

**Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue
Umweltkontaminanten – Untersuchungen zu Eintrag und Verhalten
verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-
Tandemmassenspektrometrie**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin

Heike Pawelzick

geboren am 23.03.1976 in Würzburg

2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2001 bis Januar 2005 am *Institut für Lebensmitteltoxikologie* (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Heinz Nau) der *Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover* unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Gerd Hamscher angefertigt.

Referent: Prof. Dr. R. G. Berger
Universität Hannover
Lebensmittelchemisches Institut
Wunstorfer Str. 14
30453 Hannover

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Gerd Hamscher
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Zentrum für Lebensmittelwissenschaften
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
- Lebensmitteltoxikologie -
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tag der Promotion: 01. März 2005

Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten – Untersuchungen zu Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Heike Pawelzick

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zu Vorkommen, Verhalten und möglichen Effekten von Human- und Veterinärpharmaka in der Umwelt durchgeführt. Der Einsatz beträchtlicher Mengen an Tierarzneimitteln führte hauptsächlich zum Eintrag von Tetracyclin- und Sulfonamidantibiotika in Gülle, in Boden und Sedimente, in Oberflächengewässer und im Falle der Sulfonamide vereinzelt auch in das Grundwasser. Dabei nahmen die Umweltkonzentrationen mit zunehmender Entfernung von der Eintragsquelle ab. Die höchsten Konzentrationen wurden in Gülle gefunden (mg/kg-Bereich), gefolgt von denen in Sedimenten (μg –mg/kg-Bereich) und Böden (μg /kg-Bereich), bis hin zu Spurenkonzentrationen in Oberflächen- und Grundwässern (μg /L-Bereich). Unter anderem auch aufgrund eines Mangels an verlässlichen und sensitiven Analysenverfahren war über das Verhalten der Tetracycline und Sulfonamide, insbesondere unter Feldbedingungen, wenig bekannt. Durch Anwendung sensitiver und selektiver HPLC-MS/MS-Technik konnten im Rahmen dieser Arbeit Felduntersuchungen zum Vorkommen und Verhalten verschiedener Antibiotika im erweiterten landwirtschaftlichen Umfeld realisiert werden.

Bereits etablierte analytische Methoden zur Bestimmung verschiedener Tetracycline in unterschiedlichen Umweltmatrices wurden erfolgreich auf die Substanzgruppe der Sulfonamide übertragen. Sulfonamide wurden, wie für die Tetracycline beschrieben, aus Gülle und Boden mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion und aus matrixreichem Grundwasser mittels Festphasen-Extraktion extrahiert. HPLC-ESI-MS/MS wurde angewandt, um die Sulfonamide selektiv und sensitiv zu detektieren. Die Bestimmungsgrenzen waren 0,02–0,05 mg/kg für Gülle, 2–5 μg /kg für Sandboden und 0,05–0,1 μg /L für matrixreiches Grundwasser. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 72 % und 108 % in Gülle bei einer Präzision kleiner 10 %, bei maximal 53 % in Sandboden bei einer Präzision von 12–18 % und zwischen 54 % und 93 % in matrixreichem Grundwasser bei einer Präzision von 11–21 %.

Für beide Substanzklassen wurde die enorme Methodenrobustheit für die komplexe Matrix Boden an zehn weiteren Bodentypen, die sich in wichtigen Bodencharakteristika wie pH-Wert, Korngrößenverteilung und organischem Kohlenstoffgehalt unterschieden, demonstriert. Die Robustheit und breite Anwendbarkeit prädestinierte diese Methode gerade für die Routineanalytik.

Kürzlich wurde Tetracyclin bei einer landwirtschaftlichen Nutzfläche (Sandboden) in Konzentrationen von mehreren Hundert $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen. Seinerzeit wurde gezeigt, dass Tetracyclin im Oberboden persistiert und möglicherweise dort durch wiederholte Gülleausbringung akkumuliert. Eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten oder oberflächennahes Grundwasser wurde damals nicht beobachtet. Die Fortführung dieser Feldstudien in den Jahren 2001 bis 2004 ergab nun ein konstantes durchschnittliches Rückstandsniveau von $152 \pm 52 \mu\text{g}/\text{kg}$ Tetracyclin im Oberboden, aber keine weitere Anreicherung. Eine Verlagerung dieser Verbindungen in das Grundwasser ($0,05\text{--}0,13 \mu\text{g}/\text{L}$) wurde trotz einer sehr starken Sorption im Oberboden nach vierjähriger Studiendauer erstmals Ende 2003 beobachtet. Untersuchungen der ausgetragenen Gülle ergaben, dass der Ackerboden darüber hinaus auch mit signifikanten Mengen an Sulfadiazin und Sulfamethazin beaufschlagt wurde. Dennoch wurde im Oberboden lediglich Sulfamethazin in Konzentrationen von nur wenigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ detektiert. Trotz der geringen Beständigkeit in Gülle und Boden konnte Sulfamethazin wiederholt in Grundwasserproben, die mit Saugkerzen in 1,40 m-Bodentiefe gewonnen wurden, in Konzentrationen bis zu $0,24 \mu\text{g}/\text{L}$ nachgewiesen werden.

Ein für Nordwestdeutschland repräsentatives Monitoring verschiedener Ackerflächen ergab zudem, dass potenziell jede Dritte mit Tetracyclinrückständen von mehr als $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ kontaminiert sein kann. Sulfonamide waren auch hier nur in Konzentrationen von wenigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ Boden vorhanden.

Diese Studien zeigen zum ersten Mal den Eintrag von Tetracyclin vom Boden in das Grundwasser sowie darüber hinaus die kontinuierliche Verlagerung von Sulfamethazin in dieses Umweltkompartiment. Akute toxische Effekte z. B. auf Wassermikroorganismen sind durch die gemessenen Konzentrationen nicht zu erwarten. Ob die Antibiotikaeinträge in das Grundwasser im subtherapeutischen Konzentrationsniveau allerdings zu einer Resistenzbildung bei aquatischen Bakterien beitragen, kann zurzeit nicht abschließend beurteilt werden.

Ergänzend zu den Feldstudien des Eintragspfades Gülle – Boden – (oberflächennahes) Grundwasser wurde eine Pilotstudie bei Aquakulturbetrieben in Niedersachsen durchgeführt. Dieses Screening zeigte, dass der Eintragspfad Aquakultur – Sediment – Oberflächenwasser hierzulande noch von untergeordneter Bedeutung ist.

Ein bislang unbekannter Eintragsweg von Antibiotika in die Umwelt mit einem möglicherweise größeren Risiko für den Menschen wurde für Stäube aus der Intensivtierhaltung entdeckt. Die Belastung von Stäuben, die in einem Schweinestall in den Jahren 1981–2000 gesammelt wurden, mit bis zu fünf verschiedenen Substanzen, konnte ebenfalls mittels HPLC-ESI-MS/MS-Analytik gezeigt werden. In 80 % der Proben konnte Tylosin und in 65 % der Proben Sulfamethazin nachgewiesen werden. Beide Verbindungen sind als Allergene bekannt und könnten somit zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung des Landwirtes durch die Inhalation dieses Staubes beitragen. Auch die zeitweilige Exposition gegenüber Chloramphenicol, dessen Einsatz insbesondere wegen seines genotoxischen Potenzials seit 1994 EU-weit in der Tierhaltung verboten ist, konnte retrospektive über die Analyse von Staubproben nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass über die Analyse von Stallstäuben auch Rückschlüsse auf die veterinärmedizinische Praxis gezogen werden können.

Schlagnorte: HPLC-MS/MS, Umweltkontaminanten, Veterinärantibiotika

Veterinary drugs from intensive livestock-farming as emerging environmental contaminants – Investigations of entrance routes and behaviour of different antibiotics in the environment using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry

Heike Pawelzick

Summary

In recent years, many investigations have been carried out on the occurrence, behaviour, and possible effects of human and veterinary pharmaceuticals in the environment. The use of considerable amounts of veterinary drugs has mainly led to the entry of tetracycline and sulfonamide antibiotics into liquid manure, soil and sediment, surface water, and occasionally also into groundwater (in the case of sulfonamides). The environmental concentrations were found to decrease with increasing distance of the source of entry. The highest concentrations were found in liquid manure (mg/kg-range), less in sediments (μg –mg/kg-range) and soils (μg /kg-range), and trace amounts in surface water and groundwater (μg /L-range). Mainly due to the lack of reliable and sensitive analytical methods, little was known about the behaviour of tetracycline and sulfonamide antibiotics, particularly under field conditions. Within the scope of this work, selective and highly sensitive HPLC-MS/MS techniques were applied to samples from various field investigations to determine the occurrence and behaviour of various antibiotics in the extended agricultural environment.

Established analytical methods for the determination of several tetracyclines in various environmental matrices were successfully applied to develop new methods to detect the substance class of sulfonamides. As previously described for the tetracyclines, sulfonamides were extracted from liquid manure and soil with liquid-liquid extraction, and from matrix-rich groundwater with solid-phase extraction. HPLC-ESI-MS/MS was applied to detect the sulfonamides selectively and sensitively. The limits of determination were 0.02–0.05 mg/kg for liquid manure, 2–5 μg /kg for sandy soil, and 0.05–0.1 μg /L for matrix-rich groundwater. Recoveries from liquid manure ranged from 72% to 108%, with an analytical precision generally lower than 10%. In sandy soil, maximum recoveries of 53% were achieved with an analytical precision of

between 12% and 18%; in matrix-rich groundwater, recoveries ranged from 54% to 93%, with an analytical precision of between 11% and 21%.

The enormous robustness of the method for both substance classes in soil, the most complex matrix, was demonstrated in ten different soil types for a very broad range of important soil characteristics such as pH, grain size distribution and organic carbon content. The robustness and broad applicability of this method make it especially suitable for routine analysis.

Very recently, tetracycline was detected in farmed land in concentrations of up to several hundred $\mu\text{g}/\text{kg}$ (sandy) soil. It was shown that tetracycline is able to persist and may accumulate in topsoil after repeated fertilisation processes. No leaching into deeper soil segments or shallow groundwater was observed. Further field studies in the years 2001 to 2004 showed no further accumulation of tetracycline, but did reveal a comparable average residue level of $152 \pm 52 \mu\text{g}/\text{kg}$. Despite the strong sorption of the drug in topsoil, leaching of this compound in groundwater was observed for the first time at the end of 2003, after four years of study. Investigations of the liquid manures applied showed that the arable land had also been amended with significant amounts of sulfadiazine and sulfamethazine. However, only sulfamethazine was detected in topsoil at concentrations of a few $\mu\text{g}/\text{kg}$. Despite its poor stability in liquid manure and soil, sulfamethazine was repeatedly detected at concentrations of up to $0.24 \mu\text{g}/\text{L}$ in groundwater sampled by suction probes at 1.4 m below soil surface.

A Survey of various agricultural fields representative of northwestern Germany showed that as many as one in three samples could be contaminated with residues of tetracyclines at concentrations of more than $100 \mu\text{g}/\text{kg}$. Again, sulfonamides were present only at concentrations of a few $\mu\text{g}/\text{kg}$ soil.

These studies showed for the first time the entry of tetracycline from soil to groundwater as well as continuous leaching of sulfamethazine into this environmental compartment. The concentrations measured here do not lead to the expectation of acute toxic effects e. g. on aquatic microorganisms. At present it cannot be conclusively determined if the antibiotic loads in groundwater at subtherapeutic concentrations may contribute to the development of antibiotic resistance.

Moreover, a comparison of intensive livestock farming and aquaculture showed that the pathway aquaculture – sediment – surface water is still of minor importance in this country.

A thus far unknown entrance route for antibiotics into the environment with a possibly higher health risk for humans was discovered in dust from animal confinement buildings. HPLC-ESI-MS/MS analysis showed that dust samples collected in a

pig fattening farm in the years 1981–2000 were contaminated with up to five different antibiotics. Tylosin and sulfamethazine were detected in 80% and 65% of these samples, respectively. As both compounds are well known as allergens, further risks may arise for the farmer from the inhalation of these dusts. Furthermore, analysis of dust samples proved retrospectively the intermittent exposure of workers to chloramphenicol, which has been banned in livestock farming within the EU since 1994, particularly because of its genotoxic potential. Therefore the analysis of dust samples from animal confinement buildings can also provide information about past and present use of veterinary drugs.

Keywords: HPLC-MS/MS, environmental contaminants, veterinary antibiotics

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	V
	Summary	IX
	Inhaltsverzeichnis	XIII
	Tabellenverzeichnis	XIX
	Abbildungsverzeichnis	XXIII
	Akronyme, Abkürzungen und Symbole	XXV
1	Einleitung	1
1.1	Verbrauchsmengen von Antibiotika	2
1.2	Mögliche Eintragspfade und Transport von Tierarzneimitteln in die Umwelt	4
1.3	Vorkommen von Antibiotika in der Umwelt	6
1.3.1	<i>Antibiotika in Gülle</i>	6
1.3.2	<i>Antibiotika in Boden</i>	8
1.3.3	<i>Antibiotika in Oberflächen- und Grundwasser</i>	9
1.4	Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte	11
1.5	Eigenschaften verschiedener Antibiotika	13
1.5.1	<i>Tetracycline</i>	13
1.5.2	<i>Sulfonamide</i>	15
1.5.3	<i>Tylosin</i>	17
1.5.4	<i>Chloramphenicol</i>	18
1.6	Analytik von Antibiotika in Umweltmatrices	19
1.6.1	<i>Probenvorbereitung: Extraktion und Anreicherung</i>	20
1.6.2	<i>Chromatographische Methoden</i>	22
1.6.3	<i>Massenspektrometrische Detektion</i>	23
2	Problemstellung	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Entwicklung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden in verschiedenen Umweltmatrices	29
3.1.1	<i>Extraktionsverfahren</i>	29

3.1.2	<i>HPLC-ESI-MS/MS</i>	29
3.1.3	<i>Methodenvalidierung</i>	32
3.1.3.1	Sulfonamide in Gülle	32
3.1.3.2	Sulfonamide in Sandboden	33
3.1.3.3	Sulfonamide in Sicker- und Grundwasser	34
3.1.4	<i>Anwendbarkeit auf Umweltproben</i>	35
3.2	Weiterentwicklung und Robustheit der analytischen Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Boden	36
3.2.1	<i>HPLC-Trennung</i>	36
3.2.2	<i>Probenvorbereitung</i>	39
3.2.2.1	Einfluß des pH-Wertes des Citratpuffers auf die Extrahierbarkeit von Tetracyclin	39
3.2.2.2	Einfluss von Ultraschall auf die Extraktionsrate von Sulfamethazin und Tetracyclin	40
3.2.2.3	Einfluss der Temperatur	40
3.2.2.4	Enzymatischer Aufschluss	41
3.2.2.5	Zusatz von Ca ²⁺ -Ionen und Huminsäure	41
3.2.3	<i>Anwendbarkeit der Gesamtmethode in Abhängigkeit vom Bodentyp</i>	42
3.3	Entwicklung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Staub	47
3.3.1	<i>Probenvorbereitung</i>	47
3.3.2	<i>HPLC-ESI-MS/MS und -MS³</i>	47
3.3.3	<i>Methodenvalidierung</i>	50
3.3.3.1	Bestimmung der Wiederfindungsraten	50
3.3.3.2	Nachweisvermögen	50
3.4	Feldstudien zur Verbreitung von Tierarzneimitteln in der Umwelt über den Eintragspfad Gülle – Boden – (oberflächennahes) Grundwasser	52
3.4.1	<i>Exposition von Gülle und Güllekrusten mit Antibiotika</i>	54
3.4.1.1	Bodendauerbeobachtungsfläche BDF01	54
3.4.1.2	Bodendauerbeobachtungsfläche BDF02	56
3.4.1.3	<i>Monitoringflächen</i>	57
3.4.2	<i>Vorkommen und Verbleib von Tetracyclinen und Sulfonamiden in güllegedüngten Böden</i>	58
3.4.2.1	Boden-Dauerbeobachtungsfläche BDF01	58
3.4.2.2	Boden-Dauerbeobachtungsfläche BDF02	61
3.4.2.3	Monitoringflächen MON01–14	63

3.4.3	<i>Eintrag von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Sicker- und Grundwasser über Gülle und güllegedüngte Böden</i>	68
3.4.3.1	Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche <i>BDF01</i>	68
3.4.3.2	Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche <i>BDF02</i>	70
3.4.4	<i>Ergänzende Modellversuche zur Untersuchung der Sorptionsprozesse von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden</i>	72
3.5	Aquakulturen	74
3.6	Feldstudien zum Vorkommen von Tetracyclinen, Sulfonamiden, Tylosin und Chloramphenicol in Stallstäuben	76
3.6.1	<i>Schweinemastbetrieb</i>	76
3.6.2	<i>Legehennenstall</i>	80
4	Diskussion	81
4.1	Analytische Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden in verschiedenen Umweltmatrices	81
4.1.1	<i>Extraktionsverfahren</i>	81
4.1.2	<i>HPLC-ESI-MS/MS</i>	83
4.1.3	<i>Methodenvalidierung</i>	84
4.1.3.1	Gülle	84
4.1.3.2	Sandboden	85
4.1.3.3	Matrixreiches Grundwasser	85
4.1.4	<i>Anwendbarkeit</i>	86
4.2	Weiterentwicklung und Robustheit der analytischen Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Boden	86
4.2.1	<i>Robustheit der Gesamtmethode</i>	87
4.2.1.1	Einfluss der Trennsäule	87
4.2.1.2	Einflussfaktoren auf die Extraktionsrate	88
4.2.2	<i>Anwendbarkeit der Gesamtmethode in Abhängigkeit vom Bodentyp</i>	88
4.3	Entwicklung einer Multimethode zur Bestimmung von Antibiotika in Staub	88
4.3.1	<i>Extraktionsverfahren</i>	89
4.3.2	<i>HPLC-ESI-MS/MS</i>	89
4.3.3	<i>Methodenvalidierung</i>	90

4.4	Feldstudien zur Verbreitung von Tierarzneimitteln in der Umwelt über den Eintragspfad Gülle – Boden – (oberflächennahes) Grundwasser	91
4.4.1	<i>Exposition von Gülle und Güllekrusten mit Antibiotika</i>	91
4.4.1.1	Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche <i>BDF01</i>	91
4.4.1.2	Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche <i>BDF02</i>	92
4.4.1.3	Standorte Monitoringflächen <i>MON01–14</i>	92
4.4.2	<i>Eintrag und Verhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden in güllegedüngten Böden</i>	93
4.4.2.1	Vorkommen von Antibiotikarückständen im Boden	93
4.4.2.2	Sorption und Verteilungsvorgänge von Antibiotika im Boden	94
4.4.2.3	Persistenz von Antibiotikarückständen im Boden	95
4.4.2.4	Bewertung der Bodenuntersuchungen	97
4.4.3	<i>Eintrag von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Sicker- und Grundwasser über Gülle und güllegedüngte Böden</i>	99
4.4.3.1	Verlagerung mit dem Sickerwasser	99
4.4.3.2	Verlagerung ins Oberflächenwasser	101
4.4.3.3	Bewertung der Grundwasseruntersuchungen	102
4.5	Aquakultur	102
4.6	Mögliche Effekte von Antibiotika aus dem landwirtschaftlichen Umfeld in der Umwelt	104
4.6.1.1	Boden und Sediment	104
4.6.1.2	Grundwasser	106
4.6.1.3	Andere Effekte	106
4.7	Luftgetragene Antibiotikarückstände in Stallstäuben	107
4.7.1	<i>Der Stallstaub als neue Quelle von Tierarzneimittel und deren Freisetzung über die Luft in die Umwelt</i>	107
4.7.2	<i>Luftgetragene Antibiotikarückstände - Ein Gesundheitsrisiko für den Menschen?</i>	107
4.7.3	<i>Stallstäube als Informationsquelle zur landwirtschaftlichen Praxis</i>	109
5	Experimentelles	111
5.1	Geräte und sonstiges Labormaterial	111
5.1.1	<i>Probenvorbereitung</i>	111
5.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	112
5.1.3	<i>Sonstiges</i>	112

5.1.4	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/-Tandem-</i> <i>massenspektrometrie</i>	113
5.1.4.1	HPLC-System	113
5.1.4.2	HPLC-Bedingungen	113
5.1.4.3	HPLC-Trennsäulen	114
5.1.4.4	Massenspektrometer	115
5.1.4.5	MS ⁿ -Methoden	115
5.2	Material	118
5.2.1	<i>Chemikalien und Lösungsmittel</i>	118
5.2.2	<i>Standardsubstanzen</i>	119
5.2.3	<i>Referenzmaterialien</i>	121
5.2.3.1	Gülle für Wiederfindungsversuche	121
5.2.3.2	Sandboden für Wiederfindungsversuche	121
5.2.3.3	Sickerwasser für Wiederfindungsversuche	121
5.2.3.4	Sandboden für Robustheitsversuche	121
5.2.3.5	Referenzböden für Wiederfindungsversuche	121
5.2.3.6	Staub für Wiederfindungsversuche	122
5.2.3.7	Ackerboden und Regenwasser für Adsorptions/Desorptions-Experimente	122
5.3	Allgemeine Vorschriften	122
5.3.1	<i>Reinigen und Ausheizen von Laborglaswaren</i>	122
5.3.2	<i>Vorbehandlung von Glaswaren</i>	122
5.3.3	<i>Bestimmung der Trockensubstanz</i>	123
5.4	Analyse von verschiedenen Antibiotika mit HPLC-ESI-MSⁿ	123
5.4.1	<i>HPLC-Trennung</i>	123
5.4.2	<i>Tandemmassenspektrometrie und MS³</i>	124
5.4.3	<i>Kalibrierung</i>	124
5.4.4	<i>Qualifizierung</i>	125
5.4.4.1	Chromatographische Leistungskriterien	125
5.4.4.2	Massenspektren	127
5.4.5	<i>Quantifizierung</i>	127
5.5	Analysenvorschriften	128
5.5.1	<i>Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden in</i> <i>Gülle</i>	128
5.5.1.1	Probenvorbereitung	128
5.5.1.2	Messung	128

5.5.1.3	Auswertung	129
5.5.1.4	Methodenvalidierung	129
5.5.2	<i>Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen, Tylosin und Sulfonamiden in Sandboden</i>	130
5.5.2.1	Probenvorbereitung	130
5.5.2.2	Messung	131
5.5.2.3	Auswertung	131
5.5.2.4	Methodenvalidierung	131
5.5.3	<i>Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen, Tylosin und Sulfonamiden in matrixreichem Wasser</i>	132
5.5.3.1	Probenvorbereitung	132
5.5.3.2	Messung	133
5.5.3.3	Auswertung	134
5.5.3.4	Methodenvalidierung	134
5.5.4	<i>Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen, Sulfonamiden, Tylosin und Chloramphenicol in Staub</i>	135
5.5.4.1	Probenvorbereitung	135
5.5.4.2	Messung	136
5.5.4.3	Auswertung	136
5.5.4.4	Methodenvalidierung	136
5.6	Modellversuche zur Untersuchung der Sorptionsprozesse von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden	138
5.6.1	<i>Desorptionsexperimente</i>	138
5.6.2	<i>Bestimmung von Adsorptionskoeffizienten</i>	139
5.7	Feldstudien	139
5.7.1	<i>Standorte der Bodenuntersuchungen und Probenahme von Boden- und Gülleproben</i>	139
5.7.2	<i>Standorte der Sicker- und Grundwasserbeprobungen und Probenahme</i>	141
5.7.3	<i>Standorte der Aquakulturbetriebe und Probenahme von Teichwässern und -Sedimenten</i>	141
5.7.4	<i>Herkunft und Probenahme der Stallstäube</i>	142
5.8	Statistik	142
6	Literatur	143
7	Publikationsliste	157

Tabellenverzeichnis

Tab. 1–1:	Jährlicher Verbrauch (Reinwirkstoffmengen) von therapeutischen Antibiotika und Leistungsförderern in der EU und der Schweiz in den Jahren 1997 und 1999.....	3
Tab. 1–2:	Jährlicher Verbrauch (Reinwirkstoffmengen) von therapeutischen Antibiotika in verschiedenen Regionen Deutschlands	4
Tab. 1–3:	Metabolisierungsraten der am häufigsten in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika	6
Tab. 1–4:	Maximale Konzentrationen verschiedener Antibiotika, die bislang in Gülle (Schwein/Rind) nachgewiesen wurden	8
Tab. 1–5:	Maximale Konzentrationen verschiedener Antibiotika, die bislang in landwirtschaftlich genutzten güllegedüngten Böden nachgewiesen wurden	9
Tab. 1–6:	Maximale Konzentrationen verschiedener Antibiotika, aus wahrscheinlich veterinärmedizinischer Anwendung, die bislang in der aquatischen Umwelt nachgewiesen wurden	10
Tab. 1–7:	Struktureigenschaften der Tetracycline	14
Tab. 1–8:	Struktureigenschaften der Sulfonamide	16
Tab. 3–1:	Grundkalibrierung der einzelnen Sulfonamide über den Arbeitsbereich von 0,1–10 ng nach Bestimmung mit HPLC-ESI-MS/MS	31
Tab. 3–2:	Gerätepräzision bei der Bestimmung von Sulfonamiden mit HPLC-ESI-MS/MS.....	32
Tab. 3–3:	Wiederfindung von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in Gülle	33
Tab. 3–4:	Wiederfindung von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in Sandboden	34

Tab. 3–5:	Wiederfindung von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxyipyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in matrixreichem Grundwasser	35
Tab. 3–6:	Ergebnisse der Trennungsoptimierung für Gradiententrennung	37
Tab. 3–7:	Vergleich der Extraktionsraten für Tetracyclin bei Verwendung von Citratpuffern verschiedener pH-Werte	40
Tab. 3–8:	Vergleich der Extraktionsraten für Tetracyclin und Sulfamethazin bei verschiedenen Probenaufarbeitungen	41
Tab. 3–9:	Bodenparameter der getesteten Bodenmatrices	43
Tab. 3–10:	Wiederfindungsraten \pm Vertrauensbereiche der untersuchten Tetracycline und Tylosin berechnet aus den Wiederfindungsfunktionen für die Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$	44
Tab. 3–11:	Wiederfindungsraten \pm Vertrauensbereiche der untersuchten Sulfonamide berechnet aus den Wiederfindungsfunktionen für die Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$	44
Tab. 3–12:	Korrelation der substanzspezifischen Wiederfindungsraten mit verschiedenen Bodenparametern	45
Tab. 3–13:	Wiederfindung von Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin, Tylosin, Chloramphenicol, Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxyipyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in Staub	51
Tab. 3–14:	Substanzspezifische Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Staub	52
Tab. 3–15:	Boden- und Standortparameter der untersuchten Boden-Dauerbeobachtungsflächen	54
Tab. 3–16:	Konzentrationen von Tetracyclinen und Sulfonamiden in verschiedenen Güllen, aufgebracht auf die <i>BDF01</i> in den Jahren 2001 und 2002	55

Tab. 3–17:	Gülleausbringung und Frachten der antibiotisch aktiven Wirkstoffe des Standorts <i>BDF01</i> in den Jahren 2000–2002....	55
Tab. 3–18:	Konzentrationen von Tetracyclinen in verschiedenen Güllen, aufgebracht auf die <i>BDF02</i> in den Jahren 2001 und 2002	56
Tab. 3–19:	Gülleausbringung und Frachten der antibiotisch aktiven Wirkstoffe des Standorts <i>BDF02</i> in den Jahren 2000–2002....	57
Tab. 3–20:	Vorkommen verschiedener Tetracycline in Güllekrusten, gesammelt auf den Monitoringflächen <i>MON02</i> , <i>MON04</i> , <i>MON08</i> und <i>MON10</i> im Mai 2003.....	57
Tab. 3–21:	Gesamtergebnisse der Bodenuntersuchungen am Standort <i>BDF01</i> bei sieben halbjährlich aufeinander folgenden Probenahmen.....	60
Tab. 3–22:	Gesamtergebnisse der Bodenuntersuchungen am Standort <i>BDF02</i> bei fünf halbjährlich aufeinander folgenden Probenahmen.....	62
Tab. 3–23:	Bodenparameter und bei der Beprobung vorhandene Feldfrüchte für die Monitoringflächen (MON).....	64
Tab. 3–24:	Konzentrationsbereiche detektierter Antibiotika im Oberboden (0–30 cm Bodentiefe) der einzelnen Monitoringflächen (MON) untersucht zwischen Juni 2002 und Mai 2004	66
Tab. 3–25:	Ergebnisse der Grundwasserbeprobung über Peilbrunnen im Herbst 2002 und im Frühjahr 2003 am Standort <i>BDF02</i>	71
Tab. 3–26:	Ergebnisse der Sickerwasserbeprobung über Saugsonden aus Nylon im Frühjahr und Herbst 2003 sowie im Frühjahr 2004 am Standort <i>BDF02</i>	71
Tab. 3–27:	Mobilität für Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden ermittelt durch Desorptionsexperimente	72
Tab. 3–28:	Ergebnisse der <i>Freundlich</i> -Parameter aus der Berechnung linearer Regressionen für die Adsorptionsisothermen von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden.....	73

Tab. 3–29:	Standortbeschreibungen der untersuchten Aquakulturen in Niedersachsen	74
Tab. 3–30:	Antibiotikakonzentrationen in Teichsedimenten und -wässern bei Aquakulturen in Niedersachsen	75
Tab. 3–31:	Antibiotika-Rückstände in Schweinestall-Staub	78
Tab. 5–1:	HPLC-Gradienten	114
Tab. 5–2:	HPLC-Trennsäulen: Referenzsäule und getestete Säulen....	114
Tab. 5–3:	Chemikalien und Lösungsmittel für die HPLC und zur Probenvorbereitung	119
Tab. 5–4:	Standardsubstanzen	120
Tab. 5–5:	Korrekturfaktoren	120
Tab. 5–6:	Grundkalibrierung der einzelnen Tetracycline, von Tylosin und Chloramphenicol über den Arbeitsbereich von 0,1–10 ng nach Bestimmung mit HPLC-ESI-MS/MS	125
Tab. 5–7:	Leistungskriterien für den chromatographischen und massenspektrometrischen Nachweis verschiedener Antibiotika und optimierte MS ⁿ -Parameter.....	126
Tab. 5–8:	Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Gülle	129
Tab. 5–9:	Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Sandboden	132
Tab. 5–10:	Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in matrixreichem Grundwasser	135
Tab. 5–11:	Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Staub	137

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1–1:	Eintragspfade für Arzneimittel in die Umwelt	5
Abb. 1–2:	Strukturformel von Tylosin	17
Abb. 1–3:	Strukturformel von Chloramphenicol.....	18
Abb. 3–1:	Chromatogramme und Massenspektren bei der Analyse von sieben Sulfonamiden in einer methanolischen Standardlösung mit HPLC-ESI-MS/MS.	30
Abb. 3–2:	HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramme einer Tetracyclin-Standardlösung, mit einer injizierten Konzentration von 10 ng, bei verschiedenen Flussraten und Trennsäulen.....	38
Abb. 3–3:	Darstellung der signifikanten Korrelationen von Bodenparametern und Wiederfindungsraten.	46
Abb. 3–4:	Chromatogramme und Massenspektren verschiedener Antibiotika in einer Staubprobe analysiert mit HPLC-ESI-MS/MS.	49
Abb. 3–5:	Standorte für Bodenuntersuchungen in Niedersachsen. Lage und Charakterisierung der Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) und Monitoringflächen (MON).....	53
Abb. 3–6:	Vorkommen von Tetracyclin, Chlortetracyclin und Sulfamethazin im Oberboden einer landwirtschaftlichen Nutzfläche (<i>BDF01</i>). Ergebnisse der Feldstudie von Juni 2001 bis Mai 2004.....	61
Abb. 3–7:	Vorkommen von Tetracyclin und Chlortetracyclin im Oberboden einer landwirtschaftlichen Nutzfläche (<i>BDF02</i>). Ergebnisse der Feldstudie von November 2001 bis 2003.	63
Abb. 3–8:	Häufigkeitsverteilung des Vorkommens einzelner Antibiotika im Oberboden der 14 Monitoringflächen bei vier Probenahmen, geordnet nach Konzentrationsbereichen.	65
Abb. 3–9:	Zeitlicher Verlauf der Tetracyclin- und Chlortetracyclinkonzentrationen im Oberboden der 14 Monitoringflächen bei vier Probenahmen von Juni 2002 bis Mai 2004.....	67

