

Vorkommen und Umweltverhalten von Oxazaphosphorin-Cytostatika in Abwasserreinigungsanlagen und Oberflächengewässern

Ignaz J. Buerge, Hans-Rudolf Buser, Thomas Poiger, Markus D. Müller

Projekt Nr. 2001.H.19

BUWAL, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft:
Abteilung Stoffe, Boden, Biotechnologie

Wädenswil, Juni 2005



Autoren: Ignaz J. Buerge, Hans-Rudolf Buser, Thomas Poiger, Markus D. Müller

Agroscope

Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau

Pflanzenschutzchemie

Postfach 185

CH-8820 Wädenswil

e-mail: ignaz.buerge@faw.admin.ch

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1. Einleitung	7
2. Wirkungsmechanismus von Oxazaphosphorin-Cytostatika	9
3. Verbrauchszahlen von Cyclophosphamid und Ifosfamid	11
4. Erwartete Konzentrationen in Abwässern und natürlichen Gewässern	13
5. Oxazaphosphorine in Abwässern und natürlichen Gewässern - Literaturdaten	15
6. Analytik von Oxazaphosphorinen	17
6.1 Literaturübersicht	17
6.2 Methodenentwicklung basierend auf GC-MS	18
6.3 Methodenentwicklung basierend auf LC-MS-MS	25
6.4 Suche nach Oxazaphosphorin-Metaboliten in Patienten-Urin	29
7. Umweltverhalten von Oxazaphosphorinen	33
7.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	33
7.2 Abbauverhalten in Abwasserreinigungsanlagen	34
7.2.1 Literaturübersicht	34
7.2.2 Belebtschlamminkubationen	34
7.3 Abbauverhalten in Oberflächengewässern	36
7.3.1 Inkubationen in Seewasser	37
7.3.2 Extrapolation auf Oberflächengewässer	44
7.4 Weitere Angaben zum Abbauverhalten	46
8. Oxazaphosphorine in Abwässern und Oberflächengewässern - Messdaten aus dem Kanton Zürich	47
8.1 Auswahl der Wasserproben	47
8.2 Probenahme und Analytik	48
8.3 Vorkommen von Oxazaphosphorinen in Abwasserreinigungsanlagen	50
8.4 Vorkommen von Oxazaphosphorinen in Oberflächengewässern	57
8.5 Massenbilanz Limmat - ARA Werdhölzli	60
9. Ausblick	61
10. Literatur	63
Dank	67

Zusammenfassung

Die cytostatischen Arzneimittel Cyclophosphamid und Ifosfamid werden zur Behandlung verschiedener Formen von Krebs und zur Therapie gewisser Autoimmunerkrankungen angewendet. Die Verbindungen werden nur teilweise metabolisiert und gelangen nach renaler Ausscheidung über Spitalabwässer oder häusliche Abwässer in Abwasserreinigungsanlagen (ARA) und schliesslich in die aquatische Umwelt.

Bedingt durch ihren Wirkungsmechanismus (unspezifische Alkylierungen) ist eine Umweltgefährdung durch diese Verbindungen und ihre primären Abbauprodukte denkbar, z.B. cytotoxische Effekte, Mutagenität oder Immunsuppression bei höheren aquatischen Organismen. In der vorliegenden Arbeit wurden das Vorkommen und Verhalten von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Abwasserreinigungsanlagen und Oberflächengewässern untersucht.

Eine erste Abschätzung der in Abwässern und natürlichen Gewässern erwarteten Konzentrationen wurde ausgehend von Verbrauchsdaten gemacht. In der Schweiz wurden durch die Firma Baxter AG, die einzige Bewilligungsinhaberin, im Jahr 2002 insgesamt 55 kg Cyclophosphamid und 12 kg Ifosfamid verkauft. Genaue Verbrauchszahlen waren auch für einzelne Spitäler erhältlich. Die aus diesen Daten unter Berücksichtigung typischer renaler Ausscheidungsraten ($\approx 13-15\%$) abgeschätzten, durchschnittlichen Konzentrationen im Abwasser kommunaler Kläranlagen liegen im Bereich von wenigen ng/L. In Kläranlagen mit hohem Spitalabwasseranteil können aber höhere Konzentrationen erwartet werden (mittlerer ng/L-Bereich). In Oberflächengewässern dürften die Konzentrationen, infolge weiterer Verdünnung, in der Regel deutlich unter 1 ng/L liegen, mit der Ausnahme kleiner Vorfluter mit hohem Abwasseranteil, wo Konzentrationen im tiefen ng/L-Bereich möglich sind.

Um die Verbindungen in Abwasser und Oberflächengewässern nachweisen zu können, musste eine sehr empfindliche Analysenmethode entwickelt werden. Eine basierend auf GC-MS entwickelte Methode erwies sich als deutlich empfindlicher als bisher in der Literatur publizierte Methoden. Mit LC-MS-MS (Anschaffung im Projektverlauf) konnten die Nachweisgrenzen nochmals deutlich gesenkt werden auf $\approx 0.02-0.1$ ng/L für Proben aus Oberflächengewässern und $\approx 0.2-2$ ng/L für Abwasserproben.

In der Stadt Zürich gibt es mehrere grössere Spitäler mit Onkologieabteilung und zahlreiche Arztpraxen, in denen Cytostatika verabreicht werden. Die Spitalabwässer werden aber stark verdünnt durch die häuslichen Abwässer von ≈ 370000 Einwohnern. Die Kläranlage von Zürich (ARA Werdhölzli) repräsentiert daher eine für städtische Gebiete durchaus typische Situation bezüglich Vorkommen von Cytostatika. Im Abwasser dieser Kläranlage konnten die Verbindungen in Konzentrationen von $\approx 1.4\text{--}6$ ng/L nachgewiesen werden. Mit Analysen im Abwasser der ARA Männedorf wurde dann eine "realistic worst case" Situation erfasst; ein Spital mit relativ grosser Onkologieabteilung, dessen Abwässer in einer kleinen Kläranlage (≈ 9000 Einwohner) gereinigt werden. Umgerechnet auf eine Trockenwettersituation, wurden im Abwasser dieser ARA bis zu ≈ 40 ng/L Cyclophosphamid gefunden (effektiv gemessen wurden bis zu 11 ng/L, allerdings während einer Periode mit ausserordentlich hohen Niederschlägen). Die in Kläranlagen gemessenen Konzentrationen stimmten also mit den erwarteten Konzentrationen überein.

In Abwasserreinigungsanlagen mit Belebtschlammverfahren werden Cyclophosphamid und Ifosfamid nicht eliminiert. So wurden in abflussproportionalen Mischproben von ungereinigtem und gereinigtem Abwasser in etwa die gleichen Konzentrationen resp. Frachten gefunden. Auch in Belebtschlamm-Inkubationsexperimenten mit realistischen Konzentrationen erwiesen sich die zwei Cytostatika als persistent.

Das Verhalten in Oberflächengewässern wurde ebenfalls mit verschiedenen Inkubationsexperimenten im Labor untersucht. Die Verbindungen werden primär durch langsamen hydrolytischen Abbau und Wasseraustausch aus Gewässern eliminiert. Die Hydrolysehalbwertszeit von Cyclophosphamid bei Temperaturen um 10°C beträgt 1-2 Jahre, jene von Ifosfamid gar mehrere Jahre. In seichten, klaren und nitratreichen Gewässern kann indirekter photochemischer Abbau durch $\text{HO}^\cdot$ Radikale eine Rolle spielen. Photochemische Experimente zeigten, dass Cyclophosphamid und Ifosfamid mehr oder weniger diffusionskontrolliert mit $\text{HO}^\cdot$ Radikalen reagieren. In technischen Anlagen zur oxidativen Behandlung von Abwasser oder Trinkwasser ("advanced oxidation processes", AOP) dürften die Verbindungen vermutlich gut abgebaut werden.

Die zwei Cytostatika wurden schliesslich in einigen Oberflächengewässern aus dem Kanton Zürich analysiert. Im Zürichsee und in der Limmat beim Ausfluss

aus dem See lagen die Konzentrationen von Cyclophosphamid im Bereich der Nachweisgrenze ($\approx 0.05\text{-}0.07\text{ ng/L}$). In der Limmat bei Dietikon, $\approx 6\text{ km}$ unterhalb der ARA Werdhölzli, wurden dann etwas höhere Konzentrationen von $0.15\text{-}0.17\text{ ng/L}$ gemessen. Die Zunahme der Cyclophosphamid-Fracht in der Limmat um $\approx 1\text{ g/Tag}$ konnte durch die Einleitung von gereinigtem Abwasser aus der Kläranlage Werdhölzli erklärt werden, wo gleichzeitig Proben genommen und analysiert wurden.

Die Konzentrationen von Ifosfamid waren tendenziell etwas tiefer und betrugen $< 0.05\text{ ng/L}$ im Zürichsee und in der Limmat oberhalb der ARA Werdhölzli und $\approx 0.08\text{-}0.14\text{ ng/L}$ in der Limmat unterhalb der ARA Werdhölzli.

Die in Oberflächengewässern gemessenen Konzentrationen waren insgesamt um Grössenordnungen tiefer als die Konzentrationen, bei denen akute, ökotoxikologische Effekte nachgewiesen wurden (bei Fischen und Daphnien im mg/L -Bereich). Studien zur chronischen Ökotoxizität bei aquatischen Organismen, wie etwa Mehrgenerationenstudien, Reproduktionstests, Tests zur Immunsuppression u.a., wurden in der Literatur jedoch keine gefunden. Immerhin kann das Bioakkumulationspotenzial aufgrund der tiefen Octanol-Wasser-Verteilungskonstanten als sehr gering eingestuft werden.

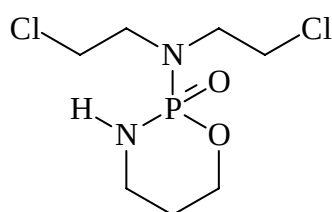
Auch gewisse Metaboliten von Cyclophosphamid und Ifosfamid können ökotoxikologische Bedeutung haben. Ausgehend von einem Patienten-Urin konnte eine qualitative, analytische Methode für zwei Metaboliten entwickelt werden. Dabei handelte es sich vermutlich um die inaktiven Verbindungen Carboxy- und Keto-Cyclophosphamid, welche aber in Umweltproben nicht nachgewiesen werden konnten. Die Entwicklung analytischer Methoden für die aktiven, potenziell alkylierenden Metaboliten Cyclophosphamid-Mustard und Ifosfamid-Mustard war hingegen, mangels Verfügbarkeit von Referenzverbindungen, nicht erfolgreich.

Eine abschliessende Risikobeurteilung für Cyclophosphamid und Ifosfamid sowie für ihre Metaboliten bezüglich Auswirkungen auf aquatische Organismen ist derzeit nicht möglich, weil Daten zur chronischen Ökotoxizität fehlen. Der vorliegende Bericht zeigt aber, dass die Konzentrationen in der aquatischen Umwelt auch unter worst-case Bedingungen sehr tief sind.

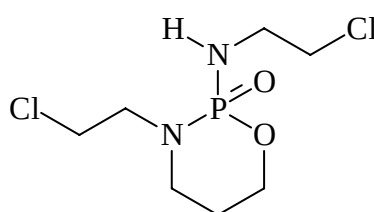
1 Einleitung

Unter der Vielzahl an Fremdstoffen (Xenobiotika), die durch anthropogene Aktivitäten in die Umwelt gelangen, haben Arzneimittel in den letzten Jahren vermehrt kritische Beachtung gefunden (1), da sie grundsätzlich biologische Effekte auslösen können. Die Verbindungen gelangen überwiegend via renale Ausscheidung und anschliessend über häusliche Abwässer und Abwasserreinigungsanlagen (ARA) in die aquatische Umwelt.

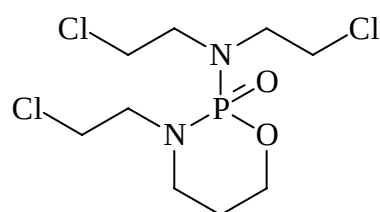
Zu den potentiell umweltgefährdenden Stoffen gehören cytostatische Arzneimittel, die zur Behandlung verschiedener Formen von Krebs in der Chemotherapie und zur Therapie gewisser Autoimmunkrankheiten (z.B. Rheuma) eingesetzt werden. Eine wichtige Gruppe bilden die Oxazaphosphorine, die drei Vertreter umfasst:



Cyclophosphamid



Ifosfamid



Trofosfamid

Handelsnamen: Endoxan, Cyclostin, Cytosan, Neosar	Handelsnamen: Holoxan, IFEX	Handelsname: Ixoten (nicht bewilligt in der Schweiz)
---	-----------------------------	--

In der Literatur wurden mutagene, karzinogene, teratogene und embryotoxische Wirkungen beschrieben (zitiert in (1-4)). Bedingt durch deren Wasserlöslichkeit, Stabilität und Wirkungsmechanismus (unspezifische Alkylierungen) ist eine Umweltgefährdung durch diese Verbindungen und ihre primären Abbauprodukte denkbar, z.B. cytotoxische Effekte, Mutagenität oder Immunsuppression bei höheren aquatischen Organismen.

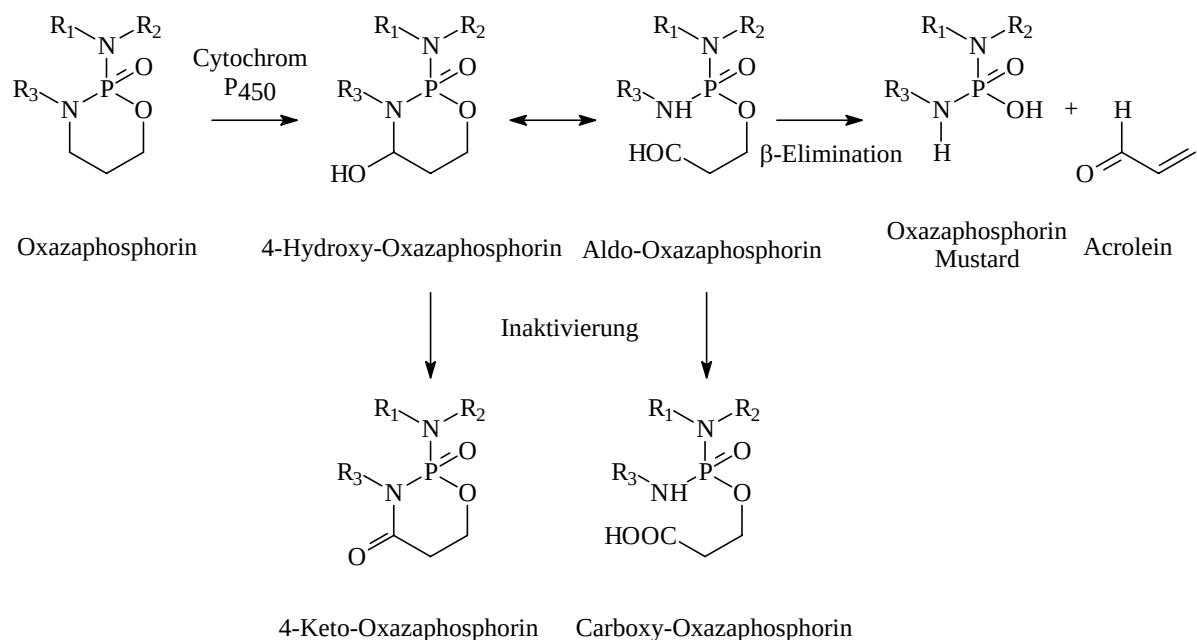
Der vorliegende Bericht fasst den aktuellen Wissensstand bezüglich Vorkommen (bezogen auf die Situation in der Schweiz) und Verhalten von Cyclophosphamid und Ifosfamid in der aquatischen Umwelt zusammen. Es wurden zwei analytische Methoden (GC-MS, LC-MS-MS) entwickelt, die es erlauben, die Oxazaphosphorine in Spurenkonzentrationen (sub-ng/L-Bereich) in ARA-Abwässern und Oberflächengewässern zu erfassen. Im Labor wurde das Abbauverhalten (biologischer, chemischer und photochemischer Abbau) der Verbindungen in Abwasser- und Seewassermatrix studiert. Aus Verbrauchszahlen, hydrologischen Daten und unter Berücksichtigung der relevanten Eliminationsprozesse wurden die in Abwasserreinigungsanlagen und Oberflächengewässern erwarteten Konzentrationen abgeschätzt und anschliessend mit gemessenen Konzentrationen verglichen.

2

Wirkungsmechanismus von Oxazaphosphorin-Cytostatika

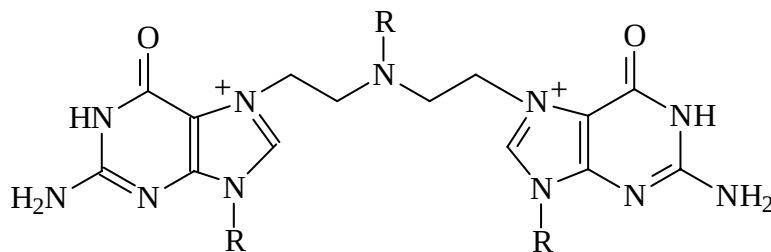
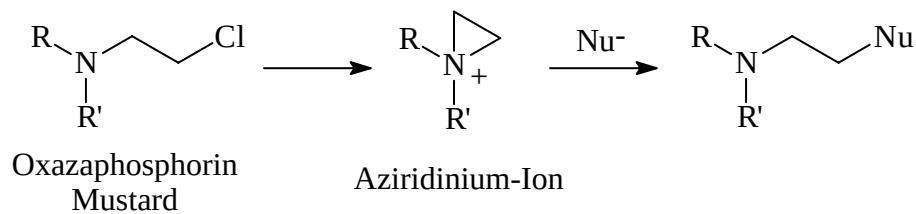
Cytostatika sind natürliche oder synthetische Substanzen, die das Zellwachstum bzw. die Zellteilung hemmen. Sie greifen unspezifisch in den Stoffwechsel von Tumorzellen und anderen schnell wachsenden Zellen ein, indem sie die Vervielfältigung oder das Auslesen der Erbsubstanz (DNA) stören. Je nach Wirkungsmechanismus unterscheidet man DNA-alkylierende, -interkalierende, -strangbrechende Agentien u.a.m.

Oxazaphosphorine gehören zu den alkylierenden Wirkstoffen, die allerdings erst nach metabolischer Umsetzung cytostatisch wirken. Die Aktivierung erfolgt in der Leber unter Beteiligung des Cytochrom-P₄₅₀-Enzymsystems zum entsprechenden Oxazaphosphorin Mustard (5).



Cyclophosphamid $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$; Ifosfamid $R_1 = R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $R_2 = \text{H}$; Trofosfamid $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$

Der Oxazaphosphorin Mustard reagiert in der Folge mit nucleophilen Gruppen (Nu^-) von z.B. DNA oder Proteinen (nucleophile Substitution). Durch Cl-Substitution an einer zweiten Chlorethylgruppe können DNA-Stränge quervernetzt werden (cross-linking), was zu Codierungsfehlern bei der Replikation führt.



cross-linking zweier Guanin-Basen

Cyclophosphamid bewirkt auch eine Dämpfung der körpereigenen Abwehr (Immunsuppression) und wird zur Behandlung von rheumatoider Arthritis und bei Knochenmarktransplantationen eingesetzt (5).

3

Verbrauchszahlen von Cyclophosphamid und Ifosfamid

Gemäss Angaben der Firma Baxter AG, der einzigen Bewilligungsinhaberin, wurden in der Schweiz im Jahr 2002 insgesamt 55 kg Cyclophosphamid und 12 kg Ifosfamid verkauft (6). Verbrauchszahlen konnten auch bei einzelnen Spitälern erfragt werden (Tabelle 1). Im Universitätsspital Zürich beispielsweise wurden im Jahr 2001 rund 1 kg Oxazaphosphorin-Cytostatika verabreicht, was etwa 1.5 % des gesamtschweizerischen Verbrauchs entspricht.

