Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V.

Bliersheimer Straße 60, 47229 Duisburg, Tel.: (02065) 418 – 208, Fax.: (02065) 418 - 211

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

Zusammenfassender Kurzbericht

01.05.1998 – 30.09.2000

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 Schwingungs-spektroskopie, 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)

1 Problemstellung

Zytostatika sind Arzneimittel, die zur Chemo-Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden. Zytostatika beeinflussen durch Eingriffe in Stoffwechselvorgänge oder Störungen der Zellteilung das genetische System der Zelle und hemmen so die Vermehrung von Tumorzellen. Ein großer Teil der Arzneimittel, die als Zytostatika verwendet werden, haben jedoch 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 vom Personal, d. h. Apothekern, pharmazeutisch technischen Angestellten, Pflegepersonal und Ärzten, besondere Aufmerksamkeit und Sorgfalt, um jede Kontamination der eigenen Person und der Umwelt zu vermeiden.

Zytostatika können auf vielfältige Weise in die Umwelt gelangen, wie zum Beispiel während der Zubereitung von Applikationen innerhalb von Krankenhausapotheken und öffentlichen Apotheken, der Entsorgung von Restmengen sowie durch die Ausscheidungen der mit Zytostatika behandelten Patienten. Da der Trend in der Onkologie in Richtung höherer Zytostatikadosen geht und gleichzeitig immer mehr Patienten mit den entsprechenden Medikamenten versorgt werden, kommt dem Problem der Umweltbelastung durch diese Substanzen eine wachsende Bedeutung zu.

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

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

Zytostatikum	Geschätzte mittlere Konzentration im Abwasser ausgewählter Krankenhäuser (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	

Quelle: Abwasserbelastende Stoffe und Abwassersituation in Kliniken. Forschungsbericht des Umweltbundesamtes 102 06 514, UBA-FB 95-075, Berlin, 1996

Im Oberflächenwasser sind dementsprechend um den Faktor 10 kleinere Werte zu erwarten, wenn ein mittlerer Verdünnungsfaktor von 10 beim Übergang vom Abwasser zum Oberflächenwasser angenommen wird. Diese Schätzung erfasst den ungünstigsten Fall, wenn kein Abbau innerhalb und außerhalb der Kläranlage erfolgt.

Für die Bewertung der Umweltbelastung durch Zytostatika sind insbesondere Informationen über die tatsächlich eingetragenen Mengen und das Verhalten dieser Substanzen und deren aktiver Metaboliten in der Umwelt notwendig. Im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsvorhabens wurden daher eine Reihe von Aufgabenstellungen bearbeitet, die eine Bewertung der Umweltbelastung durch Zytostatika ermöglichen. Ein wesentlicher Punkt war die Entwicklung von substanzspezifischen Nachweisverfahren. Dies ermöglichte u.a. Untersuchungen zum Abbauverhalten der Substanzen innerhalb einer Modellkläranlage, zum Adsorptionsverhalten an Klär-

schlamm und zur Quantifizierung der eingetragenen Mengen in einzelne Umweltkompartimente.
In dem vorliegenden zusammenfassenden Kurzbericht wird ein erster Überblick der Ergebnisse gegeben. Die detaillierte Beschreibung der einzelnen Fragestellungen sowie die abschließende Bewertung und Diskussion der im Rahmen des Untersuchungsvorhabens ermittelten Ergebnisse erfolgt im ausführlichen Abschlussbericht.

2 Durchgeführte Arbeiten

Zu Beginn des Untersuchungsvorhabens wurden insgesamt elf Zytostatika ausgewählt, 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 sind Carmustin, Chlorambucil, Cisplatin, Cyclophosphamid, Cytarabin, Etoposid, Fluorouracil, Ifosfamid, Melphalan, Methotrexat und Vinblastin. Neben den Originalsubstanzen wurden die Metaboliten von Chlorambucil, Melphalan und Methotrexat bei ausgewählten Aufgabenstellungen in die Untersuchungen einbezogen.

Wesentlicher Bestandteil der Untersuchungen war die Ermittlung der möglichen Eintragspfade von Zytostatika in die Umwelt. Insbesondere wurden Eintragspfade in Abwässer, Oberflächengewässer, Kläranlagen und Atmosphäre ermittelt, die auf Umgang, Anwendung, Transport und Entsorgung von Zytostatika zurückzuführen sind.

