

Bestimmung des Abbaus von persistenten Pharmazeutika mittels HPLC-MS/MS



Jochen Türk, Jörg Plöger, Thekla K. Kiffmeyer,

Bettina Becker, Stephan Kabasci, Klaus G. Schmidt, Heinz-Martin Kuß

Der Nachweis von Medikamenten in der aquatischen Umwelt hat in den letzten Jahren zu einer Vielzahl von Untersuchungen über Eintrag, Verbleib, Stabilität und Abbau von Pharmazeutika in verschiedenen Umweltkompartimenten geführt [1-9]. Dabei zeigte sich, dass Krankenhausabwasser in seiner Zusammensetzung zwar in vieler Hinsicht mit kommunalem Abwasser vergleichbar, aufgrund seiner Belastung mit Medikamenten, Diagnostika, Desinfektionsmitteln und Laborchemikalien jedoch zunehmend als problematisch anzusehen ist [10].

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass Klinikabwasser häufig mutagene und bakterientoxische Eigenschaften aufweist [11, 12]. Als Ursache wurden mutagen wirkende Pharmaka, insbesondere die in der Chemotherapie eingesetzten Zytostatika sowie bestimmte Antibiotika, wie z. B. Fluorochinolone identifiziert [12-14]. Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten gelangen mit den Patientenausscheidungen in das Abwassersystem. Nach Abschätzungen und ersten Untersuchungen ist bei Antibiotika mit einer Konzentration im Klinikabwasser von ca. 1 mg/L, bei Zytostatika mit 0,01-0,1 mg/L zu rechnen [7, 10]. Die Mehrzahl der bislang untersuchten Zytostatika und Antibiotika erwies sich sowohl in Laborversuchen als auch bei Untersuchungen der Zu- und Abläufe von Kläranlagen als nicht biologisch abbaubar [15-17]. Einige dieser Substanzen und auch deren Metaboliten konnten außer in den Kläranlagenabläufen auch in Oberflächen- und Grundwasser nachgewiesen werden [4, 7, 18].

Neben der Persistenz dieser Pharmaka werden vor allem Mutagenität und endokrine Effekte als zunehmend problematisch angesehen. Die Verweiblichung von z. B. Fischen aufgrund der hormonellen Wirkung von endokrinen Substanzen in Oberflächenwasser ist bereits mehrfach beschrieben [19]. Der Einfluss auf den Menschen ist allerdings noch nicht geklärt und wird sehr kontrovers diskutiert. Ähnliches gilt für die Ausbildung von resistenten Keimen durch subtherapeutische Antibiotikakonzentrationen. Kari et al. [20] beschreiben zwar die häufiger auftretende Antibiotikaresistenz bei tier- und humanpathogenen Keimen, aber auch hier konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob der Grund neben dem häufigeren Antibiotikaeinsatz auch die Verbreitung der Wirkstoffe bzw. deren Metaboliten in der Umwelt ist.

Bereits heute sehen die Regelungen des deutschen und europäischen Arzneimittelrechts eine Prüfung der ökotoxikologischen Eigenschaften bei der Neuzulassung von Veterinärarzneimitteln vor. Eine entsprechende Re-

gelung für Humanarzneimittel ist in Vorbereitung. In der EU-Richtlinie 2003/63/EG der Kommission vom 25.06.2003 wird u.a. gefordert, dass Zulassungsanträge gegebenenfalls eine zusammenfassende Beurteilung möglicher Umweltgefährdungen durch die Verwendung und/oder Beseitigung des Arzneimittels sowie Vorschläge für geeignete Beschriftungen enthalten müssen [21].

Von der Öffentlichkeit und verschiedenen Institutionen wird vor diesem Hintergrund aus Vorsorgegründen großes Interesse an der Verringerung kritischer Inhaltsstoffe aus Krankenhausabwasser geäußert und die Bereitstellung geeigneter Technologien angemahnt [9, 10]. Auch die stark steigende Zahl nationaler und internationaler Forschungsprojekte und Tagungen, die sich mit dieser Problematik befassen, macht den Forschungsbedarf und die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Verfahren deutlich [22, 23].

