesentliche Eintrag in die Umwelt von Zytostatika über das Abwasser von Krankenhäusern erfolgt. Hauptursache ist die Anwendung beim Patienten und die daraus resultierenden z.T. hoch belasteten Ausscheidungen. Beim Krankenhausabwasser ist somit primär mit Maßnahmen zur Vermeidung bzw. Verminderung des Eintrags in die Umwelt anzusetzen.

Dabei ist zu beachten, dass derzeit die Tendenz zu mehr ambulanter Behandlung der Patienten mit Zytostatika geht. Daher werden möglicherweise neben den Krankenhausabwässern auch die häuslichen Abwässer durch zytostatikahaltige Ausscheidungen belastet.

Im Krankenhausbereich sollten analog zur Organisation innerhalb der radiologischen Abteilungen auch die Ausscheidungen der Chemotherapie-Patienten getrennt gesammelt werden. Während bei radioaktiven Stoffen lediglich eine gewisse Zeit bis zur Einleitung der Abwässer in die Kanalisation eingehalten werden muss, erfordern zytostatikahaltige Abwässer eine vorherige Behandlung. Die biologische Behandlung scheidet aufgrund der in Kapitel 4.2 gezeigten geringen bzw. nicht vorhandenen Abbaubarkeit aus. Weitere Behandlungsmethoden können sein:

- Abbau durch alkalische Hydrolyse z.B. mittels NaOH oder KOH
- Abbau durch Oxidationsmittel wie z.B. NaOCl
- Einsatz photokatalytischer Oxidationsverfahren
- Adsorption an Aktivkohle mit anschließender Verbrennung

Diese prinzipiell möglichen Verfahren zur Behandlung von zytostatikahaltigen Abwässern müssen jedoch erst in technisch zuverlässige und wirtschaftlich vertretbare Anlagenkonzepte umgesetzt werden. Hierzu besteht noch ein weitgehender Entwicklungsbedarf.

Weitere Reduzierungspotenziale für den Eintrag von Zytostatika in die Umwelt liegen z.B. bei der Herstellung von kleineren Gebindegrößen und bruchfesten Transportverpackungen. Dies und die zentrale Zubereitung von Zytostatika mit optimierter Organisation der Arbeitsabläufe führt zur Verminderung oder Vermeidung von Zytostatika-Abfällen. Das von anderen Medikamentenabfällen getrennte Sammeln von Zytostatika-Abfällen ist durch die zentrale Zubereitung wesentlich erleichtert. Darüber hinaus erfolgt die sachgemäße Entsorgung als besonders überwachungspflichtiger Abfall durch geschultes Personal. Gering mit Zytostatika belastete Abfälle sollten dagegen nicht als besonders überwachungsbedürftig eingestuft werden, aufgrund der erwartungsgemäß kleinen Mengen, die über diesen Pfad in die Umwelt gelangen können.

Der Eintrag von Zytostatika über den Luftpfad während der Zubereitung von Applikationen innerhalb von Sicherheitswerkbänken ist bei den ermittelten Konzentrationen primär für den Arbeitsschutz relevant. MAK- oder TRK-Werte wurden bisher für kein Zytostatikum festgesetzt. Prinzipiell kann auch hier, analog zur Behandlung von zytostatikahaltigen Abwässern, durch geeignete Filtersysteme die zytostatikahaltige Abluft von Sicherheitswerkbänken gereinigt werden. Entsprechende Filtersysteme sind derzeit in der Entwicklung.

Nicht zuletzt führt im Bereich von Krankenhäusern und Krankenhausapotheken der sachgerechte Umgang mit Zytostatika zur Vermeidung von Unfällen und anderen unbeabsichtigten Freisetzungen von Zytostatika. Intensive Unterweisung und Aufklärung von Krankenhauspersonal, Patienten und deren Angehörige sowie von ambulanten Pflegekräften ist dafür unabdingbar.

8 Anhang

8 Anhang

8.1	Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von zehn Zytostatika in Oberflächenwasser und Abwasser mittels HPLC	114
8.1.1	Entwicklung von Anreicherungsverfahren für die HPLC	114
8.1.2	Flüssigchromatographische Trennung	144
8.1.3	Arbeitsanweisungen	162
8.2	Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von 5-Fluorouracil und Methotrexat in Klärschlamm mittels HPLC	174
8.2.1	Verfahrensentwicklung	174
8.2.2	Nachsäulenderivatisierung von Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat unter Berücksichtigung einer faktoriellen Versuchsplanung	176
8.2.3	Arbeitsanweisung	184
8.3	Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser, Abwasser und Luft mittels GC-MS	186
8.3.1	Verfahrensentwicklung	186
8.3.2	Arbeitsanweisungen	195
8.4	Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmungen von 5-Fluorouracil in Oberflächenwasser mittels GC-MS/MS und negativer chemischer Ionisierung	201
8.4.1	Verfahrensentwicklung	201
8.4.2	Arbeitsanweisung	212
8.5	Bestimmung des Dampfdrucks pulverförmig vorliegender Substanzen	214
8.6	Probenahme von Realproben	218
8.6.1	Probenahme von Oberflächenwasser und Abwasser	218
8.6.2	Probenahme von Klärschlamm	218
8.6.3	Probenahme von Luft	218

8.7	Struktur der untersuchten Zytostatika	220
8.8	Zusammenstellung der Daten ausgewählter Zytostatika zum Verhalten in der Umwelt	221

8.1 Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von zehn Zytostatika in Oberflächenwasser und Abwasser mittels HPLC

8.1.1 Entwicklung von Anreicherungsverfahren für die HPLC

8.1.1.1 Allgemeines

Die nach Abschätzungen im Krankenhausabwasser zu erwartenden Zytostatika-Konzentrationen liegen im unteren ppb-Bereich. Da die mit den bislang zur Verfügung stehenden Detektionsverfahren erreichbaren Bestimmungsgrenzen jedoch um den Faktor 10^2 bis 10^4 darüber liegen, besteht die Notwendigkeit, leistungsfähige Anreicherungsverfahren für die ausgewählten Substanzen zu entwickeln. Die Anreicherung als wesentlicher Schritt der Probenvorbereitung dient dabei nicht nur der Erhöhung der Konzentration der zu untersuchenden Substanzen sondern auch der Abtrennung von Matrixbestandteilen (Interferenzen), welche die nachfolgende chromatographische Analyse stören könnten. Beide Effekte zusammen ermöglichen eine Verbesserung der Bestimmungsgrenzen gegenüber der direkten Analyse ohne Anreicherung um mehrere Zehnerpotenzen. In diesem Untersuchungsvorhaben wurde die Festphasenextraktion als Anreicherungsverfahren eingesetzt. Die für die erfolgreiche Bestimmung im Abwasser erforderlichen hohen Anreicherungsfaktoren sind mit diesem Verfahren erreichbar. Es wurden eine Vielzahl verschiedener Festphasen-Sorbentien auf Silicagel bzw. Polymerbasis in Säulen- und Scheibenform getestet.

8.1.1.2 Durchführung der Anreicherung mittels Festphasenextraktion

Die Anreicherung wurde mit herkömmlichen 1 l Saugflaschen bzw. mittels eines kommerziellen Gerätes (Separex 47, spe-12G, Baker) durchgeführt. Mit dem letztgenannten Gerät ist die Anreicherung von bis zu zwölf Proben gleichzeitig möglich. Der benötigte Unterdruck wurde durch Wasserstrahlpumpen erzeugt und anhand eines

Manometers kontrolliert. Durch die Verwendung selbstgefertigter Adapter wurde eine geschlossene Verbindung zwischen der Festphasenscheibe bzw. -säule und dem Probenreservoir geschaffen. Auf diese Weise können Probenvolumina von mehreren Litern kontinuierlich angereichert werden, ohne dass laufend von Hand Probe nachgefüllt werden muss. Auch die Gefahr des Trockenlaufens des Sorbens besteht so nicht. Abbildung 23 zeigt die zur Festphasenextraktion verwendete kommerziell erhältliche Apparatur.

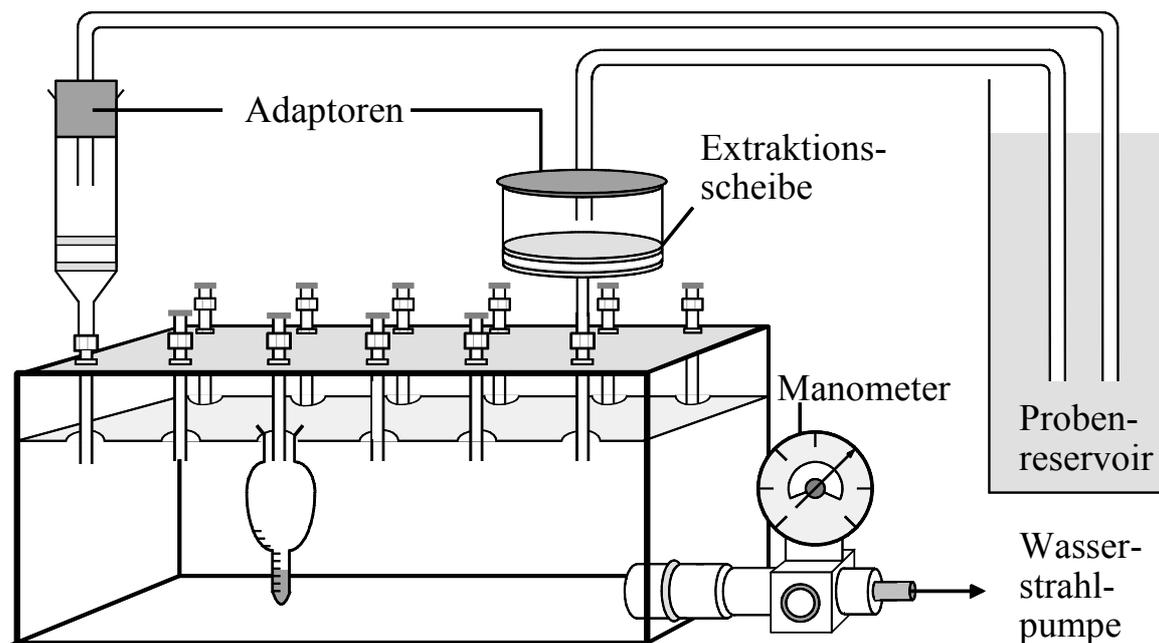


Abb. 23: Für die Festphasenanreicherung verwendete Apparatur (Separex 47, spe12G, Baker)

8.1.1.3 Ermittlung der Wiederfindungsraten

Die wässrigen Proben wurden vor der Anreicherung mit dem gewünschten Volumen der Stammlösungen eines oder mehrerer Zytostatika versetzt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden gleiche Volumina der jeweiligen undotierten Matrix nach dem selben Verfahren angereichert und die Eluate anschließend mit Zytostatikamengen dotiert, die einer Wiederfindungsrate von 100 bzw. 50 % entsprachen. Die Eluate der Anreicherung wurden mittels flüssigchromatographischer Verfahren untersucht. Die Quantifizierung erfolgte über den Vergleich der Flächen der Substanz-

peaks in den Chromatogrammen der vor bzw. nach der Anreicherung dotierten Proben.

8.1.1.4 Untersuchte Wasserproben

Für die Auswahl prinzipiell geeigneter Sorbentien wurden zunächst Lösungen der Zytostatika in destilliertem Wasser und Leitungswasser verwendet. Mit den erfolgreich getesteten Festphasenmaterialien wurden dann Versuche zur Anreicherung aus wässrigen Realproben durchgeführt. Dazu wurde Teichwasser, Flusswasser sowie das als Zulauf der Modellkläranlage verwendete synthetische Abwasser und der Ablauf der Modellkläranlage verwendet.

Die Teichwasserproben stammten aus vier verschiedenen Teichen auf dem Gelände der Ruhr-Universität. Die Flusswasserproben wurden der Ruhr an zehn verschiedenen Stellen zwischen Bochum und Essen sowie dem Kemnader See entnommen. Insbesondere diese, aus dem Freiland stammenden Proben, unterliegen in ihrer Zusammensetzung jahreszeitlich und witterungsbedingten Schwankungen. Um dennoch repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden Proben innerhalb eines Zeitraums von sechzehn Monaten entnommen und untersucht. Die Zytostatikakonzentrationen im Zu- und Ablauf der Modellkläranlage wurden im Rahmen der Abbauersuche regelmäßig mittels der beschriebenen Anreicherungsverfahren bestimmt. Alle Wasserproben wurden am Tag der Entnahme untersucht.

8.1.1.5 Getestete Festphasenmaterialien

Die für die adsorptive Bindung der Analytmoleküle verantwortlichen Gruppen der einzelnen Sorbentien unterscheiden sich vor allem in ihrer Polarität. Man unterscheidet Ionenaustauscher, polare und unpolare Wechselwirkungen. Aus der Struktur der einzelnen Substanzen, ihrem chromatographischen Verhalten und weiteren Daten wie pK_A bzw. pK_B -Wert, Wasserlöslichkeit etc. können Schlüsse auf möglicherweise geeignete Festphasenmaterialien gezogen werden. Unabhängig von diesen theoretischen Überlegungen wurden zunächst für alle zehn Zytostatika die wichtigsten kommerziell erhältlichen Festphasenmaterialien auf Silica- bzw. Polymerbasis auf ihre

Eignung getestet. Neben den herkömmlichen säulenförmigen Kartuschen wurden auch die seit einigen Jahren erhältlichen scheibenförmigen Anreicherungsmaterialien (Extraktionsdisks) verwendet. Bei diesen Produkten ist eine dünne Schicht des Anreicherungsmaterial zwischen Filtermembranen eingeschlossen. Extraktionsdisks weisen bei vergleichbarem Absorptionsvermögen einen geringeren Strömungswiderstand auf als Kartuschen und erlauben infolgedessen wesentlich höhere Flussgeschwindigkeiten während der Probenaufgabe. Außerdem neigen sie deutlich weniger zum Verstopfen und eignen sich daher insbesondere für große Volumina stark partikelhaltiger Proben. Die größere Oberfläche ermöglicht die Anreicherung aus mehreren Litern wässriger Probelösung und entsprechend höhere Anreicherungs-faktoren. Allerdings wird für die quantitative Elution der adsorbierten Zytostatika von den Extraktionsscheiben eine größere Menge an Elutionsmittel benötigt als dies bei den Kartuschen der Fall ist. Zudem sind bislang noch nicht alle Sorbentien als Disks erhältlich. In den Tabellen 23 und 24 sind die Eigenschaften der getesteten Festphasensäulen und -scheiben zusammengestellt.

Sorbens	Adsorb. Gruppen	Wechselwirkung	Sorbensmenge [mg]	Volumen [ml]	Handelsname®	Anbieter
Magnesium-Silikat unmodifiz. Silicagel	MgSiO ₃	polar	500	3	Florisil	Baker Varian
	Silicagel	polar	500	3	Bakerbond Bond Elut	Baker, Varian
Modifiz. Silicagel	Quarternäres Amin	starker Anionenaustauscher	500	3	Bond Elut SAX	Varian
	1°, 2° Amine	Anionenaustauscher	500	3	Bakerbond Bond Elut PSA	Baker, Varian
	Aminopropyl	schwacher Anionenaustauscher	500	3	Bakerbond Bond Elut	Baker, Varian
	Propylsulfonsäure	starker Kationenaustauscher	500	3	Bond Elut PRS	Varian
	Benzolsulfonsäure	starker Kationenaustauscher	500	3	Bond Elut SCX	Varian
	Carbonsäure	schwacher Kationenaustauscher	500	3	Bond Elut CBA	Varian
	C8/Kationenaustauscher	unpolar Kationenaustauscher	300	3	LiChrolut TSC	Merck
	Diol	polar	500	3	Bakerbond Bond Elut	Baker, Varian
	Cyanopropyl	polar	500	3	Bond Elut	Varian
	Phenyl	mäßig polar	500	3	Bond Elut	Varian
	Methylester	mäßig polar	500	3	narc-1	Baker
Hexyl	unpolar	500	3	Isolute	ICT	
Heptyl	unpolar	500	3	Bond Elut	Varian	

Tab. 23a: Eigenschaften der getesteten Festphasensäulen

Sorbens	Adsorb. Gruppen	Wechselwirkung	Sorbensmenge [mg]	Volumen [ml]	Handelsname®	Anbieter
Modifiz. Silicagel	Oktyl	unpolar	500	3	Bond Elut	Varian
	Dekyl	unpolar	500	3	Bond Elut	Varian
C18	Dodekyl	unpolar	500	3	Bond Elut	Varian
	C18/Rest-Silanolgruppen	unpolar/polar	500	3	Isolute	ict Machery-Nagel
			500	6	Chromabond LiChrolut Bond Elute	Merck Varian
		unpolar	500	6	PolarPlus	Baker
		unpolar	500	6	Light Load	Baker
C18 endcapped	C18	unpolar	200	3	Bakerbond	Baker ict Machery-Nagel
			500	3	Isolute	Merck
			500	6	Chromabond LiChrolut ENVI-18 Bond Elute	Supelco Varian
XAD-Harze	Styroidivinylbenzol	unpolar	500	5	Amberlite XAD-4	Fluka
	Polyacrylsäureester	polar	500	5	Amberlite XAD-7	Fluka
Styroidivinylbenzol	Quarternäres Amin	st. Anionenaustauscher	1000	5	AmberlystA-26	Fluka
	Sulfonsäure	st. Kationenaustauscher	1000	5	Dowex 50 W X2	Fluka

Tab. 23b: Eigenschaften der getesteten Festphasensäulen

Sorbens	Adsorb. Gruppen	Wechselwirkung	Sorbensmenge [mg]	Volumen [ml]	Handelsname®	Anbieter
Copoly-mere	Polystyrol	unpolar	200	6	ENV+	ict
	Polystyrol-divinylbenzol	unpolar	200	6	EN	Merck
	Polystyrol-divinylbenzol	unpolar	250	6	ENVI-Chrom P	Supelco
	Polystyrol-divinylbenzol	unpolar	200	6	SDB 1	Baker
Graphitierter Kohlenstoff	Kohlenstoff	unpolar	250	6	ENVI-Carb C	Supelco

Tab. 23c: Eigenschaften der getesteten Festphasensäulen

Sorbens	Adsorb. Gruppen	Wechselwirkung	Durchmesser [mm]	Handelsname®	Anbieter
modifiziertes Silicagel	C18 end-capped	unpolar	47	C18 Speedisk	Baker
modifiziertes Silicagel	C18	unpolar	47	C18 Polar Plus Speedisk	Baker
Copolymer	Divinylbenzol	unpolar	47	DVB Speedisk	Baker

Tab. 24: Eigenschaften der getesteten Festphasenscheiben

Während der Methodenentwicklung wurden die einzelnen Anreicherungssäulen und -scheiben, soweit es der Verstopfungsgrad zuließ, mehrfach verwendet. Bei sorgfältiger Elution und Konditionierung mit genügend großen Volumina geeigneter Lösungsmittel kann eine Verschleppung von Analyten dabei ausgeschlossen werden.

8.1.1.6 Optimierung der einzelnen Parameter der Festphasenextraktion

Bei der Entwicklung eines leistungsfähigen und reproduzierbaren Anreicherungsverfahrens müssen für jede prinzipiell geeignete Kombination aus Analyt und Sorbentstyp die einzelnen Schritte der Festphasenextraktion Konditionierung und Vor-equilibrierung, Probenaufgabe, Interferenzenelution, Trocknung und Elution optimiert werden. Weitere Änderungen dieser Parameter sind beim Übergang zu matrixbelasteten Realproben erforderlich, um eine möglichst weitgehende Abtrennung störender Interferenzen zu gewährleisten. Die Auswirkungen jeder einzelnen Veränderung auf die Effektivität der Anreicherung wurden untersucht.

Filtration

Insbesondere bei großen Volumina stark partikelbelasteter Proben dient die Filtration der Wasserprobe vor der eigentlichen Anreicherung der Abtrennung fester Bestandteile, die andernfalls die Fritten der Extraktionssäulen verstopfen würden. Neben herkömmlichen Filterverfahren und -materialien (Filtrierpapiere, Tiefen- und Membranfilter) wurden speziell für die Festphasenextraktion entwickelte Filterhilfen (Filteraid) getestet. Letztere bestehen aus kleinen Glaskugeln, die als 0,5-1 cm hohe Schicht auf die Fritten der Anreicherungssäule gegeben werden und an die die Partikel adsorbieren.

Konditionierung und Equilibrierung

Die Konditionierung des Anreicherungsmaterials dient insbesondere bei unpolaren Festphasensorbentien auf Silica-Basis dazu, die Ankergruppen zu benetzen und aufzurichten, so dass eine Wechselwirkung mit den Analytmolekülen möglich wird. In der Regel wird dazu Methanol verwendet. In dieser Arbeit wurden außerdem Acetonitril und Ethylacetat als Konditionierungsmittel getestet. Bei großen Volumina wässriger Probenlösung wird diese benetzende organische Schicht unter Umständen während der Probenaufgabe allmählich herausgewaschen und muß daher kontinuierlich ersetzt werden. Bei Probenvolumina von mehr als 1 l wurden daher Verfahren zur kontinuierlichen Solvatisierung angewandt, indem der Probenlösung selbst geringe Anteile (0,5-10 Vol%) an Konditionierungsmittel zugesetzt wurden. Bei den als

Ionenaustauscher wirkenden Sorbentien wurde mit sauren (Kationenaustauscher) bzw. basischen (Anionenaustauscher) Lösungen konditioniert, um die Ankergruppen mit H^+ - bzw. OH^- -Ionen zu beladen.

Im Anschluss an die eigentliche Konditionierung wurde das Sorbensbett mit einigen Millilitern der undotierten Probenlösung für die Probenaufgabe vorbereitet.

Probenaufgabe

Die wichtigste Variable bei der Probenaufgabe ist der pH-Wert der Probenlösung. Je nach verwendetem Festphasentyp und dem der angestrebten Adsorption zugrunde liegenden Bindungsmechanismus muss die anzureichernde Komponente bei der Probenaufgabe als Anion, Kation oder als neutrales Molekül vorliegen. Bei der Anreicherung saurer oder basischer Substanzen an Ionenaustauschern sollte der pH-Wert der Lösung mindestens zwei Einheiten über dem pK_A bzw. unter dem pK_B -Wert der Substanz liegen. Unter diesen Bedingungen befinden sich 99% der Moleküle im geladenen Zustand. Eingeschränkt wird die Wahl des pH-Wertes durch die begrenzte Stabilität der Festphasenmaterialien und der Analyten selbst. Die meisten Festphasenmaterialien sind laut Herstellerangaben im Bereich zwischen pH 2 und 8 stabil. Auch bei den nicht nach dem Prinzip des Ionenaustausches arbeitenden Sorbentien beeinflusst der pH-Wert der Probenlösung die Anreicherung insofern als Matrixbestandteile in unterschiedlichem Maß adsorbiert werden. Daher wurden bei allen Anreicherungen ganzzahlige pH-Werte von 3-8 getestet.

Die Probenlösungen wurden dazu mit Kaliumdihydrogenphosphat bzw. Dikaliumhydrogenphosphat bis zur einer Gesamtkonzentration von 0,01 M versetzt. Der genaue pH-Wert wurde mit 3 M Phosphorsäure bzw. 3 M Kalilauge eingestellt:

- pH 3,0 0,01 M KH_2PO_4 mit 3 M Phosphorsäure auf $pH\ 3,0 \pm 0,2$ eingestellt
- pH 4,0 0,01 M KH_2PO_4 mit 3 M Phosphorsäure auf $pH\ 4,0 \pm 0,2$ eingestellt
- pH 5,0 0,01 M KH_2PO_4 mit 3 M KOH-Lösung auf $pH\ 5,0 \pm 0,2$ eingestellt
- pH 6,0 0,01 M KH_2PO_4 mit 3 M KOH-Lösung auf $pH\ 6,0 \pm 0,2$ eingestellt
- pH 7,0 0,01 M K_2HPO_4 mit 3 M Phosphorsäure auf $pH\ 7,0 \pm 0,2$ eingestellt
- pH 8,0 0,01 M K_2HPO_4 mit 3 M KOH-Lösung auf $pH\ 8,0 \pm 0,2$ eingestellt

Die Ermittlung der optimalen Durchflussrate bei der Probenaufgabe ist ein wichtiger Teil der Methodenentwicklung. In der Regel werden vom Hersteller bzw. Anbieter bestimmte Bereiche für die Flussrate empfohlen. Sie sollte einerseits so hoch wie möglich sein, um die Gesamtanalysendauer gering zu halten. Andererseits muss gewährleistet sein, dass die Kontaktzeit zwischen Sorbens und Probe groß genug ist, dass sich das Adsorptionsgleichgewicht einstellen kann. Insbesondere bei elektrostatischen Wechselwirkungen (Ionenaustausch) sind anderenfalls erheblich verringerte Wiederfindungsraten möglich. Die Flussrate sollte während der gesamten Probenaufgabe so konstant wie möglich gehalten werden.

Waschschritt

Nach der Probenaufgabe werden Interferenzen soweit möglich durch geeignete Lösungsmittel selektiv von der Extraktionssäule gewaschen. Dabei muss sichergestellt werden, dass keine Analyten bereits hier ganz oder teilweise vom Sorbens gelöst werden. Bei der Verwendung von Ionenaustauschern dient der Waschschritt auch der Neutralisation als Vorbereitung zur Umstellung des pH-Wertes bei der Elution. Es wurden wässrige Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten sowie Mischungen organischer Lösungsmittel (Methanol, Acetonitril) mit Wasser getestet. Außerdem wurde die Menge und die Einwirkzeit dieser Waschlösungen variiert.

Trocknen der Extraktionssäulen

Das Trocknen der Säulen im Gasstrom dient vornehmlich der Verdrängung der Probenlösung aus dem Sorbensbett. Die Benetzung des Sorbensmaterials durch das Elutionsmittel wird durch diesen Schritt generell verbessert. Bei der Verwendung von Elutionsmitteln, die mit der Probenmatrix nicht mischbar sind, ist der Trocknungsschritt unverzichtbar. Dies gilt auch, wenn die nachfolgende Analytik durch in das Eluat gelangte Spuren der Probenmatrix gestört werden kann, wie es z. B. bei wässrigen Proben und nachfolgender GC-Analytik der Fall ist. Verschlechterungen der Wiederfindungsrate durch den Trocknungsschritt können bei flüchtigen Verbindungen auftreten.

Die einfachste Form der Trocknung besteht darin, Luft mittels Wasserstrahlpumpe durch die Extraktionssäule oder -scheibe zu saugen. Bei luftempfindlichen Analyten können Inertgase verwendet werden. Im Verlauf der Optimierung wurde mit Luft,

Stickstoff und Argon getrocknet. Außerdem wurden Dauer und Intensität des Gasstroms variiert.

Elution der Analyten

Wichtigster Parameter dieses Anreicherungsschritts ist die Wahl des Lösungsmittels bzw. die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches. Es sollte die Analyten möglichst vollständig von dem Festphasensorbens lösen und für die nachfolgende Analytik geeignet sein. Allerdings sollte die Elutionskraft des Lösungsmittels nicht größer als für die vollständige Desorption der Analyten erforderlich sein, da sonst unpolare Interferenzen ebenfalls ins Eluat gelangen. Vorteilhaft für eine zusätzliche Aufkonzentrierung durch Einengen des Eluats ist außerdem ein niedriger Siedepunkt des verwendeten Elutionsmittels. Bei der Verwendung von Ionenaustauschern wurden wässrige Phosphatpufferlösungen verwendet, deren pH-Wert so gewählt wurde, dass die adsorbierten Analytionen bei der Elution neutralisiert bzw. umgekehrt geladen werden. Dadurch wird die elektrostatische Bindung der angereicherten Substanzen an die Ankergruppen des Ionenaustauschers aufgehoben. Wie auch bei der Probenaufgabe sollte der pH-Wert dabei mindestens zwei Einheiten ober- bzw. unterhalb des pK_S - bzw. pK_B -Wertes der untersuchten Verbindung liegen. Auch Mischungen aus diesen Pufferlösungen und verschiedenen wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln wurden getestet.

Meistverwendetes Lösungsmittel für die Elution der an mäßig polare und unpolare Festphasenmaterialien adsorbierten Analyten ist Methanol. In den durchgeführten Anreicherungsversuchen wurden zusätzlich Acetonitril, Dichlormethan, Ethylacetat, Diethylether sowie Mischungen der genannten Lösungsmittel untereinander und bei Methanol und Acetonitril mit Wasser getestet. Bei Substanzen mit sauren oder basischen Eigenschaften kann ein zusätzlicher Anteil wässriger Pufferlösungen, der diese Verbindungen in ihre geladene Form überführt, die Desorption erleichtern.

Außer Art und Zusammensetzung des Elutionsmittels wurden dessen Volumen, Temperatur sowie die Einwirkzeit variiert. Außerdem wurde das minimale, zur vollständigen Desorption erforderliche Elutionsvolumen für jeden Sorbenstyp ermittelt.

Einengen

Häufig wird das Eluat im Anschluss an die eigentliche Anreicherungsprozedur durch vorsichtiges Einengen im Gasstrom weiter aufkonzentriert, um so den Anreicherungsfaktor zu erhöhen. Für die Ermittlung der optimalen Bedingungen wurden Luft, Argon und Stickstoff eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Stärke des Gasstroms und die Temperatur (Wasserbad) variiert. Für jede Substanz wurde das minimale Volumen, bis zu dem verlustfrei aufkonzentriert werden kann, bestimmt.

8.1.1.7 Ermittlung der unteren Konzentrationsgrenze der Anreicherung

Aus den oben genannten Gründen existiert für jedes Anreicherungsverfahren eine Mindestkonzentration des Analyten in einer bestimmten Matrix, unterhalb derer eine quantitative Anreicherung ($R_s \geq 90\%$) nicht mehr bzw. nicht mehr mit genügender Reproduzierbarkeit gelingt. Diese Konzentrationsgrenze wurde für jede erfolgreich getestete Substanz-Sorbens-Kombination mit dem entsprechenden optimierten Anreicherungsverfahren einzeln ermittelt. Dazu wurden je ein Liter der dotierten Probe des jeweiligen Oberflächenwassers angereichert. Diese Proben enthielten eine Konzentration von 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002 bzw. 0.001 mg/l des jeweiligen Zytostatikums.

8.1.1.8 Geeignete Festphasensorbentien

Die Tabellen 25 und 26 geben einen Überblick über die Eignung der getesteten Festphasensorbentien für die Anreicherung der einzelnen Zytostatika aus Oberflächenwasser. Mit + gekennzeichnet sind alle Sorbentien, mit denen die Anreicherung der jeweiligen Verbindung aus unterschiedlichsten Proben mit einer Wiederfindungsrate $R_s \geq 90\%$ bei einem Anreicherungsfaktor von mindestens 10 möglich ist.

Substanz	SCX	Cyano	TSC	C8	C18	C20	C18 Light Load	C18 Polar Plus
Carmustin	—	—	+	+	+	+	+	+
Chlorambucil	—	—	—	+	+	+	+	+
Cisplatin	+	—	+	—	—	—	—	+
Cyclophosphamid.	—	+	—	+	+	+	+	+
Cytarabin	+	—	—	—	—	—	—	—
Etoposid	—	+	—	+	+	+	+	+
Fluorouracil	—	—	—	—	—	—	+	+
Melphalan	—	—	—	+	+	+	+	+
Methotrexat	—	—	—	+	+	+	+	+
Vinblastin	—	—	—	+	+	+	+	+

Tab. 25: Geeignete Festphasenmaterialien auf Silicagelbasis für die Anreicherung der ausgewählten Zytostatika aus Oberflächenwasser

Soweit möglich wurde die Anreicherung mit Sorbentien durchgeführt, die in Scheibenform zur Verfügung stehen. Unter Umständen kann dies auch dann sinnvoll sein, wenn die so erfassbaren Substanzkonzentrationen höher sind als bei Anreicherungsmaterialien, die nur als Säulen zur Verfügung stehen.

Substanz	XAD-4	XAD-7	A-26	50WX2	ENV+	ENVI-Chrom P	EN	SDB1	EN-VICar b
Car-mustin	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Chlor-ambucil	+	—	—	—	+	—	—	+	—
Cisplatin	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cyclo-phopha.	+	+	—	—	+	—	+	+	—
Cytarabin	—	—	—	+	+	—	—	—	—
Etoposid	—	—	—	—	+	—	+	+	—
Fluoro-uracil	—	—	+	—	+	—	—	—	—
Melpha-lan	+	—	—	+	—	—	+	+	—
Metho-trexat	+	+	—	—	+	—	+	+	—
Vinblastin	+	—	—	—	+	—	+	+	—

Tab. 26: Geeignete Festphasenmaterialien auf Polymerbasis für die Anreicherung der ausgewählten Zytostatika aus Oberflächenwasser

8.1.1.9 Optimierte Parameter der Festphasenextraktion

Die optimalen Bedingungen der einzelnen Schritte der Anreicherung an den geeigneten Sorbentien für die zehn untersuchten Substanzen sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Substanz	Sorbens	Konditionierung*	Proben pH-Wert	Waschschritt	Elution**
Carmustin	TSC	4 ml MeOH, 5 ml pH 3,0	pH 3,0	----	1ml H ₂ O, 2 × 1ml MeOH
	C8, C18, C18 Polar Plus, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml MeOH/ACN 50:50 (v/v)
Chlorambucil	XAD-4	5 ml pH 3,0, 5 ml pH 4,8	pH 4,8	1ml H ₂ O	1ml CH ₂ Cl ₂ , 2 × 1ml Et ₂ O
	C8, C18, C18 Polar Plus, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 4,8	pH 4,8	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml CH ₂ Cl ₂
Cisplatin	Propylsulfonsäure	4 ml MeOH, 3 ml pH 3,0	pH 3,0	2×1ml H ₂ O	3 × 1ml pH 8,0
	TSC	4 ml MeOH, 3 ml pH 3,0	pH 3,0	---	3 × 1ml 1 M NaCl/MeOH 50:50 (v/v)
	C18+	4 ml MeOH 3 ml pH 6,0	pH 6,0 1 M NaCl	---	3 (5) × 1ml MeOH
	C8, C18, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml CH ₂ Cl ₂ / Et ₂ O 70/30 (v/v)

* Phosphatpuffer mit entsprechendem pH-Wert

** In Klammern Elutionsvolumina für Extraktionsscheiben

Tab. 27a: Optimierte Bedingungen der einzelnen Schritte der Festphasenextraktion

Substanz	Sorbens	Konditionierung*	Proben pH-Wert	Waschschritt	Elution**
Cyclophosphamid	XAD-4	5 ml pH 3,0, 5 ml pH 6,0	pH 6,0	4ml H ₂ O	3 × 1ml ACN
	XAD-7	5 ml pH 3,0, 20 ml 0,2 M HCl	0,2 M HCl	4ml H ₂ O	3 × 1ml Me- OH
	CN ,C8, C18, C18 Polar Plus, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 7,0	pH 7,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml ACN
Cytarabin	Dowex 50 W X2	10 ml 2 M HCl, 10 ml H ₂ O	0,2 M HCl	4 ml H ₂ O	6 × 1ml 0,1 M NaOH
	Propylsulfonsäure	4 ml MeOH, 3 ml pH 3,0	pH 3,0	4 ml H ₂ O	3 × 1ml pH 8,0
Cytarabin	ENV+	4 ml MeOH, 3 ml pH 7,0	pH 7,0	----	1ml H ₂ O, 2 × 1ml pH 3,0 MeOH 70/30 (v/v)
Etoposid	CN, C8, C18, C18 Polar Plus, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml CH ₂ Cl ₂ /ACN 50/50 (v/v)
Fluorouracil	Amberlyste A-26	10 ml 1 M NaOH, 10ml H ₂ O	0,05 M NaOH	2×1ml H ₂ O	4 × 1ml 1 M HCl
	C18 Polar Plus, C18 light load, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 4,8	pH 4,8	---	1ml H ₂ O, 2 (4)×1ml MeOH
Melphalan	XAD-4	10 ml pH 3,0, 10 ml pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 × 1ml ACN
	C8, C18, C18 Polar Plus, C18 light lo- ad, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml ACN

* Phosphatpuffer mit entsprechendem pH-Wert

** In Klammern Elutionsvolumina für Extraktionsscheiben

Tab. 27b: Optimierte Bedingungen der einzelnen Schritte der Festphasenextraktion

Substanz	Sorbens	Konditionierung*	Proben pH-Wert	Waschschritt	Elution**
Methotrexat	XAD-4	20 ml pH 3,0, 20 ml 0.2 M HCl	pH 3,0	1ml H ₂ O	4 × 1ml MeOH
	XAD-7	10 ml pH 3,0	pH 3,0	----	4×1ml MeOH
	C8, C18, C18 Polar Plus, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 3,0	pH 3,0	1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml MeOH
Vinblastin	XAD-4	10 ml P1, 10 ml pH 6,0	pH 6,0	1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml CH ₂ Cl ₂ / ACN 50/50
	C8, C18, C18 light load, SDB1, EN, ENV+, DVB	4 ml MeOH, 3 ml pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml CH ₂ Cl ₂ / Et ₂ O 70/30 (v/v)

* Phosphatpuffer mit entsprechendem pH-Wert

** In Klammern Elutionsvolumina für Extraktionsscheiben

Tab. 27c: Optimierte Bedingungen der einzelnen Schritte der Festphasenextraktion

Filtration

Die Abtrennung von Partikeln aus dem Oberflächenwasser durch die verschiedenen Filtrationsverfahren verhindert zwar das frühzeitige Verstopfen der Anreicherungssäulen und erlaubt damit die schnelle Anreicherung auch aus größeren Probenvolumina. Jedoch traten bei allen Substanzen mit Ausnahme von Cisplatin und Cytarabin nicht reproduzierbare Verluste durch den Filtrationsschritt auf. Verantwortlich dafür ist die Adsorption von Analytmolekülen an der Oberfläche der Schwebstoffe. Daher waren die Verluste bei den unpolaren Substanzen besonders hoch (bis zu 60% bei Vinblastin). Um auch diese adsorbierten Anteile zu erfassen, wurden die abfiltrierten Bestandteile in einem zusätzlichen Arbeitsschritt mit einem unpolaren Lösungsmittel (z. B. dem Elutionsmittel der Anreicherung) extrahiert. Dies führte zu einer Verbesserung der Wiederfindungsraten; insgesamt aber konnten mit diesem kombinierten Verfahren keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Die Schwankungen der Wie-

derfindungsraten waren um etwa den Faktor vier größer als bei der Anreicherung ohne vorherige Filtration.