Laboruntersuchungen zur Simulation des Verhaltens von Zytostatika, die in die Umwelt eingetragen wurden, erfolgten u.a. an einer Modellkläranlage unter Verwendung eines synthetischen Abwassers (DIN 38412 L28). Der Abbau von Substanzen im Abwasser erfolgt anhand vielfältiger Prozesse, wie z.B. biologischer Abbau, Hydrolyse oder Adsorption am Klärschlamm. Mit einer entsprechenden Versuchsplanung und -durchführung wurde an der Modellkläranlage neben dem biologischen Abbau

auch die gesamte Eliminierungsrate aufgrund weiterer Abbaumechanismen bestimmt.

Für die Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten an Klärschlamm wurden die Zytostatika Fluorouracil und Methotrexat ausgewählt. Die Versuche erfolgten im Labor unter Verwendung eines realen gefriergetrockneten und mit Zytostatikalösungen dotierten Klärschlamms.

Zusätzlich zum Eintrag und Verbleib von Zytostatika in wässrigen Matrizes und im Klärschlamm wurde der mögliche Eintrag in die Atmosphäre untersucht. Ein wesentlicher Arbeitspunkt war hier die Bestimmung des Dampfdrucks einzelner Zytostatika. Der Dampfdruck ist eine wichtige Größe, um das Verteilungsverhalten in den Kompartimenten beurteilen zu können. Auf der Basis des gemessenen Dampfdrucks wurde die Sättigungskonzentration in Luft für abgeschlossene Systeme als „worst-case“ Betrachtung sowie die Verdampfungszeit von pulverförmig vorliegenden Zytostatika-Partikeln unterschiedlicher Größe berechnet.

Die Quantifizierung des Eintrags von Zytostatika in die unterschiedlichen Umweltkompartimente war eine weitere Aufgabenstellung im Rahmen des Untersuchungsvorhabens. Eine eintragspfadorientierte Probenahmestrategie wurde dabei verfolgt. Ausgehend von Krankenhäusern und medizinischen Einrichtungen mit onkologischen Stationen wurden Stichproben genommen von:

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

Der substanzspezifische quantitative Nachweis von Zytostatika in Laborproben und insbesondere in Realproben erfordert 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 Detektionsverfahren wurden HPLC-DAD, HPLC mit Fluoreszenz-Detektion sowie CE-DAD und GC-MS, GC-MS/MS und HRGC-HRMS eingesetzt. Für alle untersuchten Zytostatika stehen damit Methoden zur Verfügung, um mit den aufgeführten Nachweisverfahren die quantitative Bestimmung in Labor- und Realproben durchführen zu können.
Eine wesentliche Optimierung der Bestimmungsgrenzen von Zytostatika in Realproben aus den Matrizes Wasser und Luft erfolgte durch die Entwicklung von Nachweisverfahren mittels Massenspektrometrie. Die entwickelten Methoden sind für ausgewählte Zytostatika einsetzbar und erweitern die Bestimmungsgrenzen in wässrigen Matrizes bis in den Bereich von einigen Nanogramm pro Liter.

3 Geprüfte und angewendete Verfahren

Im folgenden sind einige Verfahren aufgelistet, die zur Analyse von Realproben geeignet sind und je nach Anwendungsfall eingesetzt wurden. Die genannten Bestimmungsgrenzen beziehen sich auf die im Projekt untersuchten Realproben. Ausführliche Arbeitsanweisungen sind im Anhang aufgeführt. Weitere Verfahren zur Konzentrationsbestimmung in Laborproben sind detailliert im Abschlussbericht beschrieben.

