# Umgebungsmonitoring des Zytostatikums 5-Fluorouracil und Nachweis seines Hauptmetaboliten im Urin

**Dissertation**

**von**

**Sabine Funck**

**2003**

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

# Umgebungsmonitoring des Zytostatikums 5-Fluorouracil und Nachweis seines Hauptmetaboliten im Urin

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sabine Funck
aus Nettetal

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. D. Nowak |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. A. Schalhorn |
| | Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Dr. rer. nat. R. Schierl |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter |

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2003

# Inhaltsverzeichnis


**1. Einleitung ..... 1**

1.2 Risiken durch CMR Arzneimittel ..... 4

1.2.1 Cancerogenität ..... 4

1.2.2 Reproduktionstoxizität ..... 4

1.2.3 Mutagenität ..... 5

1.3 Überprüfung der Belastungen von Beschäftigten durch Monitoring ..... 5

1.3.1 Biologisches Beanspruchungsmonitoring ..... 5

1.3.2 Biologisches Belastungsmonitoring ..... 6

1.3.3 Umgebungsmonitoring ..... 6

**2. Ziel der vorliegenden Arbeit ..... 7**

**Teil A-Umgebungsmonitoring ..... 9**

**A.3. Methode ..... 9**

A.3.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ..... 9

A.3.2 Probenaufbereitung von 5-FU Wischproben ..... 10

A.3.2.1 Probenahme ..... 10

A.3.2.1.1 Lösungsmittel ..... 10

A.3.2.1.2 Wischtechnik und Wischmaterial ..... 11

A.3.2.1.3 Wischprobennahme ..... 12

A.3.2.1.4 Probenahme an Zytostatika-Vorratsgefäßen ..... 13

A.3.2.1.5 Probenahme an Handschuhen ..... 13

A.3.2.2 Extraktion ..... 13

A.3.2.3 Interner Standard ..... 13

A.3.2.4 Eintrocknung ..... 14

A.3.2.5 Derivatisierung ..... 14

A.3.2.6 Analyse ..... 17

A.3.2.6.1 Gaschromatographie ..... 17

A.3.2.6.2 Massenspektrometrie ..... 18

**A.4. Ergebnisse ..... 19**

A.4.1 Methode ..... 19

A.4.1.1 Wischtests mit verschiedener Anzahl Filter ..... 19

A.4.1.2 Abdampfen des Derivatisierungsmittels ..... 20

A.4.1.3 Stabilität von 5-FU bei verschiedenen Lagerungsbedingungen ..... 20

A.4.1.4 Stabilität von 5-FU in der extrahierten Probe ..... 21

A.4.1.5 Stabilität der 5-FU Stammlösung ..... 21

A.4.2 Validierung der Probenaufbereitung von 5-FU Wischproben ..... 22

A.4.2.1 Wiederfindung ..... 22

A.4.2.2 Präzision ..... 22

A.4.2.2.1 Präzision in der Serie ... 23
A.4.2.2.2 Präzision von Tag zu Tag ... 23
A.4.2.3 Nachweisgrenze ... 23
A.4.2.4 Bestimmungsgrenze ... 23
A.4.2.5 Linearität ... 24
A.4.2.6 Bestimmungsbereich ... 25
A.4.2.7 Empfindlichkeit ... 25
A.4.3 Ergebnisse der Wischproben ... 25
A.4.3.1 Teilnehmer ... 26
A.4.3.2 Umgebungsmonitoring in Apotheken ... 26
A.4.3.2.1 Wiederholungsmessungen ... 30
A.4.3.2.2 Zytostatika verarbeitende Apotheken in Frankreich ... 31
A.4.3.3 Umgebungsmonitoring auf Stationen ... 33
A.4.3.4 Kontamination an Zytostatika-Vorratsgefäßen ... 36
A.4.3.5 Handschuhe ... 37
**A.5. Diskussion ... 38**
A.5.1 Methode ... 38
A.5.2 Apotheken ... 39
A.5.2.1 Wiederholungsmessungen ... 41
A.5.2.2 Zytostatika verarbeitende Apotheken in Frankreich ... 42
A.5.3 Stationen ... 43
A.5.4 Zytostatika-Vorratsgefäße ... 44
A.5.5 Handschuhe ... 46
**Teil B: Biologisches Belastungsmonitoring ... 48**
Metabolismus von 5-FU ... 48
**B.3 Methodenentwicklung ... 49**
B.3.1 Löslichkeitsverhalten ... 49
B.3.2 Derivatisierung ... 50
B.3.2.1 Gaschromatographie ... 51
B.3.2.2 Massenspektrometrie ... 51
B.3.3 Urin in der Analytik ... 53
B.3.4 Flüssig-Flüssig Extraktion ... 53
B.3.5 Fest-Flüssig Extraktion ... 54
B.3.5.1 Vorversuch mit UV-Vis Spektroskopie ... 55
B.3.5.2 Anionenaustauscher ... 57
B.3.5.2.1 Oasis® MAX ... 57
Vorversuche mit UV-Vis Spektroskopie ... 58
Bestimmung mit GC/MS ... 59
Veränderung der Waschlösung ... 59
Variation der Menge Elutionslösung ... 59
Alanin als Störsubstanz ... 60

Centriprep® ..... 60
Minisart® ..... 61
B.3.5.2.2 LiChrolut® SAX und LiChrolut® $NH_2$ ..... 61
B.3.5.3 Kationenaustauscher ..... 62
B.3.5.3.1 SPEC PLUS 3 ml DAU ..... 63
B.3.5.3.2 Oasis® MCX ..... 63
B.3.5.3.3 LiChrolut® SCX ..... 64
Vorversuche mit UV-Vis Spektroskopie ..... 65
Versuche mit GC/MS ..... 65
Bestimmung der geeigneten Säure zur Einstellung des pH Wertes ..... 65
Bestimmung des geeigneten Elutionsmittels ..... 65
Menge Elutionsmittel ..... 66
Bestimmung der geeigneten Waschlösungen ..... 66
Bestimmung von FBAL aus Urin eines Patienten ..... 66
Quantitativer Nachweis von FBAL aus Urinproben ..... 66
B.3.5.3.4 Bond Elut – Certify ..... 67
B.3.5.4 Weitere Säulenmaterialien ..... 67
B.3.5.4.1 Bond Elut C18 ..... 69
B.3.5.4.2 ISOLUTE ENV+ ..... 69
B.3.5.4.3 Oasis® HLB ..... 70
Vorversuche mit UV-Vis Spektroskopie ..... 70
Messungen mit GC/MS ..... 70
**B.4. Diskussion der Methode ..... 72**
**6. Ausblick ..... 74**
**7. Zusammenfassung ..... 75**
**8. Literatur ..... 77**
**Anhang ..... 83**
Materialien und Chemikalien
**Danksagung**
**Lebenslauf**

# Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** *Krebsneuerkrankungsfälle 1998 in Deutschland*.....1
**Abbildung 2:** *Sterbefälle 1998 in Deutschland* ..... 1
**Abbildung 3:** *Zytostatika Werkbank Typ V*.....3
**Abbildung 4:** *Schematischer Schnitt durch einen Mini-Spike*..... 3
**Abbildung 5:** *Chemische Struktur von 5-Fluorouracil*..... 7
**Abbildung 6:** *Chemische Struktur von $\alpha$-Fluoro-$\beta$-alanin* ..... 8
**Abbildung 7:** *Hauptbestandteile eines gaschromatographischen Systems* ..... 9
**Abbildung 8:** *Schema der Probenaufbereitung* ..... 10
**Abbildung 9:** *Schema der Probenahme..* ..... 12
**Abbildung 10:** *Fragmentierungsschema des 5-FU Derivats* ..... 15
**Abbildung 11:** *Massenspektrum des 5-FU Derivats*..... 15
**Abbildung 12:** *Gaschromatogramm einer Probe mit 64 ng 5-FU pro Probe* ..... 16
**Abbildung 13***: Wiederfindungen nach Wischen mit 3 Filtern oder 4 Filtern*..... 19
**Abbildung 14:** *Wiederfindung von 5-FU aus extrahierten Wischproben nach siebentägiger Lagerung bei –20 °C* ..... 21
**Abbildung 15:** *Gaschromatogramm einer Probe mit 1,8 ng 5-FU pro Probe* ..... 24
**Abbildung 16:** *Darstellung der Probenahmeorte in der BRD* ..... 26
**Abbildung 17:** *Herstellung einer Zytostatika-Infusion*..... 27
**Abbildung 18:** *Vergleich der Kontamination an verschiedenen Probenahmeorten* . 29
**Abbildung 19:** *Außenkontamination von 5-FU Vorratsgefäßen*..... 36
**Abbildung 20:** *Kontamination der Handschuhe mit 5-FU*..... 37
**Abbildung 21:** *Metabolisierung von 5-FU*..... 49
**Abbildung 22:** *Fragmentierungsschema des FBAL Derivates* ..... 52
**Abbildung 23:** *Prinzip der Festphasenextraktion* ..... 55
**Abbildung 24:** *UV-Vis Spektrum einer Lösung 6 mg FPAL pro ml ammoniakal. Methanol*..... 56
**Abbildung 25:** *Struktur des Oasis® MAX Säulenmaterials*..... 58
**Abbildung 26:** *Prinzip von Centriprep®* ..... 60
**Abbildung 27:** *Struktur des Oasis® MCX Säulenmaterials*..... 64
**Abbildung 28:** *Struktur des Bond Elut C18 Säulenmaterials*..... 69
**Abbildung 29:** *Struktur des ISOLUTE ENV+ Säulenmaterials*..... 69
**Abbildung 30:** *Struktur des Oasis® HLB Trägermaterials* ..... 70

# Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** *Durchschnittliche Verbrauchsmengen und Anzahl Zubereitungen einiger Zytostatika in den teilnehmenden Apotheken* ..... 7
**Tabelle 2:** *Peakfläche m/z 301,0 bei unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen* ..... 17
**Tabelle 3:** *Wiederfindung von 5-FU aus Wischproben nach unterschiedlichen Lagerungsbedingungen* ..... 20
**Tabelle 4:** *Wiederfindungen von 5-FU aus Wischproben bei verschiedenen Konzentrationen* ..... 22
**Tabelle 5:** *Verbrauchsmenge (g/Jahr) und Anzahl Zubereitungen von 5-FU in den teilnehmenden Apotheken* ..... 27
**Tabelle 6:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-FU in Apotheken* ..... 28
**Tabelle 7:** *Ergebnisse der ersten und zweiten Messung an verschiedenen Probenahmeorten* ..... 31
**Tabelle 8:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-Fluorouracil in französischen Apotheken* ..... 32
**Tabelle 9:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-Fluorouracil von Stationen mit eigener Zubereitung* ..... 34
**Tabelle 10:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-Fluorouracil von Stationen ohne eigene Zubereitung* ..... 35
**Tabelle 11:** *Peakfläche m/z 278 bei unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen* ..... 52
**Tabelle 12:** *Probenaufbereitungsverfahren mit Anionenaustauschern* ..... 57
**Tabelle 13:** *Probenaufbereitungsverfahren mit Kationenaustauschern* ..... 62
**Tabelle 14***: Probenaufbereitungsverfahren mit weiteren Festphasensäulen* ..... 68

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm ($10^{-6}$ g) |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| 5-ClU | 5-Chloruracil |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| BAT | Biologischer Arbeitsstoff Toleranz Wert |
| cm | Zentimeter |
| FBAL | DL-2-Fluoro-3-alanin |
| FPAL | DL-3-Fluorphenylalanin |
| g | Gramm |
| GC/MS | Gaschromatographie/Massenspektrometrie |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IS | Interner Standard |
| LAF | Laminar Air Flow |
| m | Meter |
| *m/z* | Masse zu Ladungsvehältnis |
| MAK | Maximale Arbeitsplatz Konzentration |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| n | Anzahl |
| ng | Nanogramm ($10^{-9}$ g) |
| nm | Nanometer |
| pg | Pikogramm ($10^{-12}$ g) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Standardabweichung |
| sec | Sekunde |
| SIM | Selected Ion Monitoring |
| TBDMS | N-tert.-Butyl-dimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid |
| TFAL | 3,3,3-Trifluoro-DL-alanin |
| Upm | Umdrehung pro Minute |
| z.T. | zum Teil |

# 1. Einleitung

1998 erkrankten in Deutschland etwa 179.000 Frauen und 168.000 Männer erstmalig an Krebs. Die Zahl der erfassten jährlichen Krebsneuerkrankungen hat in den Jahren 1990-1998 bei Männern um 11 % und bei Frauen um 7 % zugenommen. 1998 starben etwas mehr als 103.000 Frauen und 108.500 Männer an den Folgen einer Krebserkrankung (Abbildung 1, 2) (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002).

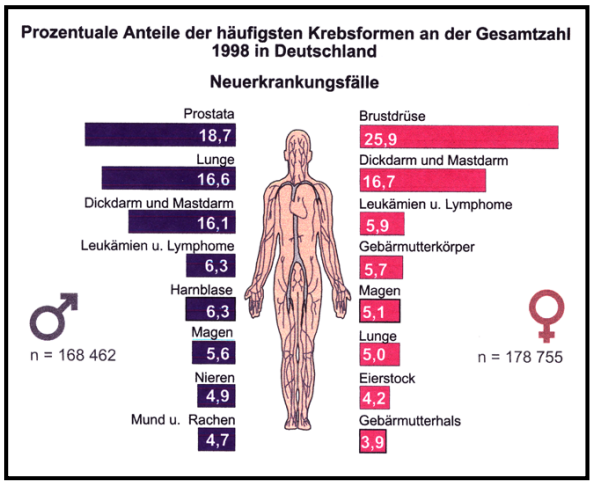


**Abbildung 1:** *Krebsneuerkrankungsfälle 1998 in Deutschland*

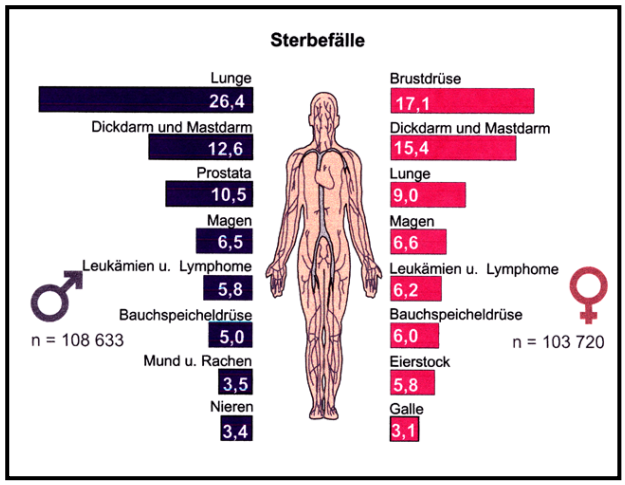


**Abbildung 2:** *Sterbefälle 1998 in Deutschland*

Jeder vierte Einwohner in Deutschland erkrankt somit im Laufe seines Lebens an Krebs. Seit den siebziger Jahren zeigt sich allerdings insgesamt eine Verbesserung der Überlebensrate von Krebspatientinnen und –patienten (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Dies ist sicherlich auf eine Optimierung der Diagnostik und Therapie zurückzuführen.

Die Krebstherapie beruht im wesentlichen auf 3 Säulen:

(1) Operation
(2) Strahlentherapie
(3) Chemotherapie

(1) Chirurgische Maßnahmen waren lange Zeit die einzige Möglichkeit zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Ziel der Operation muss die vollständige

Entfernung des Tumors sein, wodurch sich die Prognose für den Patienten verbessert (Siewert & Fink 1999).

(2) Die Strahlentherapie hat sich zu einem wichtigen Bestandteil der modernen Hämatologie und Onkologie entwickelt. Das Ziel bei der Behandlung von benignen und malignen Erkrankungen mittels ionisierender Strahlen ist die maximale Tumorschädigung bei minimaler Schädigung des gesunden Gewebes. Dies wird durch den Einsatz von differenzierten Bestrahlungstechniken erreicht (Molls 1999).

(3) Seit den vierziger Jahren werden verstärkt Zytostatika bei der Behandlung von Tumoren im Rahmen der Chemotherapie eingesetzt. Diese Substanzen schädigen durch ihre zytotoxische Wirkung das entartete Gewebe. Somit wird die Teilung der Zellen unterbunden. Ein Teil des Tumors stirbt ab, wodurch die Tumormasse reduziert wird. Zytostatika wirken dabei aber nicht spezifisch auf Tumorzellen, sondern schädigen auch schon in geringen Konzentrationen gesundes Gewebe. Aufgrund dieser Eigenschaft gehören Zytostatika zu einer besonderen Arzneimittelgruppe, da sie für den Patienten als Arzneimittel wirken, durch die Schädigung des gesunden Gewebes aber auch einen Gefahrstoff darstellen.
Die Therapie mit Zytostatika nimmt trotz dieser unselektiven Wirkung eine immer wichtigere Rolle in der Behandlung von Tumoren ein. Mittlerweile werden 86 verschiedene zytostatische Wirkstoffe bei der Tumortherapie eingesetzt (Rote Liste 2002).
Zytostatika werden wegen ihrer geringen therapeutischen Breite für den Patienten individuell vor der Applikation dosiert. Immer häufiger werden diese Zubereitungen in speziell dafür ausgestatteten Räumen, meist innerhalb der Apotheke, hergestellt. 1998 waren bereits drei Viertel der deutschen Krankenhausapotheken mit einer eigenen Zytostatikazubereitungsabteilung ausgestattet (ADKA Ausschuss für Arzneimittelherstellung und Analytik 1998). Wegen der potentiellen Gefährdung des Personals in Apotheken oder auf onkologischen Stationen durch Kontakt mit diesen Arzneimitteln ist ein sicherer und sauberer Umgang unerlässlich.
In zahlreichen Richtlinien ist heute der Umgang mit Zytostatika beschrieben, wie beispielsweise Merkblatt M620 der BGW, Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS), Apothekengesetz, Chemikaliengesetz und Gefahrstoffverordnung. Verschiedene Sicherheitssysteme, wie Sicherheitswerkbänke mit laminarer

Luftströmung (LAF, Abbildung 3), und Schutzsysteme, wie z.B. Spikes (Abbildung 4) oder Mischadapter, die die Aerosolbildung bei der Verarbeitung von Zytostatika vermindern, sind mittlerweile sehr gut entwickelt. Diese Einrichtungen gewähren einen effizienten Produkt- und Personenschutz.

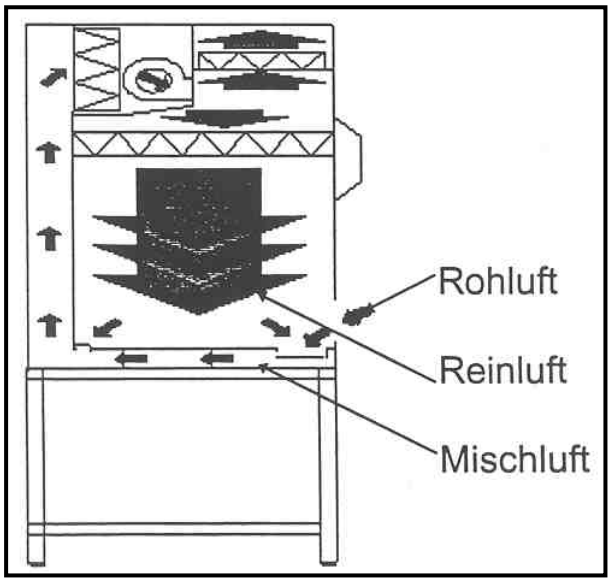


**Abbildung 3:** *Zytostatika Werkbank Typ V (Pfeile deuten den Verlauf der Luftströme an)*

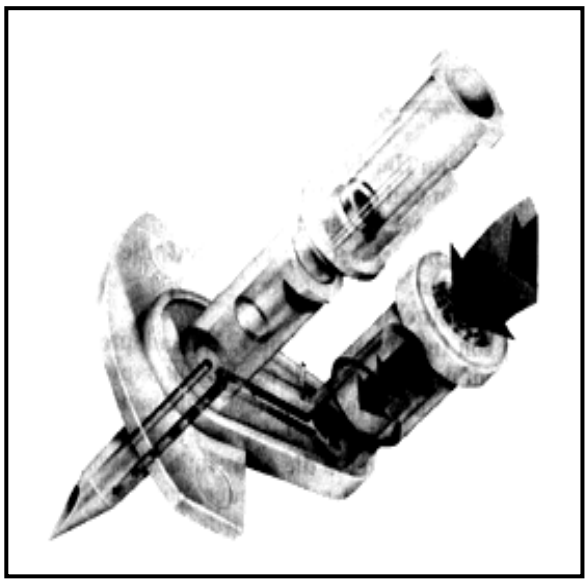

**Abbildung 4:** *Schematischer Schnitt durch einen Mini-Spike (B.Braun Melsungen AG)*

Trotzdem gibt es im Arbeitsalltag Situationen, in denen es zu einer Kontamination mit Zytostatika und damit zu einer potentiellen Gefährdung der Beschäftigten kommen kann. Neben der fehlerhaften Nutzung der Schutzmaßnahmen und Sicherheitssysteme kann es auch bei der Reinigung nach Bruch von Zytostatika-Flaschen und beim versehentlichen Stechen mit einer kontaminierten Spritze zu einer Inkorporation von Zytostatika kommen. Auf Stationen sind das Anstechen der Infusionslösung, die Entlüftung des Infusionsbestecks und das An- oder Ablegen der Infusion Situationen, bei denen es zu einem Kontakt mit Zytostatika kommen kann. Auch beim Umgang mit Ausscheidungen des Patienten muss sich das Pflegepersonal vor einer möglichen Aufnahme schützen.

## 1.2 Risiken durch CMR Arzneimittel

Neben der wachstumshemmenden Wirkung auf Tumore wirken Zytostatika auch cancerogen, mutagen und/oder reproduktionstoxisch (teratogen), weshalb sie auch als CMR Arzneimittel bezeichnet werden.

### 1.2.1 Cancerogenität

Sowohl von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als auch in der MAK- und BAT-Werte-Liste wurden einige Zytostatika, wie beispielsweise Cyclophosphamid, als krebserzeugend eingestuft. Es muss daher mit einer möglichen Gesundheitsgefährdung, auch beim beruflichen Umgang mit diesen Substanzen, gerechnet werden (Deutsche Forschungsgemeinschaft 2001). Das Berufsgenossenschaftliche Institut für Arbeitssicherheit (BIA) hat eine cancerogene Risikoabschätzung für sechs verschiedene Zytostatika ermittelt. Demnach liegt das Risiko, einen Tumor zu entwickeln, bei berufsbedingtem Umgang (Verarbeitung und Verabreichung) mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid nach 35 Jahren bei rund 1:10.000 (Nies & Roller 2001). Hieraus ergibt sich eine potentielle Gefährdung von Personen, die Umgang mit diesen Substanzen haben.

### 1.2.2 Reproduktionstoxizität

Es existieren Studien zur Teratogenität von Zytostatika, die einen statistischen Zusammenhang zwischen spontanen Fehl- oder Missgeburten und dem Umgang mit Zytostatika erkennen lassen (Selevan et al. 1985, Stucker et al. 1990, Valanis et al. 1999, Jung et al. 2001). Auch über einen Zusammenhang zwischen Zyklusstörungen und dem Umgang mit Zytostatika wird berichtet (Shortridge et al. 1995). Dies bedeutet, dass auch eine Gefährdung des Embryos während der Schwangerschaft von exponierten Frauen nicht ausgeschlossen ist.

### 1.2.3 Mutagenität

Bereits 1970 wurde über eine mögliche Gesundheitsgefährdung beim Umgang mit Zytostatika berichtet (Yaffe 1970). Diese wurde in der Folge mit Hilfe der Monitoring-Methoden

- biologisches Beanspruchungsmonitoring
- biologisches Belastungsmonitoring und
- Umgebungsmonitoring

analysiert. So wurde beispielsweise 1979 im Urin von Krankenschwestern, die Zytostatika-Lösungen zubereiteten, eine mutagene Wirkung nachgewiesen (Falck et al. 1979). Dies gab den Anstoß für weitere Studien und Entwicklungen bezüglich des Gesundheitsschutzes von Personen, die regelmäßig geringen Mengen an Zytostatika ausgesetzt sind.

## 1.3 Überprüfung der Belastungen von Beschäftigten durch Monitoring

### 1.3.1 Biologisches Beanspruchungsmonitoring

Mit Hilfe eines biologischen Beanspruchungsmonitorings lassen sich gentoxische Schäden (Mutationen), die durch Aufnahme mutagener Substanzen entstehen, nachweisen. Dazu werden folgende Testsysteme eingesetzt:

- Ames Test
- Bestimmung der Schwesterchromatidaustausch-Häufigkeit
- Bestimmung der Mikrokernrate

Allerdings sind diese Methoden auch unter gut kontrollierten Bedingungen nicht für eine Routinekontrolle geeignet, da sie nur den Expositionszustand am untersuchten Tag widerspiegeln. Zudem sind diese Methoden sehr unspezifisch, weil der Einfluss von Störfaktoren (z.B. Rauchen, Ernährung und/oder Arzneimittel) nicht genau bekannt ist und kein direkter Nachweis einer Substanz erfolgt. Außerdem ist keine

eindeutige Aussage zum Ort der Aufnahme einer Substanz möglich. Verschiedene Studien haben anhand dieser Methoden versucht, eine Inkorporation von Zytostatika nachzuweisen (DeMeo et al. 1995, Poyen et al. 1988, Goloni-Bertollo et al. 1992, Roth et al. 1994, Hessel et al. 2001, Pilger et al. 2000, Sorsa & Anderson 1996). Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch widersprüchlich.

### 1.3.2 Biologisches Belastungsmonitoring

Mit der Einführung sensitiver und spezieller Messtechniken wurde es möglich, Zytostatika oder deren Metabolite aus Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Die Aufnahme von ein oder zwei Substanzen wird oft als Indikator für eine Exposition gegenüber mehreren Zytostatika gesehen. Aber auch diese Untersuchungen spiegeln nur die innere Belastung zum Zeitpunkt der Untersuchung wider und geben keine Hinweise auf den Ort der Aufnahme (Sessink et al. 1994a, Ensslin et al. 1994a, Ensslin et al. 1997, Sessink et al. 1992b, Sessink et al. 1997, Pethran 1999). Einige dieser Studien zeigten, dass es trotz Einhaltung und Verwendung der vorgeschriebenen Schutz- und Sicherheitsmaßnahmen bei Mitarbeiter(innen) in Zytostatika-Abteilungen und auch bei Personen, die keinen offensichtlichen Kontakt mit Zytostatika hatten, zu einer Aufnahme der Substanzen gekommen war.

### 1.3.3 Umgebungsmonitoring

Die Kontamination einer Fläche oder der Raumluft durch ein Zytostatikum lässt sich durch ein Umgebungsmonitoring nachweisen. Mit der Wischprobenmethode kann in einem Umgebungsmonitoring z.B. in Apotheken und auf Stationen die Kontaminationssituation genau betrachtet werden. Durch die Kenntnis von kontaminierten Flächen lassen sich Kontaminationsquellen aufdecken und Verschleppungspfade beschreiben. So kann die Frage geklärt werden, an welchen Arbeitsschritten es zu einer Aufnahme von Zytostatika kommen kann. Dadurch kann unter Umständen eine weitere Exposition verhindert werden.