Abb. 3–10:	Eintrag von Tetracyclin und Sulfamethazin in oberflächennahes Grundwasser (1,40 m Bodentiefe). Ergebnisse der Grundwasserbeprobung mit Saugsonden aus Nylon (K) von Frühjahr 2002 bis 2004 an den vier unabhängigen Entnahmestellen 1–4 des Standortes <i>BDF01</i>	69
Abb. 3–11:	Analyse einer Wasserprobe (oberflächennahes Grundwasser) auf Tetracyclin mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	70
Abb. 3–12:	Doppelt logarithmische Darstellung der <i>Freundlich</i> -Isotherme für die Adsorption von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden.....	73
Abb. 3–13:	Standardadditionsverfahren zur Bestimmung von Chloramphenicol in Stäuben.....	77
Abb. 3–14:	Zeitlicher Verlauf und Verhältnis der Antibiotika-Konzentrationen in Stäuben eines Schweinmastbetriebes aus den Jahren 1981 bis 2000.	79
Abb. 3–15:	Zeitlicher Verlauf und Verhältnis der Antibiotika-Konzentrationen in Stäuben eines Legehennenstalls aus dem Jahr 1983.....	80

Akronyme, Abkürzungen und Symbole

[M+H] ⁺	positiv geladenes Molekülion
[M-H] ⁻	negativ geladenes Molekülion
<	kleiner als
>	größer als
< BG	NWG < c _x < BG; nachweisbar, nicht zu quantifizieren; zur Berechnung: wenn c _x < BG, dann c _x := NWG
< NWG	c _x < NWG; nicht nachweisbar; zur Berechnung: wenn c _x < NWG, dann c _x := 0
4-Epi-ATC	4-Epianhydrotetracyclin
4-Epi-CTC	4-Epichlortetracyclin
4-Epi-OTC	4-Epioxytetracyclin
4-Epi-TC	4-Epitetracyclin
α	Selektivität
α-APO-OTC	α-Apooxytetracyclin
β-APO-OTC	β-Apooxytetracyclin
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
API	<i>atmospheric pressure ionization</i> (Ionisation unter Atmosphärendruck)
APPI	<i>atmospheric pressure photoionization</i> (Photo-Ionisation unter Atmosphärendruck)
ATC	Anhydrotetracyclin
BDF	Boden-Dauerbeobachtungsfläche
BfT	<i>Bundesverband für Tiergesundheit</i>
BG	Bestimmungsgrenze
BLAC	Bund-/Länderausschuss Chemikaliensicherheit
C18	Oktadecyl-derivatisierte stationäre Phase
CAP	Chloramphenicol
C _{aq}	Gleichgewichtskonzentration in der wässrigen Phase [mg/L]
CE	<i>relative collision energy</i> [%] (relative Kollisionsenergie)
C _{org}	organischer Kohlenstoffgehalt

CTC	Chlortetracyclin
C_s	Gleichgewichtskonzentration in der festen Phase [$\mu\text{g/g}$]
CV	<i>coefficient of variation</i> [%], Variationskoeffizient
c_x	Analytkonzentration
DAD	Dioden-Array-Detektion
EG	Europäische Gemeinschaften
EMA	<i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i> (Europäische Agentur für die Beurteilung von Arzneimitteln)
ESI	<i>electrospray ionization</i> (Elektrospray-Ionisation)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaften (ab 1995: EG = Europäische Gemeinschaften)
FEDESA	<i>European Federation of Animal Health</i> (Dachverband der europäischen Arzneimittelindustrie für Tierarzneimittel)
FLD	Fluoreszenz-Detektion
FS	Feuchtsubstanz
GW	Grundwasserstand
HLB	<i>Hydrophile-Lipophile-Balance</i> [-Festphase], makroporöses Copolymer aus Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon zur Festphasen-Extraktion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPLC-ESI-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie
i. D.	innerer Durchmesser [mm]
Iso-CTC	Isochlortetracyclin
IsoW	<i>isolation width</i> [m/z]
k'	Kapazitätsfaktor
KAK_{pot}	potenzielle Kationenaustauschkapazität bei pH 8,1
$K_{\text{d,solid}}$	Sorptionskoeffizient ($K_{\text{d,solid}} = C_s/C_{\text{aq}}$)
KF	Kernfläche
K_f	<i>Freundlichsche-Adsorptionskonstante</i> [L/kg]
Konz.	Konzentration
LAVES	Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LLE	<i>liquid/liquid extraction</i> (Flüssig/Flüssig-Extraktion)

k. A.	keine Angabe
K_f	<i>Freundlich</i> -Isotherme
K_{oc}	organischer Kohlenstoff-Verteilungskoeffizient
K_{ow}	<i>n</i> -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MA	mikrobiologischer Assay
max.	maximal
Max	oberer Extremwert
Min	unterer Extremwert
MON	Monitoringfläche
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MS ⁿ	<i>multiple stage mass spectrometry</i> (mehrstufige Massenspektrometrie)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n. a.	nicht analysiert
n. b.	nicht beprobt
n. n.	nicht nachweisbar; < NWG
NLFB	Niedersächsisches Landesamt für Bodenforschung
N_t	Gesamt-Stickstoffgehalt
NWG	Nachweisgrenze
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OTC	Oxytetracyclin
PEC	<i>predicted environmental concentration</i> (erwartete Umweltkonzentration)
pH (CaCl ₂)	pH-Wert der Bodensuspension in 0,01 M CaCl ₂ -Lösung
pK _a	Säuredissoziationskonstante
PLE	<i>pressurized liquid extraction</i> (beschleunigte Lösemittelextraktion)
PN	Probenahme
R	Auflösung
r ²	Bestimmtheitsmaß
RL	Richtlinie
RP	<i>reversed-phase</i> (Umkehrphase)
RT	Retentionszeit [min]

SA	Standardabweichung
SAX	<i>strong anion exchange</i> [-Festphase] (starker Anionenaustauscher zur Festphasen-Extraktion)
SDB-1	<i>styrene divinyl benzene</i> [-Festphase], Styroldivinylbenzol- Copolymer zur Festphasen-Extraktion)
SDM	Sulfadimethoxin
SDZ	Sulfadiazin
SID	<i>source induced dissociation</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i> (Einzelmassenregistrierung)
SMPD	Sulfamethoxypyridazin
SMR	Sulfamerazin
SMX	Sulfamethoxazol
SMZ	Sulfamethazin
S/N	<i>signal to noise (ratio)</i> (Signal/Rausch [-Verhältnis])
SPE	<i>solid-phase extraction</i> (Festphasen-Extraktion)
SPME	<i>solid-phase microextraction</i> (Festphasen-Mikroextraktion)
SRM	<i>selected reaction monitoring</i> (Ionenübergangsregistrierung)
STZ	Sulfathiazol
SW	Sollwert
Tab.	Tabelle
TAM	Tierarzneimittel
TC	Tetracyclin
TMP/SA	Trimethoprim/Sulfonamid-Präparat
TS	Trockensubstanz
TYL	Tylosin
UBA	Umweltbundesamt
UMK	Umweltministerkonferenz
UV	ultraviolettes Licht
VICH	<i>International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products</i> (internationale Vereinigung zur Harmonisierung von veterinärmedizinischen Produkten)
V	Verordnung
v/v oder v/v/v	Volumenverhältnis
WDF	Wiederfindungsrate [%]
w/w	Massenverhältnis

1 Einleitung

Arzneimittel werden in großen Mengen in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt. Nach Applikation können diese Substanzen und ihre Metaboliten ausgeschieden werden und so in die Umwelt gelangen. Pharmaka werden gezielt als Stoffe mit biologischer Wirkung entwickelt und besitzen dafür spezifische physiko-chemische Eigenschaften. Um membranpermeabel zu sein, müssen sie eine gewisse Lipophilie aufweisen und um ihre Wirkstruktur bis zum Zielort zu erhalten, müssen sie persistent sein. Durch Biotransformation können während der Phase-I- (Funktionalisierung) und/oder Phase-II-Reaktionen (Konjugation) Metabolite entstehen, die meist hydrophiler sind als die Ausgangsstoffe. Folglich besitzen Arzneistoffe und Metabolite notwendige Eigenschaften, die Bioakkumulation oder Mobilität in den einzelnen Umweltkompartimenten ermöglichen und damit eine Wirkung im aquatischen und/oder terrestrischen Ökosystem ausüben zu können.

Umso erstaunlicher, dass sich erstmalig Anfang der 1970er Jahre Wissenschaftler für Arzneistoffe in der Umwelt interessierten – damals waren es Steroidhormone die als neue Umweltschadstoffe identifiziert wurden (z. B. TABAK und BUNCH 1970; NORPOTH et al. 1973; SONNEBORN 1978). In den folgenden Jahren geriet das Thema wieder in Vergessenheit und die Forscher beschäftigten sich in den 1980er Jahren intensiv mit der Umweltrelevanz vornehmlich von Industriechemikalien und Kontaminanten wie Schwermetalle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine und auch Pestizide. Erst als im Jahr 1992 Berliner Wissenschaftler bei der Untersuchung von Pflanzenschutzmittelrückständen zufällig die Clofibrinsäure, einen Lipidsenkermetaboliten, im Berliner Grundwasser entdeckten (STAN und LINKENHÄNGER 1992; STAN 1994), wurde ein mögliches ökotoxikologische Risiko von Pharmakarückständen diskutiert. Bis heute wurden weltweit mehr als 80 verschiedene Substanzen, Pharmaka und einige Metabolite, in der aquatischen Umwelt detektiert (ng–µg/L-Bereich) (HEBERER 2002).

Grundsätzlich müssen für den Eintrag von Human- und Veterinärpharmaka in die Umwelt unterschiedliche Eintragspfade betrachtet werden. Humanarzneimittel gelangen hauptsächlich über die Kläranlagenabflüsse in die Oberflächengewässer. Für Tierarzneimittel ist dagegen der Eintragsweg über die Gülle in den Boden und dann möglicherweise mit dem Sickerwasser in das Grundwasser von höchster Relevanz (HALLING-SØRENSEN 1998) (siehe Abb. 1–1).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Arzneistoffe aus der human- und veterinärmedizinischen Anwendung in Abwässern, Kläranlagenabflüssen, Oberflächen-

gewässern sowie Wirtschaftsdüngern und Böden nachgewiesen. Einen Überblick über den Kenntnisstand der letzten Jahre geben HALLING-SØRENSEN (1998), DAUGHTON und TERNES (1999), KÜMMERER (2001a, 2001b, 2003a/b, 2004), BOXALL et al. (2003) und THIELE-BRUHN (2003a). Dabei wurde in der Vergangenheit der Problematik von Pharmakarückständen aus der Humanmedizin mehr Bedeutung zugemessen, obwohl auch Tierarzneimittel im erheblichen Umfang angewendet werden. Bis heute liegen darum nur wenige Untersuchungen zum Vorkommen und Verhalten von Tierarzneimitteln in der Umwelt vor.

Zurückzuführen ist dies auch auf den Mangel an verlässlichen, ausreichend empfindlichen und selektiven Analysenmethoden für die in der Veterinärmedizin relevanten Substanzklassen der Tetracyclin-, Sulfonamid- und Makrolidantibiotika. Die Methoden der Wahl sind hier die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) (KOLPIN et al. 2002; YANG und CARLSON 2003) und -Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) (HIRSCH et al. 1999; ZHU et al. 2001; HAMSCHER et al. 2002). Sie vereinen hohe Sensitivität mit der Möglichkeit zur Strukturabsicherung. Die Anforderung an die Leistungsfähigkeit der Analysenmethoden wird durch die erwarteten Umweltkonzentrationen vorgegeben. Gerade für die komplexen Matrices wie Gülle (mg/kg-Bereich) und Boden ($\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich) sind bislang nur wenige Methoden etabliert, wohingegen der Methodenpool für die wässrigen Matrices (ng– $\mu\text{g}/\text{L}$ -Bereich) deutlich größer ist.

Die möglichen Effekte von Arzneistoffrückständen in der Umwelt sind offensichtlich. Neben den denkbaren toxischen Wirkungen auf Bodenorganismen und Pflanzen (JJEMBA 2002) ist für den Bereich der Antibiotikarückstände die Entwicklung von Resistenzen bei aquatischen und terrestrischen Bakterien von höchster Bedeutung. Da die zu erwartenden Umweltkonzentrationen meist unterhalb der Effektkonzentrationen liegen, kann gerade durch diese subtherapeutischen Wirkdosen die Selektion resistenter Stämme begünstigt werden. Wirtschaftsdünger können zudem bereits resistente Bakterien und Resistenzgene enthalten, wodurch es zu einem direkten Transfer der Resistenzeigenschaften kommen kann (WITTE 1998; LEVY 2002).

1.1 Verbrauchsmengen von Antibiotika

Die *European Federation of Animal Health (FEDESA)* gab, erstmalig 1997 und darauf 1999, Daten zu den jährlichen Verbrauchsmengen von Antibiotika in der *Europäischen Union* (inklusive der Schweiz) bekannt (FEDESA 1997, 2001). Die absoluten und relativen jährlichen Verbrauchsmengen sowie die relativen Veränderungen zueinander

Tab. 1–1: Jährlicher Verbrauch (Reinwirkstoffmengen) von therapeutischen Antibiotika und Leistungsförderern in der EU und der Schweiz in den Jahren 1997 und 1999 (nach FEDESA 2001)

Substanzgruppe	1997		1999		Δ 1997–1999
	[t]	[%]	[t]	[%]	[%]
Therapeutika	3494	27,5	3827	29,1	+11
Leistungsförderer	1599	12,5	786	6	–50,0
Humanmedizin	7659	60	8525	64,8	+11,3
Gesamtbilanz	12752	100	13216	100	+3,6

sind in Tab. 1–1 dargestellt. Daraus ergibt sich, dass die Gesamtantibiotikamenge zu circa Zweidritteln auf die Humanmedizin und zu circa einem Drittel auf die Veterinärmedizin inklusive der Leistungsförderer entfällt. Aufgrund der Rücknahme von Zulassungen für pharmakologisch wirksame Futtermittelzusatzstoffe konnte eine Abnahme in diesem Bereich beobachtet werden.

Zum Umfang des Antibiotikaeinsatzes in der Tierhaltung in Deutschland sind derzeit keine aktuellen Daten zugänglich. Jedoch gab der *Bundesverband für Tiergesundheit (BfT)* die Daten zum Tierarzneimittelmarkt 2003 in Deutschland bekannt. Demnach verzeichnet das Antibiotikasegment im Vergleich zum Vorjahr ein positives Wachstum von 5,8 % und trägt mit 28,9 % zum Gesamtumsatz von 509 Mio. Euro bei (BFT 2004). Allerdings lassen sich aus diesen Zahlen keine Rückschlüsse auf die tatsächlichen Wirkstoffmengen ziehen.

Für eine der in Deutschland bedeutendsten Region für Intensivtierhaltung, dem Regierungsbezirk Weser-Ems, hat das *Umweltbundesamt (UBA)* eine Studie zur Abschätzung der in die Umwelt eingetragenen Wirkstoffmengen von Tierarzneimitteln beauftragt (WINCKLER und GRAFE 2000). Die hierbei für die Jahre 1997 und 1999 erhobenen Daten bilden noch heute eine wichtige Grundlage für die Beurteilung der ökotoxikologischen Relevanz einzelner Stoffgruppen im Zusammenhang mit Fragen des Boden- und Gewässerschutzes. Demnach sind in der Region Weser-Ems insbesondere die Tetracycline, gefolgt von den Sulfonamiden, quantitativ von Bedeutung. Dies deckt sich mit Erhebungen der Bundesländer Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern (siehe Tab. 1–2). Die Erhebungen von WINCKLER und GRAFE (2000) flossen in die Konzeption dieser Arbeit ein. Zur näheren Untersuchung der Eintragspfade von Tierarzneimitteln in die Umwelt wurden schließlich als Leitsubstanzen die mengenmäßig bedeutendsten Tetracyclin- und Sulfonamidantibiotika ausgewählt: Chlortetracyclin (Verbrauch 1999: 24 t), Tetracyclin (Verbrauch 1999: 14 t), Oxytetracyclin (Verbrauch 1999: 1,6 t) sowie Sulfadiazin und Sulfamethazin (Verbrauch 1999: je 6 t).

Tab. 1–2: Jährlicher Verbrauch (Reinwirkstoffmengen) von therapeutischen Antibiotika in verschiedenen Regionen Deutschlands

Substanzgruppe	Weser-Ems 1997*		Brandenburg 1998/1999 [†]		Mecklenburg- Vorpommern 2001 [‡]	
	[t]	[%]	[t]	[%]	[t]	[%]
Tetracycline	39,8	58	4,6	69	6,4	41
Sulfonamide	14,4	21	0,9	14	2,5	16
Aminoglycoside	7,1	10	0,2	3	0,2	2
β-Laktame	3,8	5	0,2	3	0,1	1
Makrolide	0,2	< 1	0,01	< 1	0,1	1
Sonstige	3,9	6	0,7	10	0,8	8
Antibiotikamenge	69,2	100	6,6	100	10	100

* WINCKLER und GRAFE (2000)

[†] LINKE und KRATZ (2001)

[‡] THIELE-BRUHN et al. (2003a)

1.2 Mögliche Eintragspfade und Transport von Tierarzneimitteln in die Umwelt

Ende der 1990er Jahre postulierte HALLING-SØRENSEN (1998) verschiedene Eintragspfade für Human- und Veterinärpharmaka in die Umwelt. Seitdem gewann dieses Schema durch den erhöhten Forschungsumfang mehr an Kontur und wurde ständig erweitert (u. a. JØRGENSEN und HALLING-SØRENSEN 2000; JJEMBA 2002; KÜMMERER 2004). Anerkannt ist, dass die Haupteintragspfade und der Transport von Human- und Veterinärpharmaka grundsätzlich verschieden sind. Die Quellen, möglichen Eintrags- und Verteilungspfade von Arzneistoffen in der Umwelt sind in Abb. 1–1 skizziert.

Verabreichte Humanarzneimittel werden entsprechend ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften unterschiedlich stark biotransformiert oder auch völlig unverändert (z. B. Kontrastmittel) wieder ausgeschieden. Die ausgeschiedenen Arzneistoffe und ihre Metaboliten gelangen mit den Abwässern in die Kläranlagen. Findet dort keine Elimination statt, können die Wirkstoffe über den Wasserpfad in die Umwelt eingetragen werden und möglicherweise sogar ins Trinkwasser gelangen. Durch die Verwendung von Klärschlämmen als Wirtschaftsdünger können Humanarzneistoffe über diesen Nebenpfad auch in die terrestrische Umwelt eingetragen werden (KÜMMERER 2004).

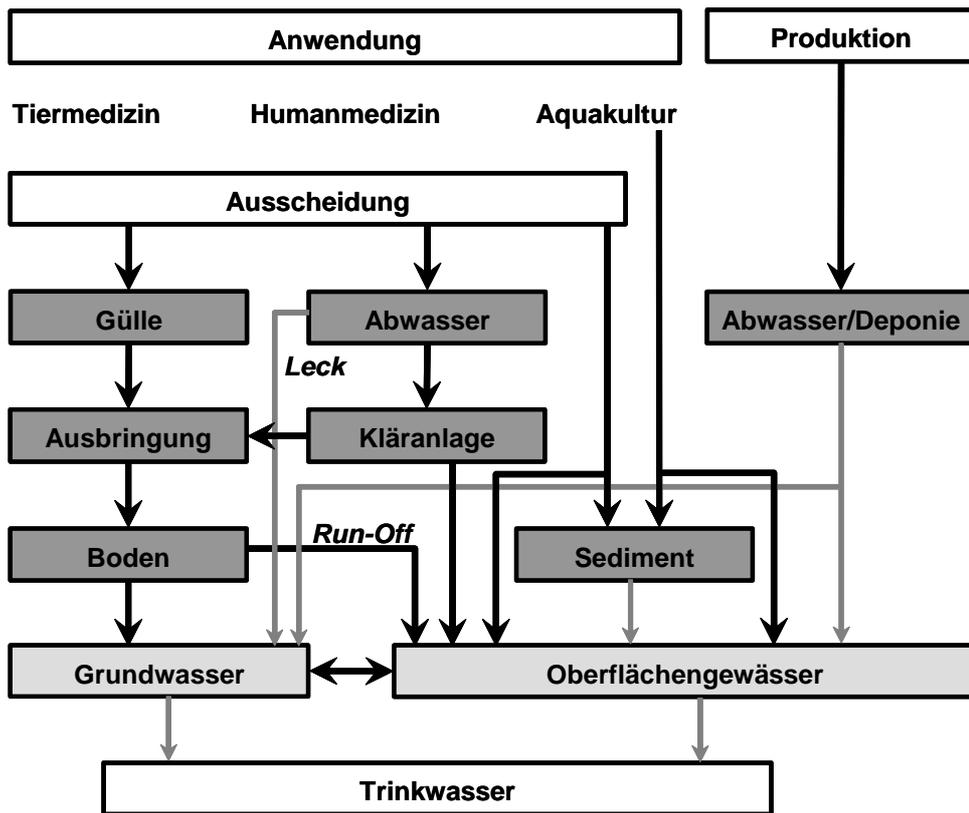


Abb. 1–1: Eintragspfade für Arzneimittel in die Umwelt (modifiziert nach HIRSCH et al. 1999).

Die in der Intensivtierhaltung verabreichten veterinärmedizinischen Wirkstoffe und ihre Metaboliten werden mit den Exkrementen ausgeschieden. Durch Beaufschlagung von Ackerflächen mit Gülle und Dung und der meist folgenden mechanischen Bodenbearbeitung werden die Wirkstoffe in den Boden inkorporiert. Begünstigt durch starke Regenfälle können die Substanzen mit dem Bodenwasser oder direkt durch Makroporenflüsse möglicherweise in das Grundwasser verlagert werden (JØRGENSEN und HALLING-SØRENSEN 2000). Bei rein topischen Applikationen, d. h. bei Gülleausbringungen auf die Ackeroberfläche, z. B. durch Versprühen oder Ausbringung mit der Schleppschlauchtechnik, ohne nachfolgende mechanische Bodenbehandlung, ist die Gefahr für einen „Run-Off“ der Substanzen in die umliegenden Oberflächengewässer besonders groß. Dieser wahrscheinlichste Eintragspfad für Tierarzneimittel in die Umwelt wurde durch Vorkommen in den relevanten Umweltkompartimenten belegt, das in Abschnitt 1.3 näher dargestellt wird.

In der Aquakultur angewendete Antibiotika können sich direkt – über das Fischfutter oder über die Ausscheidungen der Fische – in den Sedimenten niederschlagen. Begründet in dieser speziellen Anwendungsform werden die Pharmaka kaum

metabolisiert und abgebaut (JACOBSEN und BERGLIND 1988). Da die kommerzielle Nutzung der Aquakultur in Deutschland zunehmend wichtiger, sollte im Sinne des vorbeugenden Umweltschutzes auch hier ein Umweltmonitoring stattfinden.

Ein bislang unbekannter Eintrag von Antibiotika in die Umwelt mit einem möglicherweise größeren Risiko für den Menschen könnte über luftgetragene Stallstäube erfolgen. Stallstaub setzt sich aus Bestandteilen von Futtermitteln, Einstreu und Faeces zusammen und ist daher ein potenzieller Träger von oral verabreichten und von ausgeschiedenen Antibiotika. Neben dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen beim Menschen könnten auch die allergenen Eigenschaften einiger dieser Wirkstoffe zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen.

1.3 Vorkommen von Antibiotika in der Umwelt

1.3.1 Antibiotika in Gülle

Ein Großteil der bei Lebensmittel liefernden Tieren bestimmungsgemäß verabreichten Antibiotika wird über den Urin und die Faeces wieder ausgeschieden. In Fütterungsversuchen ermittelte Ausscheidungsraten für Sulfonamide und Tetracycline reichen von 50 bis 80 % (BERGER et al. 1986; KROKER 1983; WINCKLER und GRAFE 2000). Die Exkreme enthalten dabei meist eine Mischung aus Muttersubstanz und Metabolit (SPAEPEN et al. 1997; MONTFORTS et al. 1999; TOLLS 2001; BOXALL et al. 2003). Antibiotika können durch zahlreiche Phase-I- (Funktionalisierung) und/oder Phase-II-Reaktionen (Konjugation) biotransformiert werden (TOLLS 2001). Art und Weise sowie Ausmaß der Metabolisierung ist abhängig von der Substanz selbst, der Applikation und der Tierart (TOLLS 2001). Eine Übersicht über die Metabolisierungsraten verschiedener Antibiotika gibt Tab. 1–3.

Tab. 1–3: Metabolisierungsraten der am häufigsten in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika (nach BOXALL et al. 2004)

Substanzgruppe	Metabolisierungsrate
Tetracycline	minimal
Sulfonamide	hoch
Makrolide	minimal
Aminoglycoside	minimal–hoch
Fluorquinolone	moderat–hoch

Zuordnung der Metabolisierungsraten: minimal: < 20 %; moderat: 20–80 %; hoch: > 80 %.

Während Tetracycline nur geringfügig im Tier metabolisiert werden (WINCKLER und GRAFE 2000), zeigen die Sulfonamide eine hohe metabolische Umsetzungsrate (BOXALL et al. 2004). BERGER et al. (1986) zeigten, dass 46 % des Schweinen verabreichten Sulfamethazins (SMZ) in die Gülle gelangt, 50 % davon als N⁴-Acetyl-SMZ.

Die Antibiotika und Metaboliten enthaltenden Exkrementen werden als Wirtschaftsdünger eingesetzt und entweder direkt oder nach einer gewissen Lagerungszeit auf die Felder ausgebracht. Von den Ausgangskonzentrationen und der Stabilität der Antibiotika in der Gülle hängt letztlich die Antibiotikafracht in die Umwelt ab.

Bislang sind nur vereinzelte Studien zum Abbau von Antibiotika in Wirtschaftsdüngern beschrieben worden. Für Tetracycline wurden Halbwertszeiten von 30–64 Tagen ermittelt (GAVALCHIN und KATZ 1994; WINCKLER und GRAFE 2001; DE LIGUORO et al. 2003). WINCKLER und GRAFE (2001) stellten dabei keinen signifikanten Einfluss der Ausgangskonzentration, der Umgebungstemperatur sowie des Lufteintrages auf die Persistenz von Tetracyclin in Gülle fest (WINCKLER und GRAFE 2001). LANGHAMMER et al. (1988) ermittelten für Sulfathiazol bzw. Sulfamethazin einen 40–60 %igen Abbau nach fünf Wochen. Ferner können verschiedene biotische oder abiotische Prozesse dazu führen, dass Stoffwechselprodukte wieder in die Muttersubstanzen umgewandelt werden. Dies trifft insbesondere für die Rückreaktion von N⁴-Acetyl-SMZ nach Sulfamethazin zu (BERGER et al. 1986; LANGHAMMER et al. 1988). Erste Abbauversuche zu Tylosin (LOKE et al. 2000) deuten darauf hin, dass die Halbwertszeit dieses Wirkstoffes in Gülle unter zwei Tagen liegt.

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass Tetracyclin und Sulfamethazin nach bestimmungsgemäßer Anwendung in der Gülle in signifikanten Konzentrationen von bis zu 66 mg/L (WINCKLER und GRAFE 2001) und 40 mg/L vorhanden sind (LANGHAMMER et al. 1988). HAMSCHER et al. (2004) gaben kürzlich eine Literaturübersicht über die bislang maximalen Konzentrationen verschiedener in Gülle nachgewiesener Antibiotika und Metabolite (siehe Tab. 1–4).

Tab. 1–4: Maximale Konzentrationen verschiedener Antibiotika, die bislang in Gülle (Schwein/Rind) nachgewiesen wurden (modifiziert nach HAMSCHEER et al. 2004)

Substanz (-klasse)	Anzahl [n]	Anzahl [n = pos.]	max. Konz. [mg/kg]	Referenz
Tetracycline				
- Oxytetracyclin	1	1	19	DE LIGUORO et al. (2003)
- Tetracyclin	181	44	66	WINCKLER und Grafe (2001)
- Chlortetracyclin	7	4	2,7	HÖPER et al. (2002)
Sulfonamide				
- Sulfamethazin	?	?	40	LANGHAMMER et al. (1989)
- N ⁴ -Acetyl-Sulfamethazin	6	6	2,6	HALLER et al. (2002)
- Sulfadiazin	7	5	1,1	HAMSCHEER et al. (2004)
- N ⁴ -Acetyl-Sulfadiazin	4	2	0,27	PFEIFER et al. (2002)
- Sulfathiazol	6	4	12,4	HALLER et al. (2002)
Andere				
- Salinomycin	4	1	0,01	SCHLÜSENER et al. (2003a)
- Tiamulin	4	1	0,04	SCHLÜSENER et al. (2003a)
- Trimethoprim	6	1	< 0,1	HALLER et al. (2002)

Dieser Überblick verdeutlicht, dass die Größenordnung der Antibiotikagehalte in Gülle offensichtlich substanzabhängig ist. Verschiedene Studien zeigten, dass die Stabilität der Antibiotika und Metaboliten in der Gülle substanz-, tierarten- und temperaturabhängig sind (LANGHAMMER et al. 1988; KÜHNE et al. 2000; LOKE et al. 2000; WINCKLER und GRAFE 2000; 2001). Des Weiteren können verschiedene biotische oder abiotische Abbauprozesse wiederum dazu führen, dass Stoffwechselprodukte wieder in die Muttersubstanzen umgewandelt werden (BERGER et al. 1986; LANGHAMMER et al. 1988).

Es liegen bislang nur wenige Studien zum Vorkommen von Antibiotika in der Gülle vor. Diese zeigen jedoch, dass sowohl Tetracycline als auch Sulfonamide nach bestimmungsgemäßer Anwendung Rückstandskonzentrationen im mg/kg-Bereich in der Gülle hinterlassen können. Tylosin, Salinomycin und Tiamulin wurden vereinzelt im µg/kg-Bereich nachgewiesen. Diese Vorkommen verdeutlichen, dass Antibiotika und teilweise ihre Metaboliten, in bedeutenden Mengen ausgeschieden werden und entweder direkt über die Exkremate oder durch die gebräuchliche Praxis der Gülledüngung in den Boden verfrachtet werden können.

1.3.2 Antibiotika in Boden

Arzneistoffe mit einer gewissen Stabilität in Gülle können durch die gängige Praxis der Gülleausbringung auf landwirtschaftliche Nutzflächen in die Böden gelangen und

dort möglicherweise persistieren. Dies wurde im Rahmen einer Kooperation des *Niedersächsischen Landesamtes für Bodenforschung (NLfB)* und der *Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* erstmals am Beispiel der Tetracycline nachgewiesen (HAMSCHEER et al. 2000, 2002). Es wurde gezeigt, dass über die Gülle in den Ackerboden eingetragene Tetracycline im Bereich des Pflughorizontes festgelegt werden und trotz maximaler Tetracyclinkonzentrationen von bis zu 300 µg/kg Boden kein Übergang dieser Substanzklasse in tiefere Bodenschichten erfolgt (HAMSCHEER et al. 2002). Obwohl in den letzten Jahren die Exposition von landwirtschaftlichen Nutzflächen mit Antibiotika erkannt wurde, herrscht immer noch ein Mangel an verlässlichen Studien in denen Umweltkonzentrationen gemessen wurden. Die Anzahl der Nachweise in diesem Umweltkompartiment sind daher gering (siehe Tab. 1–5), welche in der Regel auf Einzelbefunden beruhen. Dieser Mangel verdeutlicht den erheblichen Forschungsbedarf in diesem Sektor.