Aus den genannten Gründen, und auch weil das Problem der Verstopfung durch Verwendung von Extraktionsdisks zumindest für einige Sorbentien gelöst werden kann, wurde im weiteren Verlauf ganz auf eine Filtration der Wasserproben verzichtet. Die festen Bestandteile der Wasserprobe sammeln sich unter diese Bedingungen während der Probenaufgabe auf der Fritte der Extraktionssäule oder -scheibe. Bei der Elution werden die an diesen Partikeln adsorbierten Analytmoleküle durch das Lösungsmittel genauso extrahiert wie die an das eigentlichen Sorbens gebundenen Moleküle. Lediglich bei der Anreicherung sehr stark partikelhaltiger Proben an Extraktionssäulen ist in Einzelfällen die Verwendung einer sogenannten Filterhilfe (Filteraid, Varian) sinnvoll. Ungelöste Bestandteile der Wasserprobe lagern sich an der rauhen Oberfläche dieser Kugeln an, so dass eine Verstopfung der Fritte verhindert oder zumindest verzögert werden kann. Diese Stoffe werden bei der Elution genau wie bei der direkten Aufgabe der unfiltrierten Probe miterfasst.

Konditionierung

Bei der Wahl des Konditionierungsmittels zeigten sich keine Unterschiede zwischen den getesteten organischen Lösungsmitteln Methanol, Acetonitril und Ethylacetat. Im weiteren wurde Methanol für die Konditionierung verwendet.

Größere Bedeutung haben das für diesen Schritt eingesetzte Lösungsmittelvolumen und die Durchlaufgeschwindigkeit.

Generell sollte, insbesondere wenn Kartuschen oder Disks mehrfach benutzt werden, nicht weniger als 4 ml Methanol, aufgeteilt in $4 \cdot 1$ ml, verwendet werden. Außerdem sollte das Lösungsmittel einige Zeit in Kontakt mit dem Sorbensmaterial bleiben.

Daher wurde beim Konditionierungsschritt kein Unterdruck angelegt. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass es unter diesen Umständen zu keiner Verschleppung von Substanzen kommt.

Nach der Konditionierung mit Methanol muss zunächst auf die Probenmatrix umgestellt werden, um zu verhindern, dass bei der anschließenden Probenaufgabe Analytmoleküle durch Methanolreste gelöst und mitgerissen werden. Dazu werden unmittelbar nach dem Durchlaufen des Methanols einige Milliliter der undotierten Probenmatrix auf die Extraktionssäule gegeben. Auch diese Vorequilibration des Sorbens

erfolgte bei Normaldruck. Zwischen diesen beiden Schritten, sowie vor der eigentlichen Probenaufgabe, ist ein Trockenlaufen der Säule unbedingt zu vermeiden. Sollte dies dennoch geschehen, so muss die gesamte Konditionierung wiederholt werden. Die dynamische Solvatisierung durch Zugabe geringer Volumenanteilen (1-5%) Methanol zur Probe führte zu keiner Verbesserung der Wiederfindungsrate.

Probenaufgabe

Aus Tabelle 27 sind die idealen pH-Werte für die einzelnen Anreicherungsverfahren ersichtlich. Generell zeigte sich, dass bei pH-Werten von 2-3 die Eluate deutlich geringere Matrixbelastungen aufwiesen als im neutralen bzw. schwächer sauren pH-Bereich. Da bei pH-Werten unterhalb pH 2,5 eine allmähliche Zersetzung des Materials auftrat, erkennbar an einer Gewichtsabnahme der Extraktionssäulen, wurden die Anreicherungen soweit möglich bei pH 3,0 durchgeführt.

Die Wahl der Durchflussrate stellt einen Kompromiss zwischen der Notwendigkeit einer quantitativen Anreicherung und der Zeitersparnis dar. Eine Durchflussrate von etwa 5 ml/min für die Extraktionssäulen und ca. 80 ml/min für die Extraktionsdisks wurde als oberer Grenzwert gefunden. Bei diesen Werten traten keine durch die Probenaufgabetechnik verursachten Substanzverluste auf. Insbesondere zu Beginn der Probenaufgabe, wenn der Gegendruck noch sehr gering ist, muss darauf geachtet werden, dass die Probe nicht zu schnell durchgesaugt wird. Unter Umständen wird daher zunächst völlig ohne Unterdruck gearbeitet.

Mit zunehmender Verstopfung muss dann der Unterdruck allmählich erhöht werden, um eine annähernd konstante Durchflussrate aufrechtzuerhalten. Bei der Verwendung von Extraktionssäulen reicht jedoch bei Probenvolumina von mehr als etwa einem Liter auch das volle Wasserstrahlvakuum nicht aus. Die Flussgeschwindigkeit nimmt stetig ab, bis es zur vollständigen Verstopfung der Säule kommt. Daher wurden - soweit erhältlich - Extraktionsdisks anstelle von Extraktionssäulen eingesetzt. Während der Probenaufgabe muss ein Trockenlaufen der Säule unbedingt vermieden werden. Dies ist besonders bei großen Probenvolumina nur durch eine direkte Verbindung zwischen der Anreicherungssäule bzw. -scheibe und dem Probenreservoir möglich, durch welche die Probenlösung kontinuierlich angesaugt wird. Eine solche Verbindung wurde mittels durchbohrter Stopfen und PE-Schläuchen geschaffen.

Waschschritt

Insbesondere bei der Anreicherung der polarerer Zytostatika führte die Verwendung von Waschlösungen mit organischen Anteilen zu erheblichen Verlusten (bis zu 100% bei Fluorouracil). Die Abtrennung störender Interferenzen hingegen gelang nur in sehr geringem Ausmaß. Daher wurde dieser Schritt im weiteren ausschließlich mit geringen Mengen (1-2 ml) destilliertem Wasser durchgeführt. Bei den Substanzen Cisplatin und Fluorouracil wurde bei der Anreicherung an unpolaren Sorbentien ganz auf den Waschschritt verzichtet. Bei der Verwendung von Ionenaustauschern müssen die Extraktionssäulen vor der Elution neutral gewaschen werden. Es ist zu vermuten, dass Substanzverluste bei der Interferenzenelution einer der Gründe für die schlechten Wiederfindungsraten bei der Anreicherung an Ionenaustauschermaterialien sind.

Trocknen

Eine geringfügige Verbesserung der Wiederfindungsrate durch den Trocknungsschritt als Vorbereitung auf die anschließende Elution konnte nur bei den Anreicherungen von Chlorambucil, Etoposid und Melphalan an unpolaren Sorbentien beobachtet werden. Bei längeren Trocknungszeiten (> 10 min) traten hingegen sowohl im Luft- als auch im Inertgasstrom bei einigen Verbindungen (Cyclophosphamid, Carmustin) Substanzverluste auf. Daher, und weil eventuell in die Eluate gelangende Wasserspuren die HPLC-Analytik nicht stören, wurde bei der Verwendung von Extraktionssäulen maximal 5 Minuten und bei den scheibenförmigen Materialien maximal 3 Minuten im schwachen Luftstrom getrocknet. Die Verwendung anderer Gase brachte keine Vorteile.

Elution

In Tabelle 27 sind die idealen Lösungsmittel sowie die für den Elutionsschritt erforderlichen Volumina aufgelistet. Generell konnten die Wiederfindungsraten durch eine Aufteilung des Elutionsmittels in mehrere kleine Portionen, die nacheinander auf das Sorbens gegeben werden, erhöht werden. Auch die Verlängerung der Einwirkzeit des Lösungsmittels auf bis zu 5 min verbessert die Ergebnisse.

Allerdings ist vor allem bei sehr flüchtigen Solventien darauf zu achten, dass nicht große Teile des Lösungsmittels bereits während der Elution verdunsten. Eine Erwärmung des Elutionsmittels erwies sich als ungeeignet zur Erhöhung des Rs-

Wertes. Insgesamt waren niedrige Wiederfindungsraten bei den Anreicherungsversuchen fast immer eine Folge von Substanzverlusten durch unvollständige Adsorption. Verluste durch ungenügende Desorption spielten nur eine untergeordnete Rolle. In den zur Elution verwendeten Lösungsmitteln sind die untersuchten Zytostatika weitgehend stabil. Die Untersuchungen ergaben, dass die Eluate der Anreicherung tiefgekühlt (- 18°C) mindestens acht Wochen ohne Änderung der Analytkonzentration aufbewahrt werden können.

Einengen der Eluate

Die Versuche, die Anreicherungsfaktoren durch Einengen der Eluate weiter zu erhöhen, wurden in Nasenkolben mit 0,2 ml-Graduierung durchgeführt. Als Inertgas wurde zunächst Stickstoff später Argon verwendet. Beide Gase eignen sich gleichermaßen für diesen Zweck, während bei der Verwendung normaler Druckluft in Einzelfällen Substanzverluste zu beobachten waren. Die Erwärmung der Eluate führte zwar zu einer Beschleunigung des Vorgangs aber auch zu einer Verschlechterung der Wiederfindungsrate. Daher wurde dieser Schritt bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Einengen bis zur Trockne bewirkte auch unter sehr schonenden Bedingungen bei sieben der zehn untersuchten Zytostatika nicht reproduzierbare Verluste; lediglich die Substanzen Cisplatin, Etoposid und Methotrexat sind davon nicht betroffen. Die untere Grenze, bis zu der verlustfrei aufkonzentriert werden kann, liegt bei den übrigen Substanzen bei ca. 0,4 ml. In Einzelfällen kann es im Verlauf des Einengens vorzeitig zu einem Ausfallen zuvor gelöster Bestandteile kommen. Wenn das geschieht, muss das Eluat mit geeigneten Lösungsmitteln, vorzugsweise dem Eluenten der nachfolgenden chromatographischen Analyse, verdünnt werden. In allen Fällen muss darauf geachtet werden, dass ein möglichst genau definiertes Volumen erhalten wird. Da dieser Wert für die quantitative Auswertung von zentraler Bedeutung ist, wurde er zusätzlich mit Hilfe einer Mikroliterspritze bestimmt.

8.1.1.10 Untere Konzentrationsgrenzen der Anreicherung

Mit den optimierten Parametern wurde die kleinste noch erfassbare Substanzkonzentration für jedes Anreicherungsverfahren bestimmt. In Tabelle 28 sind die Konzentrationsgrenzen der beschriebenen Anreicherungsverfahren aufgelistet.

Sor-bens	Untere Konzentrationsgrenzen der optimierten Anreicherungsverfahren [mg/l]									
	Carmu-stin	Chlor-am-bucil	Cis-platin	Cyclo-phos.	Cyt-ara-bin	Eto-po-sid	Fluo-ro-uracil	Mel-pha-lan	Metho-trexat	Vin-bla-stin
XAD-4	-	0,5	-	30	-	-	-	2,5	1	0,5
XAD-7	-	-	-	10	-	-	-	-	0,5	-
A-26	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
50WX2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Propyl-sulfons.	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-
Cyano	-	-	-	2	-	0,2	-	-	-	-
TSC	1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
C8	1	0,1	-	0,2	-	0,1	-	0,2	0,5	0,2
C10	1	0,1	-	0,5	-	0,2	-	0,1	0,5	0,02
C18	0,1	0,1	-	0,2	-	0,02	-	0,05	0,02	0,01
C18 light load	0,2	0,1	-	0,5	-	0,05	1	0,1	0,02	0,02
C18 Polar Plus	0,05	0,005	0,1	0,2	-	0,01	0,5	0,01	0,01	0,01
SDB1	0,005	0,05	-	1	-	0,01	-	0,01	0,05	0,01
ENV+	0,02	0,1	-	5	-	0,02	0,2	0,5	0,05	0,002
EN	0,002	0,01	-	2,0	-	0,01	-	0,02	0,02	0,005
DVB	0,02	0,01	-	0,1	0,02	0,02	0,05	0,005	0,02	0,002
	BCNU	CLB	CDD P	CYCL O	ARA C	VP1 6	5-FU	L- PAM	MTX	VLB

Tab. 28: Niedrigste mit den optimierten Anreicherungsverfahren erfassbare Zytostatika-Konzentrationen

Die Anreicherungsversuche wurden in einem Zeitraum von sechzehn Monaten durchgeführt, so dass zu jeder Jahreszeit und bei unterschiedlichsten Witterungsbedingungen (Hochwasser, Trocken-, Frostperioden) entnommene Freilandproben mitbezogen werden konnten. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Matrixbelastung, sowohl der eigentlichen Wasserproben als auch der angereicherten Eluate. In Einzelfällen sind daher noch wesentlich geringere Substanzkonzentrationen bei der Anreicherung erfassbar; die angegebenen unteren Konzentrationsgrenzen für die Anreicherung wurden jedoch in allen Versuchen erreicht. Signifikante Unterschiede in den unteren Konzentrationsgrenzen der Anreicherung zwischen den einzelnen Arten von Oberflächenwasser ergaben sich hingegen in den Untersuchungen nicht, so dass die ermittelten Werte für Teich- und Flusswasser sowie Kläranlagenzu- und -ablauf gleichermaßen gültig sind. Die beschriebenen Anreicherungsverfahren wurden zur Konzentrationsbestimmung der Zytostatika im Rahmen der Abbaubersuche eingesetzt.

8.1.1.11 Erzielte Anreicherungs-faktoren

Der Anreicherungs-faktor kann sowohl durch Erhöhung des Probenvolumens als auch durch eine stärkere Aufkonzentrierung des Eluats vergrößert werden. Dem letztgenannten Verfahren sind Grenzen gesetzt. Bei Verwendung von Extraktionssäulen können unter ungünstigen Bedingungen - hoher Feststoffanteil der Probe - nur etwa 1 l Oberflächenwasser angereichert werden, bevor die Flussgeschwindigkeit infolge beginnender Verstopfung der Fritten zu gering wird. Da andererseits das Einengen des Eluats insbesondere bei den Substanzen Cyclophosphamid, Melphalan und Chlorambucil zu nicht reproduzierbaren Verlusten führt, können nur Anreicherungs-faktoren von etwa 250 erzielt werden. Auch wenn in Einzelfällen auch an säulenförmigen Anreicherungs-materialien aus einem deutlich größeren Volumen angereichert werden konnte, wurden zur Erzielung möglichst hoher Anreicherungs-faktoren, soweit erhältlich, Extraktionsscheiben bevorzugt. Mit letztgenannten können Probenvolumina von mindestens 3 l Oberflächenwasser sicher angereichert werden. Bei einem Endvolumen des aufkonzentrierten Eluats von 0,4 ml ergibt sich somit ein Anreicherungs-faktor von mindestens 7500. Damit ist ein Hauptziel der Anreicherung im Zusammenhang mit der Problemstellung, die deutliche Erhöhung der Analytkonzentra-

tion vor der eigentlichen chromatographischen Analyse, für die meisten Substanzen erreicht.

8.1.1.12 Verbesserung der Bestimmungsgrenzen durch die Anreicherung

Hauptziel der Anreicherung war eine Verbesserung der Bestimmungsgrenzen der untersuchten Zytostatika. In Tabelle 29 sind die Bestimmungsgrenzen der direkten chromatographischen Analyse den unteren Konzentrationsgrenzen der optimierten Anreicherung gegenübergestellt.

Substanz	Bestimmungsgrenze und Detektionsparameter der HPLC [$\mu\text{g/ml}$]			Untere Konzentrationsgrenze und geeignete Sorbentien der Anreicherung [$\mu\text{g/ml}$]	
Carmustin	0,5	UV	231 nm	0,002	EN
Chlorambucil	0,2	UV	255 nm	0,005	C18 Polar Plus
Cisplatin	50	UV	318 nm	0,2	TSC, C18 Polar Plus
Cyclophosph.	80	UV	200 nm	0,1	DVB
Cytarabin	0,02	UV	283 nm	0,02	ENV+
Etoposid	0,03	Flu	230 / 328 nm	0,01	C18 Polar Plus, SDB 1, EN
Fluorouracil	0,2	UV	267 nm	0,05	ENV+
Melphalan	0,1	Flu	260 / 360 nm	0,005	DVB
Methotrexat	0,4	UV	298 nm	0,01	C18 Polar Plus
Vinblastin	0,01	Flu	255 / 345 nm	0,002	ENV+, DVB

Tab. 29: Untere Konzentrationsgrenzen der Anreicherung im Vergleich mit den Bestimmungsgrenzen der direkten chromatographischen Analyse

Durch die der chromatographischen Trennung und Detektion vorgeschaltete Anreicherung ergibt sich für die unpolareren Substanzen (Carmustin, Chlorambucil, Eto-

posid, Methotrexat, Vinblastin) bereits eine deutlich verbesserte Nachweisgrenze im Vergleich mit der direkten HPLC-Analytik. Größere Schwierigkeiten bereitet naturgemäß die Anreicherung der hydrophilen Verbindungen. Im Falle des Cytarabin gelingt eine vollständige Anreicherung (Wiederfindungsraten $\geq 90\%$) bereits bei Substanzkonzentrationen nicht mehr, bei denen eine Bestimmung mit Hilfe der direkten HPLC-Analyse noch möglich ist. Für diese Verbindung müssen in der Zukunft noch geeignete Anreicherungsmaterialien bzw. andere Anreicherungstechniken gefunden werden.

8.1.1.13 Einteilung der Zytostatika in Gruppen für die Anreicherung

Zur Vereinfachung und Beschleunigung der Analytik von Zytostatika ist es wünschenswert, möglichst viele Substanzen gleichzeitig erfassen zu können. Aus den Daten in Tabelle 30 ist jedoch ersichtlich, dass aufgrund der bereits erwähnten Heterogenität der untersuchten Substanzgruppe, die Anreicherung aller zehn Substanzen an einem einzigen Sorbens nicht möglich ist. An C18 Polar Plus lassen sich alle Substanzen bis auf Cytarabin anreichern; ENV+ ist für alle Zytostatika mit Ausnahme des Cisplatin geeignet. Allerdings unterscheiden sich die Bedingungen der einzelnen Schritte der Anreicherung verschiedener Substanzen auch bei Verwendung des gleichen Sorbens.

Will man möglichst viele Substanzen in einem Arbeitsschritt erfassen, so sind Kompromisse bei den Anreicherungsbedingungen notwendig. Dadurch nimmt für einige oder alle Substanzen die Nachweisstärke des Gesamtverfahrens ab. Es ist daher sinnvoll, jeweils nur bestimmte Zytostatika in Gruppen zur gleichzeitigen Anreicherung an einem geeigneten Sorbens zusammenzufassen. Für die weiteren Anreicherungsversuche und insbesondere für die Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit wurde folgende Aufteilung verwendet:

Gruppe	Anreicherbare Zytostatika	Sorbens
1	Carmustin, Etoposid, Vinblastin	EN
2	Chlorambucil, Etoposid, Melphalan, Methotrexat	C18 Polar Plus
3	Cisplatin, Cyclophosphamid, Etoposid, Melphalan	C18 Polar Plus
4	Fluorouracil, Vinblastin	ENV+
5	Carmustin, Etoposid, Melphalan, Vinblastin	SDB 1
6	Etoposid, Melphalan, Vinblastin	DVB

Tab. 30: Gruppen gleichzeitig anreicherbarer Zytostatika

Wie aus Tabelle 30 ersichtlich, ergeben sich Überschneidungen zwischen den sechs genannten Gruppen. Die Substanzen Carmustin, Etoposid, Melphalan und Vinblastin können mit vergleichbaren Ergebnissen mit mehreren Verfahren angereichert werden. Cytarabin taucht dagegen in der vorliegenden Aufteilung nicht auf, da bei dieser Substanz eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit durch die Anreicherung nicht zu erzielen ist.

Mit den folgenden Anreicherungsbedingungen für die einzelnen Gruppen lassen sich die in Tabelle 31 angegebenen Zytostatikakonzentrationen aus verschiedenen Oberflächenwasserproben reproduzierbar anreichern.

Bei der tatsächlichen Einteilung sollten zusätzlich das chromatographische Verhalten, wie z. B. die Fluoreszenzaktivität, berücksichtigt werden. Bei der Anwendung der Anreicherungsverfahren im Rahmen der Untersuchung des biologischen Abbauverhaltens müssen zusätzliche Kriterien, wie die Entstehung von Metaboliten, bei der Gruppeneinteilung berücksichtigt werden.

Gruppe	Sorbens	Konditionierung*	Proben pH-Wert	Waschschritt	Elution**
1 Carmustin Etoposid Vinblastin	EN	4 ml MeOH, 3 ml PP pH 6,0	pH 6,0	2 × 1ml H ₂ O	3 × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50 (v/v)
2 Chlorambucil Etoposid Melphalan Methotrexat	C18 Polar Plus	4 ml MeOH, 3 ml PP pH 4,8	pH 4,8	----	2 (3) × 1ml MeOH 2 (3) × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50 (v/v)
3 Cisplatin Cyclophosph. Etoposid Melphalan	C18 Polar Plus	4 ml MeOH, 3 ml PP pH 6,0	pH 6,0	----	2 (3) × 1ml MeOH 2 (3) × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50 (v/v)
4 Fluorouracil Vinblastin	ENV+	4 ml MeOH, 3 ml PP pH 7,0	pH 7,0	----	1ml PP pH 3,0; 1ml MeOH; 2ml CH ₂ Cl ₂ /Et ₂ O 50:50
5 Carmustin Etoposid Melphalan Vinblastin	SDB 1	4 ml MeOH, 3 ml PP pH 6,0	pH 6,0	2 × 1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50:50 (v/v)
6 Etoposid Melphalan Vinblastin	DVB	4 ml MeOH, 3 ml PP pH 6,0	pH 6,0	2×1ml H ₂ O	3 (5) × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50:50 (v/v)

* PP = Phosphatpuffer mit entsprechendem pH-Wert

** In Klammern Elutionsvolumina für Extraktionsscheiben

Tab. 31: Bedingungen für die einzelnen Schritte der gleichzeitigen Festphasenanreicherung verschiedener Zytostatika

8.1.1.14 Statistische Auswertung der Anreicherungsresultate

Bei der Betrachtung der Genauigkeit der durch das Anreicherungsverfahren ermittelten Zytostatikakonzentrationen ist zu beachten, dass in den entsprechenden Fehler auch die Abweichung des analytischen Bestimmungsverfahrens, hier also der Flüssigchromatographie, eingeht. Der Fehler des Gesamtverfahrens kann also nicht kleiner sein als der der nachfolgenden Analytik. Im allgemeinen sind jedoch die durch die Anreicherung verursachten Fehleranteile wesentlich größer, da dieser Prozess aus einer Vielzahl einzelner Schritte besteht. Jeder zuvor beschriebenen Teilschritte kommt als Fehlerquelle in Betracht. Die Verwendung eines internen Standards, der vor der Anreicherung zugesetzt wird, würde die Überprüfung der durch die Anreicherung verursachten Abweichungen ermöglichen. Allerdings muss dazu sichergestellt sein, dass diese Substanz in ihrem Verhalten sowohl bei der Anreicherung als auch bei der nachfolgenden Bestimmung dem Analyten möglichst ähnlich ist. Bei dem hier vorliegenden analytischen Problem, der gleichzeitigen Anreicherung mehrerer chemisch sehr verschiedener Substanzen, ist die Kalibrierung mittels internem Standard nicht möglich. Die R_s -Werte wurden statt dessen, wie beschrieben, über externe Standards ermittelt.

In Versuchsreihen wurde die Abweichung der R_s -Werte zwischen den wiederholten Analysen derselben Probe untersucht. Diese Versuche wurden mit den beschriebenen Anreicherungsverfahren für jede der sechs Zytostatikagruppen einzeln durchgeführt. Dazu wurden 2,5 l Oberflächenwasser mit den 2-4 Zytostatika der jeweiligen Gruppe dotiert und anschließend in fünf identische Proben (500 ml) aufgeteilt. Die Zytostatikagehalte entsprachen den in Tabelle 29 angegebenen unteren noch anreicherbaren Konzentrationen. Die fünf dotierten Proben sowie eine undotierte Blindprobe wurden parallel (bei Verwendung von Extraktionsdisks aufgeteilt in zweimal drei Proben) am jeweiligen Sorbens angereichert. In den Tabellen 32 bis 34 sind die mittleren R_s -Werte und deren Standardabweichungen σ für die unterschiedlichen Matrizes zusammengestellt.

Substanz	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4		Gruppe 5		Gruppe 6	
	R _s [%]	σ										
Carmustin	98	5	---	--	---	--	---	--	94	4	---	--
Chlorambucil	---	--	89	6	---	--	---	--	---	--	---	--
Cisplatin	---	--	---	--	91	7	---	--	---	--	---	--
Cyclophosphamid	---	--	---	--	91	5	---	--	---	--	---	--
Etoposid	92	5	94	4	94	5	---	--	95	6	98	3
Fluorouracil	---	--	---	--	---	--	93	8	---	--	---	--
Melphalan	---	--	85	6	88	7	---	--	94	6	86	6
Methotrexat	---	--	93	4	---	--	---	--	---	--	---	--
Vinblastin	92	4	---	--	---	--	97	6	97	4	96	3

Tab. 32: Mittlere Wiederfindungsraten R_s und deren Standardabweichungen σ für die Anreicherung von Zytostatikagruppen aus Flusswasser

Substanz	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4		Gruppe 5		Gruppe 6	
	R _s [%]	σ										
Carmustin	91	8	---	--	---	--	---	--	92	7	---	--
Chlorambucil	---	--	90	4	---	--	---	--	---	--	---	--
Cisplatin	---	--	---	--	102	9	---	--	---	--	---	--
Cyclophosphamid	---	--	---	--	94	8	---	--	---	--	---	--
Etoposid	98	3	89	5	96	4	---	--	93	6	95	4
Fluorouracil	---	--	---	--	---	--	97	5	---	--	---	--
Melphalan	---	--	89	6	90	7	---	--	98	3	82	8
Methotrexat	---	--	98	7	---	--	---	--	---	--	---	--
Vinblastin	95	5	---	--	---	--	99	4	100	6	96	4

Tab. 33: Mittlere Wiederfindungsraten R_s und deren Standardabweichungen σ für die Anreicherung von Zytostatikagruppen aus dem Zulauf der Modellkläranlage

Substanz	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4		Gruppe 5		Gruppe 6	
	R _s [%]	σ										
Carmustin	92	4	---	--	---	--	---	--	100	6	---	--
Chlorambucil	---	--	90	8	---	--	---	--	---	--	---	--
Cisplatin	---	--	---	--	94	8	---	--	---	--	---	--
Cyclophosphamid	---	--	---	--	97	7	---	--	---	--	---	--
Etoposid	92	3	96	5	87	6	---	--	99	5	85	6
Fluorouracil	---	--	---	--	---	--	88	6	---	--	---	--
Melphalan	---	--	86	8	94	5	---	--	91	5	82	6
Methotrexat	---	--	99	4	---	--	---	--	---	--	---	--
Vinblastin	94	5	---	--	---	--	92	4	97	6	101	4

Tab. 34: Mittlere Wiederfindungsraten R_s und deren Standardabweichungen für die Anreicherung von Zytostatikagruppen aus dem Ablauf der Modellkläranlage

Die Wiederfindungsraten bewegten sich mit den vorgestellten optimierten Verfahren im Bereich zwischen 73 und 121%. Die Standardabweichungen waren mit 3-9% mehr als doppelt so groß wie bei der direkten Bestimmung ohne vorherige Anreicherung. Die geringsten Schwankungen ergaben sich bei den dotierten Flusswasserproben. Am höchsten waren die Abweichungen bei der Untersuchung des als Zulauf der Labor-Belbtschlammanlage verwendeten synthetischen Abwassers. Hier, wie auch in etwas geringerem Ausmaß beim Kläranlagenablauf, macht sich der höhere Gehalt an störenden Interferenzen sowohl bei der Anreicherung als auch bei der chromatographischen Analyse bemerkbar. Zu hohe Befunde (R_s > 100%) ergeben sich, wenn Matrixsignale im Chromatogramm mit Substanzpeaks zusammenfallen. Da hier die unbelasteten Blindproben als Vergleich zur Verfügung standen, konnten solche Effekte erkannt und berücksichtigt werden. Bei Realproben, deren Zusammensetzung weder bekannt noch zeitlich und räumlich konstant ist, ist zur Detektion unbedingt ein substanzspezifisches Verfahren erforderlich (UV-Photodiodenarray, HPLC-MS etc.). Da die Oberflächenwasserproben ihre Zusammensetzung mit der Zeit än-

dern, ist eine Bestimmung der Tag-zu-Tag-Abweichung des Anreicherungsverfahrens nicht möglich.

8.1.2 Flüssigchromatographische Trennung

8.1.2.1 Verwendete Geräte und Lösungsmittel

Für die flüssigchromatographische Trennung wurde eine HPLC-Anlage mit binärem Hochdruckgradientensystem, UV-Photodiodenarray- sowie Fluoreszenzdetektor (alle Geräte Shimadzu) verwendet. Die Proben wurden über ein manuelles Injektionsventil mit 20µl Probenschleife (Rheodyne) mittels Mikroliterspritze injiziert. Steuerung der Geräte und Auswertung der Daten erfolgten rechnergestützt mit der Software des Geräteherstellers.

Die verwendeten Lösungsmittel waren von HPLC- bzw. Gradienten-Reinheit. Das zur Pufferherstellung verwendete Wasser wurde aus vollentsalztem Wasser (Hausversorgung) durch zweifache Destillation in einer Quarzglasapparatur gewonnen. Alle verwendeten Puffersalze waren von p.a.-Qualität.

8.1.2.2 Entwicklung der flüssigchromatographischen Methoden

Die zehn Zytostatika wurden mittels reversed-phase Chromatographie getrennt. Aufgrund der großen Heterogenität der aus sehr unterschiedlichen Substanzklassen stammenden Antitumor-mittel, ist ihre gleichzeitige flüssigchromatographische Trennung nur unter Einsatz der Gradientenelution möglich. Es wurde zunächst ein chromatographisches Trennsystem für die gleichzeitige Trennung der zehn ausgewählten Zytostatika entwickelt. Dazu wurden verschiedene Eluentenzusammensetzungen getestet und der Gradientenverlauf optimiert. Die entwickelten Trennverfahren wurden bei der Entwicklung der Anreicherungsverfahren eingesetzt.

Durch den Anreicherungs-schritt ergibt sich bereits eine Aufteilung der zehn Substanzen in mehrere Gruppen je nach dem am besten geeigneten Sorbens. Auch für die

Abbauversuche wurden die Zytostatika in insgesamt vier Gruppen aufgeteilt. Die chromatographische Bestimmung der Zytostatika der einzelnen Gruppen kann prinzipiell mit den für die Trennung der zehn Zytostatika entwickelten Gradienten erfolgen. Selektiver und vor allem schneller kann die chromatographische Analyse jedoch unter den speziell auf diese Gruppe abgestimmten Bedingungen durchgeführt werden. Daher wurden auch chromatographische Verfahren zur Auftrennung der Zytostatika der einzelnen Gruppen entwickelt. Die jeweiligen chromatographischen Parameter wurden so optimiert, dass die vollständige Trennung in möglichst kurzer Zeit gelingt.

Dabei wurde darauf geachtet, dass aus der Matrix stammende und bei der Anreicherung nicht vollständig abgetrennte Interferenzen nicht gleichzeitig mit den Analyten eluieren. Bei den Abbauversuchen sollten zusätzlich zu den Muttersubstanzen auch eventuell auftretende Abbau- bzw. Zersetzungsprodukte mit den gewählten Trennbedingungen erfassbar sein.

Für die Entwicklung der chromatographischen Methoden wurden zunächst Lösungen der zehn Substanzen in destilliertem Wasser verwendet. Die Bedingungen dieser Trennung wurden beim Übergang zu dotierten Proben verschiedener Oberflächenwässer der Matrixbelastung angepasst. Bei den genannten Wasserproben handelte es sich um Teichwasser aus verschiedenen Teichen auf dem Gelände der Ruhr-Universität Bochum, Flusswasser aus der Ruhr sowie den Zu- bzw. Ablauf der für die Abbauversuche verwendeten Modellkläranlage (synthetisches Abwasser).

8.1.2.3 Verwendete Säulen

Als stationäre Phasen wurden kommerziell erhältliche C18-Säulen (Machery-Nagel, Nucleosil[®] 100-5 C18, 250 × 4 mm) verwendet. Mit dem gleichen Material selbstgefüllte Säulen wurden wegen ihrer im allgemeinen deutlich schlechteren und wenig reproduzierbaren Trennleistung nur gelegentlich zur Bestimmung der Retentionszeiten der Einzelsubstanzen eingesetzt. Alle Säulen wurden zum Schutz der analytischen Säule mit Vorsäulen (Machery-Nagel, 11 × 4 mm, C18, Nucleosil[®] 100-5) ausgerüstet.

8.1.2.4 Optimierung der chromatographischen Trennung

Als organischer Anteil der Gradienten wurden Acetonitril und Methanol eingesetzt. Acetonitril besitzt eine größere Elutionsstärke als Methanol sowie eine andere Selektivität; daher muss für beide Lösungsmittel ein idealer Gradientenverlauf gefunden werden.

Außerdem wurde der Einfluss des pH-Wertes im Bereich von 2,5-7,0 auf Retentionszeiten und Peakformen der einzelnen Substanzen untersucht. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde Acetat-, Citronensäure- und Phosphatpuffer getestet. Auch der Einfluss der Pufferkonzentration auf die Trennergebnisse wurde untersucht. Alle Lösungsmittel wurden unmittelbar vor der Verwendung mittels Ultraschall entgast. Die Flussrate betrug bei allen Trennungen 1ml/min.

8.1.2.5 Optimierung der Detektion

UV-Detektion

Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines UV-Photodiodenarray-Detektors, dessen Verwendung die quantitative Auswertung des Chromatogramms im Absorptionsmaximum der jeweiligen Verbindung erlaubt. Außerdem ermöglicht dieser Detektor die Identifizierung einer Substanz durch Vergleich ihres während der chromatographischen Trennung aufgenommenen UV-Spektrums mit dem Spektrum der Reinsubstanz. Diese Spektren wurden durch Injektion der Stammlösungen ohne Trennsäule erhalten. Während der chromatographischen Trennung wurden die UV-Spektren im Bereich von 200-350 nm registriert und gespeichert.

Fluoreszenz-Detektion

Bei dafür geeigneten Substanzen erfolgte die Detektion sinnvollerweise mit dem Fluoreszenz-Detektor, da diese Detektionsart zumeist nachweisstärker und gegenüber der Matrix auch selektiver ist. Der verwendete Detektor arbeitet mit einer Xenon-Lampe und kann auf Anregungs- und Emissionswellenlängen von 200 bis 900 nm eingestellt werden. Durch scannen dieser Wellenlängenbereiche im stop-flow Verfahren können die Anregungs- und Emissionsmaxima einer Substanz während der chromatographischen Trennung ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fluoreszenz-Detektor für die Bestimmung der fluoreszierenden Substanzen Etoposid, Melphalan und Vinblastin genutzt. Auch Chlorambucil weist fluoreszierende Eigenschaften auf, allerdings sind bei dieser Substanz mit der UV-Detektion bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erreichen. Die optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden für die einzelnen Verbindungen bestimmt. Das Fluoreszenzgerät wurde in allen chromatographischen Trennungen als zusätzliches, dem UV-Detektor nachgeschaltetes Detektionssystem verwendet. Eine Verwendung vor dem UV Detektor ist ebenfalls möglich, allerdings darf dann kein Restriktionsventil zur Stabilisierung des Gegendrucks verwendet werden, da die Detektorzelle des Fluoreszenz-Detektors nur bis maximal 3 bar stabil ist. Die zeitliche Verzögerung zwischen den UV- und Fluoreszenzsignalen der gleichen Substanz beträgt bei der verwendeten Apparatur ca. 40 Sekunden.

8.1.2.6 Verwendete Gradienten

Die experimentell ermittelten optimalen zeitlichen Verläufe der Methanol bzw. Acetonitril-Gradienten sind im folgenden wiedergegeben. Angegeben ist jeweils der Anteil des organischen Modifiers in Volumenprozent. Die Anstiege dieses Anteils innerhalb der angegebenen Zeitspannen waren in allen Fällen linear.

Acetonitril:

Start:		99%	Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
0	-	9 min	99 - 70%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
9	-	13 min	70%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
13	-	15 min	70 - 60%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
15	-	19min	60%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
19	-	22 min	60 - 40%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
22	-	25 min	60 - 20%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5
25	-	27min	20%
			Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,5

Methanol:

Start:		97%	Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,0	
0	-	2 min	97%	Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,0
2	-	22 min	57%	Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,0
22	-	30 min	25%	Phosphatpuffer (0,01 M KH ₂ PO ₄), pH = 3,0

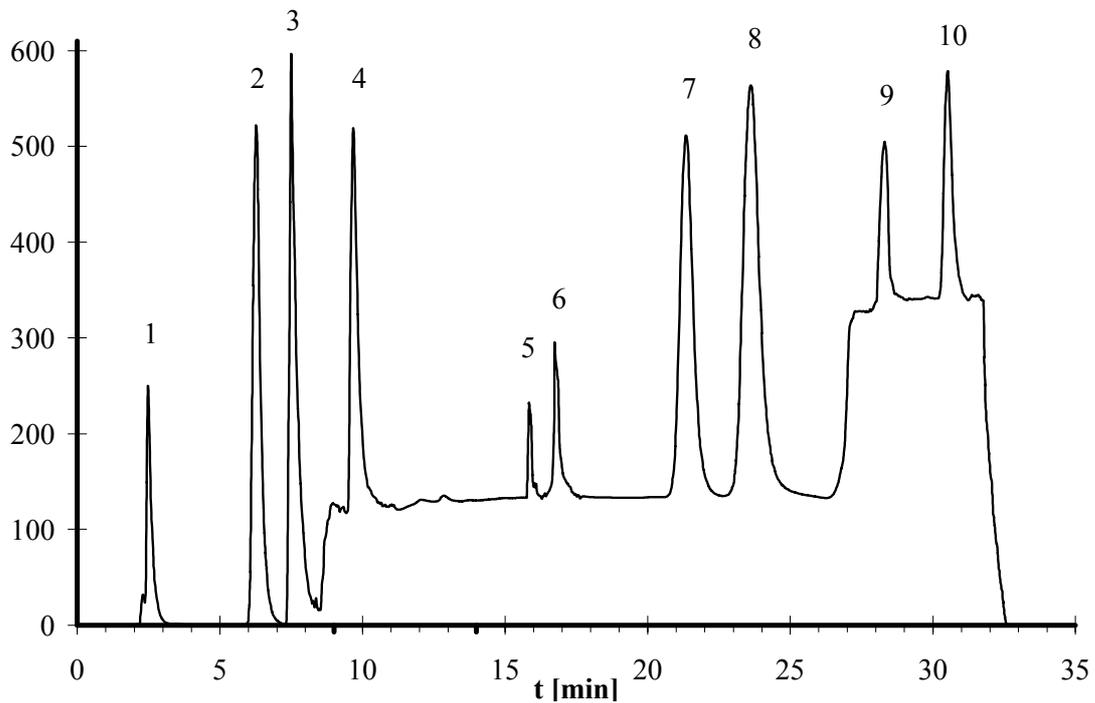
Zu beachten ist, dass der Eluent mit einer bestimmten Zusammensetzung erst mit einer gewissen Verzögerung das Einspritzventil erreicht. Im Chromatogramm ist dies durch einen Anstieg der Grundlinie zu erkennen, sobald der Eluent mit höherem organischen Anteil die UV-Detektorzelle erreicht. Diese "Gradiententotzeit" oder dwell-time beträgt unter den gegebenen Bedingungen 6,8 min. Die Verzögerung zwischen Pumpe und Einspritzventil ergibt sich als Differenz zwischen Gradiententotzeit und der eigentlichen Totzeit (2,1 min) und betrug unter den gegebenen Umständen 4,7 Minuten. Nach dem Start des Gradientenprogramms gelangt also noch für diesen Zeitraum der Eluent mit der anfänglichen Zusammensetzung auf die Säule.