Tabelle 1

Verabreichte Mengen an Cyclophosphamid und Ifosfamid in drei Spitälern im Kanton Zürich, 2001.

Spital	Spitalaufenthalt	Cyclophosphamid	Ifosfamid
Kreisspital Männedorf	in der Regel ambulant (mindestens 2 Stunden) oder kurzstationär (über Nacht)	132.4 g	124 g
Bezirksspital Affoltern am Albis	in der Regel ambulant (1-2 Stunden)	31.3 g	nicht verabreicht
Universitätsspital Zürich	häufig stationär	ca. 421 g	ca. 572 g

Die Wirkstoffe Cyclophosphamid und Ifosfamid werden in unterschiedlichen Therapieschemata verabreicht. Typische Dosierungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Als Faustregel kann von etwa 1 g Cyclophosphamid resp. 2 g Ifosfamid pro Person und Behandlung ausgegangen werden. Bis zu 50 % der verabreichten Menge wird unmetabolisiert renal wieder ausgeschieden (zitiert in (1)). Typische Werte liegen gemäss Baxter bei etwa 13 % Cyclophosphamid resp. 15 % Ifosfamid (7).

Tabelle 2

Dosierungen von Cyclophosphamid und Ifosfamid in der Chemotherapie (8).

	Cyclophosphamid	Ifosfamid
Dauertherapie	peroral, täglich 50-200 mg intravenös, täglich 120-240 mg/m ² (3-6 mg/kg Körpergewicht)	
Intervalltherapie	intravenös, alle 2-5 Tage 400-600 mg/m ² (10-15 mg/kg Körpergewicht)	intravenös, während ca. 5 Tagen, täglich 0.8-2.4 g/m ² (20-60 mg/kg Körpergewicht)
hochdosierte Intervalltherapie	intravenös, alle 3-4 Wochen 800-1600 mg/m ² (20-40 mg/kg Körpergewicht)	intravenös, während 2-3 Tagen, täglich 3.2 g/m ² (80 mg/kg Körpergewicht)
kontinuierliche Infusion		intravenös, 5-8 g/m ² (125-200 mg/kg)

beim Menschen entsprechen 60 kg etwa 1.5 m²

4

Erwartete Konzentrationen in Abwässern und natürlichen Gewässern

Eine grobe Schätzung für die erwarteten Konzentrationen von Oxazaphosphorinen in Abwässern von Kläranlagen kann ausgehend von obigen Verbrauchszahlen gemacht werden. Bei einem Wasserverbrauch von etwa 500 L pro Person und Tag und unter Berücksichtigung einer Ausscheidungsrate von 13 resp. 15 % beträgt die durchschnittliche Konzentration von Cyclophosphamid und Ifosfamid in ungereinigtem Abwasser etwa 5.4 resp. 1.4 ng/L (basierend auf Verkaufszahlen für die Schweiz).

In Abwasserreinigungsanlagen mit hohem Spitalabwasseranteil sind die erwarteten Werte entsprechend höher, z.B. für die ARA Männedorf (Abwassermenge $\approx 2.2 \text{ Mio m}^3/\text{Jahr}$ (9)) kann mit den Verbrauchszahlen aus Tabelle 1 eine durchschnittliche Konzentration von je etwa 8 ng/L Cyclophosphamid und Ifosfamid errechnet werden. Abhängig von der Anzahl aktuell behandelter Patienten können zeitlich erhöhte Konzentrationen auftreten (mittlerer ng/L-Bereich).

In Oberflächengewässern dürften die Konzentrationen infolge weiterer Verdünnung und allfälliger Elimination in der Regel im pg/L-Bereich liegen. Für den Greifensee und Zürichsee beispielsweise wurden die durchschnittlichen Konzentrationen, unter der konservativen Annahme, dass die Verbindungen in Kläranlagen und Oberflächengewässern nicht eliminiert werden, auf 0.2-0.8 ng/L resp. 0.03-0.12 ng/L abgeschätzt (Tabelle 3). Diese Abschätzung berücksichtigt allerdings nicht eine allfällige Konzentrierung der Einleitung auf Gemeinden mit Spitälern, welche eine Onkologieabteilung führen. In kleinen Vorflutern mit hohem Abwasseranteil sind Konzentrationen im tiefen ng/L-Bereich möglich.

Tabelle 3

Abschätzung der Cytostatika-Konzentrationen im Greifensee und Zürichsee (Untersee).

	Greifensee	Zürichsee
Anzahl Einwohner im Einzugsgebiet	107 000	330 000
Verkaufszahlen Cyclophosphamid ^a [kg]	55.0	
Ifosfamid ^a	12.1	
Ausscheidungsrate Cyclophosphamid ^b [%]	13	
Ifosfamid ^b	15	
Elimination in ARA und Oberflächengewässern	nicht berücksichtigt	
Seevolumen [Mio m ³]	148	3360
mittlere Wasseraufenthaltszeit [Jahre]	1.1	1.2
geschätzte Konzentration im See [ng/L]		
Cyclophosphamid	0.8	0.12
Ifosfamid	0.2	0.03

^a Schweiz, 2002, 7.3 Mio Einwohner (6)

^b Referenz (7)

5

Oxazaphosphorine in Abwässern und natürlichen Gewässern - Literaturdaten

Die in der Literatur gefundenen Messdaten zu Cyclophosphamid und Ifosfamid in Spitalabwässern, Abwasserreinigungsanlagen, Oberflächengewässern, Trinkwasser und Flusssedimenten sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die höchsten Konzentrationen wurden erwartungsgemäss in Spitalabwässern gemessen (bis 4.5 µg/L Cyclophosphamid). In kommunalen ARA-Abwässern lagen die Konzentrationen in der Regel im tiefen ng/L-Bereich. In Oberflächengewässern wurden die Verbindungen nur vereinzelt detektiert.

Tabelle 4

Konzentrationen von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Abwässern, natürlichen Gewässern und Flusssedimenten (Literaturübersicht).

	Konzentration [ng/L]
Spitalabwasser ^a	Cyclophosphamid: 19-4500 (2), 146 (10) Ifosfamid: < 6-1900 (Median 109) (11), 24 (10)
Ungereinigtes Abwasser ^a	Cyclophosphamid: < 6-143 (2) Ifosfamid: < 6-29 (Median 6.2-8.5) (11)
Gereinigtes Abwasser ^a	Cyclophosphamid: 7-17 (2), bis 20 (12) Ifosfamid: < 6 - 43 (Median 6.5-9.3) (11), bis 2900 (12)
Oberflächengewässer ^{a, b}	Cyclophosphamid: < 10 (12) ^a , < 0.02-10 (13) ^b Ifosfamid: < 10 (12) ^a
Trinkwasser ^b	Cyclophosphamid: < 0.02 (13)
Flusssedimente ^b	Cyclophosphamid: < 12 ng/kg (13)

^a Proben aus Deutschland

^b Proben aus Italien, Analytik nicht beschrieben, tiefe Nachweisgrenze eventuell fragwürdig

6

Analytik von Oxazaphosphorinen

6.1 Literaturübersicht

Zur Analytik von Cyclophosphamid und Ifosfamid wurden zahlreiche Methoden publiziert, aber nur selten wurden die Verbindungen in Umweltproben gemessen. Die Arbeitsgruppe um Kümmerer und Steger-Hartmann extrahierten die zwei Cytostatika aus Spitalabwässern und ARA-Abwässern über eine C₁₈-Festphase, reinigten über Silicagel und derivatisierten die Verbindungen mit Trifluoressigsäureanhydrid (10). Die anschliessende GC-MS Analyse (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) mit Trofosfamid als internem Standard ergab Nachweisgrenzen von 7 ng/L für Ifosfamid und 6 ng/L für Cyclophosphamid.

Ternes et al. reicherten die Oxazaphosphorine ebenfalls auf einer C₁₈-Festphase an und analysierten schliesslich mit GC-MS oder LC-MS-MS (Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie) (14). Wegen Interferenzen mit co-eluierenden Verbindungen waren die Nachweisgrenzen bei GC-MS höher als bei LC-MS-MS (GC-MS: 50 ng/L in Trinkwasser- und Flusswasserproben, 100-250 ng/L in gereinigten ARA-Abwässern; LC-MS-MS: 10 ng/L in allen Wasserproben). Die Wiederfindungsraten betrugen $(51-57) \pm (35-37) \%$ bei GC-MS und $(45-47) \pm 7 \%$ bei LC-MS-MS.

Momerency et al. erarbeiteten eine Methode für die Analyse von Ifosfamid, Cyclophosphamid und verschiedener Metaboliten aus Blutplasma (15,16). Nach Anreicherung auf einer C₁₈-Festphase wurden die Verbindungen zuerst mit Diazomethan in Diethylether methyliert und anschliessend mit Trifluoressigsäureanhydrid in Ethylacetat acetyliert. Analysiert wurde mit GC-MS, wobei sich chemische Ionisation mit Methan als Reaktions-Gas und Detektion negativer Ionen (NCI) als empfindlicher erwies als Elektronenstossionisation (EI) oder CI mit Detektion positiver Ionen (PCI).

Insgesamt reicht aber die Empfindlichkeit aller hier beschriebenen Methoden nicht aus, um die Verbindungen in natürlichen Gewässern detektieren zu können.

Wir haben deshalb die Entwicklung einer hoch-empfindlichen, selektiven Analytik mit hoher Priorität betrieben, um die Verbindungen einerseits mit GC-MS und andererseits mit LC-MS-MS analysieren zu können.

6.2 Methodenentwicklung basierend auf GC-MS

6.2.1 Experimentelles

Chemikalien

Ifosfamid (Referenzstandard) wurde bei USP, Rockville, MD bezogen, Cyclophosphamid Monohydrat (Cyclophosphamid, 94 %), Trifluoressigsäureanhydrid (≥ 99.0 %), Pyridin (> 99.8 %) und Hexachlorbenzol (≥ 99.0 %) bei Fluka, Buchs, Schweiz.

Festphasenextraktion

Als Extraktionsmaterial für Abwasser- und Seewasserproben wurde ein wiederverwendbares, poröses Polystyrol-Divinylbenzol Harz benutzt (Bio-Beads SM-2, 20-50 mesh, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ca. 10 mL Festphasenmaterial wurden in Chromatographiesäulen gefüllt und vor Gebrauch mit Dichlormethan, Methanol und Wasser gereinigt und konditioniert. Für ungereinigtes Abwasser, gereinigtes Abwasser und Seewasser wurden unterschiedliche Säulen verwendet, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Wasserproben wurden ohne Zugabe eines internen Standards aufgearbeitet, da keine isotoopenmarkierten Verbindungen (z.B. ^{13}C -Cyclophosphamid, ^{13}C -Ifosfamid) zur Verfügung standen und das in der Schweiz nicht bewilligte Trofosfamid mit vertretbarem Aufwand nicht beschafft werden konnte.

Abwasserproben (330-600 mL) resp. Seewasserproben (1 L) wurden mit einer Tropfgeschwindigkeit von ≈ 10 mL/min extrahiert. Die Elution von Cyclophosphamid und Ifosfamid erfolgte mit 5 mL Methanol, welches auch Restmengen an Wasser aus den Säulen entfernte, und anschliessend mit 10 mL Dichlormethan. Der kombinierte Extrakt wurde ausgeschüttelt und nach erfolgter Phasentrennung wurde die Dichlormethan-Phase in ein Glasvial transferiert. Eine zweite und dritte Portion von 10 resp. 5 mL Dichlormethan wurde dann über die Säulen geschickt, mit der

methanolischen Phase ausgeschüttelt und die Dichlormethan-Phase in das Glasvial übergeführt. Der kombinierte Dichlormethan-Extrakt wurde unter leichtem Luftzug zur Trockne gebracht, in 100 µL Ethylacetat aufgenommen und derivatisiert.

Derivatisierung

Die Ethylacetat-Extrakte wurden mit 5 µL Pyridin (Base und Katalysator) und ca. 50 µL Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) versetzt, gut verschlossen und während 20 min bei 80 °C derivatisiert. Die Proben wurden mit einem Strom von Stickstoff auf wenige µL eingengt und in 500 µL Toluol gelöst. Anschliessend wurden 10 µL einer Hexachlorbenzol (HCB)-Lösung (≈ 2 ng/µL in Toluol) als interner Standard zugegeben. Obwohl HCB als ubiquitäre Umweltchemikalie in Abwässern und Oberflächengewässern auftritt, waren die zugesetzten Mengen von 20 ng deutlich höher als allfälliges HCB in den Proben.

GC-MS

Die Analyse der derivatisierten Cytostatika (Cyclophosphamid-TFA, Ifosfamid-TFA) erfolgte mittels GC-MS, mit einem Magnet-Sektorfeld-Massenspektrometer (VG Tribid MS, VG Analytical, Manchester, England) oder einem Quadrupol-Massenspektrometer (Voyager, Finnigan). Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Injektion: 1 µL, on-column, Säule: BGB-5 (BGB Analytik, Adliswil, Schweiz), 15 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm Filmdicke, Temperaturprogramm: 90 °C, 2 min isotherm, 20 °C/min auf 140 °C, 5 °C/min auf 250 °C, 2 min isotherm, Trägergas: He, ≈ 23 kPa.

El-Spektren (70 eV, 180 °C) wurden im Massenbereich m/z 35-435 aufgenommen. Für die Spurenanalyse von Cyclophosphamid-TFA und Ifosfamid-TFA wurden verschiedene Ionisations- und MS-Techniken geprüft (SIM, MRM, MIKES, ECNI):

- SIM (selected ion monitoring): Ionen m/z 307.0 (und 212.0) für Cyclophosphamid-TFA und Ifosfamid-TFA, m/z 283.8 für HCB, Auflösung $M/\Delta M = 400$.
- MRM (multi reaction monitoring): Kollisionsgas Ar, $\approx 10^{-5}$ Torr, 25 eV, Hauptübergang m/z 307 $\rightarrow$ 212, Auflösung $M/\Delta M = 180$ für "Precursor"-Ion, nominale Auflösung für "Successor"-Ion.

- MIKES (mass analyzed ion kinetic energy spectrometry): Kollisionsgas He, $\approx 4 \times 10^{-6}$ Torr, 4000 eV, Übergang m/z 307 $\rightarrow$ 212, Auflösung $M/\Delta M = 400$ für Precursor-Ion, ≈ 50 für Successor-Ion.
- ECNI (electron capture negative ionisation): Puffergas Ar, 10^{-4} Torr, Ionen m/z 293.0 (und 320.0), Auflösung $M/\Delta M = 400$.

Untersuchungen zur thermischen Stabilität der TFA-Derivate

GC-MS-Analysen mit Split/Splitless-Injektion bei 250 °C wiesen darauf hin, dass die derivatisierten Oxazaphosphorine bei erhöhten Temperaturen nicht ausreichend stabil sind. Zur Überprüfung der thermischen Stabilität wurde eine Lösung mit je ca. 1 ng/ μ L Cyclophosphamid-TFA und Ifosfamid-TFA in eine 50 μ L-Glaskapillare eingeschmolzen, während 10 min bei 185 °C im GC-Ofen erhitzt und anschliessend analysiert.

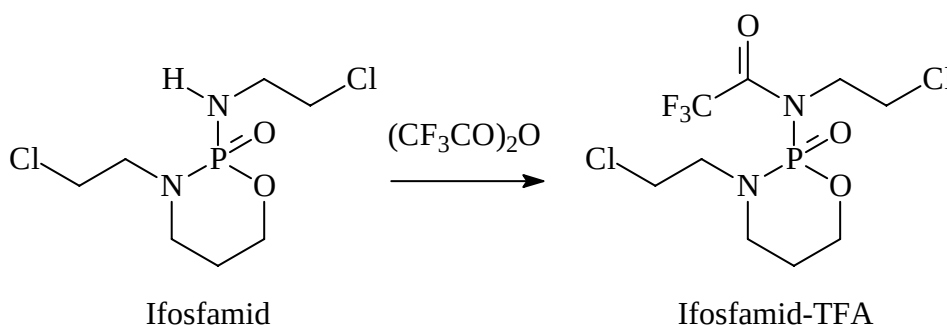
Quantifizierung mit Standardaddition

Da die Trifluoracetylierung in Standards und angereicherten Proben mit unterschiedlicher Ausbeute ablief, konnten die Oxazaphosphorine nicht mit externer Kalibration quantifiziert werden. Die Quantifizierung von Cyclophosphamid und Ifosfamid erfolgte daher durch die aufwendige Methode der Standardaddition. Abwasserproben (330-600 mL) wurden mit je ca. 25, 50 und 100 ng der beiden Oxazaphosphorine versetzt, Seewasserproben (1 L) mit je ca. 20 und 50 ng. Die aufgestockten Proben wurden über die Polystyrol-Divinylbenzol Festphase angereichert, mit TFAA derivatisiert und mit den nicht aufgestockten Proben vergleichend analysiert (siehe oben). Die Peakflächen von Cyclophosphamid-TFA und Ifosfamid-TFA wurden relativ zu HCB bestimmt.

6.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Derivatisierung zu N-TFA Derivaten

Native Standards von Cyclophosphamid und Ifosfamid zeigten bei Verwendung einer BGB-5 Säule ein sehr starkes Tailing (Adsorptionseffekte), so dass die Verbindungen mit TFAA derivatisiert werden mussten. Die Reaktion führt zu N-TFA Derivaten, nachfolgend am Beispiel von Ifosfamid gezeigt:



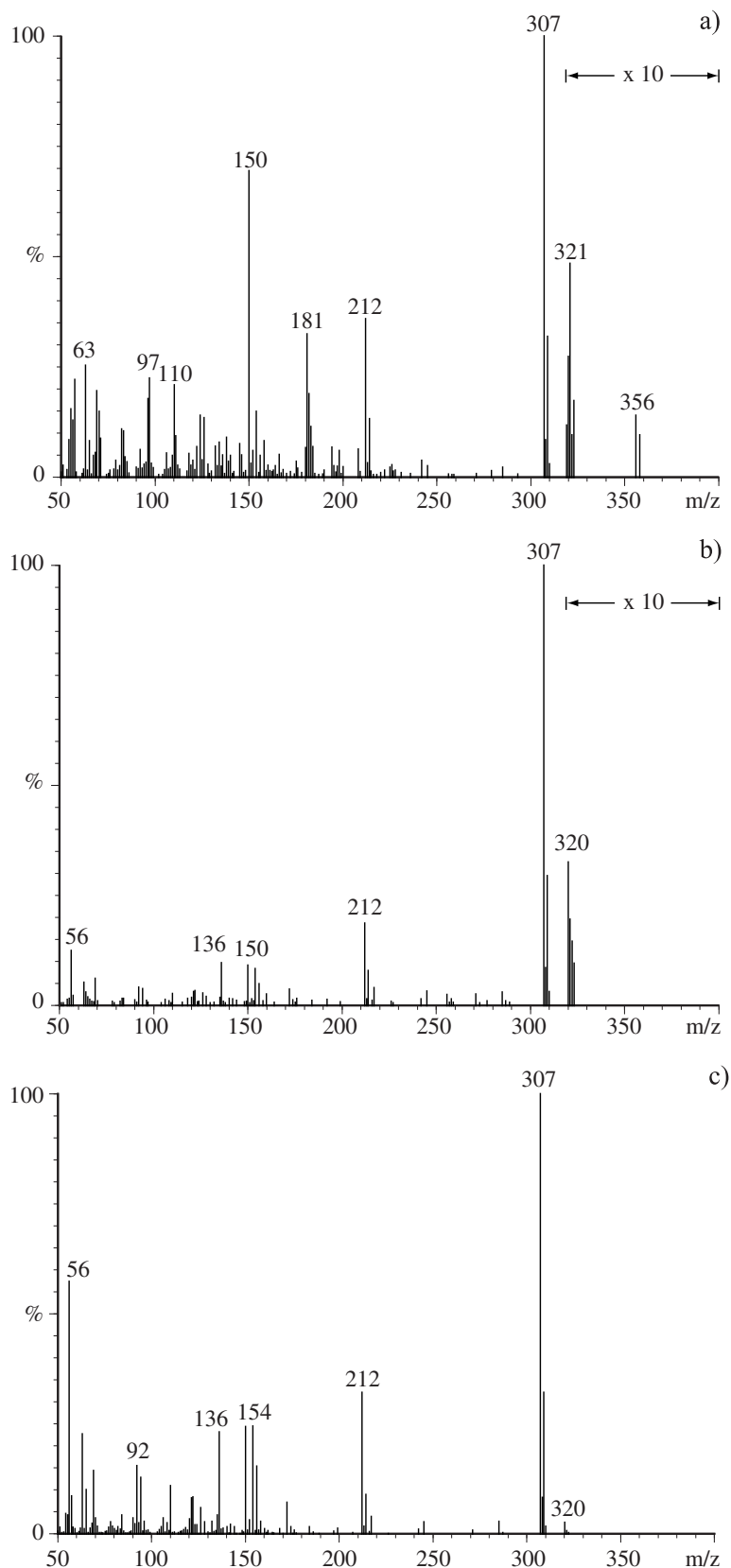
El-Massenspektren von derivatisiertem Cyclophosphamid und Ifosfamid sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Spektren der zwei isomeren Verbindungen zeigen das Molekölion (M^+ , $m/z = 356$, nur bei Ifosfamid-TFA) und intensive Fragmente mit $m/z = 307$ (Basispeak bei beiden Verbindungen, Abspaltung einer CH_2Cl -Gruppe) und $m/z = 212$ (MS-MS zeigte, dass $m/z = 212$ aus $m/z = 307$ entsteht, durch eine komplizierte Umlagerungsreaktion, eventuell unter Abspaltung von CF_3CN).