# 2. Ziel der vorliegenden Arbeit

Zytostatika können durch Kontakt und anschließende Aufnahme (z.B. über Haut, Lunge etc.) gentoxisch bzw. zytotoxisch wirken. Daher sollten in dieser Arbeit in einem Umgebungsmonitoring Kontaminationen mit Zytostatika durch Wischproben identifiziert werden. Für solche Untersuchungen eignen sich vor allem Zytostatika, die häufig in Apotheken und auf Stationen eingesetzt werden. Eine Umfrage in den teilnehmenden Apotheken ergab die in Tabelle 1 dargestellten Verbrauchszahlen:

**Tabelle 1:** *Durchschnittliche Verbrauchsmengen und Anzahl Zubereitungen einiger Zytostatika in den teilnehmenden Apotheken*

| | Verbrauchsmengen (g/Jahr) | | | Anzahl Zubereitungen (pro Jahr) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Zytostatika** | **Min** | **Median** | **Max** | **Min** | **Median** | **Max** |
| Cyclophosphamid | 90 | 787 | 3.200 | 22 | 776 | 2.800 |
| Ifosfamid | 0 | 633 | 5.132 | 0 | 234 | 1.799 |
| **5-Fluorouracil** | **100** | **3.115** | **10.500** | **41** | **1.577** | **6.800** |
| Cisplatin | 2 | 36 | 112 | 23 | 568 | 2.867 |
| Carboplatin | 6 | 129 | 520 | 9 | 285 | 1.516 |

In dieser Arbeit wurde das mengenmäßig am häufigsten eingesetzte Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU, Abbildung 5) bestimmt. Es ist zu vermuten, dass 5-FU als „Richtsubstanz“ anzusehen ist und Kontaminationen mit dieser Substanz fast immer auch auf eine Kontamination mit anderen Zytostatika schließen lassen.

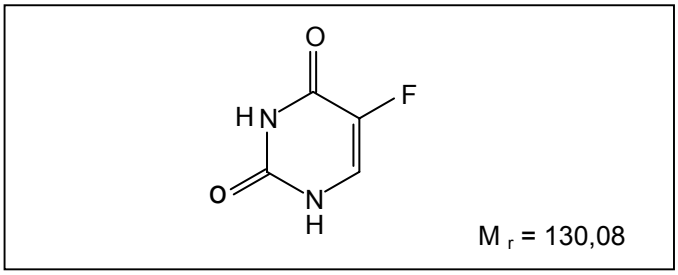


**Abbildung 5:** *Chemische Struktur von 5-Fluorouracil*

In der Literatur sind Methoden zur Bestimmung von 5-FU aus Wischproben mittels „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) beschrieben worden. Bei diesen Messungen wurden allerdings nur Nachweisgrenzen von 600 ng pro Probe erreicht (Connor et al. 1999, Sessink et al. 1992b).

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ein sensitiveres und einfach zu handhabendes Wischprobenverfahren für das Zytostatikum 5-FU zu entwickeln und in der Praxis anzuwenden. Diese Ergebnisse werden im Teil A dieser Arbeit dargestellt und diskutiert.

Im Teil B sollte außerdem eine Methode entwickelt werden, mit der die innere Belastung von Beschäftigten aufgezeigt werden kann. Hierdurch kann nach einer Exposition gegenüber 5-FU eine mögliche Inkorporation der Substanz nachgewiesen werden. Die Einhaltung und Effektivität der Schutz- und Sicherheitssysteme im Arbeitsalltag kann dadurch zusätzlich beurteilt werden. Dazu sollte $\alpha$-Fluoro-$\beta$-alanin (FBAL, Abbildung 6), der Hauptmetabolit des 5-FU, im Urin mit Hilfe der GC/MS nachgewiesen werden.

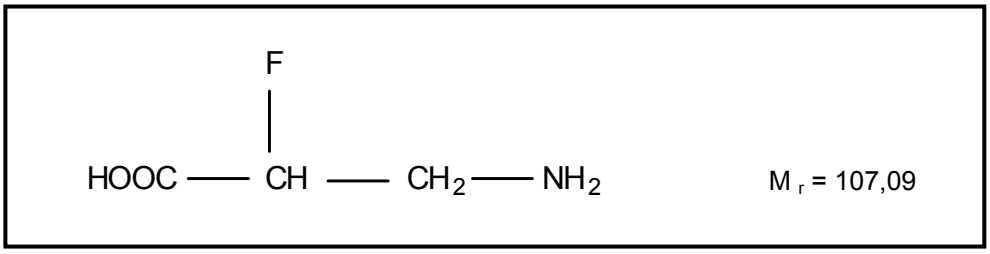


**Abbildung 6:** *Chemische Struktur von $\alpha$-Fluoro-$\beta$-alanin*

# Teil A-Umgebungsmonitoring

## A.3. Methode

### A.3.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Gaschromatographie (GC) ist eine Trennungsmethode, mit der sowohl qualitative als auch quantitative Analysen durchgeführt werden können (Abbildung 7). Die Probe wird hierbei verdampft und auf die Trennsäule gebracht. Dort findet eine Adsorption der gasförmigen Substanz auf der Oberfläche von festen Sorbentien (stationäre Phase) statt. Die mobile Phase bildet ein Trägergas. Die adsorbierte Substanz kann z.B. durch Temperaturerhöhung desorbiert werden.

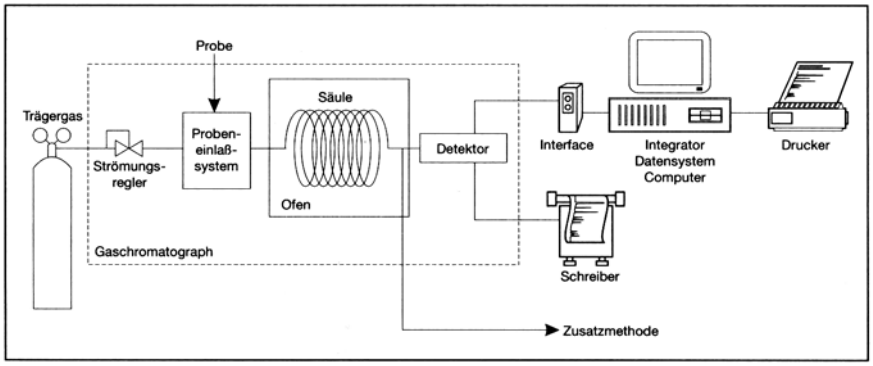


**Abbildung 7:** *Hauptbestandteile eines gaschromatographischen Systems*

Nach der gaschromatographischen Trennung erfolgt die Detektion mit einem Massenspektrometer (MS). Dabei werden die Moleküle, die aus der Trennsäule austreten, im MS in Ionen überführt. Diese sind meist unstabil und zerfallen in Fragmente, die anschließend in einem elektrostatischen Feld (Quadrupol) nach ihrer Masse getrennt und in ein messbares Signal überführt werden.

Das Ergebnis einer solchen Analyse wird im Gaschromatogramm in Form eines „Peaks“ registriert. Das Integral der Peakfläche entspricht der eingesetzten Substanzmenge.

Die GC/MS Technik wird im Bereich der Ultraspurenanalytik eingesetzt. Mit modernen Quadrupolmassenspektrometern können heute Konzentrationen von etwa 1 Femtogramm ($10^{-15}$ g) nachgewiesen werden (Oehme 1996).

## A.3.2 Probenaufbereitung von 5-FU Wischproben

Für den Nachweis von 5-FU aus Wischproben sollte eine praxisnahe Methode erarbeitet werden. Dazu wurde folgendes Probenaufbereitungsschema erstellt (Abbildung 8):

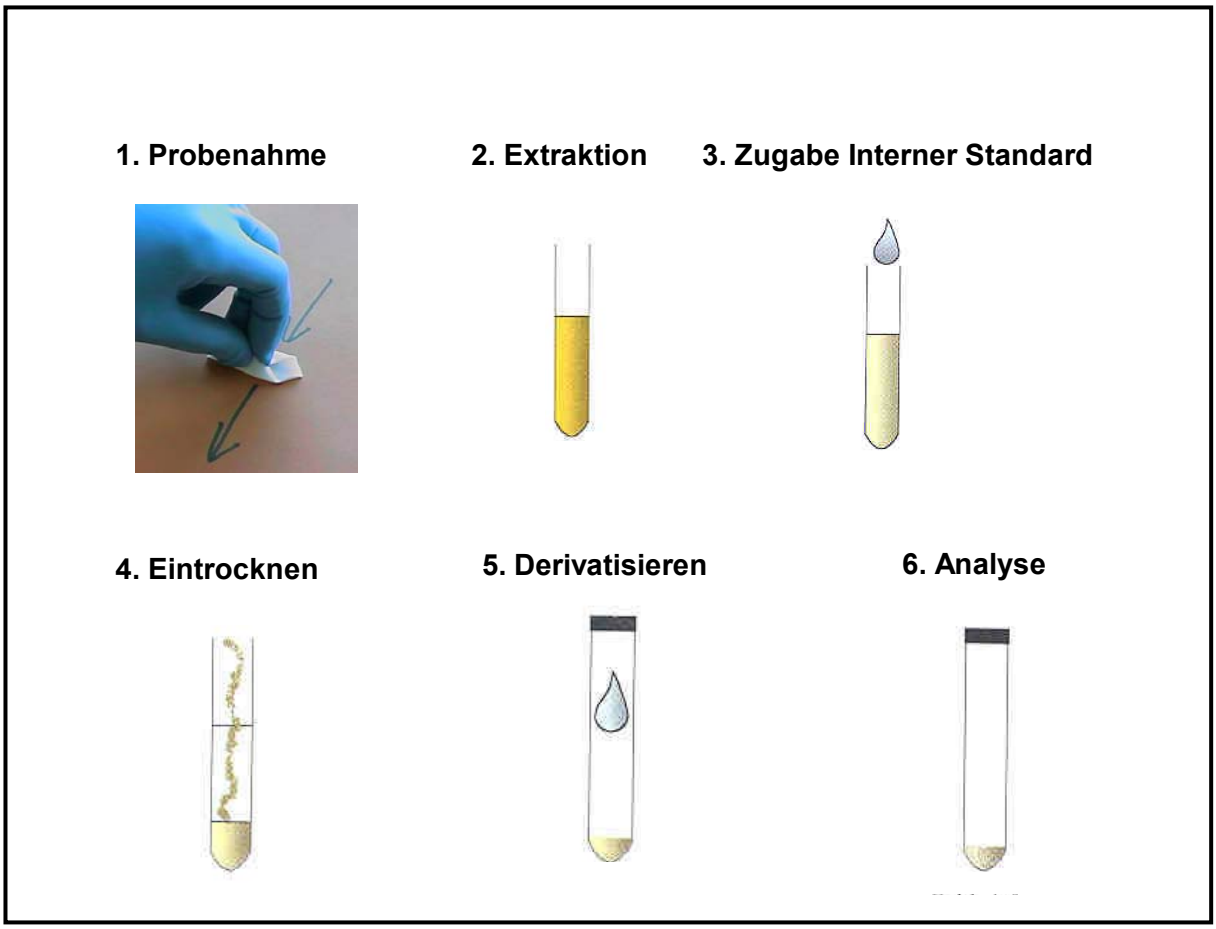


**Abbildung 8:** *Schema der Probenaufbereitung*

### A.3.2.1 Probenahme

#### A.3.2.1.1 Lösungsmittel

Bei der Probenahme soll 5-FU möglichst quantitativ während des Wischens mit dem Lösungsmittel aufgenommen werden und außerdem in dem Lösungsmittel über mehrere Tage stabil sein. Dazu wurden verschiedene Lösungsmittel auf ihre Eignung für das Verfahren getestet.

5-FU ist wenig löslich in Wasser (12,2 mg/ml), schwer löslich in Ethanol (5,5 mg/ml), Methanol (9,37 mg/ml), Isopropanol (2,15 mg/ml) und praktisch unlöslich in

Chloroform bzw. Ether (Europäisches Arzneibuch 1997, Hagers Handbuch 1995, Römpp 1995).

Das Löslichkeitsverhalten von 5-FU wurde in Aceton, Acetonitril, Butanol, Cyclohexan, Ethanol, Ethylacetat, Hexan, Isopropanol, Methanol, NaOH [pH 12,1], Natriumacetatpuffer [pH 4,5] und Toluol getestet. 5-FU ist in Aceton, Methanol und NaOH [pH 12,1] löslich. In Acetonitril löst es sich erst nach Ultraschallbehandlung. Als Lösungsmittel für die Probenahme von 5-FU kommen demnach nur NaOH, Aceton und Methanol in Frage.

Generell sind die organischen den wässrigen Lösungsmitteln vorzuziehen, denn die für die GC/MS geeigneten Lösungsmittel sollten leicht flüchtig sein und auch bei hohen Temperaturen keine chemische Reaktion mit der zu analysierenden Substanz eingehen. Wässrige Lösungsmittel stören die Derivatisierung, weil die zu untersuchenden Substanzen hydrolysiert werden können und deshalb evtl. nicht mehr nachweisbar sind. Daher muss die Substanz vor der Analyse immer von einem wässrigen in ein organisches Lösungsmittel überführt werden. Um eine möglichst einfache Probenaufarbeitung zu entwickeln, sollte die Probenahme direkt mit einem organischen Lösungsmittel erfolgen.

Bei der Verwendung von Aceton zeigen die Proben eine Wiederfindungen von 40 %. Bei einer Probenahme mit Methanol als Lösungsmittel ergeben sich, je nach Probenaufarbeitung, Wiederfindungen von 60-80 %. Daher wurde Methanol als Lösungsmittel für die Wischprobennahme verwendet.

#### A.3.2.1.2 Wischtechnik und Wischmaterial

Um eine akzeptable Wiederfindung der Substanz aus den Wischproben zu erhalten, wurden verschiedene Wischmaterialien und –schemata getestet. Dazu wurden jeweils 30 ng 5-FU auf Glasplatten der Größe 20 x 20 cm pipettiert. Als Wischmaterialien wurden Papiertücher (Fa. Kimberley-Clark®), Blaubandfilter (Fa. Schleicher & Schuell) oder soxhletierte Blaubandfilter getestet. Durch das Soxhletieren der Filter (20 h mit Ethylacetat) sollten evtl. enthaltene Verunreinigungen, die im Chromatogramm störende Signale liefern könnten, entfernt werden. Diese Materialien wurden mit Methanol benetzt und für die Probenahme verwendet.

Bei der Verwendung von Papiertüchern ergaben sich Wiederfindungen von nur 18 - 26 %, weshalb diese für Wischproben ungeeignet sind.
Die Wiederfindungen bei einer Probenahme mit soxhletierten Filtern liegen zwischen 60 und 80 %. Der Vergleich der Chromatogramme von Proben, die mit soxhletierten oder nicht–soxhletierten Blaubandfiltern genommen wurden, zeigten keinen Unterschied. Demnach ist davon auszugehen, dass aus dem Filtermaterial keine störenden Substanzen extrahiert werden. Das Soxhletieren war somit nicht nötig und die Probenahme erfolgte mit Blaubandfiltern.
Die höchste Wiederfindung ergibt sich bei folgendem Wischschema (Abbildung 9):

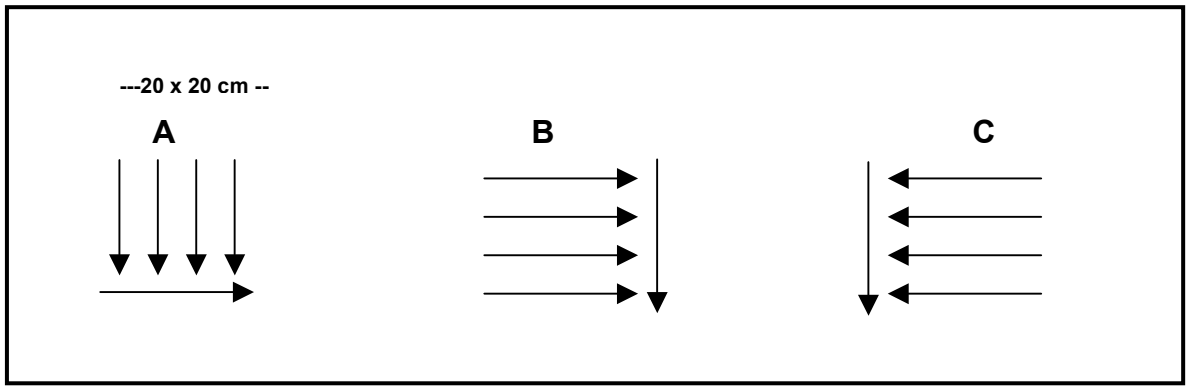


**Abbildung 9:** *Schema der Probenahme. Die Pfeile deuten in die jeweilige Wischrichtung, je ein Filter für A, B, C.*

Die gesamte Fläche wurde mit drei Filtern gewischt und die Filter anschließend in einem Glasgefäß gesammelt.

### A.3.2.1.3 Wischprobennahme

Die Wischproben wurden in der Regel auf einer Fläche von 20 x 20 cm genommen. Diese Flächen wurden nach einem festgelegten Schema (siehe 3.2.1.2) mit drei Blaubandfiltern, die mit Methanol benetzt waren, gewischt. Infusionsständer und Infusomaten wurden ebenfalls mit drei benetzten Filtern abgewischt. Die drei Filter einer Probe wurden in einem Glasgefäß gesammelt. Die untersuchten Flächen betrugen bei den Infusionsständern 800-1.000 $cm^2$. Durch die genaue Maßangabe der Flächen können diese Ergebnisse sowohl absolut (ng/Wischprobe) als auch relativ (pg/$cm^2$) angegeben werden (siehe A.4.3.2).

#### A.3.2.1.4 Probenahme an Zytostatika-Vorratsgefäßen

Die Zytostatika-Vorratsgefäße (siehe A.4.3.4) wurden vollständig mit 30 ml Methanol abgespült und das Methanol über einen Trichter in einem Glasgefäß gesammelt. Bei der Charge H sind die Vorratsgefäße mit einem Kunststoffbehälter umhüllt. Für die Untersuchung wurden die Kunststoffbehälter des jeweiligen Vorratsgefäßes vollständig mit 30 ml Methanol abgespült.

#### A.3.2.1.5 Probenahme an Handschuhen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Handschuhe von Personen, die mit der Zytostatika Zubreitung beschäftigt waren, nach einer Arbeitsperiode von 30 min untersucht. Dazu wurden die Innenflächen beider Handschuhe mit insgesamt drei mit Methanol benetzten Filtern abgewischt.

### A.3.2.2 Extraktion

Nach Zugabe von 30 ml Methanol wird das Zytostatikum durch Schütteln aus den Filtern extrahiert. Zur Optimierung der Extraktion wurden Extraktionszeiten von 20 bzw. 30 min verglichen. Es zeigte sich, dass die längere Extraktionszeit von 30 min für die Wiederfindung keinen Vorteil brachte, weshalb 20 min gewählt wurden. Nach der Extraktion wurden 10 ml der Probe abgenommen und weiterverarbeitet.

### A.3.2.3 Interner Standard

In der Gaschromatographie ist es von Vorteil, zur Probe vor der Analysenaufarbeitung einen Internen Standard (IS) zuzusetzen. Der IS sollte der zu untersuchenden Substanz chemisch ähnlich sein und wird allen Probenlösungen in gleicher Konzentration zugegeben. Somit können die bei der Aufarbeitung entstehenden Messfehler korrigiert werden. Bei der Auswertung wird die Peakfläche der zu bestimmenden Substanz auf die Peakfläche des IS bezogen (Rücker 1992).

In der Literatur findet vielfach 5-Chloruracil (5-ClU) als Interner Standard bei der Bestimmung von 5-FU Anwendung und wurde daher auch hier verwendet (Thiberville et al. 1994, Anderson et al. 1997).

### A.3.2.4 Eintrocknung

Da die Analyse in einem möglichst kleinen Volumen stattfinden soll, müssen die Proben eingetrocknet werden. Es wurde das Eintrocknen unter einem Stickstoffstrom (20 °C) mit einem erwärmten Stickstoffstrom (50 °C) verglichen. Die Wiederfindung beträgt bei 20 °C 67 % und bei 50 °C 61%. Da das Eintrocknen unter Stickstoff (50 °C) wesentlich weniger Zeit beansprucht und die Wiederfindungen vergleichbar sind, wurden die Proben im Folgenden unter erwärmtem Stickstoff (50 °C) eingetrocknet.

### A.3.2.5 Derivatisierung

Für eine gaschromatographische Trennung ist 5-FU zu polar und besitzt keine hohe Flüchtigkeit. Daher muss die Substanz in ein geeignetes Derivat überführt werden. Trimethylsilylether beispielsweise haben eine hohe Flüchtigkeit und sind weniger polar als die Ausgangsverbindungen, weshalb N-tert.-Butyl-dimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid (TBDMS) als Derivatisierungsmittel getestet wurde (Kubo et al. 1991, Thiberville et al. 1994). Dazu wurden 100 µl einer 5-FU-Lösung (1 µg/ml) mit 200 µl Derivatisierungsreagenz versetzt und 30 min bei 20 °C bzw. 70 °C derivatisiert. Anschließend wurde die Lösung gaschromatographisch getrennt und das 5-FU Derivat massenspektrometrisch detektiert. Der „Molekülpeak“ besitzt ein Masse zu Ladungsverhältnis (*m/z*) von 358,0. Theoretisch mögliche Fragmente ergeben sich bei *m/z* 244,0 oder 301,0 (Abbildung 10).

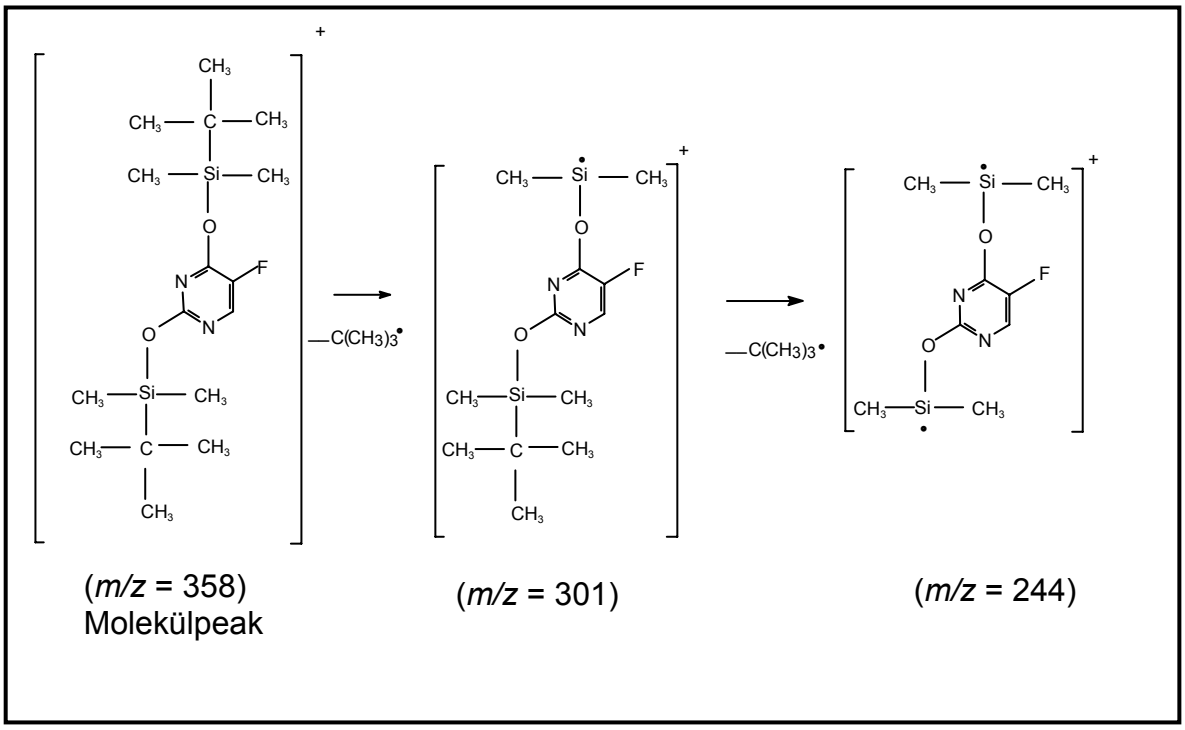


**Abbildung 10:** *Fragmentierungsschema des 5-FU Derivats*

Im Chromatogramm zeigte sich nach 8,1 min ein deutliches Signal. Das zugehörige Massenspektrum zeigte Peaks bei *m/z* 301,0 und 244,0 (Abbildung 11, 12).

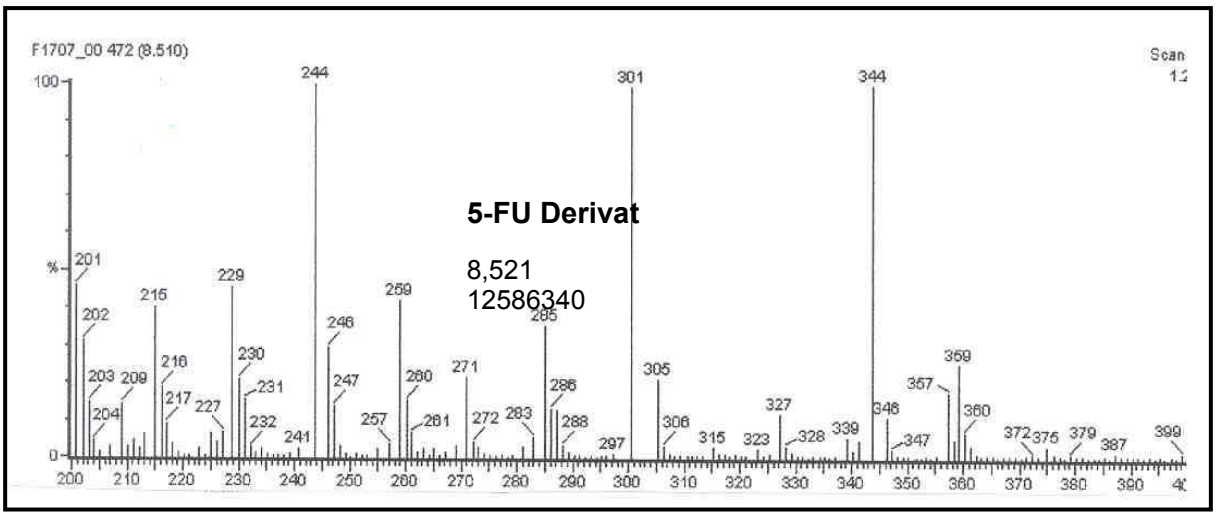


**Abbildung 11:** *Massenspektrum des 5-FU Derivats*

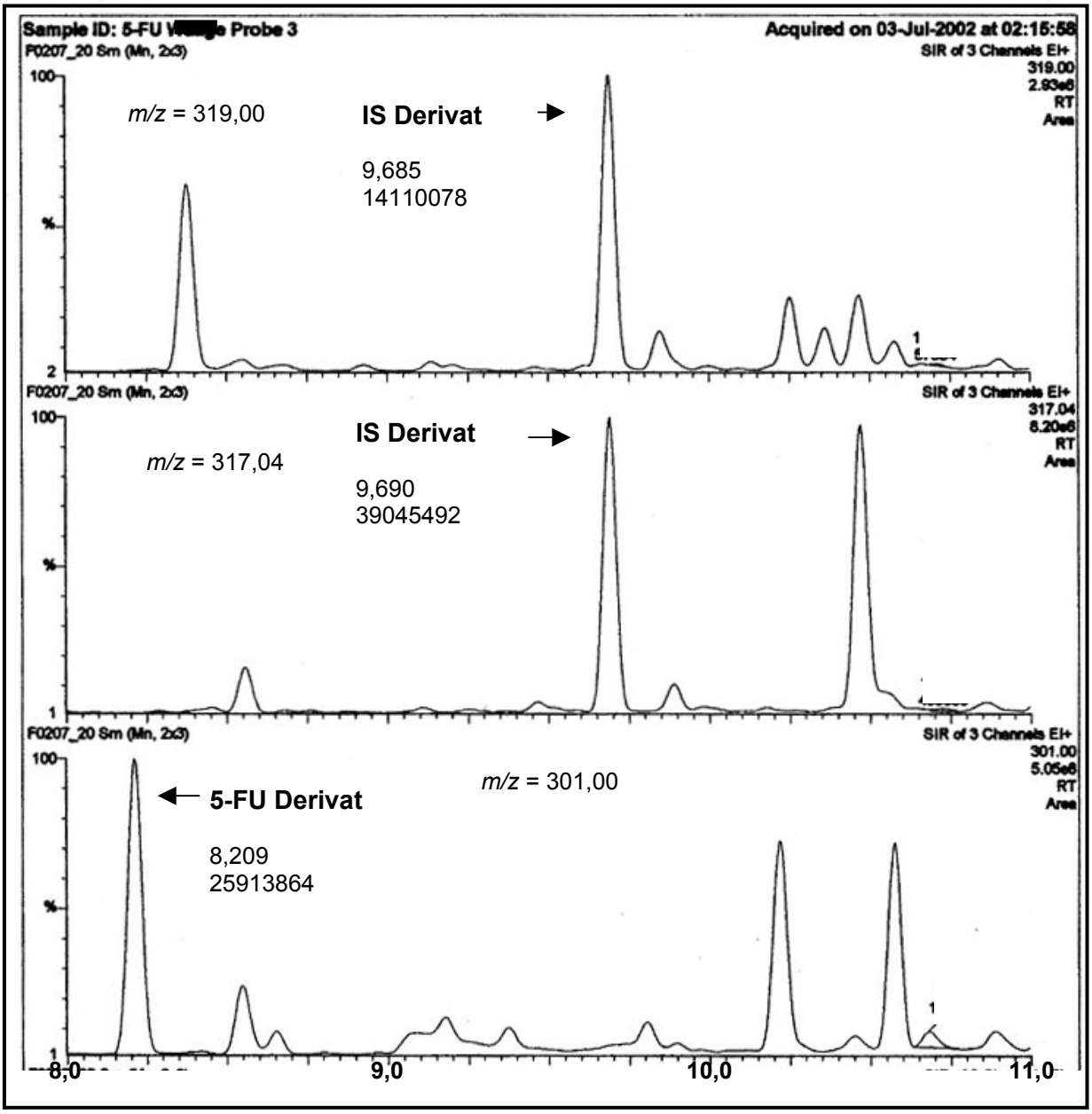


**Abbildung 12:** *Gaschromatogramm einer Probe mit 64 ng 5-FU pro Probe*

Um die Derivatisierungsbedingungen zu optimieren, wurden Temperaturen von 70, 80 bzw. 100 °C (15 bzw. 30 min) gewählt. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung mit Hilfe des „Selected-Ion-Monitoring" (SIM) auf den Massen *m/z* 358,0; 301,0 und 244,0. Bei *m/z* 301,0 wurde nach 8,5 min ein Peak gemessen. Dieser wies im Vergleich zu den „Peaks“ auf *m/z* 244,0 die größere Peakfläche auf. Tabelle 2 stellt die erhaltenen Peakflächen nach den unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen dar.

