

**Entwicklung und Validierung neuer Methoden zum Nachweis  
verschiedener Antibiotika und Zytostatika in biologischen Matrices**

–

**Untersuchungen zu neuen Eintragswegen von Tierarzneimitteln**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**  
**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation  
von

**M. Sc. Dipl.-Ing. (FH) Siegrun Mohring**  
geboren am 14.12.1977 in Münster (Westf.)

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2005 bis September 2010 am Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau (i.R.), Prof. Dr. Pablo Steinberg) der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. Gerd Hamscher angefertigt.

Hiermit erkläre ich, Siegrun Mohring, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 21.10.2010

Referent: Prof. Dr. Gerd Hamscher

Korreferentin: Prof. Dr. Carla Vogt

Tag der Promotion: 9. Februar 2011

*Meiner Familie: Mama, Papa und Ingrid  
und meinem Opa, der meinen Weg in die Chemie entscheidend beeinflusst hat.*

*Die Musik drückt das aus, was nicht gesagt werden kann und  
worüber zu schweigen unmöglich ist.*

Victor Hugo



## Zusammenfassung

Arzneimittel sind in der heutigen Zeit essenziell für die Gesunderhaltung von Mensch und Tier. So werden in der Nutztierhaltung große Mengen Antibiotika nicht nur zur Therapie sondern auch zur Prophylaxe und Metaphylaxe eingesetzt. Der Eintrag dieser Tierarzneimittel sowie das Vorkommen und Verhalten in der Umwelt wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Bereiche des Eintrags näher untersucht. In Gärtests konnte gezeigt werden, dass Sulfadiazin während der anaeroben Fermentation metabolisiert werden kann. Dafür wurden in Gärtests (5 L Fermenter; 2 Konzentrationen) sieben Sulfonamide und Trimethoprim auf ihr Abbauverhalten überprüft. Mittels HPLC-MS wurden die Gärtestproben, die im wöchentlichen Abstand entnommen wurden, auf die dotierten Substanzen untersucht. So wurde festgestellt, dass Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Sulfadimethoxin durch den Fermentationsprozess eliminiert wurden. Für Sulfadiazin konnte mit strukturaufklärenden Methoden (MS<sup>3</sup> und HPLC-ESI-TOF-MS) der Metabolit 4-OH-Sulfadiazin identifiziert werden. Durch einen mikrobiologischen Hemmstofftest wurde eine um über 90 % reduzierte antimikrobiologische Wirkung des Metaboliten nachgewiesen. Es konnte damit gezeigt werden, dass durch anaerobe Fermentation ein Abbau von Arzneimitteln möglich ist und bei, noch zu überprüfender, Übertragbarkeit auf Biogasanlagen der Eintrag von Tierarzneimitteln in die Umwelt möglicherweise reduziert werden könnte.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Eintragungsweg von Tierarzneimitteln untersucht. In der Veterinärmedizin kommt bei an Krebs erkrankten Tieren die in der Humanmedizin seit langem etablierte antineoplastische Chemotherapie immer häufiger zum Einsatz. Um mögliche Eintragswege der hier eingesetzten Zytostatika näher charakterisieren zu können, wurden Methoden für die Analyse von Zytostatika (Vincristin, Vinblastin, Cyclophosphamid, Melphalan, Chlorambucil und Doxorubicin) in Hunde-Urin, -Serum, -Speichel und -Haare entwickelt und validiert. Zunächst wurden für vier der untersuchten Substanzen für die Matrices Hunde-Urin und Hunde-Serum Flüssig-Flüssig-Extraktionen als Probenvorbereitung entwickelt. Um das Substanzspektrum und das Matrixspektrum im Zuge eines Projektes zu erweitern, wurde die Methodik erfolgreich auf eine Festphasenextraktion umgestellt. Die Messung erfolgte mittels HPLC-MS.

Es wurden insgesamt 358 Urinproben untersucht, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation der Chemotherapeutika genommen wurden. Die untersuchten Zytostatika wiesen im Urin ein sehr unterschiedliches Ausscheidungsverhalten auf. So konnte Cyclophosphamid in Hunde-Urin nur bis Tag 1 nachgewiesen werden. Melphalan wies ein ähnliches Verhalten auf und Chlorambucil wurde in keiner der analysierten Urinproben detektiert. Im Gegensatz dazu wurde Doxorubicin bis zu 21 Tage nach Applikation nachgewiesen. Vincristin und Vinblastin ließen sich bis zu sieben Tage (im Einzelfall auch bis 14 Tage) nach Applikation in Urin nachweisen. Für Doxorubicin konnten dabei die höchsten Konzentrationen (3,6 mg/L) ermittelt werden.

In Hunde-Serum konnten in Proben direkt nach der Applikation, wie erwartet, z. T. sehr hohe Konzentrationen für die untersuchten Zytostatika ermittelt werden. Für die Risikobewertung sind jedoch Proben eine Woche nach der Applikation von größerem Interesse, weil zu diesem Zeitpunkt (vor der nächsten Chemotherapie) eine Blutentnahme durch das Veterinärmedizinischen Personals stattfindet. Von 122 untersuchten Serumproben konnte nur in einer Probe 7 Tage nach der Chemotherapie Vinblastin nachgewiesen werden. In zwei Proben 1-2 Tage nach der oralen Applikation wurde Cyclophosphamid detektiert.

In Hunde-Speichel konnte nur Cyclophosphamid in sieben von 83 insgesamt untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die höchste ermittelte Konzentration betrug 7,7 µg/kg und wurde in einer Probe unmittelbar nach der Applikation von Cyclophosphamid detektiert. An Tag 1 nach Verabreichung der Chemotherapie konnten in drei von fünf Proben Cyclophosphamidkonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze (2,5 µg/kg) ermittelt werden. Für Melphalan und Chlorambucil konnte jeweils nur eine Speichelprobe gewonnen und untersucht werden. In beiden Proben konnte das entsprechende Zytostatikum nicht nachgewiesen werden. Es wurde keine Probe von Hunden untersucht, die Vinblastin erhalten haben.

Für die Matrix Hunde-Haar musste zunächst eine Methode entwickelt werden, um Positivkontrollen herzustellen. Durch Inkubation für mindestens drei Tage mit einer methanolischen Standardlösung bei 40 °C und anschließender Waschprozedur wurden Zytostatika enthaltende Haarproben erstellt. Die Probenaufarbeitung unterschied sich von den anderen Matrices indem vor der Festphasenextraktion ein enzymatischer Aufschluss mit Pronase E und Proteinase K über Nacht erfolgte.

In elf von 98 untersuchten Hunde-Haar-Proben konnten Zytostatika nachgewiesen werden. So wurde in drei Proben Cyclophosphamid im Bereich der Nachweisgrenze detektiert. In drei der Vincristinpositivbefunde wurden Konzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze ermittelt. Die fünf weiteren Konzentrationen lagen im Bereich der Nachweisgrenze.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wahrscheinlich von Urin das größte Gefährdungspotenzial ausgeht. Hier wurden zum einen fünf von sechs der untersuchten Zytostatika in z. T. sehr großen Konzentrationen ermittelt, zum anderen ist das Kontaminationsrisiko dieser Matrix schwer zu beherrschen. Im Gegensatz dazu ist das Gefährdungspotenzial bei Hunde-Serum vor allem auf das veterinärmedizinische Personal beschränkt. In Hunde-Haar und Hunde-Speichel wurden nur sehr niedrige Konzentrationen und auch nur in einer geringen Anzahl von Proben detektiert. Doch sollte laut IARC (International Agency for Research on Cancer) jedweder Kontakt mit diesen toxikologisch hochrelevanten Substanzen vermieden werden. So sollte auch ein gewisses Kontaminationsrisiko durch Hunde-Speichel und -Haare nicht ausgeschlossen werden.

Mithilfe der HPLC-MS konnten so in der vorliegenden Arbeit der Eintrag von einer toxikologisch hochrelevanten Substanzklasse in das nähere Umfeld sowie der Abbau von Sulfadiazin aufgedeckt werden damit wichtige Beiträge zur Umweltproblematik von Tierarzneimitteln geliefert werden.

Schlagworte: Tierarzneimittel, Expositionsmöglichkeiten, HPLC-MS

### Summary

In human and in veterinary medicine pharmaceuticals are essential in the treatment and prevention of diseases. Large amounts of antibiotics are used in livestock farming for the treatment of infections as well as for prophylactic and metaphylactic purposes. During the last years the occurrence and fate of veterinary pharmaceuticals as well as the entrance routes into the environment have extensively been studied. In the present work a closer look was taken on two areas of this complex issue. On the one hand, it could be shown that in anaerobic fermentation tests sulfadiazine can be biodegraded. In 5 L fermentors seven sulfonamides and trimethoprim were tested for biodegradability. Weekly drawn samples from the fermentors were analyzed by HPLC-MS, and an elimination of sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethoxazole and sulfadimethoxin could be shown. Using MS<sup>3</sup> and HPLC-ESI-TOF-MS 4-OH-sulfadiazine, a metabolite of sulfadiazine, could be identified. Furthermore, an antimicrobial inhibition test showed a reduced antimicrobial activity for this metabolite. Thus, it could be shown that a biodegradation via anaerobic fermentation is principally possible. Further experiments will have to show whether this observation can be transferred to biogas plants and thereby reduce the entrance of veterinary drugs into the environment.

In the second part of the present study a new entrance route was investigated. Dogs suffering from cancer nowadays receive, as often is the case in humans, chemotherapy. To characterize entrance routes resulting from the application of cytostatics in veterinary medicine methods to determine six cytotoxic drugs (vincristine, vinblastine, cyclophosphamide, melphalan, chlorambucil and doxorubicin) in dog urine, serum, saliva and hair were developed and validated. In a first step two liquid-liquid-extraction methods for urine and serum were developed. These methods were further optimized by including two more substances and by changing from a liquid-liquid-extraction to a solid phase extraction (SPE) sample preparation method. Analyses were carried out with High Performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC-MS).

Analysis of 358 urine samples obtained at different time points following application revealed a heterogeneous pattern of excretion of the substances under investigation. Whereas cyclophosphamide could only be detected directly after application and in minute amounts on day 1 vincristine and vinblastine could be detected until day 7 – in individual cases even until day 14. Melphalan showed a similar pattern of excretion as



cyclophosphamide. Doxorubicin was detected in urine until day 21 and at concentrations of up to 3.6 mg/L.

In dog serum samples taken directly after application, as expected, quite high concentrations could be detected. Concerning risk assessment samples taken one week after application are of great interest. At this time point blood samples were collected by the hospital staff. In one out of 122 serum samples (day 7) vinblastine was detected. Cyclophosphamide could be detected in two samples 1-2 days after oral application of this substance.

With the SPE method it also was possible to analyze saliva samples. In this case only cyclophosphamide could be detected in 83 investigated samples. Concentrations within the range of the limit of detection (LOD) (2.5 µg/kg) were determined in three out of five samples on day 1 after cyclophosphamide application, the highest measured value in a sample taken immediately after chemotherapy being 7.7 µg/kg. For melphalan and chlorambucil in each case only one sample could be obtained, and no residues were detected. No sample could be obtained for vinblastine analysis.

For the matrix dog hair, first of all a method had to be developed to produce positive control sample material. By incubating hair for at least three days with a methanolic standard solution at 40 °C sample material could be generated. For the sample preparation of hair samples prior to the SPE an enzymatic digestion with pronase E and proteinase K over night was carried out.

In eleven out of 98 analyzed hair samples cytotoxic drugs were detected. Cyclophosphamide was found in three samples within the range of the LOD. In three out of eight vincristine-positive samples the concentration was in the range of the limit of quantification (LOQ); in the other five samples vincristine concentrations were within the range of the LOD.

It can be concluded that urine probably is the matrix exhibiting the highest exposure levels towards cytostatic agents and the most relevant one regarding human health risk. On the one hand, five out of the six cytotoxic drugs analyzed in the present study could be detected in urine. On the other hand, the risk of contamination from this matrix is hard to handle. In contrast, the risk of contamination resulting from serum is constricted to hospital staff. In dog saliva and hair only minute amounts were detected in a very limited number of samples. According to the International Agency for Research on Cancer

## Summary

---

(IARC) any contact with these toxicologically relevant substances should be avoided. Thus, a certain risk derived from the contact with dog saliva and hair containing cytotoxic drugs cannot be denied.

By making use of HPLC-MS the present study contributed to further elucidate entrance routes of veterinary drugs into the environment.

Keywords: Veterinary pharmaceuticals, ways of exposition, HPLC-MS

---

# Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b><i>Einleitung</i></b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b><i>Stand der Literatur</i></b>   | <b>2</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Verbrauchsmengen von Human- und Tierarzneimitteln</b>                      | <b>2</b>  |
| <b>2.2</b> | <b>Vorkommen/Eintrag von Arzneimitteln in die Umwelt</b>                      | <b>4</b>  |
| 2.2.1      | Allgemeines   | 4         |
| 2.2.2      | Wasserkompartimente   | 5         |
| 2.2.3      | Gülle, Boden, Staub   | 7         |
| 2.2.4      | Pflanzen  | 10        |
| 2.2.5      | Antibiotika in Biogasanlagen  | 10        |
| 2.2.6      | Berufliche Exposition   | 13        |
| 2.2.7      | Eintrag von Zytostatika in das häusliche Umfeld                               | 15        |
| <b>2.3</b> | <b>Abbaubarkeit von Arzneimitteln</b>   | <b>16</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Effekt von Arzneimitteln auf die Umwelt</b>                                | <b>20</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Chemische Eigenschaften und Wirkungen von Sulfonamiden und Zytostatika</b> | <b>21</b> |
| 2.5.1      | Sulfonamide   | 21        |
| 2.5.2      | Vinca-Alkaloide   | 23        |
| 2.5.3      | Doxorubicin   | 24        |
| 2.5.4      | Stickstoff-Lost-Verbindungen  | 25        |
| <b>2.6</b> | <b>Analytik von Antibiotika und Zytostatika in biologischen Matrices</b>      | <b>26</b> |
| 2.6.1      | Antibiotika in Gülle (Fermenterinhalt)  | 26        |
| 2.6.2      | Zytostatika in Urin, Serum, Speichel und Haaren                               | 27        |
| <b>2.7</b> | <b>HPLC-MS</b>  | <b>29</b> |
| 2.7.1      | Allgemeines   | 29        |
| 2.7.2      | HPLC  | 30        |
| 2.7.3      | Ionisation  | 30        |
| 2.7.4      | Ionenanalyse  | 32        |

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>3</b>   | <b><i>Forschungsbedarf</i></b>   | <b>35</b> |
| <b>4</b>   | <b><i>Ergebnisse</i></b>   | <b>37</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikationen</b>  | <b>37</b> |
| 4.1.1      | Elimination von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation (Biogasanlage)                               | 37        |
| 4.1.2      | Zytostatika-Rückstände in Hunde-Urin   | 41        |
| 4.1.3      | Zytostatika-Rückstände in Hunde-Serum  | 43        |
| <b>4.2</b> | <b>Methodenentwicklung zur Analyse von Zytostatika in Hunde-Urin und -Serum mittels Festphasenextraktion</b> | <b>45</b> |
| 4.2.1      | Allgemeines  | 45        |
| 4.2.2      | Probenvorbereitung   | 45        |
| 4.2.3      | Messmethoden HPLC-MS   | 49        |
| 4.2.4      | Analyse von Proben – Melphalan und Chlorambucil in Hunde-Serum und -Urin                                     | 54        |
| <b>4.3</b> | <b>Analytik von Zytostatika in Hunde-Haaren</b>  | <b>55</b> |
| 4.3.1      | Methodik   | 55        |
| 4.3.2      | Analyse von Proben – Hunde-Haare   | 56        |
| <b>4.4</b> | <b>Analytik von Zytostatika in Hunde-Speichel</b>  | <b>58</b> |
| 4.4.1      | Methodik   | 58        |
| 4.4.2      | Analyse von Proben – Hunde-Speichel  | 58        |
| <b>4.5</b> | <b>Validierung</b>   | <b>59</b> |
| 4.5.1      | Allgemeines Vorgehen   | 59        |
| 4.5.2      | Urin   | 61        |
| 4.5.3      | Serum  | 62        |
| 4.5.4      | Haare  | 63        |
| 4.5.5      | Speichel   | 64        |
| <b>5</b>   | <b><i>Diskussion</i></b>   | <b>65</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Elimination von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation</b>                                       | <b>65</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Zytostatika in Hunde-Urin und -Serum</b>  | <b>66</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Weiterentwicklung der Urin und Serummethodik</b>  | <b>68</b> |

---

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.4       | Zytostatika in Hunde-Haar   | 69         |
| 5.5       | Zytostatika in Hunde-Speichel   | 71         |
| 5.6       | Zusammenfassende Diskussion   | 72         |
| <b>6</b>  | <b><i>Ausblick</i></b>  | <b>75</b>  |
| <b>7</b>  | <b><i>Ausführliche Darstellung der Ergebnisse (Publikationen 1-4)</i></b> | <b>76</b>  |
| 7.1       | Publikation 1   | 77         |
| 7.2       | Publikation 2   | 78         |
| 7.3       | Publikation 3   | 79         |
| 7.4       | Publikation 4   | 80         |
| <b>8</b>  | <b><i>Experimentelles</i></b>   | <b>81</b>  |
| <b>9</b>  | <b><i>Literatur</i></b>   | <b>92</b>  |
| <b>10</b> | <b><i>Publikationsliste</i></b>   | <b>106</b> |



# 1 Einleitung

Arzneimittel sind zur Gesunderhaltung von Mensch und Tier in der heutigen Zeit von großer Bedeutung. In der Veterinärmedizin, speziell in der Nutztierhaltung, sind Antibiotika die am häufigsten eingesetzten Arzneimittel. Ein Großteil dieser Substanzen werden jedoch unmetabolisiert ausgeschieden und gelangen über Gülle auf landwirtschaftliche Nutzflächen. Im Boden können sie möglicherweise zur Resistenzentwicklung von Bakterien beitragen oder in Pflanzen und das Grundwasser gelangen.

Biogasanlagen stellen eine Möglichkeit der Gewinnung von erneuerbaren Energien dar und finden in der Landwirtschaft eine zunehmende Verbreitung. In ihnen wird neben anderen organischen Abfällen auch Gülle anaerob fermentiert. Dieser Prozess kann durch Antibiotika in hohen Konzentrationen gestört werden. Inwieweit im Gegensatz dazu die anaerobe Fermentation jedoch Einfluss auf niedrige Antibiotikakonzentrationen haben kann, wurde bisher nur in wenigen Fällen untersucht.

Durch die Anwendung von Chemotherapien in der Kleintiermedizin entsteht ein neuer potenzieller Eintragsweg von in der Veterinärmedizin verwendeten Arzneimitteln in die Umwelt. Aufgrund verbesserter Ernährung und medizinischer Versorgung werden Tiere heute, so wie der Mensch, immer älter und erkranken dadurch auch häufiger an ähnlichen altersbedingten Krankheiten wie z. B. Krebs. So werden in der Kleintierpraxis heute Zytostatika, die selbst z. T. mutagen, teratogen und karzinogen sind, eingesetzt und stellen im engen Umfeld von Haustieren möglicherweise ein hohes Kontaminationspotenzial dar. Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit diesen Arzneimitteln werden derzeit aus der Humanmedizin abgeleitet.

Zur Untersuchung von vielen Pharmazeutika in biologischen Matrices ist in den letzten Jahren die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) als Methode der Wahl immer mehr in den Vordergrund gerückt. Für die Aufklärung möglicher Eintragswege von Arzneimitteln in die Umwelt steht damit eine selektive und sensitive Methode zur Verfügung.

## 2 Stand der Literatur

### 2.1 Verbrauchsmengen von Human- und Tierarzneimitteln

Antibiotika werden sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin in großen Mengen eingesetzt. Jedoch sind nur wenige exakte Daten über Verbräuche dieser Arzneimittelgruppen erhältlich. Während in der Humanmedizin etwa 30 % (ca. 400 t/Jahr in Deutschland) aller verschriebenen Arzneimittel Antibiotika sind (Kümmerer 2004a)<sup>1</sup>, sind sie in der Veterinärmedizin die am häufigsten verwendeten Pharmazeutika, da sie in großen Mengen zu therapeutischen Zwecken sowie zur Metaphylaxe und Prophylaxe v. a. in der Nutztierhaltung (ca. 80 %) eingesetzt werden (Boxall et al. 2003a; Kümmerer 2004a; Kemper 2008; Kools et al. 2008). Die FEDESA (European Federation of Animal Health) hat für 1997 und 1999 Verkaufsdaten für Antibiotika (Human- und Veterinärmedizin) ermittelt. Danach lag der Gesamtverbrauch an Antibiotika in EU und Schweiz in diesen Jahren bei ca. 13.000 t (FEDESA 1998; Schmerold und Ungemach 2007). Hiervon lag der Anteil der in der Veterinärmedizin verwendet wurde bei ca. 28 % (3494 t). Etwa 13 % (1599 t) der Antibiotika wurden als so genannte Leistungsförderer eingesetzt. Seit 2006 ist die Verwendung antibiotischer Leistungsförderer in der EU komplett untersagt.

Innerhalb der Gruppe der Antibiotika wiederum werden in der Veterinärmedizin Tetracycline, Sulfonamide und Beta-Lactam-Antibiotika mengenmäßig am meisten eingesetzt (Tolls 2001; Sarmah et al. 2006). In der Humanmedizin werden dagegen vor allem Beta-Lactam-Antibiotika (Penicilline ca. 50 % und Cephalosporine ca. 20 %), gefolgt von den Sulfonamiden (ca. 14 %) und Makroliden (ca. 10 %), verschrieben (Kümmerer und Henninger 2003).

In 2002 hat Ungemach eine Berechnung zur durchschnittlichen Behandlungsdauer von Mensch und Tier mit Antibiotika durchgeführt. Basierend auf den EU-Verbrauchszahlen für 1997, den Bevölkerungs- bzw. Tierzahlen der verschiedenen Nutztierarten und den durchschnittlichen Dosierungen (342 mg bzw. 54 mg Antibiotika/kg Körpermasse/Jahr für Mensch bzw. Nutztier), ergibt sich ein 6,3-fach höherer Verbrauch an Antibiotika für

---

<sup>1</sup> Freiverkäufliche Analgetika und Antiphlogistika sind nicht mit einbezogen.



den Menschen als für Nutztiere. Auch die Umrechnung auf standardisierte Tagesdosen weist auf einen erhöhten Einsatz von Antibiotika und auch eine längere Behandlungsdauer in der Humanmedizin hin (34-68 Tage/Jahr beim Mensch; 2,7-5,4 Tage/Jahr beim Nutztier) (Ungemach 2002).

Im Gegensatz zu den Antibiotika spielen Zytostatika in Bezug auf die Verbrauchsmengen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine untergeordnetere Rolle. Allerdings sind sie aus toxikologischer Sicht bedeutsam. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat u. a. Zytostatika anhand ihrer Karzinogenität klassifiziert und in verschiedene Gruppen eingeteilt (Tab. 2-1) (IARC 1975, 1976, 1981, 1987).

**Tab. 2-1. Einteilung der Karzinogene der IARC.**

---

|           |   |
|-----------|---|
| Gruppe 1  | Substanz/Gemisch wirkt krebserregend im Menschen (z. B. Cyclophosphamid)                                      |
| Gruppe 2A | Substanz wirkt wahrscheinlich krebserregend im Menschen (z. B. Doxorubicin, Acrylamid)                        |
| Gruppe 2B | Substanz wirkt möglicherweise krebserregend im Menschen (z. B. Chloroform, Acetaldehyd)                       |
| Gruppe 3  | Substanz ist nicht klassifizierbar hinsichtlich der Karzinogenität im Menschen (z. B. Vincristin, Vinblastin) |
| Gruppe 4  | Substanz ist nicht krebserregend (z. B. Caprolactam)  |

---

Methotrexat ist mit 22 t (58 %) das mit Abstand am häufigsten eingesetzte Zytostatikum in der Humanmedizin. Es folgen Hydroxycarbamid, Capecitabin und Fluorouracil. Cyclophosphamid, welches in der Veterinärmedizin am meisten eingesetzt wird, liegt mit 0,6 t auf Rang 7 der in der Humanmedizin eingesetzten Zytostatika. Es konnte ein jährlicher Gesamtverbrauch von rund 38 t für Zytostatika im humanmedizinischen Bereich berechnet werden. 79 % dieses Verbrauchs werden in niedergelassenen Praxen verabreicht (Kümmerer et al. 2008).

In der Veterinärmedizin werden Zytostatika im Gegensatz zu Antibiotika vor allem bei Haustieren eingesetzt. In einer Umfrage, die 2003/2004 in Großbritannien durchgeführt wurde, wurden niedergelassene Tierärzte über den Einsatz von Zytostatika befragt. 70,8 % der Praxen, die den Fragebogen zurück geschickt hatten, gaben an, im angegebenen Untersuchungszeitraum Zytostatika eingesetzt zu haben. Im Durchschnitt

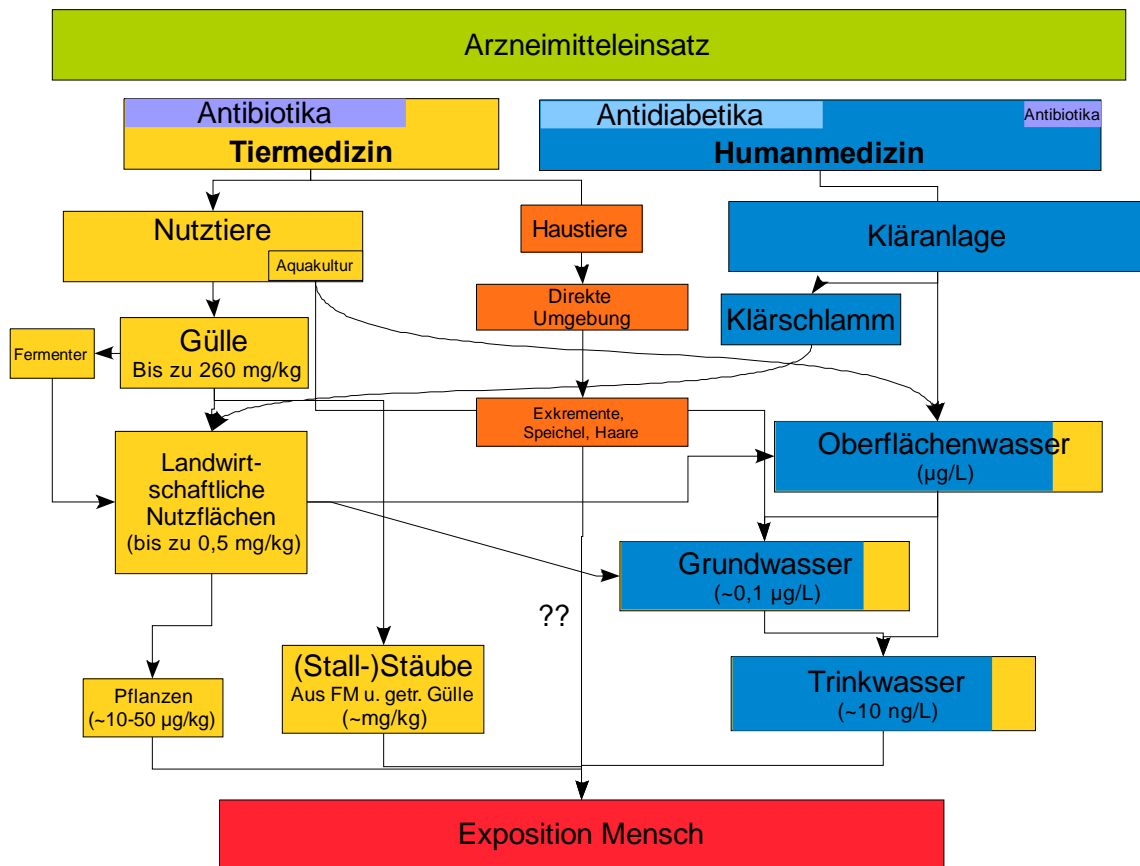
wurde alle drei Monate eine Chemotherapie durchgeführt, wobei die am meisten verwendeten Arzneimittel Vincristin und Cyclophosphamid waren. Außerdem wurde in dieser Studie ermittelt, dass es umso wahrscheinlicher ist, dass Chemotherapien durchgeführt werden, je mehr praktizierende Tierärzte in einer Praxis angestellt sind (Cave et al. 2007). Absolute jährliche Verbrauchsmengen lassen sich aus diesen Angaben allerdings nicht ermitteln. Es sei jedoch erwähnt, dass in der Veterinärmedizin niedrigere Dosierungen eingesetzt werden als in der Humanmedizin und damit auch die Verbrauchsmengen geringer sind.

## **2.2 Vorkommen/Eintrag von Arzneimitteln in die Umwelt**

### **2.2.1 Allgemeines**

Viele Arzneimittel, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin verabreicht werden, verlassen den Körper zum Teil (10-90 %) ohne metabolisiert worden zu sein (Langhammer 1989; Kümmerer und Henninger 2003; Kümmerer 2008). In der Humanmedizin gelangen diese Arzneimittel mit den Exkrementen/Ausscheidungen hauptsächlich über die Toiletten in die Kläranlagen. Wenn sie hier nicht eliminiert werden, gelangen sie weiter in die verschiedenen Wasserkompartimente wie Oberflächenwasser, Grundwasser oder sogar in das Trinkwasser (Monteiro und Boxall 2010) (Abb. 2-1).

In der Veterinärmedizin eingesetzte Arzneimittel werden jedoch prinzipiell auf anderen Wegen in die Umwelt eingetragen. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, werden in der Veterinärmedizin Antibiotika vor allem in der Nutztierhaltung eingesetzt. Diese gelangen nach der Körperpassage in die Gülle, die wiederum auf landwirtschaftliche Nutzflächen ausgebracht wird oder auch in Biogasanlagen Verwendung findet. Hier können jedoch bereits metabolisierte (und dadurch eigentlich eliminierte) Substanzen in die Ausgangssubstanz umgewandelt werden. Dies wurde für die Gruppe der Sulfonamide und ihre N-Acetyl-Metaboliten beschrieben (Berger et al. 1986; Langhammer 1989). Von den landwirtschaftlichen Nutzflächen können die Arzneimittel entweder ins Grundwasser oder bei Starkregenereignissen auch ins Oberflächenwasser gelangen. In jüngster Zeit wurde auch die Verlagerung in Pflanzen beschrieben.



**Abb. 2-1.** Expositionsmöglichkeiten der Umwelt und des Menschen mit Arzneimittelrückständen aus Veterinär- und Humanmedizin. Die Mengenverhältnisse werden durch die Breite der Rechtecke symbolisiert.

Ein weiterer, lokal beschränkter, Expositionsweg ergibt sich für Landwirte, die über die Atemluft durch Stallstäube Antibiotika aufnehmen können (Hamscher et al. 2003b).

Für in der Veterinärmedizin eingesetzte Zytostatika sind Expositionswege bislang nicht näher beschrieben.

Im Folgenden soll auf Studien aus dem Bereich der Human- und Veterinärmedizin eingegangen werden, in denen Expositionskonzentrationen und -wege in verschiedenen Umwelt-Kompartimenten beschrieben werden.

## 2.2.2 Wasserkompartimente

Einen umfassenden Überblick über das Vorkommen von Antibiotika in der aquatischen Umwelt gibt Kümmerer in einem Review von 2009 (Kümmerer 2009a). Zu den Wasserkompartimenten zählen Oberflächenwasser, Grundwasser und Trinkwasser, aber auch Krankenhausabwässer und Vorfluter von Kläranlagen. In diesen Kompartimenten

werden vor allem die Antibiotikagruppen der Makrolide und Sulfonamide ermittelt. Tetracycline und Penicilline werden in vergleichsweise geringen Mengen nachgewiesen, obwohl vor allem Penicilline in der Humanmedizin viel eingesetzt werden (Hirsch et al. 1999; Kümmerer und Henninger 2003; Monteiro und Boxall 2010). Es ist wahrscheinlich, dass diese Substanzen durch eine Spaltung des Beta-Lactamrings leicht inaktiviert werden.

Krankenhausabwasser ist erwartungsgemäß das Wasserkompartiment, in dem bisher die höchsten Antibiotikakonzentrationen mit bis zu 35 µg/L (Summe von Penicillinen, Makroliden, Sulfonamiden, Fluorchinolonen und Tetracyclinen) ermittelt wurden (Färber 2002). Um diese hohen Konzentrationen zu reduzieren, werden Krankenhausabwässer z. T. stark verdünnt (> 100-fach) bevor sie die kommunalen Abwässer erreichen (Radka und Kümmerer 2006). Dennoch werden in kommunalen Kläranlagen immer noch Konzentrationen von bis zu 6 µg/L Erythromycin-H<sub>2</sub>O detektiert (Hirsch et al. 1999). In Oberflächenwasser wurden immerhin noch bis zu 1,9 µg/L (Median 0,15 µg/L) Sulfamethoxazol gemessen (Kolpin et al. 2002). Die am häufigsten nachgewiesenen Substanzen in diesem Kompartiment sind Erythromycin, Clarithromycin und Roxithromycin.

Im Grundwasser haben Sacher et al. (2001) und Hirsch et al. (1999) noch Konzentrationen von mehreren 0,1 µg/L (0,47 µg/L für Sulfamethoxazol und zwischen 0,24 und 0,87 µg/L Erythromycin, Clarithromycin, Roxithromycin) feststellen können und führen dies auf einen direkten Einfluss von Abwasser humanen Ursprungs zurück. In zwei Grundwasserproben, die in der Nähe von landwirtschaftlichen Nutzflächen genommen wurden, konnte Sulfamethazin in Konzentrationen < 20 ng/L detektiert werden. Auch Hamscher et al. (2005) konnten eine Verlagerung von Sulfamethazin aus Ackerböden in das Grundwasser beobachten. Sogar in Trinkwasser konnten Spuren verschiedener Antibiotika (Erythromycin, Tylosin, Roxithromycin, Sulfamethoxazol) im Bereich < 5 ng/L ermittelt werden (Ye et al. 2007).

Da der jährliche Verbrauch an Zytostatika im Vergleich zu Antibiotika wesentlich geringer ausfällt (vgl. Kapitel 2.1), sind auch die eingetragenen Mengen in Wasserkompartimente entsprechend geringer. Heute werden Chemotherapien größtenteils ambulant durchgeführt. Somit hat in den letzten Jahrzehnten eine Verlagerung des Eintrags der Zytostatika von Krankenhausabwässern in kommunale Abwässer stattgefunden (Eitel et al. 2000; Kümmerer und Schuster 2008).

Zytostatika wurden in Krankenhausabwässern in Konzentrationen bis zu 0,15 µg/L gefunden (Steger-Hartmann et al. 1996; Kümmerer et al. 1997). In Oberflächenwässern wurden Konzentrationen im niedrigen ng/L-Bereich detektiert (Buerge et al. 2006). Bisher konnten Zytostatika im Trinkwasser nicht detektiert werden.

Ein weiterer möglicher Eintragsweg von Arzneimitteln in Wasser- oder Umweltkompartimente ergibt sich durch die Entsorgung nicht verbrauchter Arzneimittel. So wird ein beträchtlicher Anteil von Arzneimitteln über den Hausmüll oder über die Kanalisation (Toilette) entsorgt und kann dadurch in Wasserkompartimente gelangen. In Deutschland werden ca. 33 %; in GB 11,5 % und in den USA 35,4 % der Arzneimittel über diesen Weg entsorgt (Bound und Voulvoulis 2005; Kümmerer 2009b). In den USA wird sogar für einige Medikamente explizit die Empfehlung gegeben, diese über die Kanalisation zu entsorgen (Daughton und Ruhoy 2009; Kümmerer 2009b). In einer Umfrage in Kuwait gab immerhin die Hälfte der Befragten an, aufgrund von Medikationsumstellung nicht verwendete Medikamente zu Hause zu verwahren. Dreiviertel gaben des weiteren an, diese dann über den Hausmüll zu entsorgen (Abahussain et al. 2006). Die Entsorgung über den Hausmüll kann dann über Mülldeponien wiederum Einträge ins Oberflächen- oder Grundwasser verursachen.