GC Bedingungen

Die TFA-Derivate sind nicht unter allen Bedingungen stabil. So zerfällt insbesondere Ifosfamid-TFA bei hohen Temperaturen, wie das Thermisierungsexperiment bei $185\text{ }^\circ\text{C}$ während 10 min zeigte. Die Proben wurden daher mit der kalten "on-column"-Technik bei einer Ofentemperatur von $90\text{ }^\circ\text{C}$ injiziert, anstelle der üblichen "Split-Splitlos"-Technik, wo der Injektor auf Temperaturen von über $200\text{ }^\circ\text{C}$ beheizt wird. Um ausserdem eine rasche Elution bei möglichst tiefer Temperatur zu erreichen, wurden eine relativ kurze Säule mit grösserem Innendurchmesser ($15\text{ m} \times 0.32\text{ mm}$) und ein hoher Trägergasfluss (He , 23 kPa) verwendet (siehe oben). Unter diesen chromatographischen Bedingungen eluierten Ifosfamid-TFA und Cyclophosphamid-TFA bei $\approx 172\text{ }^\circ\text{C}$ resp. $182\text{ }^\circ\text{C}$, mit leichtem Tailing (Chromatogramme in Abbildungen 9-11). Auf eine weitere Verbesserung der Chromatographie durch Verwendung von H_2 als Trägergas wurde aus Sicherheitsgründen verzichtet. Ferner zeigte es sich, dass vor allem Cyclophosphamid-TFA bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ nur beschränkt stabil ist. Die Proben wurden daher innerhalb von < 24 Stunden analysiert.

Abbildung 1

El-Massenspektren von trifluoracetylierten Oxazaphosphorinen, a) Ifosfamid Standard, b) Cyclophosphamid Standard und c) Cyclophosphamid, extrahiert aus einer Urinprobe nach einer Chemotherapie-Behandlung.



MS-Bedingungen

Um möglichst tiefe Nachweisgrenzen zu erreichen, wurden verschiedene Ionisations- und MS-Techniken zur Detektion geprüft (SIM, MRM, MIKES, ECNI, siehe oben). EI-SIM erwies sich dabei als die empfindlichste Methode und wurde in der Folge für alle Analysen eingesetzt.

Wiederfindung und Standardaddition

Die Wiederfindung von Cyclophosphamid und Ifosfamid nach der Festphasenextraktion mit dem Polystyrol-Divinylbenzol Harz konnte nicht bestimmt werden, da die anschließende Derivatisierung in Standards und angereicherten Proben unterschiedlich gut ablief. Es zeigte sich, dass die Ausbeute der Trifluoracetylierung stark von der Probenmatrix abhängt, wobei Standards schlechter derivatisiert wurden als die angereicherten Extrakte, was scheinbare Wiederfindungen von deutlich über 100 % zur Folge hatte.

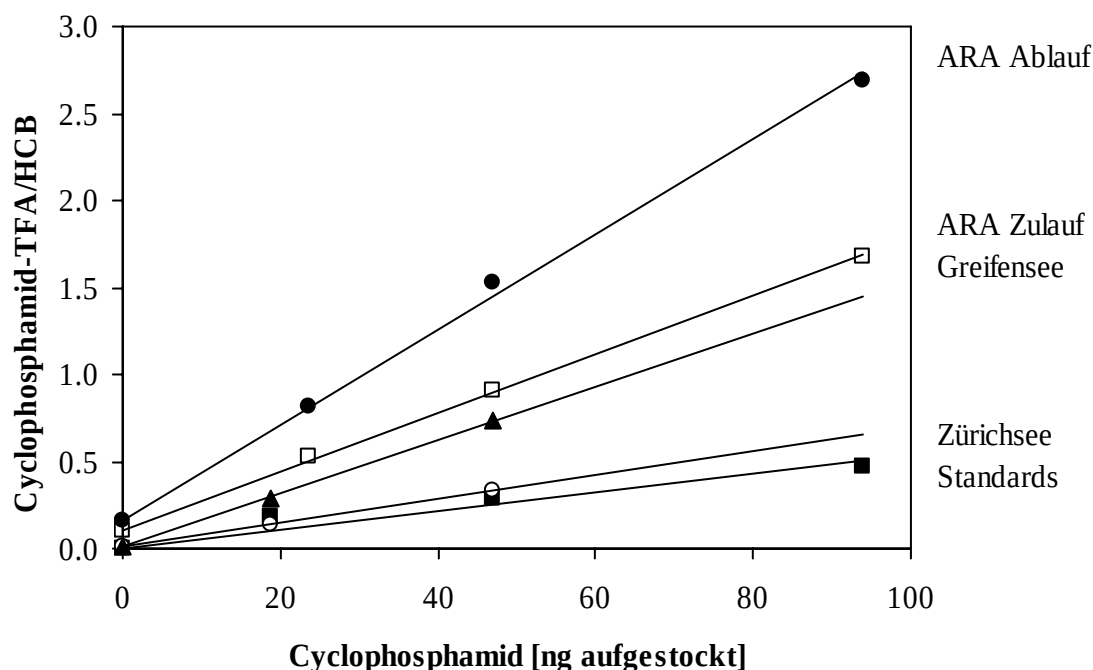
Die Konzentrationen wurden daher mit Standardaddition bestimmt (siehe oben). Abbildung 2 zeigt Standardadditionen von Cyclophosphamid in unterschiedlicher Matrix. Die Ausbeute der Derivatisierung, proportional zur Steigung der Regressionsgeraden in Abbildung 2, nahm wie folgt ab: gereinigtes Abwasser > ungereinigtes Abwasser > Greifenseewasser > Zürichseewasser > Standards. "Verschmutzte" Proben scheinen tendenziell besser derivatisiert zu werden als "saubere" Proben. Die Standardadditionen waren "linear" ($r^2 > 0.99$ in Abwasser- und Seewasserproben, $r^2 > 0.92$ in Standards), d.h. das Signalverhältnis Cyclophosphamid-TFA/HCB nahm linear zu mit der Menge aufgestocktem Cyclophosphamid. Die Menge Cyclophosphamid in den nicht aufgestockten Wasserproben wurde aus dem Verhältnis Achsenabschnitt/Steigung der Regressionsgeraden bestimmt, wobei der Achsenabschnitt fixiert wurde.

Die Derivatisierung von Ifosfamid war in gleicher Weise abhängig von der Matrix und entsprechende Standardadditionen waren ebenfalls linear.

Eine Nachreinigung der derivatisierten Proben über Silicagel war nicht möglich, da die TFA-Derivate hydrolyseempfindlich sind. Auch die underivatisierten Oxazaphosphorine konnten beim Cleanup über Silicagel nur unvollständig eluiert werden.

Abbildung 2

Standardadditionen von Cyclophosphamid zu Abwasserproben, Seewasserproben und Standards. Die Ausbeute der Trifluoracetylierung, proportional zur Steigung der Regressionsgeraden, hängt stark von der Probenmatrix ab.



Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenzen (Signal/Rauschen ≈ 3) für Cyclophosphamid und Ifosfamid lagen bei ≈ 1 ng/L in Seewasserproben, ≈ 2 ng/L in gereinigtem Abwasser und ≈ 4 ng/L in ungereinigtem Abwasser (nur Cyclophosphamid). Die Nachweisgrenze von Ifosfamid in ungereinigtem Abwasser war verhältnismässig hoch (≈ 15 -20 ng/L), wegen einer gleichzeitig eluierenden Verbindung mit $m/z = 307$, die jedoch kein Signal bei $m/z = 212$ zeigte (Abbildung 9).

Mit der hier vorgestellten GC-MS Methode wurden die in der Literatur beschreibenden Nachweisgrenzen z. T. deutlich unterschritten. Cyclophosphamid konnte nun in Abwasserproben detektiert werden (siehe Kapitel 8.3). Trotzdem waren die Nachweisgrenze von Ifosfamid in ungereinigtem Abwasser und die Nachweisgrenzen der beiden Verbindungen in Seewasserproben immer noch zu hoch. Daher wurde im zweiten Projektteil versucht, mit dem neu zur Verfügung stehenden LC-MS-MS, eine noch empfindlichere Methode zu entwickeln.

6.3 Methodenentwicklung basierend auf LC-MS-MS

6.3.1 Experimentelles

Chemikalien

Zusätzlich zu den in Kapitel 6.2.1 erwähnten Chemikalien wurde $^{13}\text{C}_3$ -Koffein als interner Standard verwendet (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA).

Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion wurde im Wesentlichen gleich durchgeführt wie in der GC-MS Methode beschrieben (Kapitel 6.2.1). Es wurden Volumina von ca. 1 L aufgearbeitet. Vor der Extraktion wurden 50 μL (Oberflächengewässer, Grundwasser) resp. 200 μL (Abwasser) einer wässrigen $^{13}\text{C}_3$ -Koffein-Lösung (mit 0.052 ng/ μL) als interner Standard zugegeben. Nach der Extraktion und Aufkonzentrierung wurden die Rückstände nicht in Ethylacetat, sondern in 1 mL Wasser aufgenommen. Dabei konnten nicht alle Komponenten gelöst werden, es kann aber angenommen werden, dass sich die ziemlich hydrophilen Oxazaphosphorine gut lösen lassen.

LC-MS-MS

Cyclophosphamid und Ifosfamid wurden auf einer XTerra RP₁₈ Kolonne (2.1 × 50 mm, particle size, 3.5 μm , Waters, Milford, MA) getrennt unter Verwendung eines HPLC 1100 Series Systems (binäre Pumpe, Mikro-Vacuum Degasser von Agilent, Palo Alto, CA) und eines LC PAL Autosamplers (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz). Chromatographiert wurde mit folgendem Gradienten: 100 % H₂O mit 0.1 % Ameisensäure, linearer Gradient auf 100 % Methanol/0.1 % Ameisensäure innerhalb von 10 min, gefolgt von einer isokratischen Phase von 2 min. Die Flussrate betrug 250 $\mu\text{L}/\text{min}$, das Injektionsvolumen 100 μL .

Die HPLC Kolonne war gekoppelt an ein API 4000 Triple Quadrupol Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Es wurden verschiedene Ionisationstechniken getestet: TIS (Turbo Ion Spray) und APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), je in positivem und negativem Modus (das polare HPLC Laufmittel wurde im negativen Modus durch 2 mM Ammoniumacetat ersetzt), wobei sich TIS positiv (Ionspray Voltage, 5 kV, 400 °C) als die empfindlichste erwies. Im MS-MS-MRM Betrieb wurden folgende Ionenübergänge gemessen: Cyclophos-

phamid m/z 261 $\rightarrow$ 140, Kollisionsenergie, 32 eV (ausserdem zur Bestätigung: 263 $\rightarrow$ 142, 32 eV), Ifosfamid 261 $\rightarrow$ 154, 31 eV (261 $\rightarrow$ 182, 25 eV), $^{13}\text{C}_3$ -Koffein 198 $\rightarrow$ 140, 28 eV.

Quantifizierung mit Standardaddition

Die Konzentration der beiden Oxazaphosphorine wurde durch Standardaddition, im Verhältnis zu $^{13}\text{C}_3$ -Koffein, ermittelt (Addition von 0, 10 resp. 20 μL einer wässrigen Lösung mit 0.124 ng/ μL Cyclophosphamid und 0.149 ng/ μL Ifosfamid zu je 300 μL Extrakt), um mögliche Matrixeffekte während der Ionisation zu korrigieren (siehe unten).

6.3.2 Ergebnisse und Diskussion

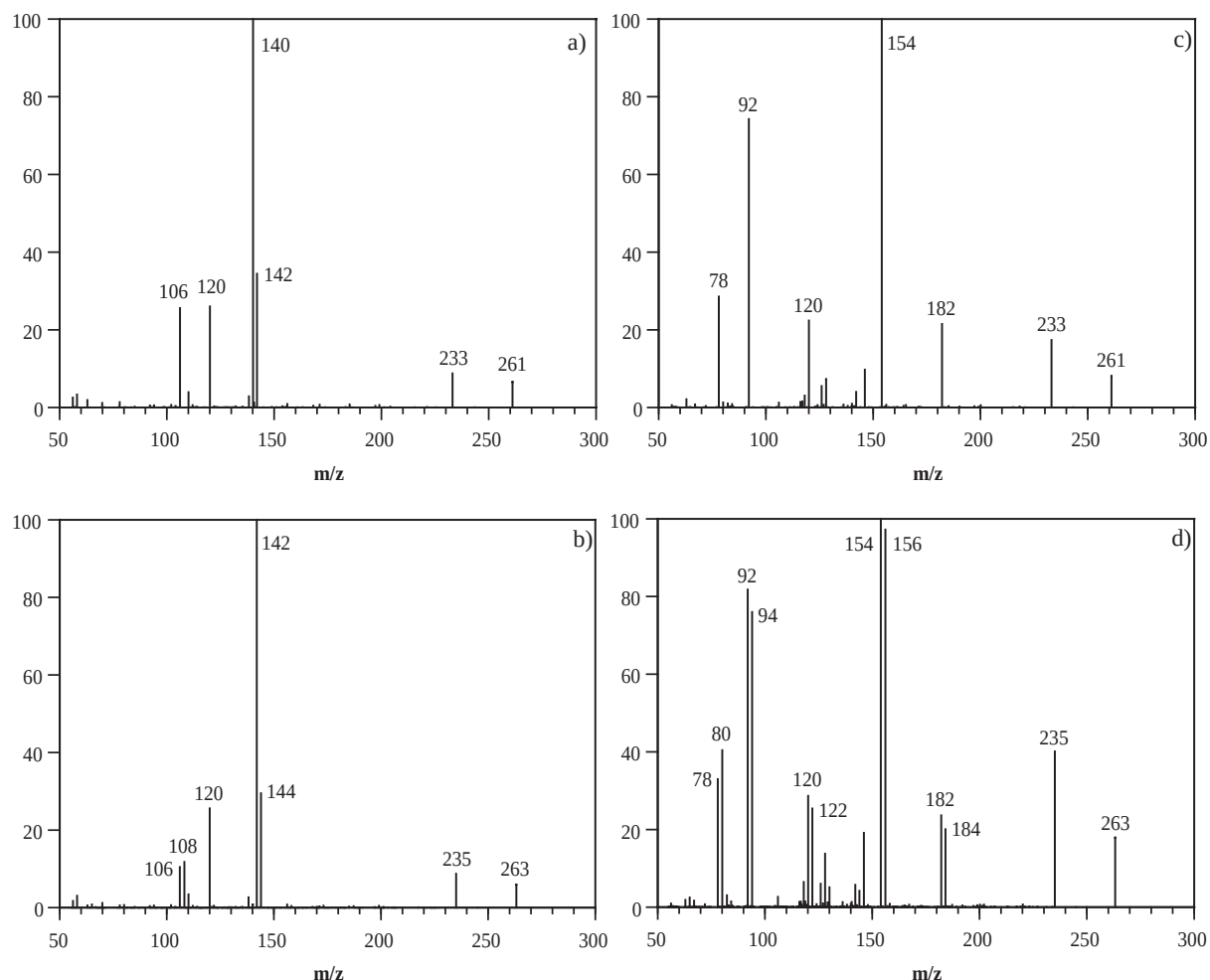
MS-Bedingungen

Abbildung 3 zeigt typische MS-MS Massenspektren ausgehend von den protonierten Oxazaphosphorinen. Die unter den gewählten Bedingungen wichtigste Fragmentierungsreaktion ist bei Cyclophosphamid die Spaltung der N-P Bindung unter Bildung der Ionen m/z = 140 und 120 (ausgehend vom $^{35}\text{Cl}_2$ -Isotop mit m/z = 261). Bei Ifosfamid führt diese Spaltung zu m/z = 182 und 78, wobei vermutlich aus ersterem Ion nach Abspaltung von C_2H_4 das Ion m/z = 154 gebildet wird (mit Cl-shift).

Die empfindlichsten Ionenübergänge wurden anschliessend für den MS-MS-MRM Betrieb weiter optimiert, insbesondere bezüglich Kollisionsenergie und CXP (collision cell exit potential) (siehe oben). Repräsentative Chromatogramme sind in den Abbildungen 12 und 13 gezeigt.

Abbildung 3

Q3-Massenspektren nach CAD-Fragmentierung (collision activated dissociation) der im Q1 selektierten Ionen $m/z = 261$ ($^{35}\text{Cl}_2$ -Isotopen von a) protoniertem Cyclophosphamid, c) protoniertem Ifosfamid) und $m/z = 263$ ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}$ -Isotopen, b) resp. d)). TIS positiv, 5 kV, 400 °C, Kollisionsenergie 32 eV.