Tab. 1–5: Maximale Konzentrationen verschiedener Antibiotika, die bislang in landwirtschaftlich genutzten güllegedüngten Böden nachgewiesen wurden (modifiziert nach HAMSCHEER et al. 2004)

Substanz (-klasse)	Anzahl [n]	Anzahl [n = pos.]	max. Konz. [mg/kg]	Referenz
Tetracycline				
- Oxytetracyclin	1	1	< 0,01	DE LIGUORO et al. (2003)
- Tetracyclin	60	36	0,31	HAMSCHEER et al. (2002)
- Chlortetracyclin	14	11	0,03	HAMSCHEER et al. (2000)
Sulfonamide				
- Sulfamethazin	14	4	0,011	HÖPER et al. (2002)
Andere				
- Salinomycin	1	1	< 0,0016	SCHLÜSENER et al. (2003b)
- Tiamulin	1	1	0,0007	SCHLÜSENER et al. (2003b)

1.3.3 Antibiotika in Oberflächen- und Grundwasser

Die Wahrscheinlichkeit eines Eintrages von Antibiotika und Metaboliten aus dem landwirtschaftlichen Umfeld in den Wasserpfad hängt in erster Linie von den Stoffeigenschaften ab. Die Mobilität ist abhängig von der Wasserlöslichkeit, dem Ladungszustand und den Matrix-Wechselwirkungen wie Komplexbildung, Ionen-Austauschreaktionen und Wasserstoffbrückenbildung. Während Humanarzneimittel über die Kläranlagenabflüsse direkt in den Wasserpfad transportiert werden, müssen für den Transport von Antibiotika aus Böden und Gülle weitaus größere Barrieren überwunden

werden. Aufgrund des erhöhten Forschungseinsatzes in den vergangenen Jahren, wurden vor allem in Oberflächengewässern in landwirtschaftlichem Umfeld häufig Antibiotika nachgewiesen (LINDSEY et al. 2001; KOLPIN et al. 2002; YANG und CARLSON 2003; YANG et al. 2004). Eine Grundwasserkontamination wurde nur in Einzelfällen für das Sulfonamid Sulfamethazin nachgewiesen (HIRSCH et al. 1999) und konnte bislang auch bei hochexponierten Ackerflächen mit Tetracyclin nicht erkannt werden (HAMSCHEER et al. 2002). Eine Übersicht der maximalen Konzentrationen in der aquatischen Umwelt gibt Tab. 1–6, wobei hier eine eindeutige Differenzierung zwischen Antibiotika aus human- und veterinärmedizinischer Anwendung, bei Wirkstoffen die in beiden Disziplinen verwendet werden, kaum durchführbar ist.

Tab. 1–6: Maximale Konzentrationen verschiedener Antibiotika, aus wahrscheinlich veterinärmedizinischer Anwendung, die bislang in der aquatischen Umwelt nachgewiesen wurden

Substanz (-klasse)	Anzahl [n]	Anzahl [n = pos.]	max. Konz. [µg/L]	Matrix	Referenz
Tetracycline					
- Oxytetracyclin	138	6 [†]	1,34	OGW	LINDSEY et al. (1999)
- Tetracyclin	138	6 [†]	0,11	OGW	LINDSEY et al. (1999)
- Chlortetracyclin	138	6 [†]	0,15	OGW	LINDSEY et al. (1999)
Sulfonamide					
- Sulfamethazin	52	2	0,16	GW	HIRSCH et al. (1999)
- Sulfamethazin	138	6 [‡]	0,22	OGW	LINDSEY et al. (1999)
- Sulfamethoxazol	6	1	0,22	GW	LINDSEY et al. (1999)
- Sulfamethoxazol	138	6 [‡]	1,02	OGW	LINDSEY et al. (1999)
- Sulfadimethoxin	138	6 [‡]	15	OGW	LINDSEY et al. (1999)
- Sulfathiazol	138	6 [‡]	0,08	OGW	LINDSEY et al. (1999)
- Sulfachloropyridazin	5	1	0,13	OGW	YANG und CARLSON (2003)
- Trimethoprim	104	13	0,71	OGW	KOLPIN et al. (2002)
Makrolide					
- Tylosin	16	?	0,28	OGW	YANG und CARLSON (2004)
- Erythromycin-H ₂ O	104	22	1,7	OGW	KOLPIN et al. (2002)
Andere					
- Lincomycin	104	20	0,73	OGW	KOLPIN et al. (2002)
- Ciprofloxazin	104	22	1,7	OGW	KOLPIN et al. (2002)
- Norfloxazin	115	1	0,12	OGW	KOLPIN et al. (2002)

[†] n = pos bezieht sich hier auf die Summe aus OTC, TC und CTC

[‡] n = pos bezieht sich hier auf die Summe aus SDM, SMZ, SMX und STZ

Abk.: OGW, Oberflächengewässer; GW, Grundwasser

Diese Übersicht verdeutlicht, dass Antibiotika aus veterinärmedizinischer Anwendung im unteren µg/L-Bereich in der aquatischen Umwelt auftreten können.

Die deutlich höhere Nachweisinzidenz in Oberflächengewässern deutet darauf hin, dass ein horizontaler oberirdischer Transfer, der so genannte „Run-Off“, von Antibiotika aus dem landwirtschaftlichen Umfeld wahrscheinlicher ist als ein Eintrag in das Grundwasser durch Auswaschen der Böden. Da Verlagerungsprozesse im Boden sehr langwierig sein können, kann anhand der seither bekannten ausgedehnten Screeningstudien (HIRSCH et al. 1999; KOLPIN et al. 2002, LINDSEY et al. 2002; YANG et al. 2004) und räumlich begrenzten Kurzzeitstudien (MEYER et al. 2000; ZHU et al. 2001; HAMSCHER et al. 2002) das Umweltverhalten verschiedener Substanzklassen nur bedingt beobachtet werden.

1.4 Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte

Aufgrund eines Berichtes des *Bund-Länderausschusses Chemikaliensicherheit* (BLAC 1998) zu „Auswirkungen der Anwendung von Clofibrinsäure und anderer Arzneimittel auf die Umwelt und Trinkwasserversorgung“ hat die 51. *Umweltministerkonferenz (UMK)* 1998 den *BLAC* beauftragt, ein Konzept für ein bundesweites Untersuchungsprogramm auf Arzneistoffe in Wasser, Boden und den maßgeblichen Eintragungspfaden zu entwickeln. Ein entsprechender Vorschlag des *BLAC* für ein Untersuchungsprogramm wurde von der 53. *UMK* im Oktober 1999 akzeptiert (BLAC 1999).

Der *BLAC* wurde beauftragt, ein einjähriges Untersuchungsprogramm durchzuführen. Damit soll „das Auftreten von Arzneistoffen aus der Verwendung von Human- und Tierarzneimitteln sowie pharmakologisch wirksamen Futterzusatzstoffen“ ermittelt werden. Das *Umweltbundesamt (UBA)* wurde seitens des Bundes-Umweltministeriums beauftragt, Daten über den Verbrauch von Wirkstoffen in Tierarzneimitteln und pharmakologisch wirksamen Futtermittelzusatzstoffen zu erheben. Hierbei werden die Umweltmedien Wasser und Boden berücksichtigt. Während für den Wasserpfad vorwiegend Humanarzneimittel eine Rolle spielen, sind für den Stoffeintrag in die Böden neben den Humanpharmaka (via Klärschlamm) in erster Linie Wirkstoffe aus Tierarzneimitteln und Futtermittelzusatzstoffen von Interesse. Das Messprogramm wurde von September 2000 bis August 2001 durchgeführt und in einem Bericht 2003 veröffentlicht (BLAC 2003).

Für eine Abschätzung der potenziellen Ökotoxizität von Tierarzneimittelwirkstoffe in der Umwelt kann die Leitlinie EMEA/CVMP/055/96-final der Europäischen Arzneimittelagentur (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA*) herangezogen werden (EMEA 1997). Darin ist ein Verfahren zur Abschätzung des

Umweltrisikos von neu zuzulassenden veterinärmedizinisch wirksamen Substanzen festgelegt.

Das Verfahren ist in zwei Phasen gegliedert. In Phase I wird geprüft, ob eine Substanz potenziell schädlich für die Umwelt ist. Wird sie als potenziell ökotoxisch eingestuft, sind in Phase II verschiedene ökotoxikologische Tests durchzuführen. Die Kriterien für den Übergang von Phase I zu Phase II sind in den Empfehlungen des *VICH (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products)* zur Implementierung der *EMEA-Leitlinie* modifiziert worden. Danach werden veterinärmedizinische Produkte u. a. dann als potenziell ökotoxisch angesehen, wenn im Boden die in einem *Worst-Case-Szenario* geschätzte Konzentration (PEC, *predicted environmental concentration*) einen Wert von 100 µg/kg überschreitet (VICH 2000; bis 2001: 10 µg/kg, EMEA 1997).

Trifft diese Anforderung zu, tritt die Stoffprüfung in die Phase II Stufe A ein. Hier sind unter anderem folgende Parameter zu erfassen und zu bewerten: Abbauraten in drei Böden, akute Regenwurmtoxizität, Phytotoxizität; Adsorptionskoeffizient an die organische Substanz des Bodens (K_{oc} -Wert) in drei Böden, akute Daphnientoxizität.

Zielgrößen sind neben einer Abschätzung akut toxischer Effekte auf Pflanze, Regenwurm und Mikroorganismen auch die potenzielle Verlagerbarkeit in Grund- und Oberflächengewässer sowie die Persistenz im Boden und damit das Potenzial im Boden zu akkumulieren. Ergeben sich aus Phase II Stufe A Hinweise auf ein erhöhtes Umweltrisiko, so sind in Stufe B weitere Labor- und Felduntersuchungen zur ökotoxikologischen Bewertung der Substanz durchzuführen.

Viele der potenziell umweltrelevanten Wirkstoffe sind jedoch vor 1996 zugelassen worden und daher häufig nicht oder nur unvollständig auf ihre Umwelteigenschaften untersucht worden. Insofern besteht für die Tierarzneimittelhersteller zurzeit nur Handlungsbedarf für neu zuzulassende Wirkstoffe. Der größte Anteil der momentan eingesetzten Stoffe – einschließlich der Tetracycline – gehört allerdings ausnahmslos zu den „Alt-Tierarzneimitteln“ für die bislang keine Prüfung auf das Umweltverhalten vorgeschrieben ist.

1.5 Eigenschaften verschiedener Antibiotika

1.5.1 Tetracycline

Tetracycline sind Breitbandantibiotika die von *Streptomyces*-Arten gebildet werden. Das erste Tetracyclinantibiotikum, das Chlortetracyclin, wurde 1948 von DUGGAR aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces aureofaciens* isoliert. Tetracycline weisen ein breites Wirkspektrum auf. Es umfasst den größten Teil der grampositiven und -negativen Bakterien dazu Mykobakterien, Mykoplasmen, Chlamydien, Rickettsien sowie große Viren. Tetracycline sind Inhibitoren der Proteinsynthese und wirken dadurch bakteriostatisch. Angriffspunkt ist die 30S-Untereinheit des 70S-Ribosoms, wobei die Bindung von Aminoacyl-t-RNA an die ribosomale Akzeptorregion gehemmt wird (STAHLMANN und LODE 2001c; KROKER et al. 2002).

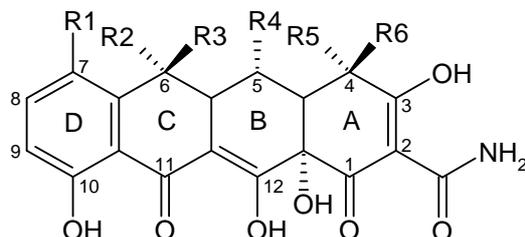
Tetracycline leiten sich aus einem System (siehe Tab. 1–7, Grundstruktur I) von vier linear annellierten sechsgliedrigen Ringen, dem Naphthacen, mit charakteristischer Anordnung der Doppelbindungen ab. Man unterscheidet die beiden chromophoren Bereiche A und BCD, die durch das sp^3 -Kohlenstoffatom 12a getrennt werden. Die Kohlenstoffatome 4, 4a, 5, 5a, 6 und 12a sind bei entsprechender Substitution asymmetrisch. Die therapeutisch genutzten Wirkstoffe unterscheiden sich nur durch ihre Substituenten an C^5 , C^6 , C^7 und C^2 (siehe Tab. 1–7). Die einzelnen Derivate zeigen vergleichbare physiko-chemische Eigenschaften.

Oxytetracyclin (OTC), Tetracyclin (TC) und Chlortetracyclin (CTC) sind kristalline, gelb bis braun gefärbte, im UV-Licht gelb fluoreszierende, lichtempfindliche Verbindungen mit amphoterem Charakter. In neutraler und saurer Lösung zeigen sie eine charakteristische UV-Adsorption bei 270 und 320 nm. Im physiologischen pH-Bereich ist die Wasserlöslichkeit der natürlichen Tetracycline nur gering (ca. 1 mg/mL), die Hydrochloride dagegen sind meist sehr gut löslich. Gut löslich sind die Tetracycline in Säuren, Basen, Alkoholen sowie polaren organischen Lösemitteln und lassen sich gut mit organischen Lösemitteln wie *n*-Butanol oder Ethylacetat extrahieren (MERCCK 2001). Der amphotere Charakter der Tetracycline wird durch die sauren Gruppen und dem basischen Dimethylamino-Rest bedingt. Insgesamt können drei pK_a -Werte (siehe Tab. 1–7) gemessen werden; der isoelektrische Punkt liegt bei $pH \sim 5$ (MITSCHER 1978, DÜRCKHEIMER 1975, OKA et al. 2000).

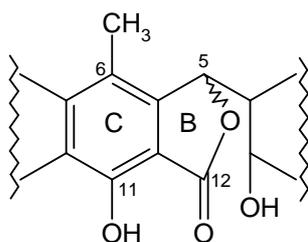
Tetracycline sind relativ säurestabil, nicht stabil im Basischen und bilden Kationen- und Anionensalze. Die einzelnen Vertreter zeigen unter milden Bedingungen eine Reihe von Abbau- und Umwandlungsreaktionen (siehe Tab. 1–7, Unterstrukturen a–c).

Tab. 1–7: Struktureigenschaften der Tetracycline

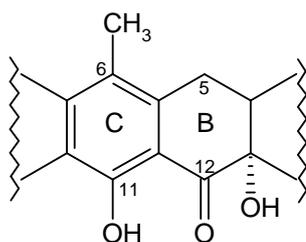
Grundstruktur I



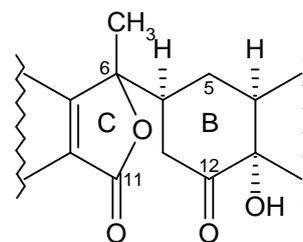
Unterstruktur a



Unterstruktur b



Unterstruktur c



Substanz	pK _{a1} *	pK _{a2} *	pK _{a3} *	Struktur	R1	R2	R3	R4	R5	R6
OTC	3,27	7,32	9,11	I	H	CH ₃	OH	OH	N(CH ₃) ₂	H
4-Epi-OTC			–	I	H	CH ₃	OH	OH	N(CH ₃) ₂	H
α-Apo-OTC			–	Ia	H	–	–	–	N(CH ₃) ₂	H
β-Apo-OTC			–	Ia	H	–	–	–	N(CH ₃) ₂	H
TC	3,30	7,68	9,69	I	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H
4-Epi-TC			–	I	H	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂
ATC			–	Ib	H	–	–	–	N(CH ₃) ₂	H
4-Epi-ATC			–	Ib	H	–	–	–	H	N(CH ₃) ₂
CTC	3,30	7,44	9,27	I	Cl	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H
4-Epi-CTC			–	I	Cl	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂
Iso-CTC			–	Ic	Cl	–	–	–	H	N(CH ₃) ₂

* nach MITSCHER 1978

Abk.: OTC, Oxytetracyclin; TC, Tetracyclin; ATC, Anhydrotetracyclin; CTC, Chlortetracyclin

Tetracycline epimerisieren leicht und reversibel zu ihren entsprechenden 4-Epi-Verbindungen bei pH-Werten zwischen 2 und 6. Tetracycline mit einer Hydroxygruppe an C⁶ (z. B. OTC, TC, CTC) spalten bei pH ≤ 2 Wasser ab. Bei Tetracyclin, Chlortetracyclin und deren Epimeren entstehen so Anhydro-Verbindungen. Oxytetracyclin bildet dagegen kein stabiles Anhydro-Derivat und wird unter diesen Bedingungen irreversibel zu den epimeren α- und β-Apo-Oxytetracyclinen degradiert. Im basischen Milieu sind Tetracycline labil und isomerisieren zu Iso-Tetracyclinen. Chlortetracyclin bildet schon bei pH = 7,5 in der Wärme Iso-Chlortetracyclin. (DÜRCKHEIMER 1975, OKA und PATTERSON 1995).

Tetracycline bilden mit zwei- und mehrwertigen Kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) schwer lösliche Komplexe; dies bewirkt eine Verminderung der enteralen Resorbierbarkeit (KROKER et al. 2002). Die Komplexbildung findet insbesondere nach einer Tautomerisierung des Keto-Enol-Systems an C^{10} - C^{12} zum Phenol-Diketon statt (bei pH 3–7,5). Wird bei steigendem pH-Wert die Dimethylaminogruppe deprotoniert, so kann ein weiteres Kation von dieser Gruppe und der dazu *cis*-ständigen 12a-Hydroxygruppe gemeinsam gebunden werden. Bei Oxytetracyclin kann zusätzlich ein Chelat zwischen der 5- und 12a-Hydroxygruppe gebildet werden (DÜRCKHEIMER 1975).

Die einzelnen Tetracycline unterscheiden sich weniger in ihrer Wirkintensität als in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften. Lediglich die Epimere zeigen eine verminderte antibiotische Wirksamkeit, wohingegen die Anhydro-, Apo- und Iso-Abbauprodukte nicht mehr antibiotisch wirksam sind. (OKA und PATTERSON 1995).

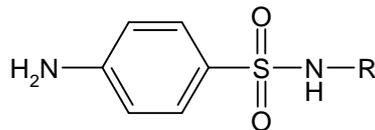
1.5.2 Sulfonamide

Sulfonamide sind synthetisch hergestellte Antibiotika. Sie sind Derivate des 4-Aminobenzolsulfonamids und werden durch Substitution am Amidstickstoff N^1 (in der Regel durch N-haltige Heterocyclen) dargestellt. Der einfachste Vertreter, das Sulfanilamid wurde erstmals 1932 von Domagk (DOMAGK 1935) aus dem Azofarbstoffs Prontosil generiert. Für die antibiotische Wirksamkeit muss der primäre Anilinstickstoff N^4 erhalten bleiben bzw. sich leicht metabolisch in ein primäres Amin überführen lassen (z. B. N-Acyl-Derivate). Die Strukturformeln der für diese Arbeit relevanten Sulfonamide sind in Tab. 1–8 dargestellt.

Sulfonamide wirken bakteriostatisch, bei hohen Konzentrationen auch bakteriozid. Sie besitzen eine Breitbandwirksamkeit gegenüber grampositiven und vielen gramnegativen Bakterien, Chlamydien und einigen Protozoenarten (Kokzidien). Alle Sulfonamide hemmen die Vermehrung von Bakterien, indem sie als kompetitive Inhibitoren (Antimetabolit) der 4-Aminobenzoessäure im Folsäuremetabolismus wirken. Die unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften der Derivate werden durch die verschiedenen Substituenten am Amid-Stickstoff und des damit verbundenen Bindungsvermögens an Plasmaproteine bestimmt (STAHLMANN und LODE 2001a). Die Inaktivierung der Sulfonamide erfolgt hauptsächlich durch Acetylierung oder auch Glucuronidierung der Amino-Gruppe. Die Elimination erfolgt überwiegend über die Nieren, zum Teil auch über Faeces und Gallen. Zwischen allen Sulfonamiden besteht komplette Kreuzresistenz (KROKER et al. 2002).

Tab. 1–8: Struktureigenschaften der Sulfonamide

Grundstruktur



Substanz	pK _{a1}	pK _{a2}	Struktur-R
SDZ	2,0 [†]	6,4 [‡]	
STZ	2,1 [†]	7,2 ^{‡, *}	
SMR	2,2 [†]	7,1 [†]	
SMZ	2,3 [†] 2,65 [*]	7,4 ^{‡, *}	
SMPD	2,1 [†]	6,7 [*] 7,0 [‡]	
SMX	1,8 [†]	5,7 [†]	
SDM	1,9 [†]	5,9 [†]	

[†] nach LIN et al. 1997

[‡] nach VREE und HEKSTER 1987

* nach MERCK 2001

Abk.: SDZ, Sulfadiazin; STZ, Sulfathiazol; SMR, Sulfamerazin; SMZ, Sulfamethazin;
SMPD, Sulfamethoxy-pyridazin; SMX, Sulfamethoxazol; SDM, Sulfadimethoxin

Sowohl das Verhalten der untersuchten Verbindungen in der Analytik als auch ihr Verhalten in der Umwelt wird unter anderem bestimmt durch ihre Größe und die physiko-chemischen Gleichgewichtskonstanten pK_a und $\log K_{ow}$ ($\log K_{ow} = -0,1-1,7$; THIELE-BRUHN 2003a). Es liegen zwei Dissoziationsgleichgewichte vor: K_{a1} ist dabei die Dissoziationskonstante für das Gleichgewicht zwischen protonierter Amino- N^4 -Gruppe und dem Sulfonamid als der neutralen konjugierten Base und K_{a2} die Dissoziationskonstante für das Gleichgewicht zwischen deprotonierter Amino- N^1 -Gruppe und dem Sulfonamid als der neutralen konjugierten Säure. Aufgrund des amphoteren Charakters ist die Löslichkeit in wässriger Lösung pH-Wert-abhängig. Das Löslichkeitsminimum liegt in etwa bei pH 3–5. Literaturdaten für die pK_a -Werte sind in Tab. 1–8 aufgeführt.

1.5.3 Tylosin

Tylosin (TYL) gehört zur Klasse der Makrolid-Anitbiotika. Strukturmerkmale dieser Substanzklasse sind ein 12-, 14-, 16- oder 17-gliedriger macrocyclischer Laktonring und ein bis drei Neutral- und Aminozucker, die mit dem Aglykon und untereinander glykosidisch verknüpft sind. Aufgrund der Aminozucker-Reste haben diese Verbindungen basischen Charakter (HORIE 1995).

Tylosin ist den 16-gliedrigen Makroliden zuzuordnen und setzt sich aus den vier Verbindungen Tylosin, Desmycosin, Macrosin und Relomycin (auch Tylosin A, B, C oder D) zusammen. Die Hauptkomponente Tylosin macht dabei etwa 80 % aus (HORIE 1995); die Struktur ist in Abb. 1–2 dargestellt.

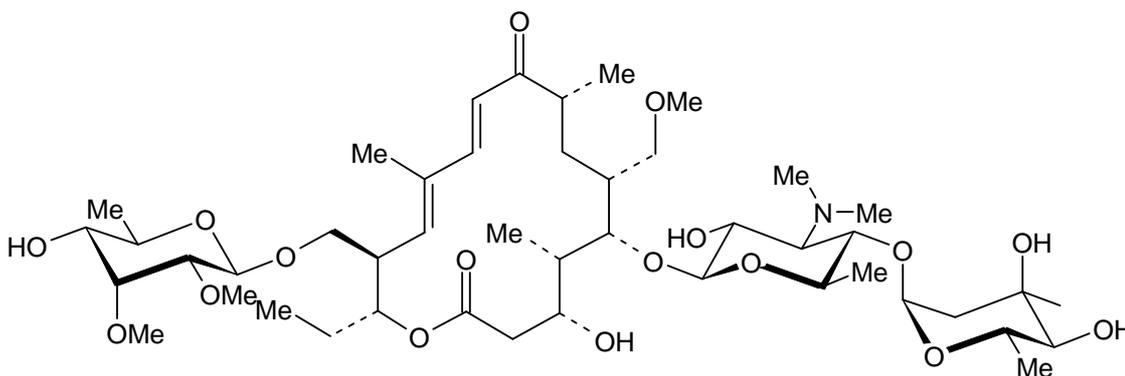


Abb. 1–2: Strukturformel von Tylosin

Tylosin zeigt eine spezifische UV-Absorption bei 282 nm und ist in wässrigen Lösungen von pH 5,5–7,5 stabil. Bei pH < 4 entsteht unter Abspaltung des Mycarosyl-Restes Desmycosin. Tylosin ist wasserlöslich und liegt aufgrund des pK_a von 7,73 der Aminogruppe, im Neutralen überwiegend als protoniertes, positiv geladenes Molekül vor. Tylosin in der kationischen Form vermag mit negativ geladenen Matrixbestandteilen wie z. B. Aminosäuren oder Proteinen, wechselwirken.

Wie alle Makrolide wirkt Tylosin in erster Linie bakteriostatisch. Es bindet an die ribosomale 50S-Untereinheit und hemmt dadurch die Proteinbiosynthese von Bakterien. Makrolid-Antibiotika sind wirksam gegen grampositive Bakterien, gegen gramnegative anaerobe Keime und gegen zellwandlose Bakterien wie Mykoplasmen. Wie alle Makrolid-Antibiotika, kann auch Tylosin von Stämmen von *Streptomyces* und *Micromonospora* isoliert werden (STAHLMANN und LODE 2001d). Tylosin fand eine breite Anwendung als Fütterungsarzneimittel zur Wachstumsförderung und wird auch zu therapeutischen Zwecken verabreicht. Seit 1999 darf es EU-weit laut Verordnung (EG) Nr. 2788/98 als antibiotischer Leistungsförderer nicht mehr verwendet werden (EG 1998).

1.5.4 Chloramphenicol

Chloramphenicol (CAP) gehört zur Gruppe der Fenicole und leitet sich von Phenylethylamin ab. Das 1947 durch Ehrlich (EHRlich et al. 1947) und unabhängig von ihm durch Gottlieb (GOTTLIEB et al. 1948) in *Streptomyces*-Nährböden entdeckte Chloramphenicol, enthält die in Naturstoffen seltenen Nitro- und Dichlormethyl-Gruppierungen (siehe Abb. 1–3). Nachdem es zunächst aus Kulturen von *Streptomyces venezuelae* gewonnen wurde, konnte es später als erstes Breitband-Antibiotikum synthetisch hergestellt (*Park-Davis Company*) werden.

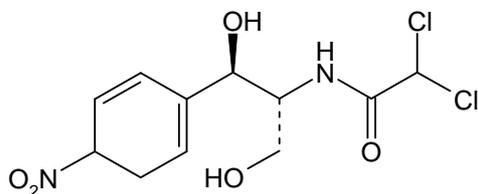


Abb. 1–3: Strukturformel von Chloramphenicol

Chloramphenicol wirkt in erster Linie bakteriostatisch und in hohen Dosen auch bakterizid. Es bindet an die ribosomale 50S-Untereinheit und inhibiert so die Proteinbiosynthese von Bakterien. Es besitzt eine breite Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Kokken und Bakterien (inklusive anaerobe Bakterien), Rickettsien, Mykoplasmen und Chlamydien (STAHLMANN und LODE 2001b). Chloramphenicol wurde wegen seiner hervorragenden antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften in der Tierproduktion häufig eingesetzt (KROKER et al. 2002). Seit 1994 ist der Einsatz als Tierarzneimittel für Lebensmittel liefernde Tiere in der europäischen Union verboten und gemäß der Ratsverordnung 2377/90 (EWG), Anhang IV gilt im Prinzip eine Null-Toleranz (EG 1990). Die therapeutische Einnahme von Chloramphenicol führt mit einer sehr geringen Inzidenz zu irreversiblen und tödlichen Knochenmarksaplasien. Das Auslösen der aplastischen Anämie beim Menschen ist dosisunabhängig. Genotoxizitätstests und Toxizitätsstudien führten bei der Beurteilung von Chloramphenicol dazu, dass kein ADI-Wert (*acceptable daily intake*) festgelegt werden konnte (JEFCA 1994) und folglich die Aufnahme in Anhang IV gemäß Artikel 5 der VO 2377/90 (EWG) erfolgte (EG 1990, EMEA 1996).

1.6 Analytik von Antibiotika in Umweltmatrices

Die Analytik von Spurenstoffen in Umweltproben setzt sich aus Probenahme, Extraktion und Anreicherung, chromatographische Trennung und Detektion zusammen. Für jeden dieser Schritte gibt es dabei verschiedene Methoden aus denen eine Auswahl getroffen werden muss. Diese hängt sowohl von den Eigenschaften der Zielanalyten als auch von der Probenbeschaffenheit ab.

Antibiotika stellen eine heterogene Gruppe von komplexen Molekülen mit verschiedenen funktionellen Gruppen dar. Die für Antibiotika typischen Molekulargewichte reichen von 250–1000 g/mol. In den verschiedenen Umweltmatrices liegen die meist polaren Stoffe als Kationen, Anionen und zwitterionische Verbindungen, seltener als Neutralverbindungen vor. Ihr Dissoziationsgrad ist abhängig von dem pH-Wert des Mediums und beeinflusst auch die Gleichgewichtslage bei der Verteilung in zweierlei Medien. Die meisten Substanzen reagieren sensitiv auf Basen (z. B. Tetracycline, Makrolide) und starke Säuren (Tetracycline). Substanzen wie beispielsweise die Tetracycline sind starke Komplexbildner oder haben eine hohe Bindungsaffinität zu Proteinen bzw. Silanolgruppen. Des Weiteren tendieren manche Antibiotika wie die Sulfonamide zur Photodegradation.

Bisher sind nur wenige leistungsfähige Analysemethoden für Antibiotika in verschiedenen Umweltmatrices beschrieben worden. Der Kenntnisstand für den Nachweis von Antibiotika in Lebensmitteln ist dabei ungleich größer. Gerade die eingesetzten Verfahren zur Probenaufarbeitung (z. B. SPE, LLE siehe Abschnitt 1.6.1) von Umweltproben leiten sich vor allem aus der Lebensmittelanalytik ab. Zur Identifizierung und Quantifizierung dagegen kommen hier die in der Spurenanalytik gängigen Verfahren der HPLC-MS und HPLC-MS/MS zur Anwendung. Als Bestätigungsverfahren sind diese den weniger spezifischen und sensitiven Methoden der HPLC-UV/-Fluoreszenz vorzuziehen. Als Screeningmethoden können auch hier die gängigen mikrobiologischen Methoden (z. B. Hemmstofftest) eingesetzt werden.

Die Kopplung von HPLC und mikrobiologischer Assay (MA) stellt eine besonders selektives Verfahren dar und ist zur Identifizierung von aktiven Metaboliten unerlässlich (SCZESNY et al. 2003).

1.6.1 Probenvorbereitung: Extraktion und Anreicherung

Gegenwärtig gelten in der Umweltanalytik modernste HPLC-MS und GC-MS-Verfahren als etabliert. Diese werden immer seltener mit den klassischen Probenvorbereitungsverfahren wie Flüssig/Flüssig-Extraktion (*liquid-liquid extraction*, LLE) oder Soxhlet-Extraktion kombiniert. Im analytischen Prozess nimmt die Probenvorbereitung eine wichtige Stellung ein. Daher wird in der noch jungen Disziplin der Umweltanalytik von Pharmakarückständen, heute verstärkt über die Anwendung von moderner Extraktions- und Anreicherungsverfahren wie die Festphasenextraktion (*solid-phase extraction*, SPE) für wässrige Proben oder die PLE (*pressurized liquid extraction*) für Feststoffe berichtet. Die SPME (*solid-phase microextraction*) zeichnet sich durch ihre breite Anwendbarkeit für gasförmige, flüssige und feste Proben aus (KOESTER 2003).

Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften bereiten die Tetracycline die größten Probleme bei der Probenvorbereitung. Tetracycline degradieren bei $\text{pH} < 2$, binden an Proteine in biologischen Matrices (DUGGAR 1948), chelatisieren mit mehrwertigen Metallionen und adsorbieren irreversibel an freie Silanolgruppen (OKA und PATTERSON 1995). Zur Extraktion werden demnach schwach saure Puffer meist in Kombination mit organischen Lösemitteln (Methanol, Ethylacetat) eingesetzt. Eine Komplexbildung kann durch Agenzien wie Oxalsäure, EDTA oder auch Citrat, das selbst mit Tetracyclinen schwache Komplexe bildet, unterbunden werden. In der

Lebensmittelanalytik wird häufig ein 0,1 M-EDTA-McIlvaine-Puffer (pH 4,0) verwandt (OKA et al. 2000).

Der kritische Punkt bei der Entwicklung von rückstandsanalytischen Methoden für die gleichermaßen selektive Extraktion von mehreren Sulfonamiden ist ihr amphoterer Charakter. Die pK_a -Werte einzelner Sulfonamide umspannen einen relativ großen Bereich von $pK_{a1} = 1,8-2,3$ und $pK_{a2} = 5,7-7,4$ (siehe Tab. 1–8). Die Löslichkeit in wässrigen und organischen Lösemittel ist vom Ladungszustand abhängig, deshalb können Multimethoden nie für alle Verbindungen optimiert werden.