### **2.2.3 Gülle, Boden, Staub**

#### *Gülle*

Als Gülle bezeichnet man Wirtschaftsdünger, der vor allem aus Urin und Kot von Rindern oder Schweinen aus der Nutztierhaltung besteht. Während Zytostatika hier keine Rolle spielen, können in Gülle zum Teil sehr hohe Konzentrationen von Antibiotika vorkommen. Engels (2004) hat 344 Schweinegülleproben hinsichtlich des Gehalts an Antibiotika untersucht. In 76,5 % der Proben wurde mindestens ein Antibiotikum nachgewiesen und in immerhin 42,8 % wurde mehr als ein Antibiotikum nachgewiesen. Einzelne Gülleproben enthielten Konzentrationen bis zu 235 mg/kg Sulfadiazin und 167 mg/kg Sulfamethazin. Chlortetracyclin wurde in einer einzelnen Probe in einer Konzentration von 331 mg/kg gefunden. Die Medianwerte der Positivbefunde lagen jedoch weit unter diesen Werten bei 3,5 mg/kg für Sulfadiazin (102 Positivbefunde), bei 4,0 mg/kg für Sulfamethazin (182 Positivbefunde) und bei 3,4 mg/kg für Chlortetracyclin (44 Positivbefunde).

Hamscher et al. konnten in acht von elf untersuchten Schweine-/Rindergülleproben Tetracyclin und Chlortetracyclin in Konzentrationen zwischen 0,08-45,3 mg/kg und bis zu 2,9 mg/kg Sulfadiazin bzw. Sulfamethazin nachweisen. Auch konnten bis zu vier Substanzen gleichzeitig detektiert werden (Höper et al. 2002; Hamscher et al. 2003a). In Untersuchungen von Winckler und Grafe (2001) wurden in 24 % der untersuchten Schweinegülleproben Positivbefunde ermittelt.

Andere Antibiotika werden in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen (Hamscher 2008). So werden Tylosin, Salinomycin und Tiamulin selten und nur im unteren µg/kg-Bereich nachgewiesen.

Christian et al. (2003) haben eine experimentell ermittelte Sulfamethazinkonzentration in Schweinegülle auf Plausibilität überprüft. Demnach ist, unter der Annahme, dass kein Abbau stattfindet, bei einer täglichen Behandlung nur eines Tieres mit Sulfamethazin (nach Dosierempfehlung) schon mit einer Konzentration von 1 mg/kg in der Gülle eines aus 100 Tieren bestehenden Bestandes zu rechnen. Bei einer Bestandsbehandlung lassen sich somit auch die oben in verschiedenen Studien ermittelten Konzentrationen erklären (30-100 mg/kg).

### *Boden*

Über Gülle als Wirtschaftsdünger gelangen Antibiotika auf landwirtschaftliche Nutzflächen. Die ersten, die diesen Eintragsweg in die Umwelt in langfristigen Feldstudien nachgewiesen haben, waren Hamscher et al. (2000). Es wurde gezeigt, dass Tetracycline nicht nur in großen Mengen eingetragen werden, sondern auch in der Umwelt persistieren (Hamscher et al. 2002; Hamscher et al. 2005). Die beiden schwerpunktmäßig beschriebenen Substanzklassen (Sulfonamide und Tetracycline) können sich hierbei sehr unterschiedlich verhalten. Während Sulfachloropyridazin rasch in eine Bodentiefe von 30 cm verlagert wird, ist Oxytetracyclin vorwiegend in den oberen 10 cm nachzuweisen (Blackwell et al. 2007). Erste Untersuchungen in 2000 konnten in 4 von 12 Böden Tetracyclin und in 2 von 12 Chlortetracyclin mit Konzentrationen deutlich über 10 µg/kg nachweisen. Auch hier konnte bereits gezeigt werden, dass Tetracycline nicht in die unteren Bodenschichten vordringen (Hamscher et al. 2000). In einer Folgestudie wurden Proben einer Boden-Dauerbeobachtungsfläche mehrfach beprobt und über zwei Jahre Durchschnittskonzentrationen für Tetracyclin von über 150 µg/kg Boden ermittelt. Während Tetracycline jedoch nicht in tiefere Bodenschichten vordringen und in der

Ackerkrume (ca. 0-30 cm) verbleiben, wurde in dieser Studie ebenfalls gezeigt, dass Sulfamethazin aus dem Boden bis in das Grundwasser verlagert wird (vgl. Kapitel 2.2.2) (Hamscher et al. 2005). Weitere Untersuchungen der Boden-Dauerbeobachtungsflächen (bis November 2007) zeigten für Tetracyclin und Chlortetracyclin eine Pseudopersistenz. D. h. die in den Sommer- und Wintermonaten abgebauten oder eliminierten Stoffe können durch den erneuten Eintrag von antibiotikahaltiger Gülle im Frühjahr kompensiert werden (Hamscher 2008).

Auch Klärschlamm darf nach der Klärschlammverordnung von 1992 unter bestimmten Voraussetzungen auf landwirtschaftliche Nutzflächen ausgebracht werden und trägt somit möglicherweise zu einer Bodenbelastung durch Antibiotika oder Zytostatika bei. Die Klärschlammverordnung sieht bisher allerdings nur eine Untersuchung auf Schwermetalle, polychlorierte Biphenyle und polychlorierte Dibenzodioxine/Dibenzofurane vor (Klärschlammverordnung 1992). Während der Abwasserbehandlung können jedoch auch Arzneimittel an Klärschlammpartikel adsorbieren. Somit wäre der Eintrag von Zytostatika in Böden möglich. Dies ist allerdings bislang noch nicht experimentell bestätigt worden. In einer Neufassung der Klärschlammverordnung sollen insbesondere Grenzwerte für perfluorierte Chemikalien eingeführt werden und eine Anpassung bestehender Grenzwerte an aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse erfolgen (Klärschlammverordnung - Entwurf der Neufassung 2010).

### *Staub*

In Stäuben enthaltene unerwünschte Stoffe spielen in der Veterinärmedizin ebenfalls eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Im Rahmen der Fütterung sowie durch getrocknete Güllereste entstehen in landwirtschaftlichen Betrieben große Mengen an Staub. So können durch den Einsatz von Fütterungsarzneimitteln z. B. auch Antibiotika in Stäube gelangen. In einer retrospektiven Studie (1981-2000) von Hamscher et al. (2003b) wurden in 18 der 20 jährlich im selben Stall genommenen Staubproben bis zu fünf verschiedene Antibiotika nachgewiesen. Unter anderem wurden hier verschiedene Tetracycline und Sulfamethazin detektiert. In drei Proben (bis 1992) konnte auch Chloramphenicol, welches aufgrund seines genotoxischen Potenzials 1994 von der EU verboten wurde, nachgewiesen werden. Somit hat nicht nur der Staub an sich einen möglichen Einfluss auf die Gesundheit des landwirtschaftlichen Personals sondern auch die darin enthaltenen unerwünschten bioaktiven Stoffe (Cambra-Lopez et al. 2010).

### 2.2.4 Pflanzen

In den letzten Jahren wurde der Weg von Antibiotika in ein weiteres Umweltkompartiment beschrieben. Antibiotika, die über Gülle in die Böden gelangen, kommen so mit Pflanzen in Kontakt. Dabei besteht die Möglichkeit der Aufnahme dieser Stoffe über die Wurzeln in das Pflanzengewebe. Bisherige Studien konnten allerdings nur sehr geringe Konzentrationen in den Pflanzen nachweisen. So wurden geringe Mengen Florfenicol (5 und 15 µg/kg) und Trimethoprim (5,3 und 6 µg/kg) in Karotten und Kopfsalat detektiert, und in Karotten zusätzlich Enrofloxacin (2,8 µg/kg) (Boxall et al. 2006). Untersuchungen von Mais, Kartoffeln und Salat ergaben Konzentrationen von 8-100 µg/kg für Sulfamethazin (Dolliver et al. 2007) und 2-17 µg/kg Chlortetracyclin (Kumar et al. 2005). Grote et al. (2009) konnten in Hydrokulturen einen Übergang von verschiedenen Antibiotika in die Pflanzen beobachten, jedoch war in Feldproben nur der qualitative Nachweis von Tetracyclin, einem Didesmethyl-Derivat von Oxytetracyclin und Ciprofloxacin möglich.

Die in Pflanzen ermittelten Konzentrationen lagen deutlich unter den für Tierarzneimittel in tierischen Lebensmitteln festgelegten ADI-Werten (ADI – acceptable daily intake). Eine toxikologische Relevanz wäre z. B. bei Substanzen mit niedrigen ADI-Werten gegeben oder wenn eine kumulative Aufnahme über mehrere Wege gleichzeitig stattfinden würde. Für Sulfamethazin wurde ein ADI-Wert von 0,05 mg/kg KG festgesetzt (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1995). Ein durchschnittlicher Erwachsener nimmt täglich ca. 0,6 kg pflanzliche Lebensmittel zu sich (WHO 2003). Damit ergibt sich für die von Dolliver et al. (2007) ermittelten Konzentrationen eine maximale Ausschöpfung des ADI-Wertes von 2 % für eine Person mit 60 kg KG für Sulfamethazin. Möglicherweise spielen jedoch gerade diese subtherapeutischen Konzentrationen in der Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen eine wichtige Rolle (Kümmerer 2004b).

### 2.2.5 Antibiotika in Biogasanlagen

In Biogasanlagen wird in einem anaeroben Fermentationsprozess organischer Abfall unter Entstehung von Biogas (u. a. Methan) vergoren. Methan wird wiederum in Blockheizkraftwerken zur Energiegewinnung verbrannt und dient somit einer nachhaltigen Energieerzeugung (Ahrens und Weiland 2007). Neben anderen organischen Ab-



fällen wird auch Gülle als Substrat in Biogasanlagen eingesetzt. Der Anteil von Gülle im Substratgemisch kann bis zu 30 % betragen. Über Gülle können auch Antibiotika in Biogasanlagen gelangen und im Reaktor einen negativen Einfluss auf den von anaeroben Bakterien geleiteten Fermentationsprozess haben. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits Untersuchungen durchgeführt, wie der Fermentationsprozess durch Antibiotika beeinflusst wird. Eine kleine Literaturübersicht ist in Tab. 2-2 gegeben.

**Tab. 2-2. Zusammenstellung von Studien über die Wirkung verschiedener Antibiotika auf die anaerobe Fermentation.**

| Autor  | Substanz               | Konzentration                    | Hemmung           |
|--|------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Poels et al.<br>(1984) <sup>a)</sup>           | Chlortetracyclin       | 3,3 mg/L; 16,7 mg/L; 33,3 mg/L   | -                 |
|  | Tylosin                | 1,7 mg/L; 8,3 mg/L; 16,7 mg/L    | -                 |
|  | Erythromycin           | 0,4 mg/L; 2,0 mg/L; 4,0 mg/L     | -                 |
|  | Chloramphenicol        | 16,7 mg/L; 83,3 mg/L; 166,6 mg/L | -                 |
|  | Virginiamycin          | 1,7 mg/L; 8,3 mg/L; 16,7 mg/L    | +++ <sup>b)</sup> |
|  | Bactracin              | 3,3 mg/L; 16,7 mg/L; 33,3 mg/L   | +++ <sup>b)</sup> |
| Lallai et al.<br>(2002)                        | Thiamphenicol          | 80 mg/L                          | +++               |
|  |                        | 60 mg/L                          | +++               |
|  | Amoxicillin            | 60 mg/L                          | ++                |
|  |                        | 120 mg/L                         | ++                |
|  | Oxytetracyclin         | 125 mg/L                         | -                 |
|  |                        | 250 mg/L                         | -                 |
| Massé et al.<br>(2000)                         | Carbadox <sup>c)</sup> | 55 mg/kg                         | -                 |
|  | Tylosin                | 110 mg/kg                        | -                 |
|  | Penicillin             | 16 mg/kg                         | + <sup>d)</sup>   |
|  | Tetracyclin            | 550 mg/kg                        | + <sup>d)</sup>   |
|  | Sulfamethazin          | 110 mg/kg                        | -                 |
|  | Lyncomycin             | 220 mg/kg                        | -                 |
| Dosierung in Fütterungsversuchen mit Schweinen |                        |                                  |                   |

Tab. 2-2. Fortsetzung.

| Autor                   | Substanz                     | Konzentration                        | Hemmung               |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Sanz et al.<br>(1996)   | Rifampicin                   | > 250 mg/L                           | 50 %                  |
|                         | Ampicillin                   | jeweils                              |                       |
|                         | Novobiocin                   | 10 mg/L                              | 20 %                  |
|                         | Penicillin                   | 500 mg/L                             | -                     |
|                         | Chlortetracyclin             | 5 mg/L                               | 20 %                  |
|                         |                              | 40 mg/L                              | 50 %                  |
|                         |                              | 152 mg/L                             | 80 %                  |
|                         | Doxycyclin                   | 8 mg/L                               | 20 %                  |
|                         |                              | 100 mg/L                             | 45 %                  |
|                         | Tylosin                      | 25 mg/L                              | 35 %                  |
|                         |                              | > 250 mg/L                           | 45 %                  |
|                         | Erythromycin                 | 250 mg/L                             | -                     |
|                         | Chloramphenicol              | 25 mg/L                              | 90 %                  |
|                         |                              | 50 mg/L                              | 100 %                 |
|                         | Aminoglycoside <sup>e)</sup> | bis 250 mg/L                         | +                     |
| Stone et al.(2009)      | Chlortetracyclin             | 27,0 mg/L, (11,6 mg/L) <sup>f)</sup> | ca. 28 %              |
|                         | Tylosin                      | ca. 35 mg/L <sup>g)</sup>            | -                     |
| Loftin et al.<br>(2005) | Sulfathiazol                 | 25 mg/L                              | 14/13 % <sup>h)</sup> |
|                         | Sulfamethazin                |                                      | 31/- %                |
|                         | Sulfadimethoxin              |                                      | -/44 %                |
|                         | Lincomycin                   |                                      | 30/33 %               |
|                         | Tylosin                      |                                      | 27/29 %               |
|                         | Chlortetracyclin             |                                      | 42/46 %               |
|                         | Oxytetracyclin               |                                      | -/-                   |
|                         | Tetracyclin                  |                                      | 54/47 %               |

<sup>a</sup> halbkontinuierliche Fütterung des Fermenters mit Substrat; <sup>b</sup> Hemmung nur bei höchster Konzentration; <sup>c</sup> in EU verboten; <sup>d</sup> nicht kritisch für den Biogasprozess; <sup>e</sup> als Gruppe zusammengefasst - Es wurden folgende Substanzen untersucht: Gentamicin, Hygromycin B, Kanamycin, Neomycin, Spectinomycin, Streptomycin; <sup>f</sup> Am Ende des Experiments – 82 Tage; <sup>g</sup> komplett abgebaut nach 109 Tagen; <sup>h</sup> Es wurden zwei Güllelagunen untersucht (A/B)  
- : keine Hemmung; +, ++ und +++: leichte, mittlere und starke Hemmung der anaeroben Fermentation.

Poels et al. (1984) konnten feststellen, dass Virginiamycin und Bacitracin lediglich in der höchsten Konzentration (16,7 mg/L bzw. 33,3 mg/L) einen Effekt auf die Methangas-

entstehung haben. Eine große Anzahl Antibiotika wurde von Massé et al. (2000) und Lallai et al. (2002) untersucht. Sie konnten zeigen, dass Tetracyclin und Penicillin nur leichte Effekte auf den Biogasprozess aufweisen und Oxytetracyclin (bis 250 mg/L), Tylosin, Sulfamethazin, Lincomycin und Carbadox keinen Einfluss auf den Fermentationsprozess haben.

Sanz et al. (1996) konnten eine z. T. sehr starke Hemmung der Gasbildung durch Antibiotika feststellen. So führte Chloramphenicol schon in recht niedrigen Konzentrationen (50 mg/L) zu einem kompletten Erliegen des anaeroben Fermentationsprozesses. Im Gegensatz zu Poels et al. konnten sie jedoch auch eine starke Hemmung der Gasbildung durch Chlortetracyclin beobachten. Loftin et al. (2005) bestätigten in Untersuchungen in Güllelagunen, dass verschiedene Antibiotika die Methanproduktion hemmen können. Stone et al. (2009) konnten in einer aktuellen Arbeit für Chlortetracyclin eine Hemmung der Methanproduktion zeigen. Zudem braucht der Fermentationsprozess unter Chlortetracyclin-Einfluss eine längere Zeit, um sich zu stabilisieren. Tylosin, unter gleichen Bedingungen untersucht, hatte keinen Einfluss auf die Methan-/CO<sub>2</sub>-Produktion.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Untersuchungen im Labormaßstab unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Einflüsse für verschiedene Antibiotika auf anaerobe Fermentationsprozesse zeigen. Dies könnte zum Teil auf die stark variierenden Testorganismen zurückzuführen sein. Die meisten Antibiotika haben jedoch, in Konzentrationen, die auch in realen Gülleproben gefunden werden, keinen Einfluss auf die Methanproduktion oder es kann zu einer gewissen Anpassung der Bakterien an das Substrat kommen (Sanz et al. 1996).

### **2.2.6 Berufliche Exposition**

Bakterienzellen und die Wirkorte von Antibiotika in ihnen unterscheiden sich deutlich von Säugerzellen. Daher sind Antibiotika für den Menschen in der Regel toxikologisch unbedenklich. Zytostatika hingegen wirken generell zytotoxisch auf alle Zellen und der Kontakt mit kleinsten Mengen sollte nach Angaben der IARC (1975, 1976, 1981, 1987) vermieden werden. Bei der Vorbereitung und Verabreichung dieser Arzneimittel lässt sich trotz moderner Ablufttechniken und sonstiger Schutzmaßnahmen ein Kontakt mit diesen toxikologisch relevanten Substanzen nicht vollständig vermeiden.

Im Jahr 1979 haben Falck et al. (1979) erstmals Urin von Krankenschwestern im bakteriellen Fluktuationstest auf Mutagenität untersucht. Dieses Verfahren diente als ein nicht selektiver Nachweis für das Vorhandensein von Zytostatika und die meisten Proben wiesen positive Testergebnisse auf. Allerdings zeigte der Urin von Patienten unter Chemotherapie eine signifikant höhere Mutagenität als der des Pflegepersonals. In der Humanmedizin sind seitdem zahlreiche Studien zur beruflichen Exposition mit Zytostatika veröffentlicht worden (Turci et al. 2003; Mason et al. 2005; Connor 2006; Sorsa et al. 2006; Tuerk et al. 2006; Yoshida et al. 2006; Hedmer et al. 2008). Sehr ausführlich wurden die Kontaminationsmöglichkeiten des Krankenhauspersonals über die Haut von Fransmann et al. (2005) untersucht. Dabei wurde die dermale Exposition über die Hände als wichtigster Weg identifiziert. Die verschiedenen Kontaminationswege für Pharmazeutisch Technisch Angestellte, Krankenschwestern in der Onkologie und Reinigungspersonal werden in der Arbeit schematisch dargestellt. Der stärkste Kontakt erfolgt beim Waschen der Patienten und dem Wechsel der Bettwäsche, da hier in der Regel keine Handschuhe getragen werden. Das Tragen von Handschuhen (sowohl Nitril als auch Latex; teilweise zweilagig) beim Waschen von Patienten verringert die Kontamination der Haut unter den Handschuhen um den Faktor vier und beim Wechsel der Bettwäsche nur um den Faktor 1,6. Die Ursache hierfür wurde jedoch nicht geklärt. Untersuchungen zur Durchlässigkeit verschiedener Handschuhmaterialien (Nitril, Latex, PVC, Polyurethan und Neopren) zeigten eine geringe Permeation für Zytostatika (Slevin et al. 1984; Connor 1999). Bei einer unmittelbar festgestellten Kontamination wird empfohlen, die Handschuhe sofort zu wechseln.

Die Ergebnisse von Fransman et al. werden indirekt durch den analytischen Nachweis von Zytostatika im Urin von Krankenschwestern von Pethran et al. (2003) bestätigt. So wurden bis zu 0,2 µg/L des Zytostatikums Epirubicin und 1,9 µg/L Ifosfamid im Urin der Krankenschwestern nachgewiesen.

In einer Studie von Meijster et al. (2006) wurden auch Bereiche außerhalb des Krankenhauses untersucht. So haben Mitarbeiter von mobilen Pflegediensten, die Patienten nach der Chemotherapie zu Hause weiterversorgen, ein vergleichbares Risiko mit Zytostatika in Kontakt zu kommen wie Krankenschwestern von Onkologiestationen. Des Weiteren kommen Mitarbeiter aus Wäschereien, in denen Krankenhausbettwäsche gereinigt wird,

in Kontakt mit Zytostatika. Hier ist die Inhalation der Wirkstoffe wahrscheinlich der primäre Kontaminationsweg.

Für den Bereich der Veterinärmedizin gibt es bisher nur wenige Studien. Sessink et al. (1993a) haben in einer Studie an Tierpflegern, die Cyclophosphamid an Labortiere verabreichten, kleine Mengen ( $0,7 \mu\text{g}/9\text{-}12 \text{ h}$ ) in deren Urin detektiert. Auch in Veterinärkliniken konnte an den Handschuhen von Tierärzten, die Infusionslösungen vorbereitet hatten, das Zytostatikum Carboplatin nachgewiesen werden. Mittels Wischproben an der Oberfläche des Bodens, der Türklinke, des Behandlungstisches und der Sicherheitswerkbank (Laminar flow cabinet) konnte eine Kontamination dieser Bereiche eindeutig festgestellt werden (Meijster et al. 2006).

### **2.2.7 Eintrag von Zytostatika in das häusliche Umfeld**

Viele Patienten verlassen heute die Krankenhäuser nach der Behandlung früher als noch vor einigen Jahren. Auch Chemotherapien können mittlerweile ambulant verabreicht werden und nach wenigen Stunden ist der Patient dann wieder in der häuslichen Umgebung. Das bedeutet aber auch, dass über die Ausscheidungen (Urin und Fäzes) der Patienten Zytostatika in das häusliche Umfeld gelangen. Diese Ausscheidungen werden jedoch zum größten Teil über das Abwassersystem entsorgt und gelangen so in die Kläranlagen. Zytostatika können ebenfalls über Schweiß oder auf andere Wege des dermalen Kontakts übertragen werden (Daughton und Ruhoy 2009). Wie bereits erwähnt, können bei der heimischen Pflege so Mitarbeiter von Pflegediensten oder auch Angehörige mit Zytostatika in Berührung zu kommen.

Ein besonderer Weg des Eintrags von Zytostatika in die häusliche Umgebung wird von Erjavec et al. (2001) beschrieben. Betroffene waren in diesem Fall allerdings Haustiere. Eine Frau, die sich einer Chemotherapie unterzog, fütterte ihre Katze und ihren Hund u. a. mit vorgekauem Fleisch und Füllungen von Schokoladenpralinen bei denen vorher durch Lutschen die Schokoladenhülle entfernt wurde. Beide Tiere verloren daraufhin ihre Haare, welche nach Beendigung der beschriebenen Fütterungsweise wieder nachwachsen.

Über den Eintrag von Zytostatika in die häusliche Umgebung durch Tiere, die eine Chemotherapie erhalten haben, sind bisher keine Studien bekannt. In der Regel verlassen

die Besitzer jedoch die tierärztliche Praxis mit ihren Tieren kurz nach der Behandlung. Insofern bestehen hierin Parallelen zur ambulanten Behandlung in der Humanmedizin.

### **2.3 Abbaubarkeit von Arzneimitteln**

Über die oben beschriebenen Wege gelangen Arzneimittel in die Umwelt und man kann mittlerweile von einer ubiquitären Verbreitung dieser „emerging contaminants“ im Wasserkreislauf und in Böden ausgehen (Boxall et al. 2003b). In diesen Kompartimenten können Substanzen eliminiert<sup>2</sup> werden, indem sie z. B. an organische oder anorganische Bestandteile sorbieren und entweder gar nicht oder nur mittels geeigneter Extraktionsmethoden analysiert werden können. Dies konnte bereits für einige Veterinärantibiotika, wie z. B. Tetracycline und Sulfonamide, die nach der Gülledüngung in Ackerböden gelangen, gezeigt werden. Tetracycline können an Huminstoffe und andere Bodenpartikel binden oder mit 2- und 3-wertigen Ionen (wie z. B. Calcium und Eisen) Komplexe bilden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Arzneimittel zumindest teilweise oder vollständig biologisch umgewandelt bzw. abgebaut werden. Unter Umständen können Mikroorganismen organische Substanzen wie Antibiotika u. a. zur Energiegewinnung und als Wachstumsbausteine verwenden. So konnten Dantas et al. (2008) zeigen, dass Bakterienisolate aus elf verschiedenen Böden in der Lage sind, mit Antibiotika als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es wurden 18 Antibiotika getestet, die das Wachstum von mindestens vier der isolierten Bodenbakterien fördern. Sechs Antibiotika konnten sogar das Wachstum aller untersuchten Bodenbakterienspezies fördern.

Die physikochemischen Eigenschaften und das Verhalten von Arzneimitteln in definierten Testsystemen können wichtige Hinweise zu einer Abschätzung eines möglichen Risikos für die Umwelt liefern. Kümmerer et al. haben das Verhalten bzw. die Abbaubarkeit vieler Antibiotika und Zytostatika in verschiedenen Testsystemen wie z. B. dem Closed Bottle Test (CBT) untersucht. Nach OECD Richtlinien steht dieser Test an erster Stelle zur Überprüfung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Substanzen. Er stellt im weitesten Sinne die Situation in einer Kläranlage nach, deren Schlamm auch als

---

<sup>2</sup> Die Begriffe Elimination, Abbau und Metabolit werden in der Literatur zum Teil sehr unterschiedlich verwendet. Von einer Elimination spricht man, wenn der Analyt nicht mehr detektiert werden kann; der Begriff Abbau wird verwendet, wenn ein Abbauprodukt nachgewiesen werden kann; und ein Metabolit entsteht, wenn eine Substanz durch einen biologischen Prozess transformiert wird (Längin et al. 2008).

Inoculum für den Testansatz verwendet werden kann. Über zwanzig untersuchte Antibiotika aus den verschiedenen Antibiotika-Klassen zeigen in diesen Testsystemen keine Abbaubarkeit. Nur Penicillin G lässt sich innerhalb von 28 Tagen bis zu einem Grad von 27 % abbauen sind (Kümmerer et al. 1996; Kümmerer et al. 1997; Steger-Hartmann et al. 1997; Al-Ahmad et al. 1999; Kümmerer et al. 2000; Al-Ahmad und Kümmerer 2001; Alexy et al. 2004). Auch Halling-Sørensen et al. stellten fest, dass die meisten der von ihnen untersuchten Antibiotika schwer abbaubar sind (Halling-Sørensen et al. 2000; Ingerslev und Halling-Sørensen 2000, 2001).

Vergleichbare Aussagen konnten nach der Durchführung ähnlicher Tests auch für Zytostatika gemacht werden (Kümmerer et al. 1997; Steger-Hartmann et al. 1997).

In Oberflächenwässern ist auch ein abiotischer Abbau via Hydrolyse oder auf photooxidativem Weg möglich. Aufgrund ihrer chemischen Strukturen und der häufigsten Applikationsart (oral) ist jedoch bei den meisten Pharmazeutika davon auszugehen, dass sie gar nicht oder zumindest nur geringfügig hydrolysierbar sind. Dies wurde in einer Studie von Lam et al. (2004), in der vergleichende Untersuchungen mit acht verschiedenen Arzneimitteln unter Lichtausschluss, unter Lichteinfluss und jeweils steril und unsteril durchgeführt wurden, bestätigt. Dabei konnte ein mikrobieller oder hydrolytischer Abbau ausgeschlossen werden. Nur Versuche unter Lichteinfluss zeigten einen Abbau der Testsubstanzen. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht bildet jedoch das Penicillin. Via Hydrolyse kann es zu einer irreversiblen Spaltung des Beta-Laktam-Ringes kommen, was auch zu einer Aufhebung seiner antimikrobiellen Wirkung führt (Hirsch et al. 1999).

Photodegradation durch Sonnenlicht in Seen oder sonstigen oberflächennahen Gewässern ist hingegen ein Weg, über den viele Arzneimittel-Klassen (Analgetika, Antiphlogistika, Antibiotika) möglicherweise abbaubar sind. In einer Studie aus der Schweiz konnte 1998 zunächst gezeigt werden, dass Diclofenacrückstände in einem See eliminiert wurden. Die Autoren schlossen auf einen photooxidativen Abbau und konnten unter Laborbedingungen auch einige Abbauprodukte nachweisen. Diese Abbauprodukte konnten jedoch unter den natürlichen Bedingungen im See nicht verifiziert werden (Buser et al. 1998). Allerdings können auch viele andere Parameter in der aquatischen Umwelt, wie Salzgehalt oder pH-Wert, den Abbau beeinflussen und wurden bereits in einigen Studien untersucht. So können z. B. Nitrationen die Photodegradation von Diclofenac, Sulfame-

thoxazol, Carbamazepin, und Clofibrinsäure beschleunigen (Andreozzi et al. 2003). Ein basischer pH-Wert erhöhte den Photoabbau von Amoxicillin leicht (Boreen et al. 2003; Andreozzi et al. 2004; Monteiro und Boxall 2010).

Im Trinkwasser werden verschiedene technische Methoden angewandt, um einen Abbau bzw. eine Elimination herbeizuführen. Hierzu zählen verschiedene Filtrierverfahren, Flockung und Oxidationsprozesse wie die Ozonierung. Jedoch ist bei der ausschließlichen Anwendung von Flockung und Sandfiltration keine komplette Elimination von eingetragenen Pharmazeutika zu erwarten. Da es aber bisher keine rechtlichen Vorgaben oder Höchstmengenregelungen zu Arzneimitteln in Trinkwasser gibt, sind Wasserwerke (noch) nicht zu weitergehenden Maßnahmen verpflichtet. In Deutschland und einigen anderen europäischen Ländern sind allerdings viele Wasserwerke bereits mit GAC (granular activated carbon), einem speziellen Filtrationsverfahren, ausgestattet, wodurch eine Kontamination des Trinkwassers mit Arzneimitteln weitestgehend verhindert werden kann (Heberer und Ternes 2006).

In Böden spielen Sorption und die damit verbundene geringere Mobilität der Substanzen eine große Rolle bei der Elimination. Viele Stoffe stehen damit einem photooxidativem Abbau nicht mehr zur Verfügung (Halling-Sørensen et al. 2002; Thiele-Bruhn 2003). Auch in dieser Matrix spielen Bedingungen wie Bodenbeschaffenheit, Temperatur und Feuchtigkeit eine große Rolle. In den meisten Studien wird auch die Wechselwirkung von Gülle bzw. Klärschlamm mit den Arzneimitteln berücksichtigt, da über diese Trägermedien die Arzneimittel vorrangig in die Böden gelangen.

Neuere Arbeiten deuten auf gebundene Rückstände oder eine so genannte Sequestrierung von Arzneimitteln in Böden hin. Dabei werden organische Substanzen in Bodenbestandteile eingebaut oder eingeschlossen und können nur unter bestimmten, teilweise drastischen Bedingungen wieder freigesetzt werden. Kreuzig und Hölting (2005) gehen im Falle des Sulfadiazins von gebundenen Rückständen aus, da bei  $C^{14}$ -Studien keine Mineralisierungsprodukte gefunden werden konnten. Eine Extraktion des Sulfadiazins u. a. mit Methanol/HCl oder Ethylacetat, war nicht möglich.

Mit wesentlich drastischeren Extraktionsmethoden (100 bar, 200 °C) gelang es jedoch Stoob et al. (2006) die Effektivität der Extraktion von Sulfonamiden (Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamethazin, Sulfadimethoxin) um den Faktor zwei bis sechs zu erhöhen. Vor allem die Erhöhung der Temperatur konnte die Extraktion verbessern. Dieser Effekt war



jedoch für Sulfamethoxazol nur minimal ausgeprägt. Da die Alterung der Böden bei der Sorption oder Sequestrierung eine große Rolle spielt, schlagen die Autoren vor, definierte Feldproben (Referenzboden) für Extraktionsversuche zu wählen. Förster et al. (2008) konnten mit ebenfalls sehr drastischen Extraktionsbedingungen (ASE – accelerated solvent extraction; 1000 MPa; 200 °C) in den Boden dotiertes Sulfadiazin nahezu quantitativ (ca. 80 %) wieder herauszulösen. In derselben Arbeit wurde im Vergleich eine Extraktion mittels Mikrowelle untersucht. Mit dieser Methode war es auch möglich, größere Probenmengen einzusetzen. Allerdings kann die Extraktionstemperatur nicht höher als 150 °C gewählt werden, da aufgrund der eingesetzten Teflontöpfe der entstehende Druck zu hoch wäre. Mit der Mikrowellenextraktion konnte in acht Tagen gealterten Böden bis zu 70 % Sulfadiazin wieder gefunden werden. Nach 218 Tagen Alterung konnten immerhin noch bis zu 45 % des dotierten Sulfadiazins wieder gefunden werden.

Diese Arbeiten unterstützten die Hypothese einer Sequestrierung des Sulfadiazins. Aufgrund seiner Extrahierbarkeit aus der Bodenmatrix kann somit nicht von einer kovalenten Bindung des Sulfadiazins z. B. an eine funktionelle Gruppe der Huminstoffe ausgegangen werden.

In Kapitel 2.2.5 wurde beschrieben, dass Antibiotika einen Effekt auf den anaeroben Gärprozess haben können. Mögliche Einflüsse der anaeroben Fermentation auf Antibiotika hingegen wurden bisher kaum untersucht. Für das Antibiotikum Oxytetracyclin konnte gezeigt werden, dass es bei der anaeroben Fermentation innerhalb von 64 Tagen bis zu 60 % eliminiert wird. Jedoch konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob es sich um einen Abbau handelt oder lediglich eine Sorption an organische Matrixbestandteile stattgefunden hat (Arikan et al. 2006). In einer anderen Arbeit konnte bei Untersuchungen zum Einfluss von Tylosin und Chlortetracyclin auf die anaerobe Fermentation eine Elimination von Tylosin innerhalb von 109 Tagen gezeigt werden. Die Konzentration von Chlortetracyclin halbierte sich hingegen innerhalb von 82 Tagen (von 27,0 mg/L auf 11,6 mg/L) und blieb danach relativ konstant bis zum Ende der Untersuchungen (225 Tage). Abbauprodukte wurden auch in diesen Untersuchungen nicht beschrieben (Stone et al. 2009).

## **2.4 Effekt von Arzneimitteln auf die Umwelt**

Einmal in die Umwelt gelangt, können Arzneimittel hier eine Wirkung auf Lebewesen entfalten, die einerseits den Wirkungsmustern in der Human- oder Tiermedizin entsprechen (z. B. Wirkungen von Antibiotika auf Mikroorganismen) oder es treten unerwartete Wirkungen („Nebenwirkungen“) mit zum Teil fatalen Auswirkungen auf die betroffenen Lebewesen auf.