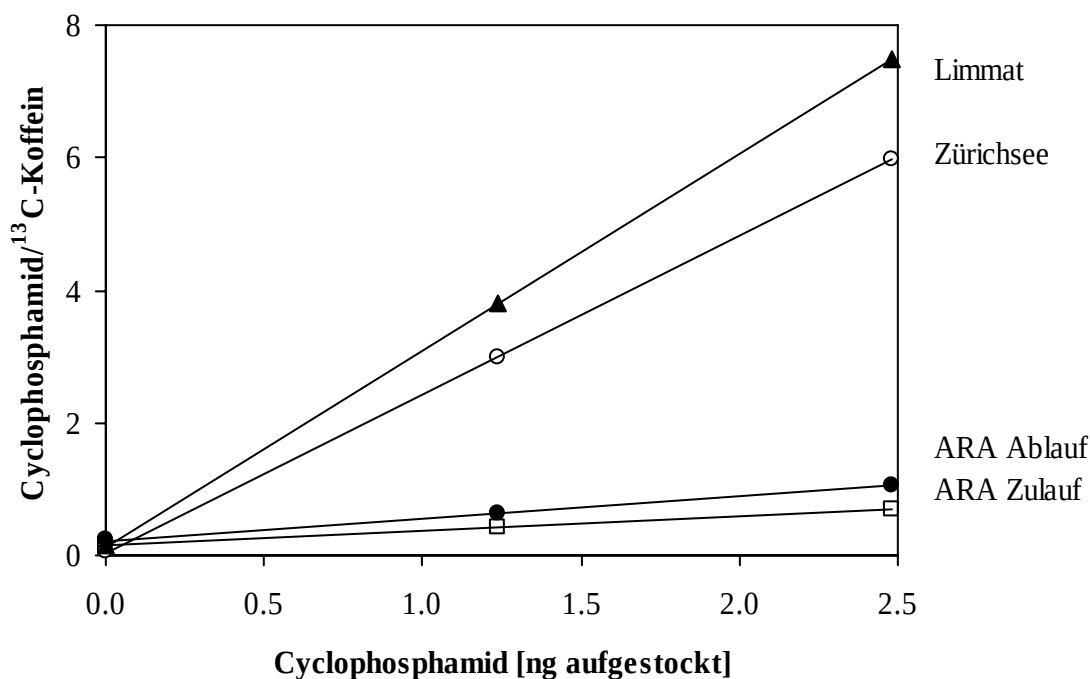


Standardaddition und Wiederfindungen

Die Bildung protonierter Molekülionen wurde in der Quelle, je nach Probematrix, mehr oder weniger stark supprimiert, insbesondere in Abwasserextrakten. In Gegenwart von Natrium beispielsweise bildeten sich Clusterionen mit $m/z = 283$ und 285 . Daher konnte die Quantifizierung nicht mit externer Kalibration erfolgen, sondern wurde mit Standardaddition durchgeführt (Abbildung 4). Die Standardadditionen waren linear ($r^2 > 0.99$).

Abbildung 4

Standardadditionen von Cyclophosphamid zu aufgearbeiteten Extrakten von Proben aus dem Zürichsee, der Limmat und aus dem Zu- und Ablauf der ARA Werdhölzli, Zürich. Die Empfindlichkeit, proportional zur Steigung der Regressionsgeraden, hängt stark von der Matrix der Probe ab (Ionensuppression, siehe Text).



Die Wiederfindung von Cyclophosphamid und Ifosfamid wurde aus Grundwasser-, Seewasser- und Abwassermatrix bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Nachweisgrenzen

Abbildung 4 illustriert, dass die Empfindlichkeit der verwendeten LC-MS-MS Methode stark von der Probematrix abhängt. Ferner wird die Empfindlichkeit auch beeinflusst durch die aktuellen chromatographischen Bedingungen (Trennleistung der HPLC-Säule) oder die Reinheit der Ionenquelle (was wiederum zu Signalsuppression führen kann). In Tabelle 6 werden daher für die Nachweisgrenzen Konzentrationsbereiche angegeben. Insgesamt wurden mit LC-MS-MS noch deutlich tiefere Nachweisgrenzen erzielt als mit der in Kapitel 6.2 beschriebenen GC-MS Methode. Cyclophosphamid und Ifosfamid konnten nun auch in Oberflächengewässern detektiert werden (siehe Kapitel 8.4). In einer fossilen Grundwasserprobe (Aqui, Zürich) konnten die Verbindungen hingegen nicht nachgewiesen werden ($< 0.02 \text{ ng/L}$).

Tabelle 5

Wiederfindung von Cyclophosphamid und Ifosfamid aus Grundwasser, Seewasser und Abwasser.

Matrix	Konzentration [ng/L]	Cyclophosphamid [%]	Ifosfamid [%]
Grundwasser (Aqui, Zürich)	0.25-0.30	81	81
Seewasser (Zürichsee) ^a	2.5-30	90-94	90-102
ungereinigtes Abwasser (ARA Wädenswil) ^b	2.5-30	74-88	75-93

^a ungespiktes Seewasser enthielt bereits ≈ 0.07 ng/L Cyclophosphamid, was in der Berechnung der Wiederfindungsraten berücksichtigt wurde.

^b ungespiktes Abwasser enthielt bereits 6 ng/L Cyclophosphamid, was in der Berechnung der Wiederfindungsraten berücksichtigt wurde.

Tabelle 6

Nachweisgrenzen (Signal/Rauschen ≈ 3) von Cyclophosphamid und Ifosfamid in natürlichen Gewässern und in Abwasser.

Matrix	Cyclophosphamid [ng/L]	Ifosfamid [ng/L]
Oberflächengewässer, Grundwasser	0.02-0.1	0.02-0.1
gereinigtes Abwasser	0.3	0.3-0.4
ungereinigtes Abwasser	0.2-1	0.3-2

6.4 Suche nach Oxazaphosphorin-Metaboliten in Patienten-Urin

Gewisse Metaboliten von Cyclophosphamid und Ifosfamid können ökotoxikologische Bedeutung haben (siehe Wirkungsmechanismus in Kapitel 2). Da keine Referenzverbindungen zur Verfügung standen, wurde versucht, ausgehend von einem Patienten-Urin eine LC-MS-MS Methode für Metaboliten zu entwickeln.

6.4.1 Experimentelles

Im Urin eines freiwilligen Patienten aus dem Universitätsspital Zürich wurde nach Metaboliten von Cyclophosphamid gesucht. Urin vor einer Chemotherapiebehandlung wurde mit Urin nach der Behandlung verglichen. Dabei wurde primär nach protonierten (mit TIS im positiven Modus) oder deprotonierten Molekülonen (TIS negativ) gesucht. Anschliessend wurden Massenspektren dieser potenziellen Metabolite aufgenommen, interpretiert und die empfindlichsten Ionenübergänge für den MS-MS-MRM Betrieb bestimmt.

6.4.2 Ergebnisse und Diskussion

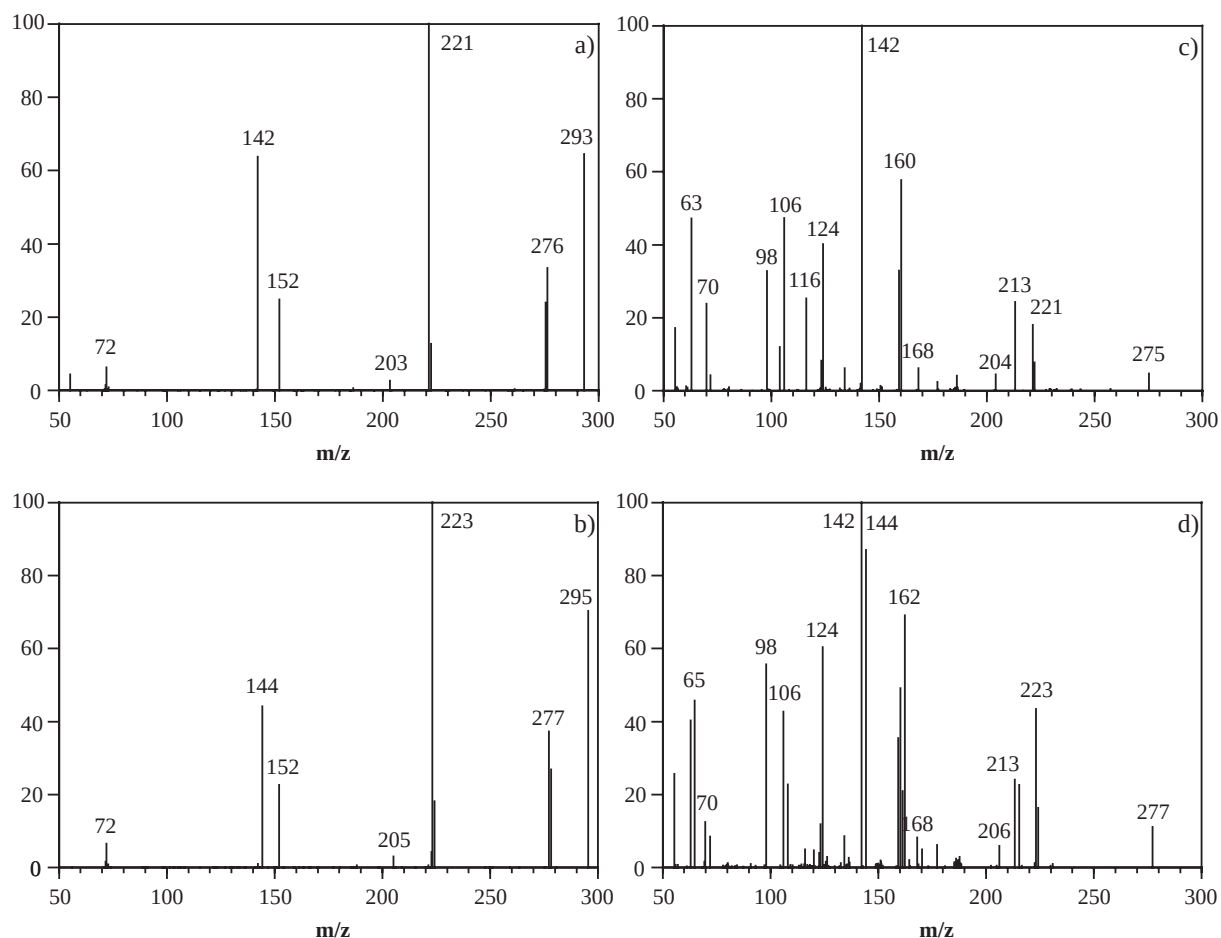
Q1-Massenspektren von Urin vor und nach der Chemotherapiebehandlung zeigten erwartungsgemäss Unterschiede, unter anderem bezüglich Ab- resp. Anwesenheit der Ionen $m/z = 293, 295$ und $275, 277$ (TIS positiv). Diese Ionen wurden anschliessend im 1. Quadrupol selektiert und nach Fragmentierung in der Kollisionszelle wurden Q3-Massenspektren aufgenommen (Abbildung 5).

Die Interpretation dieser Spektren legt nahe, dass es sich vermutlich um protoniertes Carboxy-Cyclophosphamid (Abbildung 5a,b) und protoniertes Keto-Cyclophosphamid (c,d) handelt (Strukturen, siehe Kapitel 2). In Abbildung 5a ($^{35}\text{Cl}_2$ -Carboxy-Cyclophosphamid) können die Ionen wie folgt erklärt werden: $m/z = 276$ und 275 : Abspaltung von OH resp. H_2O , $m/z 221$: Abspaltung von Propionat, $m/z 203$: Spaltung der P-O-Bindung, $m/z 152$ und 142 : Spaltung der N-P-Bindung mit H-Transfer. Die Ionen in Abbildung 5b ($^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ -Carboxy-Cyclophosphamid) können analog rationalisiert werden. Auf die Interpretation der Massenspektren in den Abbildungen 5c,d, vermutlich protoniertes Keto-Cyclophosphamid, wird nicht weiter eingegangen.

Folgende Ionenübergänge wurden dann für den MS-MS-MRM Betrieb ausgewählt: Carboxy-Cyclophosphamid: $m/z 293 \rightarrow 221$ (Kollisionsenergie, 25 eV) und $293 \rightarrow 142$ (25 eV), Keto-Cyclophosphamid: $275 \rightarrow 142$ (30 eV).

Abbildung 5

Q3-Massenspektren nach CAD-Fragmentierung der im Q1 selektierten Ionen $m/z = 293$ resp. 295 (ev. protoniertes Carboxy-Cyclophosphamid, $^{35}\text{Cl}_2$ - resp. $^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}$ -Isotop, a,b) und $m/z = 275$ resp. 277 (ev. protoniertes Keto-Cyclophosphamid, $^{35}\text{Cl}_2$ - resp. $^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}$ -Isotop, c,d). TIS positiv, 5 kV, 400 °C, Kollisionsenergie 20 eV (a,b) oder 35 eV (c,d).



Die vermuteten Metaboliten Keto-Cyclophosphamid und Carboxy-Cyclophosphamid eluierten nach 4.9 min resp. 5.4 min und Cyclophosphamid nach 6.2 min (HPLC-Bedingungen, siehe Kapitel 6.3.1). Der alkylierend wirkende Cyclophosphamid-Mustard (Kapitel 2) wurde im Urin nicht gefunden. Vermutlich reagiert dieser Metabolit sehr rasch und unspezifisch mit nucleophilen Verbindungen.

7

Umweltverhalten von Oxazaphosphorinen

7.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Oxazaphosphorine sind relativ niedermolekulare, schwerflüchtige, polare und wasserlösliche Verbindungen. Tabelle 7 listet einige wichtige physikalisch-chemische Parameter von Cyclophosphamid und Ifosfamid auf.

Tabelle 7

Physikalisch-chemische Daten von Cyclophosphamid (2-[bis-(2-chloroethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-oxide) und Ifosfamid (3-(2-chloroethyl)-2-(2-chloroethyl)-amino-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-oxide)

	Cyclophosphamid ^a	Ifosfamid ^b
Molekulargewicht	261.1 g/mol	261.1 g/mol
Schmelzpunkt	49.5-53 °C	48-50 °C
Dampfdruck	≈ 10 ⁻⁶ Pa	-
Wasserlöslichkeit	40 g/L	100 g/L
Henry Konstante	6.9 × 10 ⁻¹¹ atm L/mol (berechnet)	-
Octanol-Wasser-Verteilungskonstante, log K _{OW}	0.97	-

^a zitiert in (17)

^b zitiert in (18)

Verflüchtigung und Sorption dürften in Abwasserreinigungsanlagen und Oberflächen-gewässern auf Grund der tiefen Henry-Konstante resp. tiefen Octanol-Wasser-Verteilungskonstante eher unbedeutende Eliminationsprozesse darstellen.

7.2 Abbauverhalten in Abwasserreinigungsanlagen

7.2.1 Literaturübersicht

Die mikrobielle Abbaubarkeit von Cyclophosphamid und Ifosfamid wurde mit verschiedenen OECD-Tests untersucht. Sowohl in "ready biodegradability tests" (OECD closed bottle test, Anfangskonzentration 5 mg/L) wie in "inherent biodegradability tests" (OECD Zahn-Wellens/EMPA test, Konzentration 160 mg/L) wurde kein Abbau festgestellt (2,11,19). In einer Belebtschlamm-Kläranlage im Labormassstab (OECD confirmatory test, Konzentration 150-750 mg/L) wurde ebenfalls kein Abbau von Cyclophosphamid beobachtet (3). In einer anderen Modell-Kläranlage wurden durchschnittlich nur 17 % und < 3 % des zugegebenen Cyclophosphamids resp. Ifosfamids eliminiert (Konzentrationen: 10 µg/L Cyclophosphamid, 11.4 µg/L Ifosfamid) (2,11).

7.2.2 Belebtschlamminkubationen

Oben erwähnte Studien zur mikrobiellen Abbaubarkeit von Cyclophosphamid und Ifosfamid wurden bei sehr hohen, wenig umweltrelevanten Konzentrationen (µg/L-mg/L-Bereich) durchgeführt, bei welchen cytotoxische Effekte denkbar sind. Die Ergebnisse dieser Abbaubarkeitstests könnten also falsch negativ sein.

Daher wurden die nachfolgend beschriebenen Belebtschlamminkubationsexperimente bei wesentlich tieferen Konzentrationen durchgeführt, Konzentrationen die im Abwasser von Kläranlagen unter worst-case Bedingungen auch tatsächlich auftreten können (vgl. Kapitel 4). Um zu zeigen, dass der Belebtschlamm unter Laborbedingungen biologisch aktiv war, wurde gleichzeitig die gut abbaubare Verbindung Koffein mitinkubiert (20).

Experimentelles

1.5 L ungereinigtes Abwasser aus dem Vorklärbecken der ARA Jona-Rapperswil (25000 Einwohner) wurden mit 0.6 L Rücklaufschlamm gemischt, also in einem ähnlichen Verhältnis wie unter normalen Betriebsbedingungen. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur gerührt und durch eine Glasfritte mit wasser-gesättigter Pressluft begast (Fluss $\approx$ 0.2 L/min).

Ein Inkubationsexperiment wurde bei einem möglichst tiefen Konzentrationsniveau von 90 ng/L Cyclophosphamid und 120 ng/L Ifosfamid durchgeführt, bei dem die Verbindungen noch ohne vorgängige Probenaufarbeitung direkt mit LC-MS-MS analysiert werden konnten. Je 0.1 mL einer wässrigen Cyclophosphamid- und Ifosfamidlösung wurden zur Belebtschlamm suspension zugegeben.

Die zweite Inkubation erfolgte bei 10 × höheren Konzentrationen, um einen allfälligen Abbau der Verbindungen gut verfolgen zu können. Nach 4.5 Stunden wurde zusätzlich 1 mL einer wässrigen Koffeinelösung (44 µg/mL) zugegeben (Koffein wasserfrei, > 99 %, Fluka, Buchs, Schweiz). Periodisch wurden Proben entnommen, filtriert (0.45 µm Chromafil®PET-45/25, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und direkt mit LC-MS-MS analysiert.

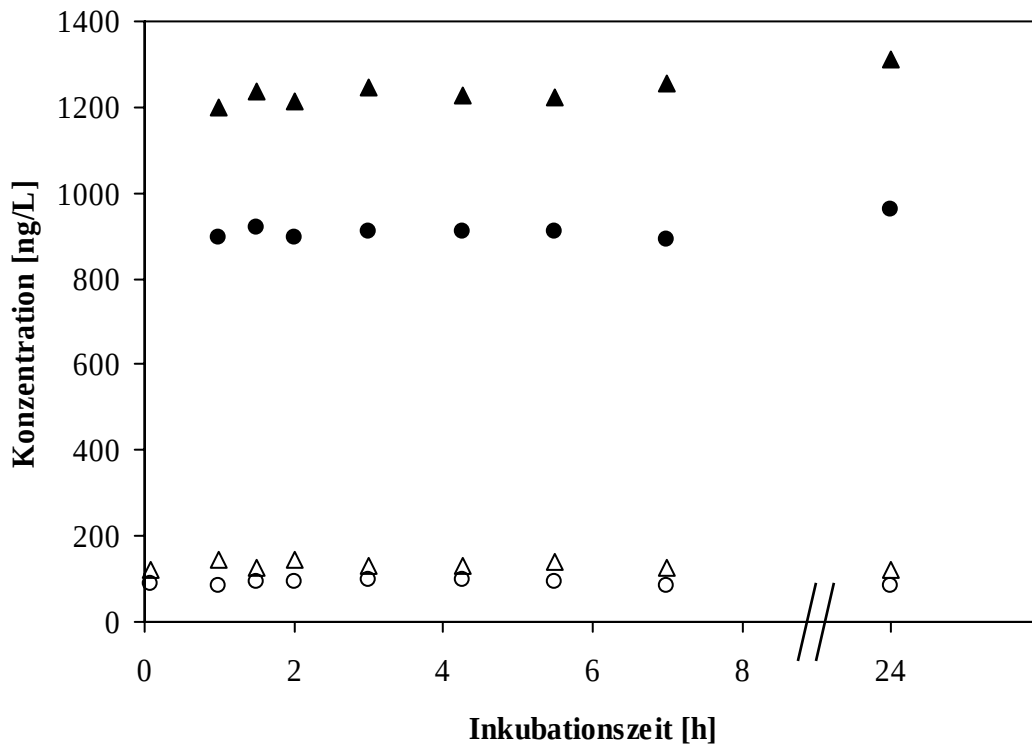
Ergebnisse und Diskussion

Cyclophosphamid und Ifosfamid zeigten sowohl im Konzentrationsniveau von ≈ 1 µg/L wie auch bei ≈ 100 ng/L innerhalb von 24 Stunden keinen Abbau (Abbildung 6) und dürften daher auch unter realistischen Bedingungen in Abwasserreinigungsanlagen nicht abgebaut werden. Die Referenzverbindung Koffein hingegen wurde innerhalb von 1 Stunde praktisch vollständig abgebaut. Der verwendete Belebtschlamm war also unter Laborbedingungen biologisch aktiv.