Zur Extraktion von Antibiotika aus wässrigen Matrices ist die SPE, mit oder ohne vorherige Filtration (0,45 μm), die Methode der Wahl. An Sorbentien steht eine breite Palette zur Auswahl (THURMAN und MILLS 1998): Sie reicht von modifizierten Kieselgelen (z. B. C18) zur Adsorption unpolarerer Verbindungen, über Polymere auf der Basis von Poly-Styrol-Divinylbenzol zur Extraktion nichtionischer polarer Analyten, bis zu Ionenaustauscherharzen zur Extraktion ionischer Substanzen. Polymere Materialien weisen im Allgemeinen höhere Kapazitäten als modifizierte Kieselgele auf. Für die Sulfonamide und Makrolide können hier uneingeschränkt die RP- und Polymerphasen eingesetzt werden. Besonders effektiv ist die Extraktion von Sulfonamiden mittels kationischer Gemischt-Phasen (Polymerphasen mit Kationenaustauscherfunktion). Da Tetracycline irreversibel an Silanolgruppen binden, können modifizierte Kieselgelphasen nur nach Konditionierung mit EDTA oder Silylierungsagenzien effektiv verwendet werden (OKA und PATTERSON 1995; LINDSEY et al. 2001). Aus dem gleichen Grund ist daher von der Verwendung von Glas als Kartuschen-Material bei der Tetracyclinanalytik abzuraten. Die Gefahr der Adsorption von Tetracyclinen an Glasflächen kann durch Sintern der Oberflächen verringert werden (OEHME 1998). Da der Ladungszustand der Analyten die Wechselwirkung mit dem Sorbensmaterial beeinflusst, muss für eine effektive Extraktion der optimale pH-Wert mittels wässriger Puffer eingestellt werden.

Für komplexere Matrices wie Boden und Gülle ist die Probenvorbereitung meist aufwendiger. Die gängigsten Extraktionsverfahren sind dabei die LLE (HALLER et al. 2002; HAMSCHER et al. 2002; PFEIFER et al. 2002; DE LIGUORO et al. 2003; KAY et al. 2004) und die PLE (GOLET et al. 2002; SCHLÜSENER et al. 2003b; JACOBSEN et al. 2004). Zur Extraktion der Antibiotikarückstände werden wiederum vor allem schwach saure Puffer wie EDTA-McIlvaine-Puffer (KAY et al. 2004), McIlvaine-Puffer (DE LIGUORO et al. 2003; PFEIFER et al. 2002) oder Citratpuffer (HAMSCHER et al. 2002; JACOBSEN et al. 2004) in Kombination mit organischen Lösemitteln wie Methanol (DE LIGUORO et al. 2003; Kay et al. 2004) oder Ethyl-

acetat (HALLER et al. 2002; HAMSCHER et al. 2002; PFEIFER et al. 2002) eingesetzt. Die Auswahl des richtigen Extraktionsmittels erfolgt meist anhand empirischer Versuche. So sind z. B. Tetracycline in Methanol oder auch DMSO weitaus besser löslich (SALVATORE und KATZ 1993), mit Ethylacetat kann jedoch bei komplexen Matrices oft eine größere Extraktreinheit erreicht werden, da weitaus weniger geladene Matrixbestandteile mit extrahiert werden.

Bei den beschriebenen methanolischen Extraktionen schließt sich meist noch eine Aufreinigung über SPE an. Bei den eingesetzten Sorbensmaterialien werden relativ unspezifische (unpolare) Polymerphasen für die Multiklassenanalytik oder spezifische für die Einzelklassenanalytik angewendet (z. B. Metall-Chelat-Affinitäts-Chromatographie für Tetracycline [DE LIGUORO et al. 2003], Diol-SPE für Makrolide [SCHLÜSENER et al. 2003b]; Aminopropyl-SPE für Sulfonamide [PFEIFER et al. 2002]). Durch Kombination von Anionenaustauscherharzen (SAX) mit Polymerphasen können insbesondere saure Matrixbestandteile (v. a. Huminstoffe) selektiv entfernt werden (JACOBSEN et al. 2004; KAY et al. 2004).

1.6.2 Chromatographische Methoden

Für nicht flüchtige, mittelpolare bis polare und mittel- bis hochmolekulare Verbindungen ist die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) die Methode der Wahl zur selektiven Trennung von Multiklassen-Antibiotika. Die meisten Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Rückstandsanalytik der Pharmaka in Lebensmitteln und sind zum Teil in Übersichtsartikeln zusammengefasst (OKA und PATTERSON 1995; SCHENCK und CALLERY 1998; OKA et al. 2000). Die HPLC ist mit einer Vielzahl von Detektoren (UV, UV/VIS, DAD, FLD, MS) koppelbar, wobei heute zunehmend die massenspektrometrische Detektion angewendet wird. Bei den Trennmaterialien kann aus einer breiten Palette der gängigen *Reversed-Phase*-Materialien (C4–C18 u. ä.) gewählt werden. Säulenmaterialien und -dimensionen müssen den Anforderungen des analytischen Problems und des Detektors angepasst werden. Variabel sind neben dem Material der Durchmesser (1–4,6 mm) und die Länge der Säule (50–250 mm) sowie die Korngröße (3–10 μm). Die von den Säulen-dimensionen abhängigen Flussraten liegen bei 0,1–2 mL/min. Im Bereich der Umweltanalytik steht die parallele Bestimmung von vielen Verbindungen im Vordergrund. Die hierfür erforderlichen guten Trennleistungen gehen im Allgemeinen einher mit längeren Analysenzeiten.

1.6.3 Massenspektrometrische Detektion

In der Rückstandsanalytik bringt die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie oder der Tandemmassenspektrometrie enorme Vorteile aufgrund der großen Empfindlichkeit dieser Methoden und Selektivität mit der Möglichkeit zur Strukturabsicherung.

Die Mehrzahl der zur Analyse von Antibiotikarückständen eingesetzten HPLC-MS (KOLPIN et al. 2002; YANG und CARLSON 2003) und HPLC-MS/MS (HIRSCH et al. 1998; ZHU et al. 2001; HAMSCHER et al. 2002) Methoden nutzt dabei Quadrupol- (LINDSEY et al. 2001) oder Tripel-Quadrupol-Analysatoren (HIRSCH et al. 1998; PFEIFER et al. 2002; SCHLÜSENER et al. 2003b) sowie Ionenfallen-Analysatoren (ZHU et al. 2001; HAMSCHER et al. 2002; YANG et al. 2004). In der Empfindlichkeit sind Quadrupol-Massenspektrometer den Ionenfallen-Systemen überlegen (THERMO QUEST 2000) und werden daher oft bevorzugt eingesetzt. Die Ionenfallentechnik bietet dagegen die Möglichkeit zu MS^n -Experimenten, zur Aufzeichnung von *Full-Scan* MS/MS-Spektren und ist zudem weitaus kostengünstiger in der Anschaffung. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten unlängst, dass Ionenfallen HPLC-MS oder -MS/MS ebenso zur quantitativen Spurenanalytik eingesetzt werden kann, wie die Tripel-Quadrupol-Analysatoren.

Entscheidend für den routinemäßigen Einsatz der HPLC-MS-Kopplung war die Entwicklung von Ionenquellen, die bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure ionization*, API) arbeiten und daher als sanfte Ionisierungstechniken gelten. Die beiden etablierten API-Interfacetechniken sind die Elektrosprayionisierung (*electrospray ionization*, ESI) und die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Neuerdings ist eine dritte sanfte Ionisierungstechnik die Photoionisierung bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure photoionization*, APPI) auf dem Markt, die wie die APCI eher für nichtionische Verbindungen geeignet ist (RAUHA et al. 2001; KAUPPILA et al. 2002). Als Faustregel gilt, Analyten die in Lösung ionisch vorliegen werden, am besten mit ESI analysiert, während nicht ionische Analyten eher für APCI geeignet sind (REEMTSMA 2003). Bei den API-Interfacetechniken erfolgen die Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer sowie die Ionisierung der Analyten außerhalb des Hochvakuumbereichs. Das HPLC-Elutionsmittel wird vor dem Eintritt in das Spektrometer größtenteils verdampft, wodurch Eingriffe in das Hochvakuum in Folge von Verschmutzungen des Spektrometers weit gehend vermieden werden können.

Die Kombination der Elektrospray-Ionisierung mit der Massenspektrometrie wurde 1984 erstmals von YAMASHITA und FENN (1984) vollzogen, wofür *John Fenn* 2002 mit dem Nobelpreis geehrt wurde (FENN 2003). Die weitere Entwicklung, die Funktionsweise und den Stand der Technik fassen zahlreiche Übersichtsartikel zusammen (FENN 1990; KEBARLE und TANG 1993; GASKELL 1997, BRUINS 1998). Im Elektrospray-Interface werden ionisierte Analyte in drei wesentlichen Schritten aus der Lösung in die Gasphase überführt. Durch das Anlegen einer Hochspannung (3–5 kV) an der Edelstahl-Probenkapillare wird ein starkes elektrisches Feld ausgebildet (als Gegenelektrode dient die beheizte Eingangskapillare) und dadurch wird die elektrophoretische Ladungstrennung der Ionen in der austretenden Probenlösung bewirkt. Entsprechend des Vorzeichens der angelegten Spannung reichern sich die gleichartig geladenen Ionen an der Oberfläche der Probenlösung an und bilden einen so genannten „Taylor-Konus“ aus (BRUINS 1998), während die entgegengesetzt geladenen Lösemittelionen durch elektrochemische Oxidation an der Metallkapillare entfernt werden. Im zweiten Schritt werden dann aus dessen Spitze geladene Tröpfchen emittiert sobald die Coulombkräfte größer sind als die Oberflächenspannung und es entsteht ein feines Spray. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange bis nach noch nicht eindeutig geklärtem Mechanismus (*charge-residue model* oder *ion-evaporation concept*; KEBARLE 2000) freie Ionen gebildet werden, die dann in das Massenspektrometer eintreten.

Da es sich bei der ESI-Technik nicht um eine „aktive“ Ionisierung handelt, müssen die Analyten bereits in Lösung als Ionen vorliegen. Die Ionenausbeute bei der Elektrosprayionisierung wird entscheidend durch die Struktur des Analyten, die Zusammensetzung und Flussrate des Fließmittels sowie die Konzentration von Elektrolyten bzw. koeluvierender Matrixbestandteilen beeinflusst (KEBARLE und TANG 1993).

Der Hauptmechanismus der APCI sind dagegen Ionen-Molekül-Reaktionen zwischen den Analyten und einem Reaktivgas in der Gasphase. Ausgelöst wird der Prozess durch Elektronentransfer von einer Glimmentladung auf das Gas (N_2) oder auf leichter ionisierbare Lösungsmittel-Moleküle. Die Flussraten können höher sein als bei ESI, auch hier ist sowohl positive als auch negative Ionisierung möglich.

ESI und APCI liefern als so genannte weiche Ionisierungstechniken vor allem Quasimolekülionen $[M + H]^+$ und $[M - H]^-$ sowie Lösemittel- und Metall-Adduktionen. Während bei der APCI-Technik nur einfach geladene Quasimolekül- und Adduktionen gebildet werden können, treten bei der ESI Ionisierung auch mehrfachgeladene Zustände auf.

Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erlaubt neben der Bestimmung des Molekulargewichtes zusätzlich eine gezielte strukturelle Charakterisierung der Analyten. MS/MS ermöglicht die Aufnahme von Ionenchromatogrammen, die aus der Fragmentierung von nur einer ausgewählten Masse resultieren. Dadurch ist MS/MS-Detektion weitaus sensitiver und selektiver als die Detektion im *Full-Scan* Modus indem das Ionenchromatogramm eines ganzen Massenbereichs aufgezeichnet wird. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit genutzten Ionenfallenanalysator können verschiedene Scan-Experimente genutzt werden: *Single-Ion MS*, *SIM (selected ion monitoring)*, *Full-Scan MS/MS*, *SRM (selected reaction monitoring)* und speziell *MSⁿ*.

2 Problemstellung

In der Intensivtierhaltung werden Antibiotika in großen Mengen zur Therapie, Meta und Prophylaxe von Krankheiten sowie vereinzelt als antibiotische Futterzusatzstoffe verabreicht (GRÄFE 1992). Auch in der Aquakultur ist der Einsatz von Pharmaka (u. a. Antibiotika) von Relevanz (RÖMBKE et al. 1996). Viele dieser Wirkstoffe werden nach Applikation meist vollständig – metabolisiert oder unmetabolisiert – wieder ausgeschieden und gelangen so z. B. über die Gülle in die Umwelt. Zur Abschätzung des Umweltgefährdungspotenzials sind weit reichende Erkenntnisse über Vorkommen, Verteilung und Verhalten dieser pharmazeutischen Reststoffe nötig.

Motivation für diese Arbeit sind erste Untersuchungen von HAMSCHER et al., die am Beispiel der Tetracycline zeigten, dass Antibiotika über die Gülle in den Ackerboden gelangen (HAMSCHER et al. 2000) und dort auch relativ beständig sind (HAMSCHER et al. 2002). Ein Übergang dieser Substanzklasse in das Sicker- und Grundwasser wurde dagegen nicht nachgewiesen. Als Methode der Wahl wurden einfache, aber effektive Extraktionsverfahren in Kombination mit einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode eingesetzt.

Diese Arbeit sollte nunmehr, unter Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte, die bisherige Datenlage erweitern:

- Durch die Entwicklung von hochspezifischen Extraktionsverfahren in Verbindung mit einem selektiven und sensitiven Nachweisverfahren (HPLC-ESI-MS/MS) soll der Nachweis weiterer Substanzgruppen in verschiedenen Umweltmatrices ermöglicht werden.
- Unter Anwendung der neu entwickelten und bestehenden spurenanalytischen Methoden sollen die Untersuchungen der Pilotstudien fortgeführt und intensiviert werden.
- Die neu entwickelten und bestehenden spurenanalytischen Methoden sollen genutzt werden, um potenzielle Expositionsquellen und Verteilungspfade für Tierarzneimittel in der Umwelt zu untersuchen.

Zur Realisierung dieser Ziele müssen in einem ersten Schritt leistungsfähige Analysenverfahren zum Nachweis von Antibiotikarückständen im Spurenbereich in verschiedenen Umweltmatrices entwickelt und validiert werden. Für den Nachweis von Tetracyclinen und Tylosin in Sandboden, Gülle sowie Sicker- und Grundwasser beschrieb HAMSCHER (2002) eine HPLC-ESI-MS/MS-Methode. Es soll gezeigt werden, dass mit den matrixabhängigen Aufreinigungsverfahren auch Sulfonamide

selektiv extrahiert und nach Anpassung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode sensitiv detektiert werden können.

Für die Matrix Boden soll darüber hinaus die Robustheit der entwickelten Multi-methode überprüft und Faktoren ermittelt werden, die die Leistungsfähigkeit der Methode möglicherweise beeinträchtigen. In diesem Zusammenhang soll eine umfassende Validierung der analytischen Methoden zum Nachweis von Tetracyclinen, Sulfonamiden und Tylosin in verschiedenen Bodentypen durchgeführt werden, wobei insbesondere der Einfluss einzelner Bodenparameter auf die Wiederfindungsraten untersucht werden soll.

Nach der Entwicklung der leistungsfähigen Analysenverfahren soll in einem zweiten Schritt der Eintrag von Arzneimitteln aus der Intensivtierhaltung in die Umweltkompartimente Gülle – Boden – Grundwasser durch intensive und extensive Felduntersuchungen erforscht werden. Die Feldstudien werden in Kooperation mit dem *Niedersächsischen Landesamt für Bodenforschung (NLF)* auf Boden-Dauerbeobachtungs- und Screeningflächen aus dem Raum Weser-Ems durchgeführt. Ziel dieser Studien ist es, bisherige Einzeluntersuchungen und -nachweise von Tierarzneimittelrückständen in der Umwelt auf eine breitere Basis zu stellen. Damit sollen erstmalig Daten über eine Langzeitexposition erhoben und mögliche Unterschiede im Verhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden erkannt werden.

Ergänzend soll zusätzlich zur Intensivtierhaltung auch der Bereich der Aquakultur betrachtet werden. In den letzten Jahren gewinnt die kommerzielle Fischzucht auch in Deutschland zunehmend an Bedeutung. Auch dort können verabreichte Antibiotika in Wasser und Sediment übergehen. Deshalb sollen in einer Screeningstudie Aquakulturen in Niedersachsen auf die Belastung mit Antibiotikarückständen untersucht werden.

Als letzter Schritt sollen die vielfältigen analytischen Möglichkeiten genutzt werden, um neue Expositionsquellen für Tierarzneimittel aufzudecken. So beschränken sich die auf diesem Sektor durchgeführten Studien auf die terrestrische und aquatische Umwelt. Gleichzeitig wird heute, neben den gasförmigen Luftschadstoffen (z. B. NO₂, SO₂, CO) der schwebfähige Feinstaub (< 5 µm) als gesundheitsschädigend angesehen (HARTUNG 1997). Bislang ist ein möglicher Beitrag von luftgetragenen Stallstäuben zur Umweltexposition der Antibiotika nicht beschrieben worden. In einer Pilotstudie sollen deshalb Sedimentationsstäube aus einem Schweinemastbetrieb und einer Hühnerstallung auf Antibiotikarückstände mit HPLC-ESI-MS/MS untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden in verschiedenen Umweltmatrices

HAMSCHER et al. (2002) beschrieben ein sensitives und selektives HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Tetracyclinen und Tylosin (TYL) in Gülle (nicht anwendbar für TYL), Sandboden und Sicker- und Grundwasser. Bei Anwendung derselben Probenvorbereitung und nach Anpassung des HPLC-Gradienten sowie Modifikation der ESI-MS/MS-Methode sollte das beschriebene Verfahren auch auf die Substanzgruppe der Sulfonamidantibiotika übertragen werden. Neben den Leitsubstanzen Sulfadiazin (SDZ) und Sulfamethazin (SMZ) wurden weitere in der Veterinärmedizin relevante Einzelsubstanzen (STZ, SMR, SMPD, SDM) sowie mit Sulfamethoxazol (SMX) ein vor allem in der Humanmedizin eingesetzter Wirkstoff ausgewählt.

3.1.1 Extraktionsverfahren

Für die Extraktion von Sulfonamiden aus Gülle- und Bodenproben war die Probenvorbereitung zur Analyse der Tetracycline (siehe Abschnitt 5.5.2.1) ohne Änderungen anwendbar. Somit gelang es mit nur einem Aufarbeitungsverfahren zwei Substanzgruppen zu erfassen und der Analyse zugänglich zu machen. Bei der Aufarbeitung von Sicker- und Grundwasserproben musste dagegen die Festphasen-Extraktion (SPE) leicht modifiziert werden (Methode (b) in Abschnitt 5.5.3.1), womit zur Analyse beider Substanzgruppen je zwei Teilproben nötig waren. Als SPE-Material kamen ebenfalls *Bakerbond SDB-1*-Kartuschen zum Einsatz. In Analogie zur Tetracyclinanalytik wurde die Vorschrift einschließlich des ersten Waschschruttes übernommen. Zur vollständigen Elution vor allem der unpolaren Sulfonamide, folgte einer ersten Extraktion mit Methanol, eine zweite mit Acetonitril. Ein Vorelutionsschritt zur Entfernung von Matrixinterferenzen war hier nicht nötig.

3.1.2 HPLC-ESI-MS/MS

Die Kombination von HPLC mit einfacher Gradiententrennung und tandemmassenspektrometrischer Detektion ermöglichte eine sensitive und selektive Bestimmung der Sulfonamide. In Übereinstimmung mit der Tetracyclinmethode wurde die HPLC-

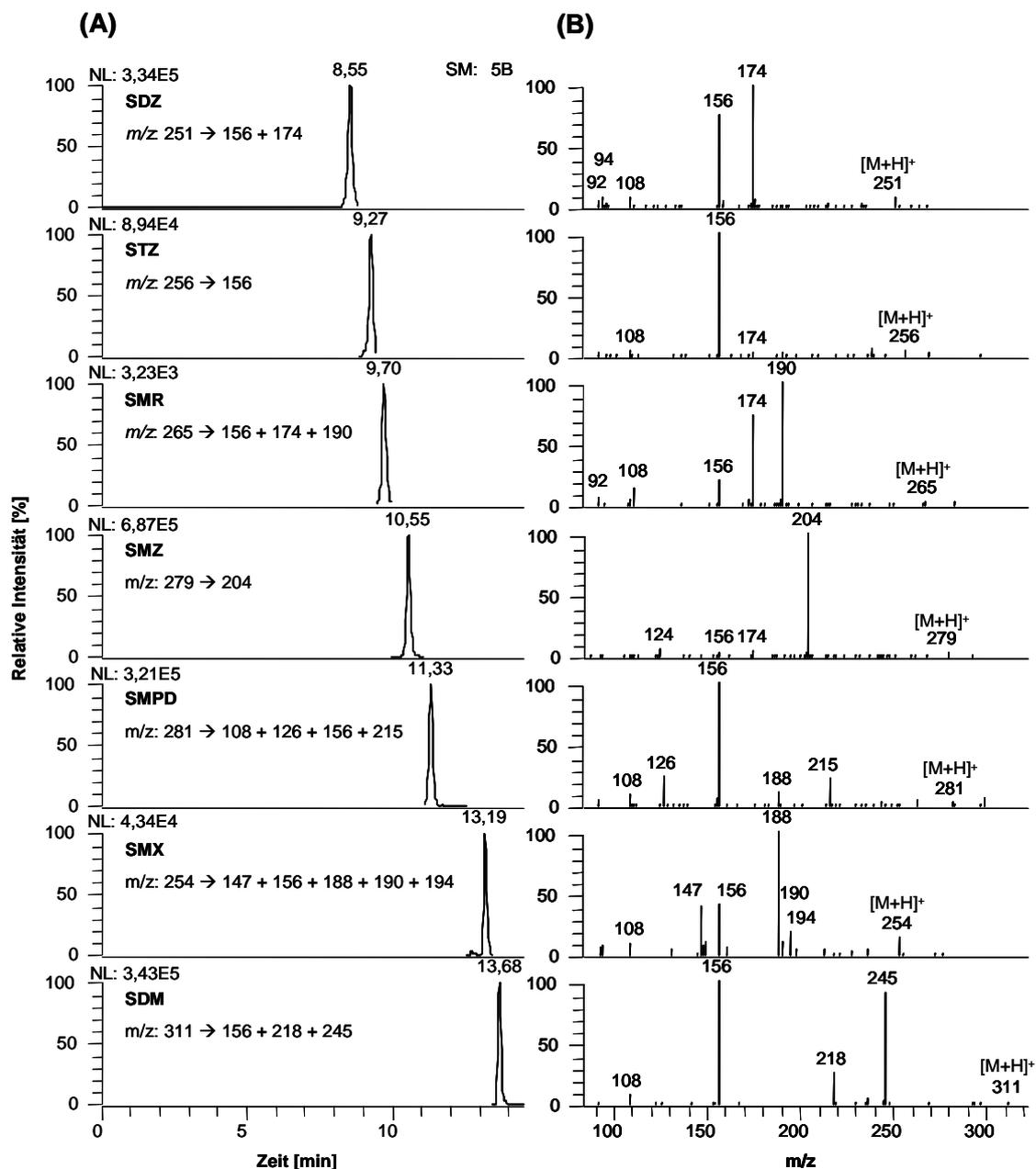


Abb. 3–1: Chromatogramme und Massenspektren bei der Analyse von sieben Sulfonamiden in einer methanolischen Standardlösung mit HPLC-ESI-MS/MS.

(A) Rekonstruierte Ionenchromatogramme einer methanolischen Standardlösung die absolut je 1 ng der Substanzen enthält.

(B) Dazugehörige MS/MS-Spektren dieser Substanzen.

Abk.: RT, retention time (Retentionszeit); SM, smoothing (Glättung); NL, normalized level (Normalisierungsgrad).

Trennsäule Waters Puresil C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1 mL/min, Gradient 2, MS/MS-Modus auf $m/z\ 251$ (SDZ), $m/z\ 256$ (STZ), $m/z\ 265$ (SMR), $m/z\ 279$ (SMZ), $m/z\ 281$ (SMPD), $m/z\ 254$ (SMX) und $m/z\ 311$ (SDM) (Methode 3).

Tab. 3–1: Grundkalibrierung der einzelnen Sulfonamide über den Arbeitsbereich von 0,1–10 ng* nach Bestimmung mit HPLC-ESI-MS/MS#

Analyt	a	b	r ²	S _{xy}	S _{x0}	V _{x0} [%]	VB _a
SDZ	196452,50	2182070,29	0,9950	627648,73	0,29	8,73	± 466313,61
STZ	-118537,91	1100890,76	0,9936	359473,90	0,33	9,94	± 267072,27
SMR	-329609,49	4915804,76	0,9988	667329,40	0,14	4,22	± 495794,50
SMZ	-172058,73	10339456,20	0,9982	1728838,58	0,17	5,12	± 1284446,12
SMPD	-269357,44	3588537,68	0,9976	713298,51	0,20	6,02	± 529947,38
SMX	-88267,01	676872,01	0,9896	282144,54	0,42	12,65	± 209620,18
SDM	-242211,91	7298668,47	0,9950	2100977,63	0,29	8,73	± 1560928,00

nach Methode 3, siehe Abschnitt 5.1.4.5

* Gesamtzahl der Kalibriermessungen n = 15

Abk.: a, Ordinatenabschnitt; b, Steigung der Geraden; S_{xy}, Reststandardabweichung; r², Bestimmtheitsmaß; S_{x0}, Verfahrensstandardabweichung; VB_a = S_a ± t (f; P%); VB_a, Vertrauensbereich des Ordinatenabschnitts a; S_a, Standardabweichung des Ordinatenabschnitts a; t, Quantile der t-Verteilung als Funktion der Freiheitsgrade f = n – 2 und Signifikanzniveau P = 95 %)

Trennung an einer „Puresil C18“-Säule mit demselben Fließmittelsystem durchgeführt. Mit dem flacheren Gradienten können so bei einer Gradientendauer von 14 min sieben Sulfonamide Basislinien getrennt werden (siehe Abb. 3–1).

Als Ionisierungs-Methoden wurde ESI⁺ ausgewählt, womit alle Sulfonamide empfindlich detektiert wurden. Die massenspektrometrische Identifizierung und Quantifizierung der Sulfonamide erfolgte im MS/MS-Modus unter Aufzeichnung der dazugehörigen Full-Scan-MS/MS-Spektren (*m/z* 85–320). Die MS/MS-Parameter wurden dabei so gewählt, dass das Molekülion in mindestens zwei charakteristische Produktionen fragmentiert. Die optimierten Parameter der MS/MS-Methode sind in Tab. 5–7 (siehe Abschnitt 5.4.4.) dargestellt.

Die Analyten können anhand der Retentionszeit und der charakteristischen Massenspektren eindeutig identifiziert werden. Zur Quantifizierung werden die rekonstruierten Ionenchromatogramme der intensivsten Fragmentationen zugrunde gelegt. In Abb. 3–1 sind typische chromatographische und massenspektrometrische Daten der sieben Sulfonamide zu sehen.

Die Linearität der Methode über den Arbeitsbereich von 0,1–10 ng wurde durch Injektion (8 µL) von fünf äquidistanten Kalibrierstandards in dreimaliger Serienmessung überprüft. Für alle Substanzen besteht über den gesamten Arbeitsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration (r² ≥ 0,99); der Vertrauensbereich des Achsenabschnittes schließt jeweils den Wert Null ein (siehe Tab. 3–1).

Tab. 3–2: Gerätepräzision bei der Bestimmung von Sulfonamiden mit HPLC-ESI-MS/MS*

Analyt	Anzahl [n]	Injektion [µL]	abs. Konz. [ng]	Signalintensität der Peakfläche [%]		
				MW	SA	CV [%]
SDZ	10	8	1,0	1746845	104240	6,0
STZ	10	8	1,0	1239971	108520	8,8
SMR	10	8	1,0	4846999	432935	8,9
SMZ	10	8	1,0	9497919	358555	3,8
SMPD	10	8	1,0	3778115	266312	7,0
SMX	10	8	1,0	897652	92069	10,3
SDM	10	8	1,0	9160028	698999	7,6

* nach Methode 3, siehe Abschnitt 5.1.4.5

Abk.: abs. Konz., absolute Konzentration; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient

Die Gerätepräzision des Verfahrens wurde durch 10fach-Injektion einer Kalibrierlösung auf dem Konzentrationsniveau von 1 ng pro 8 µL Injektionsvolumen überprüft. Die gerätebedingte Variation ist substanzabhängig und liegt zwischen 4 % und 11 % (siehe Tab. 3–2).

3.1.3 Methodvalidierung

Wie bereits gezeigt, gelang es, das von HAMSCHEER et al. (2002) beschriebene HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren mit leichten Modifikationen auf die Substanzgruppe der Sulfonamidantibiotika zu übertragen. Im Folgenden wurde die Gesamtmethode für die Matrices Gülle, Sandboden, Sicker- und Grundwasser validiert. Die Richtigkeit und Präzision wurde anhand von Wiederfindungsexperimenten überprüft. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NWG und BG) wurden auf Basis des Signal/Rausch-Verhältnisses (S/N) festgelegt (NWG: S/N = 3/1; BG: S/N = 6/1).

3.1.3.1 Sulfonamide in Gülle

Die mittleren Wiederfindungen, Standardabweichungen sowie Variationskoeffizienten aus den Aufstockungsexperimenten einer Gülle-Leermatrix mit Sulfonamid-Standardlösungen verschiedener Konzentrationen sind in Tab. 3–3 dargestellt. Im Konzentrationsbereich von 0,2–1,0 mg/kg wurden mittlere Wiederfindungen von 72–108 % erzielt, die mittleren Variationskoeffizienten waren durchweg kleiner 10 % (siehe auch Tab. 5–10, Abschnitt 5.5.1.4). Die Bestimmungsgrenzen in Gülle wurden für Sulfamethazin auf 0,02 mg/kg und für alle anderen Sulfonamide auf 0,05 mg/kg festgelegt. Die jeweiligen Nachweisgrenzen lagen bei 0,005 mg/kg bzw. 0,02 mg/kg.

Tab. 3–3: Wiederfindung von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxyipyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in Gülle

Analyt	Konz. [µg/L]	Anzahl [n]	WDF [%] (MW ± SA)	CV [%]
SDZ	0,2	8	86,4 ± 10,5	12,2
	1,0	8	93,5 ± 6,2	6,6
STZ	0,2	8	78,1 ± 7,4	9,5
	1,0	8	79,6 ± 5,7	7,2
SMR	0,2	8	84,1 ± 6,1	7,3
	1,0	8	87,4 ± 5,2	5,9
SMZ	0,2	8	88,7 ± 5,9	6,7
	1,0	8	92,6 ± 6,8	7,3
SMPD	0,2	8	103,0 ± 8,4	8,2
	1,0	8	95,5 ± 2,1	2,2
SMX	0,2	8	62,5 ± 4,5	7,2
	1,0	8	82,1 ± 2,0	2,4
SDM	0,2	8	100,1 ± 8,5	8,5
	1,0	8	116,2 ± 3,5	3,0

Abk.: Konz., Konzentration; WDF, Wiederfindung; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient

3.1.3.2 Sulfonamide in Sandboden

Die mittleren Wiederfindungen, Standardabweichungen sowie Variationskoeffizienten aus den Aufstockungsexperimenten eines rückstandsfreien Sandbodens mit Sulfonamid-Standardlösungen verschiedener Konzentrationen sind in Tab. 3–4 dargestellt. Im Konzentrationsbereich von 5,0–50 µg/kg lagen die mittleren Wiederfindung bei maximal 53 % und für Sulfamethazin bei 36 %. Die mittleren Variationskoeffizienten lagen zwischen 12 % und 18 % (siehe auch Tab. 5–9, Abschnitt 5.5.2.4). Die Bestimmungsgrenzen in Sandboden wurden für Sulfamethazin auf 2 µg/kg und für alle anderen Sulfonamide auf 5 µg/kg festgelegt. Die entsprechenden Nachweisgrenzen lagen bei 0,5 µg/kg bzw. 1 µg/kg.