Wie in Kapitel 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben, können Antibiotika über Abwasser (Humanmedizin) oder Gülle (Veterinärmedizin) in verschiedene Umweltkompartimente gelangen. Diese bieten eine Lebensgrundlage für eine große Anzahl an Mikroorganismen, die u. a. für den Abbau von organischen Stoffen verantwortlich sind. Somit sind sie essenziell für den Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorkreislauf. Die im Boden auch vorkommenden Antibiotika bakteriellen oder fungalen Ursprungs sind für das Gleichgewicht der Bakterienpopulation von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu diesen sind die meisten heute in der Humantherapie eingesetzten Antibiotika synthetisch oder semi-synthetisch hergestellt und damit viel stabiler und in der Regel nicht von Bakterien abbaubar (Kümmerer 2004b).

Therapeutisch eingesetzt, wirken Antibiotika bakteriostatisch oder auch bakterizid. Aber im Gegensatz zur Anwendung von Antibiotika in der Therapie, in der in der Regel nur ein bis zwei Antibiotika eingesetzt werden, wirkt auf die Bakterien in der Umwelt ein „Cocktail“ aus eingetragenen Substanzen. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in den Umweltkompartimenten liegen jedoch einige Größenordnungen niedriger als in der therapeutischen Anwendung (Kümmerer 2004b). Im Boden oder Wasser kann dieser Cocktail verschiedene Auswirkungen haben. Diese sind in einem Review von Ding und He (2010) zusammengefasst. So kann es zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation, zur Resistenzentwicklung oder zu einer Beeinflussung der ökologischen Funktion der Böden kommen.

Von besonderem und aktuellem Interesse ist die Resistenzproblematik. Antibiotikaresistenzen stellen ein enormes Problem dar, weil sie die Wirksamkeit von klinisch eingesetzten Antibiotika herabsetzen. Beispiele für schon vorhandene resistente Keime in der Humanmedizin sind der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und der Vancomycin-resistente enterococci (VRE). Inwieweit ein Transfer von Resistenzgenen von Bodenbakterien oder veterinärmedizinisch relevanten Bakterien auf Keime in

der Humanmedizin erfolgen kann, und ob resistente Keime aus der Veterinärmedizin somit einen Effekt auf den Menschen haben, konnte bisher allerdings nicht abschließend geklärt werden.

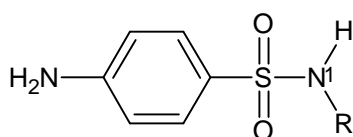
Zwei weitere und besonders gravierende Beispiele für die Effekte von Arzneimitteln in der Umwelt sind in den letzten Jahren publiziert worden.

Zum einen haben Studien u. a. aus Großbritannien gezeigt, dass Ethylestradiol, das in oralen Kontrazeptiva enthalten ist und über die Kanalisation letztendlich in die Vorfluter von Kläranlagen gelangt, zu einer „Feminisierung“ von Fischen in diesem Umweltkompartiment führen kann (Nash et al. 2004; Sumpter 2007). Auch das zweite Beispiel in diesem Zusammenhang zeigt, dass ein eigentlich für die Humanmedizin entwickeltes Schmerzmittel, Diclofenac, nach einer in Indien üblichen tiermedizinischen Anwendung zur Behandlung der hier heiligen Kühe, verheerende Auswirkungen in der Umwelt haben kann. In Indien sind mittlerweile verschiedene Geierarten sogar vom Aussterben bedroht, da sie über Vieh-Kadaver Diclofenac aufnehmen, welches für sie selbst in letaler Weise nephrotoxisch sein kann (Swan et al. 2006; Sumpter 2007).

## **2.5 Chemische Eigenschaften und Wirkungen von Sulfonamiden und Zytostatika**

### **2.5.1 Sulfonamide**

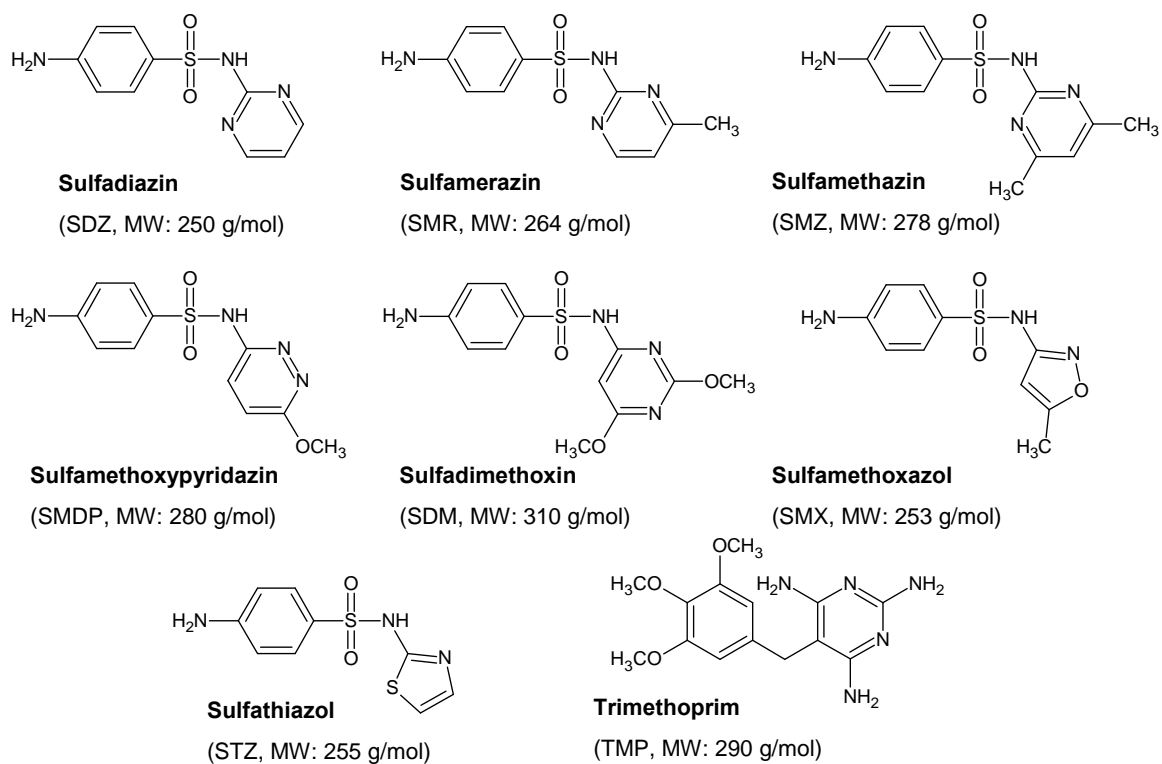
Sulfonamide stellen eine Gruppe von antibiotisch wirksamen Substanzen dar und gehören zu den Derivaten der aromatischen Sulfonsäuren. Sie waren die ersten Breitbandantibiotika, die industriell hergestellt wurden und sind daher auch unter der Bezeichnung „Chemotherapeutika“ klassifiziert. Alle Sulfonamide zeichnen sich durch eine gemeinsame Grundstruktur aus, die dem Sulfanilamid gleicht und am Amidstickstoff ( $N^1$ ) durch verschiedene heterocyclische Reste (R) substituiert wird (Abb. 2-2).



**Abb. 2-2. Grundgerüst der Sulfonamide – Durch die Variation des heterocyclischen Restes (R) kann die Wirkung gezielt beeinflusst werden.**

Sulfonamide wirken bakteriostatisch als Antimetaboliten, indem sie die Synthese der Folsäure, einem wichtigen Baustein in der bakteriellen DNA-, RNA- und Eiweißsynthese, hemmen. Sie verdrängen die p-Aminobenzoensäure, die für Bakterien zum Aufbau der Dihydrofolsäure essenziell ist.

Während in der Humanmedizin vor allem Sulfamethoxazol eingesetzt wird, finden in der Veterinärmedizin hauptsächlich Sulfamethazin und Sulfadiazin Anwendung. In der Regel werden Sulfonamide in Kombination mit Diamino-benzylpyrimidinen, hier vor allem Trimethoprim, eingesetzt (Verhältnis 1:5). In Abb. 2-3 sind die in der vorliegenden Arbeit untersuchten sieben Sulfonamide und Trimethoprim abgebildet (Mutschler et al. 2001; Kroker et al. 2002).



**Abb. 2-3.** Strukturformeln der Sulfonamide, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, und Trimethoprim. In Klammern ist die Abkürzung und das Molekulargewicht (MW) angegeben.

## 2.5.2 Vinca-Alkaloide

Vincristin und Vinblastin gehören zur Gruppe der Vincaalkaloide und kommen natürlich in Immergrün (*Catharanthus roseus*) vor. Sie gehören der Gruppe der Mitosehemmstoffe an und wirken durch die spezifische Bindung an Mikrotubuli. So verhindern sie die Bildung der mitotischen Spindel und die Trennung der Chromosomenpaare während der Zellteilung (M-Phase). Auf diese Weise führen sie zum Zelltod der Tochterzellen. Zusätzlich hemmen sie die DNA-Polymerase und inhibieren so die DNA-Biosynthese.

Chemisch zählen sie zu den dimeren Indol-Alkaloiden und bestehen aus einem Catharanthin- und einem Vindolin-Anteil, die in 3'- bzw. 10-Stellung miteinander verknüpft sind. Sie unterscheiden sich nur durch die Substituierung am N<sup>1</sup>-Stickstoffatom. Vinblastin besitzt einen Formyl- und Vincristin einen Methylrest (Römpp 2010). Trotz ihrer sehr ähnlichen Struktur unterscheiden sie sich deutlich in ihrem Wirkungsspektrum sowie in ihrer Pharmakokinetik und Toxizität. So ist Vincristin vorwiegend neurotoxisch, während Vinblastin das Knochenmark schädigt.

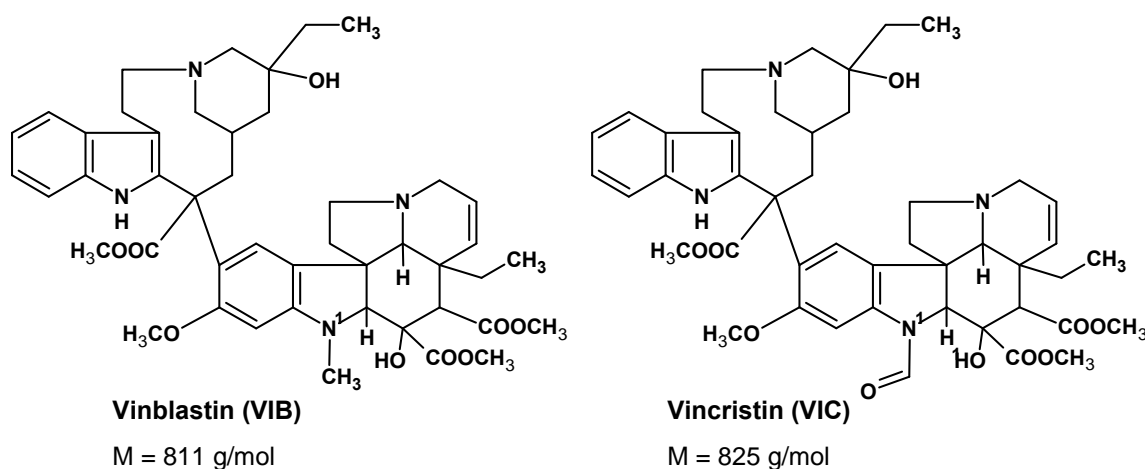
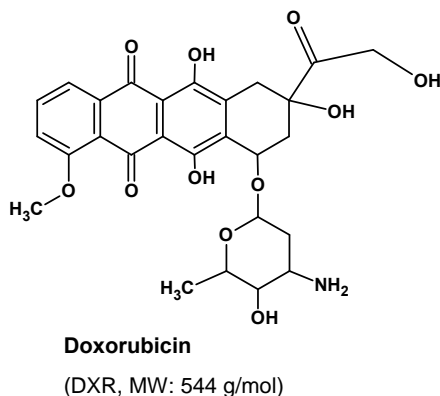


Abb. 2-4. Strukturformeln der Vincaalkaloide. In Klammern ist die Abkürzung und das Molekulargewicht (MW) angegeben.

Hinsichtlich ihrer Karzinogenität beim Menschen ordnet die IARC die Vincaalkaloide aufgrund der nicht ausreichenden Datenlage in Gruppe 3 ein, d. h. als nicht klassifizierbar hinsichtlich ihrer Karzinogenität beim Menschen. Darüber hinaus konnte für Vinblastin und Vincristin im Tierversuch eine teratogene Wirkung nachgewiesen werden (IARC 1987).

### 2.5.3 Doxorubicin

Doxorubicin zählt zu den zytostatisch wirkenden Antibiotika. Es gehört in chemischer Hinsicht zu der Gruppe der Anthracycline, die aus einem tetracyclischen Grundgerüst (Abb. 2-5), das an verschiedenen Positionen variiert sein kann, bestehen. Doxorubicin zeigt damit Strukturhomologie zu der Gruppe der Tetracycline, was sich z. B. in einem ähnlichen Extraktionsverhalten zeigt. Sowohl bei Doxorubicin als auch bei Tetracyclinen kann es daher bei der Probenvorbereitung u. a. zur Sorption an aktiven Oberflächen, z. B. in Glasgefäßen, kommen (De Jong et al. 1993; Hamscher et al. 2002).

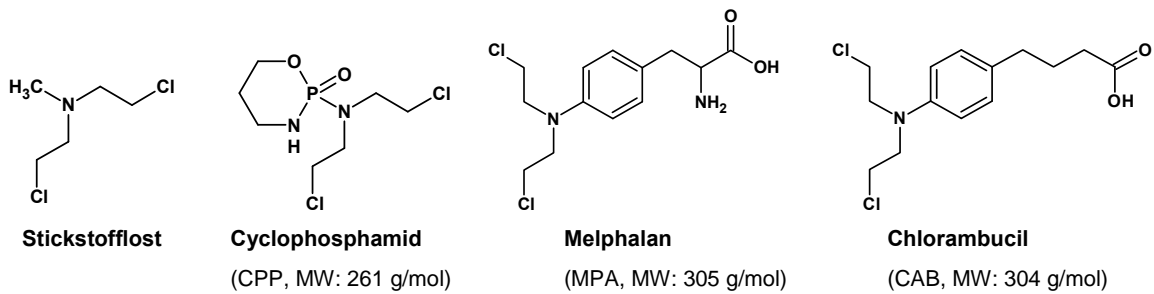


**Abb. 2-5. Strukturformel von Doxorubicin. In Klammern ist die Abkürzung und das Molekulargewicht (MW) angegeben.**

Doxorubicin weist eine starke zytotoxische Wirkung auf, die ihre stärkste Ausprägung in der S-Phase des Zellzyklus zeigt. Diese Wirkung beruht auf mehreren Mechanismen wie der Interkalation in die DNA (Hemmung der Nucleinsäuresynthese), der Induktion von Strangbrüchen (Hemmung der Topoisomerase II), der Biotransformation zu freien Radikalen (Hervorrufung von Doppelstrangbrüchen) und der Bindung an Bestandteile der Zellmembran (Erhöhung der Membranfluidität) (Mutschler et al. 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften wirkt Doxorubicin selber mutagen und karzinogen und wird von der IARC in Gruppe 2A, als wahrscheinlich karzinogen, eingestuft. Diese Einstufung besagt, dass es nicht genug Nachweise für eine Karzinogenität beim Menschen wohl aber beim Tier gibt (IARC 1987).

## 2.5.4 Stickstoff-Lost-Verbindungen

Cyclophosphamid, Melphalan und Chlorambucil gehören zur Gruppe der alkylierenden Zytostatika – im Besonderen zu den Stickstoff-Lost-Derivaten. Diese leiten sich von dem aus dem ersten Weltkrieg bekannten Kampfgas Stickstoff-Lost ab. Die cyclischen Substituenten am N-Atom bei den heute in der Chemotherapie eingesetzten Substanzen führen zu stabileren Verbindungen (Abb. 2-6).



**Abb. 2-6. Strukturformeln der Alkylantien. Zum Vergleich ist die Struktur der Ausgangssubstanz Stickstoff-Lost ebenfalls dargestellt. In Klammern sind die Abkürzung und das Molekulargewicht (MW) angegeben.**

Ihre Wirkung beruht vor allem auf der Alkylierung von Nucleinsäuren, wodurch Zellteilungsvorgänge empfindlich gestört werden können. Der Hauptvertreter dieser Substanzgruppe ist das Cyclophosphamid. Es ist eines der am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika weltweit. Cyclophosphamid selber ist ein Pro-Pharmakon. Der eigentliche Wirkstoff Phosphorsäureamid-Lost ist ein Metabolit, der erst durch die Biotransformation von Cyclophosphamid in der Leber entsteht und in der Lage ist, DNA zu alkylieren (Mutschler et al. 2001; Nohl 2002).

Cyclophosphamid, Melphalan und Chlorambucil wurden bezüglich ihrer Kanzerogenität von der IARC in Gruppe 1 eingestuft. Für diese Substanzen ist eine karzinogene Wirkung beim Menschen durch ausreichende Studien belegt (IARC 1975, 1987).

## **2.6 Analytik von Antibiotika und Zytostatika in biologischen Matrices**

### **2.6.1 Antibiotika in Gülle (Fermenterinhalt)**

Antibiotika werden vor allem im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung in tierischen Lebensmitteln analytisch bestimmt. Wenn kranke Tiere behandelt werden und z. B. die vorgeschriebenen Wartezeiten nicht eingehalten werden, kann es zu Rückständen oberhalb der Grenzwerte in Fleisch oder Milch kommen. Vielfach werden zunächst Schnelltests wie z. B. ein mikrobiologischer Hemmstofftest für Milch eingesetzt. Diese können zwar in gewissem Maße zwischen den verschiedenen Antibiotika-Klassen unterscheiden, allerdings ist der eindeutige Nachweis eines einzelnen Wirkstoffes sowie die Bestimmung der exakten Konzentration im Lebensmittel nicht möglich. Als eine Bestätigungsmethode, die auch den amtlichen Anforderungen im Sinne einer „gerichtsfesten“ Analyse entspricht, wird daher vor allem die HPLC-MS verwendet (Di Corcia und Nazzari 2002; Companyo et al. 2009).

Tiere, die mit Antibiotika behandelt werden, scheiden diese zum großen Teil nicht metabolisiert wieder aus. Die Exkremente von Schweinen oder Rindern stellen somit ein wichtiges Vehikel für den Eintrag von Antibiotika in die Umwelt dar (vgl. Kapitel 2.2.3).

Die qualitative und quantitative Analyse von Antibiotikarückständen in Gülle ist aufgrund der sehr komplexen Probenmatrix nur durch eine adäquate Probenvorbereitung möglich. Diaz-Cruz und Barcelo (2007) fassen verschiedene geeignete Verfahren für die Aufarbeitung von Umweltprobenmaterial zusammen. Aufgrund der vielen auch festen Bestandteile in Gülle bietet sich hier vor allem die Flüssig-Flüssig-Extraktion an (Haller et al. 2002; Hamscher et al. 2002). Um die Extraktionsausbeuten zu erhöhen und die Aufarbeitungszeit weiter zu reduzieren, wird heute auch die Pressurized Liquid Extraction (PLE, Druckextraktionssystem) eingesetzt (Jacobsen und Halling-Sorensen 2006).

Schon seit einigen Jahren werden Sulfonamide mittels HPLC-MS bestimmt (Diaz-Cruz und Barcelo 2007). Bis heute ist sie die Methode der Wahl für eine sensitive und selektive Bestimmung dieser Antibiotika-Klasse (Garcia-Galan et al. 2010).



## 2.6.2 Zytostatika in Urin, Serum, Speichel und Haaren

Für die Analytik von Zytostatika in Matrices wie Hunde-Urin, -Serum, -Speichel oder -Haar gibt es bisher keine umfassenden Studien. In nur einer Studie von Mazuel et al. (2003) wurde Doxorubicin in Hunde-Plasma untersucht. Es wurde eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt und validiert, um Plasmaproben von Hunden und Ratten, denen ein Doxorubicin-Peptidkonjugat intravenös verabreicht wurde, auf Doxorubicin und Leucin-Doxorubicin (den aktiven Metaboliten des Peptidkonjugats) zu untersuchen.

In der Humanmedizin wurden einige Studien zur beruflichen Exposition von Krankenhauspersonal mit Zytostatika durchgeführt und hierfür auch entsprechende Methoden entwickelt. Sottani et al. (z. B. 2008) haben die Exposition von Krankenhauspersonal in mehreren Arbeiten untersucht und dabei vor allem auf Cyclophosphamid, als am häufigsten eingesetztes Zytostatikum, in der Matrix Urin fokussiert. Zur Messung wurde hauptsächlich HPLC-MS eingesetzt. Einige Arbeiten setzten zur Messung von Cyclophosphamid auch Gaschromatographie ein, allerdings muss die Substanz im Rahmen der Probenvorbereitung derivatisiert werden (Sessink et al. 1993b; Steger-Hartmann et al. 1996; Kalthorn et al. 1999; Sannolo et al. 1999). In der Regel kommen als Probenvorbereitungsmethoden Flüssig-Flüssig-Extraktions- oder Festphasenextraktionsverfahren zum Einsatz. In den letzten Jahren wurden auch zunehmend Studien veröffentlicht, die verschiedene Zytostatika mithilfe von Multimethoden untersuchen.

Da unter anderem die Ernährung einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung von Urin und Serum hat, ist die Analytik von Zytostatika in Human-Matrices allerdings nicht ohne weiteres auf die Veterinärmedizin übertragbar.

### *Haare*

In den letzten Jahren hat die Möglichkeit der Analyse von Drogen in Haaren immer mehr an Bedeutung gewonnen und stellt mittlerweile eine wichtige Alternative zu den herkömmlichen Methoden in Urin und Serum/Plasma dar. Da viele pharmakologisch aktive Substanzen in Urin und Serum in der Regel nur über einen kurzen Zeitraum nachweisbar sind, stellt das Haar ein wichtiges Kompartiment dar, um gegebenenfalls auch einen länger zurückliegenden Missbrauch nachzuweisen. Darüber hinaus ist auch die Probenahme wesentlich unproblematischer (Thieme et al. 2000; Musshoff und Madea 2007).

Haare können allerdings nicht wie Urin, Serum oder Speichel über Festphasenextraktion oder Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeitet werden, da Arzneimittel in einer besonderen Art und Weise in die Haarstruktur integriert werden.

Auch in der Veterinärmedizin wurden einige Studien zur Verwendung der Haaranalyse bei der Feststellung von Dopingmitteln (z. B. Pferde) durchgeführt, oder auch zum Nachweis verbotener Substanzen – wie z. B. Clenbuterol – in der Nutztierhaltung (Gaillard und Pepin 1999; Nakahara 1999; Gratacos-Cubarsi et al. 2006; Gratacos-Cubarsi et al. 2007).

In der Haaranalytik muss die Probenvorbereitung ebenfalls besondere Beachtung finden. Gerade in der Drogenanalytik können auch äußere Kontaminationen der Haare eine Rolle spielen und müssen durch vorherige Waschprozeduren ausgeschlossen werden. Das Waschen wird mit organischen Lösungsmitteln, Detergentien und wässrigen Puffern vor der eigentlichen Extraktion durchgeführt (Nakahara 1999). Dabei besteht allerdings die Gefahr, dass bereits bei diesem Schritt ein gewisser Anteil der Substanzen aus dem Haar extrahiert wird.

Das eigentliche Extraktionsverfahren beinhaltet in der Regel eine längere Inkubation der Haare in einem geeigneten Extraktionsmittel. Hierzu können ein alkalischer, enzymatischer oder saurer Aufschluss eingesetzt werden. In seltenen Fällen werden auch organische Lösungsmittel verwendet. Beim alkalischen Aufschluss kann es auch zur vollständigen Hydrolyse der Haare kommen (Flanagan et al. 2007). Allerdings kann es dabei auch zur Hydrolyse der Analyten kommen (z. B. Kokain).

Um die Extrakte weiter aufzureinigen folgt in der Regel eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und/oder eine Festphasenextraktion.

### *Speichel*

Die Entnahme von Speichel ist eine weitere, nicht invasive Möglichkeit zur Probengewinnung, um z. B. einen eventuellen Drogenmissbrauch festzustellen oder DNA zu gewinnen. Im Gegensatz zu Urin kann die Gewinnung des Probenmaterials jedoch besser beaufsichtigt werden und ist somit weniger anfällig für Täuschungen (Flanagan et al. 2007). Allerdings sind die Probenvolumina im Vergleich zu Urin oder Serum deutlich geringer. Durch HPLC-MS und die damit verbundenen niedrigen Nachweisgrenzen wurde es möglich, Drogen und andere Substanzen in diesen geringen Volumina sehr

empfindlich nachzuweisen. (Drummer 2006; Langman 2007; Mullangi et al. 2009). Auch Hormone können so in geringen Konzentrationen in Speichel untersucht werden (Groschl 2008).

Besondere Aufmerksamkeit kommt der Probennahme auch in der Speichelanalytik zu. Es muss sichergestellt sein, dass keine Rückstände durch die orale Einnahme des Medikaments mehr vorhanden sind. Zur Probennahme wird dem Patienten eine speziell gefertigte Watte- oder Polyesterrolle zum Kauen in den Mund gegeben. Anschließend wird diese in ein spezielles Kunststoffröhrchen gegeben und abzentrifugiert (Flanagan et al. 2007).

Die Speichelsammlung bei Hunden stellt eine besondere Herausforderung dar. Es besteht die Gefahr, dass das Probenmaterial vom Tier verschluckt wird oder dass der Probenehmer gebissen wird. Auch mit einer Reduktion des Speichelflusses in dieser für den Hund ungewohnten Situation muss gerechnet werden. Eine aktuelle Arbeit beschreibt die Probennahme beim Hund zur Untersuchung von Cortisol. Hier wird eine Watterolle mithilfe einer Klammer für zwei Minuten im Maul des Hundes gehalten. Eine offene Dose Hundefutter, vor dem Hund platziert, soll dessen Speichelfluss anregen (Wenger-Riggenbach et al. 2010).

Es gibt nur wenige Arbeiten zur Bestimmung von Zytostatika in Speichel. Doxorubicin wurde u. a. von Maudens et al. (2009) in Humanspeichel analysiert. Die Studie wurde durchgeführt, um eine mögliche Korrelation der Arzneimittelgehalte in Plasma und Speichel zu ermitteln und die Patienten therapeutisch zu überwachen. Es zeigte sich jedoch, dass eine Abschätzung der Plasmakonzentration auf Basis der Speichelkonzentration nicht möglich ist.

## **2.7 HPLC-MS**

### **2.7.1 Allgemeines**

In der HPLC-MS wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie als universellem und empfindlichem Detektionsverfahren gekoppelt. Diese Kopplung erwies sich als nicht unproblematisch, da das HPLC-Fließmittel vollständig entfernt und die Analyten gleichzeitig in ionisierte Teilchen überführt werden müssen bevor sie in den Vakuumbereich des Massenspektrometers geleitet werden können. Mit

der Entwicklung von APCI- (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) und ESI-Interfaces (Electrospray-Ionisation) Ende der 1980er Jahre gelang es, das Fließmittel unter Atmosphärendruck effizient zu verdampfen und dabei auch den Analyten zu ionisieren. Mittlerweile hat die HPLC-MS unzählige Anwendungen gefunden, da diese Methode den sensitiven und selektiven Nachweis zahlreicher nichtflüchtiger Analyten mit geringer bis hoher Polarität in einem großen Massenbereich erlaubt (Ardrey 2003; Antignac et al. 2005; Rubio und Perez-Bendito 2009).

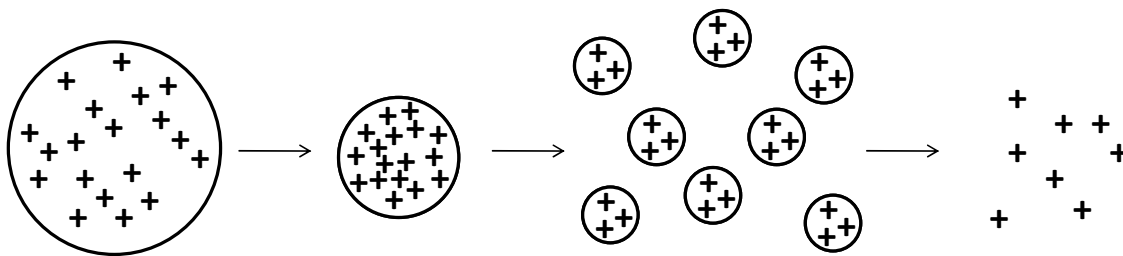
### **2.7.2 HPLC**

Die dem Massenspektrometer in der Kopplung vorgeschaltete Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) dient der Auftrennung des injizierten Analytgemisches. In der modernen HPLC stehen hierfür verschiedene Säulenmaterialien zur Verfügung. Normalphasen und Umkehrphasen (engl. Reversed-Phase) sind die am häufigsten eingesetzten Phasen (Schwedt und Vogt 2010). In der Regel werden, sowohl in der Normal- als auch in der Umkehrphasen-Chromatographie, so genannte chemisch gebundene Phasen eingesetzt. Etwa zwei Drittel der heutigen flüssigkeitschromatographischen Trennprobleme lassen sich mit der Umkehrphasen-Chromatographie lösen (Schwedt 2008). So werden auch für die Analytik von Pharmazeutika in Umweltproben vorwiegend Umkehrphasen eingesetzt (Petrovic et al. 2005). Diese Phasen werden durch chemische Modifikation der Silanolgruppen von Kieselgel mit langkettigen Alkylsilanliganden (z. B. C18) hergestellt und weisen daher sehr unpolare Eigenschaften auf. Als organischer Anteil der mobilen Phasen kommen in der Umkehrphasen-Chromatographie polare Lösungsmittel wie z. B. Methanol und Acetonitril zum Einsatz. Häufig werden diese in Gradientensystemen in Kombination mit wässrigen Puffersystemen verwendet. In der Kopplung mit der MS ist der Einsatz der Puffersubstanzen jedoch limitiert. Es können nur leicht flüchtige Komponenten wie z. B. Ammoniumacetat verwendet werden. Phosphathaltige Puffersysteme, die z. B. in der HPLC mit UV-Detektion als Fließmittel eingesetzt werden, können somit nicht auf HPLC-MS-Methoden übertragen werden.

### **2.7.3 Ionisation**

Der Prozess der Ionisation des Analyten in der Elektrospraytechnik (ESI) ist hochkomplex und bisher noch nicht vollständig verstanden. Durch eine Metallnadel gelangt

der Flüssigkeitsstrom von der HPLC in die Elektrospray-Quelle. Beim Austritt aus der Metallnadel entstehen durch einen Stickstoffstrom und eine angelegte Hochspannung (3-5 kV) zwischen Nadel und Kapillare kleine Flüssigkeitstropfen. In diesen Tropfen befinden sich die Ionen der Analyten aber auch etwaige Matrixbestandteile. Auf dem folgenden Weg dieser Tropfen durch die Kapillare verdampft nach und nach das Lösungsmittel wodurch es aufgrund der entstehenden Ladungsabstoßungen zu Coulomb-Explosionen (Abb. 2-7) kommt. So werden die Tropfen immer kleiner bis schließlich kein Lösungsmittel mehr vorhanden ist und alle Analytionen in die Gasphase übergegangen sind. Die Ionen gelangen durch eine weitere elektrische Fokussierung schließlich in den Vakuumbereich des Analysators (z. B. Ionenfalle) und können dort analysiert werden (Ardrey 2003).



**Abb. 2-7. Coulomb-Explosion in der Elektrospray-Ionisation (ESI) im Positiv-Modus. Durch Verdampfung des Lösungsmittels verdichten sich die positiven Ladungen an der Tropfenoberfläche und es kommt zu Coulomb-Explosionen bei denen kleinere Tropfen bzw. einzelne Ionen (als + dargestellt) in der Gasphase entstehen.**

Durch Matrixbestandteile, die ebenfalls in der Probenlösung enthalten sein können, kann es zu Störungen der Ionisation kommen, die sich als Signalunterdrückungen oder -verstärkungen bemerkbar machen. Die Matrixbestandteile konkurrieren dabei in den Tropfen mit den Analytionen um die Tropfenoberfläche, um in die Gasphase überzugehen. Dadurch gelangen auch Matrixbestandteile in die Falle, in der jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Ionen aufgenommen werden kann, und reduzieren den Anteil der Analytionen in der Falle (McLuckey et al. 1994). Die Signale eines Analyten in der Probe und in einem matrixfreien Standard können sich somit signifikant unterscheiden (Stüber und Reemtsma 2004). Letztendlich können Matrixeffekte sogar dazu führen, dass Analyten nicht detektiert werden, weil ihr Signal vollständig unterdrückt wird (Antignac et al. 2005).

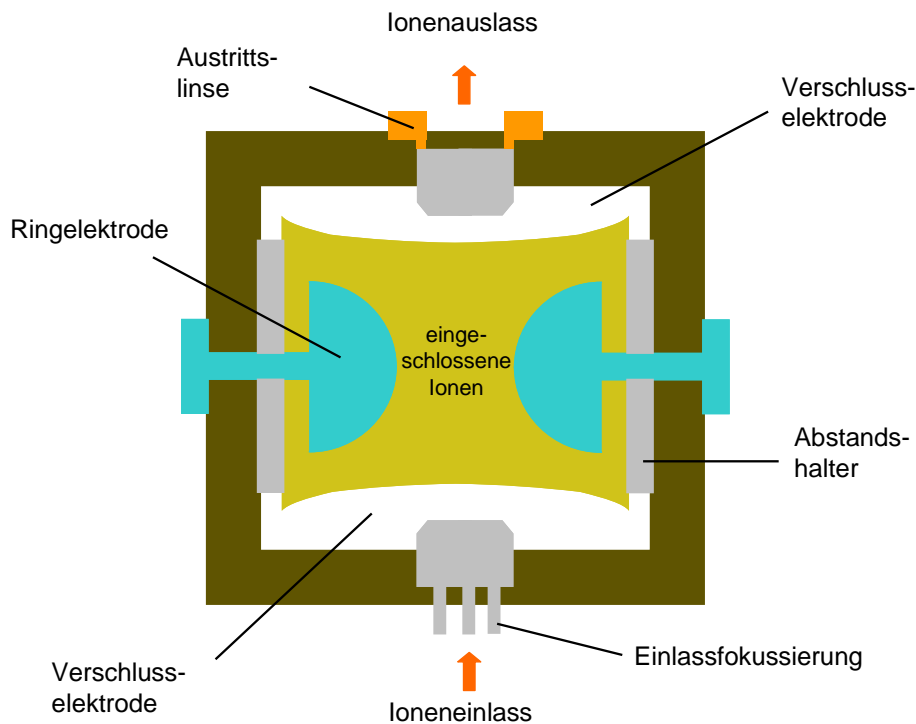
Es gibt verschiedene Ansätze, diese Matrixeffekte zu minimieren. Zum einen kann der Anteil an Matrixbestandteilen durch eine bessere Probenvorbereitung reduziert werden. Des Weiteren kann das Injektionsvolumen reduziert werden, was allerdings in der Regel auch mit einer Verringerung der Sensitivität verbunden ist. Die Verwendung eines isotonenmarkierten Standards gilt heute in der Analytik von Pharmazeutika in biologischen Matrices als die beste Methode, um Matrixeffekte in der LC-MS zumindest zu kompensieren. Dies setzt allerdings eine ausreichende und nicht durch Matrixeffekte gestörte Ionisierung sowohl des Analyten als auch des internen Standards voraus. Außerdem sind interne Standards sehr teuer und auch nicht für alle Analyten erhältlich (Stüber und Reemtsma 2004). Liang et al. (2003) konnten sogar nachgewiesen, dass Analyt und isotonenmarkierter Standard zu einer gegenseitigen Unterdrückung ihrer Signale führen können.