**Tabelle 2:** *Peakfläche (relative Einheiten) m/z 301,0 bei unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen*

| | **70 °C** | **80 °C** | **100 °C** |
|---|---|---|---|
| **15 min** | 543,3 | - | 536,8 |
| **30 min** | 541,7 | 556,7 | 536,7 |

Da sich die absoluten Werte der Signalflächen bei den unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen nicht deutlich unterscheiden, ist es ausreichend, die Derivatisierung 15 min bei 70 °C durchzuführen.
Der Interne Standard 5-Chloruracil wurde auf der Masse *m/z* 317,04 als „Quantifier“ und *m/z* 319,00 als „Qualifier“ vermessen.

### A.3.2.6 Analyse

Die Proben wurden vor der Messung zentrifugiert (10 min, 3000 Upm). Hierbei wurden grobe Verunreinigungen, wie beispielsweise Staub von der Probenahme, pelletiert und gelangten somit nicht in die Säule bzw. auf die Ionenquelle. Die Proben wurden unter den nachfolgenden Bedingungen vermessen.

#### A.3.2.6.1 Gaschromatographie

| | | |
|---|---|---|
| Kapillarsäule | Material: | Fused silica Kapillarsäule |
| | Stationäre Phase: | DB-5MS |
| | Länge: | 15 m |
| | Innerer Durchmesser: | 0,25 mm |
| | Filmdicke: | 0,25 µm |
| Vorsäule | Material: | Basisch deaktivierte Guard Column<br>ID 0,32 mm, Länge 5 m |
| Temperaturen | Säule: | Stand by 1 min<br>1 min bei 100 °C, dann Anstieg mit 10 °C/min bis 200 °C, anschließend mit 50 °C/min bis 280 °C, 2 min bei 280 °C |
| | Injektor: | 250 °C |
| | Interface: | 300 °C |
| Trägergas | Helium, Fluß 0,8 ml/min | |

| | |
|---|---|
| Splitless-Zeit | 1 min |
| Probenmenge | 2 µl |

### A.3.2.6.2 Massenspektrometrie

| | |
|---|---|
| Ionisationsart: | Elektronenionisation (EI) |
| Ionisatiosenergie: | 70 eV |
| Masseneinstellung: | 5-FU: 301,00; 5-ClU: 317,04; 319,0 |
| Dwell Time: | 0,08 sec |
| Multiplier: | 300 |

Übrige Parameter wurden nach Herstellerangaben optimiert.

# A.4. Ergebnisse

In der Literatur sind einige Methoden beschrieben worden, mit denen 5-FU aus Wischproben durch HPLC nachgewiesen wurde (Connor et al. 1999, Sessink et al. 1992b). In dieser Arbeit sollte ein Wischprobenverfahren und eine Probenaufbereitung entwickelt werden, die es ermöglicht, 5-FU auch noch in geringen Mengen mittels GC/MS nachzuweisen. Hierzu wurde zunächst ein geeignetes Wischprobenverfahren etabliert.

## A.4.1 Methode

### A.4.1.1 Wischtests mit verschiedener Anzahl Filter

Obwohl nach dem Wischen mit drei Filtern bereits gute Ergebnisse erzielt wurden, wurde überprüft, ob das Wischen mit vier Filtern einen Vorteil im Hinblick auf den quantitativen Nachweis von 5-FU bringt. Dazu wurden Glasplatten (20 x 20cm) nach Auftragen von 30 ng 5-FU gewischt.

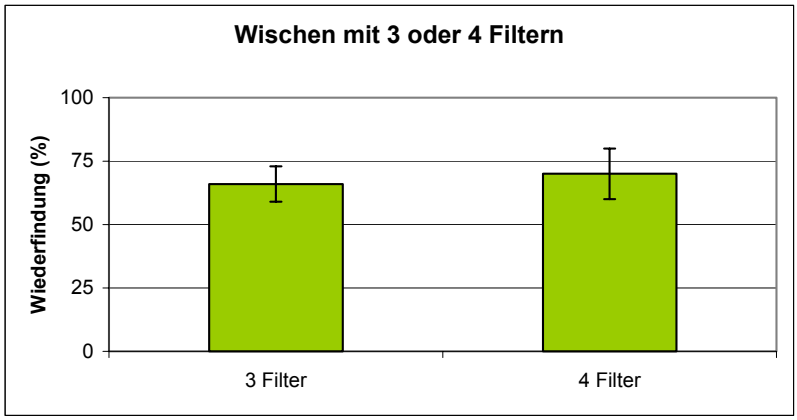


**Abbildung 13***: Wiederfindungen (%) nach Wischen mit 3 Filtern (n = 15) oder 4 Filtern (n = 12)*

Wie Abbildung 13 zeigt, werden mit drei und vier Filtern ungefähr gleiche Mengen 5-FU von der Glasplatte aufgenommen. Nach dem Wischen mit drei Filtern wird eine Wiederfindung von 66 % erreicht bzw. 70 % mit vier Filtern. Da die Methode effektiv und praktikabel sein sollte, wurde die Probenahme mit drei Filtern durchgeführt.

### A.4.1.2 Abdampfen des Derivatisierungsmittels

Da das Derivatisierungsmittel nach Möglichkeit nicht auf die Säule bzw. Ionenquelle gelangen soll, wurde die Probe nach der Derivatisierung erneut unter Stickstoff (20 °C) bzw. Stickstoff (50 °C) eingetrocknet. In beiden Fällen ließ sich das Derivatisierungsreagenz nach 10-15 min abdampfen. Es konnte jedoch weder 5-FU noch der Interne Standard im Chromatogramm nachgewiesen werden.
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das überschüssige Derivatisierungsmittel nicht mehr verdampft. Dies ist zwar nachteilig für das GC/MS-System, aber für eine empfindliche Analytik unerlässlich.

### A.4.1.3 Stabilität von 5-FU bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Aufgrund der hohen Anzahl Proben, die zwischenzeitlich analysiert werden sollten, war es nicht immer möglich, die Wischproben am Tag der Probenahme auch zu verarbeiten. Bei einer Probenahme durch Personal der Apotheke oder Station wurden die Proben an unser Labor gesendet, wodurch sich eine Verzögerung bei der Probenaufbereitung ergeben konnte. Deshalb wurde die Stabilität von 5-FU in der Probe bei verschiedenen Temperaturen getestet. Dazu wurden Proben der Konzentration 10 ng/Probe durch Wischen auf Glasplatten genommen. Ein Teil der Proben wurde noch am selben Tag verarbeitet. Der andere Teil wurde bei Raumtemperatur bzw. bei 2 – 8 °C gelagert und nach 1, 2 bzw. 7 Tagen verarbeitet.

**Tabelle 3:** *Wiederfindung von 5-FU aus Wischproben nach unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (n = 6)*

| Lagerung | Tag 1 | Tag 2 | Tag 7 |
|---|---|---|---|
| | Wiederfindung (%), (s %) | | |
| 22 °C | 81 (5) | 95 (5) | 117 (9) |
| 4 °C | 82 (7) | 92 (5) | 111 (7) |

Wie Tabelle 3 zeigt, ergeben sich Wiederfindungen von mindestens 81 %. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Analysetagen sind vermutlich methodisch bedingt. Die Lagerungstemperatur und -zeit haben offensichtlich keinen Einfluss auf

die Stabilität von 5-FU in Wischproben. Daher kann auch noch eine Woche nach Probenahme eine Verarbeitung erfolgen. Aufgrund dieser Ergebnisse war es möglich, auch in Apotheken und auf Stationen in entfernteren Städten Wischproben durchzuführen.

### A.4.1.4 Stabilität von 5-FU in der extrahierten Probe

Von der mit 30 ml Methanol ausgeschüttelten Probe wurden jeweils 10 ml abgenommen und analysiert. Die restliche Probe wurde bei –20 °C gelagert. Nach einer Woche wurden erneut 10 ml der Probe abgenommen und vermessen, um die Reproduzierbarkeit der Analyse auch noch nach einer Woche zu ermitteln. Es konnten sehr gute Wiederfindungsraten von ca. 100 % gemessen werden. Das bedeutet, dass 5-FU mindestens 1 Woche im gewählten Lösungsmittel quantitativ nachweisbar ist (Abbildung 14).

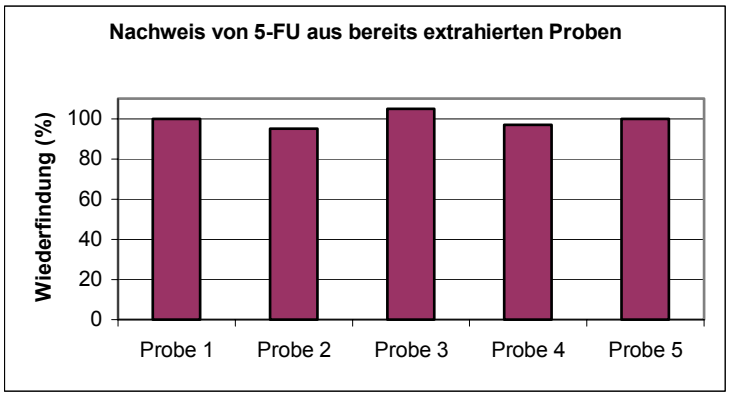


**Abbildung 14**: *Wiederfindung von 5-FU aus extrahierten Wischproben nach siebentägiger Lagerung bei –20 °C*

### A.4.1.5 Stabilität der 5-FU Stammlösung

Für die Quantifizierung der Peaks wurde täglich eine Eichreihe aus einer Stammlösung der Konzentration 0,1 ng 5-FU/µl hergestellt und mitvermessen. Um möglichst lange auf diese Stammlösung zurückgreifen zu können, ist es wichtig, die Stabilität dieser Stammlösung zu kennen. 5-FU war aus diesen Lösungen auch nach zehn Wochen noch quantitativ nachweisbar (Wiederfindungen von 99 $\pm$ 3 %).

## A.4.2 Validierung der Probenaufbereitung von 5-FU Wischproben

Die Qualität der hier entwickelten Methode wird durch die Validierung beurteilt. Dazu sind die einzelnen Validierungsparameter zu bestimmen und ihre Werte für die Beurteilung des Analyseverfahrens heranzuziehen.

### A.4.2.1 Wiederfindung

Die Wiederfindung beschreibt die in der Analyse nachgewiesene Menge einer Substanz und ist ein Maß für die Richtigkeit. Um die Wiederfindung der Methode bestimmen zu können, wurden Glasplatten der Größe 20 x 20 cm mit 1,5; 3,0; 15,0 und 150,0 ng 5-FU versetzt, gewischt und die Proben analysiert.

**Tabelle 4:** *Wiederfindungen von 5-FU aus Wischproben bei verschiedenen Konzentrationen (n = 8)*

| **Soll (ng/Probe)** | **1,5** | **3,0** | **15,0** | **150,0** |
|---|---|---|---|---|
| **Wiederfindung (%)** | 81 | 78 | 64 | 60 |
| **Standardabweichung (%)** | 6 | 3 | 6 | 6 |

Es ergaben sich Wiederfindungsraten von 60 – 80 % (Tabelle 4). Dieses Ergebnis ist in Anbetracht der Schwierigkeit des gesamten Analyseverfahrens akzeptabel.

### A.4.2.2 Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit eines Analyseergebnisses. Sie wird bestimmt, indem dieselbe Probe unter genau den gleichen Bedingungen am selben Tag mehrere Male aufgearbeitet und entweder

- direkt analysiert (Präzision in der Serie) oder
- an verschiedenen Tagen analysiert wird (Präzision von Tag zu Tag)

Die statistische Abweichung wird auch als zufälliger Fehler bezeichnet.

#### A.4.2.2.1 Präzision in der Serie

Die Präzision wird als Standardabweichung [s] ausgedrückt. Für die Bestimmung der Präzision in der Serie wurde eine Probe achtmal hintereinander analysiert. Die sich daraus ergebende relative Standardabweichung liegt mit 0,42 % in einem akzeptablen Bereich.

#### A.4.2.2.2 Präzision von Tag zu Tag

Um die Präzision von Tag zu Tag zu bestimmen, wurden aus zwei Kontrollproben verschiedener Konzentration innerhalb eines Jahres 14 Proben vermessen. Der Mittelwert der einen Proben betrug 0,27 ng 5-FU/ml. Die Streuung betrug 13,6 % (Variationskoeffizient). Die anderen Proben enthielten im Mittelwert 4,5 ng 5-FU/ml und wiesen einen Variationskoeffizienten von 8,4 % auf. Auch diese Werte liegen in einem für diese Analytik akzeptablen Bereich.

### A.4.2.3 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist die niedrigste Menge, die in der qualitativen Analytik mit einer Methode noch zuverlässig vom „Grundrauschen“ unterschieden werden kann. Die Nachweisgrenze wurde aus dem 3-fachen Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt. Unter den angegebenen Bedingungen der Probenaufbereitung und der gaschromatographisch-massenspektroskopischen Bestimmung liegt die Nachweis-grenze für 5-Fluorouracil bei 0,1 ng pro Wischprobe. Zusätzlich wurde die Nachweisgrenze aus einer typischen Kalibriergeraden nach DIN 32 645 berechnet. Danach liegt der Wert für die Nachweisgrenze bei 1 ng 5-FU pro Probe.

### A.4.2.4 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze gibt die geringste Konzentration an, die mit Hilfe einer Methode noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann.

Die Bestimmungsgrenze war ein sehr wichtiges Kriterium bei der Etablierung des Analyseverfahrens, da die zu erwartenden Konzentrationen der Proben im µg- bzw.

ng-Bereich liegen und, soweit möglich, alle Kontaminationen erfasst werden sollten. Die Bestimmungsgrenze wurde aus dem 10-fachen Signal-Rauschverhältnis abgeschätzt. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode liegt bei 1 ng pro Wischprobe. Nach einer Berechnung der Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 liegt sie bei 3 ng/Probe. Da die Peaks einer Probe mit 1 ng 5-FU deutlich vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden waren (Abbildung 15), wurden alle Proben ab 1,5 ng 5-FU ausgewertet. Mit diesem Analyseverfahren kann somit ein verlässliches Umgebungsmonitoring durchgeführt werden.

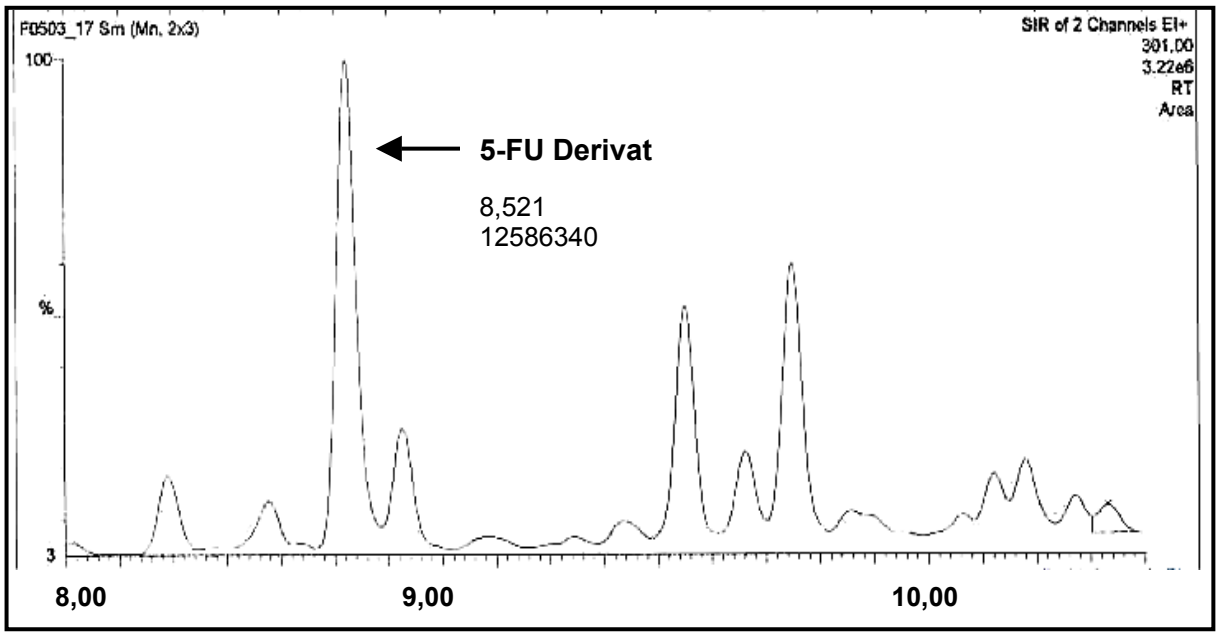


**Abbildung 15:** *Gaschromatogramm einer Probe mit 1,8 ng 5-FU pro Probe*

Die Linearität, Empfindlichkeit und der Bestimmungsbereich können in demselben Versuch ermittelt werden. Dazu wurde aus acht Messwerten eine Kalibriergerade aufgestellt.

### A.4.2.5 Linearität

Die Linearität beschreibt die Proportionalität zwischen den Messergebnissen und der Konzentration (Rücker 1992). In der gemessenen Kalibriergeraden wird sie durch den Korrelationskoeffizienten angegeben. Die Korrelationskoeffizienten von 41 verschiedenen Eichreihen ergaben einen Mittelwert von 0,997 ± 0,005. Die Linearität ist damit akzeptabel.

### A.4.2.6 Bestimmungsbereich

Die Linearität gilt nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich, den Bestimmungsbereich. Bei dieser Methode liegt der Bestimmungsbereich zwischen 1 und 50 ng pro Probe. Proben, die höhere Konzentrationen 5-FU aufweisen, müssen für die Quantifizierung in diesen Bereich verdünnt werden.

### A.4.2.7 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit eines Analyseverfahrens gibt die Änderungen eines Messergebnisses in Abhängigkeit von Konzentrationsänderungen an. Je größer die Änderung der Messwerte ist, desto empfindlicher ist die Methode. Im Diagramm ist die Steigung der erhaltenen Geraden ein Maß für die Empfindlichkeit.
Der hier erhaltene Mittelwert der Steigung von 41 verschiedenen Eichreihen betrug 0,8290 ± 0,2893. Weil diese Werte sehr stark schwanken, wurde zu jeder Messung am gleichen Tag eine zugehörige Eichreihe mitverarbeitet und -gemessen.

## A.4.3 Ergebnisse der Wischproben

In verschiedenen Studien wurde berichtet, dass bei Beschäftigten in Apotheken und auf Stationen eine Belastung mit Zytostatika festgestellt wurde, obwohl die vorgeschriebenen Schutzmaßnahmen eingehalten wurden (Sessink et al. 1994a, Ensslin et al. 1994a, Ensslin et al. 1997, Sessink et al. 1992b, Sessink et al. 1997, Pethran 1999). Ziel dieser Arbeit war es, einen breiten Überblick über die in Apotheken und auf Stationen vorherrschende Kontaminationssituation zu erhalten. Dadurch können Kontaminationsquellen und -wege erfasst werden. Mit Hilfe dieser Wischproben ist es daher in Zukunft möglich, Kontaminationen mit Zytostatika aufzuzeigen und durch eine Verbesserung der Arbeitsweise eine mögliche Exposition zu vermeiden bzw. einzuschränken.

### A.4.3.1 Teilnehmer

Für diese Untersuchung wurden Wischproben aus Apotheken, Stationen und Praxen in 31 deutschen Städten untersucht. Wie Abbildung 16 zeigt, liegen diese Orte über ganz Deutschland verteilt.

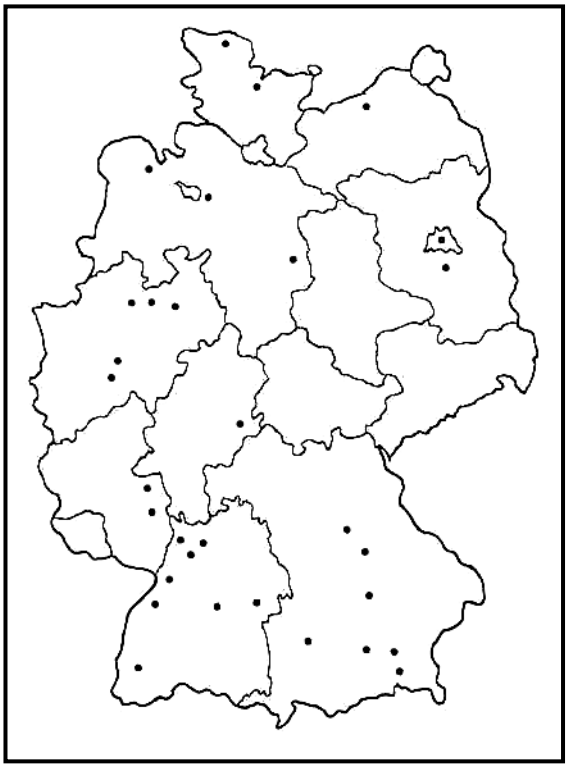

**Abbildung 16**: *Darstellung der Probenahmeorte in der BRD*

### A.4.3.2 Umgebungsmonitoring in Apotheken

Die 33 Krankenhaus- und vier öffentlichen Apotheken, die an dieser Studie teilgenommen haben, unterscheiden sich zum Teil erheblich in der Menge der täglich herzustellenden Zubereitungen. In einigen Apotheken werden pro Tag über 100 Zytostatika-Infusionen hergestellt und in anderen nur wenige pro Woche (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** *Verbrauchsmenge (g/Jahr) und Anzahl Zubereitungen (n/Jahr) von 5-FU in den teilnehmenden Apotheken*

| | Min | 25. Perz. | 50. Perz. | 75. Perz. | Max |
|---|---|---|---|---|---|
| **Verbrauchsmenge** | 100 | 1.788 | 3.115 | 4.531 | 10.500 |
| **Anzahl Zubereitungen** | 41 | 959 | 1.577 | 2.571 | 6.800 |

Die Probenahmeorte wurden in folgende Bereiche unterteilt, um den Arbeitsablauf möglichst vollständig zu repräsentieren:

- 01 Lagerplatz (Vorratsschrank, Schubfach, Kühlschrankfach)
- 02 Ablage Vorbereitung (Auspackplatz, Desinfizieren der Vorratsgefäße)
- 03 Arbeitsfläche unter der Werkbank mit laminarer Luftströmung (LAF, stichprobenartig)
- 04 Boden vor LAF (direkt unterhalb der Arbeitsfläche)
- 05 Boden Raummitte (möglichst zentral im Herstellungsbereich)
- 06 Ablage Nachbereitung (Ablage der fertigen Zubereitungen, Etikettierplatz)
- 07 Ablage Einschweißer (entweder Gerät und/oder Platz davor)
- 08 Pactosafe (Ecke auf der Oberseite des Abfallbehälters)
- 09 Materialschleuse (bzw. Durchreiche für Zytostatika)
- 10 Transportbehälter (Behälter für den Transport fertiger Zubereitungen)
- 11 Büro (außerhalb des Herstellungsraums, z.B. Dokumentations- oder PC-Platz)
- 12 Sonstiges (Waschbecken, Türklinke, Stuhl, Telefonhörer etc.)

**Abbildung 17:** *Herstellung einer Zytostatika-Infusion*

**Tabelle 6:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-FU in Apotheken (0 = unterhalb der Nachweisgrenze)*

| | Wischproben | | ng/Probe - Perzentile | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **95.** | **100.** |
| 01 Lager | 47 | 72 % | 0 | 0,0 | 5,0 | 99,0 | 4.200 | 14.100 |
| 02 Ablage Vorbereitung | 46 | 61 % | 0 | 0,0 | 1,6 | 17,3 | 375 | 6.900 |
| 03 Arbeitsfläche im LAF | 15 | 60 % | 0 | 0,0 | 1,0 | 5,0 | a) | 1.590 |
| 04 Boden vor LAF | 36 | 69 % | 0 | 0,0 | 2,0 | 11,8 | 300 | 520 |
| 05 Boden Raummitte | 50 | 48 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 7,0 | 68 | 335 |
| 06 Ablage Nachbereitung | 21 | 38 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 14,0 | 1.000 | 1.090 |
| 07 Ablage Einschweißer | 24 | 46 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 2,8 | 168 | 210 |
| 08 Pactosafe | 17 | 59 % | 0 | 0,0 | 2,0 | 91,0 | a) | 670 |
| 09 Materialschleuse | 13 | 77 % | 0 | 0,5 | 16,0 | 83,0 | a) | 38.000 |
| 10 Transportbehälter | 28 | 54 % | 0 | 0,0 | 1,7 | 12,8 | 1.100 | 1.460 |
| 11 Büro | 18 | 39 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 5,3 | a) | 360 |
| 12 Sonstiges | 28 | 54 % | 0 | 0,0 | 3,0 | 18,0 | 220 | 260 |

a) = Angabe bei n<20 nicht sinnvoll

| | Wischproben | | pg/cm² - Perzentile | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **95.** | **100.** |
| 01 Lager | 47 | 72 % | 0 | 0,0 | 12,5 | 248,8 | 10.500 | 36.900 |
| 02 Ablage Vorbereitung | 46 | 61 % | 0 | 0,0 | 4,1 | 40,6 | 940 | 17.250 |
| 03 Arbeitsfläche im LAF | 15 | 60 % | 0 | 0,0 | 2,5 | 10,0 | a) | 7.080 |
| 04 Boden vor LAF | 36 | 69 % | 0 | 0,0 | 5,0 | 28,1 | 760 | 1.300 |
| 05 Boden Raummitte | 50 | 48 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 15,6 | 170 | 840 |
| 06 Ablage Nachbereitung | 21 | 38 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 12,5 | 2.510 | 2.700 |
| 07 Ablage Einschweißer | 24 | 46 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 7,5 | 3.200 | 4.260 |
| 08 Pactosafe | 17 | 59 % | 0 | 0,0 | 5,0 | 210,0 | a) | 1.680 |
| 09 Materialschleuse | 13 | 77 % | 0 | 2,5 | 40,0 | 82,0 | a) | 250.000 |
| 10 Transportbehälter | 28 | 54 % | 0 | 0,0 | 1,3 | 32,5 | 2.700 | 3.600 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 11 | Büro | 18 | 39 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 9,9 | a) | 900 |
| 12 | Sonstiges | 28 | 54 % | 0 | 0,0 | 4,0 | 21,7 | 480 | 640 |

a) = Angabe bei n<20 nicht sinnvoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 343 Wischproben untersucht. Von diesen Proben lagen 57 % oberhalb der Nachweisgrenze.
Alle untersuchten Apotheken wiesen kontaminierte Probenorte auf. In lediglich acht Apotheken wurde an nur einem einzigen Probenahmeort eine Kontamination knapp über der Nachweisgrenze gemessen.