Tab. 3–4: Wiederfindung von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in Sandboden

Analyt	Konz. [µg/L]	Anzahl [n]	WDF [%] (MW ± SA)	CV [%]
SDZ	5,0	8	41,9 ± 8,7	18,2
	10,0	8	46,4 ± 13,7	29,5
	50,0	8	37,1 ± 3,7	9,8
STZ	5,0	8	24,0 ± 4,6	19,2
	10,0	8	24,4 ± 4,5	18,4
	50,0	8	28,0 ± 3,4	12,1
SMR	5,0	8	41,2 ± 6,1	14,8
	10,0	8	36,2 ± 3,1	8,6
	50,0	8	37,9 ± 4,5	11,9
SMZ	5,0	8	33,6 ± 7,0	20,8
	10,0	8	36,1 ± 5,2	14,4
	50,0	8	39,5 ± 2,6	6,6
SMPD	5,0	8	35,1 ± 6,2	17,7
	10,0	8	32,6 ± 4,7	14,4
	50,0	8	35,7 ± 3,2	9,0
SMX	5,0	8	45,4 ± 10,7	23,6
	10,0	8	39,5 ± 8,2	20,8
	50,0	8	42,5 ± 3,9	9,2
SDM	5,0	8	48,6 ± 8,3	17,1
	10,0	8	58,5 ± 9,0	15,4
	50,0	8	50,4 ± 3,9	7,7

Abk.: Konz., Konzentration; WDF, Wiederfindung; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient

3.1.3.3 Sulfonamide in Sicker- und Grundwasser

Die mittleren Wiederfindungen (WDF) und Standardabweichungen (SA) sowie Variationskoeffizienten (CV) aus den Aufstockungsexperimenten in einer Leermatrix von matrixreichem Grundwasser mit Sulfonamid-Standardlösungen verschiedener Konzentrationen sind in Tab. 3–5 dargestellt. Im Konzentrationsbereich von 0,2–1,0 µg/L wurden mittlere Wiederfindungen von 54–93 % erzielt, mit mittleren Variationskoeffizienten von 11–21 % (siehe auch Tab. 5–10, Abschnitt 5.5.3.4). Die Bestimmungsgrenzen in matrixreichem Grundwasser wurden für Sulfamethazin auf 0,05 µg/L und für alle anderen Sulfonamide auf 0,1 µg/L festgelegt. Die entsprechenden Nachweisgrenzen lagen bei 0,01 µg/L bzw. 0,03 µg/L.

Tab. 3–5: Wiederfindung von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxy-pyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in matrixreichem Grundwasser

Analyt	Konz. [µg/L]	Anzahl [n]	WDF [%] (MW ± SA)	CV [%]
SDZ	0,2	8	66,8 ± 14,6	21,9
	1,0	8	64,5 ± 7,4	11,5
STZ	0,2	8	50,4 ± 9,1	18,1
	1,0	8	64,3 ± 14,8	23,0
SMR	0,2	8	56,0 ± 10,6	18,9
	1,0	8	74,3 ± 7,9	10,6
SMZ	0,2	8	60,2 ± 12,5	20,8
	1,0	8	84,9 ± 6,8	8,0
SMPD	0,2	8	38,0 ± 6,2	16,3
	1,0	8	70,1 ± 11,1	15,8
SMX	0,2	8	65,1 ± 23,1	35,5
	1,0	8	46,8 ± 8,4	17,9
SDM	0,2	8	95,8 ± 13,3	7,2
	1,0	8	89,5 ± 6,7	7,5

Abk.: Konz., Konzentration; WDF, Wiederfindung; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient

3.1.4 Anwendbarkeit auf Umweltproben

Wie die umfangreiche Validierung zeigt, kann die entwickelte HPLC-ESI-MS/MS-Methode angewendet werden um verschiedene Umweltproben auf das Vorkommen von Sulfonamiden zu untersuchen. Das erzielte Nachweisvermögen in den einzelnen Matrices ist empfindlich genug um umweltrelevante Konzentrationen detektieren zu können. Die hier beschriebene Methode wurde im Rahmen verschiedener Felduntersuchungen erfolgreich angewendet. Diese Ergebnisse sind unter Abschnitt 3.4 detailliert dargestellt.

3.2 Weiterentwicklung und Robustheit der analytischen Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Boden

Nachdem die in Abschnitt 5.5.2 beschriebene analytische Methode zum Nachweis von Antibiotika in Sandboden erfolgreich etabliert wurde, sollte diese sukzessive weiter entwickelt werden. Insbesondere die Robustheit der Analysenmethode sollte unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen (verschiedene HPLC-Trennsäulen, Matrices oder Probenvorbereitungen) geprüft werden. Neben einer Methodenoptimierung sollten durch die vorgenommenen Änderungen auch Faktoren ermittelt werden, die die Leistungsfähigkeit der Methode möglicherweise beeinträchtigen können.

3.2.1 HPLC-Trennung

Anhand der bestehenden Analysenmethode (HAMSCHEER et al. 2002) zur Trennung der Tetracycline sollten Faktoren ermittelt werden, die eine Verbesserung der Auflösung und/oder eine Verkürzung der Analysenzeit bewirken. Standardmäßig wurden die Analyten an einer RP-C18-Phase („Puresil C18“) mittels eines linearen Gradientensystems (Fließmittel A: 5 M Ammoniumacetat/Ameisensäure/Wasser (pH 2,5 [0,02:0,5:99,48; v/v/v]); Fließmittel B: Acetonitril; Gradient: 0–50 % B in 9 min, 50 % B für 1 min, 99 % B für 3 min, reäquilibrieren bei 100 % A für 12 min) bei einem Fluss von 1 mL/min getrennt. Bei dieser Standardmethode koeluierten Oxytetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin, dadurch sind zum Nachweis beider Substanzen je zwei HPLC-Läufe nötig (Methoden 1 und 2, Abschnitt 5.1.4.5). Bei der Trennungsoptimierung stand deshalb die Verbesserung der Auflösung der Peaks von Oxytetracyclin, 4-Epi-Tetracyclin und Tetracyclin im Vordergrund.

Durch den Einsatz neuartiger Säulenmaterialien wurde versucht, eine Verbesserung der Selektivität und damit der Auflösung zu erreichen. Die Säulen wurden mit verschiedenen Gradienten und teilweise unter isokratischen Bedingungen getestet. Alle zu testenden Trennsäulen wurden zunächst im Full-Scan-Modus mit dem Standardgradienten auf ihr Trennverhalten für Tetracycline (Gradient 1 in Tab. 5–1, siehe Abschnitt 5.1.4.2) hin untersucht und mit dem der Referenzsäule („Puresil C18“) verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 3–6 dargestellt. Mit keiner der getesteten Säulen konnte eine vollständige Auflösung von Oxytetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin erreicht werden, allerdings zeigten einige Säulen bei sonst gleichen Bedingungen eine vergleichbare oder leicht verbesserte Selektivität (v. a. „Hypersil Gold“ von *Thermo Hypersil*).

Tab. 3–6: Ergebnisse der Trennungsoptimierung für Gradiententrennung#

	Pure-sil™	Luna®	Luna®	Luna®	MetaSil AQ	Hyper-sil Gold	Hyper-carb®
Charakteristika							
Material	RP18	Phenyl-Hexyl	C8(2)	C18(2)	RP18	RP18	
Länge [mm]	150	150	150	150	150	150	100
i. D. [mm]	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
Teilchengröße [µm]	5	5	5	5		5	–
Porendurchmesser [Å]	120	100	100	100		175	–
endcapped?	ja	nein	ja	ja	ja*	ja	–
Wechselwirkung	RP	RP; π-π-WW	RP	RP	RP	RP	–
Bodenzahl	9000	9000	9000	9000	9000	9000	
Trennverhalten							
Kapazitätsfaktor k'							
4-Epi-TC	2,49	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	–
OTC	2,56	2,52	2,69	2,77	4,07	2,89	–
TC	2,71	2,66	2,87	2,95	3,01	3,10	–
CTC	3,19	3,12	3,33	3,49	3,53	3,67	–
TYL	3,73	3,63	3,75	4,04	4,02	n. a.	–
Selektivität α							
OTC/4-Epi-TC	1,019						–
4-Epi-TC/TC	1,089						–
OTC/TC	1,044	1,039	1,051	1,047	1,052	1,053	–
TC/CTC	1,128	1,126	1,117	1,137	1,130	1,139	–
CTC/TYL	1,130	1,125	1,097	1,123	1,119		–
Auflösung R							
OTC/4-Epi-TC	0,315						–
4-Epi-TC/TC	1,386						–
OTC/TC	0,731	0,643	0,849	0,793	0,874	0,906	–
TC/CTC	2,047	2,005	1,915	2,219	2,122	2,279	–
CTC/TYL	2,156	2,068	1,653	2,076	2,029		–
Anwendbarkeit	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein

nach Gradient 1 in Tab. 5–1, siehe Abschnitt 5.1.4.2; getestete Trennsäule „Polaris C18-A“ ist hier nicht aufgeführt, da nur isokratische Trennung möglich

* polares Endcapping

** polares Embedding

Abk.: n. a., nicht analysiert

Die einzige Säule mit deutlich verbesserter Auflösung war die „Polaris C18-A“ (Varian, siehe Abschnitt 5.1.4.3) allerdings nur unter isokratischen Bedingungen (Fließmittel A/B (82:18; v/v). Daher wurde diese Säule hier nicht mit in die Gegenüberstellung mit einbezogen.

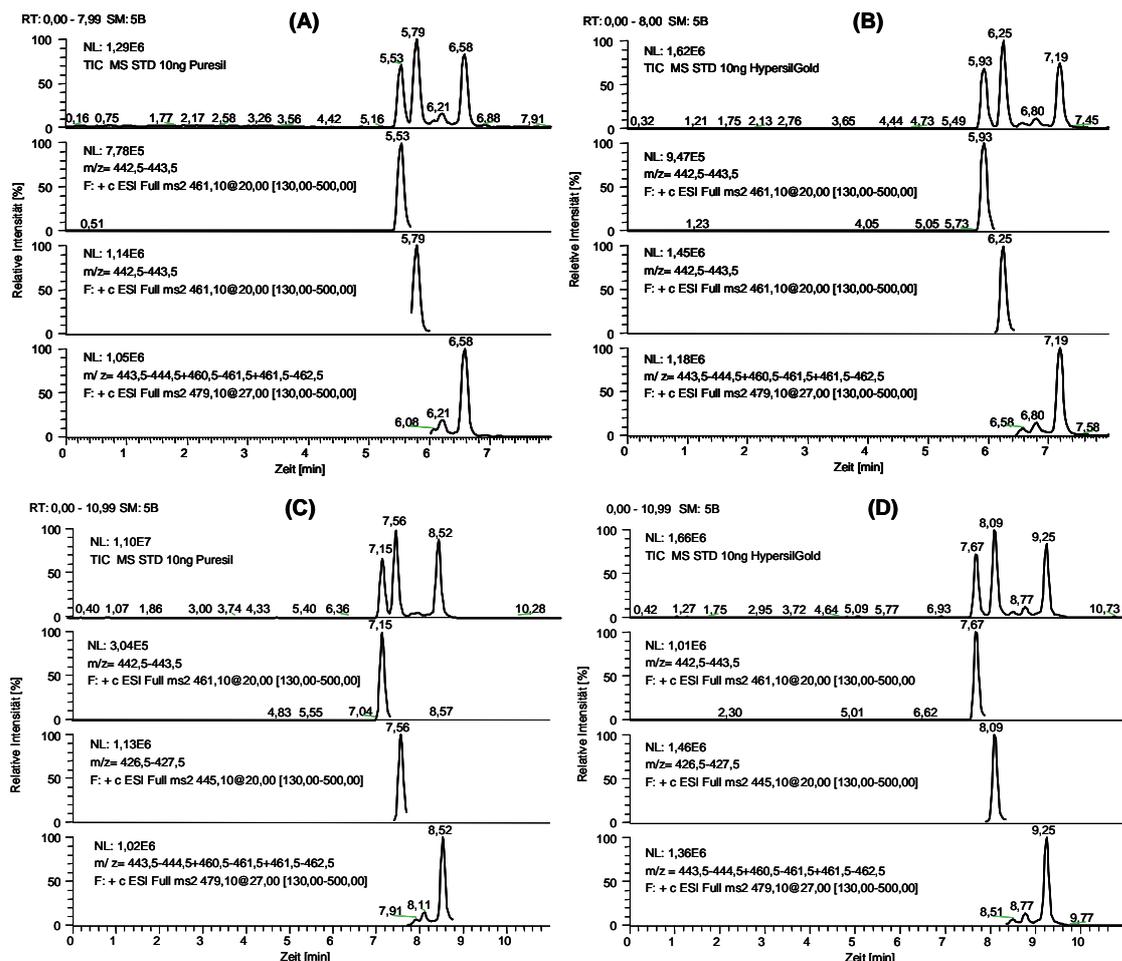


Abb. 3–2: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramme einer Tetracyclin-Standardlösung, mit einer injizierten Konzentration von 10 ng, bei verschiedenen Flussraten und Trennsäulen.

(A) Trennsäule *Waters* „Puresil C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1,5 mL/min, Gradient 3, MS/MS-Modus auf m/z 461 (OTC), m/z 445 (TC), m/z 479 (CTC).

(B) Trennsäule *Thermo Hypersil* „Hypersil Gold C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1,5 mL/min, Gradient 3, MS/MS-Modus auf m/z 461 (OTC), m/z 445 (TC), m/z 479 (CTC).

(C) Trennsäule *Waters* „Puresil C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1,0 mL/min, Gradient 1, MS/MS-Modus auf m/z 461 (OTC), m/z 445 (TC), m/z 479 (CTC).

(D) Trennsäule *Thermo Hypersil* „Hypersil Gold C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1,0 mL/min, Gradient 1, MS/MS-Modus auf m/z 461 (OTC), m/z 445 (TC), m/z 479 (CTC).

Um eine Verkürzung der Analysenzeit zu erzielen, wurden verschiedene Flussraten von 1–2 mL/min getestet. Die Versuche wurden mit der Referenzsäule und der Säule „Hypersil Gold“ (*Thermo Hypersil*) durchgeführt. Bei beiden Säulen kann mit einer Erhöhung der Flussrate auf 1,5 mL/min und angepasstem Gradienten (Gradient 3 in Tab. 5–1, siehe Abschnitt 5.1.4.2), bei nahezu gleicher Auflösung, eine Verkürzung der Analysenzeit um ungefähr 30 % bewirkt werden (siehe Abb. 3–2).

3.2.2 Probenvorbereitung

Im Rahmen der Probenvorbereitung wurde der Einfluss der nachstehenden Parameter auf die Extraktionsausbeute überprüft: pH-Wert des Extraktionsmittels, Temperatur, Ultraschall, Zusatz von Komplexbildnern. Für die im Folgenden aufgeführten Versuche wurden Bodenmatrices mit originären Tetracyclinrückständen (60–120 µg/kg, *BDF01*) verwendet. Sulfamethazin lag in diesen Proben nur in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze vor.

3.2.2.1 Einfluß des pH-Wertes des Citratpuffers auf die Extrahierbarkeit von Tetracyclin

Für die von HAMSCHEER et al. (2002) beschriebene Methode zur Extraktion von Tetracyclinen aus Sandboden, mit der Verwendung eines hoch molaren, schwach sauren Citratpuffers (1 M; pH 4,7), wurden bereits im Zuge der Methodenentwicklung (SCZESNY 2001) mehrere wässrige Puffersysteme getestet. Hierbei zeigte sich, dass durch Absenken des pH-Wertes auf 4,0 bzw. 3,0 im Vergleich zur optimierten Methode 60 % weniger Tetracyclin bzw. keines mehr nachweisbar war.

Um die Robustheit der Methode bzgl. pH-Wert-Schwankungen beim Extraktionspuffer weiter zu überprüfen wurde die Standardmethode im Vergleich zur Verwendung von Citratpuffern von pH 4,3, 5,0 und 6,0 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Modellversuche zeigten (siehe Tab. 3–7), dass die absoluten Wiederfindungen für Tetracyclin in einem pH-Wert-Bereich von 4,7–5,0 vergleichbar sind. Für pH-Werte von 4,3 und 6,0 verschlechtern sie sich hingegen signifikant. Somit sind pH-Wert-Schwankungen $\leq 0,3$ tolerierbar und haben keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute.

Tab. 3–7: Vergleich der Extraktionsraten für Tetracyclin bei Verwendung von Citratpuffern verschiedener pH-Werte

Die Messreihen für die variierten pH-Werte wurden mittels t-Test durch Vergleich mit dem Sollwert der Standardmethode bei einem Signifikanzniveau von 95 % überprüft

Nr.	Serie		
	pH = 5,0	pH = 6,0	pH = 4,3
Messwert [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
1	55,8	36,1	41,2
2	46,2	35,3	38,6
3	46,0	40,2	30,6
4	68,1	39,2	41,8
Anzahl der Werte (n)	4	4	4
Mittelwert (MW)	54,0	37,7	38,0
Standardabweichung (SA)	10,4	2,4	5,2
Prüfwert*	0,944	9,679	4,289
Tabellenwert (P = 95 %)	3,182	3,182	3,182
Mittelwerte vergleichbar?	ja	nein	nein

*Prüfwert; $PW = \frac{|MW - SW|}{SA} \cdot \sqrt{n}$; Sollwert (SW) bei pH 4,7, SW = 49,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$

3.2.2.2 Einfluss von Ultraschall auf die Extraktionsrate von Sulfamethazin und Tetracyclin

In Modellversuchen wurde die Standardextraktion für Sandboden (siehe Abschnitt 5.5.2.1) mit zusätzlicher Ultraschallbehandlung beim Extraktionsschritt durchgeführt. Nach der Vorextraktion mit Citratpuffer wurden die Proben 1 min bzw. 10 min mit Ultraschall behandelt, das Verfahren standardgemäß fortgeführt, analysiert und anschließend mit dem Analyseergebnis einer nicht modifizierten Probe verglichen.

Die Ergebnisse dieser Modellversuche sind in Tab. 3–8 dargestellt. Für Sulfamethazin, das in diesen originären Bodenproben stets zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze vorlag, konnte keine Veränderung der Extraktionsrate quantifiziert werden. Auch für Tetracyclin konnte keine signifikante Abweichung festgestellt werden.

3.2.2.3 Einfluss der Temperatur

Anhand von Modellversuchen wurde die Auswirkung einer Hitzebehandlung bei Bodenproben vor deren Extraktion auf das Nachweisvermögen der Sulfonamide und Tetracycline getestet. Die Bodenproben mit originären Rückständen wurden hierzu mindestens 12 h auf 100 °C im Trockenschrank erhitzt, analysiert und anschließend mit dem Analyseergebnis einer nicht erhitzten Probe verglichen.

Tab. 3–8: Vergleich der Extraktionsraten für Tetracyclin und Sulfamethazin bei verschiedenen Probenaufarbeitungen

Behandlung	SMZ	4-Epi-TC	TC	ATC	ΣTC
	Konzentration [µg/kg]				
keine	< BG	10,9	55,2	8,0	74,1
	Veränderung [%]				
1 min Ultraschall	< BG	37 ± 9	14 ± 2	42 ± 20	20 ± 4
10 min Ultraschall	< BG	17 ± 4	-22 ± 2	-15 ± 2	-15 ± 2
12 h bei 100 °C	< BG	-65 ± 19	-61 ± 7	371 ± 90	-13 ± 2

Abk.: ΣTC, Summe aller Tetracyclinderivate

Die Ergebnisse dieser Modellversuche sind in Tab. 3–8 dargestellt. Für Sulfamethazin, das in diesen originären Bodenproben stets zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze vorlag, konnte kein Substanzverlust quantifiziert werden. Sulfamethazin war sowohl vor der Hitzebehandlung als auch nach dieser stets nachweisbar. Der Anteil Tetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin verringert sich dagegen um je 60 %, wobei gleichzeitig ein Konzentrationsanstieg beim Anhydrotetracyclin um das 4,7-fache zu verzeichnen ist. Die Gesamtkonzentration an Tetracyclin bleibt dabei nahezu gleich, d. h. die Hitzebehandlung führt zwar zu einer Degradation von Tetracyclin zu Anhydrotetracyclin, aber ohne erkennbaren Substanzverlust.

3.2.2.4 Enzymatischer Aufschluss

Tetracycline neigen in biologischen Matrices an Proteine zu binden (DUGGAR 1984). Sulfamethazin bildet in Böden möglicherweise nicht extrahierbare Rückstände (*bound residues*) (LANGHAMMER et al. 1989; LANGHAMMER et al. 1990). Daher wurden die Bodenmatrix mit eiweiß- (Pepsin) und stärke-spaltenden (Amylasen) Waschmittelenzymen hydrolysiert und anschließend mit der Standardmethode extrahiert. Eine Spaltung von nicht extrahierbaren Tetracyclin- und Sulfamethazin-Rückständen konnte mittels der eingesetzten Enzyme nicht erreicht werden. Die vorhergehende Hydrolyse blieb ohne Auswirkung auf die absolute Extraktionsrate.

3.2.2.5 Zusatz von Ca²⁺-Ionen und Huminsäure

Tetracycline tendieren zur Chelatbildung in Anwesenheit von mehrwertigen Kationen, vornehmlich Ca²⁺, Mg²⁺, Fe^{2+/3+} und Al³⁺ (DÜRCKHEIMER 1975). Im Boden zahlreich vorhandene Metall-Ionen könnten Tetracycline komplex binden und somit immobilisieren. In einem Modellversuch sollte der Einfluss einer möglichen Chelatisierung auf die Extraktionsrate anhand von Ca²⁺-Ionen untersucht werden.

Huminsäuren, als Bestandteil der organischen Bodensubstanz, können mit ihren vielseitigen funktionellen Gruppen sowohl mit hydrophoben Verbindungen wechselwirken, als auch hydrophile Komplexe bilden (ZIECHMANN 1996). Die Keto-Enol-Strukturen der Tetracycline könnten beispielsweise mit Carboxyl-Funktionen der Huminsäuren wechselwirken und somit durch Ausbildung von Wasserstoff-Brücken stärker an die Bodenmatrix gebunden werden (LINDSEY 2001; AGA 2003).

Diese beiden Hypothesen wurden anhand von Modellversuchen überprüft. Schon geringe Zusätze von Humussäure bzw. Ca^{2+} -Ionen (als Chordisalz) zu Boden (0,01 %; w/w) vor der Extraktion bewirkten signifikante Wiederfindungsverluste.

3.2.3 Anwendbarkeit der Gesamtmethode in Abhängigkeit vom Bodentyp

Wie bereits beschrieben, wurde das Nachweisverfahren für Tetracycline und Tylosin in Sandboden bereits erfolgreich auf die Sulfonamide übertragen. Die Anwendbarkeit der Methode zielte darauf ab, diese Antibiotika in Ackerböden, die alle als Sandböden klassifiziert werden können, nachzuweisen (siehe Abschnitt 3.4.2). Daher beschränkten sich alle durchgeführten Validierungen auf einen sandigen Boden.

Durch Änderung des Bodentyps sollte anhand von Wiederfindungsexperimenten die Robustheit der Methode bezüglich der Bodenmatrix überprüft werden. Die verwendeten Referenzböden sind in Tab. 3–9 aufgeführt. Im Rahmen des Forschungsvorhabens *Erprobung und Vorbereitung einer praktischen Nutzung ökotoxikologischer Testsysteme (ERNTE)* wurden diese zehn Böden als Referenzböden ausgewählt und im Zuge dessen umfangreich charakterisiert. Acht der Böden entstammen von Acker-, Wiesen- und Waldflächen Deutschlands und sind von ihren Eigenschaften her repräsentativ für Mitteleuropa. Zusätzlich wurde ein künstlicher Boden (nach OECD) und ein in Deutschland verwendeter Standardboden (LUFA 2.2) verwendet. Die Böden weisen Schluff-Gehalte von 11,6–83,0 % und Gehalte an organischen Kohlenstoff (C_{org}) von 0,9–5,1 auf. Die pH-Werte der Böden reichen von pH 3,1–7,4.

Die Böden wurden zunächst in Doppelbestimmung extrahiert (siehe Abschnitt 5.5.2.1) und mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methoden 1, 2 und 3, siehe Abschnitt 5.1.4.5) auf Antibiotika analysiert. Es konnten keine Rückstände für Tetracycline, Sulfonamide und Tylosin oberhalb der jeweiligen Nachweisgrenzen detektiert werden. Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die Böden auf fünf Niveaus von 2,5–250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mit den entsprechenden Antibiotika dotiert und nach der Standardmethode analysiert. Die Wiederfindungsrate für jede der elf untersuchten Substanzen in den

Tab. 3–9: Bodenparameter der getesteten Bodenmatrices

Bodenproben und Untersuchungsdaten wurden von Dr. Jörg Römbke,
ECT Ökotoxikologie GmbH, Flörsheim/Main zur Verfügung gestellt

Boden	Bodenart	Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]	C _{org} [%]	pH
BDW	Lu	13,6	56,7	29,7	2,3	4,9
BWZ	Sl2	81,3	13,6	5,1	1,5	3,8
Eso5	Su2	83,8	11,6	4,7	5,1	3,1
GG 1	Su2	80,5	15,7	3,8	0,9	5,5
HAG	Lu	12,8	62,3	24,9	2,6	5,2
LUFA 2.2	Sl2	76,9	16,3	6,8	2,7	6,1
OECD	Sl2	75,4	16,6	8,0	4,7	6,0
SBG	Lt2	27,0	47,1	25,9	3,4	5,8
SCA	Ut4	7,8	69,7	22,5	2,2	7,4
SOE	Ut3	2,0	83,0	15,0	1,6	6,6

zehn Bodentypen wurde anhand der Wiederfindungsfunktion ermittelt. Als Bestimmungsgrenze wurde der zweitniedrigste Kalibrierpunkt festgesetzt. Die Wiederfindungsraten für Tetracycline, Tylosin und Sulfonamide sind in Tab. 3–10 und Tab. 3–11 dargestellt. Aus diesen Untersuchungen ist abzuleiten, dass die Methode mit den meisten untersuchten Bodentypen, die ein breites Spektrum abdecken, zuverlässig und empfindlich arbeitet. Nur für Tylosin haben die Bodenparameter einen entscheidenden Einfluss auf die Wiederfindungsraten. So liefert die Methode nur für vier Böden verlässliche Ergebnisse. Nachdem die Wiederfindungsraten für alle Sulfonamide in allen Böden vergleichbar sind, lassen sich dagegen bei der Tetracyclinanalytik wiederum größere Unterschiede in Abhängigkeit vom Bodentyp feststellen. Insofern müssen vor der Übertragung der Methode auf andere Bodentypen individuelle Wiederfindungsraten bestimmt werden.

Nachdem die Wiederfindungen für insgesamt elf Substanzen in zehn verschiedenen Böden ermittelt waren, sollte untersucht werden, ob die substanzspezifischen und matrixabhängigen Wiederfindungsraten mit den verschiedenen Bodenparametern (siehe Tab. 3–9) korrelieren. Hierzu wurde zunächst eine bivariate Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Korrelation sind in Tab. 3–12 dargestellt. Insgesamt ergaben sich für fünf Variable signifikante Korrelationen.

In einem zweiten Schritt wurde für diese signifikanten Beziehungen eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt (siehe Abb. 3–3). Hierzu wurde als abhängige Variable jeweils die substanzspezifischen Wiederfindung gewählt und der Einfluss der Bodenparameter durch schrittweise Auswahl der Einflussvariablen (Kriterien: Wahrscheinlichkeit von F-Wert für Aufnahme $\leq 0,05$; Wahrscheinlichkeit von F-Wert für

Ausschluss $\geq 0,1$) auf das Regressionsmodell überprüft. Die Signifikanz einer Einflussvariablen wurde schließlich mit dem ANOVA-Test überprüft.

Tab. 3–10: Wiederfindungsraten \pm Vertrauensbereiche* der untersuchten Tetracycline berechnet aus den Wiederfindungsfunktionen# für die Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ §.

Boden	WDF [%]			
	OTC	TC	CTC	TYL
BDW	39,8 \pm 1,5	16,2 \pm 0,8	36,6 \pm 2,7	< 1
BWZ	52,1 \pm 4,9	35,6 \pm 2,7	87,5 \pm 19,3	51,0 \pm 11,2
Eso5	28,6 \pm 2,9	16,9 \pm 1,7	31,3 \pm 1,8	46,7 \pm 1,1
GGI	55,3 \pm 7,0	25,3 \pm 0,5	51,3 \pm 1,8	19,0 \pm 0,5
HAG	55,6 \pm 2,8	36,7 \pm 1,2	52,9 \pm 2,9	< 5
LUFA 2.2	64,5 \pm 6,6	49,1 \pm 1,8	58,3 \pm 4,5	48,2 \pm 3,2
OECD	32,9 \pm 3,6	25,3 \pm 0,5	51,3 \pm 1,8	19,0 \pm 0,5
SBG	46,9 \pm 1,8	32,8 \pm 1,6	43,8 \pm 1,2	48,5 \pm 2,5
SCA	34,1 \pm 0,5	19,7 \pm 2,0	27,7 \pm 1,3	< 1
SOE	62,3 \pm 5,3	39,7 \pm 1,5	80,2 \pm 9,2	< 5

* Vertrauensbereich berechnet auf der Basis eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$ und einer Anzahl von $n - 2$ Freiheitsgraden

lineare Regression $x_{\text{gefunden}} = a + x_{\text{zugesetzt}} \cdot b$ (Achsenabschnitt a, Steigung b)

§ drei unabhängige Bestimmungen für jede Konzentration ($n = 12$)

Tab. 3–11: Wiederfindungsraten \pm Vertrauensbereiche* der untersuchten Sulfonamide berechnet aus den Wiederfindungsfunktionen# für die Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ §

Boden	WDF [%]						
	SDZ	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SMX	SDM
BDW	62,5 \pm 7,1	53,2 \pm 5,8	60,9 \pm 9,0	62,5 \pm 9,3	60,3 \pm 10,7	49,5 \pm 4,8	61,1 \pm 9,3
BWZ	48,8 \pm 1,3	39,2 \pm 4,2	50,3 \pm 0,4	55,3 \pm 4,4	51,0 \pm 4,2	37,2 \pm 1,9	56,2 \pm 2,3
ESo5	62,1 \pm 6,1	47,6 \pm 7,1	55,0 \pm 4,7	48,7 \pm 5,5	49,6 \pm 4,1	45,3 \pm 3,6	61,5 \pm 3,3
GGI	55,2 \pm 6,9	41,9 \pm 7,9	53,8 \pm 8,4	69,2 \pm 17,1	64,8 \pm 19,6	35,1 \pm 4,3	51,3 \pm 7,7
HAG	65,8 \pm 9,6	61,4 \pm 14,2	60,4 \pm 3,5	64,2 \pm 7,2	69,6 \pm 11,4	48,9 \pm 4,8	52,2 \pm 2,6
St 2.2	48,8 \pm 2,6	43,4 \pm 2,0	61,8 \pm 5,2	47,2 \pm 1,5	37,1 \pm 1,5	46,5 \pm 4,9	45,0 \pm 1,9
OECD	55,2 \pm 6,9	41,9 \pm 7,9	53,8 \pm 8,4	51,2 \pm 7,0	45,8 \pm 6,2	35,1 \pm 4,3	51,3 \pm 7,7
SBG	56,7 \pm 3,6	45,4 \pm 5,7	57,8 \pm 4,8	61,0 \pm 7,4	53,1 \pm 5,4	61,1 \pm 3,2	58,6 \pm 4,8
SCA	41,4 \pm 2,9	33,0 \pm 6,7	43,9 \pm 6,9	52,9 \pm 8,8	34,1 \pm 3,1	36,8 \pm 1,6	49,4 \pm 2,8
SOE	65,8 \pm 12,7	51,4 \pm 11,0	56,4 \pm 7,8	58,9 \pm 10,3	50,6 \pm 8,5	57,6 \pm 13,1	69,5 \pm 12,9

* Vertrauensbereich berechnet auf der Basis eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$ und einer Anzahl von $n - 2$ Freiheitsgraden

lineare Regression $x_{\text{gefunden}} = a + x_{\text{zugesetzt}} \cdot b$ (Achsenabschnitt a, Steigung b)

§ drei unabhängige Bestimmungen für jede Konzentration ($n = 12$)

Tab. 3-12: Korrelation der substanzspezifischen Wiederfindungsraten mit verschiedenen Bodenparametern