An alle Gradienten schloss sich ein Spülprogramm mit erhöhter Flussrate zur Entfernung stark reternierender Verbindungen von der Säule und anschließender Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen an.

Spülprogramm:	0 - 2 min	80% organischer Modifier	Flussrate 1,0 ml/min
	2 - 4 min	80-0% organischer Modifier	Flussrate 1,5 ml/min
	4 - 6 min	0% organischer Modifier	Flussrate 1,5 ml/min
	6 -10 min	0% organischer Modifier	Flussrate 1,0 ml/min

In den Abbildungen 24 und 25 sind die mit dem UV- bzw. Fluoreszenz-Detektor aufgenommenen Chromatogramme der zehn Zytostatika, getrennt mit den verschiedenen Gradienten, dargestellt.

UV-Detektion: 202 nm



Fluoreszenz-Detektion: 250/350 nm

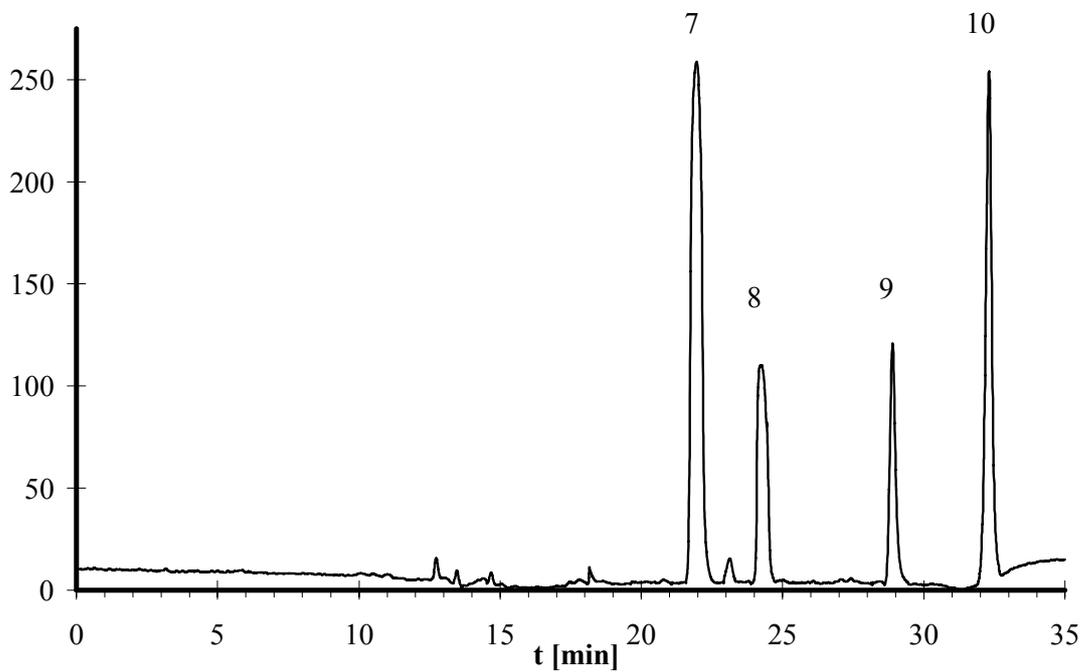
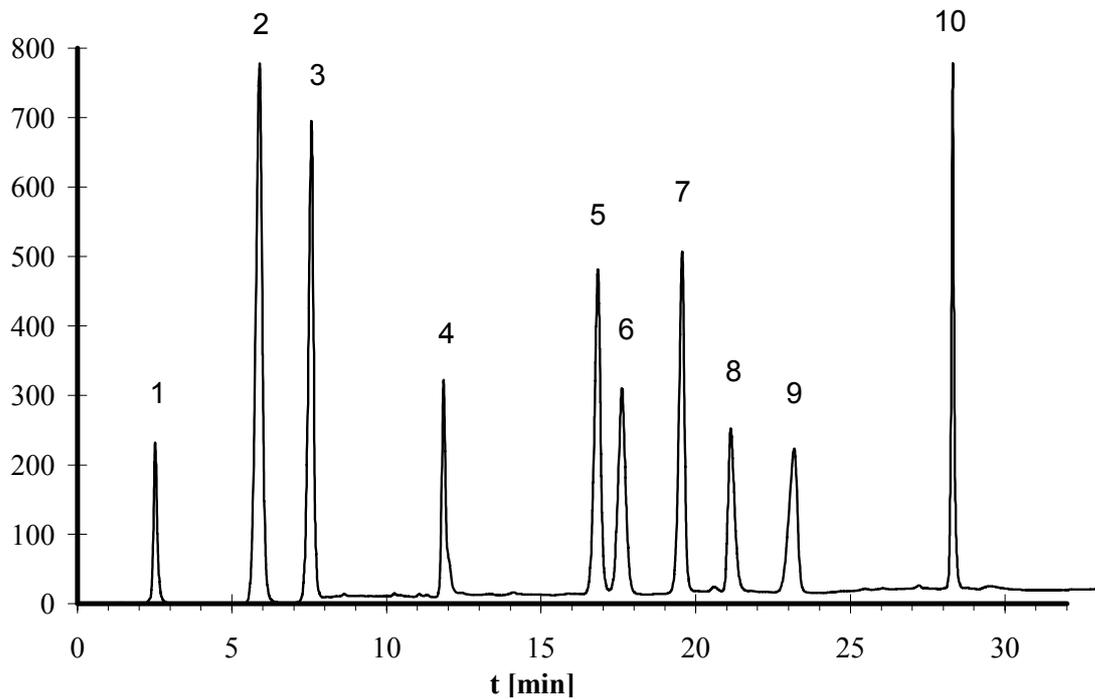


Abb. 24: Chromatogramme der zehn untersuchten Zytostatika in Flusswasser Methanol-Gradient. Cisplatin, 2 Fluorouracil, 3 Cytarabin, 4 Methotrexat, 5 Cyclophosphamid, 6 Carmustin, 7 Melphalan, 8 Etoposid, 9 Vinblastin, 10 Chlormambucil

UV-Detektion: 202 nm



Fluoreszenz-Detektion: 250/350 nm

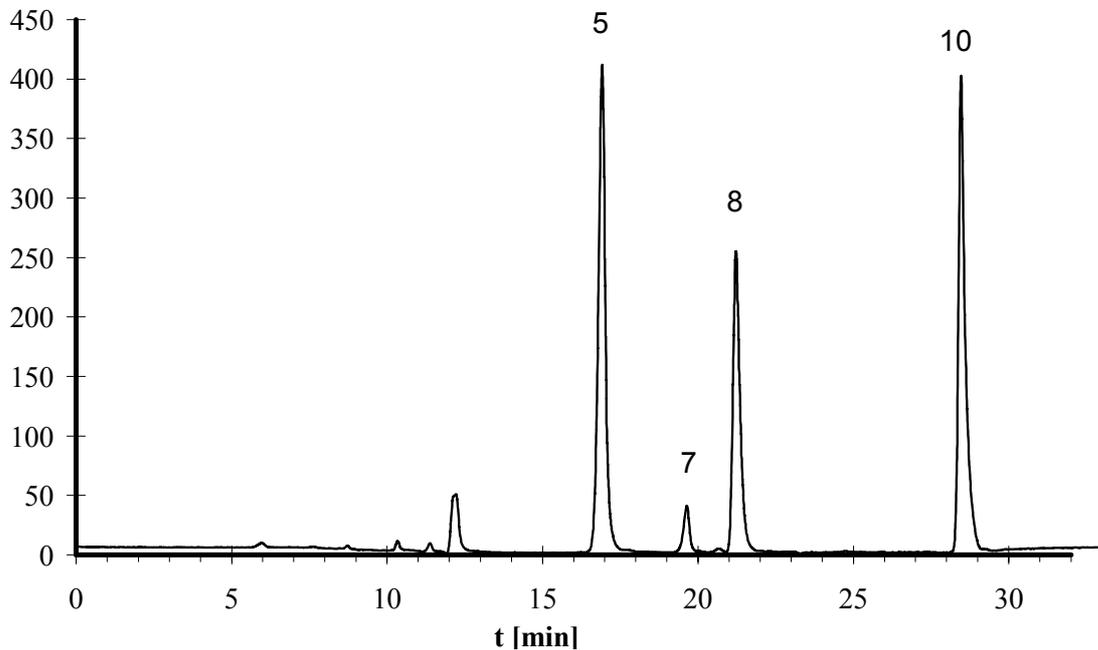


Abb. 25: Chromatogramme der zehn untersuchten Zytostatika in Flusswasser, Acetonitril-Gradient. 1 Cisplatin, 2 Fluorouracil, 3 Cytarabin, 4 Methotrexat, 5 Melphalan, 6 Cyclophosphamid, 7 Etoposid, 8 Vinblastin, 9 Carmustin, 10 Chlorambucil

Die Trennung der zehn Substanzen ist sowohl mit Methanol als auch mit Acetonitril als organischem Modifier möglich. Allerdings ergeben sich abweichende Peakreihenfolgen, die aber auch vom pH-Wert (siehe unten) abhängen. Die Analysendauer beträgt in beiden Fällen etwa 30 Minuten, inklusive Spülprogramm ca. 40 Minuten. Wird Methanol als organisches Lösungsmittel verwendet, so gelingt die Trennung nur mit einem Stufengradienten. Kritisch ist dabei vor allem die Trennung der Substanzen Cyclophosphamid und Carmustin bzw. Melphalan und Etoposid. Solche Stufengradienten haben den generellen Nachteil, dass beim sprunghaften Ansteigen des organischen Anteils im Eluenten eine große Anzahl aus der Matrix stammender Substanzen gleichzeitig von der Säule eluieren. Es muss darauf geachtet werden, dass sich unter diesen keine der zu untersuchenden Substanzen befindet. Für eine möglichst gute Auftrennung sind linear ansteigende Gradienten zu bevorzugen.

Die Verwendung von Methanol als organischem Modifier führt, bedingt durch die UV-Absorption dieses Lösungsmittels im unteren UV-Bereich (UV-cut-off = 205 nm), zu einer gewissen Beeinträchtigung der UV-Detektion in diesem Bereich. Erkennbar ist dies an einem deutlichen Ansteigen der Grundlinie in den bei 202 nm aufgenommenen Chromatogrammen. Dieses Phänomen tritt auch bei der Verwendung von Acetonitril auf ist aber wesentlich schwächer ausgeprägt. Ein weiteres, bei der Verwendung von Methanol auftretendes Problem ist der starke Anstieg des Gegendrucks im Verlauf der chromatographischen Analyse. Die Viskositätskurve von Methanol-Wasser-Gemischen weist ein Maximum bei ca. 40% organischem Anteil auf. In Verbindung mit dem Salzgehalt des wässrigen Anteils führt dies zu einem Ansteigen des Gegendrucks auf Höchstwerte von mehr als 300 bar. Derartig hohe Drucke verringern die Lebensdauer der analytischen Säulen stark und können auch zu Schäden am Pumpensystem führen. Der gleiche Effekt tritt bei der Verwendung von Acetonitril wesentlich schwächer in Erscheinung; der maximale Gegendruck bleibt unter den genannten Bedingungen unter 250 bar. Insgesamt führten die genannten Nachteile zur ausschließlichen Verwendung von Acetonitril im weiteren Verlauf der Untersuchungen.

8.1.2.7 Einfluss des pH-Wertes

Für den wässrigen Teil des Gradienten erwiesen sich pH-Werte von 3,0-4,0 als ideal. Dies stellt einen Kompromiss dar, bei dem das Retentionsverhalten der zehn Zytostatika eine vollständige Trennung erlaubt. Die Peakformen der einzelnen Signale sind unter diesen Bedingungen akzeptabel. Oberhalb von pH 4,5 verbreitern sich die Peaks der Substanzen Cytarabin, Etoposid und Vinblastin stark.

Unterhalb eines pH-Wertes von ca. 2,5 beginnt dagegen die allmähliche Zersetzung des reversed-phase-Säulenmaterials. Insbesondere die Retentionszeiten der Zytostatika Cytarabin und Vinblastin hängen sehr stark vom pH-Wert ab.

Beim Vinblastin steigt die Retentionszeit schon bei einem pH-Wert von 4,5 bei den verwendeten Gradienten auf mehr als 60 Minuten an. In Fällen, in denen eine Überlagerung von Peaks der untersuchten Zytostatika mit Matrixsignalen auftritt, kann eine geringfügige Änderung des pH-Wertes die Trennung verbessern.

Für die Einstellung des pH-Wertes sind Phosphatpuffer am besten geeignet. Citronensäure- und Acetatpuffer neigen zu einer schnellen Kontamination mit Bakterien und müssen daher täglich neu angesetzt werden. Es wurde eine Pufferkonzentration von 0,01 M KH_2PO_4 gewählt. Höhere Werte führen mit ansteigendem organischen Anteil im Eluenten zu einem unerwünschten starken Anstieg des Gegendrucks. Unter Umständen kann es bei höheren organischen Anteilen (> 80%) sogar zu einem Ausfallen von Puffersalzen im System kommen, wodurch irreversible Schäden an Pumpen, Säule und Detektor entstehen können. Bei niedrigeren Phosphatkonzentrationen verschlechtern sich die Peakformen der basischen Substanzen durch zunehmende Wechselwirkung der Analyten mit den nicht C18-modifizierten Restsilanolgruppen des Silicagelgerüsts.

8.1.2.8 Detektion

Die Bestimmung der Substanzen erfolgte im Absorptionsmaximum der jeweiligen Verbindung. Bei den Substanzen, deren absolute UV-Absorptionsmaxima im unteren Wellenlängenbereich (< 220 nm) liegen, kommt es jedoch insbesondere bei kleinen Retentionszeiten (< ca. 10 min) häufig zu einer Interferenz mit Matrixsignalen. In die-

sen Fällen wurden - soweit vorhanden - relative Absorptionsmaxima bei höheren Wellenlängen für die Detektion herangezogen.

Die absoluten und relativen UV-Absorptionsmaxima mit den dazugehörigen Extinktionskoeffizienten sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenz-Detektion sind in Tabelle 35 zusammengestellt.

Substanz	UV-Detektion		Fluoreszenz-Detektion	
	Absorptions- Maximum [nm]	Extinktions- koeffizient [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	Anregungs- wellenlänge [nm]	Emissions- wellenlänge [nm]
Carmustin	231	844	---	---
Chlorambucil	204 (260)	752 688	260	360
Cisplatin	203 (298)	5200 190	---	---
Cyclophosphamid	200	218	---	---
Cytarabin	283 (203)	10230 13171	---	---
Etoposid	208 (286)	863 307	230	328
Fluorouracil	203 (267)	10581 7070	---	---
Melphalan	204 (260)	660 592	260	360
Methotrexat	203 (307)	617 475	---	---
Vinblastin	215 (269)	592 176	255	345

(In Klammern relative Absorptionsmaxima)

Tab. 35: UV-Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizienten, Anregungs- und Emissionswellenlängen der untersuchten Zytostatika

Bei der Fluoreszenzdetektion ist ein Wechsel der Anregungs- und Emissionswellenlänge während der chromatographischen Trennung nicht möglich. Bei mehreren fluoreszierenden Zytostatika in der Probe bzw. bei Proben mit unbekannter Zusammensetzung muss entweder ein Kompromiss bei der Auswahl der Anregungs- und Emissionswellenlänge eingegangen oder die Analyse mehrfach bei den jeweils idealen Wellenlängen durchgeführt werden. Als Kompromiss für die gleichzeitige Analytik der vier fluoreszierenden Substanzen wurde eine Anregungswellenlänge von 250 nm und eine Emissionswellenlänge von 350 nm gewählt.

8.1.2.9 Bestimmungsgrenzen der flüssigchromatographischen Analyse

Mit den optimierten chromatographischen Methoden wurden die Konzentrationsgrenzen für die direkte Bestimmung der einzelnen Zytostatika aus destilliertem Wasser und Oberflächenwasser ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte über die Peakhöhen. Die einzelnen Werte für die Bestimmungsgrenzen aus destilliertem Wasser und den verschiedenen Oberflächenwässern sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Substanz	UV-Detektion			Fluoreszenz-Detektion		
	λ_{\max} [nm]	dest. Wasser [mg/l]	Oberflächenwasser [mg/l]	$\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{E}}$ [nm]	dest. Wasser [mg/l]	Oberflächenwasser [mg/l]
Carmustin	231	0,2	0,5	---	---	---
Chlorambucil	204 (260)	0,05	0,5 0,2	260/360	---	---
Cisplatin	203 (298)	30	50	---	---	---
Cyclophosph.	200	45	80	---	---	---
Cytarabin	283 (203)	0,007	0,07 0,1	---	---	---
Etoposid	208 (286)	0,05	0,1 0,1	230/328	0,03	0,03
Fluorouracil	203 (267)	0,06	0,1	---	---	---
Melphalan	204 (260)	0,28	0,8 0,4	260/360	0,1	0,1
Methotrexat	203 (307)	0,15	0,6 0,4	---	---	---
Vinblastin	215 (269)	0,06	0,1 0,5	255/345	0,01	0,01

Tab. 36: Messbedingungen und Bestimmungsgrenzen der chromatographischen Analytik

8.1.2.10 Flüssigchromatographische Trennung im Anschluss an die Anreicherung

Durch das unterschiedliche Verhalten der zehn ausgewählten Zytostatika bei der Anreicherung ergibt sich eine Vorfraktionierung der Substanzen je nach dem geeigneten Sorbens und den optimalen Anreicherungsbedingungen. Die Zytostatika werden durch den Anreicherungsschritt in die folgenden Gruppen unterteilt:

Gruppe	Anreicherbare Zytostatika	Sorbens
1	Carmustin, Etoposid, Vinblastin	EN
2	Chlorambucil, Etoposid, Melphalan, Methotrexat	C18 Polar Plus
3	Cisplatin, Cyclophosphamid, Etoposid, Melphalan	C18 Polar Plus
4	Fluorouracil, Vinblastin	ENV+
5	Carmustin, Etoposid, Melphalan, Vinblastin	SDB-1
6	Etoposid, Melphalan, Vinblastin	DVB

Tab. 37a: Einteilung der zehn untersuchten Zytostatika in Gruppen durch die Anreicherung

Gruppe	Zytostatika	Detektionsparameter	t _R [min]	Gradient
1	Etoposid Vinblastin Carmustin	Flu 240/340 nm Flu 240/340 nm UV 230 nm	7,2 8,1 8,6	Start: 30:70(v/v) ACN/PP pH3,5 0-6 min 30-70 Vol% ACN 6-7 min 70-80 Vol% ACN 7-11 min 80 Vol% ACN
2	Methotrexat Melphalan Etoposid Chlorambucil	UV 307 nm Flu 250/350 nm Flu 250/350 nm Flu 250/350 nm	7,6 10,2 11,3 14,4	Start: 10:90(v/v) ACN/PP pH 3,5 0-5 min 10-40 Vol% ACN 5-8 min 40 Vol% ACN 8-12 min 40-80 Vol% ACN 12-14 min 80 Vol% ACN
3	Cisplatin Melphalan Cyclophosp Etoposid.	UV 202 nm Flu 240/340 nm UV 202 nm Flu 240/340 nm	2,5 13,4 14,1 16,0	Start: 0:100(v/v) ACN/PP pH 3,5 0-4 min 0-30 Vol% ACN 4-6 min 30 Vol% ACN 6-8 min 30-35 Vol% ACN 8-12 min 35-80 Vol% ACN
4	Fluorouracil Vinblastin	UV 267 nm Flu 255/345 nm	3,8 11,6	Start: 5:95 (v/v) ACN/PP pH 3,0 0-4 min 5-40 Vol% ACN 4-7 min 40-80 Vol% ACN
5	Melphalan Etoposid Vinblastin Carmustin	Flu 250/350 nm Flu 250/350 nm Flu 250/350 nm UV 230 nm	6,5 7,8 9,5 10,8	Start: 30:70(v/v) ACN/PP pH 3,0 0-3 min 30-40 Vol% ACN 3-6 min 40 Vol% ACN 6-8 min 40-80 Vol% ACN
6	Melphalan Etoposid Vinblastin	Flu 250/350 nm Flu 250/350 nm Flu 250/350 nm	6,4 8,5 12,1	Start: 30:70(v/v) ACN/PP pH 3,0 0-6 min 30 Vol% ACN 6-8 min 30-35 Vol% ACN 8-10 min 35-40 Vol % ACN 10-12 min 80 Vol % ACN

PP = Phosphatpuffer

Tab. 37b: Bedingungen der chromatographischen Trennung der Zytostatikagruppen im Anschluss an die Anreicherung

Bei der Analytik ist also nur die Trennung und Bestimmung der Substanzen der jeweiligen Gruppe erforderlich. Dies kann dann unter den für diese Substanzen idealen Bedingungen erfolgen. In 37b sind die für die Auftrennung der sechs Gruppen geeigneten Gradienten und Messbedingungen aufgeführt. Aus den oben genannten Gründen wurde bei allen Gradienten Acetonitril als organischer Modifier verwendet.

8.1.2.11 Diskussion der Ergebnisse

Die zuvor erwähnte unterschiedliche, vom Ort und Zeitpunkt der Probenahme abhängige Matrixbelastung der verschiedenen Proben wirkt sich in gewissem Umfang auch auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Zytostatika aus. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben des gleichen Typs (z. B. Teichwasser) sind dabei unter Umständen größer als die zwischen den verschiedenen Probentypen. Die angegebenen Werte sind Obergrenzen für die niedrigste noch zu bestimmende Konzentration einer Komponente, die sich auch unter ungünstigen Verhältnissen reproduzieren ließen. Sie gelten für alle Arten von Oberflächenwasser, mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Bei der quantitativen Analyse der einzelnen Substanzen aus Realproben sind die Bestimmungsgrenzen naturgemäß deutlich höher als bei der Verwendung matrixfreier Standardlösungen. Dies gilt auch für die Eluate der angereicherten Proben. Zwar bewirken die zuvor beschriebenen Anreicherungsverfahren eine Abtrennung der Hauptmatrixbestandteile, also des Wassers, der anorganischen Salze und anderer hochpolarer Substanzen, Stoffe, deren Polarität und Elutionsverhalten den Analyten ähnelt, werden jedoch mitangereichert. Die Konzentration dieser Interferenzen kann dann im Eluat gegebenenfalls sogar höher sein als in der Realprobe selbst.

Bei der Analytik von Realproben stehen im Gegensatz zu den bei der Methodenentwicklung verwendeten dotierten Proben nicht die unbelasteten Wässer als Vergleich zur Verfügung. Daher können Substanzen, deren Peaks bei einer zuvor ausgearbeiteten chromatographischen Trennung mit denen der zu bestimmenden Zytostatika interferieren nicht sicher erkannt werden. Insbesondere im Bereich der Bestimmungsgrenze in Konzentrationsbereichen also, in denen ein Peak im Chromatogramm noch deutlich erkennbar und quantitativ auswertbar ist, kann mit dem Dio-

denarray-Detektor oftmals kein eindeutiges UV-Spektrum mehr erhalten werden. Die Identifizierung einer Substanz stützt sich dann im wesentlichen auf die Retentionszeit und ist dementsprechend unsicher. Eine Überlagerung eines Peaks mit Matrixsignalen kann unter diesen Umständen zu falsch positiven Befunden bzw. zur Angabe überhöhter Konzentrationswerte führen. Die Bestimmungsgrenze hängt infolgedessen eher von der Leistungsfähigkeit des Photodiodenarrays ab als vom Rauschen allgemein. Das Rauschen liegt bei dem verwendeten UV-Detektor zwischen 0,1 mAbs im Bereich zwischen 200 und 210 nm bzw. 0,02 mAbs bei höheren Wellenlängen. Ein Peak kann ab einer Signalhöhe von ca. 0,1 bzw. 0,5 mAbs als solcher erkannt werden. Ein aussagekräftiges UV-Spektrum zur eindeutigen Identifizierung einer Substanz kann jedoch erst ab einer Signalhöhe von etwa 2, bzw., im unteren Wellenlängenbereich, 10 mAbs erhalten werden.

Bei Substanzen mit wenig charakteristischen UV-Spektren, die zudem vorwiegend im unteren zugänglichen UV-Bereich absorbieren (Cisplatin, Cyclophosphamid), ist diese Grenze noch höher anzusetzen. Im Hinblick auf den Einsatz der zu entwickelnden Analytik zur Zytostatikabestimmung in Proben mit starker und vor allem wechselnder Matrixbelastung wurde die Bestimmungsgrenze nicht über die 6σ -Grenze bzw. das S/N-Verhältnis ermittelt; statt dessen wurde eine untere Konzentration gewählt, die es ermöglicht Identität und Reinheit der jeweiligen Substanz anhand des UV-Spektrums zu beurteilen. Daraus ergeben sich insbesondere für die Substanzen Cyclophosphamid und Cisplatin sehr hohe Bestimmungsgrenzen. Generell ist die Nachweisstärke der zur Verfügung stehenden Detektoren für diese Substanzen nicht ausreichend. Eine Verbesserung der Bestimmungsgrenzen könnte durch die Kopplung der HPLC mit anderen Detektoren (Massenspektrometer bzw. elektrochemische Verfahren) erreicht werden.

In den Fällen, in denen bei Realproben eine Substanz über das UV-Spektrum nicht zweifelsfrei identifiziert werden kann oder wenn der Peak ganz oder teilweise durch Matrixsignale überlagert ist, empfiehlt es sich, die Trennung unter anderen Bedingungen zu wiederholen. Dies kann beispielsweise durch Wechsel des organischen Modifiers, Änderung des Gradientenverlaufs, des pH-Wertes sowie bei fluoreszierenden Substanzen durch Änderung der Anregungs- und Emissionswellenlänge erreicht werden. Auf diesem Weg kann vielfach eine Abtrennung der Substanz vom Interferenzsignal erreicht werden. Vor allem aber kann anhand der charakteristischen

Verschiebung der Retentionszeit infolge der vorgenommenen Veränderungen in der Regel sicher entschieden werden, ob das betreffende Signal von dem vermuteten Zytostatikum stammt oder nicht.

Eine größere Zuverlässigkeit bei der Identifizierung und Bestimmung der einzelnen Substanzen wurde auch durch Verwendung des Fluoreszenzdetektors erreicht. Da im Vergleich mit der UV-Aktivität nur sehr wenige Substanzen fluoreszierende Eigenschaften aufweisen, treten in den mit dem Fluoreszenzdetektor aufgenommenen Chromatogrammen nur selten störende Signale auf. In Kombination mit dem UV-Detektor kann in der Regel eine sichere Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Substanz vorgenommen werden. Auch bei Substanzen, bei denen die UV-Detektion nachweisstärker als die Fluoreszenzdetektion ist, sollten daher trotzdem immer beide Detektionsarten genutzt werden.

8.1.2.12 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle Konzentrationsbestimmungen durch die verwendeten chromatographischen Verfahren wurden mindestens zweimal durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt. Zur Bestimmung der Zytostatikagehalte wurden mittels externem Standard 5-Punkt-Kalibriergeraden erstellt. Dazu wurden Lösungen der Zytostatika in Acetonitril bzw., im Zusammenhang mit der Anreicherung, in den zur Elution verwendeten Lösungsmitteln verwendet. Vergleiche mit den Ergebnissen der Quantifizierung anhand wässriger Stammlösungen ergaben keine signifikanten Abweichungen. Wegen der teilweise begrenzten Stabilität der Zytostatika in wässriger Lösung sollten nur frisch angesetzte wässrige Lösungen als Standards verwendet werden. In Tabelle 38 sind die Regressionskoeffizienten sowie der lineare Bereich dieser Geraden für die einzelnen Zytostatika wiedergegeben.

Die Standardabweichung der chromatographischen Analyse wurde durch zehnfach wiederholtes Einspritzen derselben Probe im Laufe eines Tages bestimmt. Die Tag-zu-Tag Abweichung der Bestimmungen wurde durch Einspritzen derselben Probe an jeweils zweimal fünf aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt. Für diese Versuche wurden Lösungen der Zytostatika in Acetonitril verwendet, um Verfälschungen des Ergebnisse durch eine eventuell auftretende hydrolytische Zersetzung zu vermeiden. Diese Versuchsreihen wurden zur Kontrolle der Leistungsfähigkeit des chroma-

tographischen Systems im Verlauf der Arbeit regelmäßig mit verschiedensten Proben durchgeführt. Die daraus erhaltenen mittleren Standardabweichungen der Peakhöhen für verschiedene Konzentrationsbereiche sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

Die Standardabweichungen der ermittelten Peakhöhen sind naturgemäß im Bereich der Nachweisgrenze deutlich höher als im mittleren oder oberen Konzentrationsbereich. Durch die teilweise erhebliche Peakverbreiterung wird unter diesen Umständen die Quantifizierung über die Peakhöhen zunehmend unsicher. In solchen Fällen ist es sinnvoll, zusätzlich die Peakflächen zur Auswertung heranzuziehen.

Die Abweichungen der an verschiedenen Tagen durchgeführten Bestimmungen derselben Probe sind im allgemeinen etwas größer als die Abweichungen innerhalb eines Tages. Da es sich zumeist um eine allmähliche Konzentrationsabnahme handelte, muss davon ausgegangen werden, dass hier bereits Zersetzungs- und Adsorptionsphänomene eine Rolle spielen. Die Kalibrierung sollte daher in nicht zu kleinen Abständen mit neu angesetzten Standardlösungen wiederholt werden

Der lineare Bereich der Kalibrierfunktionen erstreckt sich bei den einzelnen Zytostatika über zwei bis vier Größenordnungen. Begrenzt wird er teilweise durch die zu geringe Löslichkeit einiger Zytostatika in organischen Lösungsmitteln. Derart große Zytostatikakonzentrationen sind jedoch in Realproben ohnehin nicht zu erwarten. Da nur matrixfreie Lösungen als Standards verwendet wurden, ist die untere Grenze des linearen Bereichs bei einigen Zytostatika kleiner als die Bestimmungsgrenzen.

Der fortlaufende Einsatz der verwendeten chromatographischen Methoden zur Analyse einer sehr großen Anzahl verschiedenster Proben stellt die Robustheit dieser Verfahren unter Beweis. Insgesamt sind die Fehler der chromatographischen Analyse deutlich geringer als die ermittelte Ungenauigkeit bei der Konzentrationsbestimmung unter Einbeziehung der Anreicherung. Der größte Anteil des Fehlers des Gesamtverfahrens wird also, wie nicht anders zu erwarten, durch den Anreicherungsschritt verursacht. Für die eigentliche chromatographische Bestimmung ist eine zweimalige Wiederholung daher ausreichend, insoweit die Ergebnisse dieser Messungen um nicht mehr als 5% voneinander abweichen.

Substanz	linearer Bereich [mg/l]	r (Kalibriergerade)	σ (n = 10) [%] Konzentrationsbereich			σ (Tag-zu-Tag) [%] Konzentrationsbereich		
			unterer	mittlerer	oberer	unterer	mittlerer	oberer
Carmustin	0,1-500	0,988	4	2	2	6	3	4
Chlorambucil	0,01-500	0,992	3	2	1	5	4	6
Cisplatin	20-500	0,958	6	4	4	6	4	4
Cyclophosp.	10-1000	0,944	5	2	3	7	4	5
Cytarabin	0,01-100	0,968	3	2	2	3	3	4
Etoposid	0,01-100	0,997	4	2	2	3	2	4
Fluorouracil	0,02-500	0,979	3	2	1	3	3	3
Melphalan	0,1-100	0,991	5	2	2	4	6	6
Methotrexat	0,1-500	0,996	3	1	2	5	2	2
Vinblastin	0,01-100	0,988	4	2	2	4	3	1

Tab. 38: Statistische Daten der verwendeten chromatographischen Methoden

8.1.3 Arbeitsanweisungen

8.1.3.1 Gruppe 1: Carmustin, Etoposid und Vinblastin

Probe:	500 ml dotiertes Oberflächenwasser oder 250 ml dotierter Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage
Konzentration:	2 µg/l Carmustin, 10 µg/l Etoposid, 5 µg/l Vinblastin
Sorbens:	Extraktionssäule: EN (LiChrolut [®] , 200 mg, 6 ml, Merck)
Konditionierung:	erst 4 × 1 ml Methanol, dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 6,0 ohne Vakuum durch die Säule laufen lassen, Säule nicht trockenlaufen lassen
Probenaufgabe:	Probe mit 0,35 g bzw. 0,7 g KH ₂ PO ₄ versetzen (ca. 0,01 M), pH-Wert mit 3 M Phosphorsäure auf pH 6,0 einstellen Extraktionssäule mit Probe füllen, Adapter anschließen Säule nicht trockenlaufen lassen, Probe durchsaugen dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks soweit möglich konstant halten (maximale Flussgeschwindigkeit 5 ml/min (einzelne Tropfen erkennbar)), Nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen
Waschschritt:	2 × 1 ml destilliertes Wasser langsam durch die Säule saugen
Trocknen:	2-4 Minuten Luft durch die Säule saugen
Elution:	graduierten Nasenkolben einsetzen, 3 × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50 (v/v) nacheinander auf die Säule geben jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen dann langsam durchsaugen
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (Stickstoff oder Argon) bei Raumtemperatur vorsichtig bis zur 0,4 ml-Marke einengen sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen

Rs [%] Carmustin: $91 \pm 8\%$, Etoposid: $92 \pm 5\%$, Vinblastin: $92 \pm 5\%$

Analytik 20 μ l des eingeeengten Eluats mit HPLC analysieren

Säule C18-Säule (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 \times 4 mm)

Gradient: Start: 30:70 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH 3,5
 0-6 min 30-70 Vol% ACN
 6-7 min 70-80 Vol % ACN
 7-11 min 80 Vol % ACN

Detektion: Carmustin: UV 230 nm; Etoposid, Vinblastin: Fluoreszenz: 240/340 nm

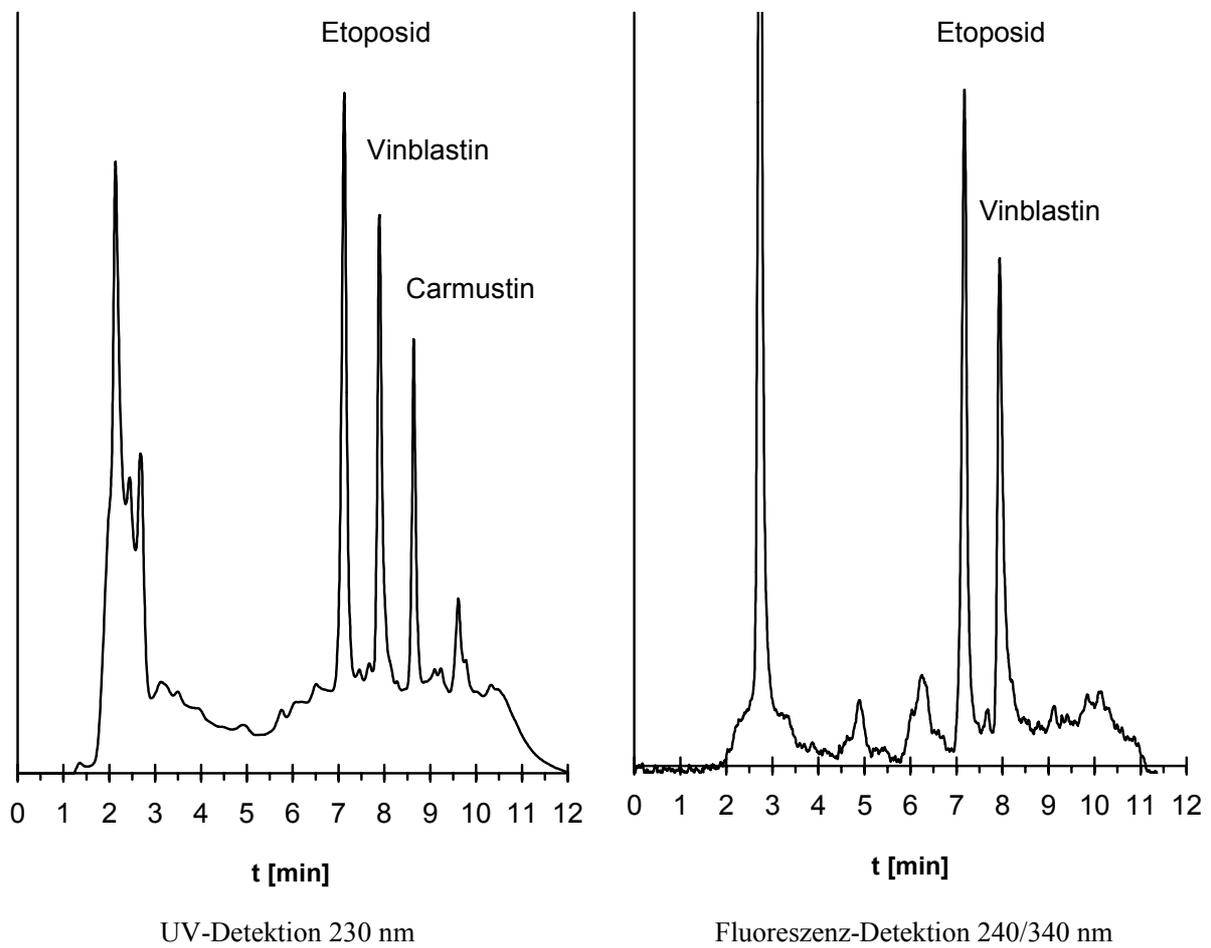


Abb. 26: Chromatogramme der Zytostatika der Gruppe 1, angereichert aus 500 ml Flusswasser an EN-Extraktionssäulen