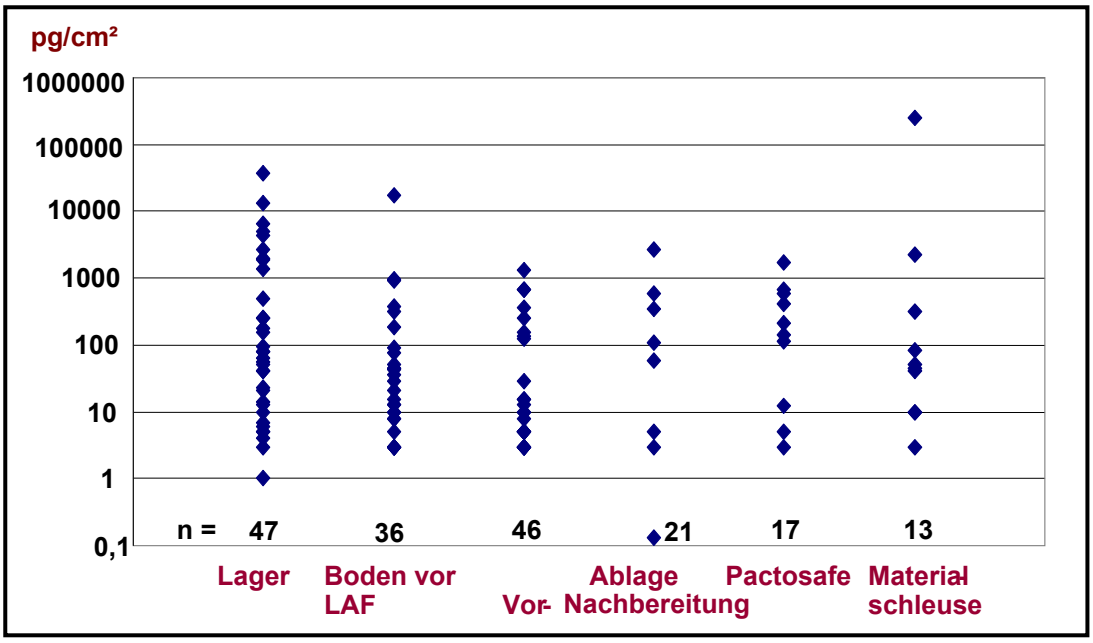


**Abbildung 18:** *Vergleich der Kontamination an verschiedenen Probenahmeorten*

Bemerkenswert hohe Kontaminationen findet man in den Lagerplätzen (Tabelle 6), in denen die von den Firmen gelieferten Zytostatika-Vorratsgefäße aufbewahrt werden. Hier wurden im Vergleich der Medianwerte (50. Perzentil) sehr hohe Kontaminationen gemessen. Auf der „Ablage Vorbereitung (02)“ werden die für eine Zubereitung benötigten Utensilien wie Trägerlösung, Spritzen, Kanülen oder Zytostatika-Vorratsgefäße abgestellt, bis sie zum Gebrauch in den LAF hineingereicht werden. Auch hier sind im Vergleich der 75. Perzentil-Werte hohe Kontaminationen gemessen worden. Die Arbeitsflächen unter den Werkbänken wurden nur stichprobenartig untersucht. Hier ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Kontamination zu rechnen, da dort die Zytostatika-Infusionen hergestellt

werden. Auf dem Boden vor dem LAF fanden sich knapp 70 % positive Proben und auf dem Boden in der Raummitte noch 48 %. „Ablage Nachbereitung (06)“ beschreibt die Flächen, auf denen die fertigen Infusionen abgestellt werden. Hier waren nur 38 % der Proben positiv. Allerdings wurden bei den wenigen positiven Proben hohe Verunreinigungen mit 5–FU nachgewiesen. Für den Transport werden die Infusionen in wasserundurchlässige Folie eingeschweißt. An den Einschweißplätzen wies nahezu jede zweite Probe eine Kontamination mit 5-FU auf. Ebenso fand sich auch an 54 % der untersuchten Transportbehälter eine Verunreinigung mit 5-FU. Viele positive Proben (59 %) mit hohen Kontaminationen wurden auch an den Abfallbehältern (Pactosafe) nachgewiesen.
Auffällig waren die Kontaminationen an den Probenahmeorten, die nicht direkt im Herstellungsbereich lagen. Die Materialschleuse dient in der Regel dazu, benötigte Arbeitsgeräte wie Spikes, Tupfer, Spritzen oder auch Zytostatika-Vorratsgefäße von außen in den Herstellungsraum hineinzubringen, ohne den Raum betreten zu müssen. Beim Vergleich der Medianwerte fällt auf, dass dort häufig eine erhebliche Kontamination mit Zytostatika zu beobachten ist. Unter „Büro (11)“ wurden alle Proben zusammengefasst, die außerhalb des Herstellungsraumes genommen wurden. Hier fand sich bei etwa 40 % der Proben eine Verunreinigung mit 5-FU.

#### A.4.3.2.1 Wiederholungsmessungen

In einigen Apotheken wurden nach Bekanntgabe der Ergebnisse erneut Wischproben genommen. Dabei wurden in erster Linie besonders belastete Probenahmeplätze untersucht. Zusätzlich wurden stichprobenartig auch Orte, an denen nach der ersten Probenahme keine Kontamination gemessen wurde, untersucht, um zu überprüfen, ob eine Verschleppung an diese Orte stattgefunden hat. An allen hochbelasteten Probenahmeorten der ersten Untersuchung konnte eine deutliche Verringerung der Konatmination nachgewiesen werden (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** *Ergebnisse der ersten und zweiten Messung an verschiedenen Probenahmeorten (0 = unterhalb der Nachweisgrenze)*

| | pg/cm² | |
|---|---|---|
| | 1. Messung | 2. Messung |
| Ablage Vorbereitung | 17.250 | 283 |
| Büro | 903 | 0 |
| Ablage Nachbereitung | 50 | 0 |
| Boden Raummitte | 155 | 8 |
| Transportbox | 3.665 | 40 |
| Kühlschrank | 13.375 | 33 |
| Boden vor LAF | 155 | 18 |
| Ablage Vorbereitung | 375 | 2.400 |
| Transportbox | 33 | 3.804 |

Probenahmeorte, die nach der ersten Untersuchung geringe Kontaminationen aufzeigten, waren auch nach der zweiten Messung nur geringfügig oder nicht nachweisbar belastet. Allerdings wurden an zwei Probenahmeplätzen (Ablage Vorbereitung und Transportbox) mit zunächst niedriger Kontamination bei der zweiten Messung eine deutlich höhere Kontamination gemessen, was auf eine Verschleppung von 5-FU hindeuten könnte.

#### A.4.3.2.2 Zytostatika verarbeitende Apotheken in Frankreich

Es konnten im Rahmen dieser Arbeit auch Proben aus Zytostatika verarbeitenden Apotheken aus Frankreich untersucht werden. In Frankreich werden Zytostatika-Infusionen für verschiedene Krankenhäuser zentral in einigen Apotheken hergestellt. Aus drei verschiedenen Apotheken wurden insgesamt 51 Proben analysiert (Tabelle 8). Aufgrund der kleinen Probenanzahl wurden die Probenahmeorte nur in folgende Bereiche unterteilt:

- 01 Lagerplatz (Vorratsschrank, Schubfach, Kühlschrankfach)
- 02 Ablage (Ablage Vorbereitung und Ablage Nachbereitung)
- 03 Arbeitsfläche unter dem LAF

- 04 Boden (Boden vor LAF und Boden Raummitte)
- 05 Sonstiges (Einschweißgerät, Transportbehälter, Abfalleimerdeckel)

**Tabelle 8:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-Fluorouracil in französischen Apotheken (0 = unterhalb der Nachweisgrenze)*

| | **Wischproben** | | **ng /Probe - Perzentile** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **100.** |
| 01 Lager | 7 | 100 % | 8 | 14 | 22 | 940 | 5.150 |
| 02 Ablage | 13 | 85 % | 0 | 3 | 9 | 23 | 97 |
| 03 Arbeitsfläche im LAF | 8 | 88 % | 0 | 5 | 93 | 260 | 930 |
| 04 Boden | 9 | 100 % | 5 | 15 | 16 | 22 | 307 |
| 05 Sonstige | 14 | 93 % | 0 | 4 | 14 | 102 | 46.000 |

| | **Wischproben** | | **pg/cm² - Perzentile** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **100.** |
| 01 Lager | 7 | 100 % | 9 | 40 | 63 | 1.360 | 8.580 |
| 02 Ablage | 13 | 85 % | 0 | 6 | 16 | 27 | 240 |
| 03 Arbeitsfläche im LAF | 8 | 88 % | 0 | 11 | 82 | 650 | 2.330 |
| 04 Boden | 9 | 100 % | 11 | 38 | 40 | 55 | 770 |
| 05 Sonstige | 14 | 93 % | 0 | 6 | 23 | 158 | 47.800 |

Nur bei vier der untersuchten Probenorte konnte keine Kontamination mit 5-FU gemessen werden. Alle anderen untersuchten Orte wiesen eine deutlich über der Nachweisgrenze liegende Kontamination auf. Auch bei diesen Proben finden sich die höchsten Kontaminationen in den Bereichen der Lagerflächen. Dort wiesen alle untersuchten Proben eine Verunreinigung mit 5-FU auf. Die geringsten Kontaminationen mit 5-FU ließen sich auf den „Ablagen (02)“ nachweisen. Die dort gemessenen Konzentrationen von 5-FU sind deutlich niedriger als an den übrigen Probenahmeorten. Im Vergleich der Mediane und der 75. Perzentil-Werte mit den deutschen Apotheken sind die Arbeitsflächen innerhalb der Werkbank sehr stark kontaminiert. Der Medianwert für diesen Probenahmeort beträgt 82 pg/cm². Auch alle auf dem Boden im Herstellungsraum genommenen Proben waren positiv. Der sehr

hohe Maximalwert unter „Sonstiges“ stammt von einer Probe, die in einer Transportkiste genommen wurde.

### A.4.3.3 Umgebungsmonitoring auf Stationen

Auf Stationen und in onkologischen Praxen wird den Risiken, die sich beim beruflichen Umgang mit Zytostatika ergeben können, noch keine so starke Beachtung geschenkt wie in den Apotheken. Deshalb war auf den Stationen das Interesse an einem Umgebungsmonitoring nicht überall vorhanden, so dass es schwierig war, Teilnehmer zu gewinnen. Dennoch wurde die Kontaminationssituation auf zwölf Stationen und in zwei onkologischen Praxen untersucht.
Die Stationen unterscheiden sich in Bezug auf Räumlichkeiten, Applikation und Entsorgung von den Apotheken. Da auch der Arbeitsablauf auf den Stationen nicht einheitlich gestaltet ist, wurden die Probenahmeorte wie folgt unterteilt, um eine statistische Auswertung vornehmen zu können.

- 01 Boden Stationszimmer (vor Arbeitsfläche, Raummitte)
- 02 Ablage Infusionen (Anlieferungsplatz, Auspackplatz, Tablett)
- 03 Infusionsständer (Stange, Fußgestell, Infusomaten)
- 04 Boden Patientenzimmer (vor dem Bett, Raummitte)
- 05 Entsorgungsbehälter (Pactosafe, Abfalltonne, Ausgussbecken)
- 06 Sonstiges (Nachtkästchen, Türklinke, Stuhl, etc.)

Während der Auswertung der Ergebnisse stellte sich heraus, dass eine Unterscheidung zwischen Stationen mit einer eigenen Zubereitung von Zytostatika (Tabelle 9) und Stationen mit einer Anlieferung der Infusionen aus einer Apotheke (Tabelle 10) sinnvoll ist. Aufgrund der geringen Probenzahl der einzelnen Wischorte wurde auf eine Angabe des 95. Perzentil-Wertes verzichtet.

**Tabelle 9:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-Fluorouracil von Stationen mit eigener Zubereitung (0 = unterhalb der Nachweisgrenze)*

| | Wischproben | | ng/Probe - Perzentile | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **100.** |
| 01 Boden Stationszimmer | 12 | 42 % | 0 | 0 | 0 | 12 | 450 |
| 02 Ablage Infusionen | 13 | 54 % | 0 | 0 | 5 | 36 | 7.400 |
| 03 Infusionsständer | 10 | 80 % | 0 | 6 | 21 | 30 | 190 |
| 04 Boden Patientenzimmer | 8 | 75 % | 0 | 3 | 14 | 20 | 50 |
| 05 Entsorgungsbehälter | 6 | 67 % | 0 | 1 | 6 | 17 | 110 |
| 06 Sonstiges | 8 | 88 % | 0 | 21 | 56 | 350 | 2.500 |

| | Wischproben | | pg/cm² - Perzentile | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **100.** |
| 01 Boden Stationszimmer | 12 | 42 % | 0 | 0 | 0 | 30 | 1.100 |
| 02 Ablage Infusionen | 13 | 54 % | 0 | 0 | 12 | 90 | 18.500 |
| 03 Infusionsständer | 10 | 80 % | 0 | 12 | 48 | 70 | 160 |
| 04 Boden Patientenzimmer | 8 | 75 % | 0 | 7 | 35 | 50 | 130 |
| 05 Entsorgungsbehälter | 6 | 67 % | 0 | 2 | 15 | 42 | 90 |
| 06 Sonstiges | 8 | 88 % | 0 | 54 | 140 | 870 | 6.400 |

Insgesamt wurden 125 Wischproben analysiert. Der Anteil positiver Proben lag bei den Stationen mit eigener Zubereitung (70 %) und bei den Stationen ohne eigene Zubereitung (68 %) etwa gleich hoch. Bei näherem Betrachten der Medianwerte fällt aber auf, dass die Stationen mit eigener Zubereitung tendenziell höher belastet sind als die Stationen mit Anlieferung der Infusionen durch die Apotheke. Die einzige Ausnahme bildet der Boden im Stationszimmer. Hier wurden auf den Stationen mit eigener Zubereitung bei über 40 % und bei den Stationen ohne eigene Zubereitungen bei 75 % der Proben eine Verunreinigung mit 5-FU nachgewiesen. Die „Ablage Infusionen (02)“ bezeichnen Orte, meist im Stationszimmer, an denen die Zytostatika enthaltenden Infusionen gelagert und oft auch für die Applikation angestochen werden. Auch hier wurden mit 54-58 % positiver Proben in beiden Gruppen deutliche Kontaminationen festgestellt.

**Tabelle 10:** *Ergebnisse der Wischproben von 5-Fluorouracil von Stationen ohne eigene Zubereitung (0 = unterhalb der Nachweisgrenze)*

| | Wischproben | | ng/Probe - Perzentile | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **100.** |
| 01 Boden Stationszimmer | 8 | 75 % | 0 | 0,8 | 5,0 | 7 | 470 |
| 02 Ablage Infusionen | 12 | 58 % | 0 | 0,0 | 2,5 | 6 | 840 |
| 03 Infusionsständer | 19 | 68 % | 0 | 0,0 | 4,0 | 136 | 3.700 |
| 04 Boden Patientenzimmer | 18 | 89 % | 0 | 2,0 | 4,5 | 13 | 6.900 |
| 05 Entsorgungsbehälter | 4 | 25 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 1 | 4 |
| 06 Sonstiges | 7 | 71 % | 0 | 0,5 | 2,0 | 3 | 170 |

| | Wischproben | | pg/cm² - Perzentile | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probenahmestellen** | **n** | **positiv** | **0.** | **25.** | **50.** | **75.** | **100.** |
| 01 Boden Stationszimmer | 8 | 75 % | 0 | 1,9 | 12,5 | 17 | 1.170 |
| 02 Ablage Infusionen | 12 | 58 % | 0 | 0,0 | 2,5 | 12 | 2.100 |
| 03 Infusionsständer | 19 | 68 % | 0 | 0,0 | 5,0 | 170 | 3.700 |
| 04 Boden Patientenzimmer | 18 | 89 % | 0 | 5,0 | 11,3 | 32 | 17.000 |
| 05 Entsorgungsbehälter | 4 | 25 % | 0 | 0,0 | 0,0 | 2 | 10 |
| 06 Sonstiges | 7 | 71 % | 0 | 2,2 | 5,0 | 7 | 420 |

Fast 70 - 80 % der Proben, die an den Infusionsständern genommen wurden, waren positiv. Der 75. Perzentil-Wert von 170 pg/cm² lässt auf sehr hohe Verunreinigungen schließen. Das bedeutet, dass der Großteil der Infusionsständer oder Infusomaten als kontaminiert betrachtet werden muss. Fast immer wurde am Boden vor dem Patientenbett eine Kontamination festgestellt. An einer Stelle wurden über 17.000 pg 5-FU/cm² nachgewiesen. Die niedrigsten Kontaminationen finden sich, im Gegensatz zu den Apotheken, an den Entsorgungsbehältern. Auch hier ist auffällig, dass die Stationen mit eigener Zubereitung deutlich höher kontaminiert waren als die Stationen ohne eigene Zubereitung.

### A.4.3.4 Kontamination an Zytostatika-Vorratsgefäßen

Da bei der Analyse der Wischproben in den Bereichen der Zytostatika-Vorratslager hohe Kontaminationen mit 5-FU nachgewiesen wurden, konnte eine Kontamination der Vorratsgefäße mit Zytostatikum nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden stichprobenartig 105 originalverpackte Flaschen zufällig aus den Vorratsschränken der Apotheken ausgewählt und auf Außenkontamination untersucht.

Es wurden fünf Chargen mit 5-FU Lösungen der Konzentration 5.000 mg/Flasche (A-E), eine Charge mit 1.000 mg/Flasche (F) und eine Charge mit 500 mg/Flasche (G) von insgesamt drei Herstellern untersucht (Abbildung 19).

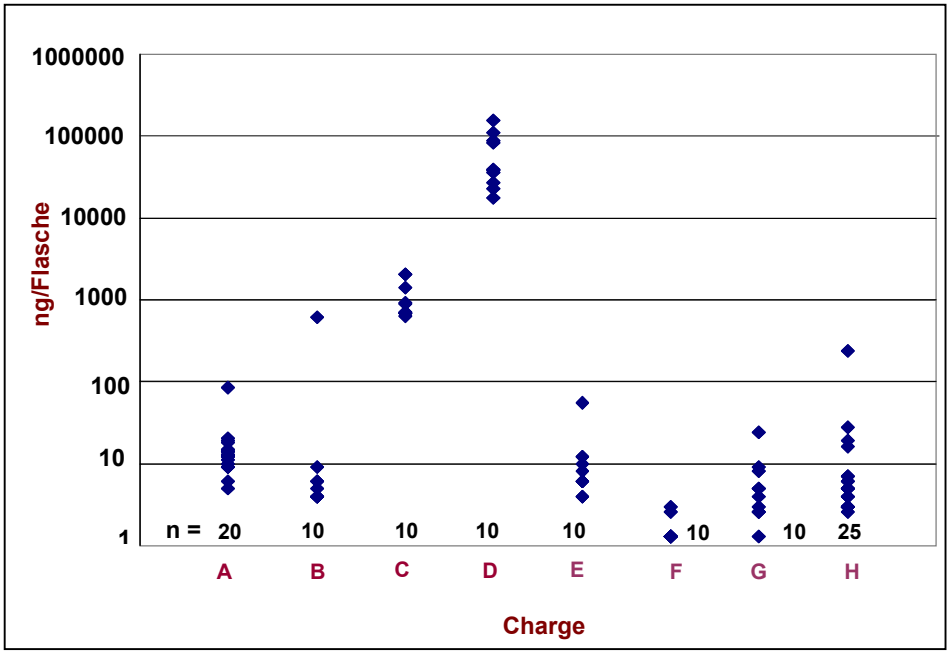


**Abbildung 19:** *Außenkontamination von 5-FU Vorratsgefäßen*

Von allen untersuchten Flaschen war nur eine einzige nicht mit 5-FU kontaminiert. Fünf der Flaschen waren mit über 0,1 mg 5-FU verunreinigt. Es fällt auf, dass der Grad der Außenkontamination mit der Menge 5-FU in den Flaschen korreliert. Die Chargen A-E, die 5.000 mg pro Flasche enthielten, zeigten immer deutliche Verunreinigungen. Einzige Ausnahme war die Charge E, bei der ein Maximalwert von 55 ng/Flasche gemessen wurde. Charge D dagegen war durchgehend stark kontaminiert. In Charge F lagen die gemessenen Werte nur knapp über der Nachweisgrenze, dennoch ist deutlich zu erkennen, dass fast alle untersuchten Flaschen eine erhebliche Außenkontamination mit Zytostatikum aufwiesen.

Interessant sind die Ergebnisse der Charge H. Bei dieser Charge handelt es sich um ein besonderes Verpackungssystem, bei dem die Flaschen (5.000 mg 5-FU pro Flasche) mit einem zweiten Kunststoffbehälter umhüllt sind (Kittlaus 2001). Durch dieses Verpackungssystem kommt es bei der Verarbeitung nicht mehr zu einem Kontakt mit der evtl. kontaminierten Flasche. Hier ließ sich eine geringe Kontamination mit Zytostatikum nachweisen. Die Ergebnisse lagen alle zwischen 2 und 28 ng/Behälter. Nur ein Behälter war mit 236 ng höher belastet.

### A.4.3.5 Handschuhe

Um den Kontaminationsweg des 5-FU verfolgen zu können, wurden in einer Apotheke neben den genannten Wischorten auch 17 Handschuhpaare von Mitarbeiter(innen), die Zytostatika-Infusionen herstellten, untersucht. Acht Probanden arbeiteten als Zureicher und neun als Zubereiter unter dem LAF. In jeder Arbeitsperiode wurden 2-3 g 5-FU verarbeitet.

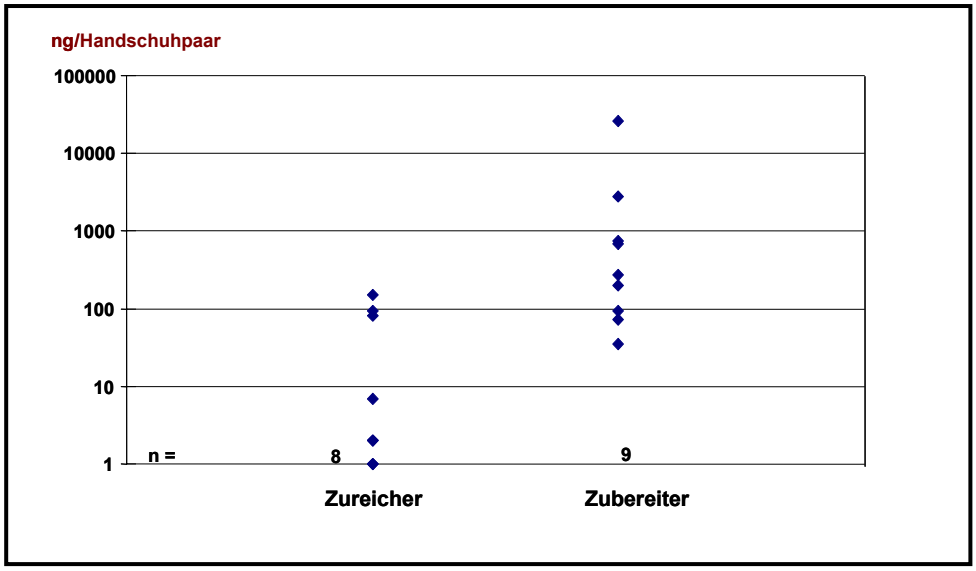


**Abbildung 20:** *Kontamination der Handschuhe mit 5-FU (ng/Handschuhpaar)*

Wie die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen, waren die untersuchten Handschuhe immer kontaminiert. Es fällt auf, dass die Handschuhe der Zubereiter wesentlich höher kontaminiert waren als die der Zureicher. Bei den Zureichern lagen vier Werte knapp über der Nachweisgrenze, der höchste Wert lag bei 152 ng pro Handschuhpaar. Bei den Zubereitern hingegen wurden Kontaminationen zwischen 35 und 26.400 ng pro Handschuhpaar gemessen.

# A.5. Diskussion

Hintergrund für diese Arbeit waren Studien, in denen bei Beschäftigten in Zytostatika-Abteilungen oder bei Pflegepersonal auf onkologischen Stationen trotz der eingesetzten Schutz- und Sicherheitsmaßnahmen eine Inkorporation von Zytostatika festgestellt wurde. Darüber hinaus wurde auch bei Personen ohne direkten Kontakt mit Zytostatika eine innere Belastung gemessen (Sessink et al. 1994b, Ensslin et al. 1994b, Ensslin et al. 1997, Sessink et al. 1992b, Sessink et al. 1997, Pethran 1999). Die schädliche Wirkung der Zytostatika nach einer Exposition und Inkorporation ist noch nicht eindeutig geklärt. Es muss jedoch von einer Gefährdung des Personals ausgegangen werden. Durch Wischproben sollte ein Überblick über die Kontaminationssituation in Apotheken und auf Stationen im gesamten Bundesgebiet erhalten werden. Durch die Bestimmung von Kontaminationsquellen und Verschleppungspfaden soll der potentiellen Gefahr einer Aufnahme von Zytostatika vorgebeugt werden.

## A.5.1 Methode

Für die zu entwickelnde Methode galt es, Anforderungen wie einfache Handhabung, robuste Analytik und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu vereinigen. Bisher wurden in der Literatur für solche Wischproben Aufbereitungsverfahren für die HPLC beschrieben. Mit diesen Methoden konnten Nachweisgrenzen von bis zu 0,6 µg pro Probe erreicht werden (Connor et al. 1999, Sessink et al. 1992b). Im Vergleich mit der HPLC besitzt die GC/MS eine höhere Sensitivität, wodurch niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden können. Durch die Kopplung mit einer massenspektrometrischen Detektion wird eine höhere Spezifität der zu untersuchenden Substanz erreicht. Mit der Wischprobentechnik und dem anschließenden Nachweis von 5-FU durch GC/MS wurde ein sensitives Verfahren mit einer Nachweisgrenze von 1 ng 5-FU pro Probe entwickelt. Bisher wurde diese Nachweisgrenze durch vergleichbare analytische Methoden nicht erreicht. Daher ist diese Methode für den Nachweis geringster Mengen 5-FU geeignet. Die einfache Handhabung der Probenahme ermöglicht die problemlose externe Durchführung der Wischproben. Weitere Vorteile der Methode bestehen in der Stabilität von 5-FU im gewählten Lösungsmittel von bis zu einer Woche bei Raumtemperatur und der

schnellen Probenaufbereitung. So können in kurzer Zeit relativ viele Proben untersucht werden. Im Vergleich mit bereits etablierten Methoden konnte das hier entwickelte Verfahren auf einige wenige Arbeitsschritte reduziert werden. So konnte die Anzahl systematischer Fehler so gering wie möglich gehalten werden.