Variable	Statistik	Anzahl [n]	OTC	TC	CTC	SDZ	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SMX	SDM	TYL
pH	Korrelation nach Pearson	10	0,239	0,244	-0,058	-0,329	-0,255	-0,193	0,054	-0,386	0,070	-0,265	-0,505
	Signifikanz (2-seitig)		0,506	0,496	0,873	0,353	0,477	0,594	0,882	0,270	0,848	0,460	0,136
C _{org}	Korrelation nach Pearson	10	-0,657*	-0,291	-0,466	0,172	0,076	0,127	-0,584	-0,242	0,060	0,008	0,300
	Signifikanz (2-seitig)		0,039	0,415	0,175	0,635	0,835	0,726	0,076	0,501	0,869	0,982	0,399
N _t	Korrelation nach Pearson	10	0,007	0,012	-0,419	0,408	0,586	0,569	0,197	0,233	0,785**	0,212	-0,111
	Signifikanz (2-seitig)		0,985	0,973	0,228	0,242	0,075	0,086	0,586	0,517	0,007	0,556	0,760
C/N	Korrelation nach Pearson	10	-0,471	-0,184	0,086	-0,164	-0,335	-0,277	-0,453	-0,253	-0,557	-0,192	0,198
	Signifikanz (2-seitig)		0,170	0,611	0,814	0,650	0,344	0,438	0,188	0,480	0,094	0,595	0,584
Sand	Korrelation nach Pearson	10	-0,081	0,037	0,148	-0,275	-0,385	-0,053	-0,363	-0,125	-0,557	-0,368	0,695*
	Signifikanz (2-seitig)		0,824	0,919	0,683	0,442	0,272	0,884	0,303	0,730	0,094	0,296	0,026
Schluff	Korrelation nach Pearson	10	0,143	0,017	-0,055	0,274	0,352	-0,005	0,334	0,082	0,528	0,408	-0,714*
	Signifikanz (2-seitig)		0,694	0,963	0,879	0,444	0,318	0,988	0,346	0,823	0,116	0,242	0,020
Ton	Korrelation nach Pearson	10	-0,099	-0,176	-0,372	0,233	0,408	0,203	0,381	0,222	0,541	0,199	-0,527
	Signifikanz (2-seitig)		0,786	0,626	0,289	0,518	0,241	0,574	0,278	0,538	0,106	0,582	0,118
KAK	Korrelation nach Pearson	9	-0,199	-0,126	-0,355	-0,020	0,115	-0,114	-0,018	-0,259	0,357	0,092	-0,657
	Signifikanz (2-seitig)		0,607	0,746	0,349	0,959	0,767	0,770	0,963	0,500	0,346	0,815	0,054
Na	Korrelation nach Pearson	9	-0,441	-0,396	-0,524	0,070	0,107	0,288	-0,423	-0,292	0,091	0,079	-0,132
	Signifikanz (2-seitig)		0,234	0,291	0,148	0,857	0,785	0,452	0,256	0,446	0,816	0,839	0,735
K	Korrelation nach Pearson	8	-0,583	-0,304	-0,620	-0,212	-0,195	-0,364	-0,011	-0,241	0,260	-0,062	-0,158
	Signifikanz (2-seitig)		0,129	0,464	0,101	0,614	0,644	0,375	0,980	0,565	0,534	0,883	0,709
Ca	Korrelation nach Pearson	9	-0,118	-0,055	-0,409	-0,286	-0,105	-0,216	-0,036	-0,372	0,147	-0,231	-0,605
	Signifikanz (2-seitig)		0,762	0,889	0,275	0,456	0,789	0,577	0,926	0,324	0,706	0,550	0,084
Mg	Korrelation nach Pearson	9	-0,199	-0,375	-0,282	0,406	0,538	0,324	0,343	0,359	0,209	0,244	-0,709*
	Signifikanz (2-seitig)		0,607	0,320	0,463	0,278	0,135	0,395	0,366	0,343	0,589	0,527	0,032
KAK _{ber}	Korrelation nach Pearson	10	-0,321	-0,257	-0,501	0,314	0,430	0,213	0,129	0,092	0,566	0,248	-0,444
	Signifikanz (2-seitig)		0,365	0,474	0,141	0,377	0,215	0,555	0,722	0,800	0,088	0,490	0,198

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant; ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

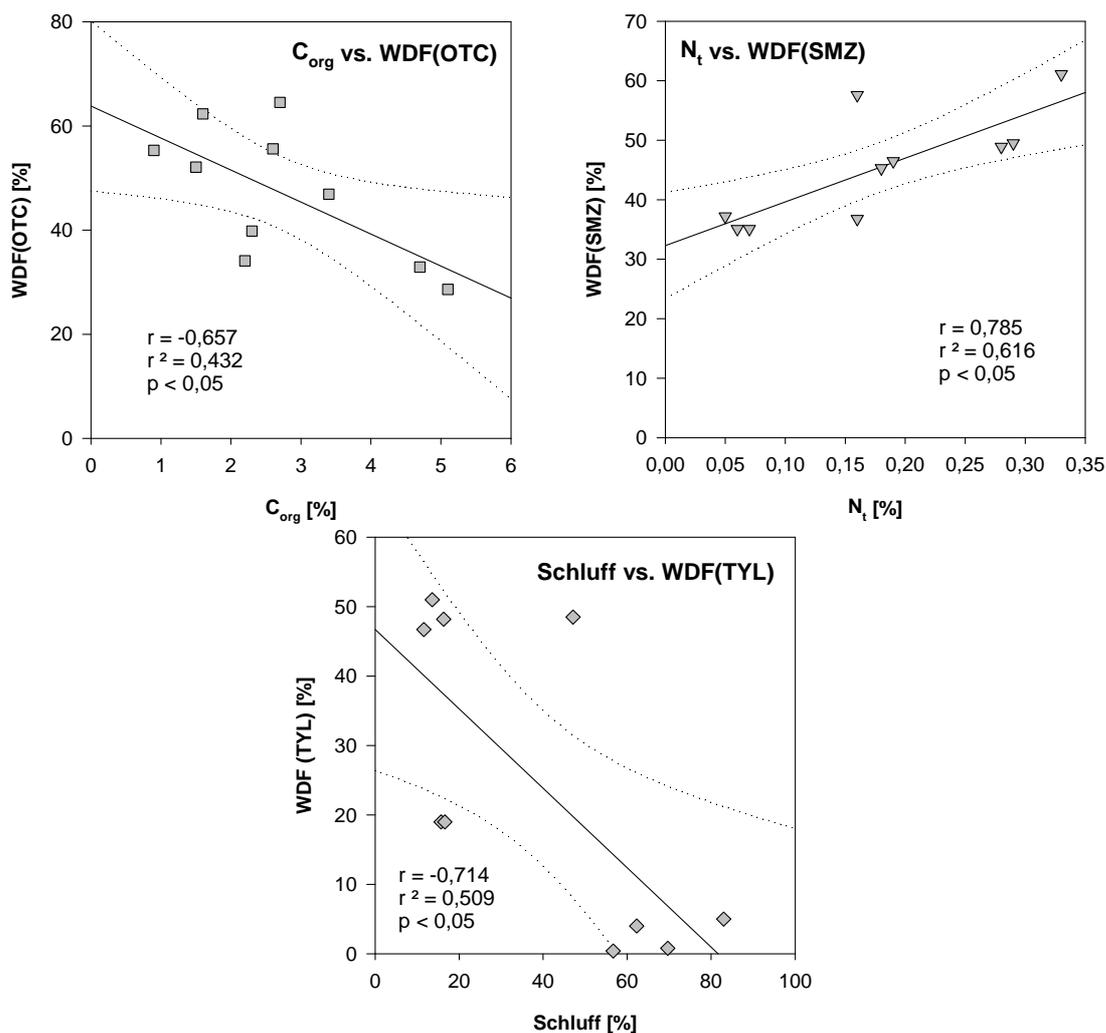


Abb. 3–3: Darstellung der signifikanten* Korrelationen von Bodenparameter und Wiederfindungsrate.

Dargestellt ist der lineare Zusammenhang zwischen der Konstante (Bodenparameter) und der abhängigen Variablen (WDF) unter Angabe des Korrelationskoeffizienten r und des Bestimmtheitsmaßes r^2 .

* $p < 0,05$, statistisch signifikant gemäß ANOVA Test

Die schrittweise Regression ergab für Tylosin, dass der Informationsgehalt der Einflusskonstanten „C/N“ und „Ca“ auf die Wiederfindung für Tylosin in der Korrelation mit dem Schluffgehalt bereits enthalten ist. So konnte letztendlich für drei Substanzen eine Abhängigkeit von einer Konstanten nachgewiesen werden.

3.3 Entwicklung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Staub

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Kombination von raschen und einfachen Extraktions-Verfahren (LLE, SPE) mit einer leistungsfähigen HPLC-Trennung und selektiver Tandemmassenspektrometrie den Nachweis von Sulfonamiden im Spurenbereich auch in komplexen Matrices (Gülle, Boden) ermöglicht (siehe Abschnitt 3.1). In Verbindung mit dem von HAMSCHEER et al. (2002) beschriebenen HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Tetracyclinen und Tylosin in Umweltmatrices wurde angestrebt, die Anwendbarkeit dieser Methoden um die Matrix Staub und die Substanz Chloramphenicol (CAP) noch zu erweitern. Im Folgenden sollte eine analytische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von 12 Antibiotika (OTC, TC, CTC, SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SMX, SDM, TYL und CAP) in Staub mittels HPLC-ESI-MS/MS entwickelt werden.

3.3.1 *Probenvorbereitung*

Die Extraktion von Antibiotika aus Staubproben gelang mittels einfacher Flüssig-/Flüssig-Extraktion. Als Grundlage wurden die Aufreinigungsverfahren für die Matrices Boden und Gülle verwendet (siehe Abschnitte 5.5.1.1 und 5.5.2.1). Staub setzt sich im Gegensatz zu Boden und Gülle aus sehr viel kleineren Partikeln zusammen. Bei gleichen Aliquots war für Staub eine effektivere Extraktion zu erwarten, da die Matrix eine wesentlich größere Oberfläche bietet. Deshalb wurde die Probeneinwaage auf 100 mg reduziert. Die Stäube wurden mit 1 M-Citratpuffer (pH 4,7) vorextrahiert und mit Ethylacetat zweimal ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden eingengt und in 100 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (90:10; v/v) aufgenommen. Sedimentationsstäube aus Schweine- und Hühnerställen sind zudem sehr proteinreich (20–50 %) (HARTUNG 1997). Bei der Rekonstitution wurden mit extrahierte Proteine durch den Acetonitrilanteil denaturiert. Daher musste der wieder aufgenommene Probenextrakt vor der Analyse mit HPLC-ESI-MS/MS nochmals zentrifugiert werden.

3.3.2 *HPLC-ESI-MS/MS und -MS³*

Die Analyten wurden standardmäßig an einer RP-C18-Phase („Puresil C18“) mittels verschiedener linearer binärer Gradientensysteme aus 5 M Ammoniumacetat/Ameisen-

säure/Wasser (0,02:0,5:99,48; v/v/v) und Acetonitril bei einem Fluss von 1 mL/min getrennt. Der Fluss wird vor Einlass in das Massenspektrometer gesplittet, wobei letztlich ~10 % zur tandemmassenspektrometrischen Detektion eingesetzt werden. Tandemmassenspektrometrie wurde in einer LCQ Ionenfalle durchgeführt. Die Kopplung mit der HPLC erfolgte über ein Elektrospray-Interface, das mit der Ausnahme zur Analyse von Chloramphenicol (negative Ionisierung) im Positiv-Modus betrieben wurde. Die Antibiotika wurden im MS/MS-Modus analysiert und anhand der intensivsten Produkt-Ionen quantifiziert. Die optimierten Parameter der MS/MS-Methoden und charakteristischen Fragmentierungen sind in Tab. 5–7 (siehe Abschnitt 5.4.5) dargestellt.

Auch Chloramphenicol wurde im MS/MS-Modus bestimmt. Zur Absicherung eines Chloramphenicol-Befundes wurde zusätzlich ein Bestätigungsverfahren mittels MS³ entwickelt. Hierzu wurde ein Produkt-Ion des MS/MS-Experiments nochmals fragmentiert und die Produkt-Ionen der dritten Dimension anschließend detektiert. Die MS³-Technik ist ausschließlich mit einer Ionenfalle durchführbar. Selektion und Fragmentierung der Ionen finden hier diskontinuierlich an einem Ort statt. Abb. 3–4 zeigt die Chromatogramme und die dazugehörigen MSⁿ-Spektren einer Chloramphenicol-positiven Staubprobe, in der zusätzlich noch vier weitere Antibiotika detektiert wurden.

zu Seite 49 quer:

Abb. 3–4: Chromatogramme und Massenspektren verschiedener Antibiotika in einer Staubprobe analysiert mit HPLC-ESI-MS/MS.

(A) Rekonstruierte Ionenchromatogramme einer Staubprobe die 0,43 mg/kg OTC, 0,32 mg/kg CTC, 0,26 mg/kg TYL, 0,41 mg/kg SMZ und 9,07 mg/kg CAP enthält.

(B) Dazugehörige MS-MS-Spektren dieser Substanzen.

(C) Referenzspektren der Substanzen in einer methanolischen Standardlösung mit einer Absolutmasse von 1 ng.

MS/MS-Methode 1: Trennsäule Waters „Puresil C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1 mL/min, Gradient 1, MS/MS-Modus auf *m/z* 461 (OTC), *m/z* 445 (TC), *m/z* 479 (CTC), *m/z* 916,5 (TYL), *m/z* 321 (CAP).

MS/MS-Methode 3: Trennsäule Waters „Puresil C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1 mL/min, Gradient 2, MS/MS-Modus auf *m/z* 251 (SDZ), *m/z* 256 (STZ), *m/z* 265 (SMR), *m/z* 279 (SMZ), *m/z* 281 (SMPD), *m/z* 254 (SMX) und *m/z* 311 (SDM).

3.3.3 Methodenvalidierung

3.3.3.1 Bestimmung der Wiederfindungsraten

Die Ermittlung der Wiederfindungsraten erfolgte durch Aufstocken mit unabhängig hergestellten Aufstocklösungen auf Konzentrationsniveaus von 0,2, 0,5 und 1,0 mg/kg. Als Matrix wurde rückstandsfreier Staub des untersuchten Schweinemastbetriebes verwendet. (siehe Abschnitt 5.2.3.6). Für die Untersuchungen der Stäube des Schweinestalls ist dies optimal, da in dieser Leerprobe der aufgestockte Analyt ähnlich an der Matrix gebunden sein sollte wie unter realen Bedingungen (KROMIDAS 1999). Auf die Durchführung der Experimente mit einer vergleichbaren Staubmatrix aus einem Geflügelstall wurde verzichtet, da im Rahmen der durchgeführten Studie nur vier Staubproben aus einer Legehennenstallung untersucht wurden.

Tab. 3–13 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zur Wiederfindung. Die vorliegenden Wiederfindungsraten für die Tetracycline lagen unabhängig von der Konzentration in einem akzeptablen Bereich von 98–111 % (OTC), 81–99 % (TC) bzw. 88–100 % (CTC) (EG 2002). Die Wiederfindung für Tylosin war deutlich schlechter und betrug im Mittel 27 % bei einem mit den Tetracyclinen vergleichbaren Variationskoeffizienten von etwa 26 %. Dagegen liefert die Analysenmethode bei der Extraktion eine Signalverstärkung während der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse. Infolgedessen wurden alle Chloramphenicol-positiven Proben mittels Standardaddition (siehe Abschnitt 3.6.1) ausgewertet. Für die Sulfonamide ergaben sich mittlere Wiederfindungsraten von 39,3–48,6 % bei mittleren Variationskoeffizienten von 21,2–32,6 %.

Tab. 3–13: Wiederfindung von Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin, Tylosin, Chloramphenicol, Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxyipyridazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadimethoxin in Staub

Analyt	Konz. [mg/kg]	Anzahl [n]	WDF [%] (MW ± SA)	CV [%]
OTC	0,2	3	97,5 ± 14,1	14,5
	0,5	3	110,6 ± 25,3	22,9
	1,0	6	101,0 ± 24,4	24,1
TC	0,2	3	80,9 ± 15,4	19,0
	0,5	3	98,5 ± 30,0	30,4
	1,0	6	88,8 ± 16,4	18,5
CTC	0,2	3	87,7 ± 11,2	12,8
	0,5	3	94,1 ± 25,7	27,4
	1,0	6	99,6 ± 18,4	18,5
TYL	0,2	3	22,4 ± 6,0	21,3
	0,5	3	27,5 ± 7,8	28,3
	1,0	6	30,7 ± 8,6	28,0
CAP	0,2	3	301,7 ± 97,3	32,2
	0,5	3	243,3 ± 229,8	18,7
	1,0	6	229,8 ± 55,0	24,0
SDZ	0,2	3	31,2 ± 1,3	4,2
	0,5	3	51,1 ± 14,8	29,0
	1,0	6	47,6 ± 11,6	24,4
STZ	0,2	3	32,9 ± 10,8	32,8
	0,5	3	42,7 ± 11,2	26,2
	1,0	6	46,0 ± 17,0	37,0
SMR	0,2	3	28,2 ± 6,9	24,5
	0,5	3	49,0 ± 18,7	38,2
	1,0	6	40,7 ± 12,9	31,7
SMZ	0,2	3	29,5 ± 10,0	33,9
	0,5	3	61,5 ± 17,8	28,9
	1,0	6	55,4 ± 19,1	34,5
SMPD	0,2	3	28,4 ± 3,9	13,7
	0,5	3	49,0 ± 10,2	20,8
	1,0	6	44,6 ± 12,2	27,4
SMX	0,2	3	54,5 ± 24,0	44,0
	0,5	3	37,2 ± 7,7	20,7
	1,0	6	36,5 ± 10,1	27,7
SDM	0,2	3	32,0 ± 5,2	16,3
	0,5	3	49,1 ± 14,5	29,5
	1,0	6	46,8 ± 10,7	22,9

Abk.: Konz., Konzentration; WDF, Wiederfindung; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; CV, Variationskoeffizient

3.3.3.2 Nachweisvermögen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens wurden über das S/N-Verhältnis im Chromatogramm ermittelt. In Tab. 3–14 sind die im Einzelnen ermittelten Grenzen aufgeführt. Aufgrund von koeluiender Matrix wurde für das zuletzt eluierende Sulfamethoxazol eine vierfach schlechtere Nachweisgrenze als für alle anderen erzielt. In Matrix wurden für die Tetracycline im Vergleich zum Analytpeak in Methanol wesentlich breitere Peaks erhalten, was sich ungünstig auf das S/N- von Chloramphenicol Wiederfindungen von über 200 %. Zurückzuführen ist dies auf Verhältnis auswirkte. Damit war hier trotz besserer Wiederfindung die Nachweisgrenze niedriger als für die Sulfonamide.

Tab. 3–14: Substanzspezifische Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Staub

Substanz	Staub [§]	
	BG [mg/kg]	NWG [mg/kg]
OTC	0,10	0,050
TC	0,10	0,050
CTC	0,10	0,050
SDZ	0,05	0,025
STZ	0,05	0,025
SMR	0,05	0,025
SMZ	0,05	0,025
SDM	0,05	0,025
SMPD	0,05	0,025
SMX	0,20	0,100
TYL	0,10	0,050
CAP	0,10	0,050

[§] Mischprobe aus zwei rückstandsfreien Schweinestallstäuben (siehe Abschnitt 5.2.3.6)

Abk.: BG, Bestimmungsgrenze; NWG, Nachweisgrenze

3.4 Feldstudien zur Verbreitung von Tierarzneimitteln in der Umwelt über den Eintragspfad Gülle – Boden – Grundwasser

Das *Niedersächsische Landesamt für Bodenforschung (NLFb)* veranlasste seit 1999 Bodenuntersuchungen zum Vorkommen von Tierarzneimitteln auf 14 Flächen des niedersächsischen Boden-Dauerbeobachtungsprogramms (KLEEFISCH und KUES 1997) sowie auf 14 zusätzlich ausgewählten Monitoringflächen (siehe Abb. 3–5). Als Ergebnis dieser ersten Untersuchungen wurden auf verschiedenen Flächen Rückstände von Tetracyclinantibiotika nachgewiesen (HAMSCHEER et al. 2000). Bei einer über zwei Jahre beprobten Boden-Dauerbeobachtungsfläche (BDF) wurde ein kontinuier-

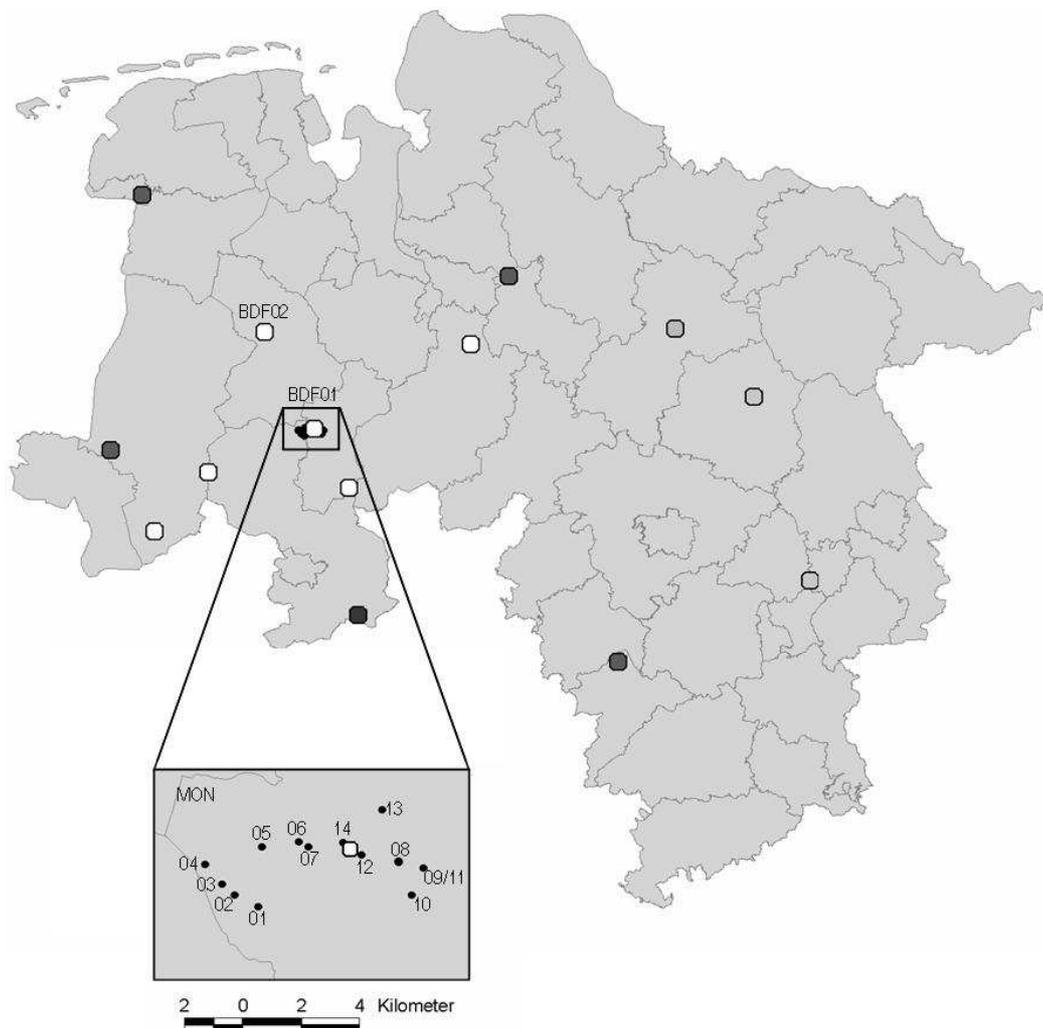


Abb. 3–5: Standorte für Bodenuntersuchungen in Niedersachsen. Lage und Charakterisierung der Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) und Monitoringflächen (MON).

licher Eintrag von Tetracyclinen in die Ackerkrume festgestellt und permanente mittlere Tetracyclin-Konzentrationen von über 100 µg/kg im Oberboden ermittelt (HAMSCHEER et al. 2002). Im Herbst 2000 und im Frühjahr 2001 wurden im Rahmen des *BLAC*-Untersuchungsprogramms (BLAC 2003) und in Kooperation mit dem *Niedersächsischen Landesamt für Ökologie* Gülle-, Boden- und Grundwasserproben von verschiedenen BDF untersucht (HÖPER et al. 2002).

Basierend auf diesen Vorläufer-Studien sollten im Rahmen dieser Arbeit die Eintragspfade Gülle – Boden– Grundwasser für Antibiotika in die Umwelt intensiv erforscht werden. Hierzu wurden in Kooperation mit dem *NLFB* detaillierte Feldstudien auf Flächen des Raumes Weser-Ems geplant. Als Standorte wurden zwei BDF (*BDF01/02*) sowie 14 Monitoringflächen (*MON01–14*) ausgewählt (siehe Abb. 3–5).

Die BDF, für die umfangreiche Angaben zur Bewirtschaftung vorlagen (KLEEFISCH und KUES 1997), wurden mit Hilfe von Bodenproben des Ober- und Unterbodens (0–30 cm und 30–90 cm Bodentiefe) und Sicker- bzw. Grundwasserproben intensiv untersucht. Ergänzend konnten hier auch Wirtschaftsdünger untersucht werden. Dagegen beschränkten sich die Monitoringuntersuchungen auf die Beprobung des Oberbodens (0–30 cm Bodentiefe). Für diese Flächen lagen keine Betriebsinformationen und keine Informationen über ausgebrachte Wirtschaftsdünger vor.

Bei allen Flächen handelt es sich – typisch für diese Region – um sandige Standorte mit relativ hohen Grundwasserständen (siehe Tab. 3–15), so dass bezogen auf eine mögliche Verlagerung von Stoffen in das Grundwasser (siehe Abschnitt 3.4.3) „Worst-Case“-Bedingungen vorliegen.

Tab. 3–15: Boden§- und Standortparameter der untersuchten Boden-Dauerbeobachtungsflächen

Parameter	Einheit	<i>BDF01</i>	<i>BDF02</i>
Bodentyp		Gley-Podsol	Podsol
Sand	Gewichts-%	91,5	82,6
Schluff	Gewichts-%	6,1	15,1
Ton	Gewichts-%	2,4	2,3
C_{org}	Gewichts-%	1,55	3,38
N_t	Gewichts-%	0,11	0,12
KAK-pot[#]	mmolc/kg	106	167
pH (CaCl₂)		4,6	4,8
Winter-GW*	cm unter Flur	ca. 70–80	ca. 180–190
Sommer-GW	cm unter Flur	ca. 140–150	> 200

§ Die Bodenparameter sind Mittelwerte aus den Untersuchungen von vier Kernflächen à 256 m²

Potenzielle Kationenaustauschkapazität bei pH 8,1

* Grundwasserstand

3.4.1 Exposition von Gülle und Güllekrusten mit Antibiotika

3.4.1.1 Bodendauerbeobachtungsfläche *BDF01*

Am Standort *BDF01* wurde während des Untersuchungszeitraums regelmäßig Gülle ausgebracht (siehe Tab. 3–17). Lediglich von zwei der ausgebrachten Güllen konnten Proben gezogen und auf Antibiotika analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3–16 zusammengefasst.

Tab. 3–16: Konzentrationen von Tetracyclinen[§] und Sulfonamiden[§] in verschiedenen Güllen, aufgebracht auf die *BDF01* in den Jahren 2001 und 2002

Substanz	Anzahl [n]	Probenahme	
		2001	2002
		Konzentration [mg/kg FS] (Mittelwert ± Standardabweichung)	
4-Epi-TC	2	0,65 ± 0,02*	0,17 ± 0,01*
TC	2	3,22 ± 0,33	1,01 ± 0,02
ATC	2	n. a.	0,20 ± 0,01
Iso-CTC	2	< 0,05*	n. n.
4-Epi-CTC	2	n. n.	n. n.
CTC	2	0,09 ± 0,04	n. n.
SDZ	2	0,34 ± 0,02	n. n.
SMZ	2	< 0,02	n. n.

[§] OTC sowie STZ, SMR, SMZ, SMPD, SMX und SDM wurden keinmal nachgewiesen

* Quantifizierung erfolgte über TC- bzw. CTC-Referenzsubstanz

Abk.: FS, Feuchtsubstanz; n. a., nicht analysiert; n. n., nicht nachweisbar

Tab. 3–17: Gülleausbringung und Frachten der antibiotisch aktiven Wirkstoffe des Standorts *BDF01* in den Jahren 2000–2002

Art des Wirtschaftsdüngers		Probenahme		
		2000*	2001	2002
		Schweinegülle	Mischgülle	Mischgülle
Trockensubstanzanteil	[% TS]	9,7	9,6	9,8
ausgebrachte Güllemenge	[m ³ /ha]	40	40	30
TC	[mg/kg TS]	41,2	33,5	14,1 [#]
CTC	[mg/kg TS]	1,0	0,9	n. n.
SMZ	[mg/kg TS]	7,2	n. n.	n. n.
SDZ	[mg/kg TS]	11,3	3,5	n. n.

Daten nach HAMSCHER et al. 2002

[#] inkl. 4-Epi-TC und ATC

Abk.: TS, Trockensubstanz; n. n., nicht nachweisbar

Von den drei Tetracyclinen konnten TC und CTC nachgewiesen werden. Neben TC wurde gleichzeitig auch 4-Epi-TC detektiert. Die Epimerisierungsrate lag zwischen 6 % und 17 %. Auch gelang es, antibiotisch inaktive Abbauprodukte wie Isochlortetracyclin (Iso-CTC) und Anhydrotetracyclin (ATC) nachzuweisen. SDZ und SMZ waren die einzigen Sulfonamide, die detektiert werden konnten. Dieses Nachweisspektrum wurde später qualitativ in den Ergebnissen der Bodenuntersuchungen zumindest teilweise wieder gefunden (siehe Abschnitt 3.4.2.1). Mit den ermittelten Konzentrationen wurde anhand der jährlichen Ausbringungsmenge eine Kalkulation der theoretischen Antibiotikafrachten pro Hektar und Jahr durchgeführt. Dabei wurden lediglich die antibiotisch wirksamen Substanzen berücksichtigt. Die Resultate dieser Abschätzung sind in Tab. 3–17 dargestellt.

3.4.1.2 Bodendauerbeobachtungsfläche *BDF02*

Auch Standort *BDF02* wurde während des Untersuchungszeitraums regelmäßig mit Gülle beaufschlagt (siehe Tab. 3–19). Auch hier konnten lediglich von zwei der ausgebrachten Güllen Proben eingeholt und auf Antibiotika analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3–18 zusammengefasst.

Von den drei Tetracyclinen konnten TC und CTC nachgewiesen werden. Neben TC wurde gleichzeitig auch 4-Epi-TC detektiert. Die Epimerisierungsrate lag bei ungefähr 15 %. Auch gelang es antibiotisch inaktive Abbauprodukte wie Iso-CTC und ATC nachzuweisen. Sulfonamide wurden nicht detektiert. Qualitativ entsprach dies dem Rückstandsprofil der Bodenuntersuchungen (siehe Abschnitt 3.4.1.2).

Tab. 3–18: Konzentrationen von Tetracyclinen§ in verschiedenen Güllen, aufgebracht auf die *BDF02* in den Jahren 2001 und 2002

Substanz	Anzahl [n]	Probenahme	
		2001	2002
Konzentration [mg/kg FS] (Mittelwert ± Standardabweichung)			
4-Epi-TC	2	0,14* [#]	0,19 ± 0,10 [#]
TC	2	0,82 ± 0,26	1,21 ± 0,36
ATC	2	n. a.	0,10 ± 0,01 [#]
Iso-CTC	2	1,42* [#]	0,62 ± 0,06 [#]
4-Epi-CTC	2	n. n.	0,06 ± 0,06 [#]
CTC	2	1,51 ± 0,39	0,60 ± 0,21

§ OTC sowie Sulfonamide (SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SMX, SDM) wurden keinmal nachgewiesen

* n = 1

[#] Quantifizierung erfolgte über TC- bzw. CTC-Referenzsubstanz

Abk.: FS, Feuchtsubstanz; n. a., nicht analysiert; n. n., nicht nachweisbar

Tab. 3–19: Gülleausbringung und Frachten der antibiotisch aktiven Wirkstoffe des Standorts BDF02 in den Jahren 2000–2002

		Probenahme	
		2001	2002
Art des Wirtschaftsdüngers		Rinder-/Schweinegülle	k. A.
Trockensubstanzanteil	[% TS]	4,1	k. A.
ausgebrachte Güllemenge	[m ³ /ha]	16	30/15
TC	[mg/kg TS]	23,4 [#]	k. A.
CTC	[mg/kg TS]	36,8	k. A.

[#] inkl. 4-Epi-TC

Abk.: k. A., keine Angabe, TS, Trockensubstanz

Mit den ermittelten Konzentrationen wurde anhand der jährlichen Ausbringungsmenge eine Kalkulation der theoretischen Antibiotika-Frachten pro Hektar und Jahr durchgeführt. Es wurden lediglich die antibiotisch wirksamen Substanzen berücksichtigt. Die Resultate dieser Abschätzung sind in Tab. 3–19 dargestellt.

3.4.1.3 Monitoringflächen

Auf vier Standorten der Monitoringflächen konnten bei der Probenahme im Mai 2004 vertrocknete Gülleaggregate gesammelt werden. Die Zusammensetzung dieser Matrix war am ehesten mit der von Gülle vergleichbar. Die Proben wurden deshalb mit der Analysenmethode für Gülle aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.5.1) und mittels HPLC-ESI-MS/MS auf Tetracycline und Sulfonamide analysiert. Zur Auswertung wurden die Wiederfindungsraten für Gülle herangezogen (93,7 % für OTC, 93,2 % für TC und 110,6 % für CTC; vgl. Tab 5–8 in Abschnitt 5.5.1.4). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 3–20 dargestellt.