Die Autoren

Jochen Türk ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA). Nach Abschluss des Chemiestudiums an der Universität Dortmund wechselte er im Rahmen der Promotion bei PD Dr. Kuß zur Universität Duisburg-Essen an das IUTA. Dort arbeitet er an der Entwicklung neuer Analysemethoden für arbeits- und umweltschutzrelevante Pharmazeutika mittels HPLC-MS/MS. **Jörg Plöger** studiert an der Hochschule Niederrhein Instrumentelle Analytik und hat im Rahmen eines Praxissemesters und seiner anschließenden Tätigkeit als studentische Hilfskraft am IUTA an dem gemeinsamen Projekt von IUTA und Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT mitgearbeitet. Zurzeit schreibt er seine Diplomarbeit zum Thema Hochtemperaturflüssigchromatographie am IUTA. **Dr. Thekla Kiffmeyer** promovierte über das Thema „Ökologisch-chemisches Verhalten und spurenanalytische Charakterisierung von Zytostatika“ in Bochum und ist seit 1998 Leiterin des Bereiches Umweltmedizin im IUTA. Frau **Bettina Becker** studierte an der Hochschule Niederrhein Chemieingenieurwesen mit Schwerpunkt Bioverfahrenstechnik und ist seit 2000 bei Fraunhofer UMSICHT in der Abteilung Bioverfahrenstechnik bei Herrn Dr. Kabasci tätig. **Dr. Stephan Kabasci** studierte an der Universität Dortmund Chemietechnik und promovierte bei Fraunhofer UMSICHT. Seit 1998 ist er dort Kompetenzfeldleiter „Bioverfahrenstechnik“ und seit Januar 2004 Geschäftsfeldleiter „Nachwachsende Rohstoffe“. **Prof. Dr.-Ing. Klaus Gerhard Schmidt** ist wissenschaftlicher Leiter des IUTA und Lehrstuhlinhaber für Umweltverfahrenstechnik an der Universität Duisburg-Essen, Standort Duisburg. Privatdozent Privat-Dozent Dr. **Heinz-Martin Kuß** studierte Chemie an der RWTH Aachen. Er lehrt und forscht auf dem Gebiet Instrumentelle Analytik im Rahmen des Internationalen Bachelor/Master-Studienganges „Wasser: Chemie Analytik Mikrobiologie“ an der Universität Duisburg-Essen, Campus Duisburg. Er ist Mitherausgeber der CLB.

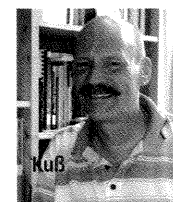
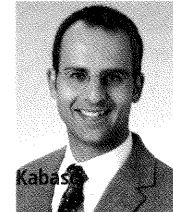
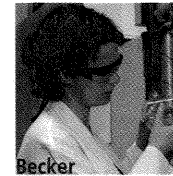
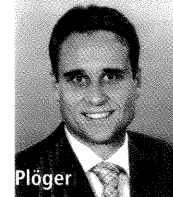
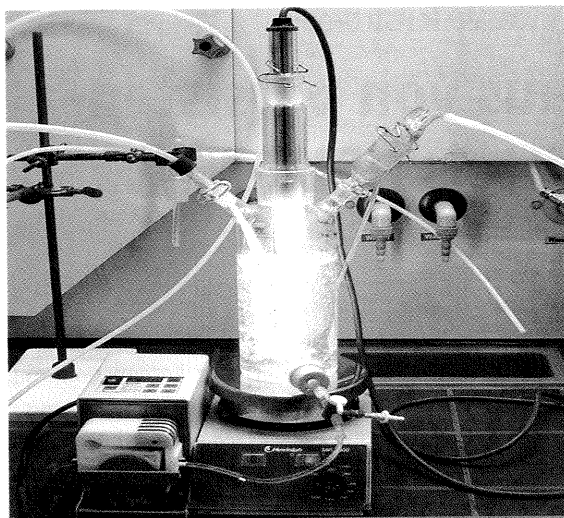


Abbildung 1:
Laboranlage zur
Abwasserbe-
handlung mit
Heraeus TNN 15/32
Quecksilber-Nieder-
druckstrahler (P =
15 W, $\lambda = 254$ nm).