## A.5.2 Apotheken

Anhand der Ergebnisse der Wischproben aus den Apotheken ließen sich an allen Probenahmeorten deutliche Kontaminationen mit 5-FU nachweisen. Vor allem Orte wie „Lager“, „Pactosafe“ und „Materialschleuse“ fielen als besonders hoch belastet auf.

Obwohl schon seit den vierziger Jahren Zytostatika bei der Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden, werden erst seit den neunziger Jahren Untersuchungen zum Umgebungsmonitoring in Apotheken und auf Stationen durchgeführt. In diesen Veröffentlichungen wurden jedoch die Kontaminationen der Arbeitsflächen unter den Werkbänken in den Vordergrund gerückt. In einer der ältesten Studien wurden dort Belastungen von 10.000 - 62.000 pg/cm$^2$ (Sessink et al. 1992a) bzw. 200 - 2.000 pg/cm$^2$ (Sessink et al. 1992b) gemessen. Insgesamt wiesen 13 % bzw. 25 % der untersuchten Proben eine Verunreinigung mit 5-FU auf. Auch in Tumorzentren in Kanada und den USA wurden in der Werkbank Kontaminationen durch 5-FU in Höhe von 800 - 32.000 pg/cm$^2$ gemessen (Connor et al. 1999). In Italien wurden an diesen Stellen Belastungen von 89 - 13.000 pg/cm$^2$ gefunden (Floridia et al. 1999). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Ergebnisse zeigten eine wesentlich geringere Kontamination der Arbeitsfläche unter dem LAF. Neun von 15 Proben waren positiv (60 %), wobei acht Proben im Bereich von 1 – 15 pg/cm² lagen. Diese Ergebnisse zeigen den hohen Arbeitsstandard in den hier untersuchten Apotheken und lassen vermuten, dass die Werkbänke in Bezug auf eine mögliche Exposition kein großes Risiko darstellen. Wichtiger ist es hingegen, das direkte Arbeitsumfeld der Beschäftigten zu untersuchen. So konnten Kontaminationen an bis dahin unerwarteten Stellen gefunden werden. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf Kontaminationsquellen und Verschleppungswege.

In den bisher veröffentlichten Studien wurden Proben aus dem Arbeitsumfeld des Personals nicht in verschiedene Bereiche eingeteilt. Vielmehr wurden gezielt einige Orte wie beispielsweise der Boden des Herstellungsraums stichprobenartig

untersucht (Floridia et al. 1999, Sessink et al. 1992a, Sessink et al. 1992b). Dabei wurden in diesen Proben vom Boden des Herstellungsraums deutliche Kontaminationen zwischen 12.000-1.461.000 pg/cm² gemessen (Micoli et al. 2001). Bei einer Unterscheidung zwischen Proben vom Boden vor dem LAF und in der Mitte des Herstellungsraums wurden vor der Werkbank Belastungen von 1.000-13.000 pg/cm² festgestellt (Connor et al. 1999). Auf dem Boden in der Raummitte wurde nur in einer von sieben Proben eine Kontamination mit 5-FU gefunden (40.800 pg/cm²). Bei Untersuchungen in den Lagerplätzen wurden bei sieben Proben Kontaminationen mit 5-FU zwischen 2.200-120.000 pg/cm$^2$ nachgewiesen. Nur eine Probe war negativ (Floridia et al. 1999).

In einer weiteren Studie wird eine Unterteilung der Wischorte in fünf verschiedene Bereiche vorgenommen. In jedem Bereich wurden jeweils 5-10 Proben untersucht. Diese Ergebnisse repräsentieren verlässlicher die Kontaminationssituation im Arbeitsumfeld der Beschäftigten und zeigen tendenziell, dass das Lager und die Bodenproben sehr hohe Belastungen mit 5-FU aufweisen (Schmaus et al. 2002).

In dieser Arbeit sollten gezielt Kontaminationsquellen und Verschleppungspfade für das Zytostatikum 5-FU aufgezeigt werden. Dazu wurde das Arbeitsumfeld in zwölf spezifische Probenahmeorte unterteilt, die den gesamten Arbeitsablauf repräsentieren sollten.

Bemerkenswert ist, dass sich die höchsten Kontaminationen in den Vorratslagern finden. Sie lassen auf eine Kontamination der Zytostatika-Vorratsgefäße schließen. Daher stammen wahrscheinlich auch die hohen Kontaminationen auf den Ablageflächen zur „Vorbereitung“. Ebenso wie die Lagerflächen dienen diese Ablagen nur zur Bereitstellung von benötigtem Arbeitsmaterial wie beispielsweise den Flaschen. Eine Verarbeitung von Zytostatika findet hier noch nicht statt. Bevor die Vorratsgefäße in den LAF hereingereicht werden, werden sie meist in dessen Nähe wischdesinfiziert. Dabei kann Desinfektionsmittel und evtl. außen an der Flasche befindliches Zytostatikum heruntertropfen und es kommt zu einer Kontamination des Bodens vor dem LAF. An diesen Stellen wurde bei 70 % der Proben eine Verunreinigung gemessen. Bei den untersuchten Bodenproben der Raummitte waren nur 48 % der Proben positiv. Der Medianwert (50. Perzentil) der Bodenproben vor dem LAF war mit 5,0 pg/cm² deutlich höher als der von Proben am Boden in der Raummitte (0,0 pg/cm²). Es scheint demnach vom Boden vor dem LAF zu einer Verschleppung auf den gesamten Boden im Herstellungsbereich zu

kommen. Durch kontaminierte Handschuhe (siehe 4.3.5) kann es über die fertigen Zytostatika-Infusionen zu einer Verschleppung zur „Ablage Nachbereitung“ kommen. Bemerkenswert ist, dass auch an den „Einschweißplätzen“ nahezu jede zweite Probe eine Kontamination mit 5-FU aufwies. Die häufige Kontamination des Paktosafe lässt sich evtl. durch eine unsachgemäße Entsorgung von kontaminiertem Zytostatika-Abfall erklären. Erstaunlich ist die Anzahl positiver Proben, die in der Materialschleuse und im Büro gemessen wurde (77 % bzw. 39 %). Dies zeigt, dass die Möglichkeit einer Kontamination nicht auf den Herstellungsbereich beschränkt bleibt, sondern alle Räume innerhalb der Apotheke betroffen sein können.
Für die Erfassung der Kontaminationssituation in Apotheken ist eine Einteilung in die oben angegebenen zwölf Probenahmeorte sinnvoll. Es wurde beobachtet, dass das Lager und die Materialschleuse mit über 70 % und der Boden vor dem LAF sowie der Pactosafe mit etwa 70 % positiver Proben auffällig hoch kontaminierte Wischorte waren. Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Untersuchungen konnte hier gezeigt werden, dass die Vorratsgefäße eine Kontaminationsquelle sein können. Von hier aus kommt es über die „Ablage Vorbereitung“ bis zu den Einschweißplätzen zu einer Verschleppung von 5-FU. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich eine Kontamination nicht nur auf die Arbeitsplätze beschränkt, sondern auch Stellen außerhalb des Herstellungsraums betroffen sind. Kontaminationen wurden beispielsweise auch an den Transportbehältern, Stühlen und Türklinken gefunden. Alle Mitarbeiter in der Apotheke sollten daher mit dem Gefahrstoff Zytostatikum vertraut gemacht werden. Dennoch sollte der Personenkreis, der Umgang mit Zytostatika hat, von der Warenannahme bis zur Entsorgung, so klein wie möglich sein. Die Arbeitsweise in einigen Apotheken sollte daher überdacht und gezielt Verbesserungen des Arbeitsablaufs vorgenommen werden.

### A.5.2.1 Wiederholungsmessungen

Die Effektivität in der Umstellung der Arbeitsweise in einigen stark belasteten Apotheken wurde durch erneute Wischprobenahme kontrolliert. Dabei fiel auf, dass an allen zuvor stark belasteten Orten die Kontaminationen mit 5-FU bei der zweiten Probenahme deutlich geringer waren. Durch eine angepasste Arbeitsweise lassen sich somit Kontaminationen vermeiden. Allerdings muss dabei der gesamte Arbeitsablauf bedacht werden. Die betroffenen Apotheken haben gezielt versucht,

die hohen Kontaminationen an den betreffenden Stellen zu verringern. Dies ist zwar gelungen, aber zusätzlich wurde an vorher nicht so hoch belasteten Orten eine hohe Verunreinigung gemessen. Eine Verschleppung des Zytostatikums ist hier also nicht ganz auszuschließen. Eine weitere Verbesserung der Arbeitsweise ist in diesem Fall durchzuführen und kann wieder durch Wischproben auf ihre Effektivität kontrolliert werden.

### A.5.2.2 Zytostatika verarbeitende Apotheken in Frankreich

Die Ergebnisse der Wischproben aus den französischen Apotheken zeigten, dass bis auf vier Ausnahmen alle 51 untersuchten Proben eine Verunreinigung mit 5-FU aufwiesen. Lediglich 40 – 72 % der Wischproben an diesen Probenahmeorten in deutschen Apotheken wiesen eine Kontamination mit 5-FU auf. Auch bei der Betrachtung der Mediane und 75. Perzentil-Werte ist zu erkennen, dass die Werte der französischen Apotheken immer deutlich über den Ergebnissen der deutschen Apotheken liegen. Zum Vergleich der Ergebnisse muss jedoch auch die unterschiedliche Arbeitsweise in beiden Ländern berücksichtigt werden. In Frankreich werden die Zytostatika-Infusionen zentral in einigen Apotheken für verschiedene Krankenhäuser hergestellt. Daher unterscheiden sich die Apotheken in der täglich hergestellten Anzahl Zubereitungen z.T. erheblich von deutschen Krankenhausapotheken. In Frankreich werden in diesen untersuchten Apotheken jährlich etwa 9 kg 5-FU verarbeitet, während in Deutschland der Medianwert bei den Verbrauchszahlen bei 3 kg lag. Da es für die Herstellung von Zytostatika-Infusionen keine europäischen Richtlinien gibt, könnten die großen Unterschiede in der Belastung durch die unterschiedliche Arbeitsweise erklärt werden.

## A.5.3 Stationen

Die Ergebnisse der Wischproben auf den Stationen zeigten meist eine höhere Kontamination mit 5-FU als in den Apotheken. Ein auffälliges Ergebnis sind sicherlich die höheren Kontaminationen, die auf den Stationen mit eigener Zubereitung gefunden wurden. Dies lässt sich vielleicht dadurch erklären, das die räumliche Ausstattung auf den Stationen für eine Herstellung von Zytostatika-Infusionen nicht immer optimal ist.

In der Literatur sind bereits Studien beschrieben, in denen Wischproben auf Stationen genommen worden sind (Sessink et al. 1992b). In erster Linie wurden aber in diesen Studien Proben aus den Herstellungsräumen untersucht. In dieser Arbeit sollte jedoch auch auf den Stationen das direkte Arbeitsumfeld der Beschäftigten und der Patienten untersucht werden, um Probleme, die sich evtl. bei der Lagerung, Applikation oder Entsorgung ergeben, beschreiben zu können. Dazu sind in der Literatur allerdings kaum Vergleichszahlen zu finden. Bei der Untersuchung in einer niederländischen Tagesklinik wurden an vier verschiedenen Tagen Proben auf den „Böden im Applikationsraum“ genommen. Die Probenahmeorte wurden nicht genauer eingeteilt. Die gemessenen Werte lagen zwischen 0,7 – 1,8 ng/cm². Allerdings finden sich keine Angaben zur Anzahl positiver Proben (Sessink et al. 1992b). In amerikanischen und kanadischen Kliniken wurden in der gesamten Umgebung der Patienten 29 Wischproben genommen und untersucht. 52 % dieser Proben wiesen eine Kontamination zwischen 70 – 8.900 pg 5-FU/cm² auf (Connor et al. 1999).

Im Gegensatz zu diesen Studien, in denen relativ wenige Proben genommen wurden, wurden in der hier durchgeführten Arbeit 125 Wischproben genommen, um einen detaillierten Überblick zu bekommen. Dazu wurden hauptsächlich Räume, in denen Zytostatika gelagert und appliziert werden, sowie Räume, zu denen die Patienten Zutritt haben, wie Waschräume, Stations- und Patientenzimmer untersucht.

Ein Problem auf allen Stationen ist die hohe Kontamination in den Stationszimmern („Boden Stationszimmer“ und „Ablage Infusionen“). Bevor eine Infusion dem Patienten angehängt werden kann, muss sie angestochen und das Infusionsbesteck entlüftet werden. Dies wird oftmals im Stationszimmer durchgeführt. Bei diesem Arbeitsschritt besteht immer die Gefahr, dass Zytostatika-Lösung verspritzt wird. Dabei befinden sich unter Umständen währenddessen nicht nur Ärzte und

Pflegepersonal, sondern auch anderes Klinikpersonal bzw. Besucher in diesem Raum. Die Kontamination kann dann von dort aus auf die Station verschleppt werden.

Beim Anlegen oder Abnehmen der Infusionen bzw. während der Applikation scheint es durch heraustropfende Infusionslösung zu Kontaminationen am Infusionsständer und auf dem Boden zu kommen. Dies konnte durch Probenahme am Boden vor dem Patientenbett bestätigt werden. Um diese Kontaminationsquelle so gering wie möglich zu halten, sollten die Infusionsständer und Infusomaten regelmäßig gereinigt werden. Auch die Untersuchungen der Entsorgungsbehälter zeigen, dass auf den Stationen vermehrt auf einen sicheren und sauberen Umgang vor und während der Applikation sowie bei der Entsorgung der Infusion geachtet werden sollte.

Die Ergebnisse der Wischproben auf Stationen zeigen Schwierigkeiten beim Umgang mit den Infusionen vor und während der Applikation auf. Darüber hinaus stellt die Gefahr der Verschleppung auf den Stationen ein weitaus größeres Problem dar als in den Apotheken, in denen in der Regel nur das Personal in den Herstellungsräumen einer möglichen Exposition ausgesetzt ist. Auf den Stationen ist der gefährdete Personenkreis wesentlich größer. Neben dem Pflegepersonal sind auch allgemeines Klinikpersonal und Besucher potentiell exponiert. Dieser Personenkreis und der „mobile“ Patient können zudem erheblich zu einer Verschleppung des Zytostatikums auf der Station bzw. in der gesamten Klinik beitragen.

Mittlerweile werden einige Stationen, die während der Studie die Zytostatika-Infusionen selber herstellten, mit fertigen Infusionen aus den Apotheken beliefert. Diese Umstellung wurde in einigen Fällen durch die hier dargestellten Ergebnisse beschleunigt.

## A.5.4 Zytostatika-Vorratsgefäße

Die hohen Kontaminationen, die in den Vorratslagern gemessen wurden, ließen auf eine Kontamination der Zytostatika-Vorratsgefäße schließen. In der Literatur wurde erstmals 1997 über kontaminierte Verpackungen von Zytostatika berichtet (Wilken 1997). Hier wurden Flaschen verschiedener Hersteller auf sichtbare Außenkontaminationen untersucht. 1998 sollte im Rahmen einer Umfrage in hessischen Krankenhausapotheken Art und Umfang möglicher

Außenkontaminationen von Zytostatika-Vorratsgefäßen ermittelt werden (Hepp & Gentschew 1998). In beiden Studien konnten an einigen Flaschen sichtbare Kontaminationen mit Zytostatikum, meist unterhalb der Bördelkappe, festgestellt werden. Mit Hilfe sensitiver Messmethoden wurden Platinflaschen von fünf verschiedenen Herstellern nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ untersucht. Dabei wurde bei der Hälfte der 18 untersuchten Flaschen eine Kontamination mit Platin gemessen (Paul et al. 1998). 1999 wurden in einer belgischen Studie 90 5-FU-Vorratsgefäße mittels HPLC auf Außenkontaminationen analysiert (Delporte et al. 1999). Hierbei wurde nur an drei Flaschen eine Belastung mit 5-FU nachgewiesen. Dies ist sicherlich auf die recht hohe Nachweisgrenze von 5 µg pro Flasche zurückzuführen. Mit dieser Nachweisgrenze wäre in dieser Arbeit nur an zehn der 105 untersuchten Flaschen eine Kontamination festgestellt worden. Durch den Einsatz sensitiverer Messverfahren wie GC/MS oder Voltammetrie können Nachweisgrenzen von wenigen ng bis pg erreicht werden. Mit diesen Methoden wurden 34 Cyclophosphamid-, neun Ifosfamid- und 50 Platin-Vorratsgefäße untersucht und an 88 Flaschen eine Kontamination festgestellt (Pethran et al. 2001).
In der hier vorliegenden Arbeit konnten Kontaminationen bis zu 1 ng pro Flasche nachgewiesen werden. Mit einer Ausnahme wurde an allen untersuchten Flaschen eine Verunreinigung mit 5-FU festgestellt. An fünf der untersuchten Flaschen wurde eine Außenkontamination von mehr als 0,1 mg 5-FU gemessen.
Nach diesen Ergebnissen muss jede Primärverpackung von Zytostatika als potentiell kontaminiert angesehen werden. Eine besondere Bedeutung bekommen die Kontaminationen an den Zytostatika-Vorratsgefäßen auch dadurch, dass z.T. sehr hohe Verunreinigungen gefunden wurden. So kann es zu einer erheblichen Verschleppung innerhalb der Apotheke kommen. Die kontaminierten Flaschen stellen damit eine potentielle Gefährdung für alle Mitarbeiter dar, weil durch Lagerräume außerhalb der Zytostatika-Abteilung auch ungeschulte und nicht immer ausreichend geschützte Mitarbeiter in Kontakt mit diesen Flaschen kommen können.
Vor allem müssen größere Anstrengungen seitens der Hersteller unternommen werden, um diese Kontaminationsquelle erheblich zu reduzieren. Mittlerweile wurde dazu ein neues Konzept vorgestellt (Kittlaus 2001), bei dem die Zytostatika-Vorratsgefäße nach der Endkontrolle in einen zweiten Kunststoffbehälter aus transparentem Polypropylen verpackt werden, der in der Apotheke nicht mehr entfernt wird. Hierdurch kommt es bei der Handhabung nicht mehr zu einem Kontakt

mit der kontaminierten Flasche. Die ersten Ergebnisse bezüglich einer Kontamination solcher Kunststoffbehältnisse sind sehr vielversprechend, sollten aber noch im Routinebetrieb bestätigt werden.

## A.5.5 Handschuhe

Bei der Herstellung von aseptischen Zubreitungen, insbesondere bei Zytostatika-Infusionen, ist durch geeignete Schutzausrüstungen wie beispielsweise Handschuhe sowohl der Produkt- als auch der Personenschutz sicherzustellen. Kontaminierte Handschuhe können durch die anfallenden Handgriffe zu einer Verschleppung von Zytostatika führen. Zusätzlich können sie für einige Substanzen durchlässig sein und somit kann es zu einer inneren Belastung der Personen kommen.
Da die Zytostatika-Vorratsgefäße als eine der Hauptkontaminationsquellen ausgemacht wurden, sollten die Schutzhandschuhe des Personals auf Kontaminationen mit 5-FU untersucht werden. Alle untersuchten Handschuhe waren kontaminiert, wobei die Handschuhe der Zubereiter mit 35 – 26.400 ng pro Paar deutlich höher kontaminiert waren als die der Zureicher (1 – 152 ng pro Paar).
Die Handschuhe des Personals wurden bereits in einigen vorhergehenden Studien untersucht. Dort waren die Handschuhe, die während der Herstellung und anschließenden Reinigung getragen wurden, mit 23.000-62.000 ng 5-FU pro Paar kontaminiert (Sessink et al. 1992b). Bei Zureichern wurden in einer weiteren Studie Belastungen von 120 - 3.290 ng/Paar und bei den Zubereitern 70 - 3.770 ng/Paar gemessen (Micoli et al. 2001). Angaben über die Tragedauer der Handschuhe wurden nicht gemacht. Handschuhe, die nach einer Tragedauer von 30 Minuten untersucht wurden, wiesen in elf von 17 Fällen eine Kontamination von 21.000 - 620.000 ng/Paar auf (Sessink et al. 1994b).
Die in dieser Arbeit für die Zureicher ermittelten Werte lagen deutlich unter den Werten der Arbeit von Micoli et al. (2001). Die Verunreinigungen an den Handschuhen der Zubereiter lagen z.T. in der Größenordung, wie sie in den oben genannten Studien angegeben werden.
Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Verschleppung des 5-FU über die Handschuhe möglich ist. Besondere Bedeutung haben dabei die kleinen alltäglichen Handgriffe, die einmal mit und einmal ohne Handschuhe durchgeführt werden, weil

nicht über eine mögliche Kontamination nachgedacht wird. Der Arbeitsablauf sollte unter diesem Aspekt genauer durchdacht und dem Arbeitsalltag angepasst werden.
Sessink und Mitarbeiter zeigten, dass bei der Verarbeitung von Zytostatika die Aufnahme der Substanzen hauptsächlich dermal erfolgt (Sessink et al. 1994b). In verschiedenen Studien wurde die Durchlässigkeit einiger Handschuhmaterialien gegenüber Zytostatika getestet. Es zeigte sich, dass einige dieser Materialien, besonders Latex und Polyvinyl, durchlässig für Zytostatika sind und somit nicht immer einen sicheren Schutz vor einer Aufnahme bieten (Stoikes et al. 1987, Gross & Groce 1998, Mader et al. 1991, Connor 1995). Durch einen zu späten Handschuhwechsel kann es auch auf diesem Weg zu einer inneren Belastung kommen.
Die bei der Herstellung von Zytostatika-Infusionen getragenen Handschuhe wiesen sowohl bei Zureichern als auch bei Zubereitern eine Verunreinigung mit 5-FU auf. Kontaminierte Handschuhe können durch unbedachte Handgriffe zu einer Verschleppung des Zytostatikums beitragen. Darüber hinaus bieten einige Materialien keinen geeigneten Schutz bei Kontakt mit diesen Substanzen. Dieser kann aber, aufgrund der hier erhaltenden Ergebnisse, nicht ausgeschlossen werden.

Bei allen Arbeitsschritten von der Herstellung bis zur Applikation und der Entsorgung von Zytostatika kann es nach diesen Ergebnissen im Prinzip zu einer Kontamination kommen.

# Teil B: Biologisches Belastungsmonitoring

Die Ergebnisse der Wischproben zeigten, dass an allen untersuchten Probenahmeorten mit einer Kontamination durch 5-FU gerechnet werden muss. Dabei sind nicht nur Bereiche betroffen, in denen Zytostatika-Infusionen hergestellt werden, sondern auch übrige Räume in Apotheken oder auf Stationen. Beim Umgang mit Zytostatika müssen deshalb besondere Schutz- und Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden. Durch die z.T. hohen Kontamination mit 5-FU an den untersuchten Probenahmeorten wird deutlich, dass dennoch die Gefahr einer Aufnahme von 5-FU besteht. Vor allem bei der Herstellung der Zytostatika-Infusion, der Vorbereitung zur Applikation und der Entsorgung kann es zu einer Inkorporation von Zytostatikum kommen. Erstes Ziel sollte die Beseitigung der Kontaminationen sein und die Verhinderung einer Verschleppung. Die Aufnahme der Zytostatika ist in jedem Fall zu vermeiden. Urinuntersuchungen können die innere Belastung von exponierten Personen aufzeigen. Diese Untersuchungen sollten Hinweise auf die Sicherheit der jeweilige Arbeitsweise liefern. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln, mit der $\alpha$-Fluoro-$\beta$-alanin (FBAL), der Hauptmetabolit des 5-FU, aus Urin nachgewiesen werden kann.

**Metabolismus von 5-FU**

Das Zytostatikum 5-FU wird hauptsächlich in der Leber metabolisiert. Über 80 % der Substanz wird in Form von Metaboliten eliminiert, weniger als 15 % unverändert im Urin ausgeschieden.

Bei der Metabolisierung wird 5-Fluorouracil zunächst durch Dihydropyrimidin–Dehydrogenase (DPD) zu Dihydro–5–fluorouracil reduziert (Abbildung 21). Nach Öffnung des Pyrimidinringes entstehet $\alpha$-Fluoro-$\beta$-ureido–propionsäure, woraus $\alpha$-Fluoro-$\beta$-alanin (FBAL), Ammoniak und $CO_2$ entsteht (Anderson et al. 1997, Pinedo & Peters 1988). Unter Zusatz von Ammoniak entsteht über einen anderen Abbauweg neben FBAL auch Harnstoff.

Der Hauptmetabolit FBAL sollte aus Urinproben beruflich exponierter Personen nachgewiesen werden.

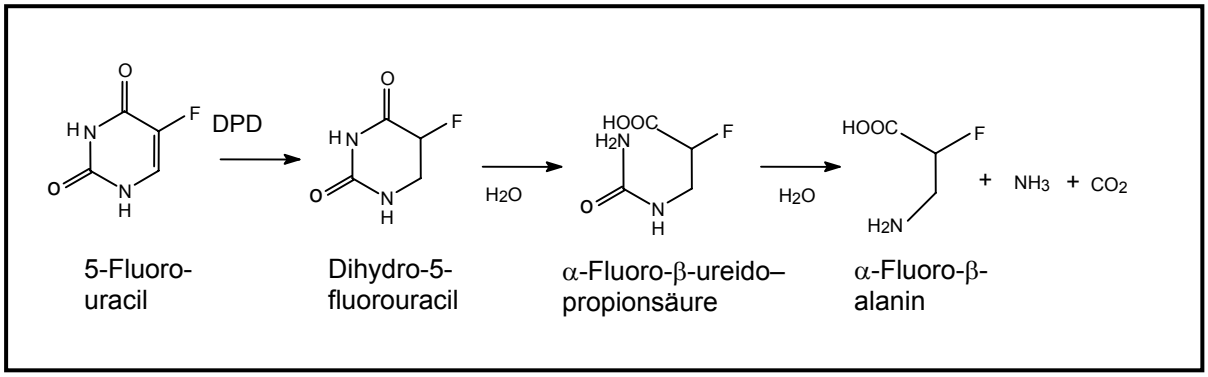


**Abbildung 21:** *Metabolisierung von 5-FU*

# B.3 Methodenentwicklung

Bis heute ist nur eine Methode beschrieben, mit der FBAL aus Urin von Zytostatika-exponierten Personen mit GC/MS nachgewiesen wurde (Sessink et al. 1994c). Die Eignung dieser Methode wurde mit FBAL-Proben (0,1 mg in 2 ml Wasser) untersucht. Diese Probenaufbereitungsmethode konnte nicht reproduziert werden, so dass für diese Fragestellung eine alternative Methode entwickelt werden musste.

## B.3.1 Löslichkeitsverhalten

Wie bereits erwähnt, sind für eine Untersuchung mit GC/MS die organischen den wässrigen Lösungsmitteln vorzuziehen (siehe 3.2.1.1). Im Gegensatz zu den Wischproben, die mit einem organischen Lösungsmittel durchgeführt werden können, muss bei dieser Methode FBAL aus der wässrigen Phase in ein organisches Lösungsmittel überführt werden.