Die hohe Persistenz der zwei Oxazaphosphorine wurde auch bestätigt durch Analysen in Abwasser von Kläranlagen aus dem Kanton Zürich (siehe Kapitel 8.3). Die gemessenen Konzentrationen resp. Frachten waren vergleichbar in ungereinigtem und gereinigtem Abwasser.

Abbildung 6

Inkubation von Cyclophosphamid (Kreise) und Ifosfamid (Dreiecke) in Belebtschlamm aus der ARA Jona-Rapperswil unter Laborbedingungen bei zwei Konzentrationsniveaus (Details siehe Text).



7.3 Abbauverhalten in Oberflächengewässern

Cyclophosphamid und Ifosfamid dürften aufgrund der Ergebnisse der Belebtschlamminkubationen auch in Oberflächengewässern nicht biologisch abgebaut werden. Verflüchtigung und Sorption/Sedimentation wurden bereits in Kapitel 7.1 als irrelevante Prozesse eingestuft. Als möglicher Eliminationprozess in Oberflächengewässern kommt daher, abgesehen von Verdünnung durch sauberes Wasser, noch abiotischer Abbau in Frage, d.h. chemischer und/oder photochemischer Abbau.

Aufgrund der chemischen Strukturen der zwei Oxazaphosphorine wurde angenommen, dass die Verbindungen kein Licht mit Wellenlängen > 290 nm absorbieren (Wellenlängenbereich von natürlichem, troposphärischem Sonnenlicht) und somit direkte Photolyse ausgeschlossen werden kann. Die nachfolgend beschriebenen Inkubationsexperimente mit Seewasser wurden daher darauf

angelegt, dunkel-chemischen Abbau von indirektem photochemischem Abbau durch verschiedene reaktive Sauerstoffverbindungen und Radikale zu unterscheiden.

7.3.1 Inkubationen in Seewasser

Insgesamt wurden 13 verschiedene Inkubationsexperimente durchgeführt, 7 davon mit Cyclophosphamid und Ifosfamid, 4 mit der Referenzverbindung 4-Chlorbenzoat, welche spezifisch mit HO[•] Radikalen reagiert (21), und 2 mit dem Aktinometer 4-Nitroacetophenon, um die Lichtverhältnisse zu überprüfen (22). Durch die Zugabe ausgewählter Reagenzien wurde die Konzentration von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Radikalen entweder gezielt erhöht oder erniedrigt (Tabelle 8).

7.3.1.1 Experimentelles

Chemikalien

4-Chlorbenzoat (99 %) und 4-Nitroacetophenon (98 %) wurden bei Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen, Pyridin (≥ 99.8 %), Isopropanol (≥ 99.8 %) und Natriumazid (≥ 99.0 %) bei Fluka, Buchs, Schweiz, Kaliumnitrat (> 99 %) bei Merck, Darmstadt, Deutschland und Suwannee River Fulvic Acid (SRFA, Typ Standard) bei der International Humic Substances Society (www.ihss.gatech.edu).

Charakterisierung des Seewassers

Seewasser für die Inkubationsexperimente stammte aus dem Zürichsee bei Wädenswil und wurde am 2. Februar 2005 in einer Tiefe von ca. 10 cm entnommen. In Tabelle 9 sind einige für die Bildung resp. den Abbau von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Radikalen relevante chemische Parameter aufgelistet.

Tabelle 8

Inkubationsexperimente mit Cyclophosphamid (CP), Ifosfamid (IF), der Referenzverbindung 4-Chlorbenzoat (4-CB) und dem Aktinometer 4-Nitroacetophenon/Pyridin (PNAP/PYR) in Seewasser und destilliertem Wasser, ohne oder mit Zugabe der Reagenzien NO_3^- , Isopropanol, Suwannee River Fulvic Acid (SRFA) oder Natriumazid.

	Matrix	CP [µg/L]	IF [µg/L]	4-CB [µM]	PNAP [µM]	PYR [mM]	NO_3^- [µM]	Isopropanol [mM]	SRFA [mg/L]	NaN_3 [mM]	erfasster Abbauprozess ^a
photochemische Experimente											
1	Seewasser	1.0	1.2								chem, photo
3	dest. Wasser	1.0	1.2								chem, (direkte Photolyse)
4	Seewasser	1.0	1.2				100				chem, photo mit mehr $\text{HO}^\cdot$
5	Seewasser	1.0	1.2					5.2			chem, photo ohne $\text{HO}^\cdot$
6	Seewasser	1.0	1.2						10		chem, photo mit mehr $^1\text{O}_2$, mehr $^*\text{DOC}$, weniger $\text{HO}^\cdot$
7	Seewasser	1.0	1.2							2.25	chem, photo mit weniger $^1\text{O}_2$
8	Seewasser			1.1							chem, photo, primär mit $\text{HO}^\cdot$
9	Seewasser			1.1			100				chem, photo mit mehr $\text{HO}^\cdot$
10	Seewasser			1.1				5.2			chem, photo ohne $\text{HO}^\cdot$
11	Seewasser			1.1					10		chem, photo mit mehr $^1\text{O}_2$, mehr $^*\text{DOC}$, weniger $\text{HO}^\cdot$
12	dest. Wasser				10.1	5					chem, direkte Photolyse
Dunkelexperimente											
2	Seewasser	1.0	1.2								chem
13	dest. Wasser				10.1	5					chem

^a chem = chemischer Abbau, z.B. Hydrolyse; photo = photochemischer Abbau, z.B. durch $\text{HO}^\cdot$ Radikale, $^1\text{O}_2$ (Singlet Sauerstoff) oder $^*\text{DOC}$ (angeregte gelöste organische Verbindungen), biologischer Abbau wird in Seewasserinkubationen ebenfalls erfasst, ist aber unwahrscheinlich (siehe Text).

Tabelle 9

Chemische Charakterisierung des für die Inkubationsexperimente verwendeten Zürichseewassers. Probenahme: 2. Februar 2005 bei Wädenswil in ca. 10 cm Tiefe.

pH	8.08
Alkalinität [mM]	2.51
gelöster organischer Kohlenstoff [mg C/L]	1.6
Nitrat [mg N/L]	0.7
Nitrit [μ g N/L]	2.0
Eisen [mg/L]	< 0.1

Inkubationslösungen

Die Anfangskonzentrationen von Cyclophosphamid, Ifosfamid, 4-Chlorbenzoat und 4-Nitroacetophenon/Pyridin sind in Tabelle 8 aufgeführt, ebenso die resultierenden Konzentrationen zugegebener Reagenzien wie NO_3^- , Isopropanol, SRFA oder Natriumazid (bei NO_3^- ergibt sich die Anfangskonzentration aus bereits im Seewasser gelösten $48 \mu\text{M}$ und zugegebenen $100 \mu\text{M}$ in den Experimenten 4 und 9).

Beim Herstellen der Inkubationslösungen wurde darauf geachtet, dass keine zusätzlichen organischen Lösungsmittel, wie etwa Methanol aus Stammlösungen, die Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff veränderte. Organische Stammlösungen wurden so verdünnt, dass vor der Wasserzugabe das Lösungsmittel verdunstete. Lichtempfindliche Lösungen wurden im Dunkeln zubereitet. In den Experimenten 6 und 11 (Tabelle 8) senkte sich der pH-Wert des Seewassers geringfügig nach Zugabe von SRFA, was mit 0.1 M NaOH kompensiert wurde.

Belichtung

Volumina à 25 mL Lösung wurden dann in Quarz-Reagenzgläser (Durchmesser, 12 mm) gefüllt und mit einem geschliffenen Glasstopfen verschlossen. Eine allfällige Verdunstung von Wasser während der Inkubation wurde gravimetrisch überprüft, war aber nicht von Bedeutung. Als Lichtquelle wurden Niederdruck-Quecksilberdampf-Fluoreszenzlampen verwendet (Typ TL 40W/05, Philips). Das UV-Licht, das diese Lampen emittieren ($300\text{--}460 \text{ nm}$, Maximum bei 365 nm), gleicht dem Spektrum von natürlichem Sonnenlicht im UV-Bereich. Die Reagenzgläser wurden seitlich mit vier Lampen kontinuierlich belichtet. Die Temperatur der belichteten Lösungen betrug $\approx 22^\circ\text{C}$. Die Dunkelkontrollen (Experimente 2 und 13) wurden bei $\approx 20^\circ\text{C}$ inkubiert.

Analytik

In definierten Zeitabständen wurden Aliquote à 1 mL entnommen, mit 25 µL (1.3 ng) $^{13}\text{C}_3$ -Koffein als internem Standard versetzt und mit LC-MS-MS analysiert (siehe Kapitel 6.3). 4-Chlorbenzoesäure und 4-Nitroacetophenon wurden mit HPLC-DAD gemessen (Pumpe: Jasco PU-980, Autosampler: Jasco AS-1555, DAD: MD-1510), bei folgenden Bedingungen: Säule: LiChrospher 100-5 RP C18, 25 cm, 4 mm i.d., 5 µm Partikelgrösse (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), Eluent: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure 50:50:0.1, isokratisch, Injektionsvolumen: 20 µL, Flussrate: 1 mL/min, Wellenlänge 240 nm (4-Chlorbenzoesäure) resp. 288 nm (4-Nitroacetophenon).

7.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Chemischer Abbau

Im Dunkeln wurde Cyclophosphamid in Seewasser nur langsam abgebaut mit einer Halbwertszeit von ≈ 80 Tagen bei $\approx 20^\circ\text{C}$, vermutlich durch hydrolytischen Abbau (Experiment 2). Die Konzentration von Ifosfamid nahm während der 69 Tage Inkubation gar nicht ab. Mit dem Inkubationsexperiment 3, destilliertes Wasser mit Belichtung, wurde ebenfalls der hydrolytische Abbau erfasst, da direkte Photolyse der Verbindungen ausgeschlossen werden konnte (siehe oben). Dabei wurde für Cyclophosphamid eine etwas kürzere Halbwertszeit von ≈ 57 Tagen gefunden. Der raschere Abbau in diesem Experiment kann mit der leicht höheren Inkubationstemperatur bei Belichtung ($\approx 22^\circ\text{C}$), eventuell auch mit dem tieferen pH Wert von destilliertem Wasser erklärt werden.

Auch gemäss Literatur erfolgt die Hydrolyse der zwei Oxazaphosphorine langsam. Für Cyclophosphamid wurden Halbwertszeiten von 45-121 Tagen abgeschätzt (extrapolierte Werte, Inkubationszeiten nur 17 Tage, pH 3.4-8.6, 20°C , (23)), für Ifosfamid ≈ 620 Tage (abgeschätzt aus Experimenten bei höheren Temperaturen, pH 5, 25°C , (24)). Unter stark sauren Bedingungen (pH 1.2) wurde Cyclophosphamid allerdings bereits nach 33 Stunden zu 50 % abgebaut (23) und auch für Ifosfamid wurden unterhalb von pH 5 sowie oberhalb von pH 8 erhöhte Abbauraten gefunden (24).

Indirekter photochemischer Abbau

Bei Belichtung von Seewasser (Experiment 1) wurden beide Verbindungen deutlich rascher abgebaut als im Dunkeln, mit Halbwertszeiten von ≈ 44 Tagen für Cyclophosphamid (Abbildung 7a) resp. ≈ 144 Tagen für Ifosfamid (Abbildung 7b). Die zwei Oxazaphosphorine werden offenbar durch photochemisch gebildete, reaktive Sauerstoffverbindungen oder Radikale abgebaut.

$\text{HO}\cdot$ Radikale beispielsweise sind sehr reaktive Spezies, die eher unspezifisch mit organischen Verbindungen reagieren. Deren Gleichgewichtskonzentration in einem Gewässer kann abgeschätzt werden aus den Konzentrationen von Nitrat (wichtigste lichtabsorbierende Verbindung für die Bildung von $\text{HO}\cdot$), gelöstem organischem Kohlenstoff, Karbonat und Bikarbonat (wichtigste $\text{HO}\cdot$ Scavenger), der Lichtintensität und der Lichtabschwächung im Wasser (25,26). Durch Nitratzugabe kann also die $\text{HO}\cdot$ Konzentration gezielt erhöht werden, während etwa die Zugabe von Isopropanol ($\text{HO}\cdot$ Scavenger) das Gegenteil bewirkt. Tatsächlich wurde sowohl für Cyclophosphamid wie für Ifosfamid ein rascherer Abbau in Gegenwart erhöhter Nitratkonzentration beobachtet, während Isopropanol zu einem verlangsamten Abbau führte (Experimente 4 und 5, Abbildung 7). Entsprechende Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Die bei unterschiedlichen $\text{HO}\cdot$ Konzentrationen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten (Experimente 1, 4-6) korrelierten mit abgeschätzten $\text{HO}\cdot$ Konzentrationen (25,26) (Abbildung 8). Erwartungsgemäss zeigte auch die Referenzsubstanz 4-Chlorbenzoat, welche spezifisch mit $\text{HO}\cdot$ Radikalen reagiert (21), eine vergleichbare Zunahme der Abbaurate in Funktion der $\text{HO}\cdot$ Konzentration (Experimente 8-11, Abbildung 8). Das bedeutet, dass Cyclophosphamid und Ifosfamid ähnlich rasch mit $\text{HO}\cdot$ Radikalen reagieren wie 4-Chlorbenzoat, d.h. mehr oder weniger diffusionskontrolliert. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Reaktion von 4-Chlorbenzoat mit $\text{HO}\cdot$ Radikalen in Wasser beträgt $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (27). $\text{HO}\cdot$ Radikale sind offenbar wichtige reaktive Spezies für den indirekten photochemischen Abbau der zwei Oxazaphosphorine.

In Abbildung 8 erfasst der Achsenabschnitt der Regressionsgerade von Cyclophosphamid primär den hydrolytischen Abbau der Verbindung und den indirekten photochemischen Abbau durch andere reaktive Sauerstoffverbindungen oder Radikale.

Abbildung 7

Einfluss von Nitrat oder Isopropanol auf den photochemischen Abbau von a) Cyclophosphamid und b) Ifosfamid in Seewasser. Linien zeigen Fits gemäss Kinetik pseudo-erster Ordnung.

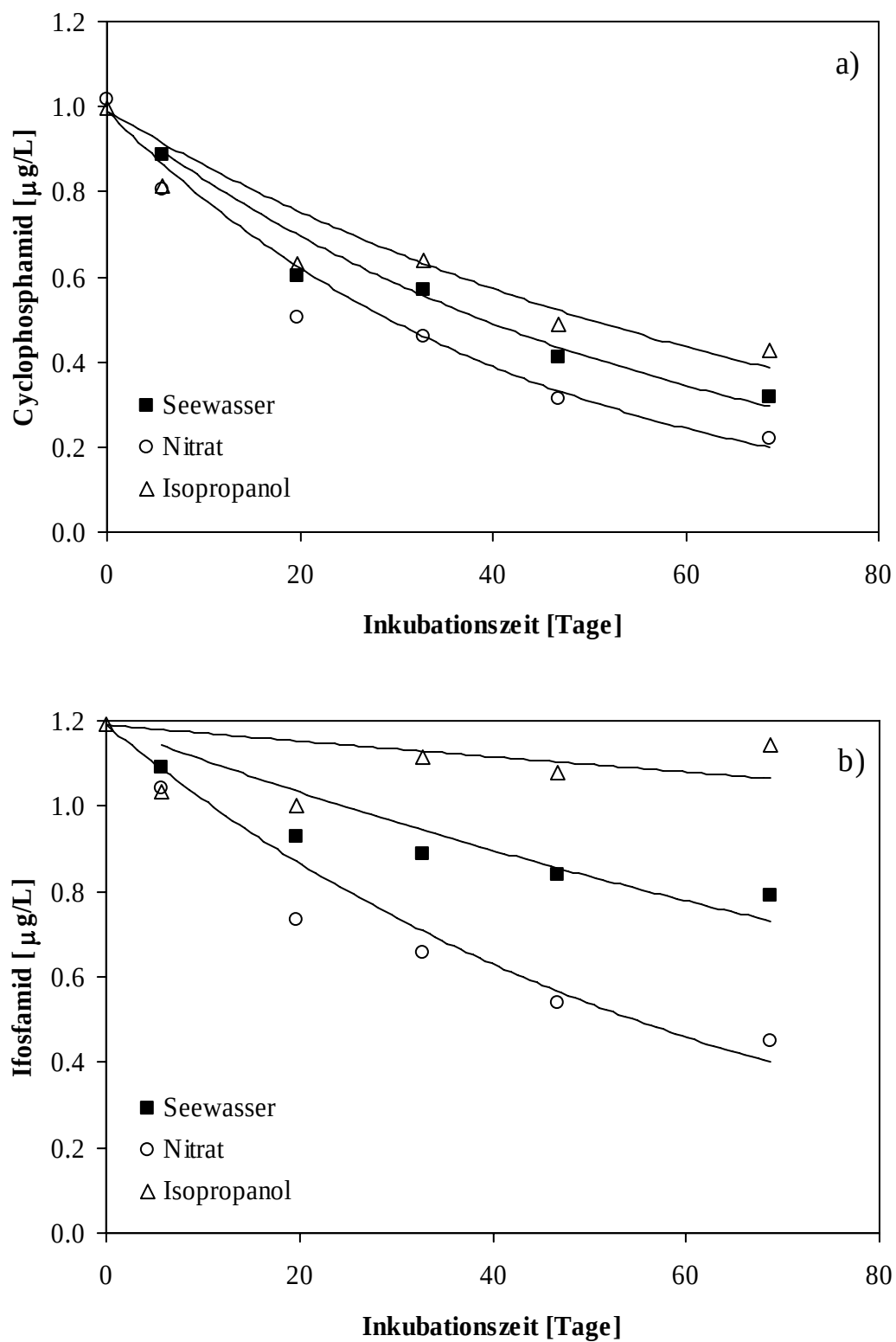
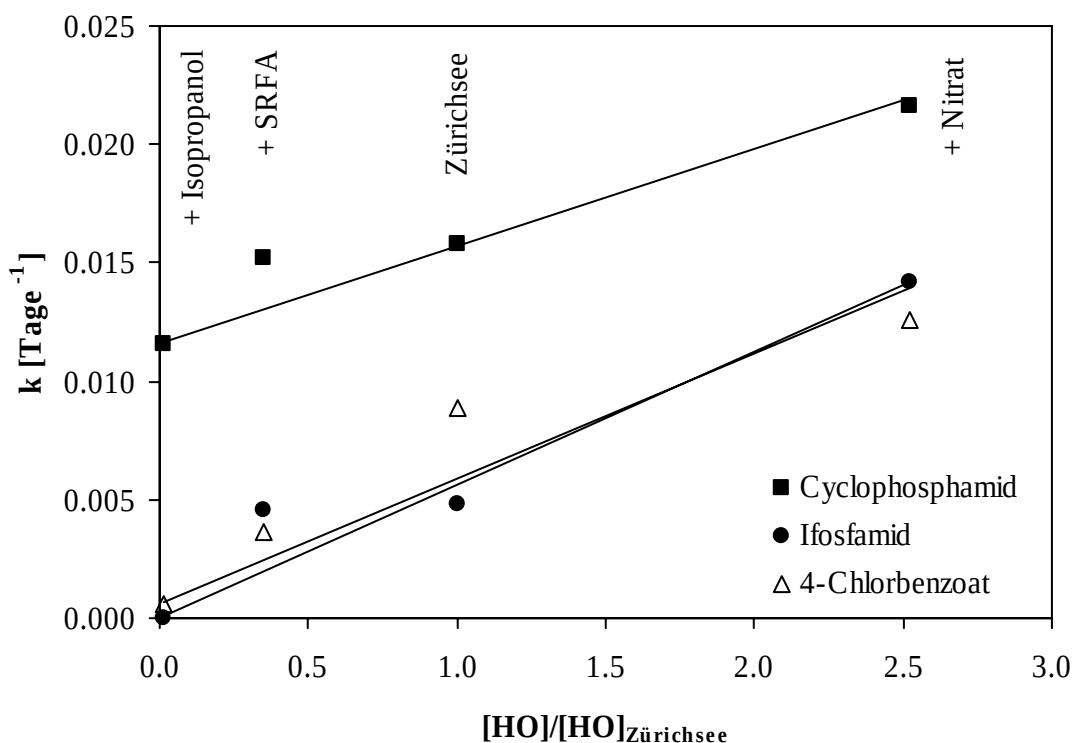


Abbildung 8

Korrelation zwischen Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung für den Abbau von Cyclophosphamid, Ifosfamid und 4-Chlorbenzoat und abgeschätzten $\text{HO}^\cdot$ Konzentrationen relativ zur $\text{HO}^\cdot$ Konzentration in Seewasser (Experiment 1, ohne Reagenzienzugabe).