8.1.3.2 Gruppe 2: Chlorambucil, Etoposid, Melphalan und Methotrexat

Probe:	1000 ml dotiertes Oberflächenwasser oder 500 ml dotierter Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage
Konzentration:	5 µg/l Chlorambucil, 10 µg/l Etoposid, 10 µg/l Melphalan, 10 µg/l Methotrexat
Sorbens:	Extraktionsdisks: C18 Polar Plus, 47mm, (Speedisk [®] , Bakerbond [®] Baker)
Konditionierung:	erst 4 × 1 ml Methanol dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 4,8, ohne Vakuum durch die Scheibe laufen lassen, Scheibe nicht trockenlaufen lassen !
Probenaufgabe:	Probe mit 0,7 bzw. 1,4 g KH ₂ PO ₄ versetzen (0,01 M). Extraktionskartusche mit Probe füllen, Adapter anschließen. Scheibe nicht trockenlaufen lassen ! Probe durchsaugen dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks soweit möglich konstant halten (maximale Flussgeschwindigkeit 80 ml/min). Nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen
Waschschritt:	-----
Trocknen:	1-2 Minuten Luft durch die Scheibe saugen
Elution:	graduierten Nasenkolben einsetzen erst 3 × 1ml MeOH, dann 2 × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50(v/v) auf die Scheibe geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen.
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (Stickstoff oder Argon) bei Raumtemperatur vorsichtig bis zur 0,4 ml-Marke einengen. Sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen.
Rs [%]	Chlorambucil: 89 ± 8%, Etoposid: 89 ± 5%, Melphalan: 85 ± 8%, Methotrexat: 93 ± 7%
Analytik	20 µl des eingengten Eluats mit HPLC analysieren

Säule C18-Säule (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 × 4 mm)

Gradient: Start: 10:90 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH 3,5
 0-5 min 10-40 Vol% ACN
 5-8 min 40 Vol % ACN
 8-12 min 40-80 Vol % ACN
 12-14 min 80 Vol % ACN

Detektion: Methotrexat: UV 307 nm; Chlorambucil, Etoposid, Melphalan: Fluoreszenz: 240/340 nm

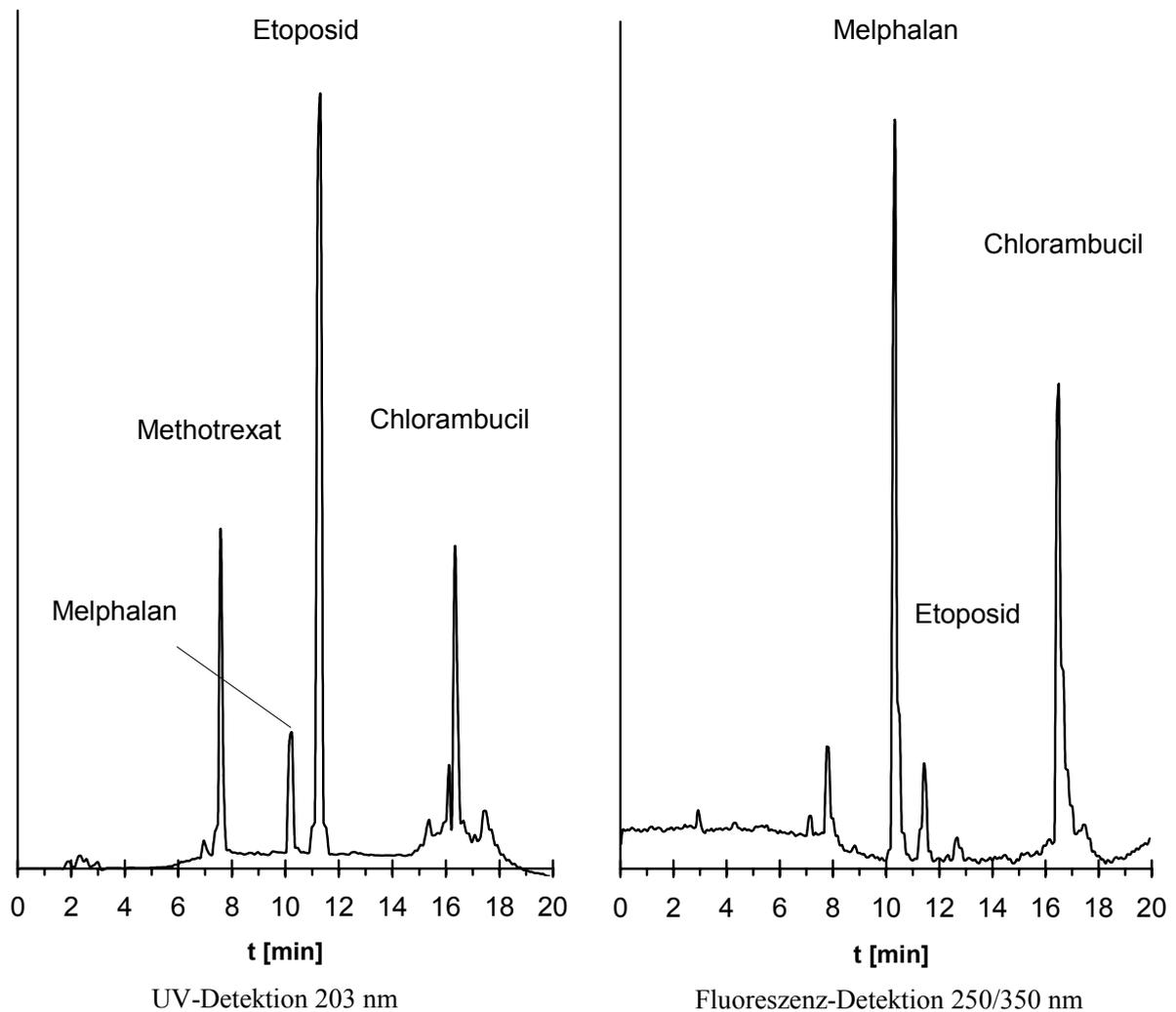


Abb. 27: Chromatogramme der Zytostatika der Gruppe 2, angereichert aus 1 l Flusswasser an C18 Polar Plus-Extraktionsdisks

8.1.3.3 Gruppe 3: Cisplatin, Cyclophosphamid, Etoposid und Melphalan

Probe:	1000 ml dotiertes Oberflächenwasser oder 500 ml dotierter Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage
Konzentration:	100 µg/l Cisplatin, 200 µg/l Cyclophosphamid, 10 µg/l Etoposid, 10 µg/l Melphalan,
Sorbens:	Extraktionsdisks: C18 Polar Plus, 47 mm, Speedisk® (Bakerbond®, Baker)
Konditionierung:	erst 4 × 1 ml Methanol dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 6,0, ohne Vakuum durch die Scheibe laufen lassen, Scheibe nicht trockenlaufen lassen !
Probenaufgabe:	Probe mit 0,7 bzw. 1,4 g KH ₂ PO ₄ versetzen (0,01 M) und mit 3 M KOH-Lösung auf pH 6,0 einstellen. Extraktionskartusche mit Probe füllen, Adapter anschließen. Scheibe nicht trockenlaufen lassen! Probe durchsaugen dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks soweit möglich konstant halten (maximal Flussgeschwindigkeit 80 ml/min) Nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen
Waschschritt:	-----
Trocknen:	1-2 Minuten Luft durch die Scheibe saugen
Elution:	graduierten Nasenkolben einsetzen, erst 3 × 1 ml MeOH, dann 2 × 1 ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50(v/v) auf die Scheibe geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (Stickstoff oder Argon) bei Raumtemperatur vorsichtig bis zur 0,4 ml-Marke einengen. Sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen
Rs [%]	Cisplatin: 91 ± 9%, Cyclophosphamid: 91 ± 8%, Etoposid: 87 ± 6%, Melphalan: 88 ± 7%
Analytik	20 µl des eingengten Eluats mit HPLC analysieren

Säule C18-Säule (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 × 4 mm)

Gradient: Start: 0:100 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH 3,5
 0-4 min 0-30 Vol% ACN
 4-6 min 30 Vol % ACN
 6-8 min 30-35 Vol % ACN
 8-12 min 35-80 Vol % ACN

Detektion: Cisplatin, Cyclophosphamid: UV 202 nm;
 Etoposid, Melphalan: Fluoreszenz 240/340 nm

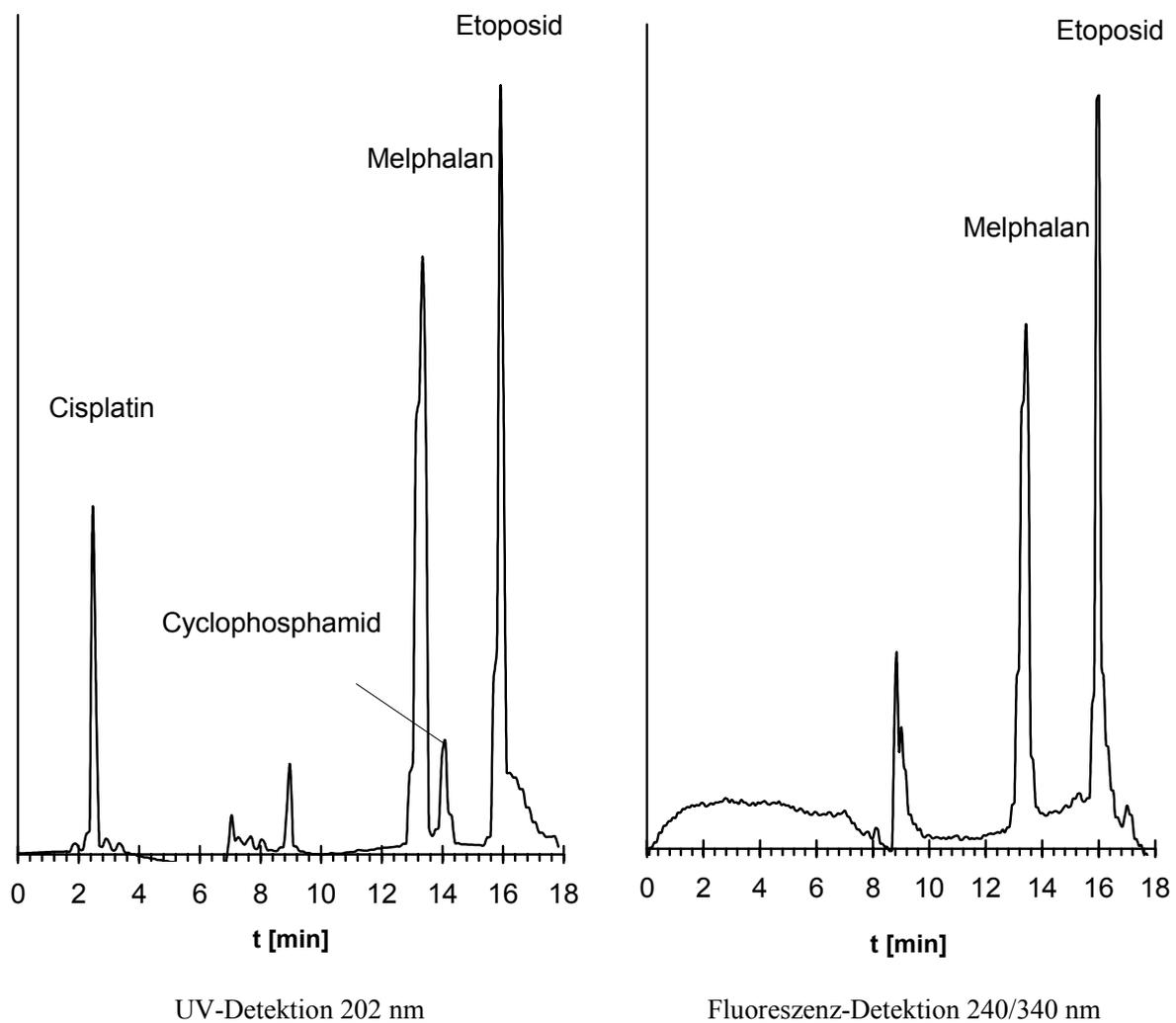


Abb. 28: Chromatogramme der Zytostatika der Gruppe 3, angereichert aus 1 l Flusswasser an C18 Polar Plus-Extraktionsscheiben

8.1.3.4 Gruppe 4: Fluorouracil und Vinblastin

Probe:	500 ml dotiertes Oberflächenwasser oder 250 ml dotierter Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage
Konzentration:	200 µg/l Fluorouracil, 2 µg/l Vinblastin
Sorbens:	Extraktionssäule: ENV+, 200 mg, 6 ml, (Isolute [®] , ict)
Konditionierung:	erst 3 × 1 ml Methanol dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 7,0, ohne Vakuum durch die Säule laufen lassen, Säule nicht trockenlaufen lassen !
Probenaufgabe:	Probe mit 0,87 bzw. 0,44 g K ₂ HPO ₄ versetzen (0,01 M). pH-Wert mit 3 M Phosphorsäure auf pH 7,0 einstellen. Extraktionssäule mit Probe füllen, Adapter anschließen. Säule nicht trockenlaufen lassen ! Probe durchsaugen, dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks soweit möglich konstant halten (maximale Flussgeschwindigkeit 5 ml/min (einzelne Tropfen erkennbar)). Nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen
Waschschritt:	-----
Trocknen:	2-4 Minuten Luft durch die Säule saugen
Elution:	graduierten Nasenkolben einsetzen, 1ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 3,0, dann 1 ml MeOH, dann 2 × 1ml CH ₂ Cl ₂ /Et ₂ O 50/50 (v/v) nacheinander auf die Säule geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen.
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (Stickstoff oder Argon) bei Raumtemperatur vorsichtig bis zur 0,4 ml-Marke einengen. Sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen.
Rs [%]	Fluorouracil: 90 ± 6%, Vinblastin: 94 ± 4%
Analytik	20 µl des eingengten Eluats mit HPLC analysieren

Säule C18-Säulen (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 × 4 mm)

Gradient: Start: 5:95 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH 3,0
 0-4 min 5-40 Vol% ACN
 4-7 min 40-80 Vol % ACN
 7-10 min 80 Vol% ACN

Detektion: Fluorouracil: UV 267 nm;
 Vinblastin: Fluoreszenz 255/345 nm

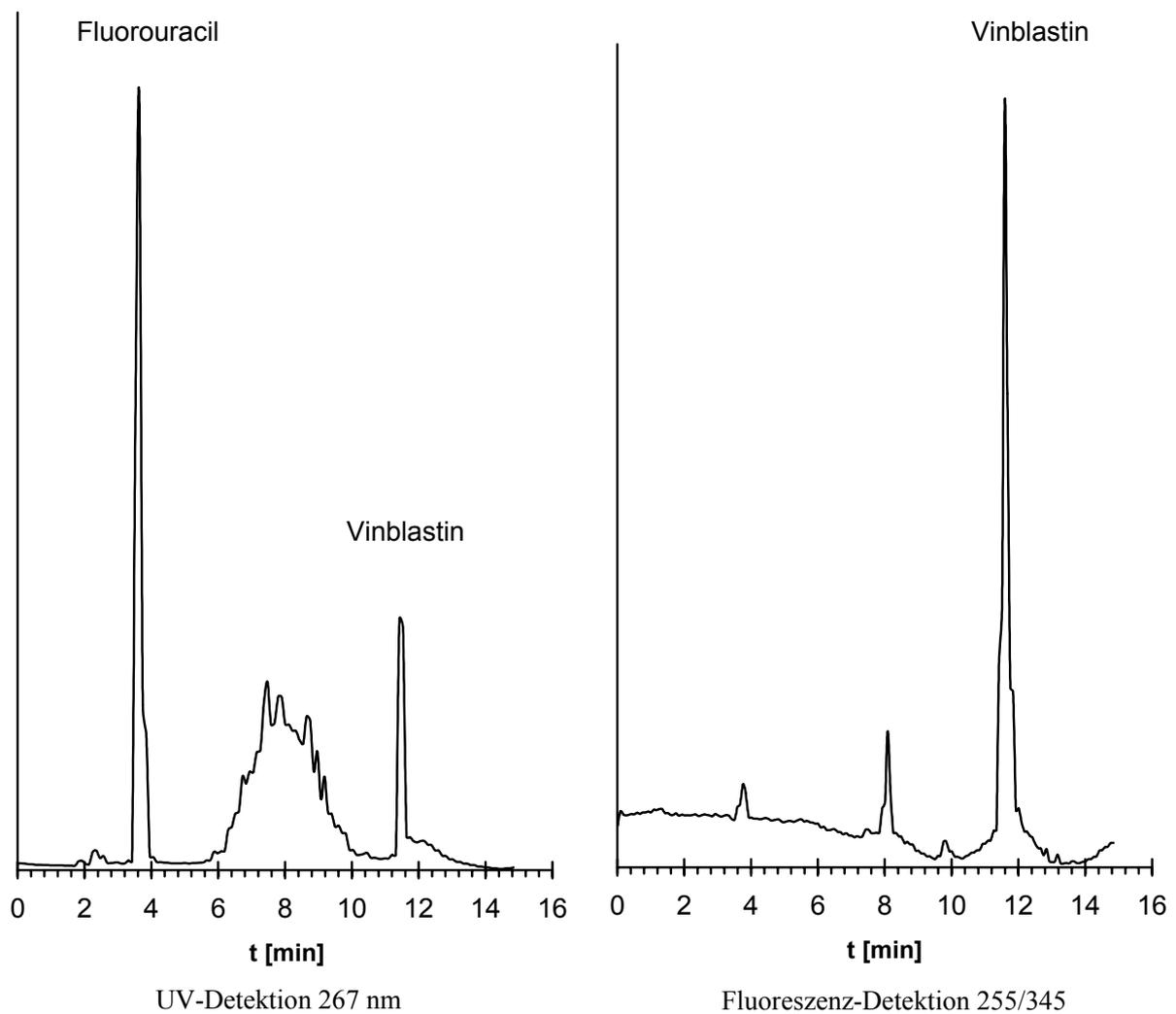


Abb. 29: Chromatogramme der Zytostatika der Gruppe 4, angereichert aus 500 ml Flusswasser an ENV+ Extraktionssäulen

8.1.3.5 Gruppe 5: Carmustin, Etoposid, Melphalan und Vinblastin

Probe:	500 ml dotiertes Oberflächenwasser oder 250 ml dotierter Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage
Konzentration:	5 µg/l Carmustin, 10 µg/l Etoposid, 10 µg/l Melphalan, 10 µg/l Vinblastin
Sorbens:	Extraktionssäule: SDB 1, 200 mg, 6 ml, (Bakerbond [®] , Baker)
Konditionierung:	erst 4 × 1 ml Methanol, dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 6,0, ohne Vakuum durch die Säule laufen lassen, Säule nicht trockenlaufen lassen !
Probenaufgabe:	Probe mit 0,35 bzw. 0,7 g KH ₂ PO ₄ versetzen (0,01 M). pH-Wert mit 3 M KOH-Lösung auf pH 6,0 einstellen. Extraktionssäule mit Probe füllen, Adapter anschließen. Säule nicht trockenlaufen lassen ! Probe durchsaugen dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks soweit möglich konstant halten (maximale Flussgeschwindigkeit 5 ml/min (einzelne Tropfen erkennbar)). Nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen.
Waschschritt:	2 × 1 ml destilliertes Wasser langsam durch die Säule saugen.
Trocknen:	2-4 Minuten Luft durch die Säule saugen.
Elution:	graduieren Nasenkolben einsetzen. 3 × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50 (v/v) nacheinander auf die Säule geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen.
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (Stickstoff oder Argon) bei Raumtemperatur vorsichtig bis zur 0,4 ml-Marke einengen. Sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen.

Rs [%] Carmustin: $92 \pm 7\%$, Etoposid: $93 \pm 6\%$, Melphalan: $91 \pm 6\%$, Vinblastin: $97 \pm 6\%$

Analytik 20 μ l des eingengten Eluats mit HPLC analysieren

Säule C18-Säulen (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 \times 4 mm)

Gradient: Start: 30:70 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH 3,5
 0-3 min 30-40 Vol% ACN
 3-6 min 40 Vol % ACN
 6-8 min 40-80 Vol % ACN

Detektion: Carmustin: UV 230 nm;
 Etoposid, Melphalan, Vinblastin: Fluoreszenz: 240/340 nm

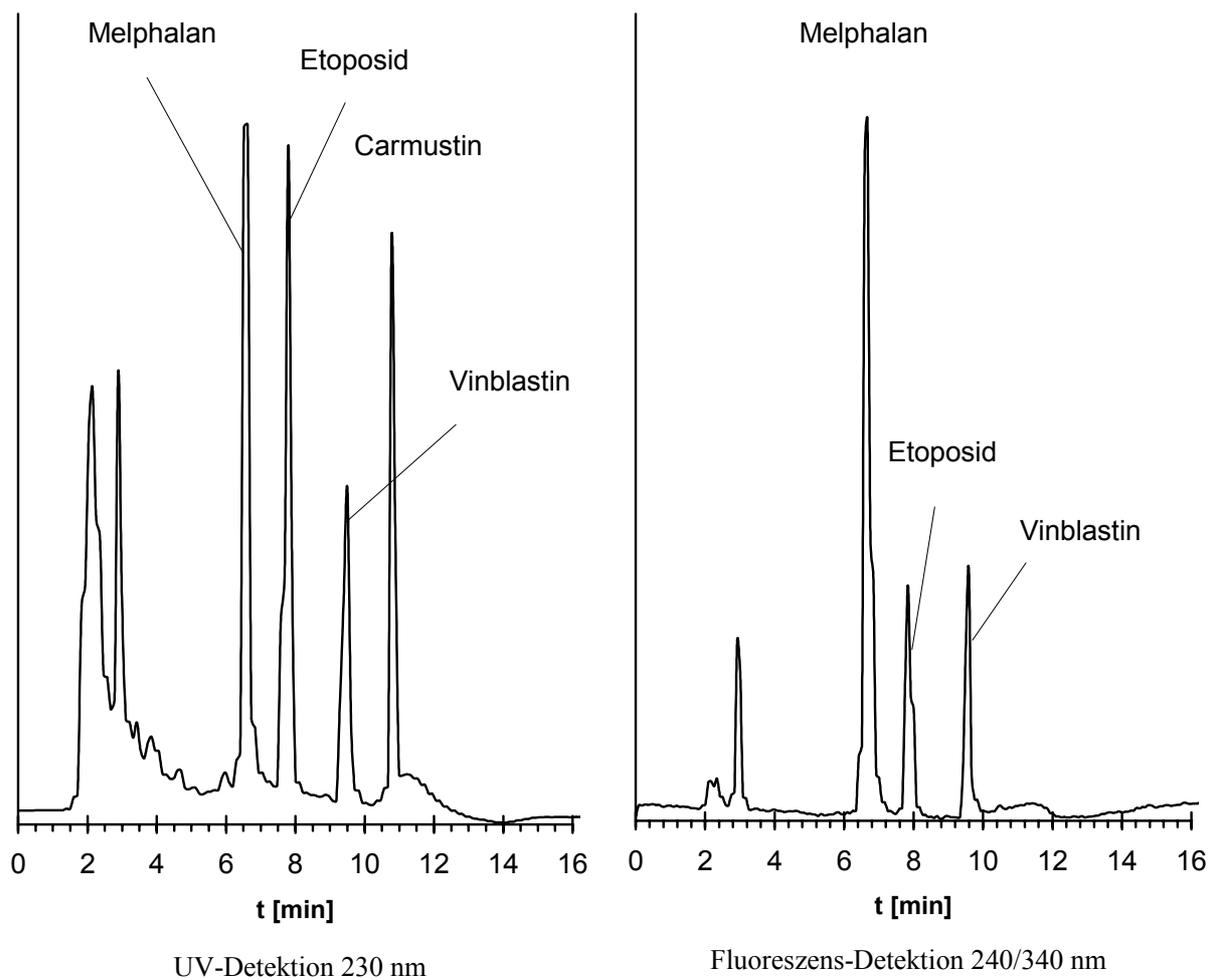


Abb. 30: Chromatogramme der Zytostatika der Gruppe 5, angereichert aus 500 ml Flusswasser an SDB 1-Säulen

8.1.3.6 Gruppe 6: Etoposid, Melphalan und Vinblastin

Probe:	1000 ml dotiertes Oberflächenwasser oder 500 ml dotierter Zu- bzw. Ablauf der Modellkläranlage
Konzentration:	20 µg/l Etoposid, 5 µg/l Melphalan, 2 µg/l Vinblastin
Sorbens:	Extraktionsdisks: DVB, 47mm, Speedisk® (Bakerbond®, Baker)
Konditionierung:	erst 4 × 1 ml Methanol, dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 6,0, ohne Vakuum durch die Scheibe laufen lassen, Scheibe nicht trockenlaufen lassen !
Probenaufgabe:	Probe mit 0,7 bzw. 1,4 g KH ₂ PO ₄ versetzen (0,01 M) und mit 3 M KOH-Lösung auf pH 6,0 einstellen. Extraktionskartusche mit Probe füllen, Adapter anschließen Scheibe nicht trockenlaufen lassen ! Probe durchsaugen dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks soweit möglich konstant halten (maximale Flussgeschwindigkeit 80 ml/min). Nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen
Waschschritt:	2 × 1 ml destilliertes Wasser auf die Scheibe geben, kurz einwirken lassen dann langsam durch die Säule saugen.
Trocknen:	1-2 Minuten Luft durch die Scheibe saugen.
Elution:	graduierten Nasenkolben einsetzen. Erst 5 × 1ml ACN/CH ₂ Cl ₂ 50/50(v/v) auf die Scheibe geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen.
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (Stickstoff oder Argon) bei Raumtemperatur vorsichtig bis zur 0,4 ml-Marke einengen. Sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen.
Rs [%]	Etoposid: 91 ± 4%, Melphalan: 89 ± 7%, Vinblastin: 96 ± 4%

Analytik 20 µl des eingeeengten Eluats mit HPLC analysieren

Säule C18-Säulen (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 × 4 mm)

Gradient: Start: 30:70 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH 3,0
 0-6 min 30 Vol% ACN
 6-8 min 30-35 Vol % ACN
 8-10 min 35-40 Vol % ACN
 10-12 min 80 Vol % ACN

Detektion: Etoposid, Melphalan, Vinblastin: Fluoreszenz: 240/340 nm

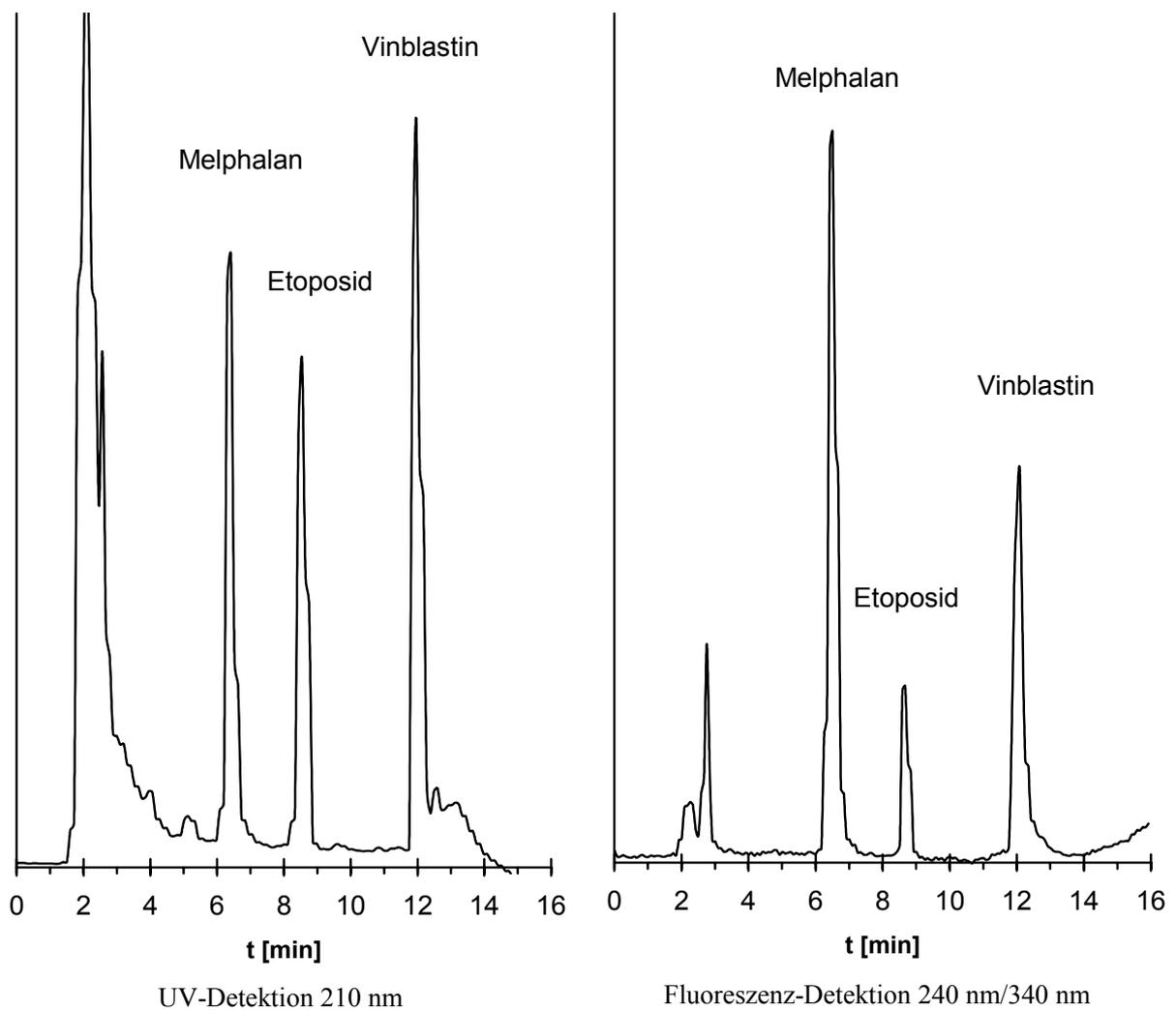


Abb. 31: Chromatogramme der Zytostatika der Gruppe 6, angereichert aus 1000 ml Flusswasser an DVB-Extraktionsdisks

8.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von 5-Fluorouracil und Methotrexat in Klärschlamm mittels HPLC

8.2.1 Verfahrensentwicklung

8.2.1.1 Optimierung der flüssigchromatographischen Trennung für 5-Fluorouracil

Zunächst musste die chromatographische Trennung für das System optimiert werden. Da 5-Fluorouracil auf der verwendeten C_{18} -Phase bei Verwendung von Phosphatpuffer-Acetonitril Eluenten mit einer Retentionszeit von etwa sieben Minuten bei 100% Phosphatpuffer und vier Minuten bei 95% Phosphatpuffer von der Säule eluiert wird, wurde im allgemeinen bei einer Zusammensetzung von 99% Phosphatpuffer zu 1% Acetonitril gearbeitet. Der pH-Wert des Phosphatpuffers betrug in allen Fällen 3,5. Wegen der Komplexität und des Einflusses der Matrix musste die Zusammensetzung der mobilen Phase teilweise geringfügig geändert werden, weshalb die Peakflächen zur Auswertung der Chromatogramme herangezogen wurden.

Insbesondere bei hohen Wassergehalten und nur minimalen Zusätzen eines organischen Modifiers zur mobilen Phase können sich aber bei Verwendung einer C_{18} -Phase oftmals schlechte Trennungen ergeben bzw. es kommt zu Peakverzerrungen und Tailing, da die langen C_{18} -Ketten nicht vollständig aufgerichtet werden.

Deshalb musste in jedem Fall eine ausreichende Konditionierung der Phase mit Acetonitril vor jeder Trennung durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass nach jeder Trennung ein Spülschritt durchgeführt wurde, wobei gleichzeitig stark retardierende organische Bestandteile von der Säule eluiert werden. Hierzu wurde der Acetonitril-Gehalt in der mobilen Phase mittels eines linearen Gradienten bis auf 75% erhöht. Höhere Acetonitril-Gehalte sind nicht anzustreben, da es zum Ausfall von in der mobilen Phase sowie in der Matrix enthaltenen Salzen kommen kann, was zur Verstopfung der Säule und Beschädigungen im Pumpen- und Mischkammersystem der Anlage führen kann.

Die Detektion erfolgte bei 267 nm, da Fluorouracil hier ein relatives Absorptionsmaximum besitzt. Zwar liegt das absolute Maximum bei 203 nm, diese Wellenlänge bie-

tet sich aber für eine selektive Detektion des Analyten nicht an, da im unteren Wellenlängenbereich viele Stoffe, die in der Matrix enthalten sind, ebenfalls ein Absorptionsmaximum aufweisen. Es kommt somit zu erheblichen Peaküberlagerungen und eine quantitative Auswertung über die Peakflächen kann dann nicht mehr vorgenommen werden.

8.2.1.2 Optimierung der flüssigchromatographischen Trennung für Methotrexat

Bei der Optimierung der chromatographischen Trennung sollten sowohl Methotrexat als auch das bei der Hydrolyse gebildete 7-Hydroxy-Methotrexat erfasst werden. Es wurde deshalb mit einem Phosphatpuffer-Acetonitril-Gehalt von 87,5% - 12,5% gearbeitet. Auch hier musste wegen starker Matrixeinflüsse der Gehalt an organischem Modifier teilweise geringfügig (0,5%-Schritte) verändert werden, um so eine bessere Auflösung zu erzielen. Mit Hilfe des Diodenarray-Detektors können jedoch störende Begleitstoffe der Matrix ausgeblendet werden, da dieser Detektor die kontinuierliche Aufnahme von Absorptionsdaten über einen weiten Wellenlängenbereich während der chromatographischen Analyse ermöglicht. Dadurch sind die Spektren der chromatographisch getrennten Verbindungen zugänglich und können zur Identifizierung der Substanzen herangezogen werden. Auch können so für jede beliebige Wellenlänge des Messbereichs Chromatogramme erstellt werden, die eine optimale quantitative Bestimmung ermöglichen. Da sowohl MTX als auch 7-OH-MTX bei 307 nm ein relatives Absorptionsmaximum besitzen, wurde die Auswertung der Peakflächen bei 307 nm durchgeführt, da hier keine Peaküberlagerungen auftraten.

8.2.2 Nachsäulenderivatisierung von Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat unter Berücksichtigung einer faktoriellen Versuchsplanung

8.2.2.1 Versuchsplanung

Es sollte untersucht werden, welche Faktoren Einfluss auf den Response der Nachsäulenderivatisierung von Methotrexat (MTX) und seines Hauptmetaboliten 7-Hydroxy-Methotrexat (7-OH-MTX) durch UV-Bestrahlung der Analyten nehmen. Methotrexat zeigt ebenso wie 7-Hydroxy-Methotrexat im Grundzustand keine Fluoreszenzeigenschaften. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Bestrahlung mit UV-Licht wird der Analyt in zwei Moleküle gespalten, von denen eines fluoreszenzaktiv ist. Die Umwandlung des nicht-fluoreszenzaktiven Methotrexat zu fluoreszenzaktiven Reaktions- bzw. Zwischenprodukten wird in einem Reaktionsreaktor bestehend aus UV-Lampe und UV-transparenter Kapillare erreicht. Verschiedene Faktoren nehmen hierbei Einfluss auf den Response der Nachsäulenderivatisierung:

Die Nachsäulenderivatisierung erfolgt nur in Anwesenheit einer 30 %-igen Wasserstoffperoxidlösung, die der mobilen Phase zugesetzt wird. Hierbei entstehen 2,4-Diaminopteridin-6-carboxaldehyd und die korrespondierende Carboxylsäure.

Der pH-Wert nimmt Einfluss auf den Response der Reaktion. Laut Literaturangaben erreicht der relative Response für die Fluoreszenz der Spaltungsprodukte von MTX bzw. 7-OH-MTX ein Maximum bei einem pH-Wert von 6,75 bzw. 4,6. Die Problematik hinsichtlich der Änderung des pH-Wertes für die chromatographische Trennung von MTX und 7-OH-MTX besteht in einer Verschiebung der Retentionszeiten von mehr als 30 Minuten. Aus diesem Grund konnte die Änderung des pH-Wertes nicht in die Versuchsplanung integriert werden. Es wurde zunächst bei einem pH-Wert von 3,5 gearbeitet, der mit einem Phosphatpuffer eingestellt wurde. Erst nach Abschluss der Untersuchungen sollte dann ermittelt werden, ob die Änderung des pH-Wertes den Response verändert.

Die Länge der Kapillare bestimmt die Verweilzeit der Analyten im Reaktionsreaktor; eine über dem Optimum liegende Bestrahlungsdauer hat eine Zersetzung der Reaktionsprodukte zur Folge. Alle Kapillaren sind transparent und haben einen Innendurchmesser von 0,3 mm. Es stehen insgesamt drei Kapillaren mit einer Länge von 5 m, 10 m und 20 m zur Verfügung.

Die Flussrate beeinflusst indirekt die Verweilzeit der Analyten im Reaktionsreaktor. Höhere Flussraten bewirken, dass die Substanzen den Reaktionsreaktor schneller verlassen. Es wurde immer bei einer Flussrate von 1 ml/min gearbeitet. Höhere Flussraten lassen sich nicht erzielen, da der Druckabfall über der analytischen Säule bereits 210 bar betrug. Niedrigere Flussraten sind nicht anzustreben, da dann der Bereich des van-Deemter Optimums verlassen wird. Dies hat eine Verlängerung der Analysenzeit und verbreiterte Peaks bzw. Tailing zur Folge.