Aminosäuren wie Alanin sind generell in unpolaren Lösungsmitteln unlöslich. In polaren organischen Lösungsmitteln sind sie schwer löslich und in Wasser löslich. Diese Eigenschaften sind auf den dipolaren Charakter der Moleküle mit basischer Amino- und saurer Carboxylgruppe zurückzuführen. Der Zusatz von Ameisensäure verbessert die Löslichkeit von Alanin in organischen Lösungsmitteln (DAB-10 Nachtrag 1992, Hagers-Handbuch 1995). Auch β-Alanin ist in Wasser leicht, in Alkohol wenig und in Ether nicht löslich (Römpp 1995). Aufgrund dieser Daten wurde

das Löslichkeitsverhalten von FBAL in Aceton, Aceton/n-Hexan, Acetonitril, Butanol, Chloroform, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, Methylenchlorid und Wasser getestet.
FBAL löst sich gut in Wasser. Nach 10 min Behandlung mit Ultraschall ist es auch in Methanol löslich. Geringe Konzentrationen FBAL sind in Acetonitril löslich. In den übrigen Lösungsmitteln ist es nicht löslich. FBAL löst sich jedoch in Methanol und Ethanol nach Zugabe von 1-2 % Ameisensäure bzw. 5 % $NH_4OH$ vollständig. Durch die Protonierung bzw. Deprotonierung der Aminosäure wird die Substanz polarer und ist damit in polaren Lösungsmitteln besser löslich.
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ammoniakalisches bzw. saures Methanol als Lösungsmittel für die Festphasenextraktion verwendet.

## B.3.2 Derivatisierung

Die Derivatisierung von FBAL ist Vorraussetzung, um die Probe anschließend mit GC/MS analysieren zu können.
Aminosäuren können zu Trimethylsilyl- (TMS) oder N-tert.-Butyl-dimethylsilyl-Verbindungen derivatisiert werden. Die N-tert.-Butyl-dimethylsilyl- sind den TMS-Derivaten vorzuziehen, da sie nach einer Elektronenionisation (EI) ein gut auswertbares Massenspektrum liefern. Dabei bilden sich $[M-57]^+$ Ionen (Halket 1993).
N-tert.-Butyl-dimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid (TBDMS) wird in der Literatur als Derivatisierungsmittel für FBAL angegeben und wurde daher für die Probenaufbereitung getestet (Thiberville et al. 1994). FBAL in Acetonitril wurde mit 200 µl TBDMS versetzt und derivatisiert (30 min, 70 °C). Anschließend wurde die Lösung unter den nachfolgenden Bedingungen gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert.

### B.3.2.1 Gaschromatographie

| | | |
|---|---|---|
| Kapillarsäule | Material: | Fused silica Kapillarsäule |
| | Stationäre Phase: | DB-5MS |
| | Länge: | 15 m |
| | Innerer Durchmesser: | 0,25 mm |
| | Filmdicke: | 0,25 µm |
| Vorsäule | Material: | Basisch deaktivierte Guard Column ID 0,32 mm, Länge 5 m |
| Temperaturen | Säule: | Stand by 1 min<br>1 min bei 100 °C, dann Anstieg mit 7,5 °C/min bis 140 °C, anschließend mit 20 °C/min bis 290 °C, 7 min bei 290 °C |
| | Injektor: | 250 °C |
| | Interface: | 300 °C |
| Trägergas | Helium, Fluß 0,8 ml/min | |
| Splitless-Zeit | 1 min | |
| Probenmenge | 2 µl | |

### B.3.2.2 Massenspektrometrie

| | |
|---|---|
| Ionisationsart: | Elektronenionisation (EI) |
| Ionisatiosenergie: | 70 eV |
| Masseneinstellung: | FBAL: 278; FPAL: 326; TFAL: 314 |
| Dwell Time: | 0,08 sec |
| Multiplier: | 500 |

Die übrigen Parameter wurden nach Herstellerangaben optimiert.

Der Molekülpeak liegt bei *m/z* 335. Theoretisch mögliche Fragmente liegen bei *m/z* 278 und 221 (Abbildung 22).

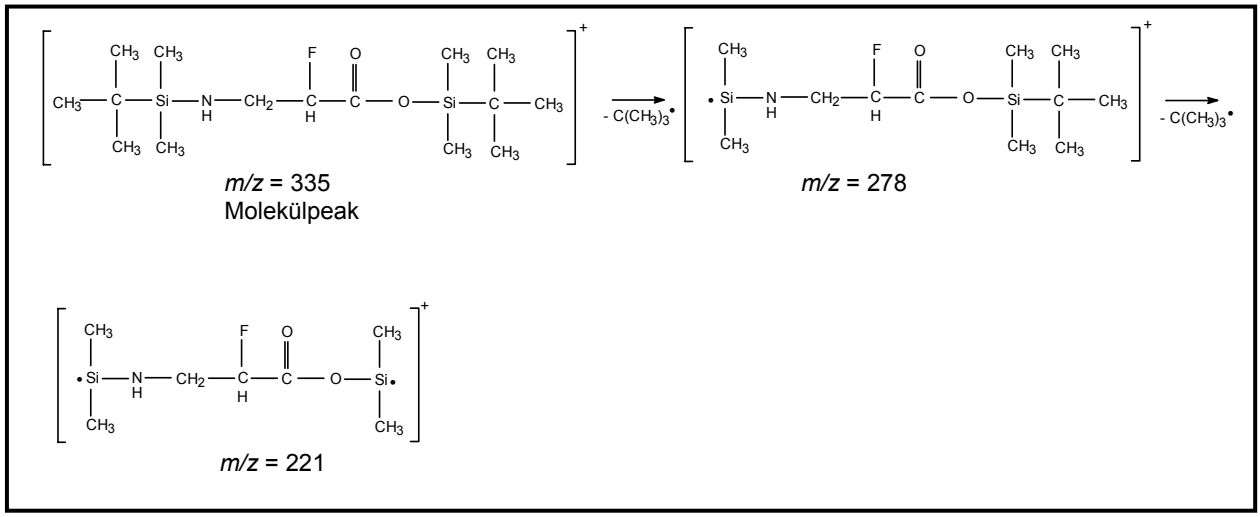


**Abbildung 22:** *Fragmentierungsschema des FBAL Derivates*

Das Chromatogramm zeigte nach 8,14 min einen deutlichen Peak. Im zugehörigen Massenspektrum wurden bei *m/z* 279, 278 und 320 Peaks gemessen. Die quantitative Bestimmung erfolgte im folgenden mit Hilfe des „Selected-Ion-Monitoring“ (SIM) auf der Masse *m/z* 278.

Um die optimalen Derivatisierungsbedingungen zu bestimmen, wurden 50 ng FBAL in 100 µl Acetonitril gelöst, mit 100 µl TBDMS versetzt und bei verschiedenen Bedingungen umgesetzt.

**Tabelle 11:** *Peakfläche (relative Einheiten) m/z 278 bei unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen*

| Derivatisierungsbedingungen | 70 °C | 80 °C | 100 °C |
|---|---|---|---|
| **15 min** | 45,3 | 41,6 | 37,5 |
| **30 min** | 42,7 | 35,1 | 40,1 |

Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, war es ausreichend, FBAL bei 70 °C 15 min zu derivatisieren. Eine Standardreihe von 1 – 100 ng FBAL wurde vermessen und ergab eine lineare Eichgerade.

Fluorphenylalanin (FPAL) und Trifluoralanin (TFAL) verhalten sich hinsichtlich ihres Löslichkeitsverhaltens ähnlich wie FBAL und lassen sich ebenso derivatisieren. Im

Massenspektrum ergeben sie ein analoges Fragmentierungsschema und wurden daher als Interne Standards eingesetzt.

## B.3.3 Urin in der Analytik

Für die Analytik ist Urin eine spezielle Matrix, da sie sehr komplex zusammengesetzt ist. Um einzelne Substanzen im Urin nachweisen zu können, müssen diese von der Matrix abgetrennt werden. In der Regel sind die Analyten nur in Spuren im Urin vorhanden. Um dennoch eine sichere Quantifizierung durchführen zu können, muss eine Konzentrierung der Proben durchgeführt werden.
Zu diesem Zweck werden in der Regel die Methoden

1. Flüssig-Flüssig Extraktion und
2. Fest-Flüssig Extraktion eingesetzt.

## B.3.4 Flüssig-Flüssig Extraktion

Bei der Flüssig-Flüssig Extraktion wird eine gelöste Substanz aus ihrem Lösungsmittel durch ein weiteres, nicht mischbares Lösungsmittel extrahiert. Vorteile sind die geringen Kosten dieser Methode. Nachteilig ist die mögliche Bildung von Emulsionen, wodurch keine scharfe Phasengrenze sichtbar und eine quantitative Abtrennung der Substanz nur schwer möglich ist. Darüber hinaus ist es schwierig das Verfahren zu automatisieren.
In der Literatur sind Methoden zur Bestimmung von Aminosäuren, die durch Flüssig–Flüssig Extraktion in die organische Phase überführt wurden, beschrieben (Halket et al. 1999, Husek 1995, Kataoka 1997, Matsumura et al. 1996).
Urinproben zur Bestimmung von FBAL aus Urin wurden zunächst, wie in der Methode von Halket und Mitarbeitern angeben, aufgearbeitet. Im Gaschromatogramm wurde kein eindeutiger Peak für das FBAL-Derivat nachgewiesen, da zahlreiche störende Signale die Auswertung erschwerten.
Daraufhin wurden die für eine Extraktion von FBAL nötigen Bedingungen ermittelt und verschiedene Lösungsmittel untersucht, um eine möglichst quantitative Überführung von FBAL aus der wässrigen Lösung in eine organische Phase zu erreichen. Damit ein eindeutiger Nachweis ohne Störsubstanzen möglich ist, wurde

FBAL zunächst nur in Wasser gelöst und extrahiert. Methanol ist zur Lösung von FBAL zwar geeignet, allerdings ist es mit Wasser mischbar, weshalb auf andere organische Lösungsmittel zurückgegriffen wurde.
Die Extraktion von 2 µg FBAL aus 2 ml Wasser pH [1-11] wurde mit verschiedenen Extraktionsmitteln durchgeführt. Die Proben wurden zweimal mit 2 ml Ethylacetat, Chloroform oder Methylenchlorid bzw. 5 ml N.-tert.-Dibutylether/Isopropanol (3:1) oder Diethylether/Ethanol (3:1) ausgeschüttelt (30 min).
Bei Verwendung von Ethylacetat oder Chloroform als organische Phase wurde kein FBAL nachgewiesen. Bei Verwendung von N.-tert.-Dibutylether/Isopropanol und Diethylether/Ethanol wurde FBAL eindeutig nachgewiesen. Ebenso war bei Verwendung von Methylenchlorid ein Nachweis von FBAL aus den Proben mit pH [1] und [10] möglich. Die Wiederfindungen lagen zwischen 1 und 30 %. Diese Ergebnisse konnten aber nicht auf Urinproben übertragen werden, da offensichtlich Substanzen mit extrahiert wurden, die im Chromatogramm zahlreiche störende Signale lieferten. FBAL kann aus Urin daher mit dieser Methode nicht eindeutig isoliert werden. Die Flüssig-Flüssig Extraktion zur Probenvorbereitung wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

## B.3.5 Fest-Flüssig Extraktion

Die Fest-Flüssig Extraktion (Solid Phase Extraction (SPE), Festphasenextraktion) ist ein physikalisches Trennungsverfahren zwischen einer festen und einer flüssigen Phase, in der die zu untersuchende Substanz gelöst ist. Die feste Phase hat dabei eine höhere Affinität zu der zu isolierenden Substanz als die flüssige Phase. Wenn die Probe über die Säule gegeben wird, wird die Substanz auf der Oberfläche der festen Phase adsorbiert, während übrige Probenbestandteile die Säule passieren. Dabei sollte eine starke, jedoch reversible Wechselwirkung mit der Oberfläche der stationären Phase stattfinden, wie hydrophobe van-der-Waals-Kräfte, polare Wasserstoffbrückenbindungen oder Ionenbindungen. Nach einigen Reinigungsschritten, durch die übrige adsorbierte Probenbestandteile von der Säule gespült werden, wird die zu untersuchende Substanz mit einem geeigneten Lösungsmittel von der Festphasenkartusche eluiert (Abbildung 23). Ziel der Festphasenextraktion ist die Isolierung der zu untersuchenden Substanz aus einem Gemisch.

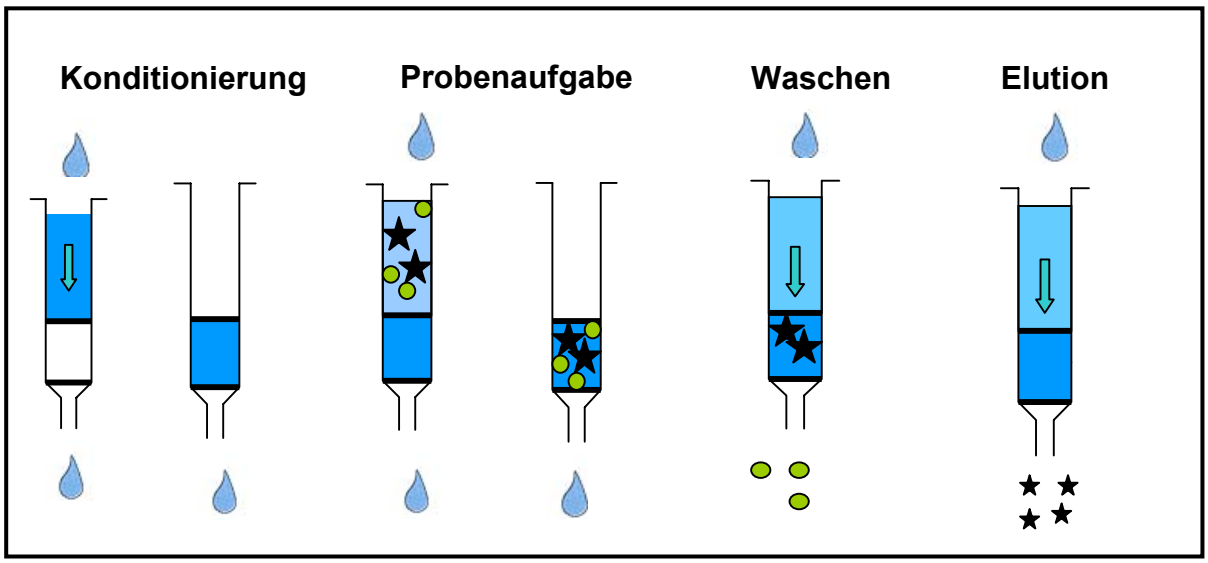


**Abbildung 23:** *Prinzip der Festphasenextraktion*

Durch die Entwicklung unterschiedlicher Säulenmaterialien (Umkehrphasen, Ionenaustauscher etc.) hat sich die Festphasenextraktion mittlerweile als eine effektive Methode zur Isolation und Aufreinigung verschiedener Substanzen etabliert. Die Vorteile der Fest-Flüssig Extraktion gegenüber der Flüssig-Flüssig Extraktion sind beispielsweise die hohe Selektivität, die durch verschiedene Solventien und Säulenmaterialien erreicht wird. Durch die Abtrennung von Verunreinigungen werden im Gaschromatogramm weniger störende Signale gemessen. Darüber hinaus bietet eine Fest-Flüssig Extraktion den Vorteil der einfachen Handhabung und die Möglichkeit, den Arbeitsablauf zu automatisieren.

### B.3.5.1 Vorversuch mit UV-Vis Spektroskopie

Die UV-Vis Spektroskopie hat gegenüber der GC/MS Vorteile, da Substanzen mit Absorption im UV-Vis Bereich auch in wässrigen Lösungen untersucht werden können und die Messung ohne zeitaufwändige Eintrocknung und Derivatisierung erfolgen kann. Die Messung dauert zudem nur einige Minuten. Um das geeignete Festphasenmaterial wählen zu können, wurden der Probendurchfluss, die Waschlösungen und das Eluat nach Passieren verschiedener Säulenmaterialien UV-Vis spektroskopisch untersucht. Zwar können mit dieser Methode nur hohe Konzentrationen der zu analysierenden Substanzen nachgewiesen werden, allerdings sollte hier nur die Eignung des Säulenmaterials getestet werden. Für die Bestimmung von FBAL aus den entsprechenden Lösungen ist die UV-Vis

Spektroskopie nicht geeignet, da FBAL unter diesen Bedingungen keine Absorption zeigt. Daher wurde eine strukturell ähnliche Vergleichssubstanz, Fluorphenylalanin (FPAL), verwendet. Das Absorptionsmaximum wurde in jedem eingesetzten Lösungsmittel bestimmt. Um beispielsweise das Absorptionsmaximum des FPAL in ammoniakalischem Methanol zu bestimmen, wurde eine Lösung der Konzentration 6 mg FPAL/ml hergestellt und ein Spektrum von 200–400 nm der Probe gegen ammoniakalisches Methanol gemessen (Abbildung 24).

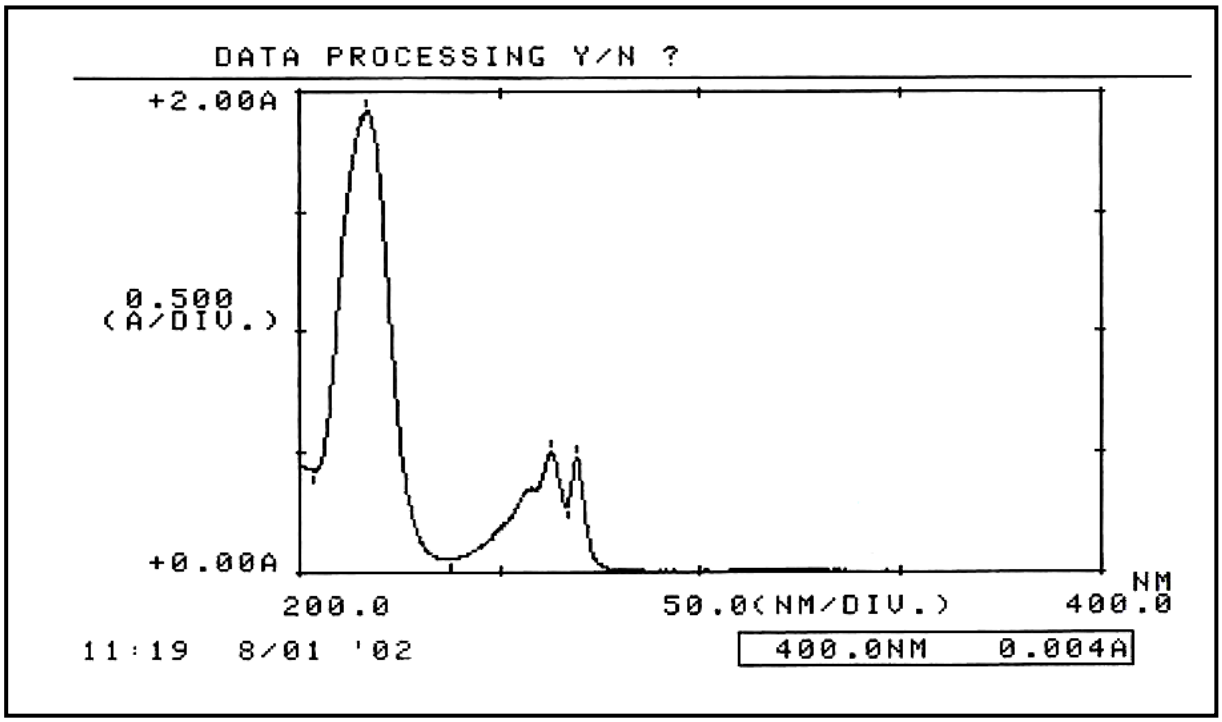


**Abbildung 24:** *UV-Vis Spektrum einer Lösung 6 mg FPAL pro ml ammoniakal. Methanol*

Das Absorptionsmaximum für FPAL in ammoniakalischem Methanol, Wasser pH [1,2] und Wasser/$NH_4OH$ liegt bei 269 nm, in Methanol bei 270 nm und in n-Hexan und Wasser/Methanol bei 271 nm. Für die Analyse von FBAL aus Urin musste das geeignete Säulenmaterial sowie Reinigungs- und Elutionslösungen gefunden werden. Daher wurden zunächst verschiedene Säulenmaterialien getestet.

### B.3.5.2 Anionenaustauscher

Aminosäuren besitzen aufgrund ihrer basischen Amino- und sauren Carboxylgruppe einen dipolaren Charakter. Durch Zugabe eines basischen Lösungsmittels werden die Aminosäuren deprotoniert und liegen als Anionen vor. Daher sollten sie über sogenannte Anionenaustauscher-Kartuschen aus Lösungen abgetrennt werden können. Die Aminosäuren werden anschließend mit einem sauren Lösungsmittel von diesen Kartuschen eluiert. In Löslichkeitsversuchen zeigte sich, dass FBAL in Methanol unter Zusatz von Säure vollständig löslich ist. Daher sollte Methanol/HCl 5 % als Elutionsmittel geeignet sein. Es wurden die Anionenaustauschersäulen Oasis® MAX, LiChrolut® SAX und LiChrolut® $NH_2$ getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12:** *Probenaufbereitungsverfahren mit Anionenaustauschern*

| Nr. | Probe | Säulentyp | Säulenkonditionierung | Waschen | Elution | Ergebnis |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 12 mg Fluorphenylalanin in 2 ml $H_2O$ (pH [12]) | Oasis® MAX 3cc, 60 mg | 2 ml Methanol, 2 ml Wasser | 2 ml Wasser/ $NH_4OH$ 2 %, 2 ml Methanol | 2 ml Methanol mit 5 % HCl (30%) | + |
| **2** | 500 ng FBAL in 2 ml Urin oder $H_2O$ (pH [11]) | Oasis® MAX 3cc, 60 mg | 2 ml Methanol, 2 ml Wasser | 2 ml Wasser/ $NH_4OH$ 2 %, 2 ml Methanol | 2 ml Methanol mit 5 % HCl (30 %) | ++ |
| **3** | 750 ng FBAL in $H_2O$ oder Urin oder 1,75 ml $H_2O$ und 0,25 ml Urin oder $H_2O$/Urin 1:1 (pH [9,5]) | LiChrolut® SAX (stark) | 2 x mit 2,5 ml Methanol, 2 x mit 2,5 ml Methanol/0,1 M Ammoniak (1:1), 2 x mit 2,5 ml 0,1 M Ammoniak | 2 ml Wasser, 2 ml n-Hexan, 100 µl Methanol | 2 x 2,5 ml HCl in Methanol (pH [1,2]) | - |
| **4** | 750 ng FBAL in $H_2O$ oder Urin bzw. 1,75 ml $H_2O$ und 0,25 ml Urin oder $H_2O$/Urin 1:1 (pH [9,5]) | LiChrolut® $NH_2$ (schwach) | 2 x mit 2,5 ml Methanol, 2 x mit 2,5 ml Methanol/0,1 M Ammoniak (1:1), 2 x mit 2,5 ml 0,1 M Ammoniak | 2 ml Wasser, 2 ml n-Hexan, 100 µl Methanol | 2 x 2,5 ml HCl in Methanol (pH [1,2]) | - |

[- = kein Nachweis von FBAL, + = Nachweis von FBAL möglich, aber Nachweisgrenze über 1 µg pro Probe (= 500 µg/l), ++ = Nachweisgrenze ≤ 1 µg pro Probe (= 500 µg/l)]

#### B.3.5.2.1 Oasis® MAX

Oasis® MAX Kartuschen besitzen eine hohe Selektivität für saure Substanzen und werden bei der Aufarbeitung von Substanzen aus Urin, Blut, Serum, Plasma und Wasser verwendet. Die Trägersubstanz besteht aus einem Gemischtphasen Polymer

mit einer Anionenaustauscherfunktion. Die starken Anionenaustauscher Eigenschaften kommen durch quartäre Aminogruppen zustande, die auf der Oberfläche eines [Poly-(divinylbenzol-co-N-vinylpyrrolidon)]-Copolymers aufgebracht sind (Abbildung 25).

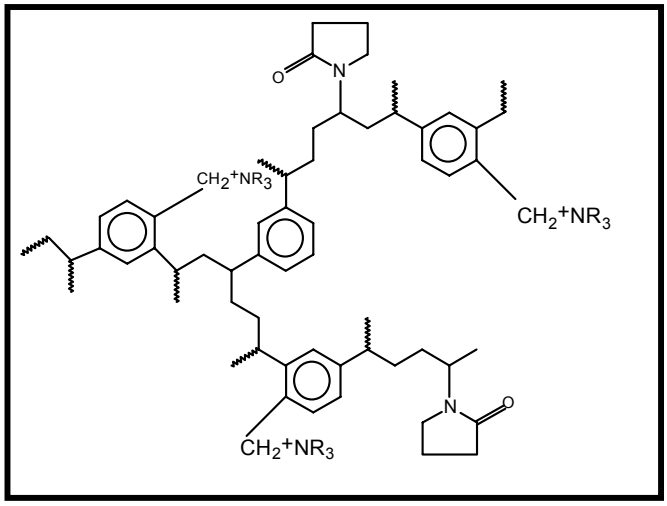


**Abbildung 25:** *Struktur des Oasis® MAX Säulenmaterials*

### Vorversuche mit UV-Vis Spektroskopie

Der Durchfluss der Probe, die Waschlösungen und das Eluat wurden im UV-Vis Spektrometer vermessen (Tabelle 12, Nr. 1). Im Probendurchfluss lässt sich eine geringe Absorption und in den Waschfraktionen keine Absorption durch FPAL messen. Das Eluat hingegen zeigt eine deutliche Absorption bei der betreffenden Wellenlänge. Die Adsorption des Probendurchflusses lässt sich durch die überschrittene Säulenkapazität erklären, da von der Firma für diesen Säulentyp 2-10 mg Gesamtsubstanz als Kapazitätsbereich angegeben werden. Diese Versuche deuten demnach darauf hin, dass FPAL an der Säule adsorbiert, durch das Waschen nicht heruntergespült und durch das Elutionsmittel wie gewünscht eluiert wird. Aus diesem Grund wurden nachfolgende Versuche mit FBAL und GC/MS durchgeführt.

**Bestimmung mit GC/MS**

Mit der in Tabelle 12, Nr. 2 beschriebenen Methode konnte FBAL aus Wasserproben nachgewiesen werden. Urinproben zeigten jedoch bei dieser Konzentration im Gaschromatogramm keinen Peak für FBAL. Versuche mit Proben geringerer FBAL Konzentrationen zeigten, dass eine Bestimmung von 300 ng FBAL pro Probe aus Wasser möglich ist.
Um herauszufinden, ob diese Methode generell für die Bestimmung von FBAL aus Urin geeignet ist, wurde der Urin eines Patienten, der eine Chemotherapie mit 5-FU erhielt, untersucht. Der Urin wurde auf pH [12,1] eingestellt und, wie in Tabelle 12, Nr. 2 beschrieben, aufgearbeitet und analysiert. Hier konnte FBAL mit GC/MS nachgewiesen werden. Mit dieser Methode ist also generell ein Nachweis von FBAL auch aus Urin mittels GC/MS möglich.
Zur genauen Bestimmung der Nachweisgrenze von FBAL aus Urin wurden Proben verschiedener FBAL Konzentrationen hergestellt und verarbeitet. Die Nachweisgrenze für diese Art der Probenaufbereitung liegt bei 1 µg FBAL pro Probe.
Durch Veränderungen der Probenaufbereitung wurde versucht, eine geringere Nachweisgrenze zu erreichen.