Fulvinsäuren (SRFA) können einerseits als $\text{HO}^\cdot$ Scavenger wirken, andererseits als Quelle von $^1\text{O}_2$ (Singlet-Sauerstoff) oder als angeregte Triplet-Spezies zu indirektem photochemischem Abbau organischer Verbindungen führen. Bei Zugabe von SRFA (Experiment 6) wurde jedoch, im Vergleich zum Inkubationsexperiment 1, ein nur geringfügig langsamerer Abbau der Verbindungen beobachtet (keine statistisch signifikanten Unterschiede, Tabelle 10).

Das gleiche gilt für den Abbau von Cyclophosphamid in Gegenwart von Natriumazid (Experiment 7), welches die Konzentration von $^1\text{O}_2$ erniedrigt (28). Der Abbau von Ifosfamid scheint hingegen durch Natriumazid etwas stärker beeinflusst zu werden (Tabelle 10), d.h. $^1\text{O}_2$ ist möglicherweise am indirekten photochemischen Abbau von Ifosfamid beteiligt.

Tabelle 10

Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung [Tage⁻¹] für den Abbau von Cyclophosphamid (CP), Ifosfamid (IF), 4-Chlorbenzoat (4-CB) und 4-Nitroacetophenon (PNAP) in Seewasser und destilliertem Wasser. Experimentelle Bedingungen siehe Tabelle 8. Fehlerangaben sind 95 % Vertrauensintervalle.

	Matrix	CP	IF	4-CB	PNAP
photochemische Experimente					
1	Seewasser	0.016 ± 0.005	0.005 ± 0.003		
3	dest. Wasser	0.012 ± 0.004	0.000 ± 0.003		
4	+ NO ₃ ⁻	0.022 ± 0.005	0.014 ± 0.005		
5	+ Isopropanol	0.012 ± 0.005	0.000 ± 0.003		
6	+ SRFA	0.015 ± 0.003	0.005 ± 0.003		
7	+ NaN ₃	0.014 ± 0.003	0.002 ± 0.002		
8	Seewasser			0.009 ± 0.002	
9	+ NO ₃ ⁻			0.013 ± 0.002	
10	+ Isopropanol			0.001 ± 0.002	
11	+ SRFA			0.004 ± 0.002	
12	Seewasser				0.050 ± 0.003
Dunkelexperimente					
2	Seewasser	0.009 ± 0.004	0.000 ± 0.002		
13	dest. Wasser				0.002 ± 0.001

7.3.2 Extrapolation auf Oberflächengewässer

Obwohl der Abbau von Cyclophosphamid und Ifosfamid im Labor bei Belichtung deutlich beschleunigt wurde, dürfte indirekte Photolyse in Oberflächengewässern von geringer Bedeutung sein. Die Eindringtiefe des für die Bildung von HO[•] Radikalen benötigten UV-Lichts ($\lambda \approx 320$ nm) beträgt typischerweise nur wenige cm. Eine Ausnahme bilden allenfalls seichte, klare, nitratreiche Gewässer.

Folglich ist die Hydrolyse der wohl wichtigste Abbauprozess in den meisten Oberflächengewässern. Da die jährlichen Durchschnittstemperaturen in unseren

Gewässern in der Regel unter 10 °C liegen, müssen die oben angegebenen Halbwertszeiten korrigiert werden. Für die Hydrolyse von Ifosfamid wurde in der Literatur eine Aktivierungsenergie von 118 kJ/mol bestimmt (24) und für Cyclophosphamid wurde aus Abbauxperimenten bei zwei Temperaturen (23) eine ähnlich hohe Aktivierungsenergie von ≈ 100 kJ/mol abgeschätzt. Eine um 10-15 °C tiefere Temperatur bewirkt demnach eine Verlangsamung der Hydrolyse um etwa einen Faktor 5-10. Für Cyclophosphamid ergibt das Hydrolysehalbwertszeiten von ≈ 400 bis 800 Tagen, für Ifosfamid dürfte es gar mehrere Jahre brauchen, bis sich die Konzentration durch Hydrolyse in natürlichen Gewässern halbiert.

Die zwei Verbindungen werden natürlich auch durch Wasseraustausch aus Oberflächengewässern eliminiert. Die mittlere Wasseraufenthaltszeit (Tabelle 11) erlaubt einen direkten Vergleich der relativen Bedeutung von hydrolytischem Abbau und Elimination durch Wasseraustausch. Obwohl langsam, ist die Hydrolyse für den Verbleib von Cyclophosphamid in den meisten Schweizer Seen gleich wichtig oder gar wichtiger als Wasseraustausch. Bei Ifosfamid hingegen dürfte Hydrolyse nur in Seen mit sehr langsamem Wasseraustausch eine Rolle spielen.

Tabelle 11

Mittlere Wasseraufenthaltszeiten in Schweizer Seen (29).

See	τ [Jahre]	See	τ [Jahre]
Bielersee	0.16	Lago Maggiore	4.1
Zürichsee	1.4	Bodensee	4.3
Walensee	1.5	Lago di Lugano	8.2
Murtensee	1.6	Lac de Neuchâtel	8.3
Thunersee	1.9	Lac Léman	11.4
Brienzersee	2.7	Zugersee	14.7
Vierwaldstättersee	3.4	Sempachersee	15

7.4 Weitere Angaben zum Abbauverhalten

Wenn auch in den meisten Oberflächengewässern von geringer Bedeutung, dürfte der Abbau durch $\text{HO}^\cdot$ Radikale in technischen Anlagen zur oxidativen Behandlung von Abwasser oder Trinkwasser eine wichtige Rolle spielen. Bei diesen sogenannten "advanced oxidation processes" (AOP) wird Wasser mit einem Oxidationsmittel (z.B. O_3 oder H_2O_2) versetzt und mit UV-Licht bestrahlt (30). Dabei bilden sich hohe Konzentrationen an $\text{HO}^\cdot$ Radikalen. Es kann also angenommen werden, dass bei einer AOP-Behandlung von Spitalabwässern die zwei Oxazaphosphorine rasch abgebaut werden. Unbekannt allerdings sind die dabei gebildeten Metabolite. In den in Kapitel 7.3 beschriebenen Inkubationsexperimenten wurde zwar nach den Metaboliten Carboxy- und Keto-Cyclophosphamid gesucht (Methode, siehe Kapitel 6.4), sie konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Das Eliminationsverhalten von Ifosfamid wurde ferner in einer im Labor simulierten Mülldeponie (Lysimeter) studiert. Dabei wurde eine 50 %-ige Elimination der Verbindung beobachtet, allerdings erst nach etwa 80 Tagen als sich methanogene Bedingungen im Reaktor etabliert hatten (31).

8 Oxazaphosphorine in Abwässern und Oberflächengewässern - Messdaten aus dem Kanton Zürich

8.1 Auswahl der Wasserproben

Abwasserproben

Für erste Analysen von Cyclophosphamid und Ifosfamid in Abwasserproben wurde die kommunale Kläranlage von Männedorf, Kanton Zürich, ausgewählt. Das Kreispital Männedorf, dessen Abwässer in dieser Kläranlage gereinigt werden, verfügt über eine relativ grosse Onkologieabteilung (Tabelle 1). In der kleinen Kläranlage (≈ 9000 Einwohner, (9)) wird das Spitalabwasser verhältnismässig wenig verdünnt, so dass relativ hohe Konzentrationen der Oxazaphosphorine erwartet werden konnten. Vorteilhaft war ferner, dass der aktuelle Verbrauch an Cytostatika im Spital nachgefragt werden konnte. So war es möglich, in dieser Kläranlage Analysen während einer Zeitperiode mit Chemotherapie-Behandlungen im Spital vorzunehmen und, zum Vergleich, während einer Zeitperiode ohne Behandlungen.

Mit Analysen im Abwasser der ARA Männedorf konnte also eine "realistic worst case" Situation erfasst werden. Weitere Analysen wurden dann in der ARA Werdhölzli in Zürich durchgeführt, welche die Abwässer von ≈ 370000 Einwohnern reinigt (9). In Zürich gibt es mehrere grössere Spitäler mit Onkologie, aber auch zahlreiche Arztpraxen, in denen Cytostatika verabreicht werden. Die Spitalabwässer werden allerdings stark verdünnt durch häusliche Abwässer. Die Kläranlage Werdhölzli repräsentiert daher eine für städtische Gebiete durchaus typische Situation bezüglich Vorkommen von Cytostatika. Der aktuelle Verbrauch vor/während der Probenahmen konnte in Zürich nicht erfasst werden.

Urinproben

Eine Person im Spital Männedorf war bereit, Urin für Analysen zur Verfügung zu stellen. Die Person wurde am 25. September 2002 mit 900 mg i.v. Cyclophosphamid behandelt. Es wurde Urin nach der Chemotherapie-Behandlung, sowie zu Kontrollzwecken auch Urin vor der Behandlung analysiert.

Proben aus Oberflächengewässern

Die gereinigten Abwässer der ARA Männedorf werden in den Zürichsee, jene der ARA Werdhölzli in die Limmat eingeleitet. Cyclophosphamid und Ifosfamid wurden daher primär in diesen zwei Gewässern gemessen. Durch Analysen resp. Frachtbestimmungen in der Limmat oberhalb und unterhalb der ARA Werdhölzli und im Zulauf und Ablauf dieser Kläranlage konnte ferner eine einfache Massenbilanz für die zwei Verbindungen aufgestellt werden.

8.2 Probenahme und Analytik

Abwasserproben

Abwasserproben wurden von den Klärwerkmeistern zur Verfügung gestellt. In der ARA Männedorf wird das Abwasser in drei Stufen gereinigt, mechanisch, biologisch (Belebtschlammverfahren) und chemisch (Phosphatfällung mit Eisensalzen). Vom 20. bis 27. September 2002 wurden abflussproportionale 24-Stunden-Mischproben im Rohwasser und im Ablauf des Nachklärbeckens entnommen. Bis zur Extraktion wurden die Abwasserproben bei $\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die acht Tagesmischproben wurden anschliessend im Labor zu zwei abflussproportionalen 4-Tages-Mischproben vereinigt. Diese Proben wurden mit der GC-MS Methode (Kapitel 6.2) analysiert.

In der ARA Werdhölzli wird das Abwasser ebenfalls nach dem Belebtschlammverfahren gereinigt mit einer zusätzlichen, nachgelagerten Filtrationsstufe. Auch hier wurden abflussproportionale Tagesmischproben entnommen, im Rohwasser und im Ablauf der Filtration. Eine erste Beprobung erfolgte zwischen 29. März und 3. April 2005, eine zweite zwischen 18. und 24. April 2005. Die Tagesmischproben wurden im Labor zu einer abflussproportionalen 6-Tages- resp. 7-Tages-Mischprobe vereinigt und mit der LC-MS-MS Methode analysiert (Kapitel 6.3).

Am 6. Juli 2004 wurde ferner eine Abwasserprobe aus dem Ablauf des Vorklärbeckens der ARA Wädenswil entnommen und mit LC-MS-MS analysiert. Dieses Abwasser wurde auch für Wiederfindungsexperimente verwendet (Kapitel 6.3).

Urinproben

Urinproben wurden nicht mit Festphasenextraktion, sondern mit Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeitet. 20 mL Urin vor der Cyclophosphamid-Behandlung ($\text{pH} \approx 5$) resp. 50 mL Urin nach der Behandlung ($\text{pH} \approx 7$) wurden mit 4×20 mL Dichlormethan ausgeschüttelt. Um die Phasentrennung zu verbessern, wurden die Extrakte zentrifugiert (≈ 2000 g). Der kombinierte Dichlormethan-Extrakt wurde dann unter leichtem Luftzug zur Trockne gebracht und in 5 mL Ethylacetat aufgenommen. Ein Aliquot von 100 μL wurde mit TFAA derivatisiert und mit GC-MS analysiert.

Proben aus Oberflächengewässern und Grundwasser

Erste Wasserproben aus dem Zürichsee und Greifensee wurden am 7. resp. 26. August 2002 mit einem Niskin-Schöpfer entnommen, jeweils in 1 m Tiefe, über der tiefsten Stelle im See. Diese Proben wurden mit GC-MS analysiert.

Eine Stichprobe aus dem Zürichsee bei Wädenswil vom 13. Juli 2004 wurde mit LC-MS-MS analysiert, sowie für Wiederfindungsexperimente verwendet (Kapitel 6.3). Am 30. Oktober 2003 wurde eine Probe von fossilem Grundwasser (Aqui, Zürich) für die Bestimmung von Blindwerten entnommen.

Weitere Probenahmen erfolgten gleichzeitig mit den Beprobungen in der ARA Werdhölzli, einerseits in der Limmat oberhalb der Kläranlage (Stichproben am 5. und 22. April 2005 beim Ausfluss aus dem Zürichsee, Quaibrücke), andererseits ≈ 6 km unterhalb der Kläranlage Werdhölzli bei Dietikon (abflussproportionale Tagesmischproben vom 29. März bis 3. April 2005 und 18.-24. April 2005).

8.3 Vorkommen von Oxazaphosphorinen in Abwasserreinigungsanlagen

Cyclophosphamid

Cyclophosphamid konnte in allen Abwasserproben nachgewiesen werden in Konzentrationen zwischen 2 und 11 ng/L (Tabelle 12). In ungereinigtem und gereinigtem Abwasser wurden etwa die gleichen Konzentrationen resp. Frachten gemessen, was die in den Belebtschlamminkubationen beobachtete hohe Persistenz von Cyclophosphamid bestätigt (Kapitel 7.2.2).

Tabelle 12

Konzentrationen und Frachten von Cyclophosphamid in abflussproportionalen Sammelproben vom Zulauf und Ablauf von Kläranlagen aus dem Kanton Zürich.

ARA	Datum	Durch- fluss [m ³ /Tag]	Zulauf Konz. [ng/L]	Ablauf		
				Fracht [g/Tag]	Konz. [ng/L]	Fracht [g/Tag]
Männedorf ^a	20.-23.09.02 ^c	16500	≈ 4	≈ 0.06	≈ 2	≈ 0.04
Männedorf ^a	24.-27.09.02 ^d	14900	11	0.16	10	0.15
Wädenswil ^b	06.07.04 ^e	- ^e	6	- ^e	nicht gemessen	
Werdhölzli ^b	29.03.-03.04.05	194000	5	0.97	4	0.72
Werdhölzli ^b	18.-24.04.05	316000	2.0	0.64	2.1	0.67

^a GC-MS

^b LC-MS-MS

^c keine Behandlungen mit Cyclophosphamid im Spital Männedorf

^d am 24., 25. und 26. September 2002 erfolgten Behandlungen mit je 900 mg Cyclophosphamid im Spital Männedorf

^e Stichprobe

Während einer Zeitperiode ohne Chemotherapie-Behandlungen im Spital Männedorf (20.-23. September 2002) wurden im Abwasser der kommunalen Kläranlage trotzdem geringe Konzentrationen an Cyclophosphamid gefunden (≈ 4 ng/L im Zulauf, ≈ 2 ng/L im Ablauf, Abbildungen 9a resp. 10a), was vermutlich durch dessen Verwendung als Immunsuppressivum erklärt werden kann.

An den folgenden Tagen wurden im Spital drei Personen mit je 0.9 g Cyclophosphamid behandelt. Tatsächlich wurden nun höhere Konzentrationen gemessen, nämlich 11 ng/L im Zulauf und 10 ng/L im Ablauf (24.-27. September, Abbildungen 9b resp. 10b).

Aus den gemessenen Konzentrationen und den aktuellen Durchflussmengen kann berechnet werden, dass während dieser 4 Tage insgesamt ungefähr 0.6 g Cyclophosphamid die Kläranlage passierten. Zieht man davon die Fracht an Cyclophosphamid ab, die an den 4 Tagen ohne Behandlungen im Spital Männedorf im Abwasser gefunden wurde (diffuser Eintrag, ≈ 0.2 g), so dürften via Spitalabwasser noch rund 0.4 g oder etwa 14 % der verabreichten Menge (2.7 g) ins Abwasser gelangt sein. Typische Ausscheidungsraten liegen bei ≈ 13 % (Kapitel 3).

Die Messungen in der ARA Männedorf fielen unglücklicherweise in eine Periode mit ausserordentlich hohen Niederschlägen, was eine starke Verdünnung des Abwassers zur Folge hatte (Durchfluss $\approx 4 \times$ Trockenwetteranfall). Die Cyclophosphamid-Konzentrationen in den 4-Tages-Mischproben hätten bei Trockenwetter bis zu 40 ng/L betragen können.

Abbildung 9

GC-MS-SIM-Chromatogramme von Rohwasser der ARA Männedorf, 4-Tages-Mischproben, a) keine Oxazaphosphorin-Behandlungen im Spital (20.-23.09.02), b) drei Cyclophosphamid-Behandlungen im Spital (24.-27.09.02), c) Probe b, aufgestockt mit Cyclophosphamid und Ifosfamid. Das Zeitfenster 7.0-9.5 min zeigt $m/z = 284$ mit Elution von HCB (interner Standard), das Zeitfenster 10-14 min zeigt $m/z = 307$ mit Elution von Ifosfamid-TFA und Cyclophosphamid-TFA. Signalintensitäten sind normalisiert bezüglich HCB.