#### **2.7.4 Ionenanalyse**

In der Massenspektrometrie gibt es sehr unterschiedliche Verfahren zur Ionenanalyse. Zur Zeit sind Geräte, die auf der Triple-Quadrupol- oder Ionenfallen-Technologie beruhen, die am häufigsten eingesetzten Messsysteme (Rubio und Perez-Bendito 2009). Ionenfallen-Massenspektrometer werden insbesondere in der Umweltanalytik vielfältig eingesetzt (Rubio und Perez-Bendito 2009). So ist die Strukturaufklärung unbekannter Substanzen (z. B. Metaboliten) auch im Spurenbereich möglich. Bei Basislinientrennung der Analyten ist ebenfalls eine Quantifizierung in niedrigen Konzentrationsbereichen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich) möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer (Abb. 2-8) eingesetzt, weshalb im Folgenden auf diese Technik näher eingegangen wird.

Im Gegensatz zu einem Triple-Quadrupol-System werden in Ionenfallen die von der Quelle (ESI oder APCI) gelieferten Ionen diskontinuierlich isoliert und weiter verarbeitet. Über eine elektronische Steuerung am Ioneneinlass wird die Anzahl der eingelassenen Ionen optimiert. In der Ionenfalle, die aus einer Ringelektrode und weiteren Elektroden besteht, werden die Ionen gefangen und bewegen sich in einem elektrischen Feld auf einer stabilen (Kreis-)Bahn. Durch systematische Änderungen der angelegten elektrischen Spannungen an der Ringelektrode werden die Ionen sukzessive

aus der Falle zum Detektor geleitet. Durch dieses System besteht die Möglichkeit, komplette Massenspektren aufzuzeichnen (Full scan modus).



**Abb. 2-8. Ionenfalle.** Nach dem Einlass in die Ionenfalle (Aufsicht) bewegen sich die Ionen auf einer stabilen Bahn bis eine bestimmte Spannung an der Ringelektrode angelegt wird. Durch diese Spannung werden Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses auf ihrer Bahn instabil und werden durch die Austrittslinse zum Detektor geleitet. Eine systematische Variierung der Spannung führt zu kompletten Massenspektren.

Aufgrund der Besonderheit der Ionenfalle ist es auch möglich, Ionen einer bestimmten Masse in der Falle zu sammeln. Dieses sind aufgrund der „weichen“ Ionisationsmethode, ESI, in der Regel Molekülionen und werden auch Vorläuferionen genannt. Mittels zusätzlicher Energie aus den Verschluss-elektroden kommt es zu Kollisionen zwischen den Ionen und mit, in die Falle kontinuierlich eingeleiteten, Heliumatomen (Creaser und Stygall 1998). Diese Kollisionen führen zu so genannten Tochterionen (oder Fragmentionen). Diese Tochterionen werden wie oben beschrieben sukzessive aus der Falle an den Detektor geleitet, ihre Intensitäten registriert und daraus ein MS/MS-Spektrum generiert. Auch MS/MS-Tochterionen einer bestimmten Masse können wiederum isoliert werden und zu so genannten Enkeltochterionen fragmentiert werden. Dies führt zu  $MS^3$ -Spektren. So sind theoretisch  $MS^{10}$ -Spektren darstellbar. Allerdings

werden in der Praxis meistens MS/MS und in seltenen Fällen auch MS<sup>3</sup>-Verfahren eingesetzt.

Aufgrund der diskontinuierlichen Abarbeitung des Ionenstroms sind die Datenpunkte des Analyten nicht gleichmäßig über einen Peak verteilt. Anstieg und Abfall eines Peaks sind durch wenige Datenpunkte gekennzeichnet, die Spitze eines Peaks durch mehr Datenpunkte, was hinsichtlich der Quantifizierung einen prinzipiellen Nachteil der Ionenfallen-Technologie darstellt. Allerdings liefern Ionenfallen für jeden Datenpunkt ein komplettes MS/MS-Spektrum nahezu ohne Sensitivitätsverluste. Dies ist insbesondere für die Absicherung von Rückstandsbefunden ein großer Vorteil. Hierdurch kann im Vergleich zum Triple-Quadrupol-System auch eine höhere Selektivität erreicht werden, da in diesen Geräten in der Regel nur zwei Massenübergänge detektiert werden. Bei der Beschränkung auf nur einen Massenübergang (Selected Reaction Monitoring - SRM) kann mit einem Triple-Quadrupol-Gerät im Vergleich zu einer Ionenfalle daher um ca. ein bis zwei Größenordnungen sensitiver detektiert werden (*ThermoQuest 2000*).



### 3 Forschungsbedarf

In den letzten Jahren wurden bereits viele Eintragswege von Human- und Tierarzneimitteln in die Umwelt und auch eine mögliche Exposition des Menschen durch Arzneimittelrückstände aus verschiedenen Umweltkompartimenten aufgezeigt. Hierzu kamen neben selektiven Probenvorbereitungsverfahren auch leistungsfähige HPLC-MS-Methoden zum Einsatz.

Im Bereich der Tierarzneimittel wurde in jüngster Zeit auch das Eliminationsverhalten von Antibiotika in Gülle und Boden untersucht. Bisher ist jedoch wenig darüber bekannt, ob und wie die Substanzen sorbiert oder auch abgebaut werden können. Daraus ergab sich folgender Forschungsbedarf für die vorliegende Arbeit:

- Da Gülle in Biogasanlagen als Substrat eingesetzt wird, sollten geeignete analytische Verfahren zur Bestimmung von Sulfonamiden in Gärsubstrat entwickelt werden. Mit diesen Methoden sollte dann die Elimination von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation untersucht werden.

Neben diesen Untersuchungen stellte sich durch die Zunahme von Chemotherapien in der Veterinärmedizin die Frage, wo die eingesetzten Zytostatika nach der Therapie verbleiben. In diesem Zusammenhang sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Durch Chemotherapien in der Veterinärmedizin kann eine toxikologisch hochrelevante Substanzklasse in Tierarztpraxen und das häusliche Umfeld der Patientenbesitzer gelangen. Bisherige Leitlinien für den Umgang mit Hunden in der Chemotherapie sind vor allem aus humanmedizinischen Studien abgeleitet. Für Hunde-Urin und -Serum gibt es bisher keine geeigneten analytischen Methoden, um veterinärmedizinische Chemotherapeutika zu erfassen und damit einen ersten Beitrag zur Bewertung eines Risikos durch ihre Verwendung zu leisten. Insofern sollte im Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-MS-Multimethode entwickelt werden, die die Bestimmung der wichtigsten Zytostatika der Veterinärmedizin gewährleistet. Die Methode sollte dann zur Untersuchung von Urin- und Serumproben von Chemotherapie-Patienten der Kleintierklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingesetzt werden.

Darüber hinaus sind bei Haustieren möglicherweise noch zwei weitere Matrices von Bedeutung.

- Zum einen ist für den Hund die Schnauze eine Möglichkeit, um sich mit seiner Umgebung auszutauschen. So kann es möglicherweise leicht zum Kontakt mit Hundespeichel für den Besitzer kommen (z. B. durch Lecken). Insofern stellt Speichel eine weitere potenzielle Kontaminationsmöglichkeit mit Zytostatika dar. Daher erschien es sinnvoll, auch eine Methode zur Untersuchung von Speichelproben zu entwickeln und damit Proben von Chemotherapie-Patienten zu untersuchen.
- Hunde wechseln – mit Ausnahme weniger Rassen – zweimal im Jahr das Fell. Wie bereits aus der Drogenanalytik bekannt ist, sind Haare eine Matrix, in der man auch lange Zeit nach der Einnahme von illegalen Substanzen einen Missbrauch nachweisen kann. Die Analytik von Haarproben unterscheidet sich – insbesondere hinsichtlich der Bereitstellung von Referenzproben und der Probenvorbereitung – jedoch deutlich von der Analytik in anderen Matrices. Es sollte daher eine geeignete Methodik entwickelt werden, um Proben von Chemotherapie-Patienten untersuchen zu können.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikationen

#### 4.1.1 Elimination von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation (Biogasanlage)

(siehe Publikation 1: Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy?)

Ein wesentlicher Teil der Arbeit bestand in der Entwicklung eines HPLC-MS-Verfahrens zur Bestimmung von Sulfonamiden und Trimethoprim in Fermenterinhalt von Biogasanlagen. Der Fermenterinhalt stellt eine komplexe Matrix dar, die aus sehr unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt sein kann. Neben anderen organischen Abfällen kann der Anteil an Gülle bis zu 30 % betragen. Mit dieser können dann z. B. Antibiotika aus der Behandlung von Nutztieren in die Fermenter gelangen.

Im Rahmen eines Projekts „Entwicklung eines mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen“ sollte unter anderem der Einfluss von Antibiotika auf den Biogasprozess untersucht werden. Hier wurde festgestellt, dass Sulfonamide den Prozess erst ab relativ hohen Konzentrationen stören (ca. 750 mg/kg Sulfadiazin; 150 mg/kg Sulfamethazin). Jedoch ergaben sich in den ersten Fermentationsversuchen Hinweise darauf, dass sich Sulfadiazin nahezu vollständig eliminieren bzw. abbauen lässt. Daraufhin wurde in der in Publikation 1 veröffentlichten Studie der Einfluss der anaeroben Fermentation auf fünf weitere Sulfonamide und Trimethoprim in Fermentern im Labormaßstab untersucht. In zwei 5-L-Fermentern wurden 2 bzw. 10 mg von jedem Sulfonamid in Kombination mit Trimethoprim (Verhältnis 1:5 zur Gesamtmasse der Sulfonamide) für vier Wochen fermentiert. In 500 mL Kolben wurden ergänzende Kontroll-Experimente durchgeführt. Aufgrund der kleineren Ansatzgröße wurden Proben nur vor und nach der Gärung entnommen.

Nach einer einfachen aber effizienten Probenvorbereitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde die HPLC-MS zur Messung der wöchentlich gezogenen Proben eingesetzt, um das Eliminationsverhalten der verschiedenen Sulfonamide zu verfolgen.

Bei jedem Gärttest wurde parallel zu den eigentlich zu testenden Substanzen ein Gärttest als Blindwert durchgeführt. In diesem Gärttest wurde Gülle von nicht mit Sulfonamiden behandelten Tieren eingesetzt. Dieses Gärsubstrat wurde auch als Leermatrix für Validierungszwecke verwendet.

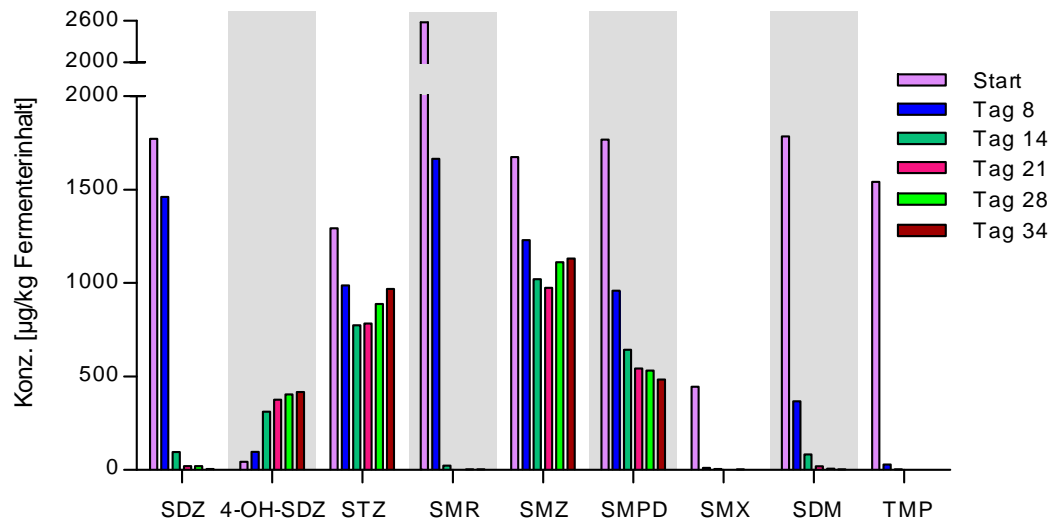
Für die Analyse der Sulfonamide konnte auf eine im Labor etablierte Methode zurückgegriffen werden (Hamscher et al. 2005) und diese für die Matrix Fermentersubstrat sowie für Trimethoprim, als weiteren Analyten, angepasst werden. Für Trimethoprim konnte zwar der gleiche Gradient in der HPLC verwendet werden, allerdings musste aufgrund der Koelution mit Sulfathiazol und Sulfamerazin eine 2. HPLC-Trennung durchgeführt werden.

Für Wiederfindungsversuche wurde Fermenterinhalt aus den Gärttestblindwerten zunächst mit Standardlösung dotiert und eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei einem pH Wert von 4,7 durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein erhöhter pH-Wert im alkalischen Bereich günstiger für die Extraktion von Trimethoprim ist. Allerdings verschlechtern sich die Wiederfindungsraten für die Sulfonamide je höher der pH-Wert gewählt wurde. Somit wurde ein mittlerer pH-Wert von 5,0 gewählt, der zwar zu niedrigen Wiederfindungsraten (26,6 %) für Trimethoprim führt, aber die Wiederfindungsraten für die Sulfonamide noch nicht reduziert. Da die Variationskoeffizienten des Gesamtverfahrens  $< 20\%$  lagen, konnte die niedrige Wiederfindung für Trimethoprim akzeptiert werden.

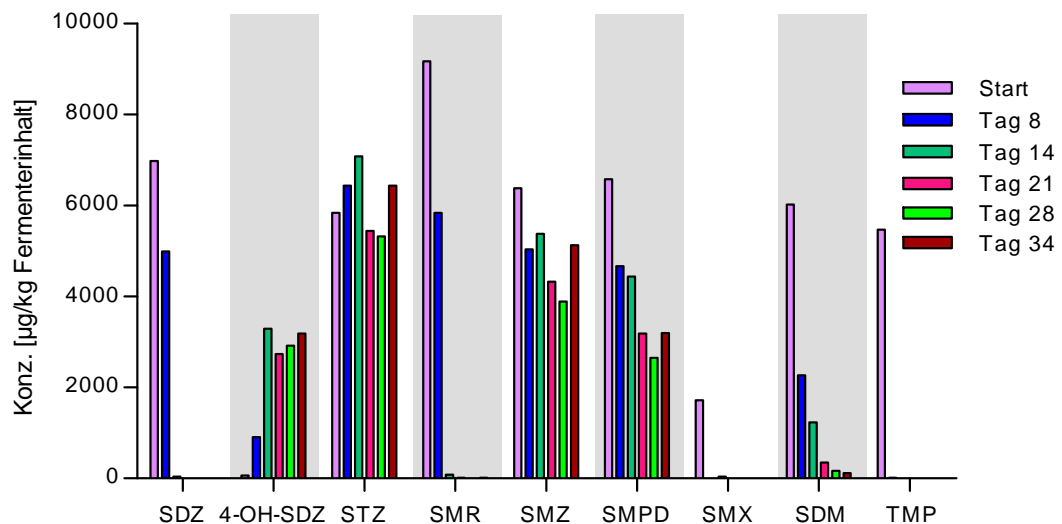
Mit der so entwickelten Methode war es letztendlich möglich, die Konzentrationen der untersuchten Sulfonamide während des Verlaufs der Fermentation in relativ kleinen Probenmengen (1 g) zu verfolgen. Dies war wichtig, um die unter anaeroben Bedingung stattfindende Fermentation zu den Probennahmezeitpunkten an Tag 7, 14, 21 und 28 nicht zu stören.

Beide großen Fermentatoren ergaben sehr ähnliche Ergebnisse (2 mg und 10 mg) (Abb. 4-1 und Abb. 4-2). So konnte gezeigt werden, dass durch den Prozess der anaeroben Fermentation mit Gülle eine Elimination von vier der sieben Sulfonamide möglich ist. Sulfadiazin und Sulfamerazin sind zwar nach einer Woche noch  $> 50\%$  im Gärsubstrat vorhanden; nach zwei Wochen sind jedoch nur noch minimale Konzentrationen zu detektieren. Sulfamethoxazol hingegen ist schon zum großen Teil direkt

nach Dotierung eliminiert. Sulfadimethoxin zeigt eine starke (> 70%) Elimination schon innerhalb der ersten Woche.



**Abb. 4-1.** Elimination der Sulfonamide im 5 L Fermentor – Anfangskonzentration 2 mg/kg Gülle.  
 SDZ = Sulfadiazin, 4-OH-SDZ = 4-OH-Sulfadiazin, STZ = Sulfathiazol,  
 SMR = Sulfamerazin, SMZ = Sulfamethazin, SMPD = Sulfamethoxyipyridazin,  
 SMX = Sulfamethoxazol, SDM = Sulfadimethoxin, TMP = Trimethoprim.



**Abb. 4-2.** Elimination der Sulfonamide im 5 L Fermentor – Anfangskonzentration 10 mg/kg Gülle.

Im Gegensatz dazu werden Sulfathiazol, Sulfamethazin und Sulfamethoxyipyridazin nur geringfügig eliminiert. Diese Elimination findet zum größten Teil schon direkt nach der Dotierung des Gärsubstrats mit den Sulfonamiden statt. Die Konzentrationen von Sulfathiazol und Sulfamethazin bleiben über die gesamte Fermentation relativ stabil; die Konzentration von Sulfamethoxyipyridazin pendelt sich auf etwa einem Viertel der Ausgangskonzentration ein. In Tab. 4-1 ist die relative Elimination der sieben Sulfonamide in Bezug auf ihre Anfangskonzentration über einen Zeitraum von 34 Tagen angegeben. Hier sind auch die Werte der zusätzlich durchgeführten Blindwerte, bei denen nur Proben am Anfang und am Ende genommen werden konnten, mit einbezogen.

**Tab. 4-1. Elimination der sieben Sulfonamide und Trimethoprim und Zunahme des Sulfadiazin-Metaboliten bei anaerober Fermentation – angegeben in Prozent der Anfangskonzentration. Mittelwerte aus zwei/fünf<sup>a</sup> Versuchsansätzen (10 und 2 mg/kg Sulfonamid). (entnommen aus Publikation 1).**

| □□SDZ         | SDZ                | SDZ-<br>MB         | STZ                | SMR                | SMZ                | SMDP               | SMX                | SDM                | TMP                |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Start</b>  | 100,0 <sup>a</sup> | 8,0 <sup>a</sup>   | 100,0 <sup>a</sup> | 100,0 <sup>a</sup> | 100,0 <sup>a</sup> | 100,0 <sup>a</sup> | 100,0 <sup>a</sup> | 100,0 <sup>a</sup> | 100,0 <sup>a</sup> |
| <b>Tag 8</b>  | 77,0               | 25,9               | 93,3               | 64,1               | 76,2               | 62,6               | 1,3                | 29,1               | 1,1                |
| <b>Tag 14</b> | 2,9                | 89,1               | 90,6               | 0,9                | 72,6               | 51,9               | 1,5                | 12,5               | 0,1                |
| <b>Tag 21</b> | 0,6                | 87,8               | 76,9               | 0,1                | 63,0               | 39,5               | 0,2                | 3,4                | 0,0                |
| <b>Tag 28</b> | 0,6                | 94,2               | 79,9               | 0,1                | 63,7               | 35,2               | 0,4                | 1,6                | 0,0                |
| <b>Tag 34</b> | 0,1 <sup>a</sup>   | 100,0 <sup>a</sup> | 103,3 <sup>a</sup> | 0,0 <sup>a</sup>   | 100,0 <sup>a</sup> | 27,7 <sup>a</sup>  | 0,1 <sup>a</sup>   | 0,4 <sup>a</sup>   | 0,0 <sup>a</sup>   |

Für Sulfadiazin konnte ein Metabolit charakterisiert und identifiziert werden. Mithilfe der HPLC wurde die Substanz isoliert und die antimikrobielle Aktivität mit einem mikrobiologischen Hemmstofftest (Brillantschwarz-Reduktionstest) geprüft. Der Metabolit weist im Vergleich zur Muttersubstanz eine um ca. 90 % reduzierte antimikrobielle Aktivität auf. Somit kann in diesem Fall zumindest von einem beginnenden Abbau der Muttersubstanz gesprochen werden. Mit verschiedenen strukturaufklärenden Verfahren, wie MS<sup>3</sup> und TOF-Massenspektrometrie wurde der Metabolit als 4-OH-Sulfadiazin identifiziert.

Bei den übrigen untersuchten Sulfonamiden sowie Trimethoprim kann hingegen bisher nur von einer Elimination gesprochen werden, da wahrscheinlich starke Sorptionsprozesse dazu führen, dass die Analyten mit herkömmlichen Extraktionsverfahren nicht

mehr nachgewiesen werden können und trotz gezielter Suche bisher keine weiteren Metaboliten identifiziert wurden.

Die anaerobe Fermentation stellt somit ein Verfahren dar, mit dem das in der Veterinärmedizin häufig eingesetzte Sulfadiazin zumindest teilweise abgebaut werden kann.

#### **4.1.2 Zytostatika-Rückstände in Hunde-Urin**

(siehe Publikation 2: Determination of Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anti-Cancer Chemotherapy by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Is There An Environmental or Occupational Risk? und

Publikation 3: Cytotoxic Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy)

Spielen in der Nutztierhaltung in erster Linie Antibiotika eine große Rolle, so sind in der Kleintiermedizin fast alle Arzneimittelbereiche, die auch in der Humanmedizin zum Einsatz kommen, vertreten. Denn vor allem Katzen und Hunde nehmen in der heutigen Zeit immer mehr den Status eines Familienmitglieds ein, dem die bestmögliche Versorgung zukommen soll.

In der vorliegenden Studie sollte daher das Eintragsverhalten von Zytostatika in die Umwelt bzw. in die nähere (häusliche) Umgebung, einer im Vergleich zu Antibiotika toxikologisch wesentlich relevanteren Arzneimittelgruppe untersucht werden.

Eine Möglichkeit, wie Zytostatika durch Tiere in das unmittelbare Umfeld des Besitzers gelangen können, ist über den Urin. Um die Zytostatikagehalte in Hunde-Urin zu analysieren wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat getestet. Es wurden Puffer mit verschiedenen pH-Werten, vor allem im alkalischen Bereich, und verschiedene Extraktionsmittel geprüft. Ziel war es, in Anlehnung an die Entscheidung der Kommission (Europäische Kommission 2002), Wiederfindungen im Bereich zwischen 70 -100 % mit Variationskoeffizienten < 20 % zu erzielen.

Die besten Ergebnisse konnten mit Dichlormethan als Extraktionsmittel bei einem pH-Wert von 9,5 (1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) erzielt werden. Für die Ermittlung der Messparameter zur Analyse mit dem HPLC-MS System wurden die zu untersuchenden Zytostatika über eine

Spritzenpumpe direkt in das Massenspektrometer injiziert. So konnten wichtige MS/MS-Parameter, u. a. die Isolierungsweite sowie die Kollisions-Energie in der Ionenfalle ermittelt und optimiert werden. Mit einer In-Matrix-Kalibrierung wurden dann im Zuge der Methodenvalidierung verschiedene Parameter wie z. B. die Linearität ermittelt. Alle Validierungsdaten sind in Publikation 2 gelistet.

Im Zuge der Studie wurden mit der so entwickelten Methode Proben von Hunden, die an Tumoren erkrankt sind, untersucht. Die Hunde erhielten innerhalb eines zyklischen Protokolls die Substanzen Cyclophosphamid, Vincristin und Doxorubicin im wöchentlichen Wechsel bzw. Vinblastin wöchentlich. Anschließend wurden Proben in der Regel direkt nach der Infusion (1-2 Stunden), an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 entnommen. Die Proben wurden meistens von den Patientenbesitzern genommen, da die Hunde nur zur Infusion in der Klinik anwesend waren. Die Lagerung erfolgte zunächst bei  $-20\text{ °C}$  und später im Labor bei  $-80\text{ °C}$  bis zur Analyse. Da eine Multimethode für alle vier zu untersuchenden Substanzen entwickelt wurde, konnten so auch Zeitpunkte bis zu 21 Tage nach Behandlung (also vor der nächsten Infusion derselben Substanz) ohne eine zusätzliche Probenaufarbeitung untersucht werden.

In den Proben konnten zum Teil sehr unterschiedliche Konzentrationen für die einzelnen Zytostatika nachgewiesen werden. Zum einen war natürlich der Zeitpunkt der Probennahme, auf Grund der verschiedenen Pharmakokinetik der einzelnen Substanzen, hierfür verantwortlich. Zum anderen werden sie in unterschiedlichen mehrere 10er Potenzen umfassenden Dosierungen eingesetzt ( $200\text{ mg CPP/m}^2\text{ BSA}$  (body surface area – Körperoberfläche),  $30\text{ mg DXR/m}^2\text{ BSA}$ ,  $0,7\text{ mg VIC/m}^2\text{ BSA}$ ). Vinblastin wurde in einem getrennten Protokoll verabreicht mit anschließender oraler Gabe von Cyclophosphamid.

Insgesamt wurden 318 Urinproben analysiert. Diese führten zu 666 Messungen, da jede Probe für drei verschiedene Zeitpunkte nach Applikation einer der drei Substanzen steht. Es konnte hiermit ein sehr unterschiedliches Ausscheidungsverhalten der untersuchten Zytostatika beobachtet werden. So konnten direkt nach der Infusion bis zu  $2,6\text{ mg/L}$  Cyclophosphamid und  $3,6\text{ mg/L}$  Doxorubicin im Urin ermittelt werden. Jedoch wurde Cyclophosphamid schon an Tag 1 nur noch in Spuren ( $< 8\mu\text{g/L}$ ) detektiert. Vincristin und Vinblastin zeigen ein ähnliches Verhalten. Sie können bis zu sieben Tage – in Einzelfällen sogar bis zu 14 Tagen – in Hunde-Urin nachgewiesen werden. Die



Höchstkonzentrationen lagen hier bei 0,15 mg/L Vincristin und 0,3 mg/L Vinblastin. Doxorubicin kann sogar bis zu 21 Tage nach Applikation im Urin nachgewiesen werden. So konnten bis zu 40,5 µg/L nach 14 Tagen und Werte zwischen Bestimmungs- und Nachweisgrenze (BG: 1,0 µg/L; NWG: 0,5 µg/L) bis zu Tag 21 nach der Chemotherapie ermittelt werden.

#### **4.1.3 Zytostatika-Rückstände in Hunde-Serum**

(siehe Publikation 4: Drug Residues in Serum of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy)

Rückstände in Serum spielen im Gegensatz zu Hunde-Urin in der häuslichen Umgebung in der Regel keine Rolle, allerdings ist das berufliche Umfeld von Laborpersonal und Tierärzten in diesem Zusammenhang von Relevanz. In der Humanmedizin wurden schon einige Studien zur beruflichen Exposition von Krankenhauspersonal durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.6). In der hier durchgeführten Studie wurde vor allem Hunde-Serum untersucht, das eine Woche nach der letzten Applikation von Zytostatika entnommen wurde. Die Hunde werden im Zuge der Chemotherapie in der Regel wöchentlich in der Klinik vorgestellt und erhalten, nach Feststellung der Therapierbarkeit, die nächste Dosierung. Dafür wird vorher eine Blutprobe entnommen und diese auf verschiedene Parameter untersucht. Bei der Blutentnahme durch den Tierarzt und die Bearbeitung im Labor kann es unter dem Gesichtspunkt der beruflichen Kontamination zu einem Kontakt mit den Zytostatika kommen.

Die unmittelbare Übertragung der Urin-Methodik auf die Serumuntersuchungen war nicht möglich. Es zeigte sich, dass nur mit Ethylacetat anstelle von Dichlormethan als Extraktionsmittel für Serum reproduzierbarere Ergebnisse in den Wiederfindungsraten erzielt werden können. Die übrigen Extraktionsschritte waren identisch zur Urin-Methode. Auch die Messmethode mittels HPLC-MS wurde übernommen.

Insgesamt wurden 81 Serumproben sieben Tage nach Behandlung genommen und diese auf die vier Zytostatika untersucht. In lediglich einer Probe konnte Vinblastin nachgewiesen werden (7 µg/L) und in 2 Proben Cyclophosphamid (7 und 9 µg/L). Die Proben, in denen Cyclophosphamid gefunden wurde, stammten von Hunden, die neben Vinbla-

stin jeden zweiten Tag vom Besitzer mit Cyclophosphamid oral behandelt wurden. Somit entsprach in diesen Fällen der Probennahmezeitpunkt 1-2 Tage nach der Behandlung.

Es wurden auch einige Proben direkt nach der Infusion untersucht, um die Methodik auch im oberen Konzentrationsbereich einzusetzen. Erwartungsgemäß konnten hier zum Teil sehr hohe Konzentrationen ermittelt werden – für Cyclophosphamid bis zu 2,8 mg/L. Die Mediankonzentrationen lagen bei 37 µg/L für Vinblastin, 13 µg/L für Vincristin, 2,5 mg/L für Cyclophosphamid und 0,4 mg/L für Doxorubicin.

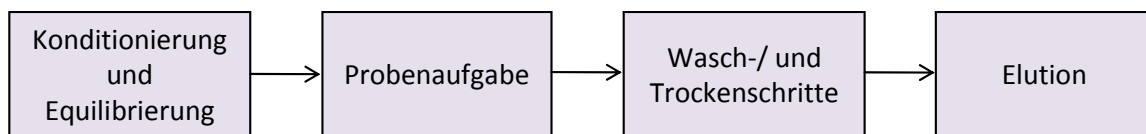
## **4.2 Methodenentwicklung zur Analyse von Zytostatika in Hunde-Urin und -Serum mittels Festphasenextraktion**

### **4.2.1 Allgemeines**

Da im Rahmen des DFG-Projektes „Drug residue analysis in dogs receiving chemotherapy: Investigation into potential hazards of anti-cancer treatment in veterinary medicine“ zum einen das Spektrum der Substanzen erweitert wurde und zum anderen auch weitere Matrices untersucht werden sollten, musste die Methodik aus den vorherigen Studien (Publikation 2 und 3) angepasst werden. Bei ersten Versuchen, in denen die Substanzen Chlorambucil und Melphalan mit eingebunden wurden, stellte sich heraus, dass Melphalan in der Flüssig-Flüssig-Extraktion, die bei einem pH-Wert von 9,5 durchgeführt wird, möglicherweise hydrolysiert. Sehr niedrige und darüber hinaus hochvariable Wiederfindungsraten deuten ebenfalls auf einen Abbau der Substanz hin. Im Folgenden wird die Vorgehensweise bei der Methodenweiterentwicklung hinsichtlich Probenvorbereitung und Messmethodik, näher erläutert. Um das generelle Verhalten der Zytostatika in einer Festphasenextraktion zu testen, wurden dabei zunächst eine Einfachbestimmung mit zwei Kartuschen – Oasis HLB und Bakerbond™ SDB – durchgeführt (Abb. 4-4). In den darauf folgenden Optimierungsversuchen für die Festphasenextraktion wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und in den Abbildungen der Mittelwert dargestellt (Abb. 4-5 und Abb. 4-6). Die Variationen lagen dabei bis auf wenige Ausnahmen unter 20 %.

### **4.2.2 Probenvorbereitung**

Um die bisherige Flüssig-Flüssig-Extraktion zu ersetzen und um Matrixeffekte in der HPLC-MS zu minimieren wurde eine Festphasenextraktion (SPE) entwickelt (siehe Abb. 4-3). In der Methodenentwicklung wurden neben der Suche nach einer geeigneten Phase vor allem die Waschschritte und die Elutionsschritte, wie im Folgenden dargestellt, optimiert. Die Probenvorbereitung für die Matrices Hunde-Urin und -Serum sind in M5 und M6 (Kapitel 8) dargestellt. Dabei erfolgte im Anschluss an die Festphasenextraktion eine Verdampfung der Elutionsmittel bis zur Trockne und eine Wiederaufnahme in einem geeigneten Lösungsmittel. In M10 und M12 sind die Messung mit der HPLC-MS und die quantitative Auswertung beschrieben.

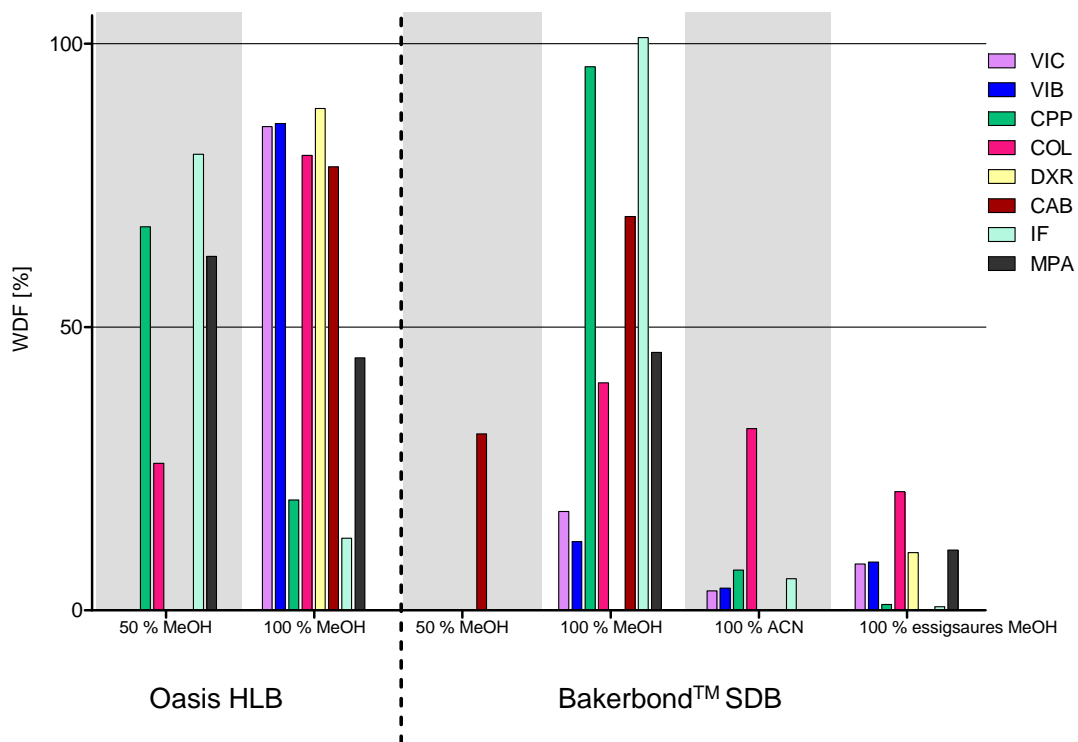


**Abb. 4-3. Generelles Schema einer Festphasenextraktion (SPE).**

#### *Wahl der Phase*

Viele Festphasen werden heute auf Polymerbasis hergestellt und folgende wurden getestet: Bakerbond™ SDB (Mallinckrodt Baker, Griesheim), Oasis HLB (Waters GmbH, Eschborn), Bond Elut Plexa und Bond Elut PPL (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt). Neben den neu zu bearbeitenden Substanzen, Chlorambucil und Melphalan, sollten noch zwei interne Standards zur Überwachung der Extraktion in die Methodik eingearbeitet werden.