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

Substanz	*Wiederfindungsrate*	*Bestimmungsgrenze*
Cyclophosphamid	70 – 90 %	10 ng/l
Ifosfamid	70 – 90 %	10 ng/l

II Bestimmung von Cyclophosphamid, Ifosfamid und 5-Fluorouracil in Oberflächenwasser mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion und GC-MS/MS

Substanz	*Wiederfindungsrate*	*Bestimmungsgrenze*
Cyclophosphamid	80 – 120 %	< 1 µg/l
Ifosfamid	80 – 120 %	1 µg/l
5-Fluorouracil	60 – 80 %	20 ng/l

III Bestimmung von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Oberflächenwasser mittels Festphasen-Extraktion und hochauflösender GC-MS (HRGC-HRMS)

Substanz	*Wiederfindungsrate*	*Bestimmungsgrenze*
Cyclophosphamid	70 – 90 %	10 ng/l
Ifosfamid	70 – 90 %	10 ng/l

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

Substanz	*Wiederfindungsrate*	*Bestimmungsgrenze*
Cyclophosphamid	80 – 120 %	50 ng/l
Ifosfamid	80 – 120 %	50 ng/l

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

Substanz	*Wiederfindungsrate*	*Bestimmungsgrenze*
Methotrexat	70-90%	3 mg/kg Trockenmasse
7-OH-Methotrexat	60-80%	14 mg/kg Trockenmasse
Etoposid	60-80%	2 mg/kg Trockenmasse

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

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

* Annahme: Wiederfindungsrate = 100 %

4 Erste Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Im folgenden werden einige exemplarische Ergebnisse der Untersuchungen von Labor- und Realproben vorgestellt und daraus resultierende Schlussfolgerungen abgeleitet.

Auswertung von Laborproben

So zeigen z.B. die Abbauversuche von Zytostatika in der Modellkläranlage, 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 sind nicht abbaubar.
Die Untersuchungen zum Abbauverhalten zeigen, dass es neben abbaubaren Zytostatika auch solche gibt, die die Kläranlagen passieren und bis in die Vorfluter gelangen können.

Adsorptionsversuche zeigen, dass keine signifikante Adsorption der Substanzen 5-Fluorouracil und Methotrexat an Schlammpartikeln erfolgt. Für den Metaboliten 7-Hydroxy-Methotrexat ergab sich dagegen ein positiver Befund bei der Extraktion des dotierten Schlammes. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine Adsorption organischer Spurenbestandteile am Klärschlamm nicht auszuschließen und damit die Kontamination von Klärschlamm mit Zytostatika möglich ist.

Untersuchungen zum Verdampfungsverhalten von pulverförmig vorliegenden zytostatikahaltigen Partikeln weisen darauf hin, dass diese 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 die 100-fache Zeit. Über Größe und Anzahl der beim Umgang mit Zytostatika entstehen-

den Partikel ist bisher nichts bekannt. Hierzu sind spezielle Untersuchungen erforderlich, die dann auch Rückschlüsse über die realen Verdampfungszeiten zulassen.

Auswertung von Realproben

Die im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsvorhabens genommenen Realproben wurden mit den oben beschriebenen Verfahren analysiert. Bei den Proben handelte es sich um Stichproben. Es wurden drei Messkampagnen, beginnend bei den Hauptsammlern der Krankenhausabwässer bis zu den Vorflutern, durchgeführt. Des weiteren erfolgten in zwei Krankenhausapotheken, in denen Zytostatika zubereitet wurden, sowohl Probenahmen für Emissionsmessungen an einem Fortluftsystem als auch Probenahmen für diffuse Quellen in der Raumluft der Apotheken.

Mit Zytostatika belastete Realproben wurden sowohl in der Matrix Wasser als auch in der Matrix Luft gefunden. Die untersuchten Klärschlämme zeigten keine positiven Befunde. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Realproben der Klärschlämme mit dem Verfahren ohne Anreicherung untersucht wurden. Eine Anreicherung des Extraktes war nicht möglich, da bei den untersuchten Schlämmen kein ausgeprägtes Sedimentationsverhalten – im Gegensatz zu den gefriergetrockneten und aufgeschlämmten Proben – zu beobachten war.

Bei den detektierten Zytostatika handelte es sich um Cyclophosphamid und Ifosfamid. In der Matrix Wasser lagen die Konzentrationen der positiven Proben bei zwei der drei beprobten Hauptsammler 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 Stichproben genommen, die nicht homogenisiert wurden.