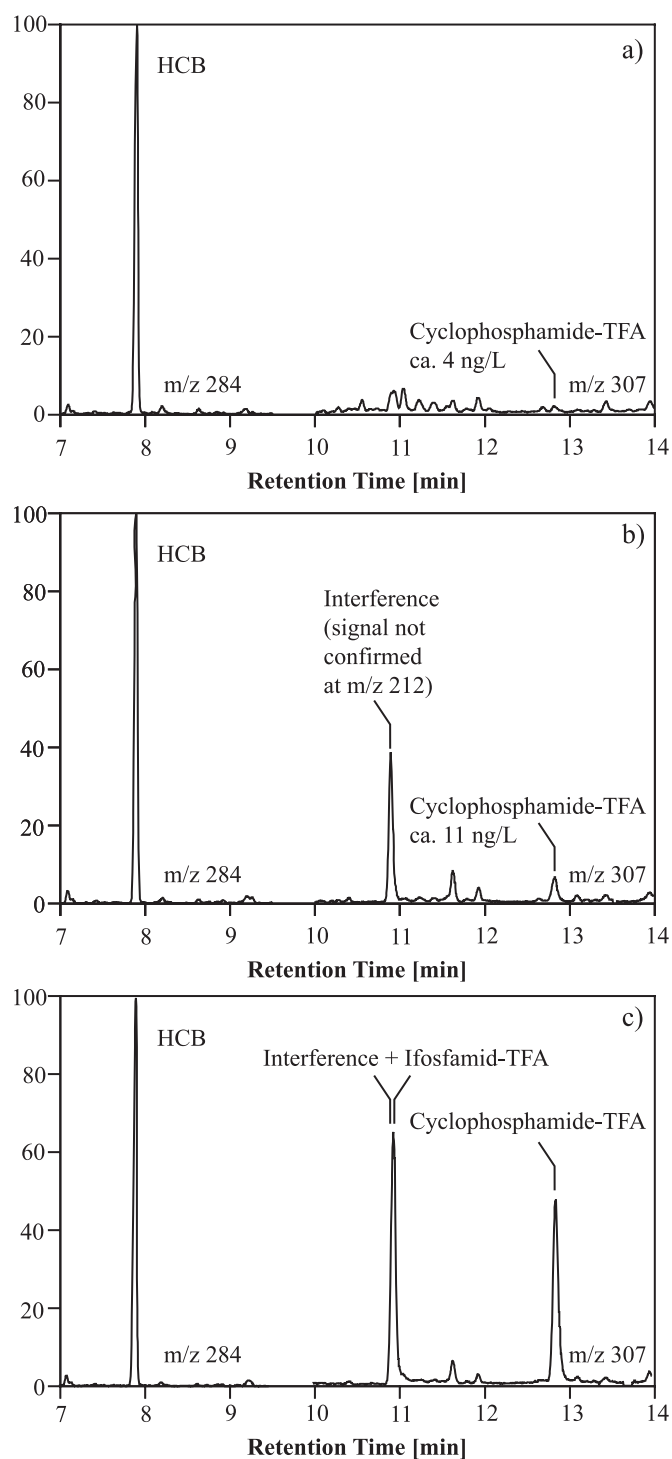
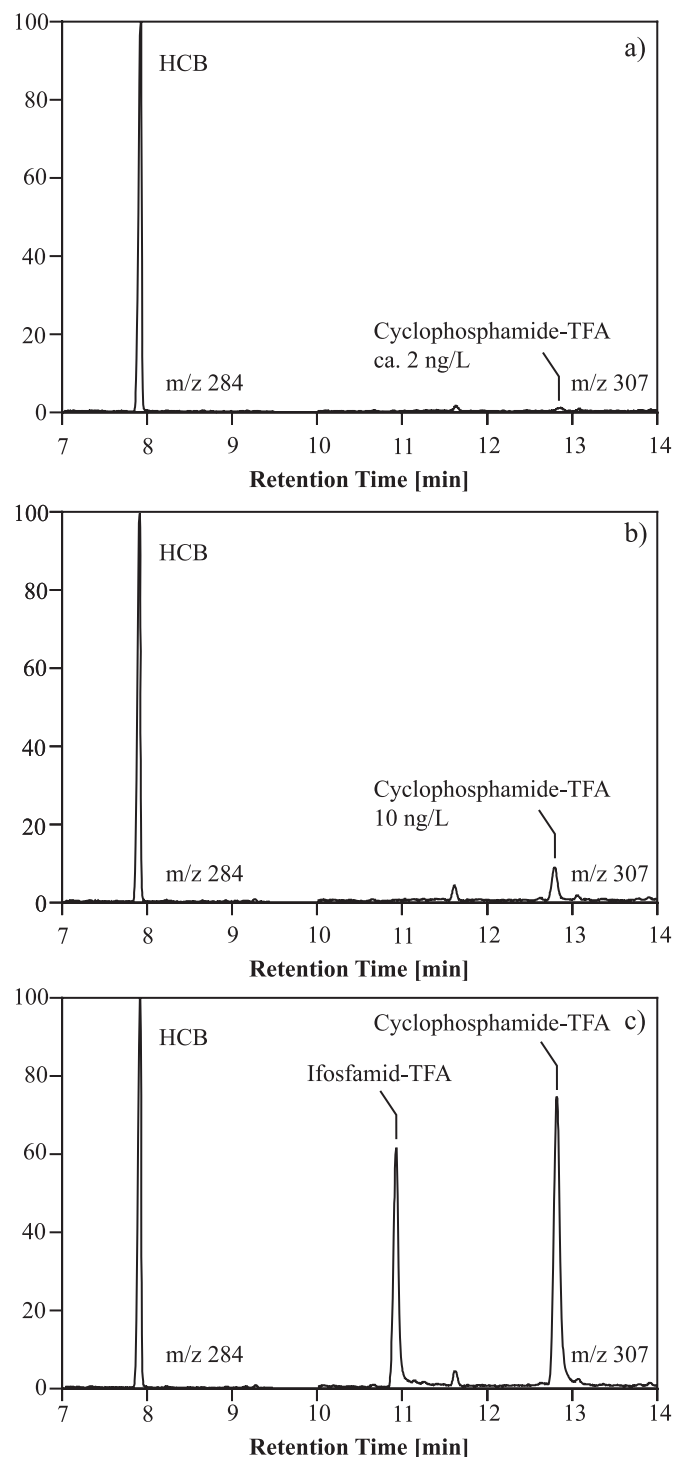


Abbildung 10

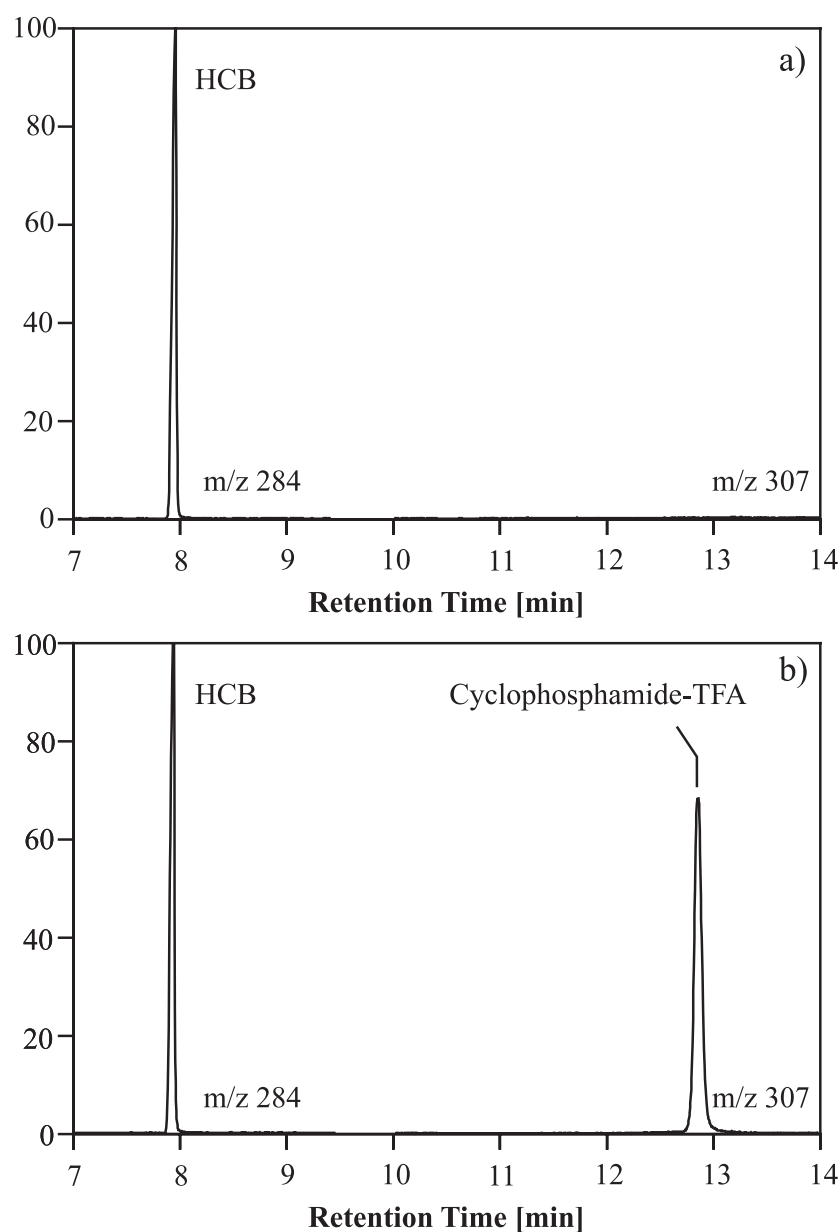
GC-MS-SIM-Chromatogramme von gereinigtem Abwasser der ARA Männedorf, 4-Tages-Mischproben, a) keine Oxazaphosphorin-Behandlungen im Spital (20.-23.09.02), b) drei Cyclophosphamid-Behandlungen im Spital (24.-27.09.02), c) Probe b, aufgestockt mit Cyclophosphamid und Ifosfamid. Das Zeitfenster 7.0-9.5 min zeigt $m/z = 284$ mit Elution von HCB (interner Standard), das Zeitfenster 10-14 min zeigt $m/z = 307$ mit Elution von Ifosfamid-TFA und Cyclophosphamid-TFA. Signalintensitäten sind normalisiert bezüglich HCB.



Im Urin einer Person wurden nach einer Chemotherapie-Behandlung ≈ 200 mg/L Cyclophosphamid gemessen (Massenspektrum in Abbildung 1c, Chromatogramme in Abbildung 11). Ifosfamid, welches nicht verabreicht wurde, konnte im Urin nicht nachgewiesen werden (< 1 mg/L). Offensichtlich erfolgte keine Isomerisierung von Cyclophosphamid zu Ifosfamid.

Abbildung 11

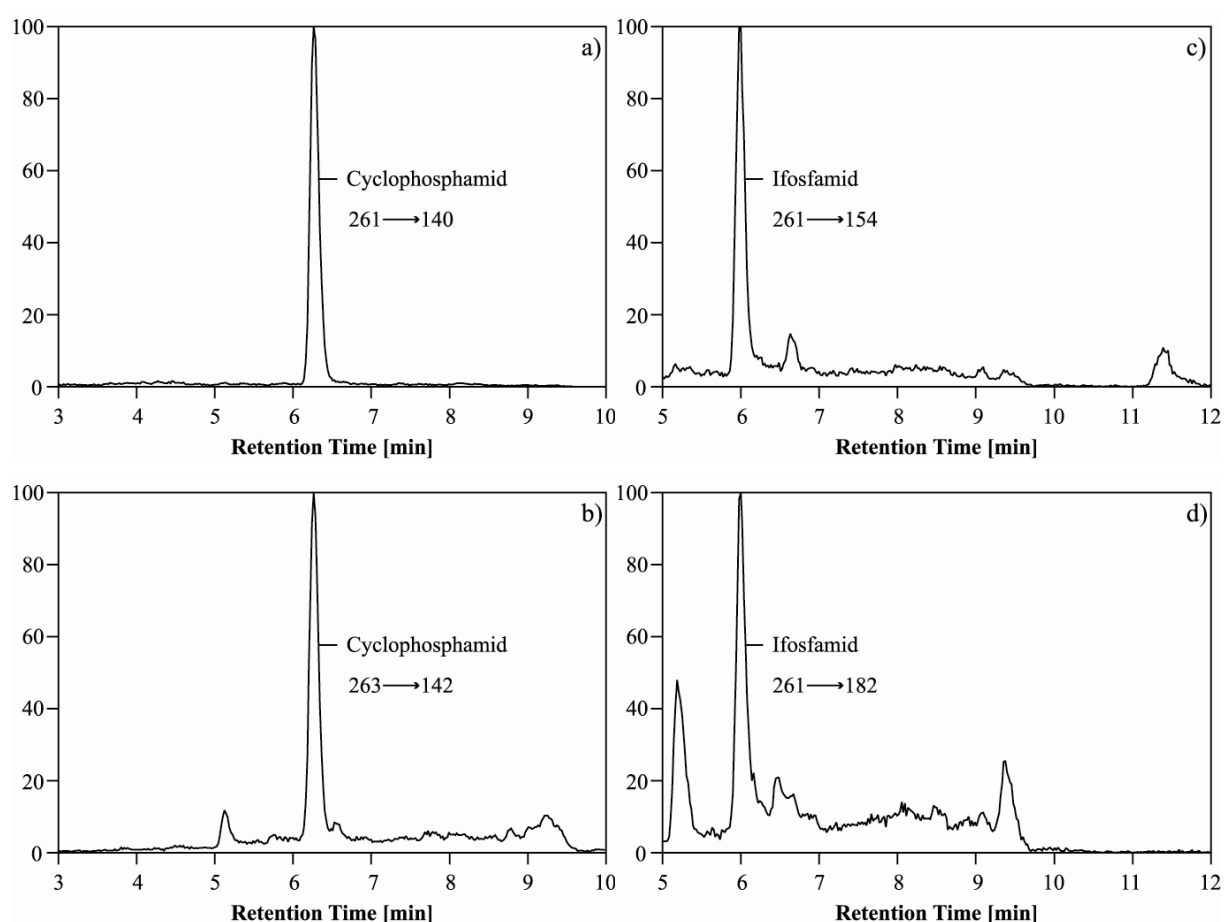
GC-MS-SIM-Chromatogramme von Urinproben a) vor und b) nach einer Chemotherapie-Behandlung mit 900 mg i.v. Cyclophosphamid. Das Zeitfenster 7.0-9.5 min zeigt $m/z = 284$ mit Elution von HCB, das Zeitfenster 10-14 min zeigt $m/z = 307$ mit Elution von Cyclophosphamid-TFA. Signalintensitäten sind normalisiert bezüglich HCB.



Weitere Analysen wurden mit der wesentlich empfindlicheren LC-MS-MS Methode durchgeführt. Ein typisches Chromatogramm einer Abwasserprobe mit 6 ng/L Cyclophosphamid ist in Abbildung 12a,b gezeigt.

Abbildung 12

LC-MS-MS-MRM-Chromatogramme von ungereinigtem Abwasser der ARA Wädenswil, Stichprobe vom 6. Juli 2004, mit 6 ng/L Cyclophosphamid (a) m/z 261 $\rightarrow$ 140 zur Quantifizierung, b) 263 $\rightarrow$ 142 zur qualitativen Überprüfung) und 3 ng/L aufgestocktem Ifosfamid (c) 261 $\rightarrow$ 154, Quantifizierung, d) 261 $\rightarrow$ 182, qualitative Überprüfung).



Ungereinigtes und gereinigtes Abwasser der ARA Werdhölzli in Zürich wurde zweimal auf Cyclophosphamid und Ifosfamid untersucht. Die anfallende Abwassermenge von durchschnittlich 194000 m³/Tag während der ersten Beprobung entsprach typischen Betriebsbedingungen (Jahresdurchschnitt: $\approx$ 220000 m³/Tag, (9)), während bei der zweiten Probenahme deutlich mehr Abwasser anfiel (316000 m³/Tag). Tatsächlich waren die Konzentrationen in der zweiten Probeserie nur etwa

halb so hoch (2.0 ng/L im Zulauf, Tabelle 12) wie in der ersten (5 ng/L). Im gereinigten Abwasser wurden etwa die gleichen Konzentrationen resp. Frachten gemessen wie in den entsprechenden Zulauf-Proben.

Mit der ausgehend von einem Patienten-Urin entwickelten LC-MS-MS Methode (Kapitel 6.4) konnten die vermuteten Metaboliten Carboxy-Cyclophosphamid und Keto-Cyclophosphamid im Abwasser nicht nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass Carboxy-Cyclophosphamid, welches beim neutralen pH Wert von Abwasser in anionischer Form vorliegen dürfte, auf der verwendeten Polystyrol-Divinylbenzol-Festphase nur ungenügend sorbiert. Ansäuern der Abwasserproben hätte aber möglicherweise zu unvollständiger Wiederfindung von Cyclophosphamid geführt, welches bei tiefem pH vermutlich protoniert wird.

Ifosfamid

Ifosfamid wurde im Spital während der zwei Probenahmen in der ARA Männedorf nicht verabreicht (die ursprünglich geplante Behandlung einer Person mit 3200 mg Ifosfamid wurde kurzfristig auf einen späteren Zeitpunkt verschoben) und konnte im Abwasser auch nicht detektiert werden (Tabelle 13).

Im Abwasser der Kläranlage Werdhölzli in Zürich konnte Ifosfamid jedoch nachgewiesen werden mit Konzentrationen zwischen ≈ 1.4 und 5 ng/L im Zulauf und 1.7-6 ng/L im Ablauf. Vorkommen und Persistenz von Ifosfamid und Cyclophosphamid waren in dieser ARA also vergleichbar. Ein typisches Chromatogramm einer Abwasserprobe ist in Abbildung 12c,d gezeigt.

Vergleich von erwarteten mit gemessenen Konzentrationen

Die in Kapitel 4 abgeschätzten Durchschnittskonzentrationen von 5.4 ng/L Cyclophosphamid und 1.4 ng/L Ifosfamid in ungereinigtem Abwasser stimmen sehr gut mit den in der ARA Werdhölzli effektiv gemessenen Konzentrationen überein (2.0-5 ng/L resp. 1.4-5 ng/L). Auch die in der ARA Männedorf gefundenen Konzentrationen von Cyclophosphamid (≈ 40 ng/L, umgerechnet auf Trockenwetter) entsprechen den Erwartungen für eine "realistic worst case" Situation.

Tabelle 13

Konzentrationen und Frachten von Ifosfamid in abflussproportionalen Sammelproben vom Zulauf und Ablauf von Kläranlagen aus dem Kanton Zürich.

ARA	Datum	Durch- fluss [m ³ /Tag]	Zulauf Konz. [ng/L]	Ablauf		
				Fracht [g/Tag]	Konz. [ng/L]	Fracht [g/Tag]
Männedorf ^a	20.-23.09.02 ^c	16500	< 15	-	< 2	-
Männedorf ^a	24.-27.09.02 ^c	14900	< 15	-	< 2	-
Wädenswil ^b	06.07.04 ^d	- ^d	< 0.3	- ^d	nicht gemessen	
Werdhölzli ^b	29.03.-03.04.05	194000	5	0.91	6	1.22
Werdhölzli ^b	18.-24.04.05	316000	≈ 1.4	≈ 0.45	1.7	0.54

^a GC-MS

^b LC-MS-MS

^c keine Behandlungen mit Ifosfamid im Spital Männedorf

^d Stichprobe

8.4 Vorkommen von Oxazaphosphorinen in Oberflächengewässern

Cyclophosphamid konnte nur mit der LC-MS-MS Methode in Oberflächengewässern detektiert werden (Tabelle 14). Im Zürichsee und in der Limmat beim Ausfluss aus dem See lagen die Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze (≈ 0.05-0.07 ng/L). In der Limmat bei Dietikon, ≈ 6 km unterhalb der ARA Werdhölzli, wurden dann etwas höhere Konzentrationen im Bereich 0.15-0.17 ng/L gemessen.

Die Konzentrationen von Ifosfamid waren tendenziell etwas tiefer und betrugen < 0.05 ng/L im Zürichsee und in der Limmat oberhalb der ARA Werdhölzli und ≈ 0.08-0.14 ng/L in der Limmat unterhalb der ARA Werdhölzli (Tabelle 15).

Tabelle 14

Konzentrationen und Frachten von Cyclophosphamid in Oberflächengewässern und einem fossilen Grundwasser aus dem Kanton Zürich.

Gewässer	Datum	Abfluss [m ³ /s]	Konzentration [ng/L]	Fracht [g/Tag]
Zürichsee ^a	07.08.02	-	< 1	-
Greifensee ^a	26.08.02	-	< 1	-
Zürichsee ^b	13.07.04	-	≈ 0.07	-
Limmat, Quaibrücke ^b	05.04.05	93	≈ 0.05	≈ 0.4
Limmat, Quaibrücke ^b	22.04.05	120	≈ 0.06	≈ 0.7
Limmat, Dietikon ^b	29.03.-03.04.05	102	0.15	1.3
Limmat, Dietikon ^b	18.-24.04.05	138	0.17	2.0
fossiles Grundwasser, Aquif ^b	30.10.03	-	< 0.02	-

^a GC-MS

^b LC-MS-MS

Tabelle 15

Konzentrationen und Frachten von Ifosfamid in Oberflächengewässern und einem fossilen Grundwasser aus dem Kanton Zürich.