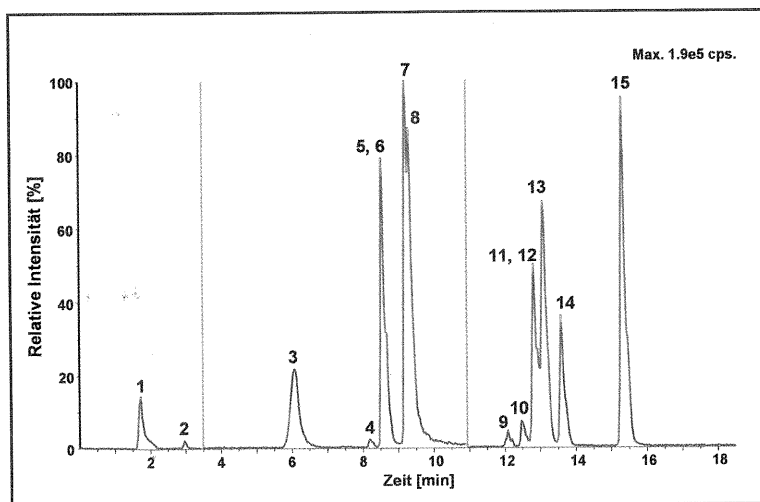


Analytik

Abbildung 2:
LC-MS/MS-Chro-
matogramm (TIC)
eines dotierten
Toilettenab-
wassers (100
 $\mu\text{g/L}$). Zytostatika:
Cytarabin (1),
5-Flourouracil (2),
Chlorambucil (4),
Methotrexat (6),
Ifosfamid (11),
Cyclophosphamid
(13) und Etoposid
(14); Antibiotika:
Amoxicillin (3),
Trimethoprim (5),
Ofloxacin (7),
Ciprofloxacin (8),
Cefuroxim (9),
Sulfamethoxazol
(10), Chloram-
phenicol (12),
Penicillin V (15).

Die Analytik der im Spurenbereich vorkommenden, meist polaren, wasserlöslichen Pharmazeutika wurde erst durch die Weiterentwicklungen in der HPLC-MS-Gerätetechnik [24, 25] ermöglicht. Zur Kontrolle der Wirksamkeit eines neuen Behandlungsverfahrens war die Entwicklung einer einfachen und robusten Multi-Methode ohne aufwändige Probenvorbereitung notwendig.

Nach Filtration durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Celluloseacetat-Spritzenfilter (Schleicher & Schuell) können die Proben direkt mittels LC-MS/MS analysiert werden. Die chromatographische Trennung erfolgt mit einem 0,1 % Ameisensäure enthaltenden Wasser-Acetonitril-Gradienten auf einer 125×2 mm Nucleodur 100-5 C18 EC HPLC-Säule (Macherey-Nagel) mit einer Flussrate von $300 \mu\text{L/min}$ bei 30°C . Nach Ionisierung mittels TurbolonSpray bei 400°C erfolgt die Messung in drei Zeitfenstern mit Polaritätswechsel im positiven und negativen MRM-Modus (multiple reaction mode) mit einem API 3000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Applied Biosystems). Umschalt- (settling time) und



Verweilzeit (dwell time) betragen 700 bzw. 100 ms. Die Nachweisgrenzen dieser Multi-Methode liegen substanz- und matrixabhängig zwischen $0,2 \mu\text{g/L}$ und $5 \mu\text{g/L}$. Zur exakten Quantifizierung ist eine gewichtete Matrix-Kalibration ($1/x$) notwendig. In Abbildung 2 ist das LC-MS/MS-Chromatogramm einer dotierten Toilettenabwasserprobe dargestellt.

Verfahrensentwicklung

Für die Reduktion von Pharmazeutikabelastungen in der aquatischen Umwelt gibt es auf dem Weg der Wirksubstanzen vom Patienten zur Trinkwasseraufbereitung verschiedene Ansatzpunkte bezüglich des Einsatzortes der Behandlungsverfahren. Allen Ansätzen gemein ist nach einer entsprechenden Vorbehandlung die Anwendung von oxidativen Verfahren [8, 25]. Besonders hervorzuheben sind hierbei die sogenannten advanced oxidation processes (AOP). Bei diesen Verfahren werden die Wasserinhaltsstoffe mit Hilfe von Ozon oder Wasserstoffperoxid bzw. einer Kombinationen beider Oxidationsmittel in Verbindung mit UV-Strahlung oxidiert. Die Oxidation erfolgt hierbei im Wesentlichen über im UV-Licht entstehende Hydroxylradikale. Um mögliche ökotoxikologische Auswirkungen zu minimieren, ist eine frühzeitige Entfernung der Arzneimittel aus dem Abwasser anzustreben.