In der Matrix Luft betrugen die Konzentrationen in den Emissionsproben 17 ng/m^3 bis 13 µg/m^3 gasförmiges Cyclophosphamid. Innerhalb der Raumluft von Krankenhausapotheken mit Zytostatikazubereitung wurden Konzentrationen im Bereich von

1 ng/m^3 bis 223 ng/m^3 partikuläres und von 45 ng/m^3 bis 600 ng/m^3 gasförmiges Cyclophosphamid bestimmt.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Laboruntersuchungen und die Auswertungen von Realproben darauf hin, dass Zytostatika in die Umwelt gelangen können und dort verteilt werden. Die quantitative Analyse von ersten Stichproben gibt Hinweise auf die zu erwartenden Konzentrationen von Zytostatika in den einzelnen Umweltkompartimenten.
Die ökotoxikologische Bewertung der Umweltbelastung aufgrund der ermittelten Konzentrationen sowie die Schlussfolgerungen aus allen im Rahmen des Untersuchungsvorhabens ermittelten Ergebnissen und eine abschließende ausführliche Diskussion sind Teil des Abschlussberichts, der zum Jahresende 2000 vorliegen wird.

Anhang

Im folgenden sind einige Verfahren aufgelistet, die zur Analyse von Realproben geeignet sind und je nach Anwendungsfall eingesetzt wurden. Weitere Verfahren zur Konzentrationsbestimmung in Laborproben sind detailliert im Abschlussbericht beschrieben.

I Bestimmung von 5-Fluorouracil in Oberflächenwasser mittels Flüssig-/Flüssig-Extraktion und GC-MS/MS

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)
Trägergas:	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-ClU)
Qualifierion:	m/z = 213
Speicherzeit:	8 ms
Dissoziationszeit:	30 ms (5-FU), 20 ms (5-ClU)
Stabilitätsfaktor:	q = 0,45 (5-FU), 0,225 (5-ClU)
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

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

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 Inertgas-strom bis zur Trockne einengen.
Wiederfindungsraten:	Cyclophosphamid: Rs = 80 – 120 % Ifosfamid: Rs = 80 – 120 %

II ii Derivatisierung

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

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

II 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).

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

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

Probe: 1000 ml Oberflächenwasser

Interner Standard: d_4-Cyclophosphamid

III i Anreicherung

Sorbens: Extraktionsdisks: 500 mg C_{18} Octadecyl, ∅ 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_2PO_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 lassen. Anschließend jedes Mal durch Anlegen eines Vakuums die Kartusche trockenziehen.

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

Wiederfindungsraten: Cyclophosphamid: Rs = 70 – 90 %
Ifosfamid: Rs = 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

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

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-Hydroxymethotrexat.

IV ii Anreicherung

Sorbens:	Extraktionsdisks: 500 mg C_{18} Octadecyl, ∅ 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/CH_2Cl_2 50/50 (v/v) auf die Scheibe geben, jeweils 2 min ohne Unterdruck einwirken lassen, dann langsam durchsaugen.
Einengen:	Eluat im schwachen Inertgasstrom (N_2 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 eingeengten 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-Hydroxymethotrexat:	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-Methotrexat:	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)

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

Probe:	50 ml Oberflächenwasser
Interner Standard:	CPd_4, entsprechend der erwarteten Konzentration von CP und IF.
V i Anreicherung	siehe II i
V ii Derivatisierung	siehe II ii

V iii Gaschromatographische Trennung

Probenaufgabe:	1 µl Probe, 90 s splitless
Trennung:	Kapillartrennsäule (DB-5-MS; l = 60 m, di = 0,25 mm, df = 0,25 µm)
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
Qualifierion:	m/z = 307,0149 (CP/IF)
	m/z = 311,0539 (CPd_4)

V v Bestimmungsgrenzen:

Cyclophosphamid:	50 ng/l Oberflächenwasser
Ifosfamid:	50 ng/l Oberflächenwasser

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

Probe:	1000 ml Oberflächenwasser oder Ablauf einer Kläranlage.
Interner Standard:	CPd4, entsprechend der erwarteten Konzentration von CP und IF.

VI i Anreicherung

Sorbens:	Extraktionsdisks: 500 mg C_{18} Octadecyl, ∅ 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, 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: 10 ng/l Oberflächenwasser

Ifosfamid: 10 ng/l Oberflächenwasser

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

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)
Qualifierion:	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/m^3 bzw. 12 ng/m^3. Annahme: Wiederfindungsrate = 100 %