Gewässer	Datum	Abfluss [m ³ /s]	Konzentration [ng/L]	Fracht [g/Tag]
Zürichsee ^a	07.08.02	-	< 1	-
Greifensee ^a	26.08.02	-	< 1	-
Zürichsee ^b	13.07.04	-	< 0.05	-
Limmat, Quaibrücke ^b	05.04.05	93	< 0.05	< 0.4
Limmat, Quaibrücke ^b	22.04.05	120	< 0.05	< 0.5
Limmat, Dietikon ^b	29.03.-03.04.05	102	≈ 0.14	≈ 1.3
Limmat, Dietikon ^b	18.-24.04.05	138	≈ 0.08	≈ 0.9
fossiles Grundwasser, Aquif ^b	30.10.03	-	< 0.02	-

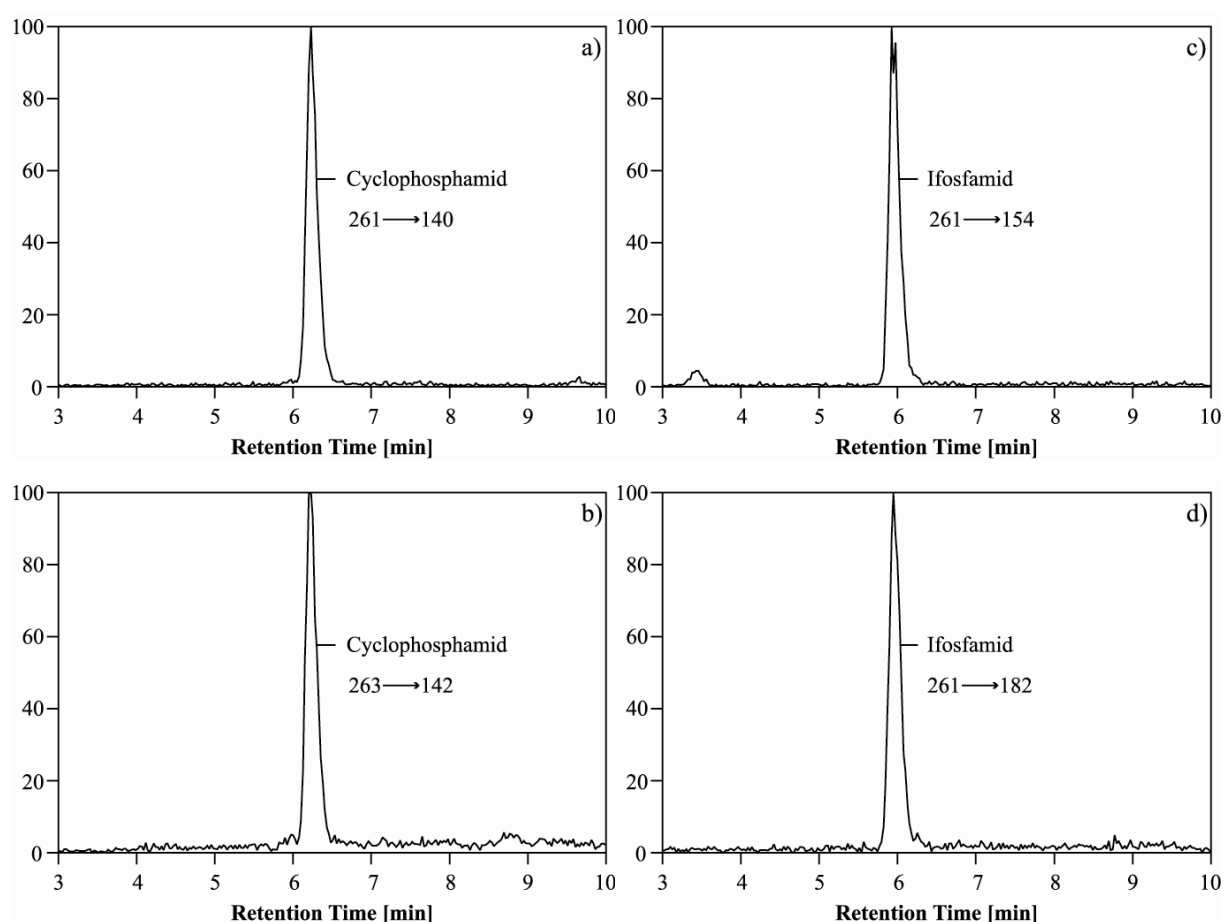
^a GC-MS

^b LC-MS-MS

Im analysierten fossilen Grundwasser aus Zürich konnten die zwei Oxazaphosphorine erwartungsgemäss nicht nachgewiesen werden ($< 0.02 \text{ ng/L}$). Chromatogramme einer mit 0.25 ng/L Cyclophosphamid und 0.30 ng/L Ifosfamid aufgestockten Grundwasserprobe sind in Abbildung 13 gezeigt.

Abbildung 13

LC-MS-MS-MRM-Chromatogramme von aufgestocktem Grundwasser (Aqui, Zürich), Stichprobe vom 30. Oktober 2003, mit 0.25 ng/L Cyclophosphamid (a) m/z 261 $\rightarrow$ 140 zur Quantifizierung, b) 263 $\rightarrow$ 142 zur qualitativen Überprüfung) und 0.30 ng/L Ifosfamid (c) 261 $\rightarrow$ 154, Quantifizierung, d) 261 $\rightarrow$ 182, qualitative Überprüfung).



Vergleich von erwarteten mit gemessenen Konzentrationen

Die im Zürichsee gemessenen Cyclophosphamid-Konzentrationen von ≈ 0.05 - 0.07 ng/L waren nur etwa halb so hoch wie die in Kapitel 4 abgeschätzte Durchschnittskonzentration (0.12 ng/L). Diese Schätzung beruhte allerdings auf der konservativen Annahme, dass Cyclophosphamid im See nicht abgebaut wird. Berücksichtigt man nun zusätzlich den langsamen hydrolytischen Abbau der Verbindung (Halbwertszeit

≈ 400-800 Tage, Kapitel 7.3.2), so lassen sich die gemessenen Konzentrationen tatsächlich bestens erklären.

Ifosfamid konnte im Zürichsee nicht nachgewiesen werden (< 0.05 ng/L), was übereinstimmt mit der in Kapitel 4 abgeschätzten Durchschnittskonzentration von 0.03 ng/L. Letztere muss nicht korrigiert werden, da die Hydrolyse von Ifosfamid deutlich langsamer erfolgt als die Elimination durch Wasseraustausch im Zürichsee.

8.5 Massenbilanz Limmat - ARA Werdhölzli

In der Limmat wurde erwartet, dass die Konzentrationen der zwei Oxazaphosphorine durch die Einleitung von Abwasser der Kläranlage Werdhölzli zunehmen. Tatsächlich wurden in Dietikon in beiden Messkampagnen höhere Konzentrationen gefunden als beim Ausfluss aus dem Zürichsee (Tabellen 14, 15). Konzentrationen erlauben allerdings nur einen qualitativen, Frachten hingegen einen quantitativen Vergleich.

So betrug die Cyclophosphamidfracht in der ersten Woche beim Ausfluss Zürichsee ≈ 0.4 g/Tag und in der Limmat unterhalb der ARA Werdhölzli 1.3 g/Tag (Tabelle 14). Während dieser Zeit wurden mit gereinigtem Abwasser 0.7 g/Tag in den Fluss eingeleitet (Tabelle 12). Diese einfache Massenbilanz hat demnach einen Fehler von < 20 %, was angesichts des Fehlers der flussproportionalen Probenahme und des höheren analytischen Fehlers im Bereich der Nachweisgrenze sehr wenig ist.

Die entsprechende Massenbilanz für Cyclophosphamid bei der zweiten Probenahme, sowie für Ifosfamid bei beiden Beprobungen war ebenfalls stimmig (Tabellen 12-15) und bestätigt die Verlässlichkeit der verwendeten analytischen Methode im Spurenbereich.

Pro Tag gelangten während der zwei Probenahmen etwa 1-2 g Cyclophosphamid und Ifosfamid in die Kläranlage Werdhölzli. Geht man von einer durchschnittlichen Dosis von rund 1 g aus (Kapitel 3) und berücksichtigt man typische renale Ausscheidungsraten von ≈ 13-15 %, so kann abgeschätzt werden, dass in der Stadt Zürich während dieser Zeit täglich etwa 7 bis 14 Behandlungen erfolgten.

Cyclophosphamid und Ifosfamid erweisen sich als ziemlich persistente Verbindungen und werden in Abwasserreinigungsanlagen mit Belebtschlammverfahren nicht und in den meisten Oberflächengewässern nur sehr langsam abgebaut, primär durch hydrolytischen Abbau. Die Hydrolysehalbwertszeit von Cyclophosphamid bei Temperaturen um 10 °C beträgt 1-2 Jahre, jene von Ifosfamid gar mehrere Jahre.

Wegen des im Vergleich zu vielen bisher untersuchten Arzneimitteln eher geringen Verbrauchs der Verbindungen, liegen die in Oberflächengewässern gemessenen Konzentrationen, trotz der hohen Persistenz, nur im pg/L-Bereich. Sie sind also um Größenordnungen tiefer als die Konzentrationen, bei denen akute, ökotoxikologische Effekte nachgewiesen wurden (Tabelle 16).

Tabelle 16

Daten zur Ökotoxizität von Cyclophosphamid und Ifosfamid.

Cyclophosphamid

- Mutagenität bei Fischen (Mikronukleus Test mit Erythrozyten von *Astyanax bimaculatus*): 24 h Exposition, maximale Effekte bei 8-16 mg/kg (32)
 - Mutagenität bei Fischen (Mikronukleus Test mit Erythrozyten von *Anguilla anguilla*): 3 Tage Exposition, maximale Effekte bei 25 mg/L (33)
 - Mutagenität bei Fischen (Tochterchromatidenaustausch bei *Anguilla anguilla*): 3 Tage Exposition, Effekte im mg/L Bereich (34)
-

Ifosfamid

- akute Toxizität bei Fischen (OECD 203, *Salmo gairdneri*):
LC₅₀ (96 h) > 1000 mg/L (31)
 - akute Toxizität bei Daphnien (OECD 202, *Daphnia magna*):
EC₅₀ (48 h) 162 mg/L, NOEC (48 h) 100 mg/L (31)
-

Studien zur chronischen Ökotoxizität bei aquatischen Organismen, wie etwa Mehrgenerationenstudien, Reproduktionstests, Tests zur Immunosuppression u.a., wurden in der Literatur jedoch keine gefunden. Immerhin kann das Bioakkumulationspotenzial aufgrund der tiefen Octanol-Wasser-Verteilungskonstanten (Tabelle 7) als sehr gering eingestuft werden.

Ausgehend von einem Patientenurin konnte eine qualitative analytische Methode für zwei Metaboliten entwickelt werden. Dabei handelte es sich vermutlich um die inaktiven Metaboliten Carboxy- und Keto-Cyclophosphamid (Kapitel 6.4), welche aber in Umweltproben nicht nachgewiesen werden konnten. Die Entwicklung analytischer Methoden für die aktiven, potenziell alkylierenden Metaboliten Cyclophosphorin-Mustard und Ifosfamid-Mustard (Kapitel 2) war hingegen, mangels Verfügbarkeit von Referenzverbindungen, nicht erfolgreich.

Eine abschliessende Risikobeurteilung für Cyclophosphamid und Ifosfamid sowie für ihre Metaboliten bezüglich Auswirkungen auf aquatische Organismen ist derzeit nicht möglich, weil Daten zur chronischen Ökotoxizität fehlen. Der vorliegende Bericht zeigt aber, dass die Konzentrationen in der aquatischen Umwelt auch unter worst-case Bedingungen sehr tief sind.

10

Literatur

- (1) Daughton, C.G.; Ternes, T.A., Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives* 1999, 107, 907-938.
- (2) Steger-Hartmann, T.; Kümmerer, K.; Hartmann, A., Biological Degradation of Cyclophosphamide and its Occurrence in Sewage Water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1997, 36, 174-179.
- (3) Kiffmeyer, T.; Götze, H.-J.; Jursch, M.; Lüders, U., Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 361, 185-191.
- (4) Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; Bertram, B.; Wiessler, M., Biodegradability of Antineoplastic Compounds in Screening Tests: Influence of Glucosidation and of Stereochemistry. *Chemosphere* 2000, 40, 767-773.
- (5) Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg (Deutschland), 1996, p 981.
- (6) Zobrist, T., Baxter AG, Volketswil (Schweiz), persönliche Auskunft über Verkaufszahlen von Cyclophosphamid und Ifosfamid in der Schweiz, 2002.
- (7) Baxter Oncology GmbH, Frankfurt am Main (Deutschland), *Endoxan, Product Monograph; Holoxan, Standard Information for Hospital Pharmacists* (2nd Update).
- (8) *Arzneimittelkompendium der Schweiz*; www.kompendium.ch, Zugriff im Juli 2005.
- (9) Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL), Zürich, 2000.
- (10) Steger-Hartmann, T.; Kümmerer, K.; Schecker, J., Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1996, 726, 179-184.

- (11) Kümmerer, K.; Steger-Hartmann, T.; Meyer, M., Biodegradability of the Anti-Tumour Agent Ifosfamide and its Occurrence in Hospital Effluents and Communal Sewage. *Wat. Res.* 1997, 31, 2705-2710.
- (12) Ternes, T. A., Occurrence of Drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. *Wat. Res.* 1998, 32, 3245-3260.
- (13) Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M.; Fanelli, R., Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* 2000, 355, 1789-1790.
- (14) Ternes, T.A.; Hirsch, R.; Mueller, J.; Haberer, K., Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and β_2 -sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 362, 329-340.
- (15) Momerency, G.; Van Cauwenberghe, K.; De Bruijn, E.; Van Oosterom, A.T.; Highley, M.S.; Harper, P.G., Determination of Iphosphamide and Seven Metabolites in Blood Plasma, as Stable Trifluoroacetyl Derivatives, by Electron Capture Chemical Ionization GC-MS. *J. High Resolution Chromatogr.* 1994, 17, 655-661.
- (16) Momerency, G.; Van Cauwenberghe, K.; Slee, P.H.T.J.; Van Oosterom, A.T.; De Bruijn, E.A., The Determination of Cyclophosphamide and its Metabolites in Blood Plasma as Stable Trifluoroacetyl Derivatives by Electron Capture Chemical Ionization Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 1994, 23, 149-158.
- (17) Di Guardo, A.; Calamari, D.; Benfenati, E.; Halling-Sorensen, B.; Zuccato, E.; Fanelli, R. In *Pharmaceuticals in the Environment*; Kümmerer, K., Ed.; Springer: Berlin (Deutschland), 2001; pp 91-102.
- (18) International Agency for Research on Cancer, *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*; Volume 26, World Health Organization: Lyon (Frankreich), 1981; p 411.
- (19) Kümmerer, K.; Steger-Hartmann, T.; Baranyai, A.; Bürhaus, I., Prüfung des biologischen Abbaus der Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosfamid mit dem Closed Bottle Test (OECD 301 D). *Zbl. Hyg.* 1996, 198, 215-225.
- (20) Buerge, I.J.; Poiger, T.; Müller, M.D.; Buser, H.R., Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 691-700.

- (21) Hoigné, J., Inter-calibration of OH radical sources and water quality parameters. *Wat. Sci. Tech.* 1997, 35, 1-8.
- (22) Dulin, D.; Mill, T., Development and Evaluation of Sunlight Actinometers. *Environ. Sci. Technol.* 1982, 16, 815-820.
- (23) Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M.-C.; Kutscher, B.; Müller, A.; Niemeyer, U.; Pohl, J.; Polymeropoulos, E.E., Chemical and Biological Evaluation of Hydrolysis Products of Cyclophosphamide. *J. Med. Chem.* 1994, 37, 3986-3993.
- (24) Munoz, M.; Bonjoch, J.; Prat, J.; Pujol, M.; Girona, V.; de Bolos, J., Degradation kinetics of ifosfamide in aqueous solution. *Int. J. Pharmaceutics* 1996, 139, 249-253.
- (25) Larson, R.A.; Zepp, R.G., Reactivity of the carbonate radical with aniline derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.* 1988, 7, 265-274.
- (26) Schwarzenbach, R.P.; Gschwend, P.M.; Imboden, D.M. *Environmental Organic Chemistry*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken (New Jersey), 2003; p 1313.
- (27) Neta, P.; Dorfman, L.M., Pulse radiolysis studies. XIII. Rate constants for the reaction of hydroxyl radicals with aromatic compounds in aqueous solutions. *Adv. Chem. Ser.* 1968, 81, 222-230.
- (28) Hirahara, Y.; Ueno, H.; Nakamuro, K., Aqueous photodegradation of fenthion by ultraviolet B irradiation: contribution of singlet oxygen in photodegradation and photochemical hydrolysis. *Wat. Res.* 2003, 37, 468-476.
- (29) Liechti, P. *Der Zustand der Seen in der Schweiz*, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL): Bern (Schweiz), Schriftenreihe Umwelt Nr. 237, 1994; p 159.
- (30) Parsons, S., Ed. *Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment*; IWA Publishing: London (England), 2004; p 356.
- (31) Schecker, J.; Al-Ahmad, A.; Bauer, M.; Zellmann, H.; Kümmerer, K., Elimination des Zytostatikums Ifosfamid während der simulierten Zersetzung von Hausmüll im Labormassstab. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 1998, 10, 339-344.
- (32) Matsumoto, F.E.; Cólus, I.M.S., Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology* 2000, 23, 489-492.

- (33) Pacheco, M.; Santos, M.A., Induction of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in the Erythrocytes of *Anguilla Anguilla* L. Exposed either to Cyclophosphamide or to Bleached Kraft Pulp Mill Effluent. *Fresen. Envir. Bull.* 1996, 5, 746-751.
- (34) Santos, M. A.; Pacheco, M., Mutagenicity of Cyclophosphamide and Kraft Mill Effluent and Sediment on the Eel *Anguilla-Anguilla* L. *Sci. Total Environ.* 1995, 171, 127-130.

Dank

Wir bedanken uns bei Dr. A. Heck (Universitätsspital Zürich), Dr. U. Strebel (Kreisspital Männedorf) und Dr. T. Frösch (Bezirksspital Affoltern am Albis) für die interessanten Diskussionen und dienlichen Angaben, unter anderem zum Cytostatika-Verbrauch in ihren Spitälern oder zu Zeitpunkt, Dauer und Dosierung typischer Cytostatika-Behandlungen. Zwei Personen im Spital Männedorf resp. Unispital Zürich waren bereit, ihren Urin für Analysen zur Verfügung zu stellen, wofür ihnen herzlich gedankt sei.

Wir danken T. Zobrist von der Firma Baxter AG (Volketswil) für Angaben zum gesamtschweizerischen Verbrauch von Cyclophosphamid und Ifosfamid und für die Produktemonographien zu Endoxan und Holoxan.

J. Weber von der Abwasserreinigungsanlage Männedorf und P. Feusi von der ARA Werdhölzli in Zürich sei gedankt für die Abwasserproben, der Wasserversorgung Zürich für Wasserproben aus dem Zürichsee und dem Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL, Zürich) für Wasserproben aus dem Greifensee.

M. Langmeier und M. Reutlinger (Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz, EAWAG, Dübendorf) haben die chemische Charakterisierung des für die Inkubationsexperimente verwendeten Zürichseewassers vorgenommen. Dr. S. Canonica (EAWAG) sei gedankt für seine Ratschläge bei der Planung der photochemischen Experimente.

Wir möchten uns auch bei Dr. M.E. Balmer, A. Bächli, A. Hauser und B. Patrian (Agroscope FAW, Wädenswil) für zahlreiche Hilfeleistungen bei Probenahmen und im Labor bedanken.

Dieses Projekt wurde vom Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft finanziert. Wir danken Dr. B. Hitzfeld, Dr. U. Stämpfli, Dr. C. Studer und Dr. A. Weber für die interessanten Diskussionen.