Die direkte Behandlung von Teilabwasserströmen hat im Gegensatz zur Behandlung des gesamten Abwassers den Vorteil, dass hier nur die mit Pharmazeutika hoch belasteten Toilettenabwässer, nicht aber die Spül-, Küchen- und Wäschereiabwässer von Krankenhäusern behandelt werden müssen. Auch sind die zu behandelnden Volumenströme wesentlich kleiner als bei Behandlung ganzer Kläranlagenabläufe.

Die im Rahmen des mit Mitteln des BMWA geförderten AiF-Forschungsvorhabens „Entwicklung eines Verfahrens zur oxidativen Behandlung von Krankenhausabwasser-Teilströmen – insbesondere zur Eliminierung von Zytostatika im Abwasser“ (AiF-Vorhaben-Nr. 13147) im Labormaßstab durchgeführte Verfahrensentwicklung ist Grundlage für den Bau einer Pilotanlage. Bei diesem ersten Teilvorhaben des zweistufig aufgebauten Projektes zeigten die Versuche, dass eine aufwändige Feststoffseparierung, wie sie z. B. die Membranfiltration darstellt, nicht notwendig ist. Nach 6 bis 10-stündiger Sedimentation des Toilettenabwassers ist eine direkte Behandlung des Überstandes möglich. In den Laborversuchen wurden für sieben Zytostatika und acht Antibiotika die Effektivität des Abbaus in Abhängigkeit von der verwendeten UV-Strahlung, Art und Menge des Oxidationsmittels, Behandlungsdauer und Temperatur sowie der Einfluss verschiedener Reaktionsvolumina mit der in Abbildung 1 dargestellten Versuchsanlage untersucht.

Die Versuche zeigten, dass ein Abbau ($> 99\%$) sowie eine Reduktion der ökotoxikologischen Eigenschaften mit verschiedenen Verfahren erreichbar ist. Je nach Art des eingesetzten Oxidationsmittels (Ozon O_3 oder Wasser-

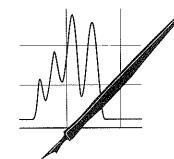
stoffperoxid H_2O_2) und der verwendeten UV-Strahlung (Quecksilber-Niederdruckstrahler Hg-Nd oder -Mittel-druckstrahler Hg-Md) sind Behandlungszeiten zwischen 10 und 90 Minuten erforderlich. In der Tabelle sind die Ergebnisse der untersuchten Verfahrensvarianten zusammengestellt. Leitsubstanz für die Beurteilung der Kinetik mittels der Halbwertszeit τ ist das am schwersten zu oxidierende Cyclophosphamid (CP).

Als Fazit der Untersuchungen ist festzuhalten, dass nur einige Verfahren eine ausreichende Wirksamkeit aufweisen. Schlechte Ergebnisse erzielten die Kombinationen von Ozon/UV bzw. $O_3/H_2O_2/UV$. Diese Varianten werden daher für die weitere Betrachtung ausgeschlossen. Bei den anderen Verfahren (Hg-Nd/ H_2O_2 , Hg-Md/ H_2O_2 , und Ozon ohne UV-Strahlung) zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Laborergebnissen und ersten Untersuchungen mit halbertechnischen Anlagen. Diese sind zum einen in der deutlich höheren spezifischen Leistung der UV-Strahler (UMEX, Hg-Md) und zum anderen in der Verwendung eines besseren Gaseintragssystems (Wedeco, O_3) begründet.

In einem Folgeprojekt sollen daher die aussichtsreichsten Technologien (Hg-Nd/ H_2O_2 , Hg-Md/ H_2O_2 und Ozon) im praxisnahen Betrieb getestet und im Hinblick auf Effektivität und insbesondere Wirtschaftlichkeit optimiert werden. Die Ergebnisse dieser F&E-Arbeiten, die Erstellung eines Funktionsmusters zur Behandlung von Toilettenabläufen und die Demonstration der Effektivität im realen Maßstab sind Voraussetzung für den Erfolg und die wirtschaftliche Einsetzbarkeit dieser neuen Technologie.

Umweltchemie und Ökotoxikologie, 8. Jahrg. 2002 / Nr. 4.