Tab. 3–20: Vorkommen verschiedener Tetracycline§ in Güllekrusten, gesammelt auf den Monitoringflächen MON02, MON04, MON08 und MON10 im Mai 2003

Standort	Substanz	n	Konzentration [mg/kg TS]	CV [%]
			(Mittelwert ± Standardabweichung)	
MON02	OTC	3	< 0,05	k. A.
	TC	3	1,84 ± 0,52	28,3
	CTC	3	0,13 ± 0,03	23,1
MON04	TC	3	1,22 ± 0,22	18,0
	CTC	3	0,05 ± 0,01	20,0
MON08	TC	3	2,13 ± 0,47	22,1
MON10	TC	3	0,08 ± 0,02	25,0

§ Sulfonamide waren in keiner Probe nachweisbar

Abk.: TS, Trockensubstanz; CV, Variationskoeffizient; k. A., keine Angabe

Bei vier untersuchten Güllekrusten wurden maximal drei Tetracycline nachgewiesen, wohingegen keines der analysierten Sulfonamide detektiert werden konnte. Die Maximalkonzentration für TC lag bei 2,13 mg/kg und für CTC bei 0,13 mg/kg. Die Befunde entsprachen in qualitativer Hinsicht den entsprechenden Ergebnissen der Bodenuntersuchungen dieser Flächen (siehe Abschnitt 3.4.2.3).

3.4.2 Vorkommen und Verbleib von Tetracyclinen und Sulfonamiden in güllegedüngten Böden

3.4.2.1 Boden-Dauerbeobachtungsfläche *BDF01*

Bereits im Zeitraum von Mai 2000 bis Mai 2001 wurden am Standort *BDF01* Bodenuntersuchungen durchgeführt (HAMSCHER et al. 2002). Diese Studie sollte im Rahmen dieser Arbeit durch weitere Probenahmen ergänzt werden und das analytische Spektrum um die Substanzgruppe der Sulfonamide erweitert werden.

Ab Juni 2001 wurde diese Fläche in halbjährlichem Abstand bis einschließlich Mai 2004 beprobt (siehe Abschnitt 5.7.1). Die Gesamtdauer der Untersuchungen betrug somit 35 Monate. Auf dem Feld von ungefähr 5 ha waren vier Kernflächen (KF) von je 16 × 16 m markiert, welche unabhängig beprobt wurden. Auf dem Sandboden (siehe Tab. 3–15) der Ackerfläche wurde während des Untersuchungszeitraums vornehmlich Mais und/oder Wintergetreide kultiviert. Abhängig von der Kultivierung waren die einzelnen KF unterschiedlich oft von Düngemaßnahmen betroffen. Die ausgebrachte Gülle war Schweine- oder Mischgülle. Die Beprobungen fanden – für den Fall einer Begüllung – jeweils nach den Düngemaßnahmen im Frühjahr und Herbst statt.

Die Bodenproben wurden mit der in Abschnitt 5.5.2 beschriebenen Methode auf Tetracycline (OTC, TC, CTC), Tylosin und Sulfonamide (STZ, SDZ, SMZ, SMR, SMPD, SDM, SMX) mittels HPLC-MS/MS untersucht. Alle Werte wurden um die mittlere Wiederfindung im Boden korrigiert (siehe Tab. 5–9 und HAMSCHER et al. 2002) und auf die Trockensubstanz bezogen. Die angegebenen Werte für TC und CTC stellen die Summe aus der Muttersubstanz und deren 4-Epimer dar.

Die Ergebnisse der insgesamt sieben Probenahmen des Standortes sind in Tab. 3–21 und Abb. 3–6 zusammengefasst. Die bei den Probenahmen vom 20.11.01, 30.05.02 und 19./20.11.02 unterschiedliche Gülleausbringung auf den jeweiligen KF (siehe Tab. 3–21) spiegelte sich nicht in deren Einzelwerten wieder. In der Tabelle wurden deshalb die Mittelwerte aller KF pro Bodensegment angegeben. Die Substanzen TC, CTC und SMZ konnten zu jedem Probenahmezeitpunkt nachgewiesen

werden, wobei die höchsten Konzentrationen für TC gefunden wurden. Die Rückstände waren jeweils im humusreichen Oberboden (0–30 cm) lokalisiert und vereinzelt in der Grenzsicht aus Pflughorizont (30–40 cm) und Unterboden. Dahingegen waren in den tieferen Bodenschichten (> 40 cm) keine der oben genannten Antibiotika nachweisbar. OTC, TYL und weitere sechs Sulfonamide (STZ, SDZ, STZ, SMR, SMPD, SDM, SMX) wurden in keiner Probe detektiert.

Insgesamt wurde für TC bei 58 % der positiven Einzelproben der Wert von 100 µg/kg überschritten. Die Kernflächenmittelwerte der Bodentiefen 0–10 cm, 10–20 cm und 20–30 cm waren in 57,1 %, 71,4 %, und 85,7 % von sieben Probenahmen größer als 100 µg/kg. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Bodentiefen war nicht feststellbar (siehe Tab. 3–21).

Die Konzentrationen für TC waren dabei deutlich höher als für CTC, die sich im Bereich der Bestimmungsgrenze von 5 µg/kg bewegten (siehe Tab. 3–21).

SMZ war lediglich bei drei Probenahmen über alle vier Kernflächen nachweisbar. Die Konzentrationen lagen dann zwischen 0,5 und 2 µg/kg (siehe Tab. 3–21). Der Maximalwert für Sulfamethazin von 3,0 µg/kg trat bei der Probenahme vom 20.11.01 auf.

zu Seite 60 quer:

Tab. 3–21 : Gesamtergebnisse der Bodenuntersuchungen am Standort *BDF01* bei sieben halbjährlich aufeinander folgenden Probenahmen

Angegeben sind die berechneten mittleren Konzentrationen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen) in den einzelnen Bodentiefen aus vier unabhängigen Beprobungen der definierten Kernflächen (KF1–4). Die vier KF von je 16 \times 16 m liegen innerhalb eines Areals von 100 \times 100 m auf einer etwa 5 ha großen landwirtschaftlichen Nutzfläche.

Tab. 3–21: Gesamtergebnisse der Bodenuntersuchungen am Standort *BDF01* bei sieben halbjährlich aufeinander folgenden Probenahmen

		Gülleausbringung						
Gülle [m ³ /ha]	40	25	30	25	30	25	30	
Zeitpunkt	23.04.2001	11.10.2001	17.04.2002	20.06.2002	17.04.2002	20.06.2002	19.04.04	
Kernflächen	KF1–4	KF2/3	KF1/4	KF2/3	KF1/4	KF2/3	KF1–4	
		Probenahme						
Bodentiefe [cm]	19.06.2001	20.11.2001	30.05.2002	19./20.11.2002	02.05.2003	26.11.2003	05.05.2004	
		TC* [µg/kg TS]						
00–10	87,2 ± 25,6	118,6 ± 47,3	226,5 ± 208,1	181,4 ± 165,0	86,0 ± 25,4	69,3 ± 19,0	127,9 ± 33,2	
10–20	266,8 ± 146,1	113,2 ± 70,3	295,3 ± 127,9	91,7 ± 11,7	134,9 ± 43,3	93,3 ± 26,6	142,9 ± 48,2	
20–30	182,2 ± 110,4	104,2 ± 38,3	234,7 ± 204,1	35,1 ± 8,4	253,4 ± 192,6	200,1 ± 90,7	140,5 ± 41,7	
30–40	n. n.	n. n.	116,8 ± 93,5	n. n.	n. n.	n. n.	12,7 ± 9,7 [#]	
40–60	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
60–90	n. n.	n. n.	n. n.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	
		CTC* [µg/kg TS]						
00–10	< 5,0 [#]	6,5 ± 1,4	5,3 [#] ± 2,3	5,1 ^{##} ± 3,9	< 5,0 ^{##}	5,9 [#] ± 3,1	10,1 ± 7,5	
10–20	5,7 ± 0,5	< 5,0 ^{##}	5,5 [#] ± 2,6	< 5,0 ^{###}	11,3 ^{##} ± 10,7	9,2 ^{##} ± 8,7	20,4 ± 14,9	
20–30	< 5,0 ^{##}	5,2 [#] ± 2,2	6,5 ± 0,9	< 5,0 ^{###}	38,0 ^{##} ± 66,7	20,0 ± 16,9	11,2 ± 4,1	
30–40	n. n.	n. n.	< 5,0 ^{##2}	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
40–60	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
60–90	n. n.	n. n.	n. n.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	
		SMZ [µg/kg TS]						
00–10	n. a.	< 2,0 ^{##}	< 2,0 ^{##}	n. n.	< 2,0 ^{####}	n. n.	n. n.	
10–20	n. a.	< 2,0 ^{###}	< 2,0 ^{###}	n. n.	< 2,0 ^{####}	n. n.	n. n.	
20–30	n. a.	< 2,0 ^{###}	< 2,0 ^{###}	n. n.	< 2,0 ^{####}	n. n.	n. n.	
30–40	n. a.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
40–60	n. a.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
60–90	n. a.	n. n.	n. n.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	

* inklusive des 4-Epipimers; [#] 1 Einzelwert $c_x < BG$; ^{##} 2 Einzelwerte $c_x < BG$; ^{###} 3 Einzelwerte $c_x < BG$; ^{####} 4 Einzelwerte $c_x < BG$

Abk.: k. A., keine Angabe; n. n., nicht nachweisbar; n. a., nicht analysiert; zur Berechnung: wenn $c_x < BG$, dann $c_x = NWG$; wenn $c_x < NWG$, dann $c_x = 0$

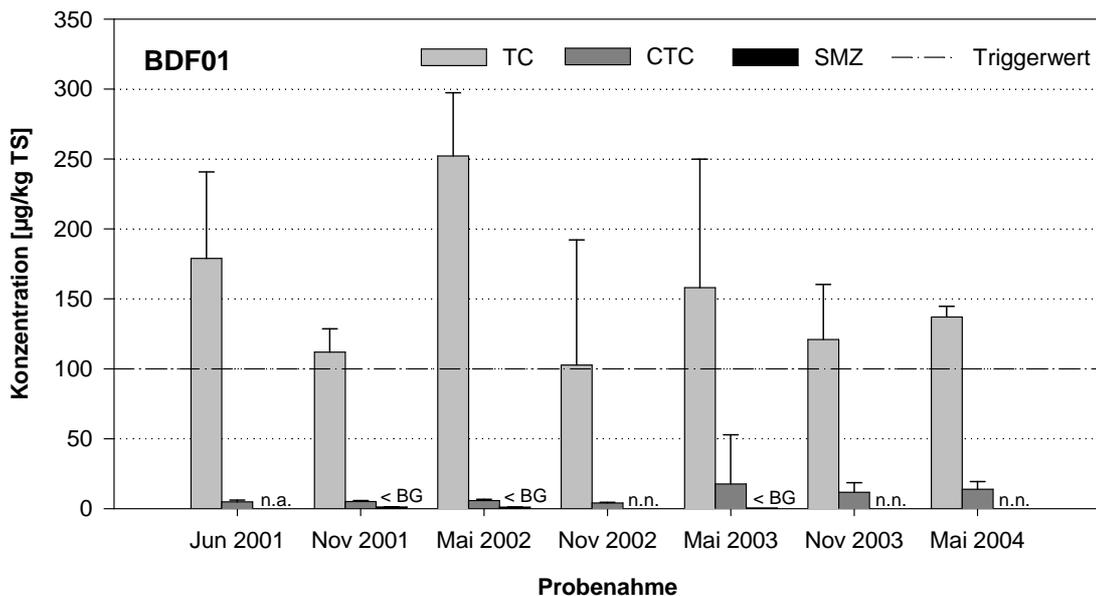


Abb. 3–6: Vorkommen von Tetracyclin, Chlortetracyclin und Sulfamethazin im Oberboden einer landwirtschaftlichen Nutzfläche (BDF01). Ergebnisse der Feldstudie von Juni 2001 bis Mai 2004.

Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus den Werten nach Tab. 3–21 der Bodentiefen 0–10 cm, 10–20 cm und 20–30 cm.

Das Rückstandsprofil in Abb. 3–6 verdeutlicht die Größenordnung der mittleren Gehalte im Oberboden (0–30 cm) der einzelnen Antibiotika zueinander. Die Gesamtbelastung an TC lag für alle sieben Zeitpunkte über 100 µg/kg. Die höchsten Werte traten jeweils im Frühjahr zu Beginn einer Vegetationsperiode auf. Die relative Abnahme der mittleren TC-Belastung im November betrug im Jahr 2001 37 %, im Jahr 2002 59 % und im Jahr 2003 34 %. Über den gesamten Untersuchungszeitraum waren die Konzentrationen für TC dabei rechnerisch 17-fach höher als für CTC und sogar 246-fach höher als für SMZ.

3.4.2.2 Boden-Dauerbeobachtungsfläche BDF02

Der Standort BDF02 wurde erstmalig im November 2001 in halbjährlichem Abstand bis einschließlich November 2003 beprobt. Die Gesamtdauer der Untersuchungen betrug somit 24 Monate. Auf der Fläche wurden wiederum vier markierte KF, analog zu BDF01, nach der in Abschnitt 5.7.1 beschriebenen Methode beprobt. Die Bodenproben wurden auf Tetracycline, Tylosin und Sulfonamide hin untersucht. Alle Werte wurden um die mittlere Wiederfindung im Boden korrigiert (siehe Tab. 5–9 und HAMSCHER et al. 2002) und auf die Trockensubstanz bezogen. Die angegebenen Werte für TC und CTC stellen die Summe aus der Muttersubstanz und deren 4-Epimer dar.

Tab. 3–22: Gesamtergebnisse der Bodenuntersuchungen am Standort *BDF02* bei fünf halbjährlich aufeinander folgenden Probenahmen

Angegeben sind die berechneten mittleren Konzentrationen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen) in den einzelnen Bodentiefen aus vier unabhängigen Beprobungen der definierten Kernflächen (KF1–4). Die vier KF von je 16×16 m liegen innerhalb eines Areals von 100×100 m auf einer etwa 5 ha großen landwirtschaftlichen Nutzfläche.

		Gülleausbring ung			
Gülle [m³/ha]	16/20	30/15	k. A.	k. A.	k. A.
Zeitpunkt	20.02.2001/ 10.04.2001	23.04.2002/ 11./12.06.2002	k. A.	k. A.	k. A.
Kernflächen	KF1–4	KF1–4	k. A.	k. A.	k. A.
		Probenahme			
Bodentiefe [cm]	20.11.2001	14.06.2002	19.11.2002	28.04.2003	25.11.2003
		TC* [µg/kg TS]			
00–10	§ < 5,0 ^{###}	44,9 \pm 36,3	10,2 \pm 2,5	23,8 \pm 6,3	11,7 \pm 2,4
10–20		6,9 [#] \pm 3,0	15,9 \pm 1,4	13,0 \pm 5,2	8,4 \pm 3,2
20–30		11,4 \pm 2,8	11,2 \pm 2,4	9,5 \pm 1,9	7,4 \pm 2,0
30–60	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
60–90	n. n.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
		CTC* [µg/kg TS]			
00–10	§ 6,0 [#] \pm 1,7	41,1 \pm 33,1	9,0 \pm 1,7	9,0 \pm 2,5	10,3 \pm 1,1
10–20		6,9 ^{##} \pm 4,8	12,5 \pm 1,3	10,2 \pm 3,9	9,0 \pm 4,0
20–30		7,7 \pm 1,2	10,4 \pm 1,3	6,0 [#] \pm 2,3	7,2 [#] \pm 2,7
30–60	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
60–90	n. n.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

* inklusive des 4-Epipimers

1 Einzelwert $c_x < BG$

2 Einzelwerte $c_x < BG$

3 Einzelwerte $c_x < BG$

Abk.: k. A., keine Angabe; n. n., nicht nachweisbar; n. a., nicht analysiert

Zur Berechnung: wenn $c_x < BG$, dann $c_x := NWG$; wenn $c_x < NWG$, dann $c_x := 0$

Die Ergebnisse der Bodenuntersuchungen der *BDF02* sind in Tab. 3–22 und Abb. 3–7 dargestellt. Für alle Probenahmezeitpunkte konnten die Substanzen TC und CTC in etwa gleichen Verhältnissen nachgewiesen werden. Die Rückstände wurden ausschließlich im humusreichen Oberboden (0–30 cm) detektiert, wohingegen im Unterboden keine der analysierten Antibiotika nachweisbar waren. OTC, TYL und Sulfonamide (STZ, SDZ, STZ, SMZ, SMR, SMPD, SDM, SMX) wurden in keiner Probe detektiert.

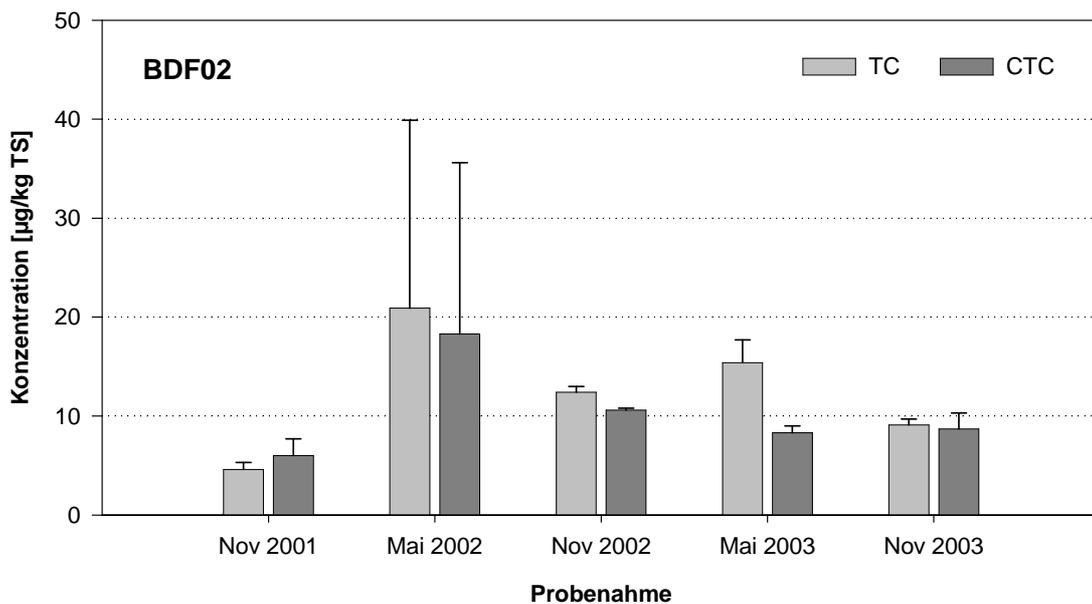


Abb. 3–7: Vorkommen von Tetracyclin und Chlortetracyclin im Oberboden einer landwirtschaftlichen Nutzfläche (*BDF02*). Ergebnisse der Feldstudie von November 2001 bis 2003.

Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus den Werten nach Tab. 3–22 der Bodentiefen 0–10 cm, 10–20 cm und 20–30 cm.

Im Vergleich zu Standort *BDF01* wurden hier während des gesamten Untersuchungszeitraums wesentlich niedrigere Konzentrationen im Boden nachgewiesen. Die Mittelwerte der Kernflächen bewegen sich nahe der Bestimmungsgrenze mit einer Spannweite von 16,4 µg/kg für TC und von 12,6 µg/kg für CTC. Zwischen den Werten der Probenahmen im Frühjahr und im Herbst bestand kein signifikanter Unterschied. Die Spitzenwerte für TC und CTC betragen 98,9 bzw. 89,3 µg/kg. Die Maximalwerte lagen somit im Bereich von 100 µg/kg, überschritten wurde dieser Wert aber nie.

3.4.2.3 Monitoringflächen *MON01–14*

Die 14 zusätzlichen Monitoringflächen (*MON01–14*) wurden ausgewählt, um eine räumliche Ausdehnung der Bodenuntersuchungen zu erzielen. Die Flächen waren im Umfeld von *BDF01* angesiedelt (Abstand Luftlinie 0,2–5 km, siehe Abb. 3–5). Bei den Böden handelte es sich ausschließlich um Sandböden (siehe Tab. 3–23). Der intensive Anbau von Mais zeigte zudem an, dass es sich um Flächen viehhaltender Betriebe handelte.

Tab. 3–23: Bodenparameter und bei der Beprobung vorhandene Feldfrüchte für die Monitoringflächen (MON)

Fläche	Bodentyp	Bodenart [#]	Feldfrucht
<i>MON01</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais
<i>MON02</i>	Gley-Podsol	Ss	Getreide
<i>MON03</i>	Gley	Ss	Mais
<i>MON04</i>	Plaggenesch über Gley	Ss	Mais
<i>MON05</i>	Gley	Ss	Mais
<i>MON06</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais
<i>MON07</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais
<i>MON08</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais
<i>MON09</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais
<i>MON10</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais
<i>MON11</i>	Plaggenesch über Gley	Sl2	Getreide
<i>MON12</i>	Gley-Podsol	Ss	Getreide
<i>MON13</i>	Gley-Podsol	Sl4	Getreide
<i>MON14</i>	Gley-Podsol	Ss	Mais

[#] Bodenartbezeichnung nach AG BODEN (1996)

Die Monitoringflächen wurden erstmalig ab Juni 2002 bis einschließlich Mai 2004 insgesamt viermal beprobt. Die Gesamtdauer der Untersuchungen betrug somit 24 Monate. Die Probenahme wurde wie unter Abschnitt 5.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Bodenproben wurden auf Tetracycline, Tylosin und Sulfonamide hin untersucht. Alle Werte wurden um die mittlere Wiederfindung im Boden korrigiert (siehe Tab. 5–9 und HAMSCHEER et al. 2002) und auf die Trockensubstanz bezogen. Die angegebenen Werte für TC und CTC stellen die Summe aus der Muttersubstanz und deren 4-Epimer dar.

Insgesamt können auf den 14 Flächen während bei des gesamten Untersuchungszeitraums von 11 untersuchten Antibiotika bis zu fünf auf einer Fläche (OTC, TC, CTC, SDZ und SMZ) nachgewiesen werden, wobei lediglich eine Fläche *MON06* keine Rückstände enthielt. In Abb. 3–8 ist die Häufigkeitsverteilung des Vorkommens aller nachgewiesenen Antibiotika nach Konzentrationsbereichen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die Sulfonamide (SDZ und SMZ) häufiger in deutlich niedrigeren Konzentrationen im Boden vorliegen als die detektierten Tetracycline (OTC, TC und CTC).

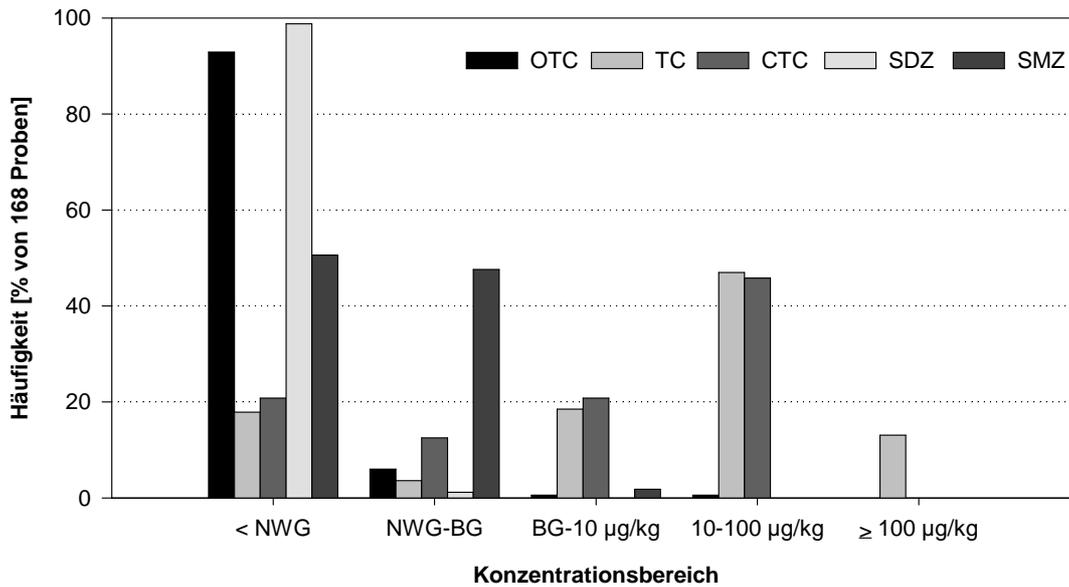


Abb. 3–8: Häufigkeitsverteilung des Vorkommens einzelner Antibiotika im Oberboden (0–30 cm Bodentiefe) der 14 Monitoringflächen bei vier Probenahmen, geordnet nach Konzentrationsbereichen.

Tab. 3–24 zeigt detailliert die Häufigkeitsverteilungen und Konzentrationsbereiche für jede einzelne Fläche. SDZ wurde lediglich bei zwei Einzelproben der Fläche *MON02* nachgewiesen. SMZ war in nahezu 50 % der untersuchten Proben nachweisbar, mit einer Maximalkonzentration von 4,5 µg/kg. Für OTC, das auf den BDF nie detektiert werden konnte, wurde für 12 Proben ein positiver Nachweis erbracht. Hier lag der höchste Wert bei 26,8 µg/kg. TC und CTC wurden wie schon auf den BDF am häufigsten und mit den höchsten Konzentrationen bestimmt. Die Konzentrationen lagen hier in annähernd 50 % der Fälle zwischen 10 µg/kg und 100 µg/kg. Der maximale CTC-Befund war 93,0 µg/kg und der maximale TC-Befund 443,2 µg/kg. Der zeitliche Konzentrationsverlauf dieser beiden Substanzen ist in Abb. 3–9 dargestellt. Daraus geht deutlich hervor, dass sich die Rückstände über einen Zeitraum von zwei Jahren auf einem vergleichbaren Niveau bewegen.

Tab. 3–24: Konzentrationsbereiche detektierter Antibiotika im Oberboden (0–30 cm Bodentiefe) der einzelnen Monitoringflächen* (MON) untersucht zwischen Juni 2002 und Mai 2004

Standort	Substanz	Anzahl [n] gesamt	Anzahl [n] > NWG	Min [µg/kg]	Median [µg/kg]	Max [µg/kg]
MON01	TC	12	12	10,1	23,2	96,3
	CTC	12	10	< 5,0	6,6	11,0
	SMZ	12	12	< 2,0	< 2,0	4,5
MON02	OTC	12	3	< 5,0	< 5,0	< 5,0
	TC	12	12	30,3	55,6	196,9
	CTC	12	12	8,5	15,5	21,6
	SDZ	12	2	< 5,0	< 5,0	< 5,0
MON03	SMZ	12	8	< 2,0	< 2,0	< 2,0
	TC	12	12	6,4	16,9	27,9
	CTC	12	12	7,2	14,1	23,1
MON04	SMZ	12	1	< 2,0	< 2,0	< 2,0
	TC	12	12	16,1	24,8	78,8
	CTC	12	12	10,2	17,8	32,2
MON05	SMZ	12	11	< 2,0	< 2,0	2,2
	TC	12	9	< 5,0	5,3	14,6
	CTC	12	11	< 5,0	5,4	16,8
MON07	TC	12	3	< 5,0	5,3	5,6
	CTC	12	1	< 5,0	< 5,0	< 5,0
MON08	TC	12	12	5,8	10,3	14,6
	CTC	12	12	7,3	10,2	18,1
	SMZ	12	9	< 2,0	< 2,0	< 2,0
MON09	TC	12	12	7,2	19,5	168,5
	CTC	12	9	< 5,0	5,3	7,2
	SMZ	12	12	< 2,0	< 2,0	< 2,0
MON10	TC	12	6	6,5	8,4	9,8
	CTC	12	9	< 5,0	6,3	23,6
	SMZ	12	1	< 2,0	< 2,0	< 2,0
MON11	OTC	12	8	< 5,0	< 5,0	26,8
	TC	12	12	35,3	73,8	350,6
	CTC	12	9	< 5,0	< 5,0	8,0
	SMZ	12	4	< 2,0	< 2,0	< 2,0
MON12	TC	12	12	13,9	44,1	116,0
	CTC	12	12	33,8	50,9	93,0
	SMZ	12	11	< 2,0	< 2,0	< 2,0
MON13	OTC	12	1	< 5,0	< 5,0	< 5,0
	TC	12	12	< 5,0	6,0	38,7
	CTC	12	12	9,1	11,9	27,1
	SMZ	12	7	< 2,0	< 2,0	< 2,0
MON14	TC	12	12	64,2	253,2	443,2
	CTC	12	12	7,3	13,7	71,3
	SMZ	12	7	< 2,0	< 2,0	< 2,0

* MON06 ohne Positivbefund; Abk.: NWG, Nachweisgrenze; Min/Max, unterer/oberer Extremwert

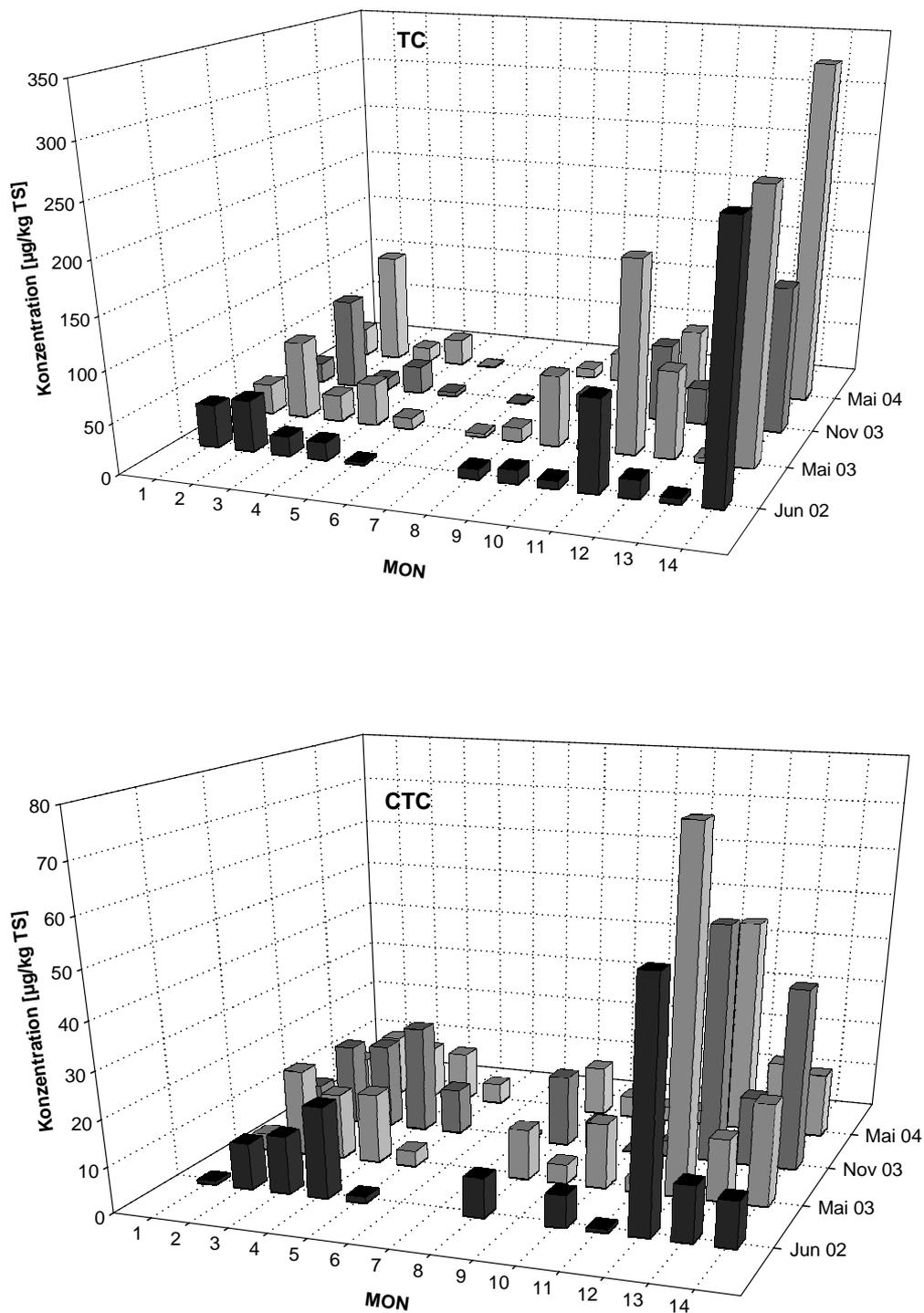


Abb. 3–9: Zeitlicher Verlauf der Tetracyclin- (oben) und Chlortetracyclinkonzentrationen (unten) im Oberboden der 14 Monitoringflächen bei vier Probenahmen von Juni 2002 bis Mai 2004.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Beprobungen für die Bodentiefen 0–10 cm, 10–20 cm und 20–30 cm

Zur Berechnung: wenn $c_x < BG$, dann $c_x = NWG$; wenn $c_x < NWG$, dann $c_x = 0$

3.4.3 Eintrag von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Sicker- und Grundwasser über Gülle und güllegedüngte Böden

3.4.3.1 Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche BDF01

Am Standort *BDF01* wurden in den Jahren 2002 bis 2004, jeweils im Frühjahr und im Herbst, an vier unabhängigen Entnahmestellen mittels Saugsonden Sickerwasserproben entnommen. Die mit einer Nylonmembran versehenen Saugsonden waren in 1,4-m-Bodentiefe lokalisiert. Aufgrund des hohen Grundwasserstandes am Standort und der Lage der Saugsonden konnte man von einer Verdünnung der Proben mit Grundwasser ausgehen, weshalb im Folgenden von oberflächennahem Grundwasser gesprochen wird. Jede gesammelte Probe wurde geteilt und parallel auf Sulfonamide und Tetracycline untersucht.