Der Zusatz von Dimethylformamid zur mobilen Phase erhöht die Selektivität des Verfahrens. Dies ist aber nur dann notwendig, wenn die Auflösung von MTX und 7-OH-MTX zu gering ist. Testmessungen haben ergeben, dass sich ein Zusatz von Dimethylformamid zur mobilen Phase unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen als nicht notwendig erwiesen hat.

Der Anteil des gelösten Sauerstoffs nimmt Einfluss auf den Response der Reaktion. Gelöster Sauerstoff in der mobilen Phase kann sowohl eine Auslöschung des Fluoreszenz-Signals durch Quenching-Effekte als auch eine Verstärkung der Fluoreszenz zur Folge haben. Aus diesem Grund wurden Messungen mit ausgeschaltetem online Entgaser durchgeführt, um Aussagen über den Grad der Auslöschung machen zu können.

Es sollte geprüft werden, ob bzw. inwieweit die einzelnen Parameter mit Hilfe einer faktoriellen Versuchsplanung optimiert werden können, wobei die Schwierigkeit darin besteht, dass für bestimmte Variablen (pH-Wert, Länge der Kapillaren) mehr als zwei Niveaus getestet werden müssten. In diesem Fall müsste man auf $2^n 3^k$ -Faktorenversuchspläne zurückgreifen. Vollständige $2^n 3^k$ -Faktorenversuchspläne weisen aber mit steigender Zahl der Einflussfaktoren einen immer größer werdenden Versuchsumfang auf, der praktisch nicht mehr realisierbar ist. Zwar bietet sich hier

eine Verminderung des Versuchsumfanges an, wenn man den Anteil des 2^n -Faktorenversuchsplans auf einen 2^{n-p} -Faktorenversuchsplan reduziert. Man erhält dann einen $2^{n-p}3^k$ -Versuchsplan. Hierbei treten dann nicht nur Vermengungen mit Wechselwirkungen 1. Ordnung, sondern auch Vermengungen mit den Hauptfaktoren ein.

Für den weiteren Versuchsablauf erwies es sich als günstiger, für jeden Faktor zwei anstatt drei Niveaus zu definieren. Ebenso wird darauf verzichtet, den pH-Wert zu verändern, da dies eine Änderung des gesamten chromatographischen Verhaltens zur Folge hat. Im weiteren Verlauf wurde wie folgt vorgegangen:

Zugesetzter Massenanteil der Wasserstoffperoxid-Lösung zur mobilen Phase [A]

- für den geringeren Massenanteil (2 ml)
- + für den höheren Massenanteil (4 ml)

Es werden zwei Kapillaren getestet [B]

- für die kürzere Kapillare (5 m)
- + für die längere Kapillare (20 m)

Es wird der Einfluss des gelösten Sauerstoffs auf die Messung getestet [C]

- für Entgaser aus
- + für Entgaser an

Somit ergibt sich eine einfache faktorielle Versuchsplanung mit drei zu verändernden Parametern.

Versuchs-Nr	A	B	C
1	+	+	+
2	-	+	+
3	+	-	+
4	-	-	+
5	+	+	-
6	-	+	-
7	+	-	-
8	-	-	-

Tab. 39: Faktorielle Versuchsplanung für drei Parameter

Nach Beendigung der Voruntersuchungen wurde durch Randomisieren der Messungen die Reihenfolge der Versuche festgelegt. Die Zeichen + bzw. – zeigen an, ob es sich um das hohe Niveau (+) oder das niedrigere Niveau (-) des entsprechenden Parameters handelt.

Festlegung des Versuchsablaufs durch Randomisieren:

Messung (entspricht Nummer 4):
Wasserstoffperoxid-Lösung –
Kapillare –
Entgaser +

Messung (entspricht Nummer 2):
Wasserstoffperoxid-Lösung –
Kapillare +
Entgaser +

Messung (entspricht Nummer 5):
Wasserstoffperoxid-Lösung +
Kapillare +
Entgaser –

Messung (entspricht Nummer 7):
Wasserstoffperoxid-Lösung +
Kapillare –
Entgaser –

Messung (entspricht Nummer 8):
Wasserstoffperoxid-Lösung –
Kapillare –
Entgaser –

Messung (entspricht Nummer 3):
Wasserstoffperoxid-Lösung +
Kapillare –
Entgaser +

Messung (entspricht Nummer 1):
Wasserstoffperoxid-Lösung +
Kapillare +
Entgaser +

Messung (entspricht Nummer 6):
Wasserstoffperoxid-Lösung –
Kapillare +
Entgaser –

8.2.2.2 Versuchsdurchführung

8.2.2.3 Verwendete Geräte

Nachsäulenderivatisierung

Für die Nachsäulenderivatisierung wurde ein Photochemischer Reaktor der Firma ICT verwendet. Die UV-transparenten Reaktionsschleifen weisen einen Innendurchmesser von 0,3 mm und eine Länge von 5 m, 10 m und 20 m auf. Im Reaktor befindet sich eine UV-Lampe mit einer nominellen Wellenlänge von 254 nm.

Analytische HPLC-Anlage

Pumpen:	2 Einkolbenpumpen für binären Hochdruckgradienten, Shimadzu, LC-10 AS, 0,01-9,9 ml/min
Mischkammer:	Shimadzu, 2,6 ml
Einspritzventil:	Rheodyne, 2795, 20 µl-Schleife
Steuerungseinheit:	Shimadzu, CBM 10A
UV-Detektor:	Shimadzu, SPD-M10A, Deuterium-Lampe
Fluoreszenz-Detektor:	Shimadzu, RF-10A, Xenon-Lampe
Auswertesoftware:	Shimadzu, Class LC10
Steuerungssoftware:	Shimadzu, Class LC10
Säulen:	Machery-Nagel, C18 endcapped, Nucleosil 100-5, 250*4,0 mm
Vorsäulen:	Machery-Nagel, C18 endcapped, Nucleosil 100-5, 11*4,0 mm

Vor Durchführung aller Messungen wurde insbesondere der Fluoreszenz-Detektor auf korrekte Funktionsweise überprüft.

8.2.2.4 Chromatographische Methode

Es wurde bei einem Fluss von 1,0 ml/min gearbeitet. Der Druckabfall betrug hierbei 215 bar. Pumpe A förderte den wässrigen Phosphatpuffer, Pumpe B förderte Acetonitril. Es wurde bei einem Mischungsverhältnis von 85 % Phosphatpuffer zu 15 % Acetonitril gearbeitet. Die Wasserstoffperoxid-Lösung wurde dem Phosphatpuffer hinzugefügt.

Die UV-Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 350 nm aufgezeichnet, die Exikations- bzw. Emissionswellenlänge wurde auf 370 nm bzw. 418 nm eingestellt.

Das Injektionsvolumen betrug in allen Fällen 100 µl und entsprach somit dem fünffachen Volumen der Injektionsschleife.

Der UV-Detektor wurde in allen Messungen dem Fluoreszenz-Detektor als zweiter Detektor nachgeschaltet.

8.2.2.5 Auswertung

Im folgenden sind die Ergebnisse der Messungen für Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat in tabellarischer Form wiedergegeben. Für die quantitative Bestimmung der Peaks wurde die Höhenmessung verwendet.

Versuchs-Nr (MTX)	A H ₂ O ₂ - Lösung	B Kapillare	C Entgaser	Peakhöhe	Retentions- zeit/min
1	+	+	+	2,1	9,86
2	-	+	+	2,9	10,06
3	+	-	+	2,3	7,92
4	-	-	+	6,4	7,98
5	+	+	-	2,4	9,98
6	-	+	-	12,1	10,09
7	+	-	-	4,2	7,86
8	-	-	-	6,3	7,98
Ergebnis	-2,1	0,04	-1,4		

Tab. 40: Ergebnisse der faktoriellen Versuchsplanung für Methotrexat

Versuchs-Nr (7-OH-MTX)	A H ₂ O ₂ - Lösung	B Kapillare	C Entgaser	Peakhöhe	Retentions- zeit/min
1	+	+	+	1,0	16,93
2	-	+	+	1,2	16,96
3	+	-	+	2,3	14,92
4	-	-	+	3,5	14,91
5	+	+	-	1,1	17,08
6	-	+	-	4,6	17,00
7	+	-	-	2,3	14,76
8	-	-	-	3,5	14,87
Ergebnis	-0,8	-0,5	-0,4		

Tab. 41: Ergebnisse der faktoriellen Versuchsplanung für 7-Hydroxy-Methotrexat

Die Verschiebung der Retentionszeiten der Analyten um zwei Minuten, die bei den Versuchsnummern 3, 4, 7, 8 erhalten wurden, verglichen mit den Retentionszeiten, die bei den Versuchsnummern 1, 2, 5, 6 erhalten wurden, ist auf die unterschiedliche Länge der eingesetzten Kapillaren zurückzuführen.

Für Methotrexat fällt auf, dass der Einfluss der Kapillarlänge auf die Intensität des Signals zu vernachlässigen ist. Demgegenüber wirken sich die Wasserstoffperoxid-Konzentration und das Entgasen auf dem niedrigeren Niveau positiv auf die Signalintensität aus. Das Optimum ergibt sich für die Versuchsnummer 6. Sind zwei bzw. alle drei Faktoren auf dem niedrigen Niveau, ist der Response am größten.

Beim 7-Hydroxy-Methotrexat wirken sich alle drei Faktoren auf dem niedrigen Niveau in gleicher Weise positiv auf die Signalintensität aus. Der Response ist hier ebenfalls am größten, wenn zwei bzw. drei Faktoren auf dem niedrigeren Niveau sind. Auffällig ist insgesamt, dass der Response jeweils bei ausgeschaltetem Entgaser ein Maximum aufweist.

Vergleicht man nun die Fluoreszenz-Detektion mit anschließender Nachsäulenderivatisierung mit der herkömmlichen UV-Detektion, so ist festzustellen, dass die bestehenden Bestimmungsgrenzen für Methotrexat und 7-Hydroxy-Methotrexat nicht verbessert werden konnten, sondern dass die Fluoreszenz-Detektion für MTX eine um den Faktor 10 schlechtere Bestimmungsgrenze liefert als die herkömmliche UV-Detektion, während für 7-OH-MTX eine um den Faktor fünf schlechtere Bestimmungsgrenze erreicht wird. Die Bestimmungsgrenzen betragen ohne Anreicherung für MTX 0,4 mg/l und für 7-OH-MTX 0,9 mg/l mit herkömmlicher UV-Detektion.

Als Ursache wurde zunächst vermutet, dass die verwendeten Kapillarstücke aufgrund ihrer Länge zu einer vorzeitigen Zersetzung der fluoreszenzaktiven Zwischenprodukte beigetragen haben. Deshalb wurden Messungen mit Kapillarstücken der Längen 1 m, 2 m und 3 m durchgeführt. Auch dies führte nicht zu einer Erhöhung der Signalintensität. Ebenso wurde für eine Änderung des pH-Wertes keine signifikante Verbesserung der Bestimmungsgrenze festgestellt.

Da die Nachsäulenderivatisierung von MTX und 7-OH-MTX die Bestimmungsgrenze des bestehenden Verfahrens mit UV-Detektion nicht verbessern konnte, wird weiterhin auf die herkömmliche Detektion zurückgegriffen.

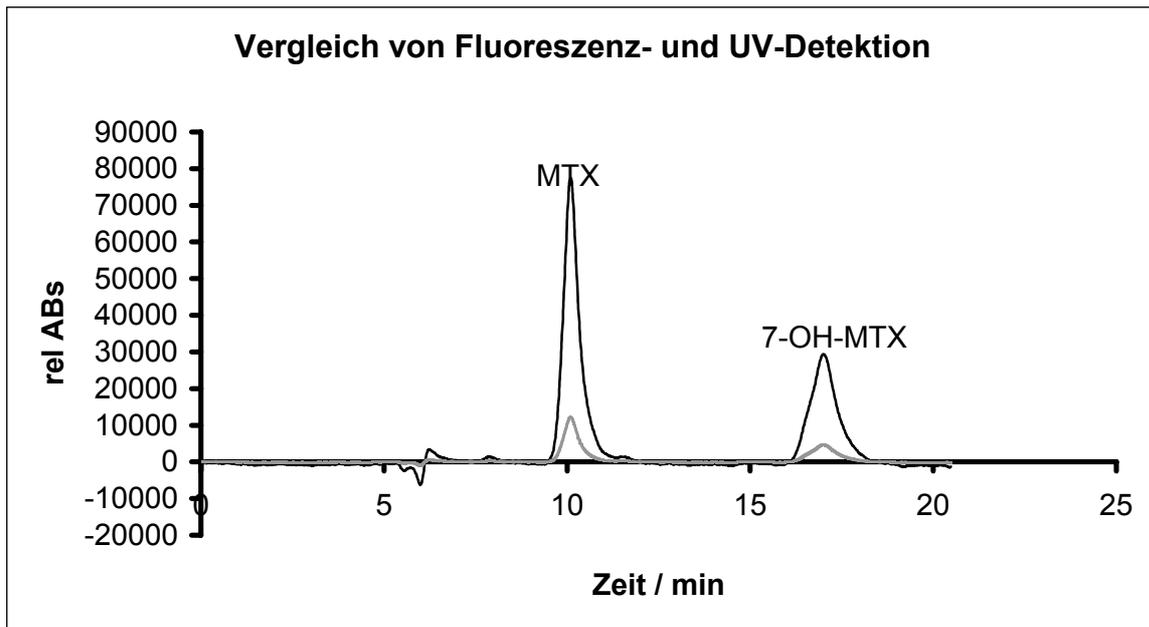


Abb. 32: Vergleich von Fluoreszenz- (grau) und UV-Detektion (schwarz markiert)

8.2.3 Arbeitsanweisung

8.2.3.1 Bestimmung von Methotrexat, 7-Hydroxy-Methotrexat und Etoposid in Klärschlamm mittels Festphasen-Extraktion und HPLC-DAD-Fluoreszenz

IV

- Probe: 5 g gefriergetrockneter Klärschlamm.
- Dotierung: 100 ml gepuffertes destilliertes Wasser, pH = 4,5 gespiked mit Zytostatika (MTX, 7-OH-MTX, VP 16).
- IV i Probenvorbereitung
- Extraktion: Reagenzglasschüttler, 1 h bei Raumtemperatur.
- Extraktionsmittel: 50 ml Methanol
- Filtration: Faltenfilter
- Konzentration: 20 µg/l Etoposid, 20 µg/l Methotrexat, 20 µg/l 7-Hydroxy-Methotrexat.
- IV ii Anreicherung
- Sorbens: Extraktionsdisks: 500 mg C₁₈ Octadecyl, Ø 47 mm, (Speedisk[®], Bakerbond, Baker).
- Konditionierung: 4 × 1 ml Methanol, dann 3 × 1 ml Phosphatpuffer pH 4,8, ohne Vakuum durch die Scheibe laufen lassen, Scheibe nicht trockenlaufen lassen.
- Probenaufgabe: Extraktionskartusche mit Probe füllen, Adapter anschließen, Scheibe nicht trocken laufen lassen, Probe durchsaugen dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks möglichst konstant halten (maximale Flussgeschwindigkeit 80 ml/min), nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen.
- Trocknen: 1 - 2 Minuten Luft durch die Scheibe saugen.

Elution: Graduierten Nasenkolben einsetzen, erst 3 × 1 ml MeOH, dann 2 × 1 ml ACN/CH₂Cl₂ 50/50 (v/v) auf die Scheibe geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen.

Einengen: Eluat im schwachen Inertgasstrom (N₂ oder Argon) bei Raumtemperatur bis zur 0,4 ml-Marke einengen. Sollten Bestandteile ausfallen, mit mobiler Phase der HPLC verdünnen.

IV iii Flüssigchromatographische Trennung

20 µl des eingengten Eluats mit HPLC analysieren.

Säule: C18-Säule (Machery-Nagel, Nucleosil 100-5 C18, 250 × 4 mm).

Gradient: Start: 15 : 85 (v/v) ACN/0,01 M Phosphatpuffer pH = 3,5, 10 – 12 min, 15 – 30 Vol% CAN.

IV iv Detektion

Methotrexat: UV 307 nm

7-OH-MTX: UV 307 nm

Etoposid: Fluoreszenz 240/340 nm

IV v Bestimmungsgrenzen

Methotrexat: 60 mg/kg Trockenmasse (ohne Anreicherung, Schlamm)

3 mg/kg Trockenmasse (mit Anreicherung, Schlamm)

7-OH-MTX: 270 mg/kg Trockenmasse (ohne Anreicherung, Schlamm)

14 mg/kg Trockenmasse (mit Anreicherung, Schlamm)

Etoposid: 30 mg/kg Trockenmasse (ohne Anreicherung, Schlamm)

2 mg/kg Trockenmasse (mit Anreicherung, Schlamm)

8.3 Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser, Abwasser und Luft mittels GC-MS

8.3.1 Verfahrensentwicklung

8.3.1.1 Struktur der Analyten

Die beiden Analyten Cyclophosphamid und Ifosfamid sowie die verwendeten internen Standards (IS) Cyclophosphamid d_4 (CP d_4) und 4-Keto-Ifosfamid sowie der Injektionsstandard Trofosfamid gehören zur Familie der Stickstofflost-Derivate (Oxazaphosphinan-Derivate). Diese Stoffe entstanden in Analogie zu den Schwefellost-Verbindungen oder Senfgasen, die als Hautkampfstoffe im I. Weltkrieg eingesetzt wurden. Ihre Strukturen sind im folgenden aufgeführt:

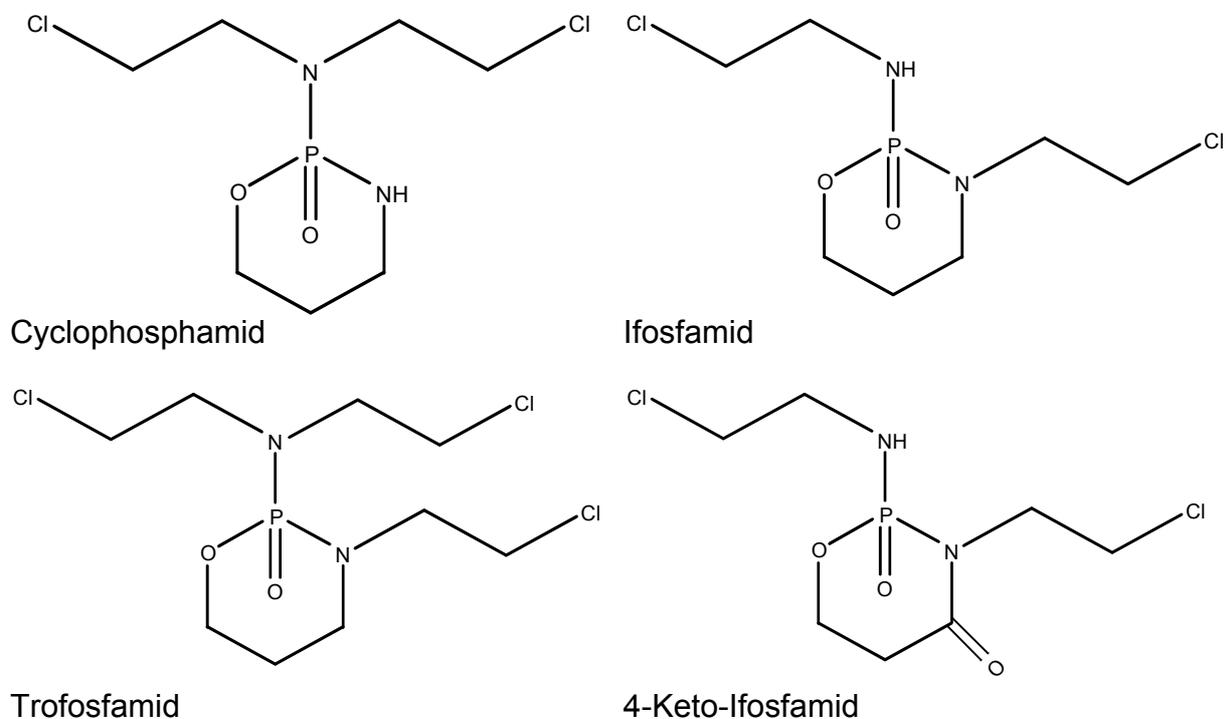


Abb. 33: Struktur von Cyclophosphamid, Ifosfamid, Trofosfamid und 4-Keto-Ifosfamid

Cyclophosphamid d₄ unterscheidet sich bzgl. der Struktur nicht von Cyclophosphamid. Beim Cyclophosphamid d₄ sind 4 Wasserstoffatome gegen Deuterium ausgetauscht, so dass sich beide Komponenten nur in der molaren Masse unterscheiden.

8.3.1.2 Herkunft der Proben

Für die Untersuchungen wurden möglichst unbelastete Oberflächenwasserproben (z.B. aus dem Kemnader Stausee in Bochum, dem Töppersee und dem Rhein in Duisburg) ausgewählt. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden diesen Proben in Abhängigkeit von der jeweiligen Aufgabenstellung die Analyten (Cyclophosphamid und Ifosfamid) und die internen Standardsubstanzen (4-Keto-Ifosfamid und/ bzw. Cyclophosphamid d₄) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

8.3.1.3 Probenvorbereitung

Der pH-Wert der einzelnen Proben kann einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität und Selektivität der verschiedenen Anreicherungs- und Extraktionsverfahren haben. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden die Proben mit Phosphat- bzw. Borat-Puffer des gewünschten pH-Wertes versetzt. Die besten Ergebnisse bei der nachfolgenden Extraktion ergaben sich bei niedrigen pH-Werten (pH 3 und 4). Im alkalischen Medium war der durch mitextrahierte Matrixbestandteile verursachte chemische Untergrund im Chromatogramm wesentlich stärker ausgeprägt als bei den schwach sauren Lösungen. Je nach anschließendem Anreicherungsverfahren wurden die Proben auf pH-Werte von 4 bzw. 6 eingestellt.

8.3.1.4 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Neben dem Erreichen großer Anreicherungsfaktoren und einer damit verbundenen Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des Gesamtverfahrens, dient die Extraktion vor allem der Abtrennung störender Matrixbestandteile.

Beim Vergleich verschiedener Extraktionsmittel stellte sich heraus, dass Essigsäureethylester (Ethylacetat, EtOAc) am besten geeignet ist, um Cyclophosphamid respektive Ifosfamid aus den verschiedenen Matrices zu extrahieren. Die Verwendung anderer Lösungsmittel (Toluol, Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff) führte zu Substanzverlusten bzw. zu höherem chemischen Rauschen.

Die Dauer der Flüssig/Flüssig-Extraktion für Probenvolumina im Bereich von 1 bis 5 ml und unter Einsatz eines Vortex-Schüttlers wurde im Bereich von 15 bis 300 Sekunden untersucht und ist mit einer Minute ausreichend gewählt, da so ein intensiver Kontakt zwischen wässriger und hydrophober Phase und somit ein vollständiges Einstellen des Verteilungsgleichgewichtes unter geringem Zeitaufwand möglich ist. Bei größeren Probenvolumina wurde die Extraktionsdauer erhöht und ein Flachbett-schüttler eingesetzt.

Falls eine eindeutigen Phasentrennung nicht möglich ist, kann die Probe außerdem zentrifugiert werden.

8.3.1.5 Festphasen-Extraktion

Bei der Verwendung fester Phasen auf der Basis von modifiziertem Silicagel ist eine bestimmte Vorgehensweise erforderlich. Um während der Extraktion eine Wechselwirkung zwischen den Analytmolekülen und den Endgruppen der Festphase zu ermöglichen, ist es notwendig, das Anreicherungsmaterial zu konditionieren. Durch Spülen der Säule mit einem organischen Lösungsmittel werden die unpolaren Ankergruppen mit diesem benetzt und dadurch aufgerichtet. Im Anschluss an die Konditionierung wird das Sorbensbett mit einigen Millilitern der undotierten Probenlösung für die Aufgabe vorbereitet. Daraufhin erfolgt die eigentliche Probenaufgabe, ohne dass das Bett trocken laufen darf. Dazu werden über käuflich zu erwerbende Adapter die Proben auf das Sorbensmaterial gegeben. Die Ermittlung der optimalen Durchflussrate bei der Probenaufgabe ist ein wichtiger Teil der Methodenentwicklung. In der Regel werden vom Hersteller bzw. Anbieter bestimmte Bereiche für die Flussrate empfohlen. Sie sollte einerseits so hoch wie möglich sein, um die Gesamtanalysendauer gering zu halten. Andererseits muss gewährleistet sein, dass die Kontaktzeit zwischen Sorbens und Probe groß genug ist, dass sich das Adsorptionsgleichgewicht einstellen kann. Bei den verwendeten Disks wurde jeweils eine Durchflussrate

von 80 ml/min eingestellt. Nach einem möglichen, bei Oberflächenwasser aber aufgrund geringer Matrixbelastung ausgelassenen, Waschschrift ist es notwendig, das Sorbensmaterial zu trocknen. Dies dient vornehmlich der Verdrängung der Probenlösung aus dem Sorbensbett. Die Benetzung des Sorbensmaterials durch das Elutionsmittel wird durch diesen Schritt generell verbessert. Bei der Verwendung von Elutionsmitteln, die mit der Probenmatrix nicht mischbar sind, ist der Trocknungsschritt unverzichtbar. Dies gilt auch, wenn die nachfolgende Analytik durch in das Eluat gelangte Spuren der Probenmatrix gestört werden kann, wie es z.B. bei wässrigen Proben und nachfolgender GC-Analytik der Fall ist, da Wasserspuren die nachfolgende Derivatisierungsreaktion verhindern. Verschlechterungen der Wiederfindungsrate durch den Trocknungsschritt können bei flüchtigen Verbindungen auftreten.

Die einfachste Form der Trocknung besteht darin, Luft durch die Extraktionssäule oder -scheibe zu saugen.

Bei der Extraktion der Analyten mittels fester Phasen, die nicht nur weitaus größere Anreicherungsfaktoren, sondern ebenso wie die Flüssig/Flüssig-Extraktion eine Abtrennung der zu bestimmenden Analyten von den Matrixbestandteilen ermöglicht, kamen verschiedene Festphasen-Sorbentien auf Silicagel-Basis in Scheibenform (Disk) zum Einsatz. Die entsprechenden Säulen wurden aufgrund der großen verwendeten Probenvolumina (bis zu 1 l) nicht benutzt.

Ergebnissen von Voruntersuchungen zur Folge, kamen Disks mit normaler C₁₈- oder C₁₈-Polar Plus-Belegung in Frage (s. Tab. 41).

Sorbens	Adsorbierende Gruppen	Wechselwirkung	Durchmesser [mm]	Handelsname[®]	Anbieter
Modifiziertes Silicagel	C18 end-capped	Unpolar	47	C18 Speedisk	Baker
Modifiziertes Silicagel	C18	Unpolar	47	C18 Polar Plus Speedisk	Baker

Tab. 41: Verwendete Festphasenmaterialien

8.3.1.6 Derivatisierung

Cyclophosphamid, sein Strukturisomer Ifosfamid und die internen Standards Cyclophosphamid d_4 und 4-Keto-Ifosfamid, die im Fall der simultanen Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid eingesetzt werden, sind im gaschromatographischen Prozess nicht temperaturstabil. Es kommt unter Abspaltung des thermodynamisch stabilen Chlorwasserstoffs zu einem intramolekularen Ringschluss (s. Abb. 34). Aufgrund dieser Tatsache müssen diese Substanzen zunächst in ihre stabilen Trifluoracetyl-Derivate überführt werden (s. Abb. 35).

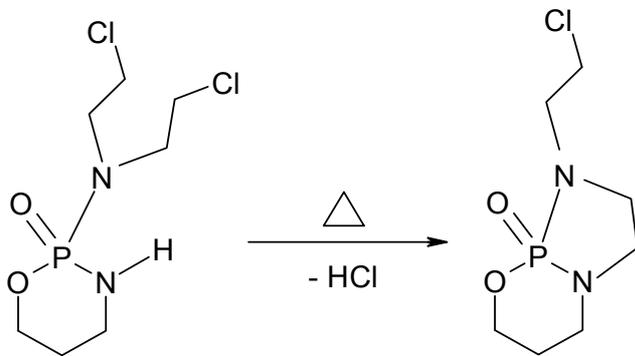


Abb. 34: Intramolekulare Alkylierung („Ringschluss“) von Cyclophosphamid

Die Umsetzung der Substanzen erfolgt im Heizschüttler durch Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA):

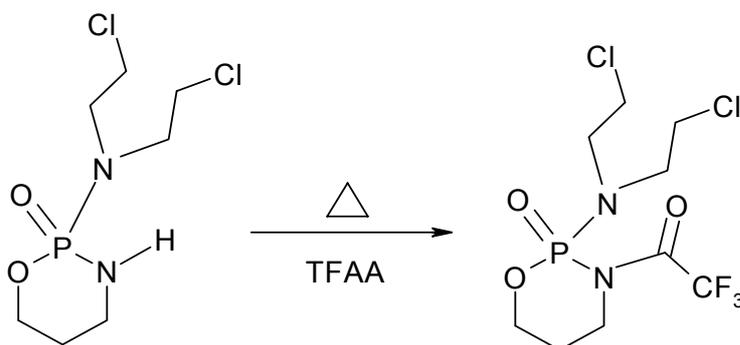


Abb. 35: Derivatisierung (Trifluoracetylierung) von Cyclophosphamid

Es wurden Untersuchungen bezüglich der optimalen Derivatisierungstemperatur und -dauer durchgeführt. Dazu wurde die Temperatur im Bereich von 50 bis 80 °C und

die Dauer der Reaktion zwischen 30 und 120 Minuten variiert. Bei einer Stunde Derivatisierung mit einer Temperatur von 70 °C wurde das Optimum an Empfindlichkeit und Zeitgewinn gefunden. Dauert die Umsetzung weniger als eine Stunde, so ist noch nicht aller möglicher Stoffumsatz erfolgt; zeitlich darüber hinaus ist keine Verbesserung zu beobachten. Ebenso verhält es sich bei der Derivatisierungstemperatur. Unterhalb von 70 °C ist der Umsatz geringer, oberhalb von 78 °C siedet das Lösungsmittel, was einen beträchtlichen Substanzverlust verursacht. Die Derivatisierung erfolgt vollständig, was durch eine Synthese des Trifluoracetyl-Abkömmlings des Cyclophosphamids mit anschließender Reinheitsüberprüfung per GC/MS belegt werden konnte.

Der Injektionsstandard Trophosphamid ist temperaturstabil, muss nicht derivatisiert werden und wird der Analysenlösung direkt vor der Injektion zugegeben.

8.3.1.7 Gaschromatographische Parameter

Bezüglich der gaschromatographischen Trennung wurden Kapillartrennsäulen unterschiedlicher Polarität auf ihre Leistung überprüft. Hierbei zeigte sich, dass eine unpolare Kapillarsäule (z.B. DB5-MS) bezogen auf die Trennung der Analyten, die besten Resultate liefert.

Splitdauer, Injektionsvolumen, Injektortemperatur, Trägergasgeschwindigkeit und die Temperaturprogramme der GC-Öfen variieren in Abhängigkeit von der gewählten Gerätezusammensetzung und sind bzgl. der Parameter Trennleistung und Analysendauer optimiert (vgl. Arbeitsanweisungen).

8.3.1.8 Massenspektrometrische Parameter

Zum massenspektrometrischen Nachweis wurden je nach erwarteter Konzentration und angewandter Aufarbeitungsmethode neben einem GCQ-MS der Firma Finnigan MAT (Thermo Quest), ein GC-MS (QMD 1000) der Firma Carlo Erba und ein HRGC-HRMS (Autospec) der Firma VG (jetzt micromass) eingesetzt. Es ist möglich, die Proben an diesen GC-MS-Geräten sowohl im Full Scan- sowie im SIM- und MS/MS-Modus (am GCQ-MS) zu vermessen. Zur Bestimmung der Retentionszeit und der

jeweiligen Massenspektren wurden höher konzentrierte Standards im Full Scan-Modus (Aufnahme aller in einem Bereich auftretenden Massen) analysiert. Eine erhöhte Nachweisstärke wurde durch die Anwendung der Einzelmassenregistrierung (Single Ion Monitoring, SIM) erreicht.

Des Weiteren kann am GCQ aufgrund der Ion-Trap-Technik Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt werden. Bei der spurenanalytischen Untersuchung von Substanzen in komplexen Matrices bietet die MS/MS-Technik die Möglichkeit, die Matrix in Form eines massenspezifischen „Clean-up“ abzutrennen.

Ein Vergleich zwischen einer Full Scan-Messung mit anschließender Computernachberechnung des Massenchromatogramms auf $m/z = 307$, dem direkten Aufnehmens des SIM-Chromatogramms und der Anwendung der MS/MS-Technik (Vorläuferion: 307, Qualifierion: 212) ergab bei Analyse der Substanzen aus Oberflächenwasser in der oben genannten Reihenfolge eine Verbesserung von einer Zehnerpotenz.

Die Anwendung der HRGC-HRMS im SIM-Modus erlaubt bzgl. der Nachweisempfindlichkeit eine adäquate Verbesserung wie der Einsatz der MS/MS-Technik.

8.3.1.9 Optimierte Analysemethoden

Aufgrund der erwarteten geringen Konzentration in Realproben und der daher angestrebten Bestimmungsgrenze von $< 50 \text{ ng/l}$ wurden die o. g. Verfahren weiter optimiert. Insbesondere wurde die Probenvorbereitung, sowohl für die Flüssig/Flüssig-Extraktion, als auch die Festphasen-Extraktion weiter entwickelt. Die optimierten Methoden unterscheiden sich geringfügig in der Probenvorbereitung. Die Detektion der Komponenten erfolgte mittels GCMS/MS (GCQ-MS) bzw. HRGC-HRMS:

Für die Flüssig/Flüssig-Extraktion haben sich folgende Arbeitsschritte bewährt:

Methode 1	Methode 2
20 ml Probe	50 ml Probe
Einstellen auf pH-Wert von 4	Einstellen auf pH-Wert von 6
3 x Extrahieren mit 20 ml EtOAc	3 x Extrahieren mit 50 ml EtOAc
Ggfs. Zentrifugieren zur Phasentrennung	
Einengen der organischen Phase bis zur Trockne	Einengen der organischen Phase bis zur Trockne
Aufnehmen in EtOAc	Aufnehmen in EtOAc
Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (1h, 70°C)	Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (1h, 70°C)
Abtrennen des Lösemittels und des überschüssigen Derivatisierungsmittels	Abtrennen des Lösemittels und des überschüssigen Derivatisierungsmittels
Aufnahme in EtOAc (incl. Trofosamid als Injektionsstandard)	Aufnahme in Toluol (incl. Trofosamid als Injektionsstandard)
GCQ-MS (GC-MS/MS)	HRGC-HRMS

Tab. 42: Methoden zur Flüssig/Flüssig-Extraktion

Der Vorteil der Festphasen-Extraktion gegenüber der Flüssig/Flüssig-Extraktion besteht in der Möglichkeit, die Analyte aus einem großen Volumen anzureichern, dann mit einer geringen Lösungsmittelmenge zu eluieren und damit einen wesentlich größeren Anreicherungsfaktor zu erzielen.

Cyclophosphamid und Ifosfamid werden aus einem Liter Oberflächenwasser auf der Festphase angereichert und anschließend mit Acetonitril eluiert. Die Durchführung ist im folgenden in einer Kurzfassung der optimierten Methoden dargestellt:

Methode 1	Methode 2
1000 ml Probe	1000 ml Probe
Einstellen auf pH-Wert von 7	Einstellen auf pH-Wert von 6
C ₁₈ -Festphase Konditionieren mit 10 ml Methanol und 10 ml undotierter Probe (Oberflächenwasser)	C ₁₈ -Festphase Konditionieren mit 10 ml Methanol und 10 ml undotierter Probe (Oberflächenwasser)
Aufgabe der Probe (1 l)	Aufgabe der Probe (1 l)
Trocknen der Festphase im Luftstrom	Trocknen der Festphase im Luftstrom
Elution mit 3 x 5 ml Acetonitril (ACN)	Elution mit 20 ml Acetonitril (ACN)
Einengen bis zur Trockne	Einengen bis zur Trockne
Aufnehmen in EtOAc	Aufnehmen in EtOAc
Derivatisierung mit Trifluoressigsäure- anhydrid (1h, 70°C)	Derivatisierung mit Trifluoressigsäure- anhydrid (1h, 70°C)
Abtrennen des Lösemittels und des über- schüssigen Derivatisierungsmittels	Abtrennen des Lösemittels und des über- schüssigen Derivatisierungsmittels
Aufnahme in EtOAc (incl. Trofosamid als Injektionsstandard)	Aufnahme in Toluol (incl. Trofosamid als Injektionsstandard)
GCQ-MS (GC-MS/MS)	HRGC-HRMS

Tab. 43: Methoden zur Festphasen-Extraktion

8.3.2 Arbeitsanweisungen

8.3.2.1 Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion und GC-MS/MS

II

Probe: 20 ml Oberflächenwasser

Interner Standard: 4-Keto-Ifosfamid

II i Anreicherung

Extraktion: Dreimalige Extraktion mit 20 ml EtOAc.

Einengen: Vereinigte organische Phasen im schwachen Inertgasstrom bis zur Trockne einengen.

Wiederfindungsraten: Cyclophosphamid: $R_s = 80 - 120 \%$

Ifosfamid: $R_s = 80 - 120 \%$

II ii Derivatisierung

Rückstand in 100 μ l EtOAc aufnehmen, 100 μ l Trifluoressigsäureanhydrid zugeben, Reaktion bei 70 °C, für eine Stunde im Thermoschüttler.

Einengen: Lösungsmittel und überschüssiges Derivatisierungsmittel mittels Inertgasstrom abtrennen, anschließend in 100 μ l EtOAc aufnehmen.

II iii Gaschromatographische Trennung

Probenaufgabe: 1 μ l Probe, 60 s splitless

Trennsäule: Kapillartrennsäule (DB-5-MS; Länge 25 m, 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 μ m Filmdicke).

Trägergas: Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit von 40 cm/s.