**Veränderung der Waschlösung**

500 ng FBAL wurden mit je 2 ml Wasser, Urin bzw. einer Mischung aus Wasser und Urin versetzt. Die Proben wurden, wie oben beschrieben (Tabelle 12, Nr. 2), aufgearbeitet, allerdings mit 2 ml Wasser/Natriumacetat pH [7] (2 %) gewaschen, was sich bei anderen Fest-Flüssig Extraktionen in dieser Arbeitsgruppe als geeignet erwiesen hatte. In keiner Probe wurde FBAL nachgewiesen. Der Einsatz von Wasser/Natriumacetat pH [7] (2 %) als Waschlösung brachte demnach keinen Vorteil in der Probenaufbereitung und wurde nicht weiter verwendet.

**Variation der Menge Elutionslösung**

Es wurden Proben der Konzentration 500 ng in 2 ml Wasser hergestellt und aufgearbeitet. Die Elution von der Säule erfolgte mit zweimal 2 ml Methanol. Die Eluate wurden getrennt aufgefangen und vermessen. Durch die Einführung des zweiten Elutionsschrittes konnte jedoch nicht mehr FBAL nachgewiesen werden.

**Alanin als Störsubstanz**

Alanin kommt im Urin in physiologischen Konzentrationen von 0 – 48 µg/ml vor (Documenta & Geigy 1960). Durch die Ähnlichkeit mit FBAL könnte es sein, dass es bei der Fest-Flüssig-Extraktion die quantitative Bestimmung von FBAL stört, beispielsweise durch Konkurrenz um Adsorptionsstellen auf der Säule. Um dies zu überprüfen, wurden 300 ng FBAL in 2 ml Wasser gelöst, mit 20 bzw. 100 µg DL-Alanin versetzt und analysiert. Die für das FBAL-Derivat gemessenen Peaks entsprechen in ihrer Größe den Peaks aus Vergleichslösungen, in denen FBAL ohne Zusatz von Alanin bestimmt wurde. Demnach sollte Alanin keinen Einfluss auf die Bestimmung von FBAL haben und kann somit als Störsubstanz ausgeschlossen werden. Nach Eintrocknung unter Stickstoff wurde der Rückstand mit Acetonitril versetzt und erwärmt (45 °C, 15 min) oder mit Ultraschall behandelt. Die Nachweisgrenze konnte dadurch jedoch nicht herabgesetzt werden.

**Centriprep®**

Durch Anwendung des Centriprepsystems sollten evtl. störende Substanzen abgetrennt werden. Das Prinzip von Centriprep® beruht auf einer zentrifugalen Filtervorrichtung, bei der eine Lösung mit Hilfe einer Zentrifuge durch einen Filter gepresst wird (Abbildung 26). Die Centriprep® Filter werden in erster Linie zur Reinigung, Aufkonzentrierung und Entsalzung von biologischen Proben angewendet.

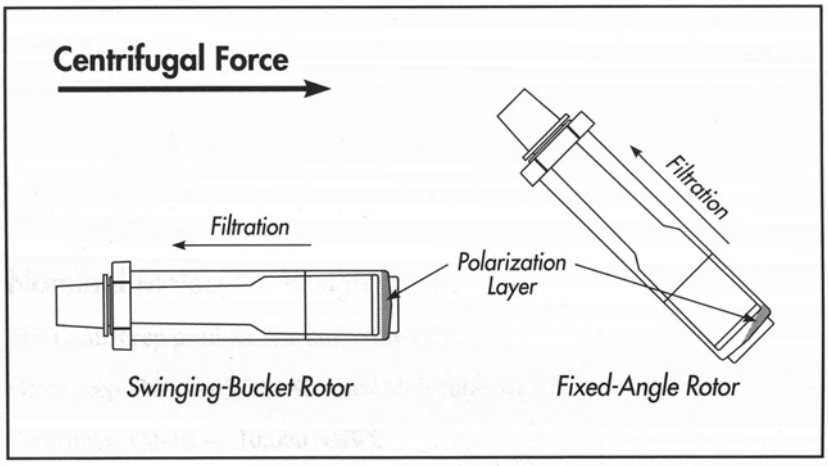


**Abbildung 26:** *Prinzip von Centriprep®*

Um zu überprüfen, ob dieses System generell zur Verbesserung der Bestimmung von FBAL aus Urin eingesetzt werden kann, wurde der Urin eines Patienten

untersucht. Dazu wurde der Urin in ein Centriprep® Röhrchen überführt, zentrifugiert (30 min, 3500 Upm) und das Filtrat analysiert. In diesen Proben konnte FBAL nachgewiesen werden. Es wurde versucht, durch den Einsatz von Centriprep® die Nachweisgrenze von FBAL in Urinproben herabzusetzen. Dazu wurden Proben der Konzentration 1,3 und 1,0 µg bzw. 666 und 130 ng pro Probe hergestellt und zentrifugiert. Nur im Filtrat der Probe mit 1,3 µg FBAL pro Probe wurde FBAL nachgewiesen, was zeigt, dass durch den Einsatz von Centriprep® die Nachweisgrenze für FBAL nicht herabgesetzt wird.

**Minisart®**

Mit Hilfe von Membranfiltern können Partikel oder Verunreinigungen aus Lösungen abgetrennt werden. Mit Hilfe dieses Filters der Porengröße 0,2 µm sollte eine Abtrennung von Urinbestandteilen, die den Nachweis von FBAL in geringen Konzentrationen stören könnten, erreicht werden.
Zu diesem Zweck wurde Urin mit 1.000 bzw. 100 ng/ml FBAL versetzt und durch einen Minisart® Filter filtriert. FBAL wurde hier nicht nachgewiesen.

Mit Oasis® MAX Kartuschen wird eine Nachweisgrenze von 1 µg FBAL pro Probe in Urin erreicht. Die erwarteten FBAL Konzentrationen im Urin exponierter Personen sind wahrscheinlich geringer. Daher wurde versucht, mit Hilfe weiterer Anionenaustauscher Kartuschen eine geringere Nachweisgrenze für FBAL zu erreichen.

### B.3.5.2.2 LiChrolut® SAX und LiChrolut® $NH_2$

Bei der Verwendung dieser Säulenmaterialien und der Art der Probenaufbereitung (Tabelle 12, Nr. 3 und 4) konnte die Nachweisgrenze für FBAL nicht herabgesetzt werden. Daher wurden sie nicht weiter für eine Bestimmung von FBAL aus Urin eingesetzt.

Durch den Einsatz von Anionenaustauschern konnte eine Nachweisgrenze von 300 ng in 2 ml Wasser und 1 µg in 2 ml Urin erreicht werden. Durch Veränderungen der Probenaufbereitung und Verwendung weiterer Kartuschen konnte die Nachweisgrenze jedoch nicht herabgesetzt werden. Es scheint daher nicht sinnvoll, mit dieser Methode ein biologisches Belastungsmonitoring durchzuführen, weshalb eine Probenaufbereitung mit Kationenaustauschern getestet wurde.

### B.3.5.3 Kationenaustauscher

Da Löslichkeitsversuche zeigten, dass FBAL in ammoniakalischem Methanol (5 %) löslich ist, sollte es auf Kationenaustauscher Kartuschen getrennt und eluiert werden können. Es wurden daher die Kationenaustauschersäulen SPEC PLUS 3 ml DAU, Oasis® MCX, Lichrolut® SCX und Bond Elut–Certify getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13:** *Probenaufbereitungsverfahren mit Kationenaustauschern*

| Nr. | Probe | Säulentyp | Säulenkonditionierung | Waschen | Elution | Ergebnis |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 100 oder 1.000 ng FBAL in 2 ml Urin oder $H_2O$ (pH [4]) Die Proben wurden mit 20 µl Glucuronidase versetzt und 1 h bei 56 °C erhitzt, mit 1 ml 0,01 % Phosphorsäure versetzt und 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert. | SPEC PLUS 3 ml DAU | 400 µl Methanol | 400 µl 0,1 M Essigsäure, 200 µl Methanol | 2 x 500 µl Methanol/ Ammoniak (9:1) | - |
| **2** | 75, 750, 1.000 und 2.000 ng FBAL in 3 ml Urin bzw. $H_2O$ (pH [1],[2]) | Oasis® MCX 3cc | entfällt | 2 ml 0,1 N HCl, 2 ml Methanol | 2 ml 5 % $NH_4OH$ in Methanol | + |
| **3** | 500 ng FBAL in 750 µl Urin (pH [7]) | LiChrolut® SCX | 3,0 ml n-Hexan, 3,0 ml Methanol 3,0 ml $H_2O$ | 2 x mit 1,5 ml Wasser | 2 x mit 1,5 ml Methanol | - |
| **4** | 6 mg FPAL in 2 ml Urin oder $H_2O$ (pH [1]) | LiChrolut® SCX | 2 x 2,5 ml Methanol 2 x 2,5 ml Methanol/0,1 M HCl 2 x 2,5 ml 0,1 M HCl | 2,5 ml $H_2O$, 2,5 ml n-Hexan | 2 x mit 2,5 ml 1 M Ammoniaklösung oder 2 % NaOH oder 2 % NaOH in Methanol oder 5 % ammoniakal. Methanol | + |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **5** | 250, 500, 750 oder 1.000 ng FBAL in 2 ml $H_2O$ (pH [1,1]) | LiChrolut® SCX | 2 x mit 2,5 ml Methanol, 2 x mit 2,5 ml Methanol/0,1 M HCl 2 x mit 2,5 ml 0,1 M HCl | 2,5 ml $H_2O$, 2 x 2,5 ml n-Hexan, im Anschluss Zentrifugation der Proben 10 min bei 3000 Upm | 2 x mit 2,5 ml ammoniakal. Diethylether / Methanol (3:1) oder 2 x 2,5 ml ammoniakal. Methanol | ++ |
| **6** | 50, 100, 200, 300 und 400 ng FBAL in 2 ml Urin (pH [3]) | HF Bond Elut – Certify, 300 mg 3 ml | 2 x mit 3 ml Methanol, 3 ml Phosphat-puffer | 3 ml Phos-phatpuffer, 3 ml n-Hexan oder 3 ml Phosphatpuf-fer, 500 µl Methanol, 1ml Essigsäure 0,1 M | 2 x 2,5 ml ammoniak. Methanol | - |
| **7** | 100 ng FBAL in 2 ml Urin (pH [2]) | HF Bond Elut – Certify, 300 mg 3 ml | 2 x 2,5 ml Methanol, 2 x 2,5 ml Methanol/0,1 M HCl, 2 x 2,5 ml 0,1 M HCl | 2,5ml Wasser 2,5ml n-Hex-an oder 2,5 ml Phosphatpuf-fer (pH [3]) einige Proben zusätzlich Methanol | 2 x 2,5 ml ammoniak. Methanol | - |

[- = kein Nachweis von FBAL, + = Nachweis von FBAL möglich, aber Nachweisgrenze über 1 µg pro Probe (= 500 µg/l), ++ = Nachweisgrenze ≤ 1 µg pro Probe (= 500 µg/l)]

### B.3.5.3.1 SPEC PLUS 3 ml DAU

Das in diesen Kartuschen verwendete Trägermaterial besteht aus einer Mischbettphase mit C18 und Kationenaustauscher-Funktion. Dabei hat das Trägermaterial auch die Funktion eines Filters. Zusätzlich ist ein inerter Vorfilter aus Glasfaser vorhanden, weshalb diese Kartuschen oft bei der Extraktion von Substanzen aus Urinproben eingesetzt werden (Szigan et al. 2001).
Diese Methode (Tabelle 13, Nr. 1) brachte im Vergleich mit den Ergebnissen der Oasis® MAX Kartuschen keinen Vorteil in Bezug auf die Nachweisgrenze. Daher wurden diese Kartuschen nicht weiter verwendet.

### B.3.5.3.2 Oasis® MCX

Die Oasis® MCX Kartuschen besitzen eine hohe Selektivität für basische Substanzen. Sie bestehen aus einem polymeren Sorbens und einer Kationenaustauscher-Funktion. Die starke Kationenaustauscher Eigenschaft kommt

durch Sulfonsäuregruppen zustande, die auf einem [Poly-(divinylbenzol-co-N-vinylpyrrolidon)]-Copolymer aufgebracht sind (Abbildung 27). Sie sind für die Aufarbeitung von Urin, Blut, Serum und Plasma geeignet.

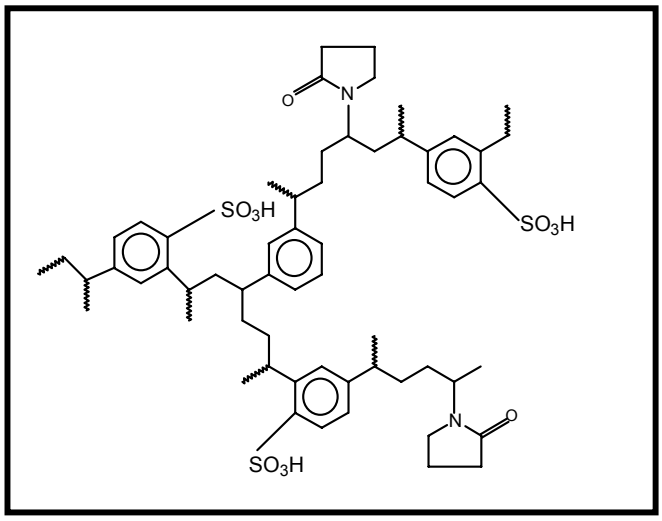


**Abbildung 27:** *Struktur des Oasis® MCX Säulenmaterials*

Bei der Bestimmung von FBAL aus Wasser konnten noch 750 ng FBAL pro Probe nachgewiesen werden. In den Urinproben wurde eine Nachweisgrenze von 1 µg pro Probe erreicht (Tabelle 13, Nr. 2).
Auch hier konnte die Nachweisgrenze von 1 µg FBAL pro Urinprobe nicht unterschritten werden, weshalb auch diese Methode nicht weiter verfolgt wurde.

### B.3.5.3.3 LiChrolut® SCX

Die LiChrolut® SCX Sorbentien bestehen aus einem Trägermaterial auf Kieselgelbasis und einem polymeren Träger.
Da nach einer Probenaufbereitung wie in Tabelle 13, Nr. 3 keine Peaks für das FBAL Derivat gemessen wurden, wurde diese Art der Probenaufbereitung ebenfalls nicht weiter verfolgt.

### Vorversuche mit UV-Vis Spektroskopie

Nach eine Probenaufbereitung wie in Tabelle 13 Nr. 4 beschrieben, wurden der Probendurchfluss, die Waschfraktionen und das Eluat UV-Vis spektrometrisch vermessen. Im Probendurchfluss wurde eine Absorption gemessen, die auch durch eine Überladung der Säule zustande kommt. Die Waschfraktionen zeigten keine Absorption. Im Eluat wurde bei allen getesteten Lösungsmitteln eine Absorption gemessen. Auch hier wird FPAL von der Säule adsorbiert, durch das Waschen nicht von der Säule desorbiert und erst durch das Elutionsmittel von der Säule eluiert.

### Versuche mit GC/MS

#### Bestimmung der geeigneten Säure zur Einstellung des pH Wertes

Für die Trennung von FBAL über einen Kationenaustauscher muss die Probe auf pH [1,1] eingestellt werden. Dazu wurden HCl (30 %) und Perchlorsäure (70 %) getestet. Die Proben, die mit Perchlorsäure versetzt wurden, ließen sich nicht unter Stickstoff eintrocknen und konnten nicht analysiert werden. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Proben mit HCl (30 %) angesäuert.

#### Bestimmung des geeigneten Elutionsmittels

Bei Verwendung der in Tabelle 13, Nr. 5 angegebenen Elutionsmittel (ammoniakalischer Diethylether/Methanol bzw. ammoniakalisches Methanol) konnte FBAL nachgewiesen werden. Die Integrale der gemessenen Peaks sind im Bereich bis 750 ng linear, wobei die Peaks der Proben, die mit Methanol eluiert wurden, im Chromatogramm eine größere Peakfläche zeigten und auch die bessere Linearität aufwiesen. Da Versuche zum Löslichkeitsverhalten von FBAL zeigten, dass es in ammoniakalischem Methanol löslich ist und auch FPAL durch dieses Lösungsmittel eluiert wird, wurde es für weitere Versuche als Elutionsmittel verwendet.

**Menge Elutionsmittel**

Um zu überprüfen, ob ein weiterer Elutionsschritt zu einer Erhöhung der Wiederfindung führt, wurden Proben der Konzentration 250 ng FBAL in 2 ml Wasser ein- oder zweimal mit 5 ml ammoniakalischem Methanol eluiert. Hierbei wurde im zweiten Elutat kein FBAL nachgewiesen. Nach diesen Ergebnissen ist für die Elution von FBAL von den LiChrolut® SCX Säulen 5 ml ammoniakalisches Methanol (5 %) ausreichend.

**Bestimmung der geeigneten Waschlösungen**

Um die geeignete Waschlösung zu finden, wurden Proben der Konzentration 250 ng FBAL in 2 ml Urin oder Wasser mit folgenden Waschlösungen gewaschen: Wasser, Phosphatpuffer pH [5], Wasser und n-Hexan, Wasser/Acetonitril, Wasser/Ethylacetat, n-Hexan, Ethylacetat, Ethanol (96 %) und HCl / Methanol. Die Ergebnisse zeigen, dass für eine Probenaufbereitung der Waschschritt mit einem wässrigen Lösungsmittel unerlässlich ist. Die größten Peakflächen erhielt man bei der Verwendung von Wasser und n-Hexan als Waschlösung, weshalb es für die Probenaufbereitung verwendet wurde.

**Bestimmung von FBAL aus Urin eines Patienten**

Die Effektivität dieser Methode wurde mit einer Urinprobe eines Patienten getestet. Dazu wurde der Urin, wie in Tabelle 13, Nr. 5 beschrieben, aufgearbeitet und analysiert (Elution mit 5 ml ammoniakalischem Methanol). In diesen Proben ist FBAL deutlich nachweisbar, weshalb diese Methode generell für die Bestimmung von FBAL aus Urin geeignet ist.

**Quantitativer Nachweis von FBAL aus Urinproben**

Urinproben einer FBAL Konzentration von 250, 500, 1.000 und 2.000 ng / 2ml zeigten im Chromtatogramm eine lineare Zunahme der Peakflächen. Mit dieser Methode (Tabelle 13, Nr. 5, Elutionsmittel: ammoniakal. Methanol) lassen sich demnach noch 250 ng FBAL pro Urinprobe (125 µg/l) nachweisen. Es wurden 14

Urinproben von Beschäftigten vor und nach der Zubereitung von Zytostatika-Infusionen untersucht. Es wurde in keiner der Proben FBAL nachgewiesen.

Um zu testen, ob andere Kartuschen die Nachweisgrenze herabsetzen können, wurden folgende Kartuschen für die Probenaufarbeitung verwendet.

#### B.3.5.3.4 Bond Elut – Certify

Bond Elut – Certify Kartuschen sind Mischphasen-Kartuschen, die bei der Extraktion von basischen (kationischen) Substanzen aus Urin, Blut und Serum eingesetzt werden. Das Trägermaterial dieser Kartusche besteht aus einem nicht polaren C8 (Octly-) Sorbens und einem starken Kationenaustauscher (Benzolsulfonsäure).
Mit dieser Art der Probenaufbereitung (Tabelle 13, Nr. 6 und 7) lassen sich die eingesetzten Konzentrationen FBAL nicht nachweisen und damit die erreichte Nachweisgrenze von 125 µg/l Urin nicht herabsetzen.

Durch den Einsatz von Kationenaustauschern bei der Bestimmung von FBAL aus Urin wurde eine Nachweisgrenze von 125 µg/l Urin erreicht. Diese konnte durch Veränderungen in der Probenaufbereitung und Verwendung weiterer Kartuschen nicht herabgesetzt werden. Diese Art der Probenaufbereitung ist dennoch sensitiver als die der Anionenaustauscher. Mit Kationenaustauschern wurden 14 Urinproben von Personen, die Zytostatika-Infusionen herstellten, untersucht. Es konnte in keiner der Proben FBAL nachgewiesen werden. Zur Bestimmung von FBAL aus dem Urin von gegenüber 5-FU exponierten Personen scheint es sinnvoll, mit einer Methode zu arbeiten, mit der FBAL Konzentrationen auch im Bereich weniger ng pro Probe bestimmt werden können. Daher wurden weitere Säulenmaterialien getestet.

### B.3.5.4 Weitere Säulenmaterialien

Neben der Trennung von Substanzen aus Gemischen mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen besteht unter anderem die Möglichkeit, mit sogenannten C18 Säulen Substanzen zu trennen, bei denen unpolare van-der-Waals-

Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffresten der funktionellen Gruppen des Sorbens und dem Analyten auftreten. Die Säulen besitzen im Gegensatz zu Ionenaustauschersäulen eine geringe Selektivität, da sie über Alkylreste unpolare Substanzen anreichern. Es wurden Bond Elut C18, Separtis ENV+ und Oasis® HLB Säulenmaterialien getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14***: Probenaufbereitungsverfahren mit weiteren Festphasensäulen*

| Nr. | Probe | Säulentyp | Säulenkonditionierung | Waschen | Elution | Ergebnis |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 25 und 250 ng FBAL in 2 ml Urin oder $H_2O$ (pH [4 oder 5]) | Bond Elut C18 | 2 x 2,0 ml Methanol, 2 x 2,0 ml Wasser | 2 ml Phosphatpuffer (pH [4]) oder 2 ml Phosphatpuffer (pH [5]) oder 2 ml Phosphatpuffer (pH [6]) oder 2 ml Phosphatpuffer (pH [8]) (alle Puffer 50 mM) | 2 x mit 2,0 ml Methanol | - |
| **2** | 500 ng FBAL in 2 ml Urin oder $H_2O$ (pH [12]) Die Proben wurden 1:1 mit Methanol versetzt. | Separtis ENV+ 100 mg 3 ml | 2 ml Methanol, 2 ml 0,1 M $NH_4OH$ | 2 ml Chloroform | 2 ml Methanol/ 5 % HCl (30 %) | + |
| **3** | 5 mg FPAL in 2,5 ml Phosphatpuffer (pH [1, 3, 5, 7, 9, 10]) | Oasis® HLB 3cc | 2 ml Methanol, 2 ml Wasser | 2 ml 5 % Methanol in Wasser | 2 ml Methanol | - |
| **4** | 500 ng FBAL in 2,5 ml Puffer (pH [1, 5, 7, 10]) | Oasis® HLB 3cc | 2 ml Methanol, 2 ml Wasser | 2 ml 5 % Methanol in Wasser oder der Waschschritt wurde ausgelassen | 2 ml Methanol | - |
| **5** | 500 ng FBAL in 2,5 ml Puffer (pH [4, 5, 6, 7]) | Oasis® HLB 3cc | 2 ml Methanol, 2 ml Wasser | entfällt | 2 ml Methanol | + |
| **6** | 500 ng FBAL in 2 ml Wasser oder Urin (pH [5]) | Oasis® HLB 3cc | 2 ml Methanol, 2 ml Wasser | 2 ml 5 % Methanol in Wasser oder 2 ml 5 % Methanol in Wasser (pH [8]) | 2 ml Methanol | - |

[- = kein Nachweis von FBAL, + = Nachweis von FBAL möglich, aber Nachweisgrenze über 1 µg pro Probe (= 500 µg/l), ++ = Nachweisgrenze ≤ 1 µg pro Probe (= 500 µg/l)]

### B.3.5.4.1 Bond Elut C18

Bond Elut C18 Säulen enthalten ein hydrophobes, auf Silica basierendes Trägermaterial (Abbildung 28). Dieses besitzt eine scheinbar geringe Selektivität, da es über die funktionelle Gruppe nahezu alle unpolaren Substanzen anreichert.

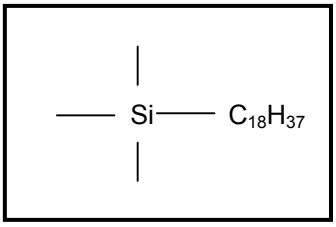


**Abbildung 28:** *Struktur des Bond Elut C18 Säulenmaterials*

Es konnte kein FBAL nachgewiesen werden (Tabelle 14, Nr. 1), da es anscheinend zu polar ist, um über C18 Säulen getrennt werden zu können.

### B.3.5.4.2 ISOLUTE ENV+

Mit ISOLUTE ENV+ Säulen werden im Gegensatz zu den vorherigen Säulen auch polare Substanzen aus wässrigen Lösungen extrahiert. Das Trägermaterial ist ein „hyper cross-linked“ hydroxyliertes Polystyrendivinylbenzol Copolymer (Abbildung 29).

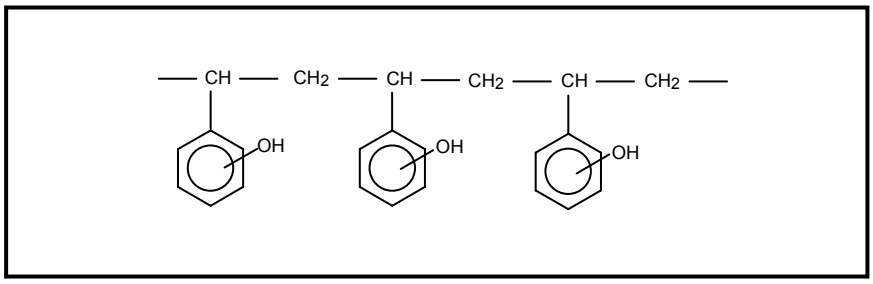


**Abbildung 29:** *Struktur des ISOLUTE ENV+ Säulenmaterials*

Im Chromatogramm der Wasser- und Urinproben wurde FBAL nachgewiesen (Tabelle 14, Nr. 2). Allerdings sind diese Resultate nicht reproduzierbar, so dass das Säulenmaterial nicht für weitere Bestimmungen verwendet wurde.

### B.3.5.4.3 Oasis® HLB

Mit Oasis® HLB Kartuschen wird ein breites Spektrum polarer und nicht-polarer Substanzen adsorbiert. Das Trägermaterial besteht aus einem makroporösen Copoylmer, das aus zwei monomeren Komponenten, dem lipophilen Divinylbenzol und dem hydrophilen N-Vinylpyrrolidin, aufgebaut ist. Die beiden Monomere liegen in einer „Hydrophilen-Lipophilen-Balance“ (HLB) vor (Abbildung 30).

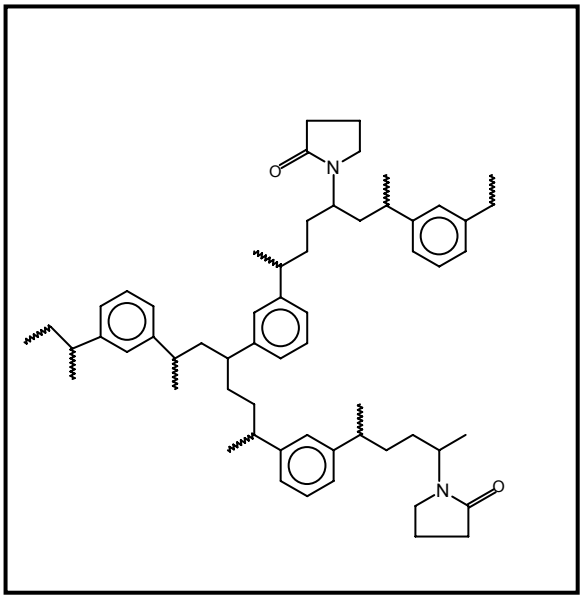


**Abbildung 30:** *Struktur des Oasis® HLB Trägermaterials*

#### Vorversuche mit UV-Vis Spektroskopie

Die Säulen wurden, wie in Tabelle 14, Nr. 3 beschrieben, behandelt. Es wurden der Probendurchfluss nach Beladung der Säule, die Waschfraktionen und das Elutat vermessen. Sowohl im Probendurchfluss, als auch in den Waschfraktionen wurde FPAL nachgewiesen. Offensichtlich eluiert FPAL mit der Waschlösung bzw. adsorbiert schlecht an der Säule. In der Eluatfraktion wurde kein FPAL nachgewiesen.