In ersten Tests wurde das Verhalten aller Zytostatika und der internen Standards auf zwei der Phasen (Oasis HLB und Bakerbond™ SDB) untersucht und wie sie mit verschiedenen, steigenden Konzentrationen von Methanol eluiert werden können. Hierfür wurde eine Konzentration von 500 µg/L gewählt, die im mittleren Konzentrationsbereich liegt. In Abb. 4-4 ist die Elution der verschiedenen Substanzen in Prozent der absolut dotierten Menge dargestellt. Nicht abgebildet sind die Werte für 10 %iges und 25 %iges Methanol, da keine der untersuchten Substanzen in diesen Elutions-/Waschlösungen detektiert werden konnte. Die acht Substanzen (Zytostatika + interne Standards) wiesen ein unterschiedliches Elutionsverhalten auf den beiden Phasen auf. Auf der Oasis HLB-Kartusche ließen sich mit 50 %igem Methanol bereits fünf Substanzen eluieren. Von der Bakerbond™ SDB-Kartusche wurde bei dieser Konzentration jedoch nur Chlorambucil teilweise eluiert und auch mit 100 %igem Methanol ließen sich einige Substanzen nicht eluieren. Doxorubicin lässt sich von den Bakerbond™ SDB-Kartuschen weder mit 100 % Methanol noch mit 100 % Acetonitril eluieren. Erst mit angesäuertem Methanol konnten geringe Mengen Doxorubicin von der Festphase gelöst werden.



**Abb. 4-4.** Elutionsverhalten der untersuchten Zytostatika auf zwei verschiedenen Kartuschen (Oasis HLB und Bakerbond™ SDB) und mit verschiedenen Elutionsmitteln. Es wurde Leerurin in einer Konzentration von 500 µg/L dotiert.

Da das Elutionsverhalten für die Oasis HLB-Kartusche besser war, wurde diese in weiteren Versuchen mit den beiden Varian-Kartuschen (Bond Elut PPL und Bond Elut Plexa) verglichen. Jedoch konnten mit den Bond Elut PPL Kartuschen nur Wiederfindungsraten von ca. 30 % für die Vinca-Alkaloide erreicht werden. Aus diesem Grund wurde sie für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

In einem direkten Vergleich der Oasis HLB und der Bond Elut Plexa-Kartusche (Abb. 4-5) wurden für alle Substanzen in zwei Konzentrationen bessere Wiederfindungsraten für die Bond Elut Plexa Kartuschen ermittelt, sodass diese Kartusche letztendlich für die weiteren Arbeiten verwendet wurde.

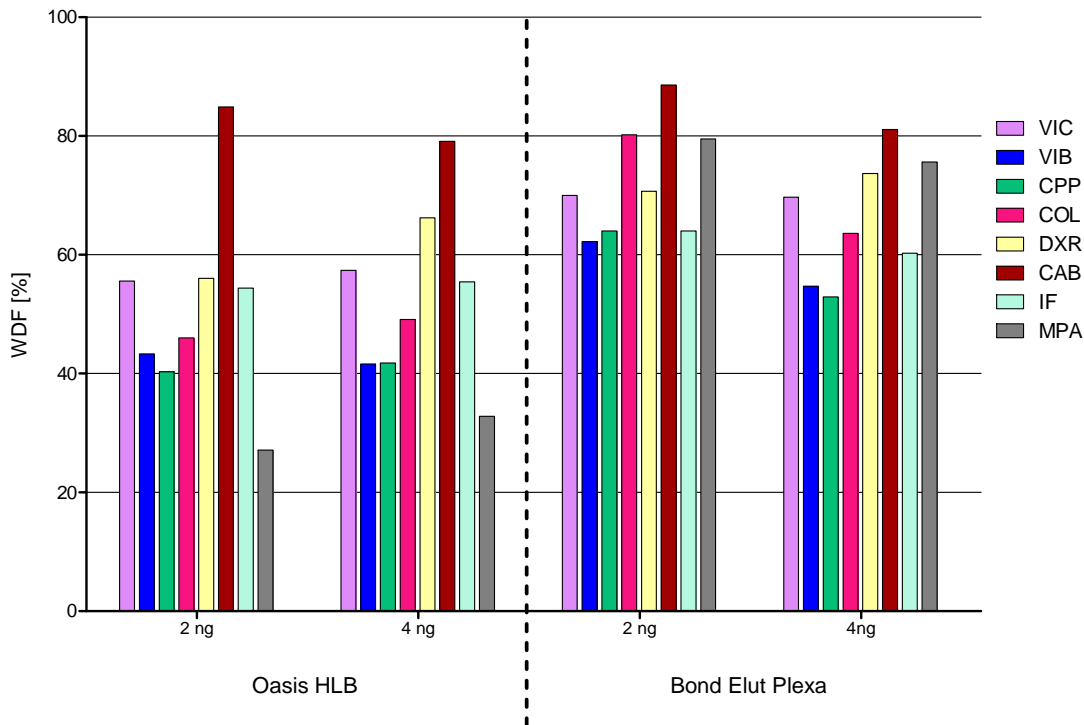


Abb. 4-5. Vergleich der Oasis HLB SPE-Kartuschen mit Bond Elut Plexa SPE-Kartuschen mit jeweils zwei Konzentrationen der Analyten (angegeben in ng auf der Säule).

### Optimierung Waschschrift

In der Festphasenextraktion dient der Waschschrift dazu, unerwünschte Matrixbestandteile von der SPE-Kartusche zu spülen während die Analyten auf dieser verbleiben. Eine Optimierung dieses Schrittes der Festphasenextraktion ist somit essenziell für die Reduktion von Matrixbestandteilen und damit verbundener Matrixeffekte bei der Messung mittels HPLC-MS (vgl. Kapitel 2.7).

Bei der hier entwickelten Methode erwies sich PBS-Puffer, mit dem die Probe ebenfalls verdünnt wurde, als geeignet für einen ersten Waschschrift. Anschließend an einen Trocknungsschritt wurde noch ein zusätzlicher Waschschrift mit 35 %igem Methanol (65 g Wasser und 28 g Methanol) eingefügt um weitere Matrixbestandteile von der Kartusche zu waschen. Zwar wurde mit diesem auch bereits ein Teil von Cyclophosphamid und Ifosfamid eluiert, dies erfolgte jedoch reproduzierbar.

### Optimierung Elution

Im Elutionsschritt werden die Analyten im Idealfall quantitativ von den SPE-Kartuschen desorbiert und für die weitere Verarbeitung aufgefangen. Es wurden sowohl verschiedene Elutionsmittel (100 %iges Methanol, 50 %/50 %-Gemisch aus Methanol und Acetonitril) als auch eine Elution in mehreren Schritten (Methanol gefolgt von Acetonitril, Methanol gefolgt von essigsaurem Methanol, Acetonitril gefolgt von essigsaurem Methanol) getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-6 dargestellt. Die Lösungsmittelmenge betrug jeweils 5 mL.

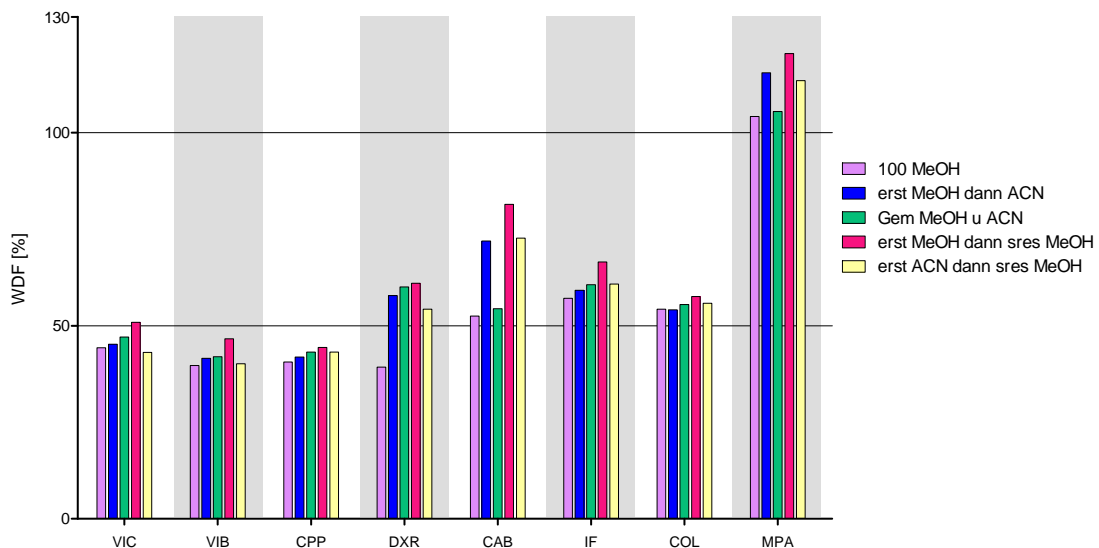


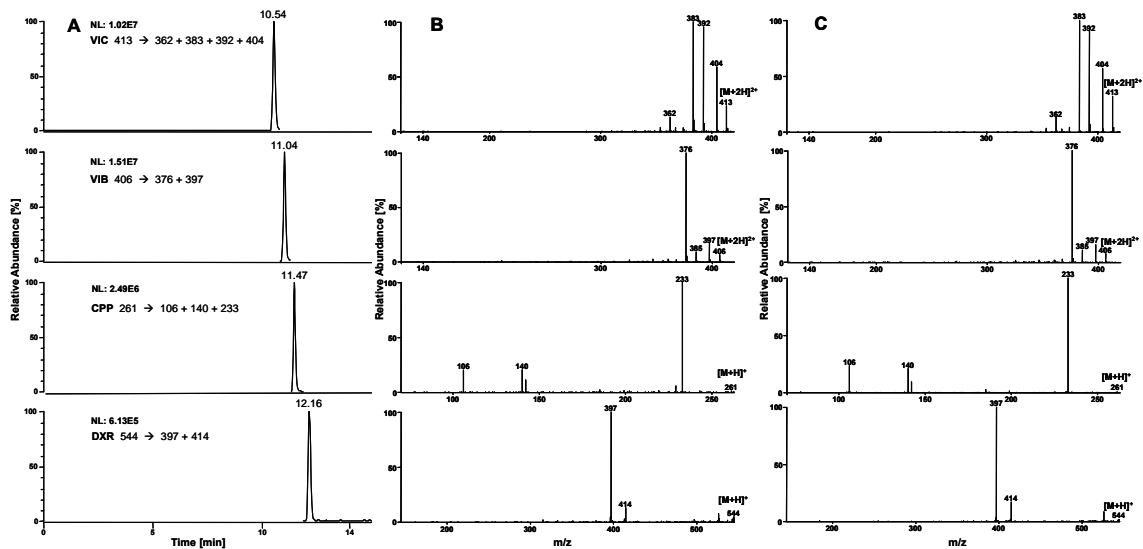
Abb. 4-6. Vergleich verschiedener Elutionsmittel.

Da Doxorubicin eine ähnliche Struktur wie Tetracycline aufweist, wurde auch hier ein saures Elutionsmittel getestet. Es zeigte sich, dass essigsaures Methanol in Kombination mit Methanol auch für die übrigen Substanzen die höchsten Elutionsraten erzielt.

### 4.2.3 Messmethoden HPLC-MS

Da die HPLC-MS-Methoden für die unterschiedlichen Matrices identisch waren, soll hier in zusammenfassender Form darauf eingegangen werden. Für die Publikationen 2 und 3 wurde bereits eine Messmethode entwickelt. Hierfür mussten auf der einen Seite die Trennung an der HPLC optimiert werden und zum anderen geeignete Parameter für die

Messung am Massenspektrometer ermittelt werden. Um mit einer Ionenfalle sensitiv messen zu können, ist in der Chromatographie eine Basislinientrennung der zu untersuchenden Substanzen notwendig. Für die Substanzen Vincristin, Vinblastin, Cyclophosphamid und Doxorubicin gelang dies mit einem 0,5 %ige-Ameisensäure/Methanol-Gradienten (Abb. 4-7) und die Proben des zyklischen Chemotherapie-modells ließen sich in einer HPLC-Trennung untersuchen. Zunächst wurde versucht, Melphalan, Chlorambucil, Colchicin und Ifosfamid in die bestehende HPLC-Methodik zu integrieren. D. h. es wurden dieselbe Trennsäule (Hypersil Gold, 150 x 4,6 mm, 5 µm; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland), die gleichen Eluenten (0,5 %ige-Ameisensäure/Methanol), der gleiche Gradient und das gleiche Injektionsvolumen gewählt.



**Abb. 4-7.** Chromatogramme (A) und Spektren für Vincristin, Vinblastin, Cyclophosphamid und Doxorubicin in einer dotierten Hunde-Urin-Probe (50 µg/L  $\pm$  2 ng on column), Flüssig-Flüssig-Extraktion; entsprechende MS/MS-Spektren der vier Substanzen in der Urinprobe (B); und MS/MS-Spektren einer Standardlösung (250 µg/L  $\pm$  2ng on column) (entnommen aus Publikation 2).

Eine Basislinientrennung für alle acht Substanzen gelang nicht, da Vinblastin und Ifosfamid sowie Doxorubicin und Melphalan koeluierten. So wurden die Analyten in zwei Gruppen aufgeteilt, in denen jeweils einer der beiden internen Standards mit gemessen wird. Der HPLC-Gradient war für beide Trennungen identisch mit einer leichten Modifikation im Vergleich zu den Publikationen 2 und 3; es wurde der



organische Anteil schneller erhöht. Die Messmethode ist in Kapitel 8 als Methode M10 beschrieben.

Die Parameter für die massenspektrometrische Messung wurden über eine direkte Infusion der Analyten mittels Spritzenpumpe in das Massenspektrometer ermittelt. Die optimierten Parameter sind ebenfalls in M10 (Kapitel 8) dargestellt. Auf zwei Spezialfälle bei der Messung soll im Folgenden näher eingegangen werden.

#### *Messung von Vincristin und Vinblastin*

Vincristin und Vinblastin werden mithilfe der zweifach geladenen Molekülonen analysiert, da diese Ionen deutlich stärkere Signale im Massenspektrometer zeigen als die einfach geladenen Spezies. Mit verschiedenen Zusammensetzungen des Aufnahme- lösungsmittels wurde versucht, das Gleichgewicht zwischen einfach- und zweifach- geladenen Molekülonen in eine Richtung zu verschieben. Der Zusatz von Ammonium- acetat (10 mM) zu Methanol führte zu leicht höheren Signalen der zweifachgeladenen Ionen verbunden mit einer etwas geringeren Variation. Daher wurde dieser Zusatz auch in der ursprünglichen Messmethode verwendet (Publikationen 2 und 3).

In der weiterentwickelten Methode wurde wieder reines Methanol eingesetzt, da keine Vorteile eines Ammoniumacetat-Zusatzes bei der Aufnahme der Eluate aus der Festpha- senextraktion festgestellt wurden.

#### *Messung von Melphalan*

In der Matrix Hunde-Urin kam es zur Koelution von Matrixbestandteilen, die eine iden- tische Masse aufweisen wie Melphalan. Da bei der Fragmentierung von Melphalan nur ein MS/MS-Fragment entsteht ( $m/z$  288, - 17 amu) und die resultierende Massendiffe- renz auch bei der Störsubstanz entsteht, war eine Identifizierung und Quantifizierung über dieses Fragmentation nicht möglich. In Abb. 4-8 sind vergleichend die Chromato- gramme und Spektren der Spuren von Leerurin und einem Standard dargestellt. Chroma- tographisch war keine bessere Trennung zu erzielen. Da Melphalan zwei Chloratome besitzt, ist ein Isotopenpeak mit ca. 64 % Intensität bei  $m/z$   $M + 2$  vorhanden ( $m/z$  307). Daher wurde versucht, über diese höhere Molekülmasse eine zuverlässige Melphalan- Bestimmung zu erreichen. Aber auch diese Methode war letztendlich durch eine Molekülmasse, die in das Isolierungsfenster des Isotopenpeaks von Melphalan streut, nicht hinreichend selektiv (Abb. 4-9).

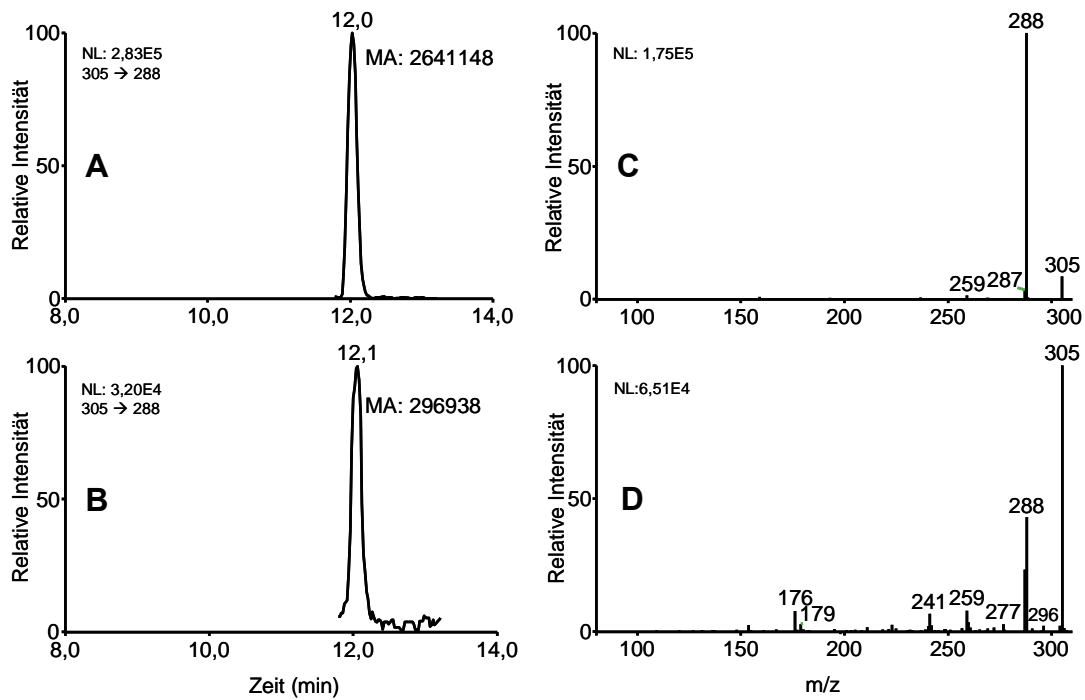


Abb. 4-8. Melphalan – Standard vs. Leerurin. Chromatogramm der Ionenspur m/z 288 eines 2 ng (on column) Melphalanstandards (A); eines Leerurins (B); entsprechende MS/MS Spektren für Standard (C) und Leerurin (D); NL: absolute Intensität; MA: Signalstärke.

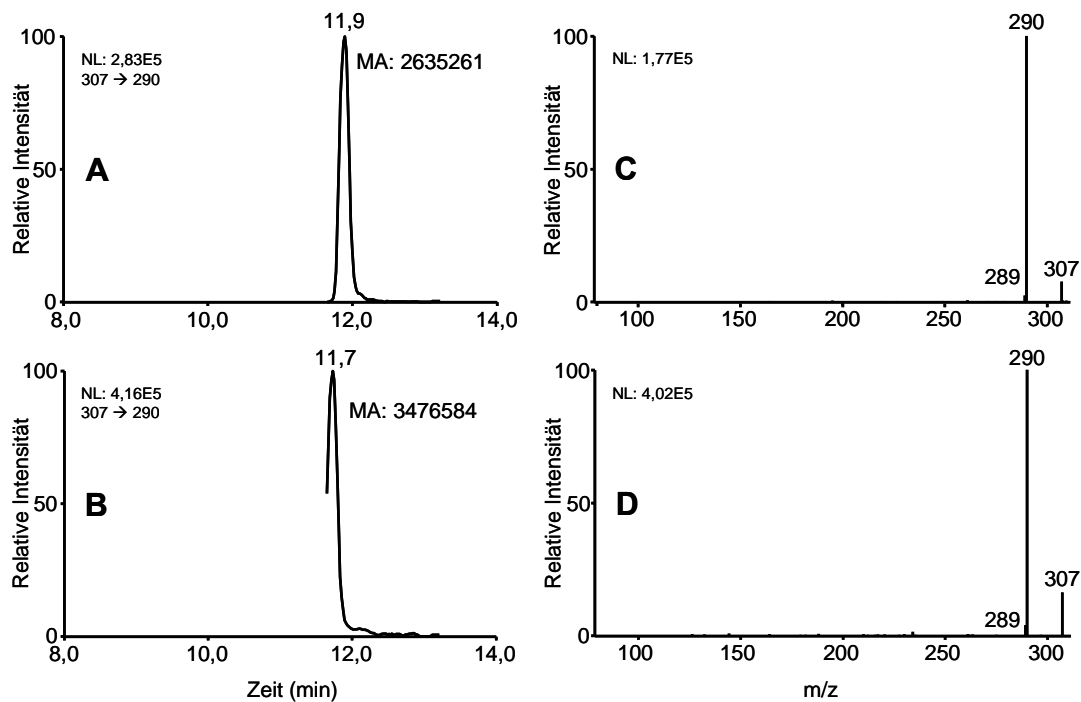
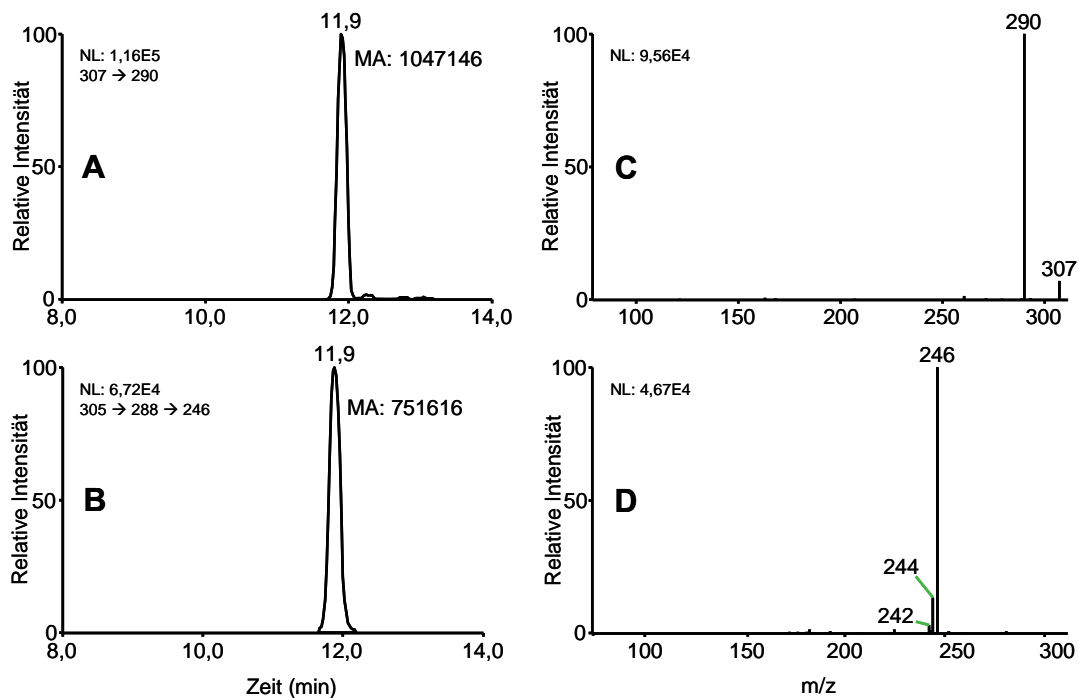


Abb. 4-9. Melphalan – Standard vs. Leerurin ( $M + 2 = m/z$  307; Chlorisotop). Chromatogramm der Ionenspur m/z 290 eines 4 ng (on column) Melphalanstandards (A); eines Leerurins (B); entsprechende MS/MS Spektren für Standard (C) und Leerurin (D); NL: absolute Intensität; MA: Signalstärke.

Mirkou et al. (2009) erhielten mit einem Triple Quadrupol Massenspektrometer ein  $m/z$  246-Fragment im MS/MS-Modus und konnten es zur Quantifizierung heranziehen. Dadurch wurde eine Bestimmungsgrenze von  $1 \mu\text{g/L}$  erreicht. Eine reproduzierbare Quantifizierung von Melphalan wurde mit dem in dieser Arbeit verwendeten HPLC-MS System erst durch die weitere Fragmentierung des MS/MS-Ions ( $m/z$  288) in ein  $\text{MS}^3$ -Ion ( $m/z$  246) möglich. Vergleicht man die Intensitäten der Signale des MS/MS-Fragments ( $m/z$  290) des fragmentierten Isotopenpeaks ( $m/z$  307) mit dem  $\text{MS}^3$ -Fragment ( $m/z$  246) des Molekülions von Melphalan ( $m/z$  305), so ergibt sich ein Intensitätsverlust von ca. 25 % (Abb. 4-10). Dadurch wurden zwar im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen schlechtere Nachweisgrenzen erzielt, aber ein hochselektiver quantitativer Nachweis des Melphalans war somit möglich.

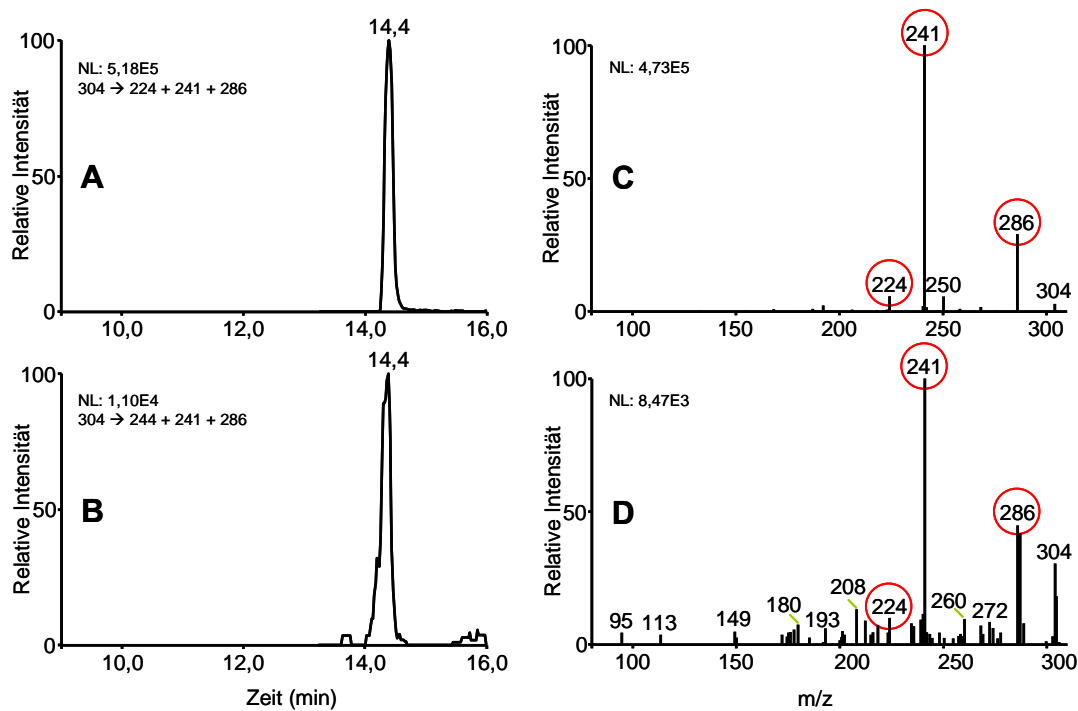


**Abb. 4-10.** Melphalan – MS/MS vs.  $\text{MS}^3$ . Chromatogramme der  $m/z$  290-Ionenspur des Chlorisotops (A) im Vergleich zur  $m/z$  246- $\text{MS}^3$ -Ionenspur des Hauptisotops ( $m/z$  305) (B) eines 4 ng (on column) Melphalanstandards; MS/MS-Spektrum Melphalan (Chlorisotop  $m/z$  307) (C);  $\text{MS}^3$ -Spektrum Melphalan (Hauptisotop) (D); das Signal des  $\text{MS}^3$ -Ions ist nur 25 % geringer als das des Chlorisotops; NL: absolute Intensität; MA: Signalstärke.

#### 4.2.4 Analyse von Proben – Melphalan und Chlorambucil in Hunde-Serum und -Urin

##### Serum

Es wurden 16 Proben von Hunden, die Chlorambucil verabreicht bekommen haben, untersucht. Die Probennahme erfolgte an Tag 1 nach der Applikation. In vier Proben wurde Chlorambucil im Bereich der Nachweisgrenze gefunden. Die Retentionszeiten von Standard und Probe stimmen sehr gut überein. Die drei Hauptfragmente werden eindeutig gefunden (Abb. 4-11).



**Abb. 4-11.** Nachweis von Chlorambucil in Hunde-Serum. Chromatogramm eines 2 ng (on column) Chlorambucilstandards (A); Chromatogramm Chlorambucil in Serumprobe (reale Probe) (B); Spektren Standard (C) und Serumprobe (D); übereinstimmende MS/MS-Ionen sind rot eingekreist; die drei Hauptfragmente werden eindeutig gefunden; NL: absolute Intensität; MA: Signalstärke.

Des Weiteren wurden 25 Proben von Hunden, die Melphalan erhalten hatten, analysiert. In lediglich einer Serumprobe deutet das Spektrum auf Spuren von Melphalan im Bereich der Nachweisgrenze hin. Die Probe wurde an Tag 1 nach Applikation entnommen.

### *Urin*

Es wurden 21 Urinproben von Hunden untersucht, die direkt nach und an Tag 1 bis Tag 4 nach der Applikation von Chlorambucil genommen wurden. In keiner der Proben konnte Chlorambucil nachgewiesen werden.

Für Melphalan konnten 19 Proben in Urin untersucht werden. Dies waren zum größten Teil Proben direkt nach (n=6) und an Tag 1 (n=11) nach der Applikation. Jeweils eine Probe wurde vor und eine 2 Tage nach der Applikation gezogen. In allen Proben direkt nach Applikation konnte Melphalan in Konzentrationen zwischen 9,8 und 371,1 µg/L detektiert werden.

## **4.3 Analytik von Zytostatika in Hunde-Haaren**

### **4.3.1 Methodik**

#### *Herstellung geeigneter Positivkontrollen*

Eine Methodenentwicklung für die Matrix Haare konnte nicht wie bei den anderen Matrices erfolgen, denn durch eine Dotierung mit Standardsubstanzen kann eine Realprobe, in die die Analyten „eingebaut“ sind, nicht ohne weiteres nachgestellt werden (Barroso et al. 2008). Der erste Schritt bestand also darin, geeignetes Probenmaterial für Positivkontrollen herzustellen mit dem anschließend verschiedene Extraktionsverfahren getestet werden konnten.

Um Haare mit eingelagerten Zytostatika herzustellen (dotierte Haarproben), wurden Hundehaare (50 mg) von einem Hund, der nie in Berührung mit diesen Substanzen gekommen ist, verwendet. Hiermit wurde zunächst eine Dotierung/Einlagerung der Analyten in das Haar über eine Inkubation mit verschiedenen Lösungsmitteln getestet. So wurde zunächst die Stabilität der Zytostatika in Wasser als Inkubationslösung überprüft. Allerdings waren die Zytostatika bei 40 °C nicht stabil oder wurden eliminiert. Gleiche Tests mit methanolischen Lösungen zeigten diesen Effekt nicht.

Auch die Überprüfung der methanolischen Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation von Haaren zeigten eine Elimination der Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter geklärt werden konnte. Insbesondere Melphalan und Chlorambucil waren schon nach kurzer Zeit nicht mehr detektierbar. Jedoch konnten

unabhängig von Dotierung und Extraktionsverfahren in den so hergestellten Proben nach Aufarbeitung Vincristin, Vinblastin und Cyclophosphamid detektiert werden. So konnten mit Vincristin und Cyclophosphamid zumindest zwei der im vorwiegend verwendeten Chemotherapieregime eingesetzten Substanzen detektiert werden.

Letztendlich konnten Haar-Positivkontrollen wie in M7 (Kapitel 8) ausführlich beschrieben hergestellt werden. Die so erhaltenen Proben wurden für die Methodenentwicklung sowie die anschließenden Versuche als Positivkontrollen verwendet.

#### *Extraktion von Zytostatika aus Haaren*

Nachdem mit der oben beschriebenen Methode Proben hergestellt werden konnten, wurde im nächsten Schritt das Extraktionsverfahren optimiert.

Die in die Haarmatrix eingewachsenen Zytostatika bzw. durch das oben beschriebene Verfahren eindiffundierten Zytostatika müssen durch geeignete Lösungsmittel aus der Matrix extrahiert werden. Hier bieten sich prinzipiell verschiedene organische und anorganische Lösungsmittel an, jedoch erwiesen sich Ethylacetat, Salzsäure (0,1 M) und Natronlauge (0,1 M) als ungeeignet. Eine 1 M Natronlauge führte zwar zu einer kompletten Auflösung der Haarstruktur, aber auch zu einer Hydrolyse der Analyten. Methanol sowie ein Gemisch aus Methanol und Salzsäure zeigten zwar messbare Extraktionsraten, die sich allerdings nicht reproduzieren ließen.

Die besten Resultate wurden mit einem enzymatischen Aufschluss der Haare erzielt. Hierfür wurden die Haare mit Pronase E und Proteinase K versetzt und über Nacht bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung verdünnt und analog der Urinmethode mittels Festphasenextraktion für die HPLC-MS-Messung aufgearbeitet.

Die Probenvorbereitung für die Matrix Haare ist in M8 (Kapitel 8) ausführlich dargestellt.

#### **4.3.2 Analyse von Proben – Hunde-Haare**

Es wurden insgesamt 98 Haar-Proben untersucht. In elf Proben konnten Spuren von Cyclophosphamid (n=3) oder Vincristin (n=8) detektiert werden. In drei Vincristinproben lagen die gefundenen Konzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze von 2,5 µg/L. Alle anderen ermittelten Konzentrationen, sowohl von Cyclophosphamid als auch von Vincristin, lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze. In Abb. 4-12 ist der Nachweis von

Cyclophosphamid in einer Haarprobe im Vergleich zu einer Standardlösung, einer Positiv- und einer Negativkontrolle dargestellt. Retentionszeit und drei ( $m/z$  106, 142 und 233) der vier MS/MS-Ionen, die für Cyclophosphamid spezifisch sind, stimmen überein. In diesem Fall wurde auf den internen Standard Ifosfamid, der eine ähnliche Retentionszeit sowie die gleiche Masse wie Cyclophosphamid und das gleiche Hauptfragment ( $m/z$  233) aufweist, in der Negativkontrolle verzichtet. Es wurden keine Proben von Hunden untersucht, die in der Chemotherapie Vinblastin erhalten hatten.