Temperatur GC-Ofen: 70 °C (1 min), 30 °C/min, 300 °C

Temperatur Injektor-Ofen: 70 °C, 7 °C/s, 300 °C

II iv Massenspektrometrische Bestimmung

Vorläuferion: $m/z = 307$ (CP/IF), 351 (4-Keto-IF)

Qualifierion: $m/z = 212$ (CP/IF), 281 (4-Keto-IF)

Speicherzeit:	8 ms
Dissoziationszeit:	30 ms
Stabilitätsfaktor:	q = 0,45
Dissoziationsspannung:	0,7 V (CP/IF), 0,6V (4-Keto-IF)
Temperatur Ionenquelle:	200 °C
Temperatur Transferline:	300 °C
II v Bestimmungsgrenze	
Cyclophosphamid:	< 1 µg/l Oberflächenwasser
Ifosfamid:	1 µg/l Oberflächenwasser

8.3.2.2 Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser mittels Festphasen-Extraktion und GC-MS/MS

III

Probe:	1000 ml Oberflächenwasser
Interner Standard:	Cyclophosphamid d ₄
III i Anreicherung	
Sorbens:	Extraktionsdisks: 500 mg C ₁₈ Octadecyl, Ø 47 mm, (Speedisk [®] , Bakerbond, Baker).
Konditionierung:	10 ml Methanol ohne Anlegen von Vakuum durch die Säule tropfen lassen, Disk nicht trocken laufen lassen.
Probenaufgabe:	Probe mit 1,4 g KH ₂ PO ₄ versetzen (0,01 M) und mit 3 M KOH-Lösung auf pH 6,0 einstellen, Extraktionskartusche mit Probe füllen, Adapter anschließen, Scheibe nicht trockenlaufen lassen, Probe durchsaugen, dabei Flussgeschwindigkeit durch allmähliche Erhöhung des Unterdrucks konstant halten (max. Flussgeschwindigkeit 80 ml/min), nach vollständiger Probenaufgabe Adapter entfernen.
Trocknen:	Eine Stunde Luft durch Scheiben saugen.
Elution:	Geeignetes Probengefäß einsetzen, viermal 5 ml Acetonitril auf die Kartusche geben, zwei Minuten einwirken las-

sen. Anschließend jedes Mal durch Anlegen eines Vakuums die Kartusche trockenziehen.

Einengen: Vereinigte organische Phasen im schwachen Inertgasstrom bis zur Trockne einengen.

Wiederfindungsraten: Cyclophosphamid: $R_s = 70 - 90 \%$

Ifosfamid: $R_s = 70 - 90 \%$

III ii Derivatisierung **siehe II ii**

III iii Gaschromatographische Trennung **siehe II iii**

III iv Massenspektrometrische Bestimmung **siehe II iv**

III v Bestimmungsgrenzen

Cyclophosphamid: 10 ng/l Oberflächenwasser

Ifosfamid: 10 ng/l Oberflächenwasser

8.3.2.3 Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion und hochauflösender GC-MS (HRGC-HRMS)

V

Probe: 50 ml Oberflächenwasser

Interner Standard: Cyclophosphamid d_4 , entsprechend der erwarteten Konzentration von Cyclophosphamid und Ifosfamid.

V i Anreicherung **siehe II i**

V ii Derivatisierung **siehe II ii**

V iii Gaschromatographische Trennung

Probenaufgabe: 1 μ l Probe, 90 s splitless

Trennung: Kapillartrennsäule (DB-5-MS; $l = 60$ m, $d_i = 0,25$ mm, $d_f = 0,25$ μ m)

Trägergas: Helium 5.0

GC-Ofen: 80 °C isotherm 2 min

20 °C/min bis 250 °C

10 min isotherm

Injektor-Temperatur: 270 °C

Transferline-Temperatur: 270 °C

V iv Massenspektrometrische Bestimmung

Ionenquelle: Speziell für Elektronenionisation, Temperatur 270 °C.

Auflösung: 7000 - 8000

Referenzsubstanz: Perfluorkerosin

Qualifizierung: m/z = 307,0149 (CP/IF)

m/z = 311,0539 (CPd₄)

V v Bestimmungsgrenzen:

Cyclophosphamid: 50 ng/l Oberflächenwasser

Ifosfamid: 50 ng/l Oberflächenwasser

8.3.2.4 Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser und Abwasser mittels Festphasenextraktion und hochauflösender GC-MS (HRGC-HRMS)

VI

Probe: 0,5 bis 1 l, je nach Matrixbelastung

Interner Standard: Cyclophosphamid d₄, entsprechend der erwarteten Konzentration von Cyclophosphamid und Ifosfamid.

VI i Anreicherung

Sorbens: Extraktionsdisks: 500 mg C₁₈ Octadecyl, Ø 47 mm, (Speedisk[®], Bakerbond, Baker).

Konditionierung: Ca. 10 ml MeOH ohne Vakuum durch die Scheibe laufen lassen, Scheibe darf nicht trockenlaufen.

Probenaufgabe: Probe mit 3 M Phosphorsäure bzw. 3 M KOH auf pH 6 einstellen, nach der Konditionierung mit MeOH die Extraktionskartusche mit einigen ml Wasser füllen, die Probe über einen Adapter hinzufügen, der nach vollständiger Probenaufgabe zu entfernen ist, die Durchflussrate bei Erhöhung des Unterdrucks auf maximal 80 ml/min steigern und konstant halten.

Trocknen:	Mindestens 10 Minuten Luft durch die Extraktionsscheibe saugen.
Elution:	2 ml ACN auf die Scheibe geben, 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, bei Abwasser 4 ml ACN:H ₂ O 20:80 verwerfen, dann langsam insgesamt 20 ml ACN durchlaufen lassen.
Einengen:	Eluat bei 70 °C im Inertgasstrom (N ₂) bis zur Trockne einengen.
Wiederfindungsraten:	Cyclophosphamid: Rs = 70 – 90 % Ifosfamid: Rs = 70 – 90 %

VI ii Derivatisierung **siehe II ii**

VI iii Gaschromatographische Trennung **siehe V iii**

VI iv Massenspektrometrische Bestimmung **siehe V iv**

VI v Bestimmungsgrenze

Cyclophosphamid: 25 - 50 ng/l je nach Matrixbelastung

Ifosfamid: 25 - 50 ng/l je nach Matrixbelastung

8.3.2.5 Bestimmung von Cyclophosphamid in Raumluft mittels Anreicherung auf Partikelfilter, XAD-2 Harz und Kühlfalle sowie GC-MS

VII

Probe Ca. 1 m³ Raumluft aus Zytostatika-Zubereitungsräumen.

VII i Anreicherung

Probenahmeapparatur: Partikelfilter (Millipore AP 40, D = 47 mm), Adsorber-Harz (1 g aufgereinigtes XAD-2), Kühlfalle aus Glas in Trockeneis / Aceton-Gemisch (-78 °C).

Durchführung: Ca. 1 m³ Luft (ca. 4 h, 250 l/h) durch Apparatur saugen.

VII ii Probenvorbereitung

Partikelfilter: Filter mit 6 ml Ethylacetat 10 min im Ultraschallbad eluieren, 4 ml davon zur Analyse.

Adsorberharz: XAD2-Harz mit 6 ml Ethylacetat 10 min im Ultraschallbad eluieren, 4 ml davon zur Analyse.

Kühlfalle 5 - 12 ml Kondensat aus der Kühlfalle, davon 2 ml dreimal mit 2 ml EtOAc extrahieren.

Interner Standard: Ifosfamid

Einengen: Vereinigte organische Phasen im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen.

VII iii Derivatisierung **siehe II ii**

VII iv Gaschromatographische Trennung

Probenaufgabe: 1 µl Probe, 30 s splitless

Trennung: Kapillartrennsäule (DB-5-MS; l = 40 m, di = 0,18 mm, df = 0,18 µm).

Trägergas: Helium 5.0

GC-Ofen: 80 °C isotherm 2 min
15 °C/min bis 250 °C
10 min isotherm

Injektor-Temperatur 230 °C

VIII v Massenspektrometrische Bestimmung

Analysengerät: Massenspektrometer (QMD 1000)

Qualifikation: m/z = 307 (CP/IF)

Transferline-Temperatur: 250 °C

Ionenquellentemperatur: 200 °C

VIII vi Bestimmungsgrenze

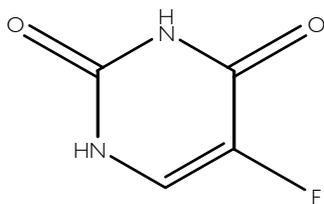
Cyclophosphamid: a) Im Eluat: Partikelphase 0,5 µg/l, Gasphase: 2,0 µg/l.
b) Unter den gegebenen Probenahmebedingungen entspricht dies Konzentrationen von 3 ng/m³ bzw. 12 ng/m³.
Annahme: Wiederfindungsrate = 100 %

8.4 Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von 5-Fluorouracil in Oberflächenwasser mittels GC-MS/MS und negativer chemischer Ionisierung

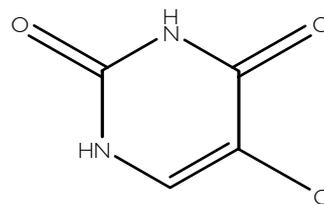
8.4.1 Verfahrensentwicklung

8.4.1.1 Struktur der Analyten

Das in der Chemotherapie als Antimetabolit bzw. Pyrimidinantagonist eingesetzte 5-Fluorouracil und sein Analogon 5-Chlorouracil zählen zu den Uracil- respektive Thyminderivaten. Sie weisen folgende Strukturen auf:



5-Fluorouracil



5-Chlorouracil

Abb. 36: Struktur von 5-Fluorouracil und 5-Chlorouracil

8.4.1.2 Herkunft der Proben

Die für die Methodenentwicklung verwendeten Wasserproben stammten aus vier verschiedenen Teichen auf dem Gelände der Ruhr-Universität.

Auch hierbei wurden die Proben erst kurz vor der Analyse gezogen und anschließend mit den benötigten Mengen der Komponenten dotiert.

8.4.1.3 Verwendete Apparaturen

Die bei der Entwicklung der Methode zur Bestimmung der therapeutischen Uracil-Derivate aus Oberflächenwasser benutzten Geräte entsprechen in vollem Umfang den bereits beschriebenen.

8.4.1.4 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Nach Durchsicht der Fachliteratur wurde die Flüssig/Flüssig-Extraktion der Festphasen-Extraktion vorgezogen.

Es wurden folgende in der Literatur bevorzugte Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische auf ihre Extraktionsfähigkeit untersucht: Ethylacetat, Ethylacetat/iso-Propanol (9:1), Aceton/Petrolether (2:1), Diethylether/iso-Propanol (4:1)

Während die ersten drei Möglichkeiten bezüglich ihres Extraktionsvermögens völlig versagten, war die Wiederfindungsrate bei Verwendung des Diethylether/iso-Propanol-Gemisches mit bis zu 60 % akzeptabel. Diese verändert sich mit steigendem iso-Propanol-Anteil anfänglich sehr, bis sie bei ungefähr 20 %-igem Bestandteil im Ether einen Sättigungsgrad erreicht (s. Abb. 37).

Da mit steigendem Gehalt an 2-Propanol auch die Co-Extraktion von Matrixbestandteilen zunimmt, ist mit einem Volumenanteil von 20 % ein Maximum an Extraktionskraft bei geringer Belastung durch Interferenzen gegeben.

Insbesondere die verwendeten, aus dem Freiland stammenden Proben, unterliegen in ihrer Zusammensetzung jahreszeitlich und witterungsbedingten Schwankungen. Ebenso variieren sie im Laufe des Jahres bezüglich ihres pH-Wertes in Abhängigkeit von der Niederschlagstätigkeit. Aus diesem Grund müssen die Proben vor der Extraktion mit dem Lösungsmittelgemisch mit einem Puffer auf einen pH-Wert von 4-5 eingestellt werden, wie es einheitlich in der Literatur beschrieben ist. In der entwickelten Methode wurde ein Wert von 4 mit einem 0,01 N Phosphat-Puffer (P_4O_{10}/KH_2PO_4) eingestellt.

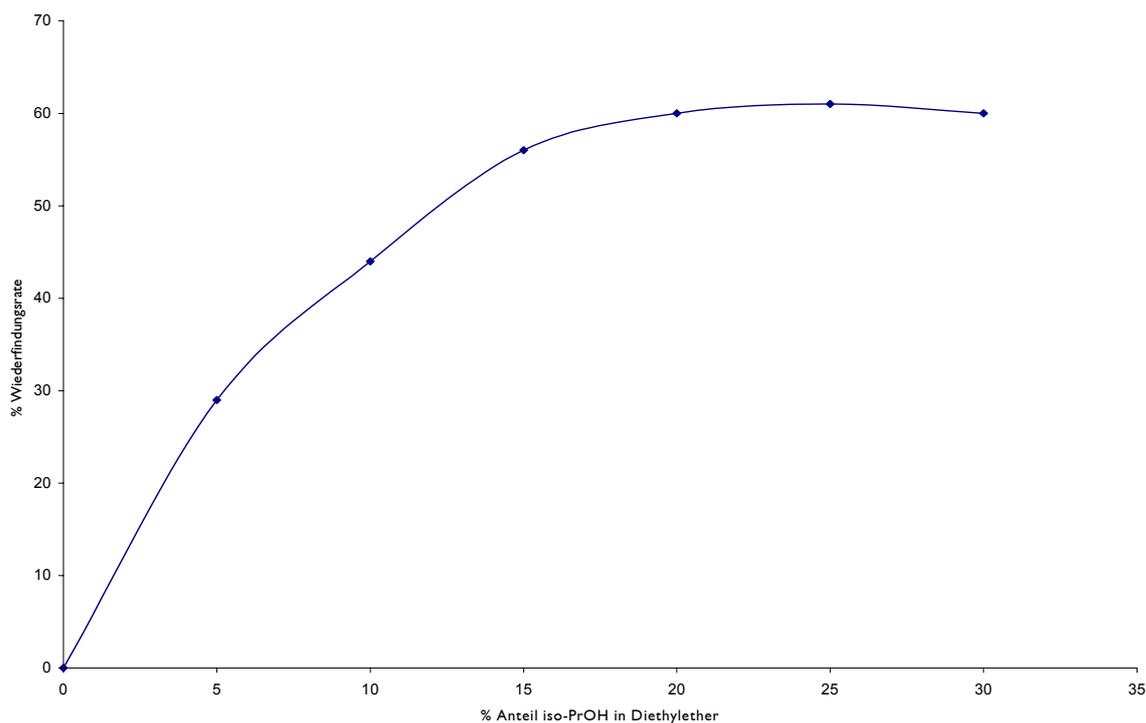


Abb. 37: Abhängigkeit der Wiederfindungsrate vom Anteil des iso-Propanols im Diethylether [Noz94]

Einen ebenfalls großen Einfluss auf ihre Effizienz hat die Dauer der Extraktion. Weil sich nach 15 Minuten das Equilibrium zwischen wässriger und organischer Phase noch nicht eingestellt hat, wird die Schütteldauer auf 30 Minuten festgelegt. Verwendung fand hierbei der Flachbrett-Schüttler.

8.4.1.5 Derivatisierung

Da die Konzentrationen von 5-Fluorouracil im Oberflächenwasser im unteren ng/l-Bereich zu erwarten sind, ist eine möglichst nachweisstarke Methode zu entwickeln. Neben einer quantitativen Extraktion der Analyten bei fehlender Co-Extraktion von Matrix ist eine sensitive GC-MS-Methode zu erstellen. Dies wird häufig durch eine weiche Ionisierungsmethode erreicht. Das Vorhandensein des Halogenatoms im Molekül legt eine negative chemische Ionisierung nahe. Eine Erhöhung der Möglichkeit, Elektronen einzufangen, kann durch eine gezielte chemische Veränderung des Moleküls, das ohnehin aufgrund der beiden aciden Protonen am Stickstoff des Rings

derivatisiert werden muss, vor oder während der Injektion bewirkt werden. Perfluorierte, aromatische Verbindungen werden häufig zu solchen Zwecken eingesetzt. Eine weitere Bedingung, die das Derivatisierungsmittel erfüllen muss, ist, dass sich auch der verwendete interne Standard 5-Chlorouracil in der gleichen Art und Weise zur Reaktion bringen lässt. Bei der Entwicklung dieser Methode kamen zwei verschiedene derartige Verbindungen zum Einsatz:

Pentafluorbenzylbromid (PFBBBr)

3,5-Bis(trifluoromethyl)benzylbromid (DTFMBBBr)

Vorab kann gesagt werden, dass sich beide Reagenzien für diese Art von chemischer Veränderung eignen. Jedoch kommt es bei der Verwendung von PFBBBr zu starkem Tailing der Substanzen im Chromatogramm. Dieses Phänomen tritt nach der Derivatisierung von 5-Fluoro- und 5-Chlorouracil mittels DTFMBBBr nicht auf. Die DTFMB-Derivate erzeugen sehr scharfe Peaks mit ähnlichem Response, der Peak des 5-Fluorouracil ist also nur geringfügig größer als der seines Analogons. Somit wurde die Methode im Hinblick auf die DTFMB-Derivate optimiert.

Die Reaktion folgt dem nachstehenden Schema:

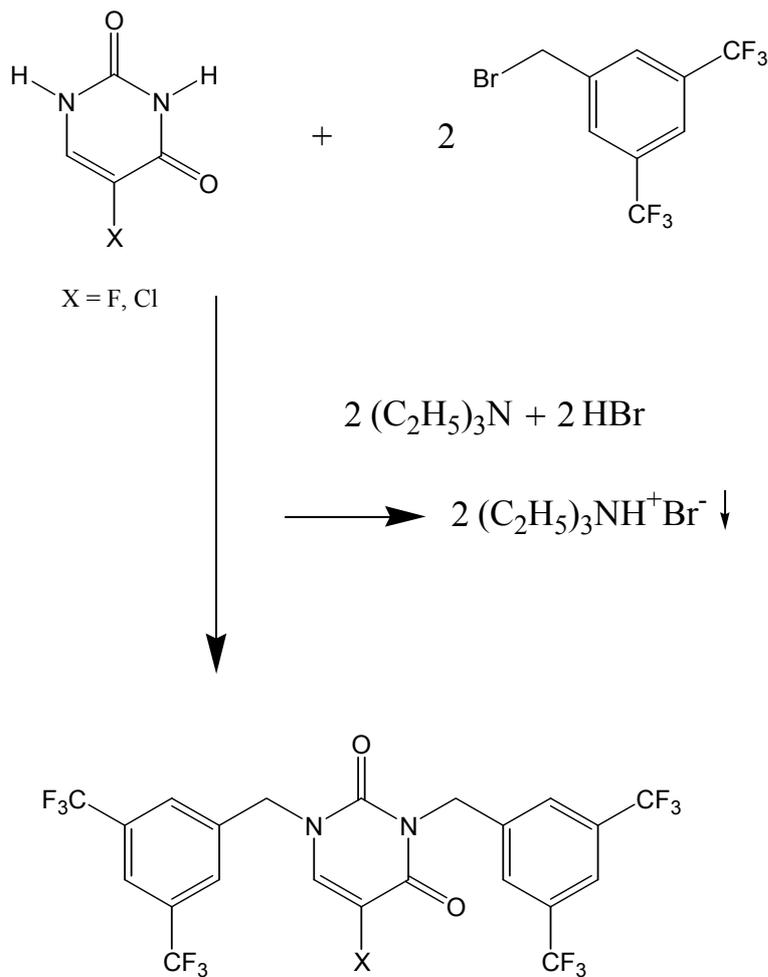


Abb. 38: Reaktionsschema der Derivatisierung mit 3,5-Bis(trifluoromethyl)-benzylbromid

Die beiden Uracil-Derivate werden in 100 μl Acetonitril mit 25 μl 3,5-Bis(trifluoromethyl)-benzylbromid für 45 Minuten bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Der dabei entstehende Bromwasserstoff (HBr) wird durch Hinzugabe von 25 μl Triethylamin dem Reaktionsgleichgewicht entzogen. Das Reaktionsabfallprodukt Triethylammoniumbromid wird nach Abschluss der Derivatisierung durch Hinzutropfen von 100 μl Ethylacetat und anschließender Gabe von 900 μl Hexan zur Fällung gebracht. Um den gallertartigen Niederschlag abtrennen zu können, wird nach fünf Minuten eine Säulenaufarbeitung notwendig. Diese erfolgt mit Hilfe einer Pasteurpipette, die – eingerahmt von zwei Glaswollepfropfen – eine etwa drei Zentimeter dicke Schicht Sephadex LH20 enthält. Vor und nach der Probenaufgabe wird mit einem Milliliter Hexan gespült, das Eluat bis zur Trockne eingengt und wiederum in 100 μl Acetonitril aufgenommen.

Liegt nur eine geringe Matrixbelastung vor, so ist es möglich, statt des Triethylamin Kaliumcarbonat zu verwenden. Das durch das Auftreten des Bromwasserstoffs neben Kohlendioxid sich bildende Produkt Kaliumbromid kann dann leicht unter Auslassung der Säulenaufarbeitung nach dem Zentrifugieren abgetrennt werden.

8.4.1.6 Optimierung der gaschromatographischen Parameter

Als gaschromatographische Säule kam eine HT5-MS (25 m * 0,1 mm * 0,1 µm) zum Einsatz, die sich durch geringes, von Säulenbluten verursachtes Rauschen auszeichnete.

Optimale Trennschärfe bei ausreichender Abtrennung der Analyten von den interferierenden Bestandteilen des Ausgangsvolumens wurde bei folgendem GC-Ofentemperaturprogramm erreicht:

Die Temperatur steigt bei einer Trägergasgeschwindigkeit von 40 cm/s von einem Anfangswert von 40 °C mit einer Rate von 20 °C/min auf 300 °C, wo die Temperatur zehn Minuten verweilt, damit gegebenenfalls stark retardierende Verunreinigungen von der Säule entfernt werden.

Bei dem an den Gaschromatographen angeschlossenen Large-Volume-Injektor Optic 2 der Firma ATAS besteht die Möglichkeit, auch hier einen Temperaturanstieg zu programmieren. Folgende Standardeinstellungen wurden benutzt:

Die Temperatur steigt von einem Anfangswert von 40 °C mit einer Rate von 8 °C/s auf 300 °C, wo die Temperatur die restliche Zeit der Analyse verweilt. Alle Drucke (Anfangs-/Transfer- und Enddruck) liegen bei 1 bar, die Transferzeit beträgt eine halbe Minute. Die gleiche Zeit bleibt zu Beginn eines Analysengangs der Split geschlossen.

Der Vorteil eines temperaturprogrammierbaren Injektors liegt darin, dass die Analyse bei einer Injektor-Temperatur gestartet wird, die unterhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels liegt, so dass die injizierte Probe nicht explosionsartig sondern verhältnismäßig langsam verdampft. Diese Tatsache bewirkt, dass die Probe und damit

auch die Analyten in weitaus größerem Umfang auf die Säule gelangen, wo es aufgrund der ebenfalls unterhalb des Lösungsmittelsiedepunktes beheizten Säule durch den „Lösemittelleffekt“ zu einer Refokussierung kommt. Die Injektormethode muss soweit optimiert sein, dass die störenden Bestandteile der Probe, die meist einen höheren Siedepunkt haben, erst dann im Injektor verdampfen, wenn der Split wieder geöffnet ist.

8.4.1.7 Optimierung der massenspektrometrischen Parameter

Bei den DTFMB-Derivaten von 5-Fluoro- und 5-Chlorouracil handelt es sich um sehr instabile Moleküle, die bei Beschuss mit energiereichen Elektronen sehr stark fragmentieren, was eine Bestimmung im Spurenbereich erschwert. Untersuchungen im EI Full Scan belegen diese Aussage. Es wurde die Elektronenenergie im Bereich von 30 bis 70 eV variiert und mit den dazugehörigen relativen Flächenzahlen des Massenchromatogramms auf dem Molekülion in Relation gesetzt.

Elektronenenergie / eV	F (5-FU-DTFMB)	F (5-CIU-DTFMB)
30	72967	93723
40	132403	132328
50	88632	82800
60	59055	55899
70	25387	24356

Tab. 44: Abhängigkeit der relativen Flächenzahl von der Energie der Elektronen

Sehr gut veranschaulicht werden kann dieser Effekt in einem Graphen:

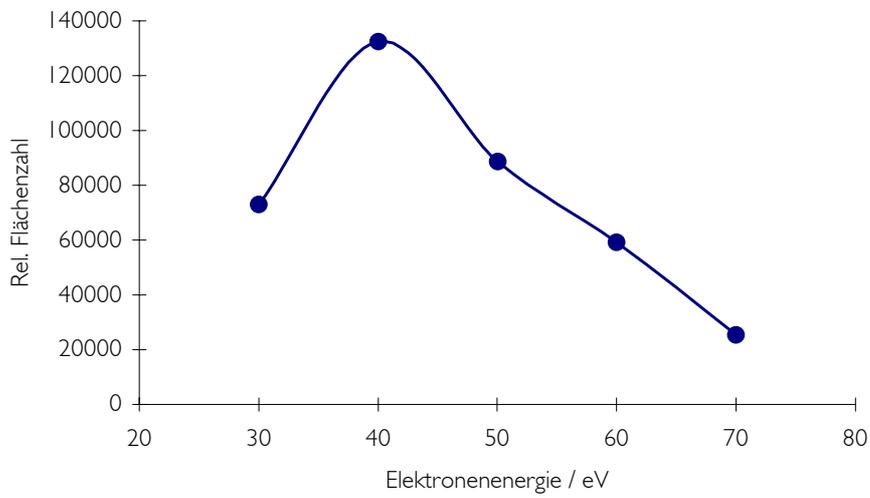


Abb. 39: Abhängigkeit der relativen Flächenzahl von 5-Fluorouracil von der Energie der Elektronen

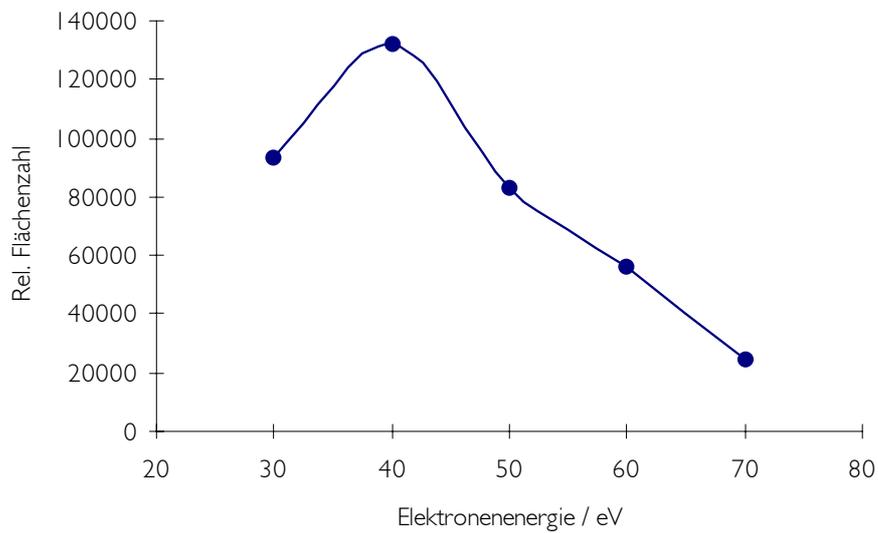


Abb. 40: Abhängigkeit der relativen Flächenzahl von 5-Chlorouracil von der Energie der Elektronen

Aber auch durch Reduzierung der Elektronenenergie war die Bestimmungsgrenze im EI Full Scan-Modus mit über 2 µg/l bei einem Ausgangsvolumen von 50 ml sehr schlecht. Auch die Anwendung der MS/MS-Technik brachte kaum eine Verbesserung.

Werden die Moleküle jedoch mit einer weichen Methode ionisiert – wie hier bei negativer chemischer Ionisierung -, so nimmt die Nachweisstärke sprunghaft zu. Als Reaktandgas wurde Methan bei einem Vordruck von 70 mTorr und dem Reinheitsgrad 4.5 verwendet. Die Elektronenenergie wurde auf 100 eV und der Emissionsstrom auf 350 mA hochgesetzt. Durch diese Veränderungen in der massenspektrometrischen Detektion war es nun möglich, eine Bestimmungsgrenze von 200 ng/l Oberflächenwasser oder 10 pg absolut zu erreichen. Hierbei wurde das dank dieser Ionisierungsmöglichkeit fast ausschließlich entstehende Ion mit der Masse 355 als Qualifier benutzt. Es entsteht durch Abspaltung eines DTFMB-Teils vom Molekülion.

Eine weitere Verbesserung versprach die MS/MS-Technik. Das zu über 90 % aus dem Molekülion entstandene Fragment mit dem m/z-Wert von 355 war als Vorläuferion prädestiniert. Die Optimierung der MS/MS-Parameter ergab die nachstehenden Ergebnisse:

Komponente	Speicherzeit	Dissoziationszeit	Stabilitätsfaktor q	Dissoziationsspannung	Vorläufer- / Qualifierion
5-FU	8ms	30ms	0,45	1,5V	355/213
5-CIU	8ms	20ms	0,225	1,5V	355/213

Tab. 45: Optimierte MS/MS-Parameter

Die hiermit mögliche Bestimmungsgrenze für 5-Fluorouracil liegt bei 20 ng/l Oberflächenwasser bzw. 1 pg absolut.

8.4.1.8 Diskussion der entwickelten Methode

Zusammenfassend kann folgende Analysenvorschrift formuliert werden:

Es werden 50 ml Probe in einer Flasche entsprechenden Volumens dreimal mit jeweils 50 ml Diethylether/iso-Propanol (4:1) 30 Minuten auf dem Flachbrett-Schüttler extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden bis zu Trockne eingengt und der Rückstand in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Durch Zugabe von 25 µl 3,5-Bis(trifluoromethyl)benzylbromid sowie der gleiche Menge an Triethylamin werden die Substanzen 45 Minuten bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht und in ihre DTFMB-Derivate überführt. Darauf folgend werden zuerst 100 µl Ethylacetat, dann 900 µl Hexan der Reaktionslösung hinzugefügt.

Sowohl das nach rund fünf Minuten als weiße Flocken ausfallende Triethylammoniumbromid als auch die vorhandenen Störbestandteile werden anschließend auf einer Sephadex LH20-Säule (3 cm Adsorbens in Pasteurpipette) zurückgehalten. Vor und nach der Probenaufgabe wird mit jeweils einem Milliliter Hexan eluiert. Die vereinigten organischen Fraktionen sind wiederum bis zur Trockne in einem Inertgasstrom einzuengen und anschließend erneut in 100 µl Acetonitril aufzunehmen.

1 µl dieser Lösung wird in den Gaschromatographen injiziert. Der Temperatur des Ofen startet bei 40 °C und steigt mit 20 °C/min auf 300 °C an. Im massenspektrometrischen Detektor wird mittels Methan als Reaktandgas negativ-chemisch ionisiert (Vordruck: 70 mTorr, Elektronenenergie: 100 eV, Emissionstrom: 350 mA). Die daran anschließende MS/MS-Analyse hat folgende Parameter:

Vorläuferion:	m/z 355 (5-FU)
	m/z 371 (5-CIU)
Qualifierion:	m/z 213
Speicherzeit:	8 ms (5-FU)
	8 ms (5-CIU)
Dissoziationszeit:	30 ms (5-FU)
	20 ms (5-CIU)
Dissoziationsspannung:	1,5 V (5-FU)
	1,5 V (5-CIU)
Stabilitätsfaktor q:	0,45 (5-FU)
	0,225 (5-CIU)

Mit der vorliegenden Methode ist es nun möglich, Konzentrationen des Zytostatikums 5-Fluorouracil im unteren ng/l-Bereich im Oberflächenwasser zu bestimmen. In der folgenden Tabelle sind noch einmal die Bestimmungsgrenzen für 5-Fluorouracil der verschiedenen massenspektrometrischen Meßmethoden aufgeführt:

Methode	BG in pg abs.	BG in ng/l
EI - Full Scan	>100	>2000
EI - MS/MS	100	2000
NCI - FS	10	200
NCI - MS/MS	1	20

Tab. 59: Vergleich der Bestimmungsgrenzen für 5-Fluorouracil bezüglich der verschiedenen massenspektrometrischen Messmethoden

Der gewählte interne Standard 5-Chlorouracil lässt sich in ähnlich niedrigen Konzentrationen in dieser Matrix nachweisen. Versuche, eine Kalibrierung dieser Methode durchzuführen, schlugen fehl. Die Korrelationsfaktoren r waren stets kleiner als 0,9. Es ist also davon auszugehen, dass die relative Standardabweichung von 5-Chlorouracil beträchtlich ist (+-200 % [Noz94]). Es empfiehlt sich die Verwendung eines isotopenmarkierten Standards wie z.B. des (1,3-¹⁵N)-5-Fluorouracil, was allerdings mit erheblichem Aufwand und/oder Kosten verbunden ist.

8.4.2 Arbeitsanweisung

8.4.2.1 Bestimmung von 5-Fluorouracil in Oberflächenwasser mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion und GC-MS/MS

I

Probe: 50 ml Oberflächenwasser

Interner Standard: 5-Chlorouracil

I i Anreicherung

Extraktion: Dreimalige Extraktion mit 50 ml Diethylether/iso-Propanol (4:1).

Einengen: Vereinigte organische Phasen im schwachen Inertgasstrom bis zur Trockne einengen.

I ii Derivatisierung

Rückstand in 100 µl Acetonitril aufnehmen, je 25 µl 3,5-Bis(trifluoromethyl)benzylbromid und Triethylamin zugeben, Reaktion bei Raumtemperatur für 45 Minuten.

Ausfällung: Mit 100 µl EtOAC und 900 µl Hexan versetzen, nach ca. 5 Minuten Fällung des Triethylammoniumbromids.

Aufreinigung: Elution einer Sephadex LH20-Säule (3 cm Adsorbens in Pasteur-Pipette) mit 1 ml Hexan, Probenaufgabe, Spülen mit 1 ml Hexan, Aufnahme der organischen Phasen.

Einengen: Vereinigte organische Phasen im schwachen Inertgasstrom bis zur Trockne einengen, Rückstand in 100 µl Acetonitril aufnehmen.

I iii Gaschromatographische Trennung

Probenaufgabe: 1 µl Probe, 60 s splitless

Trennsäule: Kapillartrennsäule (DB-5-MS; Länge 25 m; 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke)

Trärgas: Helium 5.0, Flussgeschwindigkeit 40 cm/s

GC-Ofen: 40 °C (1 min), 20 °C/min, 300 °C

Injektor-Ofen: 70 °C, 7 °C/s, 300 °C

I iv Massenspektrometrische Bestimmung

Ionisierung: NCI

Reaktandgas: Methan 4.5

Vordruck: 70 mTorr

Elektronenenergie: 100 eV

Emissionsstrom: 350 mA

Vorläuferion: m/z = 355 (5-FU), 371(5-CIU)

Qualifierion: m/z = 213

Speicherzeit: 8 ms

Dissoziationszeit: 30 ms (5-FU), 20 ms (5-CIU)

Stabilitätsfaktor: q = 0,45 (5-FU), 0,225 (5-CIU)

Dissoziationsspannung: 1,5 V

Temperatur Ionenquelle: 200 °C

Temperatur Transferline: 300 °C

Wiederfindungsrate: Rs = 60 – 80 %

I v Bestimmungsgrenze

5-Fluorouracil: 20 ng/l Oberflächenwasser

8.5 Bestimmung des Dampfdrucks pulverförmig vorliegender Substanzen

Im Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG bzw. der OECD Guideline 104 for the Testing of Chemicals werden die anerkannten und validierten Methoden zur Dampfdruckbestimmung von Feststoffen und Flüssigkeiten aufgelistet und beschrieben. Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens wurden die vorgestellten Messwerte im Einklang mit diesen Richtlinien mittels „Dampfdruckwaage“ bzw. „effusion method: vapor pressure balance“ ermittelt [HR59].

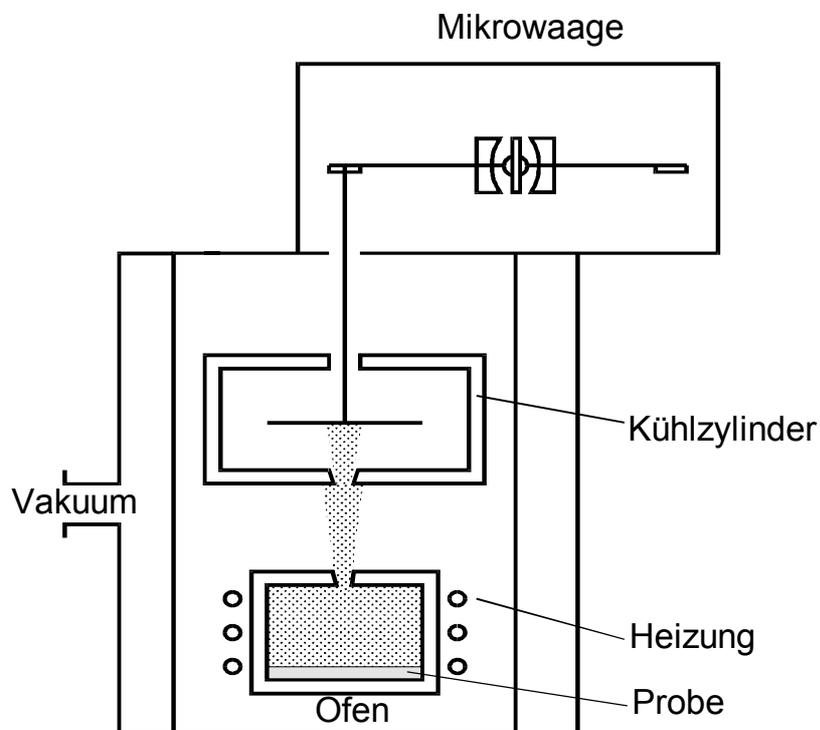


Abb. 41: Funktionsprinzip einer Dampfdruckwaage

Abbildung 41 skizziert den Versuchsaufbau. Die zu vermessende Substanz wird in einem „Ofen“ auf die Bestimmungstemperatur aufgeheizt und diese Temperatur gehalten. In dem Ofenraum stellt sich dann die Sättigungskonzentration ein. Durch eine enge kreisförmige Öffnung des Ofens strömen Gasmoleküle in das Hochvakuum aus. Der sich ausbildende Molekularstrahl trifft, durch eine Blende begrenzt, auf

die tiefgekühlte Waagschale einer Präzisionswaage und kondensiert dort. Durch Öffnen der Ofenblende wird die Waagschale durch den Impuls des Molekularstrahls um einen Betrag angehoben, der dem Dampfdruck der Substanz im Ofen proportional ist (Impulsmethode). Während der Öffnungszeit wird das Gewicht auf der Waagschale durch Kondensation des Dampfes laufend schwerer. Die Gewichtszunahme ist proportional zur Verdampfungsgeschwindigkeit (Kondensationsmethode). Mit Hilfe dieses Messverfahrens wird somit der Dampfdruck mit zwei physikalisch unabhängigen Effekten ermittelt.