Von den sieben analysierten Sulfonamiden wurde ausschließlich SMZ nachgewiesen; die Ergebnisse für diese Substanz zeigt Abb. 3–10 (unten). Trotz niedriger Konzentrationen im Oberboden (max. 3,0 µg/kg, siehe Abschnitt 3.4.2.1) wurde SMZ relativ kontinuierlich in das oberflächennahe Grundwasser (1,40 m) eingetragen, mit Konzentrationen von maximal 0,24 µg/L. Bei einer Nachweisgrenze von 0,01 µg/L wurde lediglich bei 8 von 60 analysierten Einzelproben SMZ nicht detektiert. Bei 25 Proben war SMZ eindeutig nachweisbar und in 45 % aller Untersuchungen betrug die Konzentration mindestens 0,05 µg/L, der Bestimmungsgrenze dieser Substanz für dieses Verfahren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an oberflächennahem Grundwasser auf Tetracycline sind in Abb. 3–10 (oben) dargestellt. In den Wasserproben ließen sich trotz optimierter Probenahme zunächst keine Tetracycline oberhalb der Nachweisgrenze von 0,05 µg/L detektieren. Erstmals konnte während der Sammelperiode im Winter 2003 bei drei aufeinander folgenden Probenahmezeitpunkten TC bis zu einer maximalen Konzentration von 0,14 µg/L detektiert werden (siehe Abb. 3–10 oben und Abb. 3–11). Die Befunde bei den folgenden zwei Probenahmen im Frühjahr 2004 waren dagegen wiederum negativ. In Abb. 3–11 ist das rekonstruierte Ionenchromatogramm und das zugehörige Massenspektrum einer Probe, deren TC-Gehalt mit 0,1 µg/L quantifiziert wurde, dargestellt. Als Identifizierungskriterien wurden hier sogar die strengen Maßgaben der Entscheidung 2002/657/EG zugrundegelegt, welche lediglich für den Lebensmittelsektor verpflichtend sind.

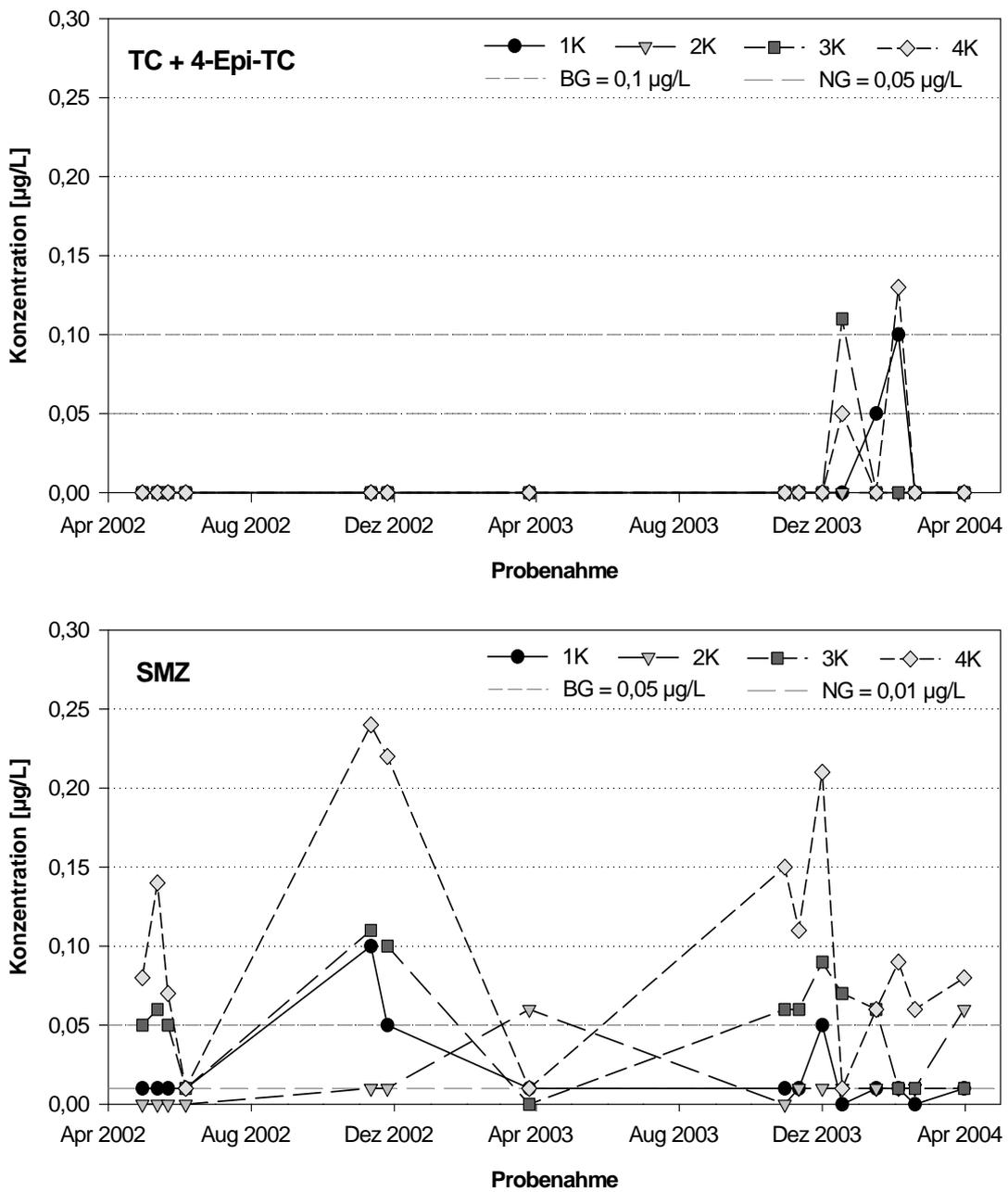


Abb. 3–10: Eintrag von Tetracyclin (oben) und Sulfamethazin (unten) in oberflächennahes Grundwasser (1,40 m Bodentiefe). Ergebnisse der Grundwasserbeprobung mit Saugsonden aus Nylon (K) von Frühjahr 2002 bis 2004 an den vier unabhängigen Entnahmestellen 1–4 des Standortes *BDF01*.

Zur Berechnung: wenn $c_x < BG$, dann $c_x := NWG$; wenn $c_x < NWG$, dann $c_x := 0$

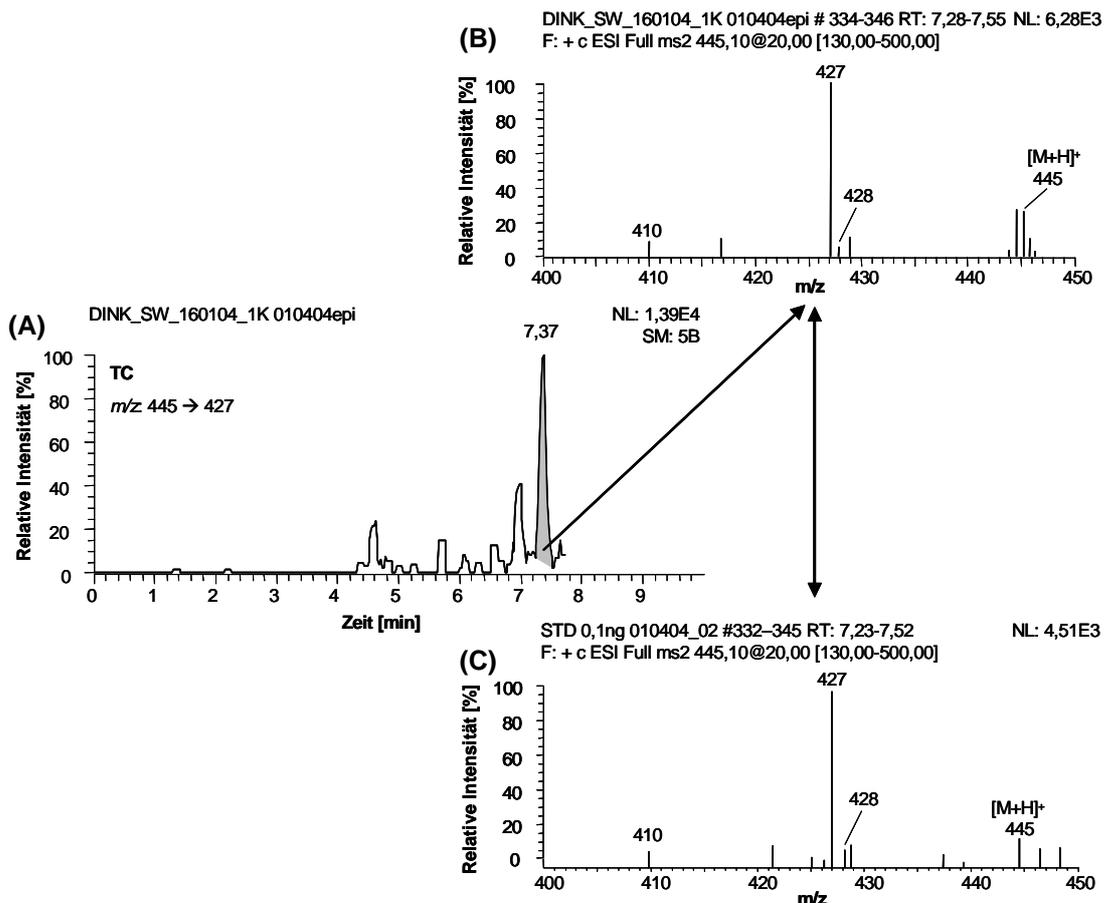


Abb. 3–11: Analyse einer Wasserprobe (oberflächennahes Grundwasser) auf Tetracyclin mittels HPLC-ESI-MS/MS.

(A) Rekonstruiertes Ionenchromatogramm einer Probe (*BDF01*; Probenahme: 16.01.2004; Entnahmestelle: 1K) die 0,1 µg/L TC enthält.

(B) Dazugehöriges MS/MS-Spektrum dieser Probe.

(C) Referenzspektrum einer methanolischen Standardlösung mit einer Absolutmasse von 0,1 ng TC.

Trennsäule *Waters* „Puresil C18“ (150 × 4,6 mm, 5 µm), Fließmittel A/B, Fluss 1 mL/min, Gradient 1, MS/MS-Modus auf *m/z* 445 (TC) (Methode 2)

3.4.3.2 Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche *BDF02*

Am Standort *BDF02* wurde während des Untersuchungszeitraums oberflächennahes Grundwasser mittels Peilbrunnen sowie Saugsonden gesammelt und auf Tetracycline und Sulfonamide untersucht.

In den analysierten Wasserproben, die über Peilbrunnen in einer Tiefe von 2,5 m bzw. 3,5 m unter der Geländeoberfläche gezogen wurden, konnten keine Tetracycline nachgewiesen werden. Dagegen war in allen analysierten Proben SMZ mit einer maximalen Konzentration von 0,09 µg/L nachweisbar (siehe Tab. 3–25).

Tab. 3–25: Ergebnisse der Grundwasserbeprobung über Peilbrunnen (P) im Herbst 2002 und im Frühjahr 2003 am Standort BDF02

Probenahme	Sonde	Sondenart	GW [m]	SMZ [$\mu\text{g/L}$]	SA* [$\mu\text{g/L}$]	TC [§] [$\mu\text{g/L}$]
19.11.2002	P1	Teflon	2,00–2,50	< 0,05	n. n.	n. n.
19.11.2002	P2	Teflon	2,00–2,50	< 0,05	n. n.	n. n.
19.11.2002	P3	Teflon	1,95–2,50	< 0,05	n. n.	n. n.
28.04.2003	P1	Teflon	2,05–3,50	0,09	n. n.	n. n.
28.04.2003	P2	Teflon	2,00–3,50	0,09	n. n.	n. n.
28.04.2003	P3	Teflon	2,10–3,50	n. a.	n. a.	n. a.

* Sulfonamide (SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SDM, SMX)

§ Tetracycline (OTC, TC, CTC)

Abk.: GW, Grundwasserstand; n. n., nicht nachweisbar; n. a., nicht analysiert

Tab. 3–26: Ergebnisse der Sickerwasserbeprobung über Saugsonden aus Nylon (K) im Frühjahr und Herbst 2003 sowie im Frühjahr 2004 am Standort BDF02

Probenahme	Sonde	Sondenart	Tiefe [m]	SMZ [$\mu\text{g/L}$]	SA* [$\mu\text{g/L}$]	TC [§] [$\mu\text{g/L}$]
17.04.2003	K1	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
17.04.2003	K2	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
17.04.2003	K3	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
17.04.2003	K4	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
29.04.2003	K1	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. a.
29.04.2003	K2	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
29.04.2003	K3	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
29.04.2003	K4	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. a.
30.10.2003	K1	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
30.10.2003	K2	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
30.10.2003	K3	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
30.10.2003	K4	Nylon	1,2	< 0,05	n. n.	n. n.
04.02.2004	K1	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. a.
04.02.2004	K2	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
04.02.2004	K3	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
04.02.2004	K4	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
18.02.2004	K1	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. a.
18.02.2004	K2	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
18.02.2004	K3	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
18.02.2004	K4	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
04.03.2004	K1	Nylon	1,2	n. a.	n. a.	n. a.
04.03.2004	K2	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
04.03.2004	K3	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. n.
04.03.2004	K4	Nylon	1,2	n. n.	n. n.	n. a.

* Sulfonamide (SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SDM, SMX)

§ Tetracycline (OTC, TC, CTC)

Abk.: n. n., nicht nachweisbar; n. a., nicht analysiert

Die Untersuchung der zu einem späteren Zeitpunkt gesammelten Sickerwässer dieser Fläche führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (siehe Tab. 3–26). Bei insgesamt 15 analysierten Proben wurden wiederum keine Tetracycline oberhalb der Nachweisgrenze von 0,05 µg/L detektiert, gleichzeitig war Sulfamethazin in mehr als 50 % der Sickerwässer nachweisbar.

3.4.4 Ergänzende Modellversuche zur Untersuchung der Sorptionsprozesse von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden

Zur Bestimmung der Mobilität von matrixgebundenen Rückständen wurden in Anlehnung an die *OECD Richtlinie 106* (OECD 2000) Adsorptions-/Desorptions-Experimente entwickelt. Als Testmatrix wurde ein Sandboden mit originären TC (316 µg/kg) und SMZ-Rückständen (1,86 µg/kg) verwendet (siehe Abschnitt 5.2.3.7). Der in der Richtlinie beschriebene Hintergrundelektrolyt ist eine 0,01 M CaCl₂-Lösung. Da Tetracycline zur Komplexbildung mit zweiwertigen Metall-Ionen neigen und dadurch eine Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten war, wurden die Versuche gleichzeitig mit Regenwasser (siehe Abschnitt 5.2.3.7) als Simulationslösung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Desorptionsexperimente sind in Tab. 3–27 dargestellt. Hieraus war erstens ersichtlich, dass der Hintergrundelektrolyt für die Desorption von TC einen signifikanten Einfluss ausübt, wohingegen die Desorption von SMZ davon unbeeinflusst bleibt. Zweitens zeigte sich, dass SMZ eine 20-fach höhere Mobilität aufweist als TC, das trotz höherer Rückstandskonzentration annähernd nicht extrahiert werden konnte.

Tab. 3–27: Mobilität für Tetracyclin und SMZ in Sandboden ermittelt durch Desorptionsexperimente

Substanz	Rückstands-konzentration [µg/kg Boden]	Experiment 1		Experiment 2	
		Desorbierte Konzentration [µg/kg]	Mobilität [%]	Desorbierte Konzentration [µg/kg]	Mobilität [%]
Methode A (Regenwasser)					
TC	316,0 ± 122,2	1,4 ± 1,3	0,4 ± 0,3	1,0 ± 0,7	0,3 ± 0,1
SMZ	1,86 ± 0,51	0,16 ± 0,09	8,4 ± 3,6	0,14 ± 0,11	7,9 ± 5,1
Methode B (0,01 M CaCl₂)					
TC	316,0 ± 122,2	1,4 ± 1,3	n. d.	1,0 ± 0,7	n. d.
SMZ	1,86 ± 0,51	0,15 ± 0,06	8,8 ± 4,1	0,15 ± 0,04	8,7 ± 3,3

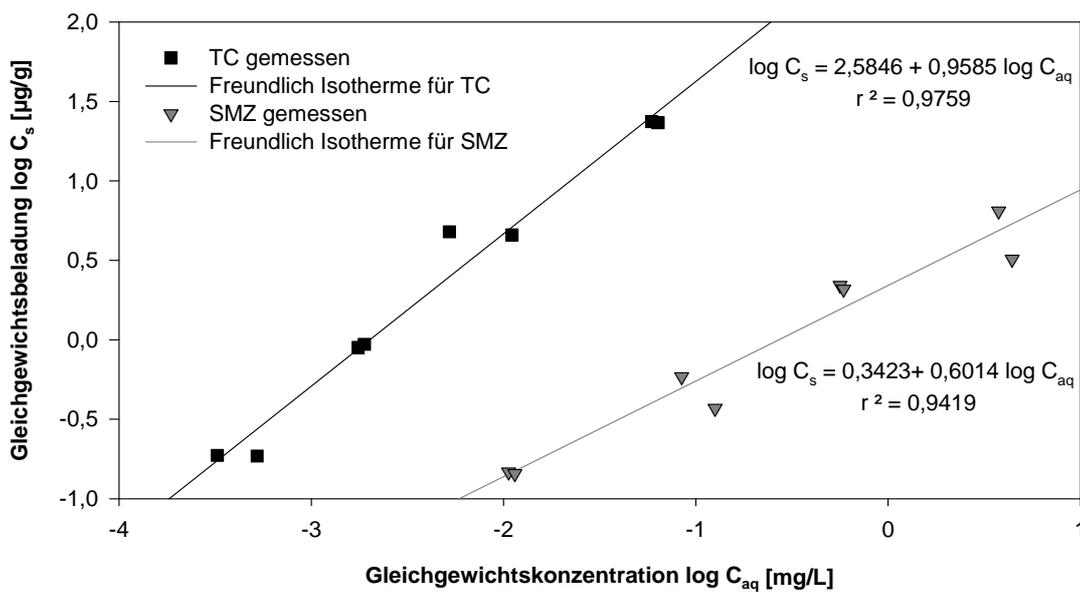


Abb. 3–12: Doppelt logarithmische Darstellung der *Freundlich*-Isotherme für die Adsorption von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden ($\log C_s = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{aq}$).

Dargestellt sind die logarithmierten Gleichgewichtskonzentrationen der um die Hintergrundkonzentrationen korrigierten Ergebnisse. Es wurden eine Leerlösung und vier Ausgangslösungen von 0,04 mg/L, 0,2 mg/L, 1,0 mg/L und 5,0 mg/L der Substanzen in Regenwasser hergestellt. Die Versuche wurden für die nicht-modifizierte Matrixprobe und für jede Konzentrationsstufe in Doppelbestimmung durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse der Desorptionsexperimente, wurde zur nachfolgenden Bestimmung der Adsorptionskoeffizienten das Regenwasser als der zweckmäßigste und praxisnaheste Hintergrundanalyt angesehen. Die Freundlich-Isotherme lieferten für beide Substanzen reproduzierbare Ergebnisse (siehe Abb. 3–12). Die Bestimmtheitsmaße der beiden Regressionen deuten auf einen linearen Zusammenhang für beide Verbindungen hin. Die ermittelten K_f -Werte (siehe Tab. 3–28) sind dabei in qualitativer Hinsicht vergleichbar mit denen in der Literatur beschriebenen (TOLLS 2001), die grundsätzlich auf Basis der *OECD Richtlinie 106* (OECD 2000) erstellt wurden.

Tab. 3–28: Ergebnisse der *Freundlich*-Parameter* aus der Berechnung linearer Regressionen für die Adsorptionsisothermen von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden

Substanz	K_f [L/kg]	1/n	r^2
TC	384,2	0,9585	0,9759
SMZ	2,2	0,6014	0,9419

* K_f , *Freundlich*sche Adsorptionskonstante; n, Linearitätsfaktor (n = 1: linear)

Abk.: r^2 , Bestimmtheitsmaß der Regression

Insgesamt bestätigten diese Modellversuche die Beobachtungen der Felduntersuchungen (siehe Abschnitte 3.4.2.1–3.4.2.2, 3.4.3). Für SMZ wurde in dem Sandboden eine geringe Sorptionsneigung als für TC und damit eine größere Mobilität festgestellt. Dagegen wurde TC sehr stark an die Bodenmatrix gebunden und zeigte damit eine geringere Mobilität.

3.5 Aquakulturen

Im Rahmen einer Screening-Studie „Aquakulturen in Niedersachsen“ koordiniert vom *Veterinärinstitut für Fische und Fischwaren Cuxhaven* des *Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)* wurden bei 15 Fischhaltungsbetrieben mit Forellenteichwirtschaft Proben von Teichwässern und -sedimenten entnommen (siehe Tab. 3–29). Insgesamt wurden 15 Wasser- und 10 Sediment-Proben auf Rückstände von Tetracyclin- und Sulfonamidantibiotika untersucht. Die Wasserproben wurden mittels SPE (siehe Abschnitt 5.5.1.1) und die Sedimentproben mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion (siehe Abschnitt 5.5.2.1) aufgearbeitet jede und jede Probe mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methoden 2–3 und 5, siehe Abschnitt 5.1.4.5) einfach analysiert. In allen untersuchten Wasserproben lagen die Sulfonamid- und Tetracyclinkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenzen (0,01 µg/L bzw. 0,05 µg/L). Ebenso waren keine Sulfonamide in den analysierten Sedimentproben nachweisbar (NWG: 0,5–1,0 µg/kg). In 4 von 10 untersuchten Teichsedimenten wurden OTC und/oder CTC nachgewiesen, wohingegen TC in keiner Probe detektiert wurde (siehe Tab. 3–30).

Tab. 3–29: Standortbeschreibungen der untersuchten Aquakulturen in Niedersachsen

Standort	Betriebsgröße (Jahresproduktion) [t/a]	Nutzung	Anwendung von TAM vor der Beprobung	Probenahme	
				Sediment [†]	Wasser [‡]
Aqua01	> 50	gewerblich	< 3 Monate (TMP/SA)	√	√
Aqua02	10–20	gewerblich	< 12 Monate	√	√
Aqua03	25–50	gewerblich	< 12 Monate	√	√
Aqua04	5–10	gewerblich	nein	√	√
Aqua05	< 5	Forschung	nein	√	√
Aqua06	25–50	gewerblich	6–12 Monate (TMP/SA)	n. b.	√
Aqua07	10–25	gewerblich	nein	n. b.	√
Aqua08	10–25	gewerblich	> 12 Monate	n. b.	√
Aqua09	< 5	Hobby	nein	n. b.	√
Aqua10	25–50	gewerblich	< 6 Monate	√	√
Aqua11	25–50	gewerblich	nein	√	√
Aqua12	25–50	gewerblich	nein	n. b.	√
Aqua13	> 50	gewerblich	> 12 Monate (TMP/SA)	√	√
Aqua14	5–10	gewerblich	6–12 Monate	√	√
Aqua15	25–50	gewerblich	nein	√	√

[†] Beprobung mit Sedimentstecher

[‡] Beprobung von Teichwasser, nicht im Bereich der Zu- oder Abläufe

Abk.: TAM, Tierarzneimittel; TMP/SA, Trimethoprim/Sulfonamid-Präparat; n. b., nicht beprobt, da Betonteich

Tab. 3–30: Antibiotikakonzentrationen in Teichsedimenten und –wässern bei Aquakulturen in Niedersachsen

Standort	Sediment				Teichwasser	
	OTC [µg/kg TS]	TC [µg/kg TS]	CTC [µg/kg TS]	SA [†] [µg/kg TS]	TC [‡] [µg/L]	SA [†] [µg/L]
<i>Aqua01</i>	n. n.	n. n.	< 5,0	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua02</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua03</i>	18,5	n. n.	< 5,0	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua04</i>	n. n.	n. n.	25,8	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua05</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua06</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua07</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua08</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua09</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua10</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua11</i>	7,0	n. n.	6,8	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua12</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua13</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua14</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<i>Aqua15</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.

[†] Sulfonamide (SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SDM, SMX)

[‡] Tetracycline (OTC, TC, CTC)

Abk.: n. n., nicht nachweisbar

3.6 Feldstudien zum Vorkommen von Tetracyclinen, Sulfonamiden, Tylosin und Chloramphenicol in Stallstäuben

3.6.1 Schweinemastbetrieb

Der Schweinemastbetrieb mit einer Besatzzahl von 350–420 Mastschweinen (60–110 kg Lebendgewicht) wurde in den Jahren 1981–2000 kontinuierlich beprobt. Es wurden ausschließlich Sedimentationsstäube gesammelt. Die Probenahme erfolgte nach der in Abschnitt 5.5.1 beschriebenen Methode im Abstand von 14–28 Tagen. Innerhalb eines Jahres wurden so 10–15 Proben gesammelt, von denen jeweils eine Probe zur Analyse zufällig ausgewählt wurde. Die Staubproben wurden in Doppelbestimmung mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.5.4.1) und jede Teilprobe mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methoden 1–4, siehe Abschnitt 5.1.4.5) einfach analysiert. Mit Ausnahme von CAP (siehe unten), wurden alle Analyten über eine externe Standardkalibrierung bestimmt und die Ergebnisse um die substanzspezifischen mittleren Wiederfindungsraten korrigiert.

Bei der CAP-Analyse kam es aufgrund eines Matrixeffektes, zu einer signifikanten Signalerhöhung um den Faktor 2–3 (siehe Abschnitt 3.3.3.1). Die drei CAP-positiven Proben wurden deshalb mittels Standardaddition (siehe Abb. 3–13) bestimmt. Zur Absicherung dieser Befunde wurde für die im MS/MS-Modus CAP-positiven Proben zusätzlich ein MS³-Experiment durchgeführt (Methode 4, siehe Abschnitt 5.1.4).

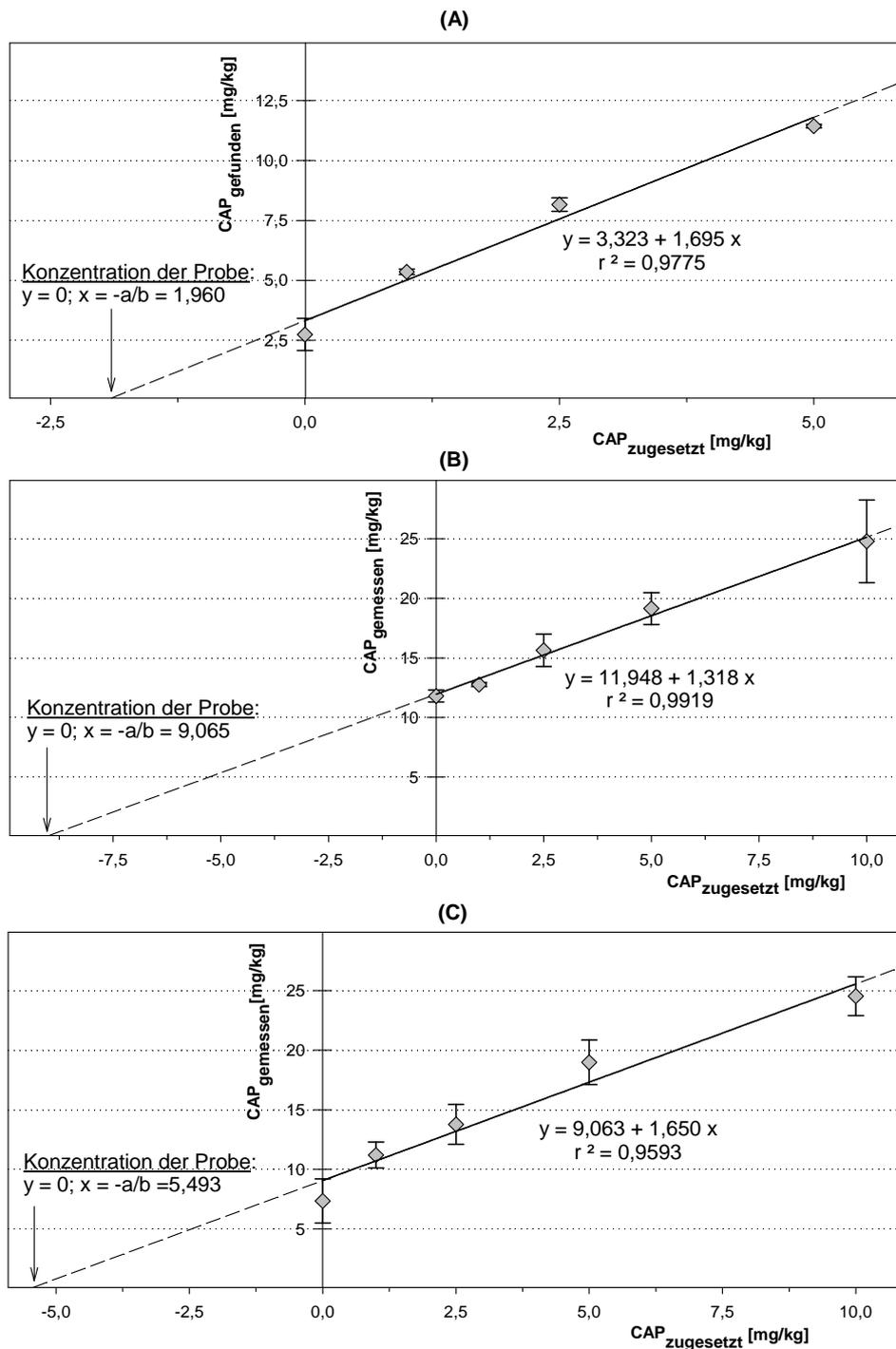


Abb. 3–13: Standardadditionsverfahren zur Bestimmung von Chloramphenicol in Stäuben.

(A) Staubprobe aus dem Jahr 1989, dotiert mit CAP zu Konzentrationen von 1 mg/kg, 2,5 mg/kg und 5 mg/kg Staub.

(B) Staubprobe aus dem Jahr 1991, dotiert mit CAP zu Konzentrationen von 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg und 10 mg/kg Staub.

(C) Staubprobe aus dem Jahr 1992, dotiert mit CAP zu Konzentrationen von 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg und 10 mg/kg Staub.

Die Ergebnisse dieser retrospektiven Studie sind in Tab. 3–32 und Abb. 3–14 dargestellt. In 18 von insgesamt 20 Proben wurden bis zu fünf verschiedene Antibiotika nachgewiesen. Die berechneten Gesamtkonzentrationen lagen dabei zwischen 0,2 mg/kg und 12,5 mg/kg Staub. Chromatogramme und Massenspektren einer Teilprobe, in der fünf Antibiotika detektiert wurden, sind bereits in Abb. 3–4 gezeigt worden. In 80 % der Proben wurde TYL nachgewiesen, wovon in drei Proben Konzentrationen > 5 mg/kg bestimmt wurden. In 13 Proben war SMZ mit Konzentrationen bis zu 2,9 mg/kg vorhanden. In 12 