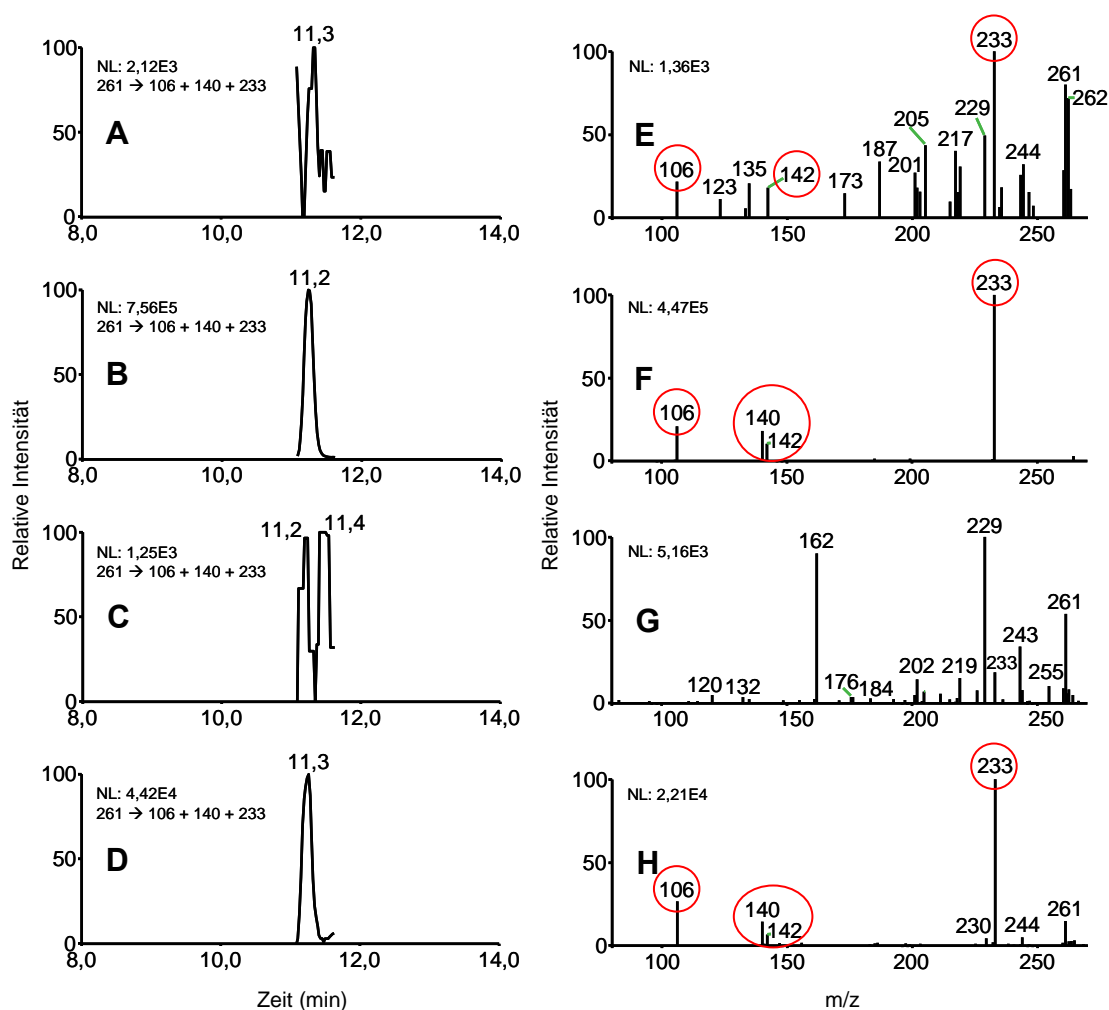


Abb. 4-12. Cyclophosphamid in Hunde-Haar im Bereich der Nachweisgrenze. Vergleich der Spektren und Retentionszeiten; Chromatogramm (A) und Spektrum (B) einer Haarprobe eines Hundes, der eine Chemotherapie erhalten hat; Chromatogramm und Spektrum eines Cyclophosphamidstandards (B+F); einer Negativ-Kontrolle (C+G); einer Positiv-Kontrolle (D+H); übereinstimmende MS/MS-Ionen sind rot eingekreist. NL: absolute Intensität; MA: Signalstärke.

## 4.4 Analytik von Zytostatika in Hunde-Speichel

### 4.4.1 Methodik

Hunde-Speichel für die Methodenentwicklung ist limitiert, da es sehr schwierig ist, diesen in größeren Mengen zu gewinnen. Insgesamt konnten nur ca. 15 mL Leerspeichel für Validierungszwecke gewonnen werden. Aufgrund der zähflüssigen Konsistenz von Speichel wurde dieser eingewogen. Als Basis wurde die Methode für Hunde-Urin mittels SPE gewählt, die Probenmenge betrug 0,5 g. Die Aufnahme des eingedampften Eluates der SPE erfolgte in 100 µL Methanol.

### 4.4.2 Analyse von Proben – Hunde-Speichel

Es wurden insgesamt 83 Speichelproben analysiert. Diese stammten vornehmlich von einem Hund, bei dem es möglich war, während der gesamten Chemotherapie (Protokoll – Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin) Proben zu nehmen. Vincristin und Doxorubicin konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. In sechs Proben wurde Cyclophosphamid detektiert. Hierbei handelte es sich um Proben, die entweder am Tag der Chemotherapie oder einen Tag später gewonnen wurden. Die höchste ermittelte Konzentration betrug 7,7 µg/kg. Für die Proben am Tag der Chemotherapie ergab sich ein Mittelwert von 4,0 µg/kg (Abb. 4-13).

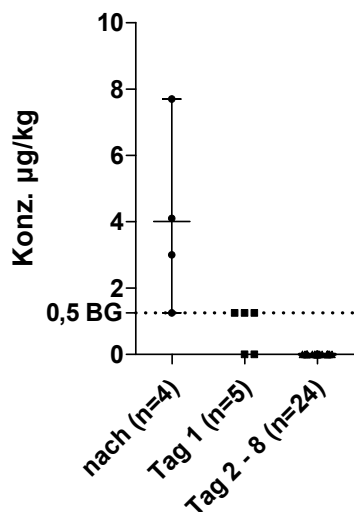


Abb. 4-13. Cyclophosphamidgehalte in Speichelproben. Angegeben sind die Zeitpunkte nach der Applikation. Für die Proben direkt nach der Applikation sind der Mittelwert und die Spannweite der Messwerte markiert. Für Konzentrationen < BG und > NWG wird der Wert der halben Bestimmungsgrenze ( $0,5 \times BG = 1,25 \mu\text{g/kg}$ ) angegeben.



Darüber hinaus wurden Proben von zwei weiteren Patienten untersucht, von denen ein Patient Melphalan (Probe an Tag 1 nach Infusion) und der andere Chlorambucil (Probe direkt nach Infusion) erhalten hatte. Beide Substanzen konnten im Speichel nicht nachgewiesen werden.

Die quantitative Auswertung ist in M12 beschrieben.

## **4.5 Validierung**

### **4.5.1 Allgemeines Vorgehen**

Mit der Validierung einer Methode soll nachgewiesen werden, dass sie für den ihr zugeordneten Zweck geeignet ist und zuverlässige Ergebnisse liefert. Zu den wichtigsten Validierungsparametern zählen: Präzision, Richtigkeit, Robustheit, Linearität, Selektivität, Wiederfindung, Nachweisvermögen und, vor allem in der HPLC-ESI-MS/MS, die Untersuchung von Matrixeffekten.

#### *Linearität, Wiederfindung*

Um den Zusammenhang zwischen Messwert und Substanzmenge darzustellen und damit Analyseergebnisse zu berechnen wird in der instrumentellen Analytik die Kalibrierung eingesetzt. Im Zuge der vorherigen Untersuchungen mittels Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode (Publikation 2) wurde die Linearität von Standardlösungen (M11) zu Vincristin, Vinblastin, Cyclophosphamid und Doxorubicin bereits untersucht. Für die neu integrierten Substanzen (und wiederholend auch für die bereits überprüften) wurde die Linearität mit sieben Standards von 0,05 ng – 50 ng (on column) überprüft. Für alle sechs Substanzen konnte ein Bestimmtheitsmaß von  $> 0,997$  ermittelt werden.

Für die weiteren Untersuchungen wurden für jede Matrix In-Matrix-Kalibrierungen durchgeführt. Dafür wurde eine Leermatrix mit einer definierten Standardmenge (Multi-standard) in verschiedenen Konzentrationen dotiert, nach 10 min Equilibrierzeit mit der entsprechenden Methode aufgearbeitet und mit der HPLC-MS analysiert. Die Signale wurden direkt mit denen von methanolischen Standardlösungen gleicher Konzentration verglichen und so Wiederfindungsraten bestimmt. Hier steht die Wiederfindung somit für

eine „Overall-Process-Efficiency“ (Niessen et al. 2006), in der alle signalverstärkenden oder –unterdrückenden Effekte berücksichtigt werden.

#### *Nachweisgrenzen/Bestimmungsgrenzen*

Die Nachweisgrenzen wurden bestimmt, indem eine Leermatrix in mehreren Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze dotiert wurde und die Spektren mit denen von Standardlösungen in der gleichen Konzentration verglichen wurden. Über Mischstandards, in denen die einzelnen Analyten in verschiedenen Konzentrationen enthalten waren, wurden die unterschiedlichen Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen berücksichtigt. Die jeweilige Substanz galt als nachgewiesen, wenn die relativen Signal-Intensitäten von mindestens zwei Fragmentationen innerhalb eines definierten Toleranzbereiches lagen (Europäische Kommission 2002). Da die Nachweisempfindlichkeit des Gerätes arbeitstäglich aufgrund von verschiedensten Einflussfaktoren variieren kann, wurde auf Basis der Spektren in Einzelfällen auch eine niedrigere Konzentration als nachgewiesen gewertet (Signal-Rausch-Verhältnis  $> 5$ ).

Als Bestimmungsgrenze wurde die kleinste Konzentration der Linearitätsuntersuchungen bestimmt, in der in den Wiederfindungsversuchen in einer Dreifachbestimmung die Variationen  $< 20\%$  waren und auch die Spektren in Standard und dotierter Probe gut übereinstimmten.

#### *Matrixeffekte*

HPLC-MS ist mittlerweile eine in vielen Disziplinen etablierte Messmethodik in der Spurenanalytik. Jedoch kann es insbesondere in der am meisten verwendeten Ionisierungstechnik, ESI, zu Matrixeffekten wie Signalsuppression und –verstärkung kommen.

Aus diesem Grund sind Untersuchungen zu Matrixeffekten ein unerlässlicher Validierungsparameter. Es gibt verschiedene Methoden, um Matrixeffekte zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Matrixeffekte untersucht, indem Leermatrix aufgearbeitet wurde und diese anschließend mit Standardlösung dotiert wurde. Diese Lösung wurde dann im Vergleich zu in Methanol angesetzten Standards unter identischen HPLC-MS-Bedingungen analysiert. Aus den erhaltenen Signalflächen kann dann ein relativer Matrixeffekt berechnet werden. Da für die Kalibrierung in dieser Arbeit jedoch die Wiederfindungen über den gesamten zu untersuchenden Bereich bestimmt wurden und deren Linearität auch nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden,

dass zum einen möglicherweise vorhandene Matrixeffekte ebenfalls linear sind und zum anderen diese mit den Berechnungen der Analytkonzentrationen in Proben unter Einbeziehung der Wiederfindungsraten bereits berücksichtigt werden.

#### *Interne Standards*

Im Zuge der Übertragung der Methodik auf die Festphasenextraktion wurden ebenfalls zwei interne Standards eingeführt. Es wurde Ifosfamid für den Bereich der Alkylantien ausgewählt sowie Colchicin für die Alkaloide (VIC und VIB) und Doxorubicin. Beide Standards weisen ähnliche Eigenschaften und Molekülmassen auf wie die jeweils zu untersuchenden Substanzgruppen und werden mit diesen in einer HPLC-Trennung zusammen analysiert (M10). Die beiden internen Standards dienen dabei nicht der Quantifizierung, sondern der Überprüfung der Extraktionsausbeuten.

Im Zuge der Validierung wurde Vincristin mit beiden Messmethoden analysiert, da das HPLC-Verfahren in beiden Methoden eine Basislinientrennung des Vincristins von allen anderen Substanzen ermöglicht. Im Folgenden sind daher in der Regel die Daten für beide Messungen angegeben und mit Teil 1 und Teil 2 gekennzeichnet.

#### **4.5.2 Urin**

In Tab. 4-2 sind die ermittelten Validierungsdaten für Hunde-Urin dargestellt. Die Nachweisgrenze von Melphalan ist deutlich höher als die der übrigen Substanzen. Aufgrund des verwendeten Mischstandards und der gewählten Konzentration für die übrigen Analyten wurden für Melphalan zwischen 12,5 µg/L und 25,0 µg/L keine weitere Konzentrationen getestet.

**Tab. 4-2. Validierungsdaten Urin.**

|                               | VIC       | VIB       | CPP        | MPA      | CAB        | DXR        |
|-------------------------------|-----------|-----------|------------|----------|------------|------------|
| Linearitätsbereich (µg/L)     | 1-1000    | 1-1000    | 1-1000     | 25-1000  | 5-1000     | 5-1000     |
| R <sup>2</sup>                | 0,9983    | 0,9995    | 0,9999     | 0,9995   | 0,9994     | 0,9990     |
| NWG (µg/L)                    | 0,5       | 0,25      | 1,0        | 25,0     | 2,5        | 1,0        |
| BG (µg/L)                     | 1,0       | 1,0       | 1,0        | 25,0     | 5,0        | 5,0        |
| Richtigkeit (%) <sup>a)</sup> | 73,4      | 69,7      | 78,8       | 102,8    | 84,2       | 83,7       |
| Präzision (%) <sup>b)</sup>   | 1,4 – 9,4 | 1,1 – 7,1 | 2,2 – 14,7 | 1,1 – 25 | 2,9 – 17,6 | 2,2 – 26,0 |
| Matrixeffekte                 | -31 %     | -38%      | -8%        | 34%      | -5%        | -14%       |

<sup>a)</sup> angegeben als Overall process efficiency (WDF); <sup>b)</sup> angegeben als Variationskoeffizient

### 4.5.3 Serum

In Tab. 4-3 sind die Validierungsparameter für Hunde-Serum angegeben. Im Zuge der Untersuchung zur Nachweisgrenze für Melphalan ergaben die Intensitäten der MS<sup>3</sup>-Ionen für eine Konzentration von 6,25 µg/L die Übereinstimmung zweier Ionen, für 12,5 µg/L allerdings nur für ein Ion. Deshalb wird eine Nachweisgrenze von 25 µg/L angegeben.

**Tab. 4-3. Validierungsparameter Serum.**

|                               | VIC        | VIB        | CPP        | MPA        | CAB        | DXR        |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Linearitätsbereich (µg/L)     | 5-1000     | 1-1000     | 5-1000     | 25-1000    | 5-1000     | 5-1000     |
| R <sup>2</sup>                | 0,9922     | 0,9951     | 0,9971     | 0,9971     | 0,9931     | 0,9967     |
| NWG (µg/L)                    | 0,5        | 5,0        | 1,0        | 25,0       | 2,5        | 5,0        |
| BG (µg/L)                     | 5,0        | 1,0        | 5,0        | 25,0       | 5,0        | 5,0        |
| Richtigkeit (%) <sup>a)</sup> | 84,4       | 76,6       | 86,6       | 89,7       | 87,3       | 70,3       |
| Präzision (%) <sup>b)</sup>   | 1,4 – 17,0 | 1,0 – 13,1 | 3,1 – 14,3 | 2,1 – 19,4 | 2,5 – 19,1 | 1,2 – 15,6 |
| Matrixeffekte                 | -12,2      | -21,6      | -10,6      | -5,9       | -1,4       | -12,3      |

<sup>a)</sup> angegeben als Overall process efficiency (WDF); <sup>b)</sup> angegeben als Variationskoeffizient

#### 4.5.4 Haare

Für die Matrix Haare konnte aufgrund der oben beschriebenen Problematik (vgl. Kapitel 4.3.1) keine umfassende Validierung vorgenommen werden. Der Nachweis erfolgte über den Vergleich des Spektrums mit dem eines Standards sowie im Vergleich zu einer Negativ- und einer Positivkontrolle. Aus den Ergebnissen wurden entsprechende Nachweisgrenzen für Vincristin und Cyclophosphamid abgeschätzt (Tab. 4-4). Wiederfindungen im eigentlichen Sinne konnten somit nicht ermittelt werden. Die Konzentrationen wurden daher unmittelbar auf das Standardsignal bezogen berechnet.

**Tab. 4-4. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen – Haare. Die Werte wurden anhand der Spektrenvergleiche von Standard und Probe geschätzt.**

|     | NWG   | BG    |
|-----|-------|-------|
|     | µg/kg | µg/kg |
| VIC | 1,0   | 2,5   |
| VIB | 1,0   | 2,5   |
| CPP | 2,0   | 5,0   |

Doxorubicin konnte weder in Proben noch in den Positivkontrollen detektiert werden.

#### 4.5.5 Speichel

Für Speichel stand nur eine begrenzte Menge an Leermatrix zur Verfügung. Aus diesem Grund konnte die Methodik nicht in größerem Umfang an die Matrix angepasst werden. Es wurde die Methodik für Hunde-Urin übernommen und eine Validierung im unteren Konzentrationsbereich (bis 25 µg/L) durchgeführt. In Tab. 4-5 sind die Validierungsparameter für Hunde-Speichel angegeben. Die Wiederfindungsraten (Overall process efficiency) sind generell etwas niedriger als für die Matrix Serum und Urin.

**Tab. 4-5. Validierungsparameter Speichel.**

|                               | VIC        | VIB        | CPP         | MPA         | CAB         | DXR         |
|-------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Linearitätsbereich (µg/L)     | 2,5-25     | 2,5-25     | 2,5-25      | 2,5-25      | 2,5-25      | 2,5-25      |
| R <sup>2</sup>                | 0,9958     | 0,9992     | 0,9883      | 0,9965      | 0,9907      | 0,9009      |
| NWG (µg/kg)                   | 1,0        | 1,0        | 1,0         | 2,5         | 2,5         | 2,5         |
| Richtigkeit (%) <sup>a)</sup> | 63,2       | 48,4       | 68,4        | 71,5        | 63,3        | 61,3        |
| Präzision (%) <sup>b)</sup>   | 5,5 - 22,9 | 5,7 - 18,5 | 12,4 - 31,0 | 17,1 - 44,6 | 13,4 - 26,9 | 12,9 - 37,2 |

<sup>a)</sup> angegeben als Overall process efficiency (WDF); <sup>b)</sup> angegeben als Variationskoeffizient

## 5 Diskussion

Mit den vorliegenden Arbeiten konnten wichtige Beiträge für zwei neue Bereiche der Umweltproblematik von Tierarzneimitteln geliefert werden: Rückstände von Zytostatika aus der veterinärmedizinischen Chemotherapie sowie ein möglicher Abbau/Elimination von Sulfonamiden in der anaeroben Fermentation (Abb. 5-1). Die hierbei entwickelten analytischen Methoden sind unerlässlich, um auf der einen Seite neue Wege der Exposition des Menschen mit Tierarzneimitteln zu erkennen und auf der anderen Seite Möglichkeiten zu finden, um den Eintrag von Tierarzneimitteln in die Umwelt zu reduzieren.

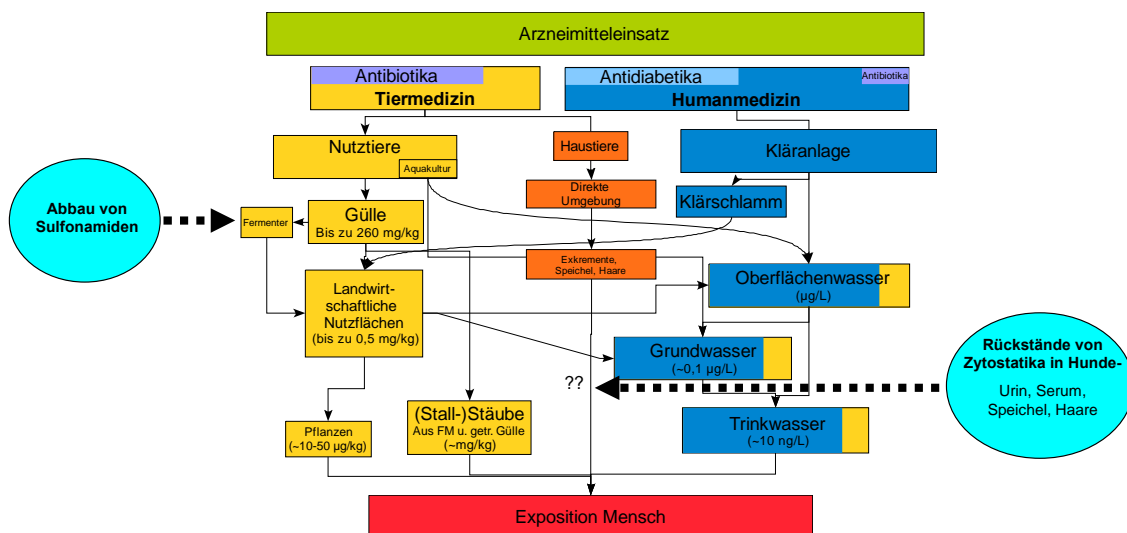


Abb. 5-1. Mögliche Expositionswege von Arzneimitteln zum Menschen – Einordnung der eigenen Arbeiten.

### 5.1 Elimination von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation

Für die Untersuchungen des Eliminationsverhaltens von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation wurde eine neue HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden in Gärsubstrat entwickelt (Publikation 1). Mit dieser konnten Proben aus Fermentationsversuchen gezielt auf den Abbau von Sulfonamiden während der anaeroben Fermentation untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass einige Sulfonamide

(Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol, Sulfadimethoxin) nach 34-tägiger Gärung effizient eliminiert werden können. Für Sulfadiazin konnte 4-OH-Sulfadiazin als Abbauprodukt identifiziert werden, das weniger als 10 % der mikrobiologischen Aktivität der Muttersubstanz aufweist. Obwohl der Gärprozess unter anaeroben Bedingungen abläuft, wurde überraschenderweise ein hydroxyliertes Produkt gebildet. Eine ähnliche Abbaureaktion durch Bakterien wurde von Chakraborty und Coates (2005) für Benzol beschrieben. Als Abbau-/Zwischenprodukt identifizierten sie Phenol.

In der intensiven Nutztierhaltung ist der Einsatz für Antibiotika zur Erhaltung der Gesundheit der Tiere essenziell (Kemper 2008). Daher werden über die Wirtschaftsdünger auch in der Zukunft Arzneistoffe in die Umwelt gelangen. In Biogasanlagen, in denen eine anaerobe Fermentation stattfindet, wird bis zu 30 % Gülle als Substrat eingesetzt. Wie am Beispiel des Sulfadiazins gezeigt wurde, können Pharmazeutika mittels anaerober Fermentation zumindest soweit metabolisiert werden, dass die antimikrobiologische Wirkung drastisch vermindert wird. Innerhalb der Gruppe der Sulfonamide sind Sulfadiazin und Sulfamethazin die in der Veterinärmedizin am häufigsten eingesetzten Sulfonamide. Sulfamethazin konnte im Gegensatz zu Sulfadiazin weder deutlich eliminiert noch abgebaut werden. Aus den hier ermittelten Ergebnissen könnte Tierärzten daher die Empfehlung gegeben werden, anstelle von Sulfamethazin bevorzugt Sulfadiazin einzusetzen. Der Landwirt sollte die Gülle dann vor dem Aufbringen auf landwirtschaftliche Nutzflächen durch eine Biogasanlage leiten. Somit könnte zumindest der Eintrag eines biologisch aktiven Tierarzneimittels in die Umwelt reduziert werden (Abb. 5-1). Für die anderen in dieser Arbeit untersuchten Sulfonamide, die ein Eliminationsverhalten aufwiesen, konnten jedoch keine Abbauprodukte nachgewiesen werden.

## ***5.2 Zytostatika in Hunde-Urin und -Serum***

Im zweiten Teil der Arbeit wurden HPLC-MS-Methoden zum Nachweis verschiedener Zytostatika, die u. a. in der Chemotherapie von Hunden eingesetzt werden, entwickelt. Mit diesen Verfahren sollten auch mögliche Expositionswege des Menschen mit dieser toxikologisch hochrelevanten Substanzgruppe identifiziert werden.



Die zunächst entwickelten Methoden (Publikationen 2–4) wurden verwendet, um Vincristin, Vinblastin, Cyclophosphamid und Doxorubicin in Urin- und Serumproben von Patienten aus der Kleintierklinik zu untersuchen.

Im Urin konnte ein sehr unterschiedliches Ausscheidungsverhalten der vier untersuchten Substanzen festgestellt werden. Vincristin und Vinblastin sind in der Regel bis zu sieben und in einzelnen Proben noch bis zu 14 Tage nach der Gabe nachweisbar. Während Doxorubicin noch bis zu 21 Tage nach der Applikation nachweisbar ist, findet man Cyclophosphamid nur noch in wenigen Proben an Tag 1 nach der Gabe. Die ausgeschiedenen Mengen liegen teilweise im mg/L-Bereich. So wurde Doxorubicin in einer Probe in einer Konzentration von 3,6 mg/L gemessen.

Da keine weiteren Untersuchungen zum direkten Risiko des Zytostatika enthaltenden Urins für die umgebenden Mensch durchgeführt wurden, soll hier ein Vergleich der ermittelten Konzentrationen mit den Dosierungen in der Humanmedizin durchgeführt werden. Dabei sollen die Tagesdosierungen in mg für das Wirkpotenzial der einzelnen Zytostatika stehen. So beträgt eine typische Tagesdosis für Doxorubicin in der Humanmedizin für eine 80 kg wiegende Person ca. 0,8 mg<sup>3</sup> (Mutschler et al. 2001) Unter der Annahme, dass eine Person einen Milliliter Hunde-Urin aufnimmt (oral oder i. v.), würde sie somit das 0,005-fache einer Tagesdosis für Doxorubicin in der Humantherapie aufnehmen. Für Vincristin (3 mg<sup>4</sup> Tagesdosis) ergibt sich aus den ermittelten Werten und Humandosierungen ein Faktor von 0,00005 der Tagesdosis und für Cyclophosphamid (200 mg<sup>5</sup> Tagesdosis) ein Faktor von 0,000013 der Tagesdosis. Diese Faktoren lassen das Risiko für die Menschen im Umfeld der Tiere sehr gering erscheinen zumal eine orale Aufnahme von 1 mL Urin sehr unwahrscheinlich ist. Dennoch kann eine dermale Aufnahme, z. B. beim Entfernen von Urin, nicht ausgeschlossen werden und laut IARC sollte jede Exposition mit diesen mutagenen, teratogenen und zum Teil kanzerogenen Substanzen vermieden werden. Im Vergleich der untersuchten Zytostatika untereinander scheint von Doxorubicin das größte Risiko auszugehen. Inwieweit tatsächlich ein Risiko von den gemessenen Zytostatika-Konzentrationen ausgeht, muss jedoch z. B. in Muta-

---

<sup>3</sup> 10-15 µg/kg KG i. v.

<sup>4</sup> 1,4 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche Berechnung für eine 80 kg schwere und 175 cm große Person. Körperoberfläche (m<sup>2</sup>) = (Gewicht (kg) x Größe (cm) / 3600)<sup>0,5</sup> (Mosteller 1987)

<sup>5</sup> 200-300 mg täglich i. v. oder per oral

genitätsassays geklärt werden. Insofern sollten die Hundebesitzer zukünftig darauf hingewiesen werden, dass sie beim Aufwischen von Hunde-Urin Handschuhe anziehen müssen.

Im Gegensatz zu Urin kommt mit Serum nur das Klinikpersonal in Kontakt. In der Regel erfolgt im wöchentlichen Zyklus der Chemotherapie, also unmittelbar vor der nächsten Infusion eine Blut-/Serumentnahme. In den hier untersuchten Serumproben (n=81) waren, im Unterschied zur Matrix Urin, jedoch keine der vier untersuchten Substanzen nachweisbar. Nur in Proben direkt nach Applikation (5 min) der Chemotherapie (n=33) wurden z. T. sehr hohe Konzentrationen ermittelt (2,8 mg/L). In zwei Proben konnte an Tag 1-2 Cyclophosphamid nachgewiesen werden (7 bzw. 9 µg/L). Für das Klinikpersonal besteht somit insbesondere beim An- und Ablegen der Infusionslösungen und -schläuche ein Kontaminationsrisiko, nicht jedoch bei Blutabnahmen mehrere Tage nach einer Chemotherapie.

### ***5.3 Weiterentwicklung der Urin und Serummethodik***

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, wurde die Methodik von Flüssig-Flüssig-Extraktion auf Festphasenextraktion umgestellt. Zum einen war es dadurch möglich, Melphalan zu bestimmen und zum anderen konnte so eine grundlegende Methode für weitere Matrices geschaffen werden. Die prinzipielle Aussage, dass eine SPE-Methodik höhere Wiederfindungsraten ermöglicht (Novakova und Vlckova 2009) konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. So wurden in der neuen Methodik größere Matrixeffekte ermittelt als in der Flüssig-Flüssig-Extraktion (vgl. Publikation 2). Dies bedeutet, dass immer noch relativ viele Matrixbestandteile in den mittels SPE erhaltenen Extrakten enthalten sind.

Mittels SPE konnten acht Substanzen (6 Wirkstoffe, 2 interne Standards) in einer Probenvorbereitung aufgearbeitet werden. Die Messung musste nach zwei HPLC-Trennungen erfolgen, um eine Basislinientrennung zu erhalten und damit für alle Substanzen die nötige Sensitivität zu erreichen. Aufgrund koeluierender Matrixbestandteile musste für die Bestimmung von Melphalan die Messung im MS<sup>3</sup>-Modus durchgeführt werden. Somit ist die Nachweisgrenze im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen relativ hoch und liegt bei 25 µg/L.

Für alle Analyten konnten sowohl in Urin als auch in Serum Wiederfindungsraten von  $> 70\%$  und Variationskoeffizienten bis auf Doxorubicin und Melphalan in Urin von  $< 20\%$  erreicht werden.

Mit der neuen Methodik war es möglich, Proben von Hunden, die mit Melphalan und Chlorambucil behandelt wurden, zu analysieren. Da nur wenige Patienten diese Therapie erhalten, war das Probenaufkommen nicht sehr groß. In vier von 16 Serumproben wurden Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze von Chlorambucil ermittelt. Melphalan konnte in einer von 25 Serumproben ebenfalls im Bereich der Nachweisgrenze detektiert werden.

In keiner der untersuchten Urinproben konnte Chlorambucil nachgewiesen werden. Melphalan wurde in sechs von 19 untersuchten Proben mit einer Konzentration von bis zu  $0,37\text{ mg/L}$  nachgewiesen. Bei einer Richtdosis von  $10\text{ mg/Tag}$  ist dies das ca.  $0,000037$ -fache einer Tagesdosis für den Menschen. Dieser Faktor liegt zwischen dem für Vincristin und Cyclophosphamid, die weiter vorne beschrieben wurden. Insofern wäre das Expositionsrisiko der Menschen in der Umgebung von mit Chlorambucil und Melphalan behandelten Hunden ähnlich zu bewerten wie für Vincristin und Cyclophosphamid.

#### **5.4 Zytostatika in Hunde-Haar**

Für die Matrix Haare bestand die größte Schwierigkeit darin, Referenzproben herzustellen. Eine Dotierung von eingewogenen Haaren mit Standardlösungen simuliert nur die Situation von Substanzen an der Haaroberfläche. So wurde angenommen, dass Substanzen die mit der in Anlehnung an Barroso et al. (2008) erstellten Methode detektiert wurden, sich innerhalb der Haarstruktur befanden. D. h., dass mit der erarbeiteten Methodik basierend auf einem enzymatischen Aufschluss die Struktur der Haare aufgebrochen und die Substanzen für die weitere Probenvorbereitung freigesetzt wurden.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode wurden 98 Haarproben untersucht, wovon in acht Proben Vincristin und in drei Proben Cyclophosphamid nachgewiesen werden konnte. Für drei der positiven Vincristinproben wurde eine Konzentration im Bereich der Bestimmungsgrenze ( $2,5\text{ }\mu\text{g/kg}$ ) ermittelt.

Da es weder in der Veterinärmedizin noch in der Humanmedizin Untersuchungen zu Zytostatika in Haaren gibt, soll hier ein Vergleich mit der Kokainanalytik in humanen Haarproben vorgenommen werden. Da Vincristin wie Kokain zur Gruppe der Alkaloide gehört, soll hier ein ähnliches Verteilungsverhalten für beide Substanzen im Körper angenommen werden. Die in dieser Arbeit für Vincristin in Hunde-Haar ermittelten Werte liegen allerdings weit unter den Konzentrationen, die für Kokain in humanen Haarproben ermittelt werden können. So wurde in einem von der Society of Hair Testing 2004 durchgeführten Ringversuch ein Medianwert von 2 ng/mg – also 1000-fach mehr als in den hier untersuchten Hundehaaren – bestimmt (Pragst und Balikova 2006). Bei der intranasalen Aufnahme, welches der effektivste Weg für die Kokainaufnahme ist, werden im Durchschnitt 30 mg aufgenommen. Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit wird die Aufnahme in der Regel wiederholt, so dass Gesamtdosen von ca. 150 mg erreicht werden. Diese werden bei Abhängigkeit jedoch immer höher, da mit jeder Einnahme ein gewisser Gewöhnungseffekt eintritt (Verebey und Gold 1988). Im Vergleich dazu sind die Dosierungen für Vincristin beim Hund mit 0,7 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (ca. 0,7 mg wöchentlich für einen 30 kg schweren Hund (Labrador)) sehr niedrig und könnten somit eine Erklärung für die sehr niedrigen Konzentrationen in den Haaren sein (Nolte und Nolte 2000).

Cyclophosphamid wird im Gegensatz zu Vincristin in Dosierungen bis zu 200 mg/m<sup>2</sup> eingesetzt, konnte aber in noch geringeren Konzentrationen als Vincristin detektiert werden. Dies liegt sehr wahrscheinlich an der schnellen Metabolisierung von Cyclophosphamid und geht einher mit den Untersuchungen in Urin, in dem Cyclophosphamid nur bis Tag 1 nachweisbar war. Generell neigen eher basische Substanzen zur Diffusion ins Haar (Pragst und Balikova 2006). Doxorubicin ( $pK_s = 8,2$ ) müsste demnach am besten von denen in dieser Arbeit untersuchten Chemotherapeutika ( $pK_s$ -Werte: VIC = 5,0; VIB = 7,4; CPP = 2,8; MPA = 2,5; CAB = 5,8) in das Haar übergehen. Allerdings zeigt Doxorubicin aufgrund seiner chemischen Struktur, die der der Tetracycline sehr ähnlich ist, wahrscheinlich ebenfalls Komplexbildung mit 2- und 3-wertigen Ionen und gelangt daher trotz einer 40-fach höheren Dosierung als Vincristin nicht in das Haar.

Ein weiterer Grund für die niedrigen Konzentrationen bzw. die Nicht-Nachweisbarkeit von Zytostatika in Hunde-Haar kann das Haarwachstum sein. Während beim Menschen das Haar mehr oder weniger kontinuierlich wächst, wechselt der Hund in der Regel

zweimal im Jahr sein Fell (zum Winter und zum Sommer). Durch diesen Wechsel und den damit verbundenen vorherigen Wachstumsstopp findet in dieser Zeit, die Wochen bis Monate dauern kann, keine Nährstoffaufnahme und somit wahrscheinlich auch keine Aufnahme von Fremdstoffen statt (Gunaratnam und Wilkinson 1983). Da eine Chemotherapie in der Regel zeitlich begrenzt für drei Monate durchgeführt wird, ist auch der Zeitraum, in dem eine Aufnahme der Chemotherapeutika erfolgt, sehr begrenzt.

Ein dritter Aspekt führt zu Studien in der Humanmedizin, die ergeben haben, dass ein Teil der Fremdstoffe von außen über den Schweiß in die Haare gelangt (Henderson 1993). Hunde schwitzen jedoch nicht wie der Mensch über Schweißdrüsen in der Haut, sondern hecheln überschüssige Wärme über die Zunge ab (Aoki und Wada 1951; Jessen 2000). Eine Aufnahme der Substanzen in die Haare über den Schweiß ist somit beim Hund unwahrscheinlich.

Insofern könnten vor allem die hier ausgeführten Spezies-Unterschiede und die eingenommenen Mengen eine Erklärung dafür sein, dass nur geringe Konzentrationen der untersuchten Zytostatika in Hunde-Haaren nachgewiesen werden konnten. Aufgrund der niedrigen ermittelten Konzentrationen ist das Risiko, das von der Aufnahme von Hunde-Haar ausgeht, im Vergleich zu Urin somit als deutlich geringer zu bewerten.