Jedes Molekül gibt beim Auftreffen auf die Waagschale den Impuls ($m_x c \cos \alpha$) in senkrechter Richtung an den Waagenbalken ab. Nach Summation über alle abgegebenen Impulse, d.h. Integration über alle Geschwindigkeiten c , Polarwinkel α und Azimutwinkel φ , folgt für die Kraft K auf den Waagenbalken [HR59]:

$$K = \frac{qnm_x}{4\pi} \int_0^{\infty} f(c) c^2 dc \int_0^{\alpha_0} \cos^2 \alpha \sin \alpha d\alpha \int_0^{2\pi} d\varphi \quad (25)$$

bzw. nach Ausführen der Integration:

$$K = \frac{qnm_x \bar{c}^2}{6} (1 - \cos^3 \alpha_0) \quad (26)$$

Diese Kraft äußert sich in einer von der Waage angezeigten scheinbaren Masse m_i .

$$K = m_i g \quad (27)$$

Aus dem gaskinetischen Gesetz für den Dampfdruck p_d

$$p_d = \frac{nm_x \bar{c}^2}{3} \quad (28)$$

folgt durch Einsetzen

$$p_d = \frac{2 g m_i}{q (1 - \cos^3 \alpha_0)} \quad (29)$$

Zur experimentellen Bestimmung des Dampfdruckes von pulverförmigen Zytostatika wurden folgende Geräte eingesetzt:

Dampfdruckwaage Netzsch, Typ 433

Combivac IT 230, Druckmessung der Dampfdruckwaage

Trivac B, Typ D 25 B, Vakuum-Ölpumpe

Turbovac 450, Turbo-Molekularpumpe

Netzsch Temperatur-Steuersystem 410 zur Dampfdruckwaage

Der relative Fehler der Messwerte hängt davon ab, wie genau die Gerätekonstanten q und α_0 sowie die Temperatur T , die scheinbare Masse m_i und die Massenänderung bestimmt werden können. Der absolute Fehler zur Bestimmung der Temperatur liegt bei ± 2 °C, die Fehler der Messgrößen m_i und deren zeitliche Änderung können durch Mittelwertbildung aus 5 bis 10 Messungen unter ± 1 % gehalten werden. Die Querschnittsfläche der Austrittsblende kann durch optische Vermessung auf ± 1 % genau bestimmt werden. Der Winkel α_0 wird aus dem Radius der Begrenzungsblende und ihrem Abstand zur Austrittsblende bestimmt. Bei einer Genauigkeit von $\pm 0,3$ % für beide Werte hat der relative Fehler des Ausdrucks $(1 - \cos^3 \alpha_0)$ den Wert von ± 4 %.

Setzt man diese Werte in die Formeln zur Bestimmung des Dampfdruckes aus dem Impuls ein, liegt der relative Fehler rechnerisch bei dem o.g. Meßsystem bei $\pm 4,2$ % (bzw. $\pm 6,5$ % bei der Kondensationsmethode). In der Praxis stellt man jedoch eine Abweichung von bis zu $+10$ % gegenüber den Werten aus der kondensationsratenabhängigen Bestimmung fest. Dies wird auf die Reflexion von Molekülen an der Waagschale zurückgeführt. Bei einem merklichen Anstieg des Anteils der reflektierten Moleküle kann die Kondensation nicht mehr als vollständig betrachtet werden. Dies äußert sich durch eine Vergrößerung des aus m_i bestimmten Dampfdruckes bei

gleichzeitiger Verkleinerung des aus $\Delta m/\Delta t$ bestimmten Wertes. Eine Differenz dieser Werte von $> 10\%$ zeigt eine unzulässige Erwärmung der Waagschale an.

Die hier vorgestellten Messwerte basieren auf der Impulsmethode und weichen von der Kondensationsmethode weniger als 10% ab. Die oben genannten relativen Fehler liegen innerhalb der Ausdehnung der eingezeichneten Messpunkte und sind deshalb nicht erkennbar.

8.6 Probenahme von Realproben

8.6.1 Probenahme von Oberflächenwasser und Abwasser

Die Probenahme erfolgte in Anlehnung an DIN 38402/A 15 „Probenahme aus Fließgewässern“ und DIN 38402/A11 „Probenahme von Abwasser“.

Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens wurden Einzelprobenahmen vom Fachpersonal der jeweils zuständigen staatlichen Umweltämter durchgeführt.

8.6.2 Probenahme von Klärschlamm

Die Probenahme erfolgte in Anlehnung an DIN 38414/S1 „Probenahme von Schlämmen“ bzw. DIN EN ISO 5667-13 „Anleitung zur Probenahme von Schlämmen aus Abwasserbehandlungs- und Wasseraufbereitungsanlagen“.

Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens wurden Einzelprobenahmen vom Fachpersonal der jeweils zuständigen staatlichen Umweltämter durchgeführt.

8.6.3 Probenahme von Luft

Die Probenahme erfolgte in Anlehnung an VDI 2066 bzw. VDI 4200 „Emissionsmessungen an geführten Quellen“ und VDI 4300 „Messungen von Innenraumluftverunreinigungen“.

Im Rahmen des Untersuchungsvorhabens wurde ein Probenahmezug verwendet, der die zeitgleiche Erfassung von partikel- und gasförmig vorliegenden Zytostatika in der Abluft und der Raumluft von Zubereitungsräumen ermöglicht.

Das Probenahmesystem besteht aus den Komponenten Probenahmesonde, Partikelfilter (Glasfaserfilter mit einem Abscheidegrad von 99,99 %), Kryofalle (Waschflasche, deren unterer Teil rundum von Kältemittel umgeben ist, Aceton/Trockeneis, - 78 °C), Adsorptionsmittel (XAD-2) sowie Pumpe mit Gasuhr und Thermometer (s. Abb. 42).

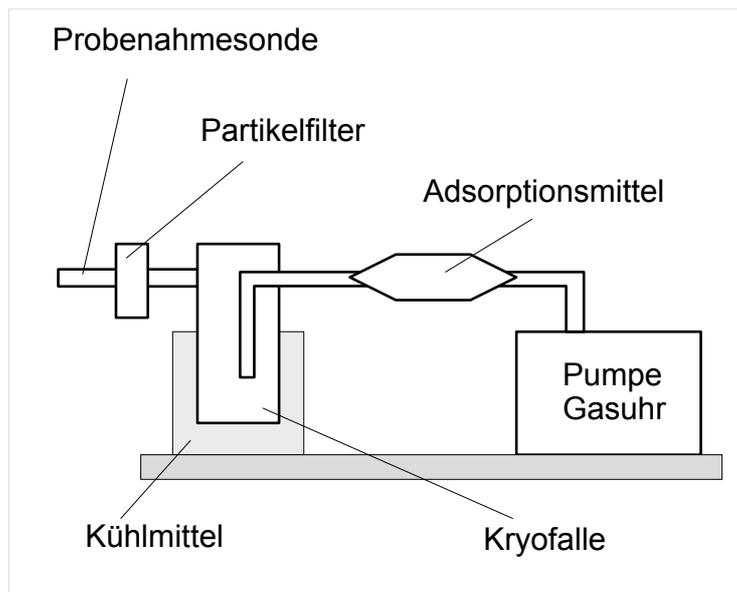
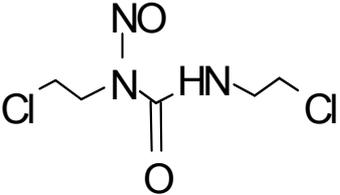
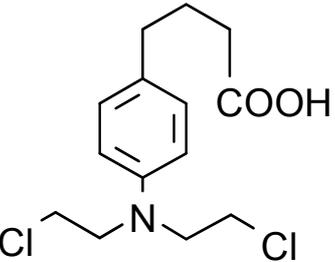
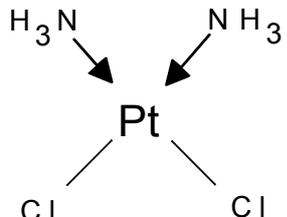
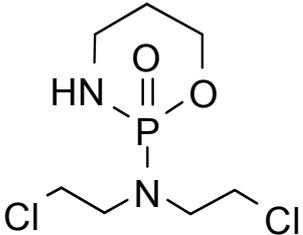
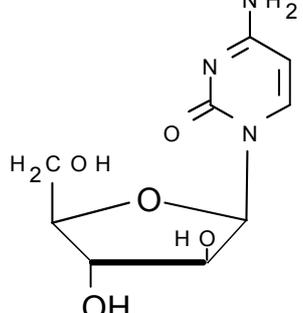
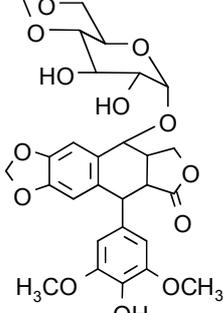
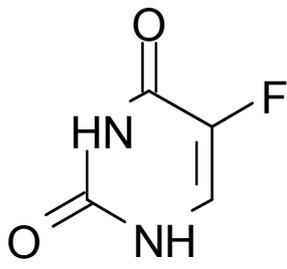
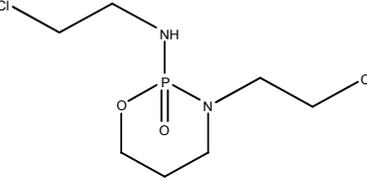
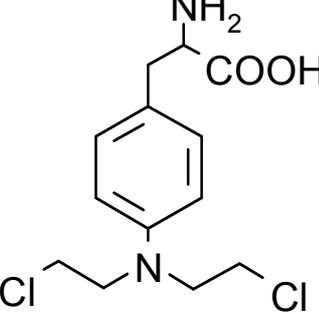
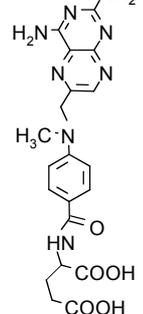
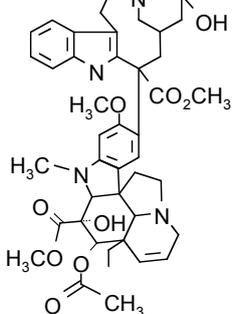


Abb. 42: Prinzipskizze des Probenahmezugs

Während der Probenahme werden zeitgleich Partikel auf dem Partikelfilter und leichtflüchtige Komponenten hauptsächlich in der Kryofalle gesammelt. Die Aufbereitung von Partikelfilter, Kondensat der Kryofalle und Adsorptionsmittel erfolgt im Labor. Analysemethoden für Arzneimittel, die gas- und partikelförmig in der Atmosphäre bzw. Raumluft vorkommen, existieren derzeit für das Zytostatikum Cyclophosphamid.

Aus den analytisch bestimmten Zytostatikamengen und dem durchgesaugten Luftvolumen erfolgte die Berechnung der mittleren Konzentration von partikel- bzw. gasförmig vorliegendem Cyclophosphamid an den verschiedenen Probenahmeorten. Die Messwerte gelten unter der Annahme einer quantitativen Erfassung der gesamten im Luftstrom enthaltenen Substanzmenge (Annahme: Wiederfindungsrate = 100 %).

8.7 Struktur der untersuchten Zytostatika

<p>Carmustin</p> 	<p>Chlorambucil</p> 	<p>Cisplatin</p> 
<p>Cyclophosphamid</p> 	<p>Cytarabin</p> 	<p>Etoposid</p> 
<p>5-Fluorouracil</p> 	<p>Ifosfamid</p> 	<p>Melphalan</p> 
<p>Methotrexat</p> 	<p>Vinblastin</p> 	

8.8 Zusammenstellung der Daten ausgewählter Zytostatika zum Verhalten in der Umwelt

Carmustin

Verhalten im Wasser: Carmustin ist wasserlöslich mit einem Wert von ca. 5 g/l. Ausgehend von dem berechneten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW} = 1,8$ und dem Bodenadsorptions-Koeffizienten $K_{OC} = 28,6$ adsorbiert Carmustin nicht an Schwebstoffen und Sediment im Wasser. Aus der Wasserlöslichkeit und dem gemessenen Dampfdruck folgt eine Henry-Konstante von $3,3 \times 10^{-7}$. Carmustin zählt somit zu den schwerflüchtigen Substanzen aus Oberflächengewässern. In der Modellkläranlage wurde Carmustin im Bewertungszeitraum von 21 Tagen abgebaut. Es wurden keine Metaboliten nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Ausgehend von einer experimentell bestimmten Wasserlöslichkeit von 5000 mg/l und einem daraus berechneten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} = 28,6$ besitzt Carmustin eine große Mobilität im Boden. Die aus dem gemessenen Dampfdruck berechnete Henry-Konstante hat einen Wert von $3,3 \times 10^{-7}$. Carmustin gehört damit zu den schwerflüchtigen Substanzen aus feuchtem Boden. Das Verdampfen aus trockenem Boden ist jedoch bei einem gemessenen Dampfdruck von 0,019 Pa nicht auszuschließen, insbesondere bei der Bildung von Aerosolen.

Verhalten in der Atmosphäre: Der gemessene Dampfdruck von Carmustin beträgt 0,019 Pa bei 20 °C. Daraus resultiert eine berechnete Verdampfungszeit für ein 10 µm großes Aerosolpartikel von 1200 Sekunden. Partikelförmiges Carmustin sollte, wie allgemein üblich bei Aerosolen, durch trockene und feuchte Deposition aus der Atmosphäre entfernt werden. Zum Verhalten von gasförmig vorliegendem Carmustin liegen keine Untersuchungen vor.

Bioakkumulation: Ein BCF-Wert von 3,2 wurde für Carmustin auf der Basis eines Octanol-Wasser-Koeffizienten von $\log P_{OW} = 1,82$ berechnet. Dieser BCF-Wert zeigt, dass eine Bioakkumulation in aquatischen Organismen nicht zu erwarten ist.

Chlorambucil

Verhalten im Wasser: Chlorambucil ist praktisch nicht löslich in Wasser. Bei einer Temperatur von 25 °C wurde eine Hydrolyserate von 0,4 pro Stunde experimentell ermittelt; dies entspricht einer Halbwertszeit von 1,7 Stunden bei einem pH-Wert von 7 [Eil88]. Hydrolyse ist damit der dominierende Prozess in Gewässern. Eine Abschätzung mittels Molekülkrementen liefert eine Henry-Konstante von $1,1 \times 10^{-8}$ [MH91]. Diese kleine Henry-Konstante lässt kein Verdampfen des schwerflüchtigen Chlorambucils aus Oberflächenwässern erwarten. In der Modellkläranlage erreichte Chlorambucil im Bewertungszeitraum von 21 Tagen nicht die Einstufung als abbaubar. Es wurden die Metaboliten Mono- und Dihydroxy-Chlorambucil nachgewiesen sowie ein nicht identifizierter Metabolit. Über die ökotoxikologischen Eigenschaften der Abbauprodukte liegen keine Daten vor.

Verhalten im Boden: Der Bodenadsorptions-Koeffizient K_{OC} von Chlorambucil hat einen berechneten Wert von 150 ausgehend von einem gemessenen Octanol-Wasser-Koeffizienten von $\log P_{OW} = 1,47$. Damit besitzt Chlorambucil eine hohe Mobilität im Boden. Das Adsorptionsverhalten der Säure Chlorambucil (Dissoziations-Konstante $pK_a = 5,75$) ist abhängig vom pH-Wert [Han95]. Die nicht dissoziierte Spezies einer Säure adsorbiert üblicherweise stärker als das Anion und daher sollte die Adsorption deutlich abnehmen bei ungefähr 1 bis 1,5 Einheiten über dem pK_a -Wert. Chlorambucil hat eine gemessene Halbwertszeit aufgrund von Hydrolyse von 1,7 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C und einem pH-Wert von 7 [Eil88]. Dies lässt darauf schließen, dass die Substanz im feuchten Boden schnell hydrolysiert.

Verhalten in der Atmosphäre: Ein geschätzter Dampfdruck von 0,00012 Pa bei 25 °C zeigt an, dass Chlorambucil gas- und partikelförmig unter normalen atmosphärischen Bedingungen existiert [Bid88, Lym85]. Die Reaktionsrate von gasförmigen Chlorambucil mit photochemisch produzierten Hydroxylradikalen wurde abgeschätzt zu $1,9 \times 10^{-10} \text{ cm}^3/\text{Moleküle s}$ bei 25 °C, entsprechend einer Halbwertszeit in der Atmosphäre von ca. 2 Stunden [MH93]. Partikelförmiges Chlorambucil wird durch trockene und feuchte Deposition aus der Atmosphäre entfernt.

Bioakkumulation: Ein BCF-Wert von 8 wurde für Chlorambucil auf der Basis eines gemessenen Octanol-Wasser-Koeffizienten von $\log P_{OW} = 1,47$ berechnet [Han95, Lym90]. Dieser BCF-Wert zeigt, dass eine Bioakkumulation in aquatischen Organismen nicht erfolgt. Dafür spricht auch die Halbwertszeit der Hydrolyse von 1,7 Stunden, die zu schnell ist für eine bedeutenden Bioakkumulation.

Cisplatin

Verhalten im Wasser: Aufgrund der Wasserlöslichkeit von 2530 mg/l verteilt sich Cisplatin in Gewässern. Ausgehend von dem berechneten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW} = 2,1$ und dem Bodenadsorptions-Koeffizienten $K_{OC} = 48,2$ adsorbiert Cisplatin nicht an Schwebstoffen und Sediment im Wasser. Die aus dem gemessenen Dampfdruck berechnete Henry-Konstante beträgt $8,8 \times 10^{-8}$. Cisplatin gehört damit zu den schwerflüchtigen Substanzen; das Verdampfen aus Wasseroberflächen ist damit vernachlässigbar [IARC26]. Cisplatin hydrolysiert sehr schnell. Die Produkte sind die eigentlich zytostatisch aktiven Stoffe.

Verhalten im Boden: Der aus der Wasserlöslichkeit berechnete Bodenadsorptions-Koeffizient K_{OC} von Cisplatin hat einen Wert von 48,2. Daher sollte Cisplatin aus dem Boden ausgewaschen werden bis es umgewandelt wird in Salze (z.B. Platinhydroxid, Platinmonosulfid) oder in Ionen durch biotische und abiotische Reaktionen. Das Eindringen der Ionen in den Boden wird durch Adsorptionsprozesse verzögert. [ASK82].

Verhalten in der Atmosphäre: Der gemessene Dampfdruck von Cisplatin beträgt 0,0018 Pa bei 20 °C. Daraus resultiert eine berechnete Verdampfungszeit für ein 10 µm großes Aerosolpartikel von $1,1 \times 10^4$ Sekunden. Partikelförmiges Cisplatin sollte, wie allgemein üblich bei Aerosolen, durch trockene und feuchte Deposition aus der Atmosphäre entfernt werden. Zum Verhalten von gasförmig vorliegendem Cisplatin liegen keine Untersuchungen vor.

Bioakkumulation: Der aus der Wasserlöslichkeit berechnete Biokonzentrationsfaktor BCF beträgt 5,4. Eine Bioakkumulation in aquatischen Organismen erfolgt somit nicht.

Cyclophosphamid

Verhalten im Wasser: Ausgehend von einem experimentell bestimmten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von $\log P_{OW} = 0,63$ und einem daraus berechneten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} = 52$ adsorbiert Cyclophosphamid nicht an Schwebstoffen oder Sediment im Wasser. Die kleine Henry-Konstante zeigt, dass Cyclophosphamid nicht aus Wasseroberflächen verdampft. Cyclophosphamid besitzt eine Hydrolyserate von $7,1 \times 10^{-4}$ pro Stunde entsprechend einer Halbwertszeit von 41 Tagen [Ell89]. In der Modellkläranlage erreichte Cyclophosphamid im Bewertungszeitraum von 21 Tagen nicht die Einstufung als abbaubar. Es wurden keine Metaboliten nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Ausgehend von einem experimentell bestimmten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von $\log P_{OW} = 0,63$ und einem daraus berechneten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} = 52$ besitzt Cyclophosphamid eine große Mobilität im Boden [Han87, Lym90]. Das Verdampfen von Cyclophosphamid aus feuchtem Boden ist aufgrund einer berechneten Henry-Konstanten von $8,8 \times 10^{-9}$ vernachlässigbar. Verdampfen aus trockenem Boden ist ebenfalls vernachlässigbar aufgrund eines aus Molekülkrementen geschätzten Dampfdrucks von 0,0058 Pa bei 25 °C [MH91, Lym85]. Dieser geschätzte Dampfdruck wurde durch Messungen im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsvorhabens bestätigt; 0,0033 Pa bei 20 °C und 0,0044 Pa bei 25 °C. Ungenügende Daten existieren zum biologischen Abbau von Cyclophosphamid im Boden. Cyclophosphamid hydrolysiert im feuchten Boden bei einer berechneten Halbwertszeit von 41 Tagen und einer experimentell ermittelten Rate der Hydrolyse von $7,1 \times 10^{-4}$ pro Stunde [Ell89].

Verhalten in der Atmosphäre: Ausgehend von einem Modell der Gas-Partikel-Verteilung von flüchtigen organischen Verbindungen in der Atmosphäre und unter Berücksichtigung eines geschätzten Dampfdrucks von 0,0058 Pa bei 25 °C existiert Cyclophosphamid in der Gas- und Partikelphase unter normalen atmosphärischen Bedingungen [Bid88]. Die Gasphase von Cyclophosphamid wird in der Atmosphäre abgebaut durch Reaktionen mit photochemisch produzierten Hydroxylradikalen; die geschätzte Halbwertszeit für diese Reaktionen beträgt ca. 5,5 Stunden [Mey93]. Der gemessene Dampfdruck von Cyclophosphamid beträgt 0,0033 Pa bei 20 °C. Daraus

resultiert eine berechnete Verdampfungszeit für ein 10 µm großes Aerosolpartikel von 4400 Sekunden. Partikelförmiges Cyclophosphamid wird durch trockene und nasse Deposition aus der Atmosphäre entfernt.

Bioakkumulation: Ein BCF-Wert von 1,8 wurde auf der Basis eines experimentell ermittelten Octanol-Wasser-Koeffizienten von $\log P_{OW} = 0,63$ berechnet. Dieser BCF-Wert zeigt, dass eine Bioakkumulation nicht erfolgt [Han87].

Cytarabin

Verhalten im Wasser: Cytarabin ist sehr gut wasserlöslich mit einem Wert von ca. 200000 mg/l [Oso80]. Ausgehend von einem experimentell bestimmten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von $\log P_{OW} = -2,18$ und einem daraus geschätzten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} < 1$ adsorbiert Cytarabin nicht an Schwebstoffen oder Sediment im Wasser. In der Modellkläranlage erreichte Cytarabin im Bewertungszeitraum von 21 Tagen nicht die Einstufung als abbaubar. Es wurden keine Metaboliten nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Ausgehend von einem experimentell bestimmten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von $\log P_{OW} = -2,18$ und einem daraus abgeschätzten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} < 1$ besitzt Cytarabin eine große Mobilität im Boden [San94].

Verhalten in der Atmosphäre: Zur Beurteilung des Verhaltens von Cytarabin in der Atmosphäre liegen keine ausreichenden Daten vor.

Bioakkumulation: Ein BCF-Wert von < 1 wurde auf der Basis eines experimentell ermittelten Octanol-Wasser-Koeffizienten berechnet. Dieser BCF-Wert zeigt, dass eine Bioakkumulation nicht erfolgt.

Etoposid

Verhalten im Wasser: Etoposid besitzt eine Wasserlöslichkeit von 80 mg/l [Mce92]. Ausgehend von dem berechneten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$

= 3,2 und dem Bodenadsorptions-Koeffizienten $K_{OC} = 681,2$ adsorbiert Etoposid an Schwebstoffen und Sediment im Wasser. Die aus Wasserlöslichkeit und Dampfdruck berechnete Henry-Konstante beträgt $7,9 \times 10^{-6}$. Etoposid zählt daher zu den schwer- bis mittelflüchtigen Substanzen aus Oberflächengewässern. In der Modellkläranlage erreichte Etoposid im Bewertungszeitraum von 21 Tagen nicht die Einstufung als abbaubar. Es wurden keine Metaboliten nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Der Bodenadsorptions-Koeffizient K_{OC} von Etoposid hat einen berechneten Wert von 681,2. Damit besitzt Etoposid eine geringe Mobilität im Boden. Die Verdampfung von Etoposid aus feuchten Boden ist aufgrund der berechneten Henry-Konstanten von $7,9 \times 10^{-6}$ vernachlässigbar.

Verhalten in der Atmosphäre: Der gemessene Dampfdruck von Etoposid beträgt 0,0026 Pa bei 20 °C. Daraus resultiert eine berechnete Verdampfungszeit für ein 10 µm großes Aerosolpartikel von 5100 Sekunden. Partikelförmiges Etoposid sollte, wie allgemein üblich bei Aerosolen, durch trockene und feuchte Deposition aus der Atmosphäre entfernt werden. Zum Verhalten von gasförmig vorliegendem Etoposid liegen keine Untersuchungen vor.

Bioakkumulation: Ein BCF-Wert von 78,5 wurde auf der Basis der Wasserlöslichkeit berechnet. Dieser BCF-Wert zeigt, dass Etoposid potentiell bioakkumulierend ist.

Fluorouracil

Verhalten im Wasser: Die Wasserlöslichkeit von Fluorouracil beträgt ca. 12500 mg/l [OH75]. Ausgehend von einem berechneten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} = 14,2$ adsorbiert Fluorouracil nicht an Schwebstoffen oder Sediment im Wasser. Aufgrund der kleinen Henry-Konstante kann Fluorouracil zu den schwerflüchtigen Substanzen gezählt werden, das Verdampfen aus Wasseroberflächen ist damit vernachlässigbar. In der Modellkläranlage erreichte Fluorouracil für geringe Konzentrationen im Bewertungszeitraum von 21 Tagen nicht die Einstufung als abbaubar. Es wurden keine Metaboliten nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Ausgehend von einem aus der Wasserlöslichkeit berechneten Bodenadsorptions-Koeffizienten von $K_{OC} = 14,2$ besitzt Fluorouracil eine große Mobilität im Boden. Das Verdampfen von Fluorouracil aus feuchtem Boden ist aufgrund einer berechneten Henry-Konstanten von $6,0 \times 10^{-9}$ vernachlässigbar.

Verhalten in der Atmosphäre: Der gemessene Dampfdruck von Fluorouracil beträgt 0,0014 Pa bei 20 °C. Daraus resultiert eine berechnete Verdampfungszeit für ein 10 µm großes Aerosolpartikel von $2,1 \times 10^4$ Sekunden. Partikelförmiges Fluorouracil sollte, wie allgemein üblich bei Aerosolen, durch trockene und feuchte Deposition aus der Atmosphäre entfernt werden. Zum Verhalten von gasförmig vorliegendem Fluorouracil liegen keine Untersuchungen vor.

Bioakkumulation: Ein BCF-Wert von 1,6 wurde auf der Basis der Wasserlöslichkeit berechnet, eine Bioakkumulation erfolgt somit nicht.

Melphalan

Verhalten im Wasser: Melphalan besitzt eine Wasserlöslichkeit von ca. 11000 mg/l. Aufgrund des geschätzten Bodenadsorptions-Koeffizienten K_{OC} von 355 adsorbiert Melphalan an Schwebstoffen und Sedimenten im Wasser. Das Verdampfen aus Wasseroberflächen ist bei der geschätzten kleinen Henry-Konstanten vernachlässigbar. Es wurde eine Hydrolyserate von 0,15 pro Stunde bei einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 25 °C experimentell ermittelt, entsprechend einer Halbwertszeit von 4,6 Stunden [Eil88]. In der Modellkläranlage wurde Melphalan im Bewertungszeitraum von 21 Tagen abgebaut. Es wurden die Metaboliten Mono- und Dihydroxy-Melphalan nachgewiesen. Es liegen keine weiteren Daten zu den Metaboliten vor.

Verhalten im Boden: Der Bodenadsorptions-Koeffizient K_{OC} von Melphalan hat einen berechneten Wert von 355 [Swa83]. Damit besitzt Melphalan eine mäßige Mobilität im Boden. Die Verdampfung von Melphalan aus feuchten Boden ist aufgrund der geschätzten Henry-Konstante von $1,7 \times 10^{-11}$ unbedeutend [MH93], ebenso wie das Verdampfen aus trockenem Boden aufgrund des geschätzten Dampfdrucks von 4×10^{-8} Pa [Lym85]. Hydrolyse in feuchtem Boden ist ein bedeutender Faktor zum Abbau von Melphalan. Es wurde eine Hydrolyserate von 0,15 pro Stunde bei einem

pH-Wert von 7 experimentell ermittelt, entsprechend einer Halbwertszeit von 4,6 Stunden [Eil88].

Verhalten in der Atmosphäre: Ausgehend von einem Modell der Gas-Partikel-Verteilung von flüchtigen organischen Verbindungen in der Atmosphäre und unter Berücksichtigung eines geschätzten Dampfdrucks von 4×10^{-8} Pa bei 25 °C existiert Melphalan fast ausschließlich in der Partikelphase unter normalen atmosphärischen Bedingungen [Bid88, Lym85]. Die Gasphase von Melphalan wird in der Atmosphäre abgebaut durch Reaktionen mit photochemisch produzierten Hydroxylradikalen; die geschätzte Halbwertszeit für diese Reaktionen beträgt ca. 1,7 Stunden [MH93]. Partikelförmiges Melphalan wird durch trockene und nasse Deposition aus der Atmosphäre entfernt.

Bioakkumulation: Ein Bioakkumulationsfaktor von $BCF = 0,24$ wurde für Melphalan auf der Basis eines gemessenen Octanol-Wasserkoeffizienten von $\log P_{OW} = -0,52$ berechnet [Lym90, Sel90]. Dieser BCF-Wert zeigt, dass eine Bioakkumulation in aquatischen Organismen nicht erfolgt.

Methotrexat

Verhalten im Wasser: Methotrexat ist praktisch unlöslich in Wasser [Mce93]. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{OW}$ kann somit nicht direkt berechnet werden. Werden hier die Werte des ebenfalls unlöslichen Chlorambucils und des nur gering wasserlöslichen Etoposids herangezogen, wird ein $\log P_{OW}$ von 1,5 bis größer 3 für Methotrexat erwartet. In der Modellkläranlage wurde Methotrexat im Bewertungszeitraum von 21 Tagen abgebaut. Es wurde der zytostatisch aktive Metabolit 7-Hydroxy-Methotrexat nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Der Bodenadsorptions-Koeffizient K_{OC} ist aufgrund der praktischen Unlöslichkeit von Methotrexat in Wasser nicht mit den oben beschriebenen Gleichungen zu berechnen. Werden hier die Werte des ebenfalls unlöslichen Chlorambucils und des nur gering wasserlöslichen Etoposids herangezogen, wird ein K_{OC} von 150 bis ca. 700 erwartet. Dies entspricht einer mäßigen bis geringen Mobilität im Boden. Über das Verdampfungsverhalten von Methotrexat aus feuchtem oder tro-

ckenem Boden kann aufgrund fehlender Daten zum Dampfdruck und der Henry-Konstanten keine Aussage gemacht werden.

Verhalten in der Atmosphäre: Zum Verhalten von Methotrexat in der Atmosphäre liegen keine Daten vor.

Bioakkumulation: Aufgrund der Unlöslichkeit von Methotrexat in Wasser besteht prinzipiell die Tendenz zur Bioakkumulation. 7-Hydroxy-Methotrexat ist deutlich unpolarer, so dass die Tendenz zur Bioakkumulation größer ist.

Vinblastin

Verhalten im Wasser: Vinblastin ist praktisch unlöslich in Wasser [Bud89]. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{OW}$ kann somit nicht direkt berechnet werden. Werden hier die Werte des ebenfalls unlöslichen Chlorambucils und des nur gering wasserlöslichen Etoposids herangezogen, wird ein $\log P_{OW}$ von 1,5 bis größer 3 für Vinblastin erwartet. In der Modellkläranlage wurde Vinblastin im Bewertungszeitraum von 21 Tagen abgebaut. Es wurden keine Metaboliten nachgewiesen.

Verhalten im Boden: Der Bodenadsorptions-Koeffizient K_{OC} ist aufgrund der praktischen Unlöslichkeit von Vinblastin in Wasser nicht mit den oben beschriebenen Gleichungen zu berechnen. Werden hier die Werte des ebenfalls unlöslichen Chlorambucils und des nur gering wasserlöslichen Etoposids herangezogen, wird ein K_{OC} von 150 bis ca. 700 erwartet. Dies entspricht einer mäßigen bis geringen Mobilität im Boden. Über das Verdampfungsverhalten von Vinblastin aus feuchtem oder trockenem Boden kann aufgrund fehlender Daten zum Dampfdruck und der Henry-Konstanten keine Aussage gemacht werden.

Verhalten in der Atmosphäre: Zum Verhalten von Vinblastin in der Atmosphäre liegen keine Daten vor.

Bioakkumulation: Aufgrund der Unlöslichkeit von Vinblastin in Wasser besteht prinzipiell die Tendenz zur Bioakkumulation.

Verwendete Abkürzungen

ACN	Acetonitril
ARAC	Cytarabin
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BCNU	Carmustin
BGBL	Bundesgesetzblatt
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
CCC	Counter Current Chromatographie
CDDP	Cisplatin
ChemG	Chemikaliengesetz
CLB	Chlorambucil
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CYCLO	Cyclophosphamid
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Dioden-Array-Detektor
DEV	Deutsche Einheitsverfahren
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	dissolved organic carbon
ECD	Electron capture detector
EN	Europäische Norm
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ERA	Environmental Risk Assessment
EU	Europäische Union
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
Flu	Fluoreszenz
Fp	Festpunkt
5-FU	Fluorouracil
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IARC	International Agency for Research on Cancer
IF	Ifosfamid

IR	Infrarot
ISO	International Organization for Standardisation
i.v.	Intravenös
LAS	Lineare Alkylbenzolsulfonate
LC	Flüssigchromatographie
LC ₅₀	lethal concentration
L-PAM	Melphalan
MAE	Microwave Assisted Extraction
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MKA	Modellkläranlage
MTX	Methotrexat
NOEC	no observed effect concentration
OAC	Ortsaufgelöste Chromatographie
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
7-OH-MTX	7-Hydroxy-Methotrexat
oTS	organische Trockensubstanz
p.a.	Zur Analyse
ppb	parts per billion 1:10 ⁹
ppm	parts per million 1:10 ⁶
RNS	Ribonukleinsäure
SMB	simulated moving bed
spe	solid phase extraction
TensV	Tensid-Verordnung
TOC	Total organic carbon
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
UBA	Umweltbundesamt
UV	Ultraviolett
US	Ultraschall
VLB	Vinblastin
VP16	Etoposid

Verwendete Formelzeichen

A	Abbaurrate
A_t	Abbaurrate zum Zeitpunkt t
A_S	Anreicherungsfaktor
\bar{c}	mittlere thermische Geschwindigkeit
C_0	Ausgangskonzentration der Substanz im Zulauf der Modellkläranlage
C_t	Substanzkonzentration zum Zeitpunkt t im Ablauf der Modellkläranlage
dd_P/dt	zeitliche Änderung des Partikeldurchmessers
d_p	Partikeldurchmesser
D_{AB}	Diffusionskoeffizient der Gasmoleküle von Stoff A in Gas B
k	Boltzmannkonstante
K	Kraft
m_x	Molekülmasse
M_m	molare Masse
$M_{m,A}$	molare Masse der Substanz A, hier Partikelmaterial
$M_{m,B}$	molare Masse der Substanz B, hier Luft
n	Anzahl Moleküle pro Volumeneinheit
N_A	Avogadrokonstante
p_d	Dampfdruck
$p_{d,P}$	Dampfdruck an der Partikeloberfläche
p_B	Luftdruck
p_G	Partialdruck des bereits verdampften Partikelmaterials
q	Querschnittsfläche der Ofenöffnung
R	allgemeine Gaskonstante
R_s	Wiederfindungsrate
r	Verdampfungsenthalpie
t	Zeit
t_R	Retentionszeit
T	Temperatur
T_G	Umgebungstemperatur
T_P	Temperatur an der Partikeloberfläche
α_0	halber Öffnungswinkel des Molekularstrahls
ρ_P	Dichte des Partikelmaterials
ρ_S	Sättigungskonzentration
σ_{AA}	Moleküldurchmesser der Sorte A, hier Partikelmaterial
σ_{BB}	Moleküldurchmesser der Sorte B, hier „Luft“

Literaturverzeichnis

- [AB89] Aherne GW, Briggs R: The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment, *Journal of Pharmaceuicals and Pharmacology* 41: 735-736, 1989
- [ADKA94] ADKA-Ausschuß für Klinische Pharmazie. Antineoplastische Chemotherapie. Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart, 1994
- [AH81] Ahmed A E, Hsu T: Quantitative analysis of Melphalan and its major hydrolysate in patients and animals by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 222, 453-460, 1981
- [AHN90] Aherne GW, Hardcastle A, Nield AH: Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology* 42: 741-742, 1990
- [APB95] Albertioni F, Petterson B, Beck O, Rask C, Seidemann P, Peterson C: Simultaneous quantitation of Methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid-phase extraction procedure using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. 665 (1): 163-170, 1995
- [ASK82] Amundsen AR, Stern EW, Kirk-Othmer: *Encycl Chem Tech* 3rd ed. Grayson M (Ed), John Wiley & Sons 18: 254-77 (1982)
- [AT95] J. Ashby, H. Tinwell: Activity of Etoposide in mouse bone marrow micronucleus test: independence of route of exposure. *Mutation Res.*, 328, 243-244, (1995)
- [CVMP/055/96] EU note for guidance EMEA/CVMP/055/96: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products.
- [BAB82] Bergsagel, D.E., Alison, R.E., Bean, H.A., Brown, T.C., Bush, R.S., Clark, R.M., Chera, T., Dalley, D., DeBoer, G., Gospadarowicz, M., Hasselback, R., Perrault, D. & Rideout, D.F. (1982) Results of treating Hodgkin's disease without a policy of laparotomy staging. *Cancer Treat. Rep.*, 66, 717-731
- [Bar78] Barker PE (1978), *Applied Science* 1: 41-50
- [Bau91] Baumann U.: Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung ökologisch relevanter Daten, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* **24** (1991) 237-241
- [BBP80]. Baccarani, M., Bosi, A., Papa, G. (1980) Second malignancy in patients treated for Hodgkin's disease. *Cancer*, 46, 1735-1740
- [BH95] Breidung R., Hager K.: *Innere Medizin systematisch*. 1. Aufl, Lorch Württemberg, Uni-Med-Verl., 1995.