- [10] ATV-DVWK Merkblatt 775 „Abwasser aus Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen“, ATV-DVWK, Februar 2001.
- [11] Giuliani F, Koller T, Wurgler FE, Widmer RM (1996) Mutation Research. Genetic Toxicology 368 (1): 49-57.
- [12] Hartmann A, Golet E, Gartiser S, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1998) Environ Toxicol Chem. 17: 377-382.
- [13] Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1999) Arch of Environ Contam Toxicol. 36: 115-119.
- [14] Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA, Giger W (2001) Anal Chem. 73(15): 3632-3638.
- [15] Kümmerer K, Al-Ahmad A, Steger-Hartmann T (1996) Umwelt-med. Forsch Prax. 1(3): 133-137.
- [16] Steger-Hartmann T, Kümmerer K, Hartmann A (1997) Ecotoxicology and Environmental Safety 36: 174-179.
- [17] Kiffmeyer T, Götz HJ, Jursch M, Lüders U (1998) Fresenius Journal of Analytical Chemistry 361: 185-191.
- [18] Ternes TA (2001) TrAC Trends in Analytical Chemistry 20 (8): 419-434.
- [19] McLachlan JA (2001) Endocrine Reviews 22: 319-341.
- [20] Kari FG, Eckhardt A, Hohl U (1999) gwa - Gas, Wasser, Abwasser 79: 443-453.
- [21] EU-Richtlinie 2003/63/EG vom 25.06.2003
- [22] Enviropharma, European conference on Human and Veterinary Pharmaceuticals in the Environment, 14.-16.04.2003, Lyon, Frankreich.
- [23] 3rd Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment, 19.-24.05.2003, Goslar.
- [24] Niessen WMA (1999) J. Chromatogr. A 856: 179-197.
- [25] Ternes TA, Stüber J, Herrmann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M, Teiser B (2003) Water Research 37: 1976-1982.



AUFSÄTZE

Tabelle : Vergleich der untersuchten Oxidations-Varianten anhand der Halbwertszeit τ und des Substanzabbaus der Leitsubstanz Cyclophosphamid (CP) sowie der Toxizitätsreduktion nach umuC-Test.

Literatur

- [1] Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Mehlich A, Ballwanz F, Kratz KL (1998) J. Chromatogr. A 812: 53-75.
- [2] Halling-Sørensen B, Nilsen N, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten-Lützhof H-C, Jørgensen SE (1998) Chemosphere 36: 357-393.
- [3] Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Kratz K-L (1999) Sci Total Environ 225: 109-118.
- [4] Sacher F, Lange FT, Brauch HJ, Blankenhorn I (2001) J. Chromatogr. A 938: 199-210.
- [5] Daughton CG, Ternes TA (1999) Environment Health Persp. 107 (Supp. 6): 907-938.
- [6] Jørgensen SE, Halling-Sørensen B (2000) Chemosphere 40: 691-699.
- [7] Kümmerer, K. (Ed.): Pharmaceuticals in the Environment. 1. Aufl., Springer Heidelberg, New York, 2001.
- [8] Heberer T (2002) Toxicol Lett 131: 5-17.
- [9] Rönnefahrt I, Koschorreck J, Kolossa-Gehring M. Arzneimittel in der Umwelt, Mitteilungsblatt der Fachgruppe

Verfahren / Maßstab	τ (CP) [min] ¹	Zeit für Substanzabbau > 99 % [min] ¹	Toxizitätsreduktion (umuC-Test) [%]
Laborapparatur			
Hg-Nd (15 W/L)	-	kein Abbau	n.b.
Hg-Nd (15W/L) + 1 g/L H_2O_2	3,9	15	> 98 % nach 120 min
Hg-Md (150 W/L) + 2 g/L H_2O_2	26	> 40	n.b.
Hg-Md (150 W/L) + 80 mg /min $L^{-1}O_3$	-	kein Abbau	n.b.
Hg-Md (150 W/L) + 1 g/L H_2O_2 und 80 mg /min $L^{-1}O_3$	> 120	20 % Abbau nach 120 min	n.b.
O_3 (80 mg /min L^{-1})	-	kein Abbau	n.b.
halbertechnische Anlagen			
Md (2100 W/L) + 1 g/L H_2O_2 , Fa. UMEX	0,4	1,7	> 99 % nach 60 min
Nd (120 W/L) + 1 g/L H_2O_2 , Fa. UMEX	3,8	23	n.b.
Blasensäule, 25 mg O_3 /min L^{-1} , Fa. Wedeco	2,6	11	> 99 % nach 16 min

¹ bezogen auf 1 L Reaktorvolumen

² n.b. = nicht bestimmt