### ***5.5 Zytostatika in Hunde-Speichel***

Eine wichtige Matrix für Untersuchungen auf Zytostatika stellte Hunde-Speichel dar, da hier auch die Möglichkeit einer nicht invasiven Probennahme besteht. Jedoch konnten in der Praxis keine großen Mengen Speichel von Hunden gewonnen werden, weshalb eine Probenmenge von 0,5 g gewählt wurde. Damit war es möglich, trotz der geringen Menge Leermatrix eine Validierung durchzuführen. Da auf die zuvor entwickelte SPE-Methodik zurückgegriffen werden konnte, waren, ohne große Optimierungsschritte Wiederfindungsraten von ca. 70 % möglich.

Bisher wurden auch in der Humanmedizin nur vereinzelte Studien zur Analytik von Zytostatika in Speichel durchgeführt. Am Beispiel des Doxorubicins wurde das Verhältnis Plasma- zu Speichelkonzentration untersucht (Maudens et al. 2009). Es wurde eine Wiederfindungsrate von 70,4 % bei einer Konzentration von 5 ng/mL für Doxorubicin erzielt, die etwas höher liegt als die in dieser Arbeit ermittelte. In derselben Arbeit wurde auch Epirubicin, ein Hydroxy-Derivat des Doxorubicins, in Patienten-

speichel untersucht. Für Epirubicin wurden ca. vier Stunden nach der Infusion Maximalwerte von ca. 80 ng/mL ermittelt. Im Vergleich zur Veterinärmedizin sind die eingesetzten Dosierungen in der Humanmedizin allerdings um das 3-5-fache höher. So wurde Epirubicin in der beschriebenen Studie in einer Dosis von 100 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche eingesetzt und die empfohlene Dosierung in der Veterinärmedizin beträgt nur 30 mg/m<sup>2</sup> (Simon 2000). Jedoch wurde in keiner der hier untersuchten Speichelproben (n=4), die am Tag der Infusion von Doxorubicin genommen wurden, Doxorubicin nachgewiesen (NWG = 2,5 µg/kg). Somit kann im Falle des Doxorubicins gefolgert werden, dass Studien aus der Humanmedizin nicht unmittelbar auf die Veterinärmedizin übertragen werden können. Möglicherweise sind eine unterschiedliche Nahrungszusammensetzung, die niedrigeren Dosierungen oder sich unterscheidende Verteilungsvorgänge im Körper für diese abweichenden Ergebnisse verantwortlich.

Cyclophosphamid konnte, im Gegensatz zu Doxorubicin, in der vorliegenden Arbeit in sechs Speichelproben detektiert werden. In allen vier Proben, die am Tag der Infusion gezogen wurden, konnte der Analyt in Konzentrationen bis zu 7,7 µg/kg ermittelt werden. Allerdings wird Cyclophosphamid in viel höheren Dosierungen als Doxorubicin eingesetzt – nämlich 200 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Des Weiteren besteht ein Zusammenhang des Gehaltes im Speichel mit dem Gehalt der verfügbaren Substanz im Plasma. Von den in dieser Arbeit am intensivsten untersuchten Substanzen weist Cyclophosphamid mit 50 % die geringste Plasmaproteinbindung auf. Doxorubicin und Vincristin weisen beide eine Bindung an Blutbestandteile von ca. 75 % auf (Kümmerer et al. 2008). Somit wäre dies eine mögliche Erklärung für den Nachweis von Cyclophosphamid in Speichel.

## **5.6 Zusammenfassende Diskussion**

In Abb. 5-1 sind mögliche Expositionswege des Menschen mit Arzneimitteln aus der Human- und Veterinärmedizin dargestellt. Viele dieser Wege sind in den letzten Jahren bereits gut charakterisiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Bereiche näher untersucht. Zum einen konnte anhand des Sulfadiazins gezeigt werden, dass der anaerobe Fermentationsprozess zu einem Abbau antimikrobiologisch aktiver Substanzen beitragen kann. Unter der Annahme, dass der anaerobe Fermentationsprozess aus den hier eingesetzten 5 L Fermentern auf eine Biogasanlage übertragbar ist, könnte somit eine Möglichkeit gegeben sein, einen Eintragsweg zu unterbrechen. Das hieße, es könnte

möglicherweise durch Biogasanlagen der Eintrag von Antibiotika aus der Nutztierhaltung in die Umwelt reduziert werden und möglicherweise auch das Risiko der Resistenzentstehung reduziert werden.

Zum anderen konnte ein neuer Expositionsweg für in der Veterinärmedizin verwendete Pharmazeutika beschrieben werden. Zytostatika können über Ausscheidungen von Hunden, die eine Chemotherapie erhalten, in das nähere Umfeld der Besitzer gelangen. Speziell über Urin kann über einen längeren Zeitraum als bisher angenommen eine Exposition erfolgen. Bisherige Leitlinien für den Umgang mit Zytostatika in der Veterinärmedizin wurden aus humanmedizinischen Untersuchungen abgeleitet (ECVIMCA 2007). So wird für Doxorubicin eine Ausscheidungszeit im Urin von sieben Tagen angegeben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – Exkretion von DXR im Hunde-Urin bis zu 21 Tage – zeigen, dass dieser Zeitraum für veterinärmedizinische Chemotherapien verlängert werden muss. Im Gegensatz dazu kann für Serum, welches insbesondere im Bereich der beruflichen Exposition eine Rolle spielt, kein Risiko festgestellt werden. Eine Woche nach der Infusion von Chemotherapeutika, dem relevanten Zeitpunkt für Blut-/Serumentnahme zwecks Kontrolluntersuchungen, wurden keine Rückstände detektiert.

Die in Hunde-Haaren und -Speichel nachgewiesenen Konzentrationen sind sehr gering ( $< 10 \mu\text{g/L}$  bzw.  $< 10 \mu\text{g/kg}$ ). Diese Matrices spielen gerade in der Tiermedizin eine größere Rolle als in der Humanmedizin. Wechseln die Tiere ihr Fell, so gelangen Haare in die häusliche Umgebung und können z. B. von Personen im Umfeld aufgenommen werden. Des Weiteren spielt der Kontakt von Speichel bei Hunden eine große Rolle, da die Schnauze für sie den hauptsächlichen Weg der Kontaktaufnahme mit der Umwelt darstellt. Im Vergleich zu den ermittelten Konzentrationen in Urin sind sie jedoch um mindestens einen Faktor 100 niedriger. Da nach der IARC jedweder Kontakt mit diesen toxikologisch relevanten Substanzen vermieden werden soll, können auch diese geringen Konzentrationen nicht vernachlässigt werden. So muss ein enger Kontakt mit den Tieren während einer Chemotherapie vermieden werden. Insbesondere sollte der Kontakt zwischen Kleinkindern und mit Zytostatika behandelten Tieren ausgeschlossen werden.

Letztendlich ist festzustellen, dass wahrscheinlich von Urin aufgrund des schwer zu beherrschenden Kontaminationsrisikos verbunden mit den darin enthaltenen höheren

Konzentrationen das größte Gefährdungspotenzial von allen untersuchten Matrices für den Menschen ausgeht.

Die Substanz von der wahrscheinlich das größte Risiko für das Umfeld, in dem sich der Hund nach der Chemotherapie aufhält, ausgeht, ist Doxorubicin, da für diese Substanz sowohl die höchsten Konzentrationen (3,6 mg/L) als auch die längste Ausscheidungszeit (21 Tage) ermittelt werden konnten. Somit ist nach der Applikation von Doxorubicin im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Zytostatika die größte Vorsicht geboten.

Für die Bestimmung von Zytostatika und Antibiotika in den dargestellten biologischen Matrices war die Entwicklung sensitiver und selektiver analytischer Methoden erforderlich. Diese konnten erfolgreich entwickelt und validiert werden. Messungen von Realproben zeigen, dass die Analyten auch in niedrigen Konzentrationsbereichen nachgewiesen und quantifiziert werden konnten.



## 6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Sulfadiazin mithilfe der anaeroben Fermentation mikrobiologisch nahezu inaktivieren und partiell abbauen lässt. Sulfonamide werden heute in der Nutztierhaltung immer noch sehr häufig eingesetzt. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Fermentationstests wurden neben Sulfadiazin noch Sulfamerazin, Sulfamethoxazol, und Sulfadimethoxin nahezu vollständig eliminiert. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit auch für diese Substanzen Abbauprodukte identifiziert werden können und ob diese ebenfalls zu einer Reduzierung der antimikrobiellen Aktivität der eingetragenen Antibiotika führen.

Für den Bereich der Zytostatika, die zunehmend in der Kleintiermedizin eingesetzt werden, konnte in der vorliegenden Arbeit der Eintrag in die klinische und häusliche Umgebung durch Urin, Haare und Speichel bereits umfassend charakterisiert werden. Weitere Untersuchungen, z. B. an Haarproben, die von geschorenen bzw. gekämmten Hunden stammen, könnten zeigen, ob ein Unterschied zwischen wachsenden und nicht mehr wachsenden Haaren besteht.

Auch die Entwicklung einer Methode zur Aufarbeitung von Hunde-Fäzes wäre ein wichtiger neuer Ansatz. Da die untersuchten Zytostatika teilweise auch biliär ausgeschieden werden, stellt Hunde-Kot eine weitere Möglichkeit des Eintrags von hochtoxischen Substanzen in das nähere Umfeld behandelter Hunde dar.

## 7 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse (Publikationen 1-4)

Der selbstständige Anteil an diesen Publikationen umfasst die Methodenentwicklung und –validierung, Auswertung der Ergebnisse, Literaturrecherche und die Verfassung der Publikationen als Erstautorin (Publikation 1,2 u. 4<sup>6</sup>) und Zweitautorin (Publikation 3).

1. MOHRING S.A.I., STRZYSCH I., FERNANDES M., KIFFMEYER T., TUERK J., HAMSCHER G. (2009)  
Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: A promising step on the way to sustainable pharmacy?  
*Environmental Science and Technology* 43, 2569–2574.
2. HAMSCHER G., MOHRING S.A.I., KNOBLOCH A., EBERLE N., NAU H., NOLTE I., SIMON D. (2010)  
Determination of Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anti-Cancer Chemotherapy by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Is There An Environmental or Occupational Risk?  
*Journal of Analytical Toxicology* 34 (3), 142-148.
3. KNOBLOCH A., MOHRING S.A.I., EBERLE N., NOLTE I., HAMSCHER G., SIMON D. (2010)  
Cytotoxic Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy.  
*Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (2), 384-390.
4. KNOBLOCH A., MOHRING S.A.I., EBERLE N., NOLTE I., HAMSCHER G., SIMON D. (2010)  
Drug Residues in Serum of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy.  
*Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (2), 379-383.

---

<sup>6</sup> Geteilte Erstautorenschaft für Publikation 2 und 4.

## 7.1 Publikation 1

Siegrun A. I. Mohring, Ina Strzysch, Marcos Reis Fernandes, Thekla K. Kiffmeyer,  
Jochen Tuerk, and Gerd Hamscher

### **Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy?**

Environmental Science and Technology, **2009**, 43 (7), 2569-2574

<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/es802042d>

#### Abstract

Antibiotics, most notably sulfonamides and tetracyclines, are frequently used veterinary pharmaceuticals in animal husbandry. A new field of application for animal manure is in biogas plants for generating environmentally friendly energy. As a result, antibiotics contained in manure may still reach the environment as fermentation residues are also used on agricultural fields as fertilizers. Therefore, in fermentation tests seven sulfonamides and trimethoprim were investigated regarding their elimination behavior during a five-week fermentation process. Sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, and trimethoprim were nearly completely eliminated while sulfathiazole, sulfamethazine, and sulfamethoxypyridazine showed persistence. For sulfadiazine it was possible by means of mass spectrometry to identify and partly quantify a metabolite, emerging from a hydroxylation at the pyrimidine ring, 4-OH-sulfadiazine. Furthermore, a microbial inhibition test showed a substantial reduction in the antimicrobial activity of the metabolite compared to the parent compound. Thus, the fermentation process may be an efficient way to reduce the load of selected veterinary antibiotics finding their way into the environment. Degradable drugs such as sulfadiazine may therefore, at least in the aspect of residual antibiotic activity of metabolites, be considered as environmentally friendly drugs.

## 7.2 Publikation 2

Gerd Hamscher, Siegrun A.I. Mohring, Anna Knobloch, Nina Eberle, Heinz Nau, Ingo Nolte, and Daniela Simon

### **Determination of Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anti-Cancer Chemotherapy by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Is There An Environmental or Occupational Risk?**

Journal of Analytical Toxicology, 2010, 34(3), 142-148

<http://www.jatox.com/index.php/Articles/Determination-of-Drug-Residues-in-Urine-of-Dogs-Receiving-Anti-Cancer-Chemotherapy-by-Liquid-Chromatography%E2%80%93Electrospray-Ionization-Tandem-Mass-Spectrometry-Is-There-An-Environmental-or-Occupational-Risk.html>

#### Abstract

Cytotoxic drugs, previously used only in human medicine, are increasingly utilized for cancer treatment in veterinary practice. We developed and validated a liquid chromatography (LC)–electrospray ionization-tandem mass spectrometry method to determine vincristine, vinblastine, cyclophosphamide, and doxorubicin in canine urine. Sample pretreatment consisted of liquid–liquid extraction, and LC separation was carried out on an RP C18 column employing a 0.5% formic acid/methanol gradient system. The analytes were detected in positive ion mode using the MS–MS scan mode. The mean recoveries in six different urine samples were between 64.2% and 86.9%. Limits of quantitation were 0.5 µg/L for vincristine and vinblastine, 1 µg/L for cyclophosphamide, and 5 µg/L for doxorubicin; limits of detection were approximately 0.25 µg/L for vincristine, vinblastine, and cyclophosphamide and 0.5 µg/L for doxorubicin. It could be demonstrated that all investigated drugs are found in urine of dogs undergoing chemotherapy. In samples from day 1 after chemotherapy, as much as 63 µg/L vincristine, 111 µg/L vinblastine, and 762 µg/L doxorubicin could be detected. Cyclophosphamide showed only minor concentrations on day 1, but up to 2583 µg/L could be found directly after chemotherapy. These initial data show that there might be a potential contamination risk when administering cytotoxics in veterinary medicine.

### 7.3 Publikation 3

Anna Knobloch, Siegrun A.I. Mohring, Nina Eberle, Ingo Nolte, Gerd Hamscher,  
and Daniela Simon

## Cytotoxic Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy

Journal Veterinary Internal Medicine, 2010, 24(2), 384–390

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0453.x/abstract>

#### Abstract

**Background:** The presence of cytotoxic drug residues in urine of dogs may represent an exposure risk for pet owners and other people as well as a potential environmental contaminant. However, studies on cytotoxic drug residues in excretions of clinical patients are lacking in veterinary oncology.

**Hypothesis:** Variable concentrations of cytotoxic residues are present in urine samples, depending on sampling time and substance.

**Animals:** Client-owned dogs with lymphoma or mast cell tumors treated with standard chemotherapy protocols.

**Methods:** Urine samples were collected before, directly after, and on days after administration of chemotherapy. Measurement of vincristine, vinblastine, cyclophosphamide, and doxorubicin residues in canine urine was performed by a quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method.

**Results:** Median cyclophosphamide residue concentration was 398.2  $\mu\text{g/L}$  directly after treatment (d0) and was below the level of detection on days 1-3 (d1, d2, d3). Median vincristine residue concentration was 53.8  $\mu\text{g/L}$  directly after treatment and was 20.2, 11.4, and 6.6  $\mu\text{g/L}$  on days 1, 2, and 3. Median vinblastine residues were 144.9 (d0), 70.8 (d1), 35.6 (d2), and 18.7  $\mu\text{g/L}$  (d3) with low concentrations detectable for 7 days after treatment. Median urine doxorubicin concentrations were 354.0 (d0), 165.6 (d1), 156.9 (d2), and 158.2  $\mu\text{g/L}$  (d3). Low concentrations of doxorubicin were measurable up to 21 days after administration.

**Conclusions and Clinical Importance:** Variable concentrations of chemotherapeutics were measured in urine samples, depending on sampling time point and drug. Findings may inform current chemoprotection guidelines and help minimize exposure risks.

## 7.4 Publikation 4

Anna Knobloch, Siegrun A.I. Mohring, Nina Eberle, Ingo Nolte, Gerd Hamscher,  
and Daniela Simon

### Drug Residues in Serum of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy

Journal Veterinary Internal Medicine, **2010**, 24(2), 379-383

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0469.x/abstract>

#### Abstract

**Background:** The presence of drug residues in blood samples can represent an occupational hazard. However, studies on cytotoxic drug residues in serum of dogs are lacking in veterinary oncology.

**Objective:** To evaluate possible occupational hazards associated with handling of blood samples from dogs receiving oncolytic drugs 7 days after treatment.

**Animals:** Twenty-seven client-owned dogs treated for lymphoma or mast cell tumors with vincristine, vinblastine, cyclophosphamide, or doxorubicin.

**Methods:** Prospective, observational study. Serum samples were either taken 7 days after administration of vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin (lymphoma), and vinblastine (mast cell tumor), or 1-2 days after the last concurrent oral administration of cyclophosphamide (mast cell tumor). Additionally, serum was collected within 5 minutes of treatment. Measurement of drug residues in serum was performed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

**Results:** In 33 samples collected within 5 minute of treatment, the median serum concentrations were vincristine: 37  $\mu$ g/L (range: 11-87  $\mu$ g/L), vinblastine: 13  $\mu$ g/L (range: 13-35  $\mu$ g/L), cyclophosphamide: 2,484  $\mu$ g/L (range: 1,209-2,778  $\mu$ g/L), doxorubicin: 404  $\mu$ g/L (range: 234-528  $\mu$ g/L). In 81 serum samples collected 7 days after treatment vinblastine (7  $\mu$ g/L) was detected in 1 sample, and cyclophosphamide (7 and 9  $\mu$ g/L) in 2 samples collected 1-2 days after oral administration of cyclophosphamide. Medications were not detected in any of the other samples.

**Conclusions and Clinical Importance:** Handling of blood samples from dogs receiving oncolytic chemotherapy 7 days after treatment with vincristine, vinblastine, cyclophosphamide, and doxorubicin should not present a health hazard.

## 8 Experimentelles

### M1 Analyse von Sulfonamiden in Gärsubstrat

Die Probenvorbereitung wird mit Ethylacetat in einer Flüssigextraktion durchgeführt. Die Messung erfolgt mittels HPLC-MS. Eine genaue Beschreibung der Methodik ist in Publikation 1 beschrieben.

### M2 Probenvorbereitung Urin (Flüssig-Flüssig-Extraktion)

Die Flüssigextraktion erfolgt mit Dichlormethan. Die Messung wird erfolgt mittels HPLC-MS. Die genaue Methodik ist in Publikation 2 beschrieben.

### M3 Probenvorbereitung Serum (Flüssig-Flüssig-Extraktion)

Die Flüssigextraktion erfolgt mit Ethylacetat. Die HPLC-MS-Analyse ist identisch zur Urin-Methode M2. Die genaue Methodik ist in Publikation 4 beschrieben.

### M4 Reinigung von Glasgeräten

#### Geräte

Spülmaschine: Mielabor G7783 (mit Reinstwasserspülanlage), Miele, Gütersloh, Deutschland

Ofen: Bosch, HBA 70B5 mit Pyrolysefunktion

#### Chemikalien

Reiniger für  
Laborspülmaschinen: RBS Solid Konzentrat, Carl Roth GmbH & Co.

#### Arbeitsvorschrift

Die zu reinigenden Glasgeräte werden bei ca. 85 °C in der Spülmaschine unter Verwendung des Reinigers gespült. Anschließend werden die Geräte im Pyrolyseofen für mindestens 1,5 Stunden bei ca. 500 °C ausgeheizt.

**M5 Probenvorbereitung Urin (Festphasenextraktion)****Geräte**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Pipetten:            | Eppendorf Reference® Variabel, verschiedene Volumenbereiche, Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| SPE-Kammer:          | Baker spe-12G, 7018-94   |
| Rotationsverdampfer: | Laborota-4002 digital, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland                          |
| Multipette:          | Multipette® Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland  |

**Chemikalien**

|   |   |
|---|---|
| Methanol  | HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt Baker, 8402 |
| Reinstwasser  | R > 18 MΩ                                     |
| NaCl  | zur Analyse, Merck, 1.06404                   |
| KCl   | zur Analyse, Merck, 1.04936                   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | zur Analyse, Merck, 1.06580                   |
| EDTA  | Ultraprein, Sigma, E-1644                     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | zur Analyse, Merck, 1.04873                   |
| Interne Standard-Lösung                               | 2 µg/mL Colchicin und Ifosfamid               |

**Verbrauchsmaterial**

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| SPE-Kartuschen:                 | Bond Elut Plexa, 200 mg, 6 mL, Varian 12109206  |
| Probenfläschchen:               | 1,5 mL, klar, Schraubkappe, MasCom Analysengeräte Service GmbH, Bremen, 1000.10               |
| Mikroeingsätze:                 | 225 µL für Probenfläschchen, G30, CS Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland, 300405 |
| Reaktionsgefäße:                | Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland                    |
| Pipettenaufsätze<br>Multipette: | Combitips plus, 0,5 mL und 50 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland                             |



Bechergläser: 50 mL, Duran Group, Schott

### Arbeitsvorschrift

Es werden zunächst folgende Lösungsmittel hergestellt:

|             |   |        |
|-------------|---|--------|
| PBS (pH 7): | NaCl  | 8,0 g  |
|             | KCl   | 0,2 g  |
|             | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 0,77 g |
|             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0,2 g  |
|             | Reinstwasser  | ad 1 L |

|                    |              |       |
|--------------------|--------------|-------|
| 35 %iges Methanol: | Methanol     | 277 g |
|                    | Reinstwasser | 650 g |

Essigsäures Methanol: Methanol wird mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt

Alle Glasgeräte werden vor der Verwendung nach M4 gereinigt und im Pyrolyseofen ausgeheizt. Die Spitzkolben zum Auffangen der Eluenten werden zusätzlich mit methanolischer EDTA-Lösung gespült.

Die Kartuschen für die Festphasenextraktion werden zunächst mit 5 mL Methanol, 5 mL Reinstwasser und 5 mL PBS konditioniert bzw. equilibriert. 1 mL einer Urinprobe wird mit 25 µL internem Standard versetzt. Anschließend wird die Probe mit 4 mL PBS verdünnt und auf die SPE-Kartuschen aufgegeben. Es folgt ein Waschschrift mit PBS, gefolgt von einem 5-minütigen Trockenschritt. Mit genau 5 mL (Multipette) 35 %igem Methanol wird die Kartusche erneut gewaschen. Anschließend erfolgt die Elution in Spitzkolben mit 5 mL Methanol gefolgt von 5 mL essigsäurem Methanol.

Die aufgefangenen Eluenten werden am Rotationsverdampfer verdampft und die Rückstände in 200 µL Methanol mithilfe von Ultraschall aufgenommen. Um Matrixbestandteile, die noch mit übertragen wurden abzutrennen wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand in ein Vial zur Messung überführt. Die so aufgearbeiteten Proben werden mittels HPLC-MS (M10) analysiert.

## M6 Probenvorbereitung Serum (Festphasenextraktion)

### Arbeitsvorschrift

Die Aufarbeitung erfolgt analog zur Methode, die für die Urinproben verwendet wird (M5), nur dass der pH-Wert des Puffers (PBS) mit Phosphorsäure auf 5 eingestellt wird. Der Trockenschritt erfolgt für 10 min nach dem Waschschrift mit 35 %igem Methanol.

## M7 Herstellung Haar Positivkontrollen

### Geräte

Probenkonzentrator      Dri-Block®, DB-3, Techne®, Staffordshire, UK

### Chemikalien

Methanol                      HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt, 8402

Mischstandardlösung      Vincristin, Vinblastin, Cyclophosphamid,  
Doxorubicin, Melphalan und Chlorambucil  
jeweils 20 µg/mL

Reinstwasser                R > 18 MΩ

Essigsäureethylester      HPLC grade, Aldrich, 27,052-0

### Verbrauchsmaterial

Zentrifugenröhrchen      15 mL, PP, Greiner GmbH, 188271

### Arbeitsvorschrift

Es werden 50 mg Haare in ein verschließbares Kunststoffzentrifugenröhrchen eingewogen. Diese werden mit 2 mL Methanol benetzt und es werden 25 µL der Mischstandardlösung hinzu gegeben. Die Flüssigkeit wird kurz gevortext und anschließend für mindestens 3 Tage verschlossen im Probenkonzentrator bei 40 °C inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Haarproben kurz erneut gevortext und anschließend zentrifugiert (5 min, 3000 g). Die Inkubationslösung wird abgenommen und 2,5 mL Methanol zugegeben, für 1 min gevortext und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird zwei weitere Male wiederholt mit Methanol und Ethylacetat. Alle Überstände bis auf Ethylacetat werden verworfen. Das Ethylacetat wird im, mit methanolischer EDTA-Lösung vorgespülten Spitzkolben, gesammelt, eingedampft und etwaige Rückstände in 200 µL Methanol aufgenommen. Diese werden mittels M10 analysiert. Wenn noch Rückstände detektierbar sind, wird der letzte Waschschrift wiederholt.

## **M8 Probenvorbereitung Haare**

### **Geräte**

Probenkonzentrator Dri-Block®, DB-3, Techne®, Staffordshire, UK

### **Chemikalien**

Proteinase K Sigma, P8044, Proteinase K von Tritirachium album -  
3.0-15.0 unit/mg Feststoff

Pronase E Sigma, P8811, Protease von Streptomyces griseus -  
≥3.5 units/mg Feststoff

TRIS 0,1 M, auf pH 7,2 eingestellt, Roth, 4855.2

### **Verbrauchsmaterial**

Zentrifugenröhrchen 15 mL, PP, Greiner GmbH, 188271

### **Arbeitsvorschrift**

Es wird eine Lösung mit zwei Enzymen vorbereitet:

Enzymgemisch: Proteinase K 4 mg/mL

Pronase E 0,8 mg/mL

in TRIS als eine Lösung angesetzt

Es werden 100 mg Haare in ein Kunststoffzentrifugenröhrchen eingewogen. Vor der Aufarbeitung der Proben werden die Haarproben mit 2 x 2,5 mL Ethylacetat gewaschen, die Überstände gesammelt, eingedampft, etwaige Rückstände in 200 µL Methanol aufgenommen und mittels HPLC-MS auf sich auf der Haaroberfläche befindenden Zytostatika zu untersuchen. Die gewaschenen Haare werden mithilfe des Probenkonzentrators und Stickstoff getrocknet.

Die getrockneten Haarproben werden mit 2,5 mL des Enzymgemischs versetzt und über Nacht im Probenkonzentrator bei ca. 40 °C inkubiert. Die Probe wird zentrifugiert (5 min; 3000 g) der Überstand abgenommen, mit 25 µL internem Standard (vgl. M5) versetzt und mit 3 mL PBS (pH 7) verdünnt. Diese Probelösung wird nach der Methode für Urin (M5) mittels Festphasenextraktion weiter aufgearbeitet. Die Messung erfolgt nach Methode M10.

### **M9 Probenvorbereitung Speichel**

Die Aufarbeitung von Speichel wird analog zur Methode für die Urinproben durchgeführt. Es wird jedoch von einer Probenmenge von 500 mg ausgegangen und die Rückstände anschließend in 100 µL Methanol aufgenommen. Dadurch ergibt sich dieselbe Aufkonzentration von 1:5 wie in den Methoden für Urin und Serumproben. Die Probe wird aufgrund der zähflüssigen Konsistenz eingewogen.

### **M10 Analyse der Zytostatika mittels HPLC-MS**

#### **Geräte**

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>HPLC:</b>         | Thermo Separation Products, San Jose, USA  |
| Autosampler:         | AS3000 mit integriertem Säulenofen 20 µL Probenschleife,<br>250 µL Probenspritze;<br>Temperatur: 10 °C |
| Pumpe:               | P4000  |
| Entgaser:            | Vacuum Membran Degasser,   |
| Diodenarraydetektor: | UV6000LP, Detektrozelle: 50 mm, 10 µL  |
| Controller:          | SN4000   |

---

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>Massenspektrometer:</b> | LCQ Ion Trap Massenspektrometer mit Elektrospray Ionisation-Interface (ESI), Finnigan MAT, Bremen, Deutschland |
| Druckluftkompressor:       | MGK-N421/90, Mahle, Stuttgart, Deutschland   |
| Stickstoff-Generator:      | Ecoinert 2 ESP, DWT-GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland   |
| Auswertung:                | Xcalibur™, Thermo Electron Corporation, Egelsbach, Deutschland   |

### Chemikalien

|                        |  |
|------------------------|--|
| Ameisensäure 98-100 %  | AppliChem, A0748; Riedel-de-Haen 33015 |
| Ammoniumacetat         | zur Analyse, Merck, 1.01116            |
| Methanol               | HPLC Gradient Grade, JT Baker, 8402    |
| Reinstwasser           | R > 18 MΩ                              |
| Helium 5.0             | Linde AG                               |
| Autosampler-Spüllösung | Methanol/10 mM Oxalsäure (90/10; v/v)  |

### Verbrauchsmaterial

Trennsäule: 150 x 4,6 mm, 5 µm Partikel, Hypersil Gold, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

### Arbeitsvorschrift

Für die HPLC werden die Eluenten wie folgt vorbereitet:

|           |  |         |
|-----------|--|---------|
| Eluent A: | Reinstwasser                           | 2.500 g |
|           | Ameisensäure                           | 12,5 mL |
|           | 5 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> | 0,5 mL  |

Eluent B: Methanol

## Geräteeinstellungen (HPLC):

Ofentemperatur: Ofen wird nicht temperiert, Raumkühlung auf 23 °C

Injektion: Push-loop Injektion, 8 µL  
Spülung des Autosamplers mit 3 mL Spüllösung

Fluss: 1 mL/min; Split 1:10 vor Einlass in MS

**Tab. 8-1. HPLC-Gradient – Zytostatika.**

| Zeit<br>min | Methanol<br>% | AS<br>% |
|-------------|---------------|---------|
| 0,0         | 0             | 100     |
| 1,0         | 60            | 40      |
| 10,0        | 90            | 10      |
| 12,0        | 90            | 10      |
| 14,5        | 99            | 1       |
| 18,0        | 99            | 1       |
| 19,0        | 0             | 100     |
| 28,0        | 0             | 100     |

## Geräteeinstellungen (Massenspektrometer):

Ionisierungsquelle ESI im positiven Modus

Temperatur der  
Kapillare 150 °C

Sheathgas (N<sub>2</sub>) 100 Einheiten

Dämpfungsgas: Helium 5.0

Spannung an der  
ESI-Nadel + 5 kV

Die Detektion der Zytostatika erfolgt in zwei HPLC-Läufen (CY1 und CY2) mit dem gleichen Gradienten. Nur die Einteilung der Scan-Segmente wird geändert.

**Tab. 8-2. Parameter Massenspektrometer – Zytostatika.**

| Substanz            | t<br>min | [M+H] <sup>+</sup><br>m/z | IW         | CE<br>%      | Fragmentionen <sup>a)</sup>  |
|---------------------|----------|---------------------------|------------|--------------|--|
| Vincristin          | 10,5     | 413,5 <sup>b)</sup>       | 1,5        | 25,0         | 362,5; 383,4; 392,4  |
| Ifosfamid (IS)      | 10,9     | 261,1                     | 1,0        | 28,0         | 182,1; 200,1; 214,1; 233,0   |
| CY1 Cyclophosphamid | 11,3     | 261,1                     | 1,0        | 28,0         | 106,1; 140,1; 233,0  |
| Melphalan           | 11,9     | 305,1<br>→ 288,1          | 0,8<br>1,0 | 24,0<br>30,0 | 246,1 <sup>c)</sup>  |
| Chlorambucil        | 14,3     | 304,2                     | 1,0        | 31,0         | 224,1; 241,1; 286,1  |
| Vincristin          | 10,5     | 413,5 <sup>b)</sup>       | 1,5        | 25,0         | 362,5; 383,4; 392,4  |
| Vinblastin          | 10,9     | 406,5 <sup>b)</sup>       | 1,5        | 24,0         | 376,4; 397,4   |
| CY2 Doxorubicin     | 12,1     | 543,9                     | 3,0        | 22,0         | 397,1; 414,5   |
| Colchicin (IS)      | 11,6     | 400,2                     | 1,0        | 35,0         | 282,0; 309,0; 310,0; 313,0;<br>326,0; 340,0; 341,0; 358,0;<br>368,0; 382,0 |

<sup>a)</sup> nur Ionen über die Quantifiziert wird; <sup>b)</sup> [M+2H]<sup>2+</sup>, <sup>c)</sup> MS<sup>3</sup>-Fragmention; t = Retentionszeit, IW = Isolierungsweite, CE = Kollisionsenergie

## M11 Erstellung der Standardlösungen

### Chemikalien

Tab. 8-3. Standardsubstanzen.

|             | Substanz              | CAS-<br>Nummer | Hersteller | Bestellnummer |
|-------------|-----------------------|----------------|------------|---------------|
| Zytostatika | Chlorambucil          | 305-03-3       | Fluka      | 23125         |
|             | Colchicin             | 64-86-8        | Sigma      | C9754         |
|             | Cyclophosphamid       | 6055-19-2      | Sigma      | C0768         |
|             | Doxorubicin           | 25316-40-9     | Sigma      | D1515         |
|             | Ifosfamid             | 3778-73-2      | Sigma      | I4909         |
|             | Melphalan             | 148-82-3       | Sigma      | M2011         |
|             | Vinblastin            | 143-67-9       | Sigma      | V1377         |
|             | Vincristin            | 2068-78-2      | Sigma      | V8879         |
| Antibiotika | Sulfadiazin           | 68-35-9        | Sigma      | 35033         |
|             | Sulfadimethoxin       | 122-11-2       | Sigma      | 46794         |
|             | Sulfamerazin          | 127-79-7       | Sigma      | 46826         |
|             | Sulfamethazin         | 57-68-1        | Sigma      | 46802         |
|             | Sulfamethoxazol       | 723-46-6       | Sigma      | 46850         |
|             | Sulfamethoxypyridazin | 80-35-3        | Sigma      | 46858         |
|             | Sulfathiazol          | 72-14-0        | Sigma      | 46902         |
|             | Trimethoprim          | 738-70-5       | Sigma      | 46984         |

### Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße: Safe-Lock Reaktionsgefäße 2 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland



## Arbeitsvorschrift

Für alle Standardsubstanzen werden Stammlösungen mit einer Massenkonzentration von 1 mg Reinsubstanz/mL Methanol angesetzt. Es werden Reinheitsgrad und das Vorliegen von Salzen als Korrekturfaktor eingerechnet. Als Zwischenverdünnung wird aus diesen Lösungen eine Mischstandardlösung mit einer Konzentration von 10 µg/L für jedes Zytostatikum durch eine Verdünnung 1:100 hergestellt. Aus dieser Lösung werden für die Standardlösungen für die massenspektrometrischen Messungen tagesaktuell verdünnt. Alle Lösungen werden bei -20 °C gelagert.