- [BHD97] Beith J, Hartley J, Darling J, Souhami R.: DNA interstrand cross-linking and cytotoxicity induced by chloroethylnitrosoureas and cisplatin in human glioma cell lines which vary in cellular concentration of o-6-alkylguanine-dna alkyltransferase. *British Journal of Cancer*, 75(4), 500-505, 1997.
- [BHH97] Brown PD., Hoffmann T., Hansen OP., Boesen AM., Gronbaek K., Hippe E., Jensen MK., Thorling K., Storm HH., Pedersenbjergaard J.: Long-term survival and development of secondary malignancies in patients with acute myeloid leukemia treated with aclarubicin or daunorubicin plus cytosine arabinoside followed by intensive consolidation chemotherapy in a danish national phase iii trial. *Leukemia*.11(1):37-41, 1997 Jan.
- [BHL84] Boivin, J.F., Hutchison, G.B., Lyden, M., Godbold, J., Chorosh, J. & Schottenfeld, D. (1984) Second primary cancers following treatment of Hodgkin's disease. *J. natl Cancer Inst.*, 72, 233-241
- [Bid88] Bidleman TF: *Environ Sci Technol* 22: 361-367 (1988)
- [BKS90] Baumann U., Kuhn G., Schefer W.: Rasche Bestimmung des Bioabbaus organischer Stoffe in einem Labor-Tropfkörper, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* **23** (1990) 129-132
- [BL93] Bonato PS, Lanchote VL: A rapid procedure for the purification of biological samples to be analysed by High-performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 16(11), 2299-2308, 1993
- [Bla91] Blanchard J: Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography*, 226, 455-460, 1991
- [BLD83] Bartolucci, A.A., Liu, C., Durant, J.R. & Gams, R.A. Acute myelogenous leukemia as a second malignant neoplasm following the successful treatment of advanced Hodgkin's disease. *Cancer*, 52, 2209-2213, 1983
- [BLS82] Brusamolino, E., Lazzarino, M., Salvaneschi, L., Canevari, A., Morra, E., Castelli, G., Pagnucco, G., Isernia, P. & Bernasconi, C. (1982) Risk of leukemia in patients treated for Hodgkin's disease. *Eur. J. Cancer clin. Oncol.*, 18, 237-242
- [Bra96] Braun J.: *Klinikleitfaden innere Medizin. Untersuchung, Diagnostik, Therapie*. 6. Auflage, Lübeck, Fischer, 1996.
- [BS93] Bokemeyer C, Schmoll HJ: Secondary neoplasms following treatment of malignant germ cell tumors. *Journal of Clinical Oncology* 11:1703-1709, 1993
- [BS95] C. Bokemeyer, H.J. Schmoll: Treatment of testicular cancer and the development of secondary malignancies. *Journal of Clinical Oncology*. 13 (1): 283-292, 1995

- [BSP94] Bokemeyer C, Schmoll HJ, Poliwoda: Häufigkeit und Bedeutung des Auftretens von Sekundärleukämien nach Etoposid-haltiger Chemotherapie. Deutsche Medizinische Wochenschrift 119:707-714, 1994
- [Bud89] Budavari, S. (ed.): The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Rahway, NJ, Merck and Co., Inc., 1989, 1570
- [Cal93] Calabresi P.: Medical oncology. Basic principles and clinical management of cancer. 2. ed., internat. ed., New York, 1993
- [CCG95] Cosbey SH, Craig I, Gill R: Novel solid-phase extraction strategy for the isolation of basic drugs from whole blood; Preliminary study using commercial available extraction cartridges. Journal of Chromatography B, 669, 229-235 1995
- [CD82] Coltman, C.A., Jr & Dixon, D.O. (1982) Second malignancies complicating Hodgkin's disease. A Southwest Oncology Group 10-year follow-up. Cancer TreatRep., 66, 1023-1033
- [CKC82] Coleman, C.N., Kaplan, H.S., Cox, R., Varghese, A., Butterfield, P. & Rosenburg, S.A. (1982) Leukaemias, non-Hodgkin's lymphomas and solid tumours in patients treated for Hodgkin's disease. Cancer Surv., 1, 733-744
- [CL96] Chabner B.A., Longo D.L. (Editors) (1996): Cancer Chemotherapy and Biotherapy. Principles and Practice. 2nd Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia
- [CM94] Classen, Meinhard: Innere Medizin. 3. Aufl., München, Urban & Schwarzenberg, 1994.
- [CSM82] Chiou CT, Schmedding DW, Manes M: Partitioning of Organic Compounds in Octanol-Water Systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1982) 4-10
- [Cyc93] Sicherheitsdatenblatt (91/155/EWG): Cyclophosphamid. ASTA-Medica, 1993
- [Das94] Daschner F: Umweltschutz in Klinik und Praxis. Springer -Verlag, Berlin, 1994
- [DEF86] McDiarmid, M.A.; Egan, T.; Furio, M.; Bonacci, M.; Watts, S.R.: Sampling for airborne fluorouracil in a hospital drug preparation area. Am J Hosp Pharm, 1986, 43, pp. 1942-1945
- [DeV93] DeVita V.T. [Hrsg.]: Cancer. Principles & practice of oncology. 4. ed., one-vol. ed. Philadelphia, Lippincott, 1993
- [DEVL22] DEV L 22, EN 29408, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Allgemeine Angaben (Gruppe L)
- [DEVL24] DEV L 24 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Allgemeine Angaben (Gruppe L) EN 29439, ISO

- [DEVL25] DEV L 25, EN 29888, ISO 9888 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Allgemeine Angaben (Gruppe L)
- [DEVL26] DEV L 26, DIN 38412, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Allgemeine Angaben (Gruppe L) EN 29439
- [Dho91] Dhom G.: Erkrankungshäufigkeit und Überlebenschancen bei Krebs. Ergebnisse des saarländischen Krebsregisters und des bundesweiten Registers für bösartige Erkrankungen im Kindesalter = Cancer incidence and patients survival. Hrsg., Der Bundesminister für Gesundheit, Baden-Baden, NomosVerl.-Ges., 1991
- [DLD93] McDevitt JJ, Lees PSJ, McDiarmid MA: Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents. *Journal of Occupational Medicine*, 35 (1993) 57-60
- [DMD95] M.P. Demeo, S. Merono, A.D. Debaille, A. Botta, M. Laget, H.Guiraud, G. Dumenil: Monitoring exposure of hospital personnel handling cytostatic drugs and contaminated materials. *International Archives of Occupational & Environmental Health*. 66 (6): 363-368, 1995
- [Dor94] Dorr R.T.: *Cancer chemotherapy handbook*. 2. ed. Norwalk, Conn, Appleton & Lange, 1994.
- [EBL86] Ertmann R., Bielack S., Landbeck G.: Determination of 7-hydroxymethotrexate in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography, *Oncology* **43** (1986) 86-88
- [EE85] S. Eksborg, H. Ehrsson: Drug level monitoring: Cytostatics. *Journal of Chromatography*, 340, 31-72, 1985
- [EE97] Elyazigi A., Ezzat A.: Pharmacokinetic monitoring of anticancer drugs Atking-Faisal-specialist-hospital, Riyadh, Saudi arabia. *Therapeutic Drug Monitoring*.19(4):390-393, 1997 Aug.
- [EHP97] Ensslin AS., Huber R., Pethran A., Rommelt H., Schierl R., Kulka U., Fruhmann G.: Biological monitoring of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs - urinary excretion and cytogenetics studies: *International Archives of Occupational & Environmental Health*. 70(3):205-208, 1997
- [EII88] Ellington JJ et al.: Measurement of Hydrolysis Rate Constants for the Evaluation of Hazardous Waste Land Disposal, Vol 3, USEPA-600/3-88-028, p. 15-17 (1988)
- [Ern77] Ernst W: Determination of the bioconcentration potential of marine organismen. A steady state approach I. Bioconcentration data for seven chlorinated pesticides in mussels (*Mytilus edulis*) and their relation to solubility data. *Chemosphere* 11 (1977) 731-740
- [ESP94] A.S. Ensslin, Y. Stoll, A. Pethran, A. Pfaller, H. Rommelt, G. Fruhmann: Biological monitoring of Cyclophosphamide and Ifosfamide in urine of hospital personnel occupational exposed to cytostatic drugs. *Occupational and Environmental Medicine*, 51(4), 229-233, 1994

- [FD95] L.R. Ferguson, W.A. Denny: Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilised resource in mutagenesis?. Mutation Research, 331, 1-26 (1995)
- [FFE97] Fetscher S., Finke J., Engelhardt R., Mertelsmann R., Lange W.: Early-onset secondary malignancies after high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation. Annals of Hematology.74(2):73-77, 1997 Feb.
- [FHJ95] J. Fuchs, J.G. Hengstler, D. Jung, G. Hiltl, J. Konietzko, F. Oesch: DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. Mutation Res., 342, 17-23 (1995)
- [FHR96] Forth W., Henschler D., Rummel W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1996
- [Fis93] Fischer, D.S.: The cancer chemotherapy handbook. 4. ed. St. Louis, Mosby, 1993.
- [Fisc93] Fischer KW (1993): Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von synthetischen Verbindungen, z. B.Detergentien, Vom Wasser, 40: 305-334
- [FP96] L.R. Ferguson, A.E Pearson: The clinical use of mutagenic anticancer drugs. Mutation Res., 355, 1-12 (1996)
- [GAK96] Gabius H.J., Andre S., Kaltner H.: Mythos Mistel - Anspruch, Wirklichkeit und prüfbare Perspektiven. Zeitung für Ärztliche Fortbildung 90: 103-110. (1996)
- [GB95] Gartiser S, Brinker L,: Abwasserbelastende Stoffe und Abwassersituation in Kliniken. Bericht für das Umweltbundesamt F+E-Vorhaben Nr. 1026514, 1995
- [GBE96] Gartiser S, Brinker L, Erbe T, Kümmrer K, Willmund R (1996) Belastung von Krankenhausabwasser mit gefährlichen Stoffen im Sinne 7a WHG. Acta Hydrochim Hydrobiol 24, 90-97
- [GefStoffV] Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Gefahrstoffverordnung - GefStoffV -) vom 26. Oktober 1993 (BGBl. I S. 1783), zuletzt geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 15. April 1997 (BGBl. I S. 782) 17.4
- [GKW96] F Giuliani, T.Koller, F.E. Wurgler, R.M. Widmer: Detection of the genotoxic activity in native hospital waste water by the UmucTest. Mutation Research. Genetic Toxicology. 368 (1): 49-57, 1996
- [GPG82] Glicksman, A.S., Pajak, T.F., Gottlieb, A., Nissen, N., Stutzman, L. & Cooper, M.R. Second malignant neoplasms in patients successfully treated for Hodgkin's disease: a Cancer and Leukemia Group B study. Cancer Treat Rep., 66, 1035-1044, 1982
- [Gre92] M.H. Greene: Is Cisplatin a human carcinogen - Review. Journal of the National Cancer Institute, 84, 306-312, 1992
- [Gro94] Gross R.: Die innere Medizin. 8.Aufl., Stuttgart, Schattauer, 1994

- [GSS96] R. Garciaboyero, G.F. Sanz, M.:A. Sanz: Two secondary malignancies following the successful treatment of a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of oncology*, 7(3), 322-323 1996
- [GWC96] W.M. Generoso, K.L. Witt, K.T.Cain, L. Hughes, N.L.A. Cacheiro, A.M.C. Lockhart, M.D. Shelby: Dominant lethal and heritable translocation tests with Chlorambucil and Melphalan in male mice. *Mutation Research. Genetic Toxicology*. 345 (3-4): 167-180,1996
- [Haa96] Haagedoorn E.L.: *Basiswissen Onkologie*. Berlin, Ullstein Mosby, 1996
- [Ham84] Hamilton-Miller JMT (1984): Antimicrobial activity of 21 anti-neoplastic agents. *Br. J. Cancer* 49: 367-369.
- [Han95] Hansch L et al.: *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. ACS Prof Ref Book, Amer Chem Soc, Washington, DC. p124 (1995)
- [Har98] *Harrison's principles of internal medicine*. 14. ed., New York, McGraw-Hill, 1998
- [HC86] Hawker DW, Connel DW: Bioconcentration of Lipophilic Compounds by some Aquatic Organisms. *Ecotox. Environ. Safety* 11 (1986) 184-197
- [HCM94] Hubert Ph, Chiap P, Moors M, Bourguignon B, Massart DL, Crommen J: Knowledge-based system for the automated solid-phase extraction of basic drugs from plasma coupled with their liquid chromatographic determination. Application to the biodetermination of β -receptor blocking agents. *Journal of Chromatography A*: 665, 87-99, 1994
- [Hei96] Heidemann E.: *Therapieschemata Onkologie und Hämatologie*. 3. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, 1996
- [Hen83] Henry-Amar, M. Second cancers after radiotherapy and chemotherapy for early stages of Hodgkin's disease. *J. natl Cancer Inst.*, 71, 911-916, 1983
- [Her95] Herd R: Endectocidal drugs: Ecological risks and counter-measures. *International Journal of Parasitology* 25: 875-885 1995
- [Her97] Hermann TW: Quantitative Methods most frequently used in therapeutic drug monitoring. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 42 (1997)
- [HHG95] Hartmann A., Herkommer K., Glück M., Speit G.: DNA damaging effect of Cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay). *Environm. & Mol. Mutag.*, 25, 180-187, 1995
- [HHL95] Harrison PTC, Humfrey CDN, Litchfield M, Shuker LK: *IEH Assessement on environmental oestrogens: consequences to human health and wildlife*. Institute for Environment and Health, University of Leicester, Leicester, 1995
- [Hic93] Hickman J.A.: *Cancer chemotherapy*. Oxford, Blackwell Scientific Publ., 1993

- [HK95] M. Hartmann, B.K. Keppler: Inorganic anticancer agents: Their chemistry and antitumor properties. *Comments Inorg. Chem.* 16 (6), 339-372, 1995
- [HW94] Harold V., Weinberg R. A.: *Gene und Krebs. Biologische Wurzeln der Tumorentstehung*, Spektrum, Akad. Verl., 1994.
- [IARC10] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volumes 10, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1987
- [IARC26] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volumes 26, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1987
- [IARC50] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volumes 50, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1990
- [IARC66] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volumes 66, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1996
- [IARC76] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volumes 76, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1999
- [IARC9] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volumes 9, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1987
- [IARCS7] International Agency for Research on Cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Supplement 7, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1987
- [Ifo93] Sicherheitsdatenblatt (91/155/EWG): Ifosfamid. ASTA-Medica, 1993
- [IL89] Isnard P, Lambert S: Aqueous Solubility and n-Octanol/Water Partition Coefficient Correlations. *Chemosphere* 18 (1989) 1837-1853
- [Iss97] Isselbacher K.J.: *Harrisons Kompendium Innere Medizin*. 13. Aufl., Hrsg.: Schölmerich J., Berlin, Blackwell-Wiss.-Verl., 1997.
- [JME93] Jacobsen GK, Mellempgaard A, Engelholm SA, et al: increased incidence of sarcoma in patients treated for testicular seminoma. *European Journal of Cancer* 29: 664-668, 1993
- [JSC76] Jacobs D, Stoller RG, Chabner BA, Johns G (1976) 7-Hydroxymethotrexat as an urinary in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexat *Journal of clinical Investigations* 57: 543-538

- [JSC76] Jacobs D., Stoller R.G., Chabner B.A., Johns G.: 7-Hydroxymethotrexate as an urinary in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate, *J. Clin. Invest.* **57** (1976) 543-538
- [JSW96] M.A. Jackson, H.F. Stack, M.D. Waters: Genetic activity profiles of anticancer drugs. *Mutation Research - Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 355 (1-2): 171-208, 1996
- [JW90] Jakob R, Windel T (1990): Ein automatisierter in vitro-Toxizitätstest von 25 Chemikalien. *Zbl. Hyg.* 190: 536-546.
- [Kar81] Karickhoff SW: Semi-Empirical Estimation of Sorption of Hydrophobic Pollutants on Natural Sediment and Soils. *Chemosphere* 10 (1981) 833-846
- [KCC78] Klubes P., Connelly K., Cerna I., Mandel H.G.: Effects of 5-FU on 5-fluorodeoxyuridine-5'-monophosphate and 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate pools, and DNA synthesis in solid mouse L-1210 and rat Walker-256 tumors., *Cancer Res.* **38** (1978) 2325-2331
- [KDS86] J.M. Kaldor, N.E. Day, S. Shiboski: *Epidemiological studies of anticancer drug carcinogenicity.* International Agency for Research on cancer, Lyon, 1986
- [KGJ98] Kiffmeyer Th, Götze H-J, Jursch M, Lüders U. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 361:185-191, 1998
- [KI94] Krishnan TR, Ibrahim I: Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 12 (3): 287-294, 1994
- [KL91] Kuschinsky, Lüllmann: *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991
- [KSB96] K. Kümmerer, T. Steger-Hartmann, A. Baranyai, I. Burhaus: Examination of the biodegradation of the antineoplastics Cyclophosphamid and Ifosphamid with the closed bottle test (OECD 301 D). *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin.* 198 (3): 215-225, 1996
- [Küt96] Küttler T.: *Pharmakologie und Toxikologie.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 17. Auflage, 1996
- [KW88] Krämer I, Wenschel HM (1988): Wachstumsverhalten ausgewählter Mikroorganismen in Zytostatika-Zubereitungen, *Krankenhauspharmazie* 11: 453-460
- [KW91] Krämer I, Wenschel HM (1991): Viability of microorganisms in antineoplastic drug solutions. *Eur. J. Hosp. Pharm.* 1 (1), 14-18.
- [Lee98] Lee MG: The environmental risk associated with the use and disposal of pharmaceuticals in hospitals. In: *Risk Assessment of chemicals in the environment.* Richardson ML (ed.): Royal Society of Chemistry, London. 491-504, 1998

- [LES79] Laskin J.D., Evans R.M., Slocum H.K, Burke D., Hakala M.T.: Basis for natural variation in sensitivity to 5-FU in mouse and human cells in culture, *Cancer Res.* **39** (1979) 383-390
- [LJ95] Lu G., Jun H.W.: Determination of trace Methotrexate and 7-OH-Methotrexate in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr.,A* **18** 1 (1995) 155-171
- [LK80] Lankelmam J, de Klein E, (1980) The role of 7-Hydroxymethotrexat during methotrexat anticancer therapy, *Cancer Letters* 9: 133-142
- [LK80] Lankelmann J., de Klein E.: The role of 7-Hydroxymethotrexate during methotrexate anticancer therapy, *Cancer Lett.* **9** (1980) 133-142
- [Lov94] Love R.R.: *Manual of clinical oncology.* International Union against Cancer. 6. ed., Berlin, Springer, 1994.
- [LSB93] Van Leeuwen FE, Stiggelbout AM, van den Belt-Dusebaut AW, et al: Second cancer risk following testicular cancer: A follow-up study of 1909 patients. *Journal of Clinical Oncology*11:415-424, 1993
- [Lüd95] Lüders U.: Entwicklung eines Anreicherungs- und chromatographischen Analysenverfahrens zur quantitativen Bestimmung von ausgewählten Zytostatika in Realproben. Tectum Verlag, Marburg, 1995
- [LW92] Law B, Weir S: Fundamental studies in reversed-phase liquid-solid extraction of basic drugs; III: sample matrix effects. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7, 487-493, 1992
- [LWW80] Liebermann L.M., Wessels B.W., Wiley A.L., Gatley S.J., Nickles R.J., Young D., Wolberg W.H., Bogden A.E.: ¹⁸F-5-FU studies in humans and animals, *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* **6** (1980) 505-509
- [Lym85] Lyman WJ: *Environmental Exposure From Chemicals Vol I*, Neely WB, Blau GE (eds), Boca Raton, FL, CRC Press (1985)
- [Lym90] Lyman WJ et al.: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods.* Washington DC, Amer Chem Soc pp. 5-4, 5-10, 15-1 to 15-29 (1990)
- [Mac94] M. Machadosantelli et al; *Biomonitoring of nurses handling with antineoplasticdrugs; Mutation Research-Fundamental & Molecular Mechanism of Mutagenesis.* 309 (2):193-199, (1994)
- [MBB85] Mervyn L, Bowrons R, Bowrons JM: The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37(1), 1-12, 1985
- [Mce92] McEvoy, G.K. (ed.): *American Hospital Formulary Service - Drug Information 92.* Bethesda, MD, American Society of Hospital Pharmacists, Inc., 1992 (Plus Supplements 1992),
- [Mce93] McEvoy, G.K. (ed.): *American Hospital Formulary Service - Drug Information 93.* Bethesda, MD, American Society of Hospital Pharmacists, Inc., 1993

- [ME87] Moore MJ, Ehrlichmann C (1987) Therapeutic drug monitoring in oncology, *Clinical Pharmacokinetics*13: 205-277
- [Men96] Menditto A.: Quality assurance in biological monitoring of environmental and occupational exposure to chemicals. *Microchemical Journal*.54(3):252-261, 1996 Oct.
- [Mey92] Meylan WM et al.: *Environ Sci Technol* 28: 459-65 (1992)
- [Mey93] Meylan WM, Howard PH: *Chemosphere* 26, 2293-99, 1993
- [MH91] Meylan WM, Howard PH: *Environ Toxicol Chem* 10: 1283-93 (1991)
- [MH93] Meylan WM, Howard PH: *Chemosphere* 26: 2293-99 (1993)
- [MHM96] R. Munker, E. Hiller, A. Melnyk, P. Gutjahr: Second malignancies. Clinical relevance and basic research (Review). *International Journal of Clinical Oncology*, 9, 763-776 (1996)
- [MMJ93] Moeller H, Mellempgaard A, Jacobsen GK, et al: Incidence of second primary cancer following testicular cancer. *European Journal of cancer* 29: 672-676, 1993
- [MS94] Marquardt H., Schäfer S.G.: *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftsverlag, Mannheim 1994
- [Mug91] Muggia F.M.: *New drugs, concepts and results in cancer chemotherapy*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, First Edition 1991
- [Mun94] Munson P.L.: *Principals of pharmacology. Basic conceps and clinical applications*. 1. Edition, International Thomson Publishing Inc., Bonn, 1994
- [Mut96] Mutschler E.: *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 7. Auflage, Stuttgart 1996
- [NBP94] Del Nozal M.J., Bernal J.L., Pampliega A., Marinero P., Pozuelo M.: Determination of the concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in rabbit plasma and tissues by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* **656** (1994) 397-405
- [NKF96] Ning Z., Kennedy K.J., Fernandes L.: Biosorption of 2,4-Dichlorophenol by live and chemically inactivated anaerobic granules, *Wat. Res.* **30** 9 (1996) 2039-2044
- [NVS94] M.A. Newman, B.G. Valanis, R.S. Schoeny, S.Q. Hee: Urinary biological monitoring markers of anticancer drug exposure in oncology nurses. *American Journal of Public Health*, 84 (5), 852-855, 1994
- [OBL96] Oravcova J, Böhs B, Lindner W: Drug protein binding studies New trends in analytical and experimental methodology. *Journal of Chromatography B*, 677, 1-28 1996
- [OECD301A] OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, (1992), 301 A "DOC Die-Away Test"

- [OECD301B] OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, (1992) , 301 B CO₂ Evolution
- [OECD301C] OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, (1992), 301 C Modified MITI Test (I)
- [OECD301D] OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, (1992), 301 D Closed Bottle Test
- [OECD301E] OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, (1992), 301 E Modified OECD Screening Test
- [OECD301F] OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, (1992), 301 F Manometric Respirometry Test
- [OKB96] Overbeck T.L., Knight J.M., Beck D.J.: A comparison of the genotoxic effects of Carboplatin and Cisplatin in Echerichia Coli. Mutation Research - DNA Repair. 362 (3): 249-259, 1996
- [OMA94] T. Okuda, M. Motohashi, I. Aoki, T. Yashiki: Sensitive Determination of methotrexate in monkey plasma by high-performance liquid chromatography using on-line solid phase extraction. Journal of ChromatographyB, 662, 79-84 (1994)
- [Oso80] Osol, A. (ed.): Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed. Easton, Pennsylvania, Mack Publishing Co., 1980, 1088
- [PC90] Peng GW, Chiou WI: Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. J. Chromatog., 531 (1990) 3-50
- [PG94] Powis, Garth [Hrsg.]: Anticancer drugs. Reactive metabolism and drug interactions. Specialist subject, 1. ed., Oxford, Pergamon Press, 1994.
- [PSH88] Pyy L, Sorsa M, Hakala E: Ambient monitoring of cyclophosphamide in manufacture and hospitals. American Industrial Hygiene Association Journal 49(6) (1988) 314-317
- [Pyy88] Pyy L et al.: Am Ind Hyd Assoc J 49: 314-317 (1988)
- [Rad93] Radeck W: Analysen physiologischer Flüssigkeietn - Festphasenextraktion und HPLC-Bestimmung. GIT Labor-Medizin 16 79-103, 1993
- [RAS96] Robieux I, Aita P, Sorio R, Toffoli G, Boiocchi M (1996) Determination of unbound Etoposide concentration in ultrafiltered plasma by high performance liquid Chromatography with fluorometric detection, Journal of Chromatography 686 (1): 35-41
- [RB94] Reupert R., Brausen G.: Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Wasser, Sediment, Schlamm und Boden mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Acta hydrochem. hydrobiol. **22** 5 (1994) 202-215
- [Rem98] Remennick L.I.: The cancer problem in the context of modernity, sociology, demography, politics. London, Sage Publ., 1998.

- [RH96] G. Reifferscheid, J. Heil: Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Res.*, 369, 129-145 (1996)
- [RL98] Bundesverband der pharmazeutischen Industrie, "Rote Liste". Edition Cantor Aulendorf, Württemberg, 1998
- [RNJ94] S. Roth, H. Norppa, H. Järventaus, P. Kyyrönen, M. Ahonen, J. Lehtomäki, H. Sainio, M. Sorsa: Analysis of chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutation Res.*, 325, 157-162, (1994)
- [RNJ94] S. Roth, H. Norppa, H. Järventaus, P. Kyyrönen, M. Ahonen, J. Lehtomäki, H. Sainio, M. Sorsa: Analysis of chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutation Res.*, 325, 157-162, (1994)
- [RP94] Radon R.W., Pratt W.B.: The anticancer drugs. 2. edition, Oxford University Press, 1994
- [SA96] M Sorsa, D. Anderson: Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutation Res.*, 355, 253-261 (1996)
- [SAB92] Sessink, P.J.M.; Anzion, R.B.; Van den Broek, P.H.H.; Bos, R.P.: Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department. *Pharm Weekbl (Sci)*, 1992b, 14 (1), pp. 16-22
- [San94] Sangster J: Logkow Databank. Sangster Res. Lab., Montreal, Quebec, Canada (1994)
- [SB96] Stobbe, Baumann: Innere Medizin. Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten. 7. Aufl., Berlin, Ullstein Mosby, 1996
- [SBB90] Stein T.A., Burns G.P., Bailey B., Wise L.: Measurement of 5-fluorouracil and its active metabolites in tissue, *J. Chromatogr.*, A **507** (1990) 259-265
- [SBS92] Sessink, P.J.M.; Boer, K.A.; Scheefhals, A.P.H.; Anzion, R.B.M.; Bos, R.P.: Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. *Int Arch Occup Environ Health*, 1992a, 64, pp. 105-112
- [Sch97] Schwabe U.: Arzneiverordnungs-Report `97, Fischer, Stuttgart, 1997
- [SCR94] Sessink PJM, Cerna M, Rössner P, Pastorkova A, Bavarova H, Frankova K, Anzion RBM. Bos RP.: Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutation Research* 309 (1994) 193-199

- [SCR94] P.J.M. Sessink, M. Cerna, P. Rossner, A. Pastorkova, H. Bavarova, K. Frankova, R.B.M. Anzion: Urinary Cyclophosphamid excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutation Research-Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 309(2): 193-199, 1994
- [Sel90] Selassie, CD et al.: *J Med Chem* 33: 1914-1919 (1990)
- [SFA94] Sessink, P.J.M.; Friemel, N.S.S.; Anzion, R.B.M.; Bos, R.P.: Biological and environmental monitoring of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to methotrexate. *Int Arch Occup Environ Health*, 1994c, Vol. 65, pp. 401-403
- [SFD96] B.J.S Sanderson, L.R. Ferguson, W.A. Denny: Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutation Research - Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 355 (1-2): 59-70, 1996
- [SG83] Singh B, Gupta RS: Mutagenic responses of thirteen anticancer drugs on mutation induction at multiple genetic loci and on sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells. *Cancer Research* 43, 577-584, 1983
- [SH80] Schmähl D., Habs M.: Carcinogenicity of N-Nitroso Compounds. *Oncology* 37: 237-242 (1980)
- [SHP97] Schmoll H.-J., Höffgen K., Possinger K.: *Internistische Onkologie, Teil 2, 2. Auflage*, Springer Verlag, Berlin, 1997
- [Sil85] de Silva JAF: Analytical strategies for therapeutic monitoring of drugs in biological fluids. *Journal of Chromatography*, 340, 3-30 1985
- [SK86] D. Schmähl, J.M. Kaldor: Carcinogenicity of alkylating cytostatic drugs IARC Scientific Publications N0 78, International Agency for Research on cancer, Lyon, 1986
- [SKA94] Sessink, P.J.M.; van de Kerkhof, M.C.A.; Anzion, R.B.M.; Noordhoek, J.; Bos, R.P.: Environmental Contamination and Assessment of Exposure to Antineoplastic Agents by Determination of Cyclophosphamide in Urine of Exposed Pharmacy Technicians. Is Skin Absorption an Important Exposure Route? *Int Arch Occup Environ Health*, 1994b, Vol. 49, No. 3, pp. 165-169
- [Ske91] Skeel R.T. [Hrsg.]: *Handbook of cancer chemotherapy*. 3. ed., 2. print. Boston, Little, Brown and Co., 1991
- [SKH97] T. Steger-Hartmann, K. Kümmerer, A. Hartmann: Biological Degradation of Cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 174-179 (1997)
- [SKS96] Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Schecker J.: Trace Analysis of the antineoplastics Ifosfamid and Cyclophosphamid in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 726 (1-2): 179-184, 1996
- [Sor88] Sorsa M et al: *Mutat Res* 204: 465-79 (1988)

- [SP90] Sorsa M, Pyy L: Exposure assessment of workers in the production of cyclophosphamide. Polish Journal of Occupational Medicine 3(2) (1990) 185-189
- [SP95] Schwabe U., Paffrath D.: Arzneiverordnungs-Report '95, Fischer, Stuttgart, 1995
- [SPF96] Schierl R., Pethran A., Fruhmann G.: Urinary Platinum in hospital personnel after platinum-drug exposure. International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health, Espo, Finland 1996
- [SPS88] M. Sorsa, L. Pyy, S. Salomaa, L. Nylund, J.W. Yager: Biological and environmental monitoring of occupational exposure to Cyclophosphamide in industry and hospitals. Mutation Research, 204, 465-479, 1988
- [SRP93] Sessink PJM, de Roos JHC, Pierik FH, Anzion RBM, Bos RP: Occupational exposure of animal caretakers to cyclophosphamide. Journal of Occupational Medicine, 35 (1993) 47-52
- [SS96] B.J.S. Sanderson, A.J. Shield: Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. Mutation Research - Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 355 (1-2): 41-57, 1996
- [SSK87] Salamoun J., Smrz M., Kiss F., Salamounouva A.: Column liquid chromatography of methotrexate and its metabolites using a post-column photochemical reactor and fluorescence detection, J. Chromatogr., B: Biomed. Appl **419** (1987) 213-223
- [STA94] Sessink, P.J.M.; Timmersmans, J.L.; Anzion, R.B.M.; Bos, R.P.: Assessment of Occupational Exposure of Pharmaceutical Plant Workers to 5-Fluorouracil; J Occup Med, 1994a, Vol. 36, No. 1, pp. 79-83
- [Ste94] Stein, J.H. [Hrsg.]: Internal medicine. Ed.-in-chief Stein J.H., 4. ed., St. Louis, Mosby, 1994.
- [Ste96] Steger-Hartmann T (1996): Analytik und Ökotoxikologie klinikspezifischer Abwasserinhaltsstoffe mit Schwerpunkt auf die Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosfamid. Dissertation Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., 1996, 176 S.
- [Str91] Strubelt O.: Elementare Pharmakologie und Toxikologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 1991
- [SVA94] P.J.M. Sessink, M.C.A. Vandekerhof, R.B.M. Anzion, J. Noordhoek, R.P. Bos: Environmental contamination and assesment of exposure to antineoplastic agents by determination of Cyclophosphami in urine of exposed pharmacy techniacans - Is skin absorption an important exposure route. Archives of Environmental Health , 49(3), 165-169, 1994
- [SVH97] Sessink PJM, Verplanke AJW, Herber RFM, Bos RP: Occupational exposure to antineoplastic agents and paramaters for renal dysfunction. International Archives of Occupational & Environmental Health. 96(3):215-218, 1997

- [Swa83] Swann RL et al.: Res Rev 85: 23 (1983)
- [SWA97] Sessink PJM., Wittenhorst BCJ., Anzion RBM., Bos RP.: Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents - reevaluation after additional protective measures. Archives of Environmental Health.52(3):240-244, 1997 May-Jun.
- [Tan92] Tannock I.F. [Hrsg.]: The basic science of oncology. 2. ed., New York, McGraw-Hill, 1992
- [TensidV] Verordnung über die Abbaubarkeit anionischer und nichtionischer grenzflächenaktiver Stoffe in Wasch- und Reinigungsmitteln (TensidV) BGBL:I 244, 1977, zuletzt geändert 04061986, I 851
- [Tja90] U.R. Tjaden: Chromatographic analysis of anticancer drugs, Review. Journal of Chromatography. 531, 235-294, 1990
- [TKW84] Tester, W.J., Kinsella, T.J., Waller, B., Makuch, R.W., Kelley, P.A., Glatstein, E. & DeVita, V.T. (1984) Second malignant neoplasms complicating Hodgkin's disease: the National Cancer Institute experience. J. clin. Oncol., 2, 762-769
- [TRGS905] TRGS 905 Technische Regeln für Gefahrstoffe, Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoffe (Bekanntmachung des BMA nach § 52 Abs.3 Gefahrstoffverordnung). Ausgabe Oktober 1995, BArBl. Nr.4/1995 S.70, Nr.6/1995 S. 50, Nr. 10/1995 S. 46
- [UBA90] Umweltbundesamt 1990 im ChemGes. Heft 9: Grundzüge der Bewertung von neuen Stoffen nach dem ChemG. 1. Fortschreibung 1990.
- [UBA95-075] Abwasserbelastende Stoffe und Abwassersituation in Kliniken, Forschungsbericht des Umweltbundesamtes 102 06 514, UBA-FB 95-075, Berlin 1996, ISSN 0722-186X
- [UBA96-060] Umweltprobleme durch Arzneimittel - Literaturstudie-, Forschungsbericht des Umweltbundesamtes 106 04 121, UBA-FB 96-060, Berlin, 1996
- [Vep95] Vepesid, Zytostatikum für die Mono- und Polychemotherapie maligner Neoplasien. Informationsschrift der Bristol-Myers GmbH, Neu-Isenburg, 1995
- [VTH88] Vendrig DEMM, Teeuwse J, Holthuis JJM: Solid-phase extraction of Vinblastine and Vincristine from plasma and urine: variable drug recoveries due to non-reproducible column packings. Journal of Chromatography. 424, 83-94, 1988
- [Wag73] Wagner R (1973), Abbaubarkeit und Persistenz, Vom Wasser, 40: 335-367
- [Wel84] Wellens H (1984) Zur Bestimmung und Bewertung der biologischen Abbaubarkeit, Testing and Evaluation of Biological Degradability, Vom Wasser, 63, 191-198
- [Wel97] Weltgesundheitsreport 1997: Die wichtigsten Daten aus dem Weltgesundheitsreport von 1997

- [WLL96] Wang K, Lu J, Li R.: The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews*, 151 (1996) 53-88
- [WR96] P.A. Whitel, J.B. Rasnmussen: SOS chromotest results in a broader context: Empirical relationships between genotoxic potency, mutagenic potency and carcinogenic potency. *Environm. and Molecular Mutagenesis*, 27, 270-305, 1996
- [WWC83] DeWerk Neal, A.; Wadden, R.A.; Chiou, W.L.: Exposure of hospital workers to airborne antineoplastic agents. *Am J Hosp Pharm*, 1983, 40, pp. 597-601
- [YLE95] K.J. Yarema, S.J. Lippard, J.M. Essigmann: Mutagenic and genotoxic effects of DNA adducts formed by the anticancer drug cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Nucleic Acids Research*. 23 (20): 4066-4072, 1995
- [YLE95] K.J. Yarema, S.J. Lippard, J.M. Essigmann: Mutagenic and genotoxic effects of DNA adducts formed by the anticancer drug cis-Diamminedichloro platinum(II). *Nucleic Acids Research*. 23 (20): 4066-4072, 1995
- [YVG82] Young D., Vine E., Ghanbarpour A., Shani J., Siemsen J.K., Wolf W.: Metabolic and distribution studies with radiolabeled 5-Fluorouracil, *Nucl.-Med* 11 1 (1982) 1-7
- [ZM90] Ziechmann W., Müller-Wegener U.: *Bodenchemie*, Mannheim, Wien, Zürich, Wissenschaftsverlag (1990)