#### Messungen mit GC/MS

Zur genaueren Bestimmung von FBAL aus Urin wurden anhand dieser Ergebnisse der Vorversuche weitere Probenaufbereitungen getestet (Tabelle 14, Nr. 4 und 5). Die Proben, die mit einer Methanol/Wasser Lösung gewaschen wurden,

zeigten keine Peaks bei der erwarteten Retentionszeit. Nach einer Probenaufbereitung ohne Waschschritt wurde FBAL im Gaschromatogramm nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass beim Waschen ein Teil des FBAL heruntergespült wird. Bei Urinproben kann wegen der Vielzahl möglicher Störsubstanzen der Waschschritt nicht weggelassen werden. Der Probenverlust, der dadurch zustande kommt, ist allerdings inakzeptabel. Es wurde deshalb versucht, durch Variation der Waschlösung ein vorzeitiges Eluieren von FBAL zu verhindern (Tabelle 14, Nr. 6), was jedoch nicht erfolgreich war.

Die oben getesteten Säulen sind im Vergleich zu den Ionenaustauschersäulen nicht geeignet, um eine Trennung des FBAL aus Urin vorzunehmen und wurden deshalb nicht weiter verwendet.

### B.3. 5. 4 GC-MS Aminosäure Testkit (EZ: faast®)

Seit Sommer 2002 ist von der Firma phenomenex® ein „Kit“ zur Bestimmung von Aminosäuren aus Urinproben mittels GC/MS erhältlich. Hierbei erfolgt die Probenaufbereitung ebenfalls durch eine Festphasenextraktion. Die verwendeten Lösungen und Säulenmaterialien sind dabei nicht bekannt, da das Verfahren patentrechtlich geschützt ist. Vorversuche mit dem Patientenurin zeigten, dass ein Nachweis von FBAL aus Urinproben generell möglich ist. Mit diesem „Kit“ wurde eine Nachweisgrenze von 100 µg FBAL pro Liter Urin erreicht. Deshalb wurden ebenfalls 14 Urinproben von Beschäftigten vor und nach der Zubereitung von Zytostatika-Infusionen untersucht (siehe Seite 66). In allen Proben wurde kein FBAL nachgewiesen, da die Konzentration FBAL im Urin der Probanden wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze lag.

# B.4. Diskussion der Methode

Aminosäuren werden aus Körperflüssigkeiten mittels HPLC und GC/MS nachgewiesen. Dabei können mit HPLC noch bis zu 450 µg/l nachgewiesen werden (Heggie et al. 1987: Fekkes et al. 2000). Eine beschriebene Methode erreicht mit GC/MS eine Nachweisgrenze von 500 µg/l (Namera et al. 2002). Bei der Verwendung anderer Detektionssysteme können auch niedrigere Nachweisgrenzen von z.B. 11 µg/l erreicht werden (Kataoka et al. 1997). Mit Hilfe verschiedener Extraktionsverfahren und Probenaufbereitungen sollte hier eine Möglichkeit gefunden werden, FBAL aus Urin für die GC/MS zu extrahieren und in möglichst geringen Konzentrationen nachzuweisen.

Die Ergebnisse des Umgebungsmonitorings (siehe 4.3) zeigten Kontaminationen im Bereich weniger Nanogramm, so dass die Konzentrationen an FBAL in Urinproben Zytostatika-exponierter Personen nicht sehr hoch sein dürfte. Deshalb ist ein sensitiver Nachweis von FBAL aus Urin für diese Problemstellung anzustreben. Im Gegensatz zu Wischproben, bei denen die Probenahme mit einem organischen Lösungsmittel erfolgt, muss der Metabolit FBAL zunächst aus der komplex zusammengesetzten Matrix Urin abgetrennt und für die Analyse vorbereitet werden. In der Literatur wurde lediglich eine Methode beschrieben, mit der FBAL aus Urin in Konzentrationen von 60 µg/l nachgewiesen wurde (Sessink et al. 1994c). Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht mit der beschriebenen Probenaufbereitung reproduzieren. Daher wurde versucht, mit den zur Verfügung stehenden Mitteln eine neue Aufreinigung und Analyse von Urinproben zu entwickeln, die an GC/MS adaptierbar ist. Hierzu muss FBAL aus einem wässrigen in ein organisches Lösungsmittel überführt werden. Zunächst wurde die Flüssig-Flüssig Extraktion getestet, die aber unter anderem aufgrund der Bildung von Emulsionen nicht zu einem quantitativen Nachweis von FBAL führte. Außerdem ist diese Methode nicht automatisierbar und sehr zeitaufwändig. Versuche zeigten, dass durch diese Methode FBAL nicht sauber extrahiert wird und zudem Chromatogramme mit störenden Signalen erhalten werden.

Die Fest-Flüssig Extraktion bietet hingegen durch die Entwicklung unterschiedlicher Säulenmaterialien eine hohe Selektivität zur Trennung unterschiedlicher Substanzen. Es wurden daher Trägermaterialien mit Anionen- und Kationenaustauscherfunktionen, polaren und unpolaren Wechselwirkungen sowie ein

kommerziell erhältlicher Analysekit getestet. Bei der Verwendung von Anionenaustauschern wurden 500 µg FBAL pro Liter Urin nachgewiesen. Durch Einsatz von Kationenaustauscher-Kartuschen wurde für Urinproben eine Nachweisgrenze von 125 µg/l Urin erreicht. Die Wiederfindung betrug ca. 20 %. In Anbetracht der Komplexität des Verfahrens ist diese Wiederfindung durchaus akzeptabel. Mit dem kommerziell erhältlichen Analysekit wurde eine nur unwesentlich geringere Nachweisgrenze von 100 µg/l erreicht. Neben den mit FBAL versetzten Urinproben wurde als Positivkontrolle der Urin eines Patienten untersucht, der eine Chemotherapie mit 5-FU erhielt. Mit diesen Urinproben wurde die prinzipielle Durchführbarkeit der Methoden mit Anionen- und Kationenaustauschern sowie dem Analysekit zur Probenaufarbeitung bestätigt. Im Urin von Beschäftigten einer Zytostatikazubereitungsabteilung wurde jedoch kein FBAL nachgewiesen, da die Konzentrationen unterhalb dieser Nachweisgrenzen lagen.

# 6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine flächendeckende Untersuchung der Kontaminationssituation mit 5-FU in Apotheken und Stationen untersucht. Dazu wurde ein „Wischprobenkit“ entwickelt, das die für die Probenahme benötigten Utensilien sowie eine genaue Anleitung zur Probenahme enthält und an Apotheken und Stationen verschickt werden kann. Die Probenahme kann somit durch die Mitarbeiter(innen) durchgeführt werden. Die Proben werden anschließend an das Labor geschickt und dort aufgearbeitet. Durch dieses standardisierte Verfahren können Wischproben aus Apotheken und Stationen in ganz Deutschland untersucht werden. Dieser „Kit“ wird auch weiterhin versendet, da besonders in den Apotheken ein großes Interesse an der Durchführung von Wischproben besteht. Ebenso interessant ist es die Kontaminationssituation in ambulanten Praxen zu untersuchen. Darüber hinaus kann mit dieser Methode auch ein Umgebungsmonitoring in der häuslichen Umgebung der Patienten durchgeführt werden.

Zusätzlich zu einem Umgebungsmonitoring kann die Effektivität der Schutzmaßnahmen und Sicherheitssysteme durch ein biologisches Belastungsmonitoring beurteilt werden. In dieser Arbeit wurde mit einer Fest-Flüssig-Probenaufbereitung mit Kationenaustauschern mittels GC/MS eine Nachweisgrenze von 125 µg FBAL pro Liter Urin erreicht. Durch die Anwendung eines kommerziell erhältlichen „Kits“ zur Bestimmung von Aminosäuren aus Urin lassen sich noch 100 µg/l nachweisen. Eine Untersuchung von Urinproben von Apothekenpersonal einer Zytostatikazubereitungsabteilung ist mit diesen Methoden nur eingeschränkt möglich, da mit den erreichten Nachweisgrenzen nur sehr hohe Kontaminationen aufgedeckt werden können. Ziel weiterer Arbeiten muss es daher sein, ein sensitiveres Nachweisverfahren zu entwickeln. Allerdings könnte die hier entwickelte Methode bei der Bestimmung geringer Mengen FBAL aus Urin von Patienten eingesetzt werden, um die Eliminierungszeit der Substanz genauer beschreiben zu können.

# 7. Zusammenfassung

Das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) wird bei der Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt, wobei es wegen seiner geringen therapeutischen Breite für die Patienten individuell vor der Applikation dosiert werden muss. Da Zytostatika nicht selektiv Wachstum und Teilung der Tumorzellen beeinflussen, sind diese Wirkstoffe für Personen mit beruflichem Umgang Gefahrstoffe. Durch Wischproben wurden Kontaminationen mit 5-FU in Apotheken und auf Stationen aufgezeigt. Die anschließende Beseitigung der Kontamination mindert das Risiko einer möglichen Inkorporation von 5-FU beim täglichen Arbeitsablauf. Die Konzentrationen des Zytostatikums wurden mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) bestimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Aufbereitung der Wischproben ermöglicht erstmals den Nachweis von 1 ng 5-FU pro Probe. Es wurden Proben in 37 Apotheken, zwei onkologischen Praxen und auf zwölf Stationen genommen. Für die Probenahme wurden in den Apotheken zwölf verschiedene Orte innerhalb des Herstellungsprozesses ausgewählt, wie z.B. Lager, Arbeitsflächen, Böden, Verpackungsplätze und Büroräume. Insgesamt wurde bei 57 % der Proben eine Belastung mit 5-FU gemessen. Überraschenderweise wurde in den Lagern eine hohe Kontamination mit 5-FU festgestellt, was vermuten lässt, dass die Apotheken mit bereits kontaminierten Flaschen von den jeweiligen Firmen beliefert werden. Wischproben an 105 Vorratsgefäßen zeigten nahezu zu 100 % Kontaminationen mit 5-FU. In den übrigen Bereichen konnten ebenfalls Kontaminationen mit 5-FU nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass 5-FU durch den gesamten Arbeitsprozess verschleppt werden kann und auch Bereiche außerhalb der Herstellungsräume betroffen sein können. Es wurde gezeigt, dass durch die Umstellung der Arbeitsweise Kontaminationen vermieden werden können. Die Sauberkeit des Arbeitsablaufes sollte jedoch regelmäßig durch Wischproben untersucht werden. Probenahmen auf Stationen zeigten, dass Stationen mit eigener Herstellung höher belastet waren als Stationen, die mit Zytostatika-Infusionen durch die Apotheke beliefert wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten einige Stationen auf eine Belieferung von Zytostatika-Infusionen durch die Apotheke um. In beiden Gruppen wurden jedoch hohe Verunreinigungen an Infusionsständern und Infusomaten gemessen. Diese stellen demnach auch eine Quelle für Verschleppungen dar.

Ergänzend zu Wischproben kann die Sicherheit eines Arbeitsablaufes mit einem biologischen Belastungsmonitoring untersucht werden. Mit der hier entwickelten Methode lassen sich 125 µg FBAL pro Liter Urin und mit einem kommerziell erhältlichen „Kit“ noch 100 µg/l nachweisen. In 14 untersuchten Urinproben von Beschäftigten einer Zytostatika-Abteilung wurde FBAL nicht nachgewiesen. Ob diese Methode für eine Routinekontrolle geeignet ist, wird durch weitere Arbeiten zu klären sein.

# 8. Literatur

ADKA Ausschuss für Arzneimittelherstellung und Analytik. 1998. Eigenherstellung in Krankenhausapotheken. *Krankenhauspharmazie* 6: 301-3

Anderson D, Kerr DJ, Blesing C, Seymour LW. 1997. Simultaneous gas chromatographic-mass spectrophotometric determination of alpha-fluoro-beta-alanine and 5-fluorouracil in plasma. *Journal of Chromatography B* 688: 87-93

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. 2002. Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends.

Connor TH. 1995. Permeability testing of glove materials for use with cancer chemotherapy drugs. *Oncology* 52: 256-9

Connor TH, Anderson RW, Sessink PJ, Broadfield L, Power LA. 1999. Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. *American Journal of Health-System Pharmacy* 56: 1427-32

DAB 10. Nachtrag 1992. *Alanin*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Delporte JP, Chenoix P, Hubert PH. 1999. Chemical contamination of the primary packaging of 5-fluorouracil RTU solutions commercially avaible on the belgian market. *EHP* 5: 119-21

DeMeo MP, Merono S, DeBaille AD, Botta A, Laget M, Guiraud H, Dumenil G. 1995. Monitoring exposure of hospital personnel handling cytostatic drugs and contaminated materials. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 66: 363-8

Deutsche Forschungsgemeinschaft. 2001. *MAK-und BAT Werte Liste 2001*: Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim: 131

Documenta, Geigy. 1960. *Wissenschaftliche Tabellen*: J. R. Geigy A.G., Schweiz: 497-505

Ensslin A, Huber R, Pethran A, Römmelt H, Schierl R, Kulka U. 1997. Biological monitoring of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs: urinary excretion and cytogenetics studies. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 70: 205-8

Ensslin A, Pethran A, Schierl R, Fruhmann G. 1994a. Urinary platinum of hospital personnel occupationally exposed to platinum containing antineoplastic drugs. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 58: 339-42

Ensslin A, Stoll Y, Pethran A, Pfaller A, Römmelt H, Fruhmann G. 1994b. Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Occupational and Environmental Medicine* 51: 229-33

Europäisches Arzneibuch. 1997. Alanin, 5-Fluorouracil: Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

Falck K, Grohn P, Sorsa M, Vainio H, Heinonen E, Holsti LR. 1979. Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet* 1: 1250-1

Fekkes D, Voskuilen-Kooyman A, Jankie R, Huijmans J. 2000. Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 744: 183-8

Floridia L, Pietropaolo AM, Tavazzani M, Rubino FM, Colombi A. 1999. Measurement of surface contamination from nucleoside analogue antineoplastic drugs by high-performance liquid chromatography in occupational hygiene studies of oncologic hospital departments. *Journal of Chromatograhy B: Biomedical Sciences and Applications* 724: 325-34

Goloni-Bertollo EM, Tajara EH, Manzato AJ, Varella-Garcia M. 1992. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. *International Journal of Cancer* 50: 341-4

Gross ER, Groce DF. 1998. An evaluation of nitrile gloves as an alternative to natural rubber latex for handling chemotherapeutic agents. *J Oncol Pharm Practice* 4: 165-8

Hagers Handbuch. 1995. *Hagers Handbuch für die pharmazeutische Praxis*: Springer Verlag: FBAL 90-91, 5-FU 258-262

Halket J. 1993. Derivates for Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In *Handbook of Derivatives for Chromatography,* ed. K Blau, J Halket, John Wiley & Sons: 297-326

Halket JM, Przyborowska A, Stein SE, Mallard WG, Down S, Chalmers RA. 1999. Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids--potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13: 279-84

Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. 1987. Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and its Metabolites in Plasma, Urine and Bile. *Cancer Research* 47: 2203-6

Hepp R, Gentschew G. 1998. Untersuchung zur Außenkontamination der Primärverpackung von Zytostatika. *Krankenhauspharmazie 19 (1)*: 22-7

Hessel H, Radon K, Pethran A, Maisch B, Gröbmair S, Sauter I, Fruhmann G. 2001. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs-evaluation by the micronucleus assay. *Mutation Research* 497: 101-9

Husek P. 1995. Simultaneous profile analysis of plasma amino and organic acids by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 669: 352-7

Jung D, Krämer I, Kreiner C, Queisser-Luft A, Konietzko J. 2001. Zytostatika Zubereitung an Sicherheitswerkbänken, Auswirkungen auf Schwangerschaftsverlauf und Nachkommenschaft von Apothekenpersonal. *Krankenhauspharmazie* 22 (1): 3-10

Kataoka H. 1997. Selective and Sensitive Determination of Protein and Non- Protein Amino Acids by Capillary Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Selective Detection. *Biomedical Chromatography* 11: 154-9

Kataoka H, Matsumura S, Makita M. 1997. Determination of amino acids in biological fluids by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus selective detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 1271-9

Kittlaus W. 2001. Entwicklung einer bruchresistenten Verpackung für Zytostatikavials. *Krankenhauspharmazie* 22 (9): 425-6

Kubo M, Sasabe H, Shimizu T. 1991. Highly sensitive method for the determination of 5-fluorouracil in biological samples in the presence of 2'-desoxy-5-fluorouridine by gaschromatography-massspectrometry. *Journal of Chromatograhy B: Biomedical Sciences and Applications* 564: 137-45

Mader RM, Rizovski B, Steger GG, Moser K, Rainer H, Dittrich C. 1991. Permeability of latex membranes to anticancer drugs. *International Journal of Phamaceutics* 68: 151-6

Matsumura S, Kataoka H, Makita M. 1996. Determination of amino acids in human serum by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B* 681: 375-80

Micoli G, Turci R, Arpellini M, Minoia C. 2001. Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatograhy B: Biomedical Sciences and Applications* 750: 25-32

Molls M. 1999. Prinzipien der Strahlentherapie. In *Kompendium Internistische Onkologie*, ed. H-J Schmoll, K Höffken, K Possinger: Springer Verlag: 299-304

Namera A, Yashiki M, Nishida M, Kojima T. 2002. Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatograhy B* 776: 49-55

Nies E, Roller M. 2001. *Krebsrisiko durch beruflichen Umgang mit Zytostatika-quantitative Betrachtung*: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften

Oehme M. 1996. Möglichkeiten und Grenzen der GC/MS. In *Praktische Einführung in die GC/MS Analytik mit Quadrupolen*: Hüthig GbmH, Heidelberg: 11-18

Paul H, Baumann L, Artelt S, Kock H. 1998. Umgebungskontrolle auf Kontamination mit Zytostatika, Nachweis von Platin auf Oberflächen in Räumlichkeiten mit zentraler Zytostatikaherstellung. *Krankenhauspharmazie* 19 (4): 181-186

Pethran A. 1999. *Untersuchung einer möglichen Gesundheitsgefährdung durch berufliche Exposition gegenüber Zytostatika, Schlußbericht*

Pethran A, Schierl R, Schmaus G. 2001. Wischproben an Arbeitsplätzen mit Zystostatika Exposition. *Krankenhauspharmazie* 22 (1): 11-5

Pilger A, Kohler I, Stettner H, Mader RM, Rizovski B, Terkola R, Diem E, Franz-Hainzel E, Konnaris C, Valic E, Rudiger HW. 2000. Long-term monitoring of sister chromatid exchanges and micronucleus frequencies in pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 73: 442-8

Pinedo HM, Peters G. 1988. Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology. *Journal of Clinical Oncology* 6: 1653-1664

Poyen D, De Meo MP, Botta A, Gouvernet J, Dumenil G. 1988. Handling of cytostatic drugs and urine mutagenesis. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 61: 183-8

Römpp. 1995. *Römpp Chemie Lexikon*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 5-Fluorouracil, β-Alanin

Rote Liste. 2002. *Rote Liste 2002, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland*: Rote Liste Service GmbH, Frankfurt a.M.

Roth S, Norppa H, Jarventaus H, Kyyronen P, Ahonen M, Lekomaki I, Sainio H, Sorsa M. 1994. Analysis of chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutation Research* 325: 157-62

Rücker, Neugebauer, Willems. 1992. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 239-296

Schmaus G, Schierl R, Funck S. 2002. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography mass spectrometry and voltammetry. *American Journal of Health-System Pharmacy* 59: 956-61

Selevan SG, Lindbohm ML, Hornung RW, Hemminki K. 1985. A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. *New England Journal of Medicine* 313: 1173-8

Sessink P, Kerkhof M, van der Anzion R, Noordhoek J, Bos R. 1994a. Environmental Contamination and Assessment of Exposure to Antineoplastic Agents by Determination of Cyclophosphamide in Urine of Exposed Pharmacy Technicians: Is Skin Absorption an Important Exposure Route? *Archives of Environmental Health* 49 (3): 165-9

Sessink PJM, Anzion RB, van den Broek PHH, Bos RP. 1992a. Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department. *Pharmaceutisch Weekblad (Scientific edition),* 14: 16-22

Sessink PJM, Boer KA, Scheefhals APH, Anzion RBM, Boss RP. 1992b. Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. *International Archives of Occupational and Environmental Health*: 105-12

Sessink PJM, van de Kerkhof MCA, Anzion RBM, Noordhoek J, Bos RP. 1994b. Enviromental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? *Archives of Environmental Health 49*: 165-9

Sessink PJM, Timmersmans JL, Anzion RBM, Bos RP. 1994c. Assessment of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to 5-fluorouracil. *Jom* 36: 79-83

Sessink PJM, Wittenhorst BCJ, Anzion RBM, Bos RP. 1997. Exposure of Pharmacy Technicians to Antineoplastic Agents: Reevaluation after Additional Protective Measures. *Archives of Enviromental Health* 52: 240-4

Shortridge LA, Lemasters GK, Valanis B, Hertzberg V. 1995. Menstrual cycles in nurses handling antineoplastic drugs. *Cancer Nurs* 18: 439-44

Siewert JR, Fink U. 1999. Prinzipien der onkologischen Chirugie. In *Kompendium Internistische Onkologie*, ed. H-J Schmoll, K Höffken, K Possinger: Springer Verlag: 282-285

Sorsa M, Anderson D. 1996. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutation Research* 355: 253-61

Stoikes ME, Carlson JD, Farris FF, Walker PR. 1987. Permeability of latex and polyvinyl chloride gloves to fluorouracil and methotrexate. *American Journal of Health-System Pharmacy* 44: 1341-6.

Stucker I, Caillard JF, Collin R, Gout M, Poyen D, Hemon D. 1990. Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. *Scandinavien Journal of Work, Environment and Health* 16: 102-7

Szigan J, Böttcher M, Sawazki J. 2001. Probenvorbereitung für die quantitative Bestimmung von Buprenorphin und Norbuprenorphin aus Urin (1). *GIT Labor Fachzeitschrift* 11: 1168-72

Thiberville L, Compagnon P, Moore N, Bastian G, Richard M, Hellot M, Vincent C, Kannass M, Dominique S, Thuillez C. 1994. Plasma 5-fluorouracil and alpha-fluoro-beta-alanine accumulation in lung cancer patients treated with continuous infusion of cisplatin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 35: 64-70

Valanis B, Vollmer WM, Steele P. 1999. Occupational exposure to antineoplastic agents: self-reported miscarriages and stillbirths among nurses and pharmacists. *Journal of Occupational Environmental Medicine* 41: 632-8

Wilken A. 1997. Beobachtungen zur Außenkontamination der Primärverpackungen von Zytostatika. *Krankenhauspharmazie 18 (1)*: 37-9

Yaffe SJ. 1970. Possible hazards of handling anti-neoplastic drugs. *Pediatrics* 46: 823

# Anhang

# Material

## *1. Geräte*

| | |
|---|---|
| **Gaschromatograph/Massenspektrometer** | MD 800, model 8060 MS CB DPFC, Fisons, Mailand, Italien |
| **Vorsäule** | F.S. Base Deactivated Guard Column, 5 m ID=0,32 mm, Restek, Bad Homburg Langerwehe |
| **Trennsäule** | DB-5-MS, 15-m x 0,25-mm x 0,25-µm, J & W Scientific, Palo Alto, Ca 94303 |
| **Autosampler** | AS 2000, Thermo Finigan, Egelsbach |
| **Eintrocknungsgerät** | Vapotherm mobil S, Barkey, Leopoldshöhe |
| **Zentrifuge** | Universal 32, Hettich, Tuttlingen |
| **Ultraschallbad** | Sonorex, Super RK 103 H, Bandelin electronic, Berlin |
| **Festphasenextraktion** | Adsorbex SPU, Merck eurolab, Darmstadt |
| **Säulen für die Festphasenextraktion** | Oasis® MAX, Oasis® MCX, Oasis® HLB, Waters, |
| | Lichrolut® SCX, Lichrolut® SAX, Lichrolut® $NH_2$, Merck eurolab, Darmstadt |
| | SPEC PLUS 3 ml DAU, Ansys® Technologies, Inc., Lake Forest, CA 92630 |
| | Bond Elut Certify, Bond Elut C18, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt |
| | Separtis ENV+, Separtis, Grenzach-Wyhlen |
| **Vortexer** | IKA Vibrax VXR, IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen |
| **Heizblock** | Techne DRI Block® DB 3A, Sample Concentrator, Labtech, Burkhadtshausen |
| **Filter** | Blaubandfilter, 90 mm, Schleicher & Schuell, Düren |
| **Papiertücher** | Kimwipes® Lite, 22 x 11,5 cm Kimberly Clark®, Mainz |

| | |
|---|---|
| **Centriprep®** | Centriprep® YM-3, Millipore GmbH, Eschborn |
| **Minisart®** | Minisart® 2 µm Filter, sartorius, Göttingen |
| **EZ: faast®** | GC-MS Physiological Aminosäure Testkit, phenomenex®, Aschaffenburg |

## *2. Chemikalien*

| | |
|---|---|
| **5-FU, 5-ClU, FPAL, TFAL** | Merck eurolab, Darmstadt |
| **FBAL** | Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich |
| **N-tert.-Butyl-dimethylsilyl-N-methyl-trifluoracetamid** | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| **Methanol** | SupraSolv® für die Gaschromatographie, Merck eurolab, Darmstadt |
| **Acetonitril** | SupraSolv® für die organische Spurenanalyse, Merck eurolab, Darmstadt |
| **Ammoniaklösung 25 %** | Suprapur, Merck eurolab, Darmstadt |
| **Salzsäurelösung 30 %** | Suprapur, Merck eurolab, Darmstadt |
| **Sonstige Chemikalien und Lösungen** | Merck eurolab, Darmstadt |

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dennis Nowak danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die stetige Gesprächsbereitschaft, mit der er den Fortgang der Arbeit begleitet hat.

Ich danke Herrn Dr. Rudolf Schierl für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit. Seine stetige Diskussionsbereitschaft hat diese Arbeit wesentlich bereichert.

Frau Dr. Gudrun Schmaus danke für die große Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Katalin Scharl danke ich für die herzliche Unterstützung im Labor.

Allen Apotheken und Stationen danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Arbeits- und Umweltmedizin, die nicht nur auf fachlicher Ebene zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir die Durchführung dieser Arbeit in vieler Hinsicht erleichtert haben.

Ich danke Michael für sein Vertrauen und die Unterstützung.

# Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

| | |
|---|---|
| Name | Sabine Funck |
| Geburtsdatum | 30.12.1973 |
| Geburtsort | Nettetal |

### *Schulbildung*

| | |
|---|---|
| 1980-1984 | Kreuzherrenschule (kath. Grundschule), Viersen |
| 1984-1993 | Städtisches Gymnasium, Viersen<br>Abschluß: Abitur |

### *Hochschulbildung*

| | |
|---|---|
| WS 1993/94 | Chemiestudium an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf |
| SS 1994-SS 1998 | Pharmaziestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn |

### *Staatsexamen*

| | |
|---|---|
| 1996 | 1. Staatsexamen |
| 1998 | 2. Staatsexamen |
| 28/07/1999 | 3. Staatsexamen |

### *praktische Berufsausbildung*

| | |
|---|---|
| 07/1998-12/1998 | Marcus Apotheke, Viersen |
| 01/1999-06/1999: | Apotheke des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz |

### *Berufspraxis*

| | |
|---|---|
| Seit 15/11/1999 | stundenweise tätig als Apothekerin im Klinikum rechts der Isar, München |

### *Wissenschaftliche Tätigkeit*

| | |
|---|---|
| Seit 11/1999 | Doktorarbeit am Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. D. Nowak |