## M12 Auswertung

Die Quantifizierung der Zytostatika in realen Proben erfolgte mittels einer vorher erstellen In-Matrix-Kalibrierung. Dabei wurden Wiederfindungen über einen breiten Konzentrationsbereich ermittelt. Für die Berechnung der Konzentration in realen Proben wird die Peakfläche des Analyten mit der eines frisch hergestellten Referenzstandards (M11) verglichen. Die Konzentration des Referenzstandards wird so gewählt, dass sie nach Möglichkeit im Bereich des Analyten liegt. Sind die gemessenen Signale der Analyten zu hoch, also die Konzentration zu hoch, wird die Probe verdünnt und erneut analysiert. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgt nach der folgenden Gleichung 1. Für die Matrix Haare wird eine Wiederfindung von 100 % angenommen.

$$c_x = \frac{A_x}{A_{Std}} \cdot m_{Std} \cdot \frac{V_{Aufn}}{V_{Inj}} \cdot \frac{100}{WDF} \cdot E \quad [\mu\text{g/L bzw. } \mu\text{g/kg}] \quad (1)$$

- mit:
- $c_x$  - Konzentration des Analyten [ $\mu\text{g/L}$ ]
  - $A_x$  - Peakflächeneinheiten des Analyten
  - $A_{Std}$  - Peakflächeneinheiten des Referenzstandards
  - $m_{Std}$  - Masse des injizierten Standards [ng]
  - $V_{Aufn}$  - Volumen in das die Probe am Ende der Aufarbeitung aufgenommen wird [ $\mu\text{L}$ ]
  - $V_{Inj}$  - injiziertes Volumen der Probelösung [ $\mu\text{L}$ ]
  - $WDF$  - Wiederfindungsrate (Overall Process Efficiency) [%]
  - $E$  - Einwaage [g] oder eingesetztes Probenvolumen [mL]

## 9 Literatur

ABAHUSSAIN E.A., BALL D.E., MATOWE W.C. (2006) Practice and opinion towards disposal of unused medication in Kuwait. *Medical Principles and Practice* 15(5): 352-357.

AHRENS T., WEILAND P. (2007) Biomethane for future mobility. *Landbauforschung Volkenrode* 57(1): 71-79.

AL-AHMAD A., DASCHNER F.D., KÜMMERER K. (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37(2): 158-163.

AL-AHMAD A., KÜMMERER K. (2001) Biodegradation of the antineoplastics vindesine, vincristine, and vinblastine and their toxicity against bacteria in the aquatic environment. *Cancer Detection and Prevention* 25(1): 102-107.

ALEXY R., KÜMPEL T., KÜMMERER K. (2004) Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 57(6): 505-512.

ANDREOZZI R., CAPRIO V., CINIGLIA C., DE CHAMPDORÉ M., LO GIUDICE R., MAROTTA R., ZUCCATO E. (2004) Antibiotics in the environment: Occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science & Technology* 38(24): 6832-6838.

ANDREOZZI R., RAFFAELE M., NICKLAS P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50(10): 1319-1330.

ANTIGNAC J.P., DE WASCH K., MONTEAU F., DE BRABANDER H., ANDRE F., LE BIZEC B. (2005) The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue. *Analytica Chimica Acta* 529(1-2): 129-136.

AOKI T., WADA M. (1951) Functional Activity of the Sweat Glands in the Hairy Skin of the Dog. *Science* 114(2953): 123-124.

ARDREY B. (2003) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.

ARIKAN O.A., SIKORA L.J., MULBRY W., KHAN S.U., RICE C., FOSTER G.D. (2006) The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves. *Process Biochemistry* 41(7): 1637-1643.

BARROSO M., DIAS M., VIEIRA D.N., QUEIROZ J.A., LOPEZ-RIVADULLA M. (2008) Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination

of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(20): 3320-3326.

BERGER K., PERTERSON B., BUENING-PFAUNE H. (1986) Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain. *Arch Lebensmittelsh* 37: 99-102.

BLACKWELL P.A., KAY P., BOXALL A.B.A. (2007) The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere* 67(2): 292-299.

BOREEN A.L., ARNOLD W.A., MCNEILL K. (2003) Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquatic Sciences* 65(4): 320-341.

BOUND J.P., VOULVOULIS N. (2005) Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives* 113(12): 1705-1711.

BOXALL A.B.A., FOGG L.A., KAY P., BLACKWELL P.A., PEMBERTON E.J., CROXFORD A. (2003a) Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicology Letters* 142(3): 207-218.

BOXALL A.B.A., JOHNSON P., SMITH E.J., SINCLAIR C.J., STUTT E., LEVY L.S. (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6): 2288-2297.

BOXALL A.B.A., KOLPIN D.W., HALLING-SØRENSEN B., TOLLS J. (2003b) Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science & Technology* 37(15): 286a-294a.

BUERGE I.J., BUSER H.R., POIGER T., MULLER M.D. (2006) Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology* 40(23): 7242-7250.

BUSER H.R., POIGER T., MULLER M.D. (1998) Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science & Technology* 32(22): 3449-3456.

CAMBRA-LOPEZ M., AARNINK A.J.A., ZHAO Y., CALVET S., TORRES A.G. (2010) Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem. *Environmental Pollution* 158(1): 1-17.

CAVE T.A., NORMAN P., MELLOR D. (2007) Cytotoxic drug use in treatment of dogs and cats with cancer by UK veterinary practices (2003 to 2004). *Journal of Small Animal Practice* 48(7): 371-377.

CHAKRABORTY R., COATES J.D. (2005) Hydroxylation and carboxylation-two crucial steps of anaerobic benzene degradation by Dechloromonas strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5427-5432.

CHRISTIAN T., SCHNEIDER R.J., FARBER H.A., SKUTLAREK D., MEYER M.T., GOLDBACH H.E. (2003) Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 31(1): 36-44.

COMPANYO R., GRANADOS M., GUITERAS J., PRAT M.D. (2009) Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(4): 877-891.

CONNOR T.H. (1999) Permeability of nitrile rubber, latex, polyurethane, and neoprene gloves to 18 antineoplastic drugs. *American Journal of Health-System Pharmacy* 56(23): 2450-2453.

CONNOR T.H. (2006) Hazardous anticancer drugs in health care: Environmental exposure assessment. *Living in a Chemical World: Framing the Future in Light of the Past* 1076: 615-623.

CREASER C.S., STYGALL J.W. (1998) Recent developments in analytical ion trap mass spectrometry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 17(10): 583-593.

DANTAS G., SOMMER M.O.A., OLUWASEGUN R.D., CHURCH G.M. (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 320(5872): 100-103.

DAUGHTON C.G., RUHOY I.S. (2009) Environmental Footprint of Pharmaceuticals: The Significance of Factors Beyond Direct Excretion to Sewers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12): 2495-2521.

DE JONG J., BAST A., VAN DER VIJGH W.J.F. (1993) Analysis of Anthracycline Antitumor Drugs in Tissues and Body-Fluids Using Liquid-Chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 12(10): 422-428.

DI CORCIA A., NAZZARI M. (2002) Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A* 974(1-2): 53-89.

DIAZ-CRUZ M.S., BARCELO D. (2007) Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 26(6): 637-646.

DING C., HE J.Z. (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(3): 925-941.

- DOLLIVER H., KUMAR K., GUPTA S. (2007) Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environmental Quality* 36(4): 1224-1230.
- DRUMMER O.H. (2006) Drug testing in oral fluid. *The Clinical Biochemist Reviews* 27(3): 147-159.
- ECVIMCA (2007) *Preventing occupational and environmental exposure to cytotoxic drugs in veterinary medicine*: Document of the European College of Veterinary Internal Medicine of Companion Animals.
- EITEL A., SCHERRER M., KÜMMERER K. (2000) Handling Cytostatic Drugs.
- ENGELS H. (2004) Verhalten von ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und in Böden [Dr.-Arbeit]. Göttingen, Germany: Georg-August-Universität Göttingen.
- ERJAVEC Z., BEIJNEN J.H., MULDER N.H. (2001) A taste of taxol. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 3: 35-36.
- EUROPÄISCHE KOMMISSION (2002) 2002/657/EG: Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. In: Off J Eur Commun.
- FALCK K., GROHN P., SORSA M., VAINIO H., HEINONEN E., HOLSTI L.R. (1979) Mutagenicity in Urine of Nurses Handling Cytostatic Drugs. *Lancet* 1(8128): 1250-1251.
- FÄRBER H. (2002) Antibiotika im Krankenhausabwasser. *Hygiene und Medizin* 27 (Suppl.1): 35.
- FEDESA (1998) Survey of antimicrobial usage in animal health in the European Union. *Deutsches Tierärzteblatt* 46(11): 1093.
- FLANAGAN R.J., TAYLOR A., WATSON I.D., WHELPTON R. (2007) *Fundamentals of Analytical Toxicology*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- FORSTER M., LAABS V., LAMSHOFT M., PUTZ T., AMELUNG W. (2008) Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(3): 1029-1038.
- FRANSMAN W., VERMEULEN R., KROMHOUT H. (2005) Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 78(5): 403-412.

GAILLARD Y., PEPIN G. (1999) Testing hair for pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B* 733(1-2): 231-246.

GARCIA-GALAN M.J., DIAZ-CRUZ M.S., BARCELO D. (2010) Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* 81(1-2): 355-366.

GRATACOS-CUBARSI M., CASTELLARI M., VALERO A., GARCIA-REGUEIRO J.A. (2006) Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 834(1-2): 14-25.

GRATACOS-CUBARSI M., GARCIA-REGUEIRO J.A., CASTELLARI M. 2007. Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. Springer Heidelberg, 1991-1998.

GROSCHL M. (2008) Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clinical Chemistry* 54(11): 1759-1769.

GROTE M., MERIC D.H., LANGENKAMPER G., HAYEN H., BETSCHE T., FREITAG M. (2009) Investigations for the transfer of pharmacological efficient substances from keeping of farm animals in leek and white cabbage. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety* 4(3-4): 287-304.

GUNARATNAM P., WILKINSON G.T. (1983) A Study of Normal Hair-growth in The Dog. *Journal of Small Animal Practice* 24(7): 445-453.

HALLER M.Y., MULLER S.R., MCARDELL C.S., ALDER A.C., SUTER M.J.F. (2002) Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952(1-2): 111-120.

HALLING-SØRENSEN B., LUTZHOFT H.C.H., ANDERSEN H.R., INGERSLEV F. (2000) Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 53-58.

HALLING-SØRENSEN B., SENDELØV G., TJØRNELUND J. (2002) Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42(3): 263-271.

HAMSCHE G. (2008) Review: Animal drugs in the environment under special consideration of stable dust. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety* 3(2): 165-173.

- HAMSCHER G., PAWELZICK H.T., HÖPER H., NAU H. (2003a) Tierarzneimittelrückstände in Wirtschaftsdüngern, Boden, Sicker- und Grundwasser. In: *Spurenstoffe in Gewässern: Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen* (Track T., Kreysa G., Hrsg.). Weinheim: Wiley-VCH, 107-122.
- HAMSCHER G., PAWELZICK H.T., HÖPER H., NAU H. (2005) Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 861-868.
- HAMSCHER G., PAWELZICK H.T., SCZESNY S., NAU H., HARTUNG J. (2003b) Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: A new source of health hazard for farmers? *Environmental Health Perspectives* 111(13): 1590-1594.
- HAMSCHER G., SCZESNY S., ABU-QARE A., HÖPER H., NAU H. (2000) Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in gülleedüngten Böden. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 107(8): 332-334.
- HAMSCHER G., SCZESNY S., HOPER H., NAU H. (2002) Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74(7): 1509-1518.
- HEBERER T., TERNES T. (2006) Residues of Pharmaceuticals from Human Use. In: *Organic Pollutants in the Water Cycle - Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds* (Reemtsma T., Jekel M., Hrsg.). Weinheim: Wiley-VCH.
- HEDMER M., TINNERBERG H., AXMON A., JONSSON B.A.G. (2008) Environmental and biological monitoring of antineoplastic drugs in four workplaces in a Swedish hospital. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 81(7): 899-911.
- HENDERSON G.L. (1993) Mechanisms of Drug Incorporation into Hair. *Forensic Science International* 63(1-3): 19-29.
- HIRSCH R., TERNES T., HABERER K., KRATZ K.L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 225(1-2): 109-118.
- HÖPER H., KUES J., NAU H., HAMSCHER G. (2002) Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden. *Bodenschutz* 4(2): 141-148.
- IARC (1975) Some aziridines, N-, S- & O-mustards and selenium. In: IARC Monog Eval Carc (International Agency for Research on Cancer, Hrsg.).
- IARC (1976) Some naturally occurring substances. In: IARC Monog Eval Carc (International Agency for Research on Cancer, Hrsg.).

IARC (1981) Some antineoplastic and immunosuppressive agents summary of data reported and evaluation. In: IARC Monog Eval Carc (International Agency for Research on Cancer, Hrsg.). Lyon (France): World Health Organisation.

IARC (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. In: IARC Monog Eval Carc (International Agency for Research on Cancer, Hrsg.). Lyon (France).

INGERSLEV F., HALLING-SØRENSEN B. (2000) Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(10): 2467-2473.

INGERSLEV F., HALLING-SØRENSEN B. (2001) Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48(3): 311-320.

JACOBSEN A.M., HALLING-SØRENSEN B. (2006) Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384(5): 1164-1174.

JESSEN C. (2000) Wärmebilanz und Temperaturregulation. In: *Physiologie der Haustiere* (Engelhardt W.v., Breves G., Hrsg.). Stuttgart: Enke.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (1995) Evaluation of certain Veterinary Drug Residues in Food.

KALHORN T.F., REN S., HOWALD W.N., LAWRENCE R.F., SLATTERY J.T. (1999) Analysis of cyclophosphamide and five metabolites from human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography B* 732(2): 287-298.

KEMPER N. (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8(1): 1-13.

KLÄRSCHLAMMVERORDNUNG (ABFKLÄRV) - ZWEITER ARBEITSENTWURF FÜR EINE NOVELLE DER KLÄRSCHLAMMVERORDNUNG VORGELEGT (2010) Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Available: <http://www.bmu.de/abfallwirtschaft/downloads/doc/46373.php> [accessed 2.9. 2010].

KLÄRSCHLAMMVERORDNUNG (ABFKLÄRV) VOM 15. APRIL 1992 (BGBl. I S. 912) ZULETZT GEÄNDERT DURCH ART. 19 GESETZ VOM 29. JULI 2009 (BGBl. I S. 2542)

KOLPIN D.W., FURLONG E.T., MEYER M.T., THURMAN E.M., ZAUGG S.D., BARBER L.B., BUXTON H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36(6): 1202-1211.



KOOLS S.A.E., MOLTMANN J.F., KNACKER T. (2008) Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50(1): 59-65.

KREUZIG R., HÖLTGE S. (2005) Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: Laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 771-776.

KROKER R., SCHERKL R., UNGEMACH F.R. (2002) Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* (Frey H.-H., Löscher W., Hrsg.). Stuttgart: Enke Verlag.

KUMAR K., GUPTA S.C., BAIDOO S.K., CHANDER Y., ROSEN C.J. (2005) Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality* 34(6): 2082-2085.

KÜMMERER K. (2004a) *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects, and risks*. 2nd Hrsg. Berlin, Heidelberg (Germany).

KÜMMERER K. (2004b) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(2): 311-320.

KÜMMERER K. (2008) Antibiotics in the Environment. In: *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects, and risks* (Kümmerer K., Hrsg.). Berlin, Heidelberg (Germany).

KÜMMERER K. (2009a) Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75(4): 417-434.

KÜMMERER K. (2009b) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90(8): 2354-2366.

KÜMMERER K., AL-AHMAD A., MERSCH-SUNDERMANN V. (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40(7): 701-710.

KÜMMERER K., AL-AHMAD A., STEGER-HARTMANN T. (1996) Epirubicin Hydrochloride in the Aquatic Environment - Biodegradation and Bacterial Toxicity. *Umweltmed Forsch Prax* 1(3): 133-137.

KÜMMERER K., HENNINGER A. (2003) Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection* 9(12): 1203-1214.

- KÜMMERER K., SCHUSTER A. (2008) Substance Flows Associated with Medical Care. In: *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects, and risks* (Kümmerer K., Hrsg.). Berlin, Heidelberg (Germany).
- KÜMMERER K., SCHUSTER A., HAISS A., GÜNTHER A., JACOBS J., MOHRING S., HAMSCHER G., SIMON D. (2008) Umweltrisikobewertung von Zytostatika. (Umweltbundesamt, Hrsg.): Umweltbundesamt, <http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-medien/dateien/3744.htm>.
- KÜMMERER K., STEGER-HARTMANN T., MEYER M. (1997) Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research* 31(11): 2705-2710.
- LALLAI A., MURA G., ONNIS N. (2002) The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresource Technology* 82(2): 205-208.
- LAM M.W., YOUNG C.J., BRAIN R.A., JOHNSON D.J., HANSON M.A., WILSON C.J., RICHARDS S.M., SOLOMON K.R., MABURY S.A. (2004) Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(6): 1431-1440.
- LANGHAMMER J.-P. (1989) Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im Landwirtschaftlichen Umfeld [PhD-Thesis]. Bonn, Germany: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
- LÄNGIN A., SCHUSTER A., KUMMERER K. (2008) Chemicals in the environment - the need for a clear nomenclature: Parent compounds, metabolites, transformation products and their elimination. *Clean-Soil Air Water* 36(4): 349-350.
- LANGMAN L.J. (2007) The use of oral fluid for therapeutic drug management: clinical and forensic toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1098: 145-166.
- LIANG H.R., FOLTZ R.L., MENG M., BENNETT P. (2003) Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17(24): 2815-2821.
- LOFTIN K.A., HENNY C., ADAMS C.D., SURAMPALI R., MORMILE M.R. (2005) Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 782-788.

- MASON H.J., BLAIR S., SAMS C., JONES K., GARFITT S.J., CUSCHIERI M.J., BAXTER P.J. (2005) Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. *Annals of Occupational Hygiene* 49(7): 603-610.
- MASSÉ D.I., LU D., MASSE L., DROSTE R.L. (2000) Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 75(3): 205-211.
- MAUDENS K.E., STOVE C.P., COCQUYT V.F.J., DENYS H., LAMBERT W.E. (2009) Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877(30): 3907-3915.
- MAZUEL C., GROVE J., GERIN G., KEENAN K.P. (2003) HPLC-MS/MS determination of a peptide conjugate prodrug of doxorubicin, and its active metabolites, leucine-doxorubicin and doxorubicin, in dog and rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33(5): 1093-1102.
- MC LUCKEY S.A., VANBERKEL G.J., GOERINGER D.E., GLISH G.L. (1994) Ion-Trap Mass-Spectrometry - Using High-Pressure Ionization. *Analytical Chemistry* 66(14): A737-A743.
- MEIJSTER T., FRANSMAN W., VELDHOF R., KROMHOUT H. (2006) Exposure to antineoplastic drugs outside the hospital environment. *Annals of Occupational Hygiene* 50(7): 657-664.
- MIRKOU A., VIGNAL B., COHEN S., GUILLAUMONT M., GLEHEN O., GUITTON J. (2009) Assays for the quantification of melphalan and its hydrolysis products in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877(27): 3089-3096.
- MONTEIRO S.C., BOXALL A.B.A. (2010) Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 202*. New York: Springer, 53-154.
- MOSTELLER R.D. (1987) Simplified Calculation of Body-Surface Area. *New England Journal of Medicine* 317(17): 1098-1098.
- MULLANGI R., AGRAWAL S., SRINIVAS N.R. (2009) Measurement of xenobiotics in saliva: is saliva an attractive alternative matrix? Case studies and analytical perspectives. *Biomedical Chromatography* 23(1): 3-25.
- MUSSHOFF F., MADEA B. (2007) Analytical pitfalls in hair testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388(7): 1475-1494.

MUTSCHLER E., GEISSLINGER G., KROEMER H.K., SCHÄFER-KORTING M. (2001) *Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 7 Hrsg. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

NAKAHARA Y. (1999) Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 733(1-2): 161-180.

NASH J.P., KIME D.E., VAN DER VEN L.T.M., WESTER P.W., BRION F., MAACK G., STAHLSCHEMIDT-ALLNER P., TYLER C.R. (2004) Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112(17): 1725-1733.

NIESSEN W.M.A., MANINI P., ANDREOLI R. (2006) Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25(6): 881-899.

NOHL H. (2002) Antineoplastica (Cytostatica). In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* (Frey H.-H., Löscher W., Hrsg.). Stuttgart: Enke Verlag.

NOLTE M., NOLTE I. (2000) Medikamentöse Therapie. In: *Praxis der Onkologie bei Hund und Katze* (Nolte I., Nolte M., Hrsg.). Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH.

NOVAKOVA L., VLCKOVA H. (2009) A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 656(1-2): 8-35.

PETHRAN A., SCHIERL R., HAUFF K., GRIMM C.H., BOOS K.S., NOWAK D. (2003) Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 76(1): 5-10.

PETROVIC M., HERNANDO M.D., DIAZ-CRUZ M.S., BARCELO D. (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A* 1067(1-2): 1-14.

POELS J., VANASSCHE P., VERSTRAETE W. (1984) Effects of Disinfectants and Antibiotics on the Anaerobic-Digestion of Piggery Waste. *Agricultural Wastes* 9(4): 239-247.

PRAGST F., BALIKOVA M.A. (2006) State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* 370(1-2): 17-49.

RADKA A., KÜMMERER K. (2006) Antibiotics for Human Use. In: *Organic Pollutants in the Water Cycle - Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds* (Reemtsma T., Jekel M., Hrsg.). Weinheim.

RÖMPP (2010) Vinblastin. In: Thieme Römpf online. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

RUBIO S., PEREZ-BENDITO D. (2009) Recent Advances in Environmental Analysis. *Analytical Chemistry* 81(12): 4601-4622.

SACHER F., LANG F.T., BRAUCH H.J., BLANKENHORN I. (2001) Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A* 938(1-2): 199-210.

SANNOLO N., MIRAGLIA N., BIGLIETTO M., ACAMPORA A., MALORNI A. (1999) Determination of cyclophosphamide and ifosfamide in urine at trace levels by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34(8): 845-849.

SANZ J.L., RODRIGUEZ N., AMILS R. (1996) The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46(5-6): 587-592.

SARMAH A.K., MEYER M.T., BOXALL A.B.A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65(5): 725-759.

SCHMEROLD I., UNGEMACH F.R. (2007) Antibiotika. In: *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie - Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene; Band 3* (Dunkelberg H., Gebel T., Hartwig A., Hrsg.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

SCHWEDT G. (2008) *Analytische Chemie, Grundlagen, Methoden und Praxis*. 2te Auflage Hrsg. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

SCHWEDT G., VOGT C. (2010) *Analytische Trennmethode*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

SESSINK P.J.M., DEROOS J.H.C., PIERIK F.H., ANZION R.B.M., BOS R.P. (1993a) Occupational Exposure of Animal Caretakers to Cyclophosphamide. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 35(1): 47-52.

SESSINK P.J.M., SCHOLTES M.M., ANZION R.B.M., BOS R.P. (1993b) Determination of Cyclophosphamide in Urine by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 616(2): 333-337.

SIMON D. (2000) Übersicht über die in der Kleintiermedizin verwendeten Chemotherapeutika sowie deren Dosis und Applikationsart, Einsatzgebiete und wichtigsten Toxizitätserscheinungen. In: *Praxis der Onkologie bei Hund und Katze* (Nolte I., Nolte M., Hrsg.). Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH.

- SLEVIN M.L., ANG L.M., JOHNSTON A., TURNER P. (1984) The Efficiency of Protective Gloves Used in the Handling of Cyto-Toxic Drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 12(3): 151-153.
- SORSA M., HAMEILA M., JÄRVILUOMA E. (2006) Handling anticancer drugs: From hazard identification to risk management? *Living in a Chemical World: Framing the Future in Light of the Past* 1076: 628-634.
- SOTTANI C., RINALDI P., LEONI E., POGGI G., TERAGNI C., DELMONTE A., MINOIA C. (2008) Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(17): 2645-2659.
- STEGE-HARTMANN T., KÜMMERER K., HARTMANN A. (1997) Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36(2): 174-179.
- STEGE-HARTMANN T., KÜMMERER K., SCHECKER J. (1996) Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 726(1-2): 179-184.
- STONE J.J., CLAY S.A., ZHU Z.W., WONG K.L., PORATH L.R., SPELLMAN G.M. (2009) Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion. *Water Research* 43(18): 4740-4750.
- STOEB K., SINGER H.P., STETTLER S., HARTMANN N., MUELLER S.R., STAMM C.H. (2006) Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1128(1-2): 1-9.
- STÜBER M., REEMTSMA T. (2004) Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4): 910-916.
- SUMPTER J.P. (2007) Environmental effects of human pharmaceuticals. *Drug Information Journal* 41(2): 143-147.
- SWAN G.E., CUTHBERT R., QUEVED M., GREEN R.E., PAIN D.J., BARTELS P., CUNNINGHAM A.A., DUNCAN N., MEHARG A.A., OAKS J.L., PARRY-JONES J., SHULTZ S., TAGGART M.A., VERDOORN G., WOLTER K. (2006) Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biology Letters* 2(2): 279-282.
- THERMOQUEST (2000) Triple quads or ion traps: which is best for your application? *Analytical News*: 7-9.

THIELE-BRUHN S. (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 166(2): 145-167.

THIEME D., GROSSE J., SACHS H., MUELLER R.K. (2000) Analytical strategy for detecting doping agents in hair. *Forensic Science International* 107(1-3): 335-345.

TOLLS J. (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science & Technology* 35(17): 3397-3406.

TUERK J., REINDERS M., DREYER D., KIFFMEYER T.K., SCHMIDT K.G., KUSS H.M. (2006) Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring - Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 831(1-2): 72-80.

TURCI R., SOTTANI C., SPAGNOLI G., MINOIA C. (2003) Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 789(2): 169-209.

UNGEMACH F.R. 2002. Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang. In: Antibiotika & Resistenzen, Symposium. Graz.

VEREBEY K., GOLD M.S. (1988) From Coca Leaves to Crack: The Effects of Dose and Routes of Administration in Abuse Liability. *Psychiatric Annals* 18(9): 513-520.

WENGER-RIGGENBACH B., BORETTI F.S., QUANTE S., SCHELLENBERG S., REUSCH C.E., SIEBER-RUCKSTUHL N.S. (2010) Salivary Cortisol Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24(3): 551-556.

WHO (2003) Gems/Food Regional Diets - Regional per Capita Consumption of Raw and Semi-processed Agricultural Commodities: Food Safety Department World Health Organization.

WINCKLER C., GRAFE A. (2001) Use of Veterinary Drugs in Intensive Animal Production. *JSS - J Soils & Sediments* 1(2): 66-70.

YE Z.Q., WEINBERG H.S., MEYER M.T. (2007) Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79(3): 1135-1144.

YOSHIDA J., KOSAKA H., TOMIOKA K., KUMAGAI S. (2006) Genotoxic risks to nurses from contamination of the work environment with antineoplastic drugs in Japan. *Journal of Occupational Health* 48(6): 517-522.

## 10 Publikationsliste

### Publikationen

**Mohring SAI, Strzysch I, Fernandes M, Kiffmeyer T, Tuerk J, Hamscher G**  
Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: A promising step on the way to sustainable pharmacy?  
Environmental Science and Technology (2009) 43, 2569–2574.

**Hamscher G, Mohring SAI, Knobloch A, Eberle N, Nau H, Nolte I, Simon D.**  
Determination of Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anti-Cancer Chemotherapy by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Is There An Environmental or Occupational Risk?  
Journal of Analytical Toxicology (2010) 34 (3), 142-148.

**Knobloch A, Mohring SAI, Eberle N, Nolte I, Hamscher G, Simon D**  
Drug Residues in Serum of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy.  
Journal of Veterinary Internal Medicine (2010) 24 (2), 379-383.

**Knobloch A, Mohring SAI, Eberle N, Nolte I, Hamscher G, Simon D**  
Cytotoxic Drug Residues in Urine of Dogs Receiving Anticancer Chemotherapy.  
Journal of Veterinary Internal Medicine (2010) 24 (2), 384-390.

### Monographien und Publikationen in Büchern

**Kümmerer K, Schuster A, Haiss A, Günther A, Jacobs J, Mohring S, Hamscher G, Simon D**  
Umweltrisikobewertung von Zytostatika.  
Herausgeber: Umweltbundesamt, UBA-Texte Nr. 06/2009, UBA-FBNr: 001256,  
Förderkennzeichen: 360 14 004, (2009) ISSN 1862-4804, 1–261.

**Augustin F, Groneberg M, Hülsmann P, Jäger R, König T, Meichsner S, Mohring S, Schneebauer C, Spengel M, Thomas J**  
Promovieren mit Fachhochschul-, Bachelor- bzw. Berufsakademie-Abschluss.  
Herausgeber: Stock S, Schneider P, Peper E, Molitor E: Erfolgreich promovieren; Ein Ratgeber von Promovierten für Promovierende; 2. Auflage, Berlin: Springer, 2008, ISBN 978-3-540-88766-9, 212-218.

**Horstkotte M, Lang K, Mohring S, Schneebauer C, Stock S**  
Datensicherung  
Herausgeber: Stock S, Schneider P, Peper E, Molitor E: Erfolg bei Studienarbeiten, Referaten und Prüfungen: alles, was Studierende wissen sollten; Berlin: Springer, 2009 ISBN 978-3-540-88815-4, 130-133.

**Burgard M, Mohring S**  
Layout und Seitengestaltung  
Herausgeber: Stock S, Schneider P, Peper E, Molitor E: Erfolg bei Studienarbeiten, Referaten und Prüfungen: alles, was Studierende wissen sollten; Berlin: Springer, 2009, ISBN 978-3-540-88815-4, 128-129.



**Burgard M, Erbe J, Kohlhase C, Küllertz D, Lang K, Mengel R, Mohring S, Neumann S, Schneebauer C, Wesener S**

Literaturverwaltung

Herausgeber: Stock S, Schneider P, Peper E, Molitor E: Erfolg bei Studienarbeiten, Referaten und Prüfungen: alles, was Studierende wissen sollten; Berlin: Springer, 2009 ISBN 978-3-540-88815-4, 111-119.

**Mohring S**

Erfahrungsberichte aus den Disziplinen – Chemie,

Herausgeber: Stock S, Schneider P, Peper E, Molitor E: Erfolgreich studieren: vom Beginn bis zum Abschluss des Studiums; Berlin: Springer, 2009, ISBN 978-3-540-88824-6, 194-195.

### **Tagungsbeiträge**

**Mohring S, Eberle N, Nau H, Nolte I, Hamscher G, Simon D**

Eine neue LC-MS-MS-Methode zum selektiven und sensitiven Nachweis verschiedener Cytostatika in Serum und Urin von kaninen Chemotherapiepatienten.

16. Symposium deutschsprachiger Veterinärpharmakologen und -toxikologen, 28.09.–29.09.2006, Hannover, Programm- und Abstracts-Band.

**Mohring S, Strzysch I, Türk J, Becker B, Merrettig-Bruns U, Hamscher G**

Untersuchungen zum Abbauverhalten ausgewählter Sulfonamide während der Biogasproduktion mittels LC-MS-MS.

17. Symposium deutschsprachiger Veterinärpharmakologen und -toxikologen, 27.09.–28.09.2007, Berlin, Programm- und Abstracts-Band. 10.

**Mohring SAI, Tuerk J, Hamscher G**

Fate of sulfonamides during anaerobic digestion of manure.

11th EAVPT International Congress, 12.07.–16.07.2009, Leipzig. In: Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics. 32 (Suppl. 1), 89.

**Mohring SAI, Hamscher G, Knobloch A, Nolte I, Simon D**

Cytostatic drugs in canine urine: comparison of two sample preparation methods. 11th EAVPT International Congress, 12.07.–16.07.2009, Leipzig. In: J Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics. 32 (Suppl. 1), 89–90.

**Mohring S, Simon D, Knobloch A, Nolte I, Hamscher G**

Bestimmung von Zytostatika in Hunde-Haaren und -Speichel.

20. Symposium deutschsprachiger Veterinärpharmakologen und -toxikologen, 9.9.–10.09.2010, Bern, Schweiz, Programm- und Abstracts-Band.

**Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher für die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung während meiner Doktorandenzeit. Vielen Dank für Dein Vertrauen, Deine immerwährende Bereitschaft für Diskussionen und den konstruktiven Austausch bei allen Fragen.

Frau Prof. Dr. Carla Vogt (Leibniz Universität Hannover) danke ich rechtherzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Auch allen Mitgliedern des AK Analytik vielen Dank für die herzliche Aufnahme und Integration in die Gruppe.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger (Leibniz Universität Hannover) danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei der mündlichen Doktorprüfung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau und Prof. Dr. Pablo Steinberg dafür, dass ich die Doktorarbeit an ihrem Institut durchführen konnte. Herrn Prof. Dr. Steinberg möchte ich zusätzlich für die konstruktiven Anregungen bei Fragen in den letzten zwei Jahren danken.

Frau Marion Schröder danke ich ganz herzlich für die Unterstützung im Labor bei der Aufarbeitung zahlreicher Proben. Frau Beate Prieß gilt ebenfalls mein Dank für die Einarbeitung in die wichtigsten Laborarbeiten und die Unterstützung im Laboralltag.

Den Kooperationspartnern des „Biogasprojektes“, hier besonders Dr. Jochen Türk (IUTA, Duisburg) und Bettina Sayder (Fraunhofer UMSICHT, Oberhausen), danke ich für die Durchführung der Gärtests und Bereitstellung der Proben.

Des Weiteren danke ich den Projektpartnern des „Zytostatika-Projektes“ Frau PD Dr. Daniela Simon, Frau Dr. Anna Knobloch und Alexa Jötze aus der Kleintierklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Bereitstellung der Hunde-Urin, -Serum, -Speichel und Haarproben.

Karolin Zoll, Kirsten Dautel und Joana Diekmann danke ich für die Korrektur des Manuskripts.

Allen Kollegen und ehemaligen Kollegen der LMTOX ein herzliches Dankeschön für Hilfestellungen und das gute Arbeitsklima während meiner Zeit am Institut. Karo, Wiebke, Einav, Annette, Nicole, Micha, Marcos, Stefan, Javier: Ich danke Euch für die tolle Zeit, die wir zusammen hatten.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder und allen Menschen, die mir nahe stehen, möchte ich mich sehr für die Unterstützung während der Zeit der Anfertigung der Dissertation bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinem Bruder Ingmar für die schnelle Hilfe bei allen computertechnischen Problemen.

**Lebenslauf**

SIEGRUN MOHRING

geb. am 14. Dezember 1977 in Münster/Westfalen

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Hochschulbildung</b>       |   |
| 02/2011                       | <b>Promotion zum Dr. rer. nat. an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover</b>  |
| 09/2005 – 09/2010             | <b>Promotionsstudium</b><br>Doktorandin am Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerd Hamscher) |
| 03/2003 – 02/2005             | <b>Studium Master of Science - Angewandte Chemie</b><br>Fachhochschule Münster<br>Thema der Masterarbeit: Bestimmung von polyzyklischen Schwefelverbindungen in Mitteldestillat (GC/MS)       |
| 10/1997 – 03/2003             | <b>Studium Chemieingenieurwesen</b><br>Fachhochschule Münster<br>Thema der Diplomarbeit: Gaschromatographische Bestimmung von Fuselalkoholen in Bier  |
| 10/1999 – 03/2000             | <b>Praxissemester: Politechnika Krakowska, Krakau, Polen</b><br>Thema: Hochtemperatur Korrosion von Eisen<br>(Stipendium Carl Duisberg Gesellschaft)  |
| <b>Berufliche Tätigkeiten</b> |   |
| 09/2005 – 02/2011             | Wissenschaftliche Angestellte<br>Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerd Hamscher)           |
| 03/2005 – 08/2005             | Wissenschaftliche Hilfskraft<br>Labor für Instrumentelle Analytik der Fachhochschule Münster  |
| 04/2005 – 06/2005             | Vorlesungsbegleitende Tutorentätigkeit in „Englisch für Ingenieure“   |
| 05/2002 – 02/2005             | Studentische Hilfskraft<br>Labor für Instrumentelle Analytik der Fachhochschule Münster   |
| 07/1998 – 12/2003             | Werksstudentin<br>Labor, Luhns GmbH   |
| 06/1997 – 09/1997             | Industriepraktikum: Firma Luhns GmbH  |
| <b>Schulbildung</b>           |   |
| 08/1988 – 06/1997             | Gymnasium Augustinianum, Greven<br>Abschluss: Abitur  |
| Schuljahr 1994/1995           | Fort Madison Highschool, USA, Abschluss: Highschool-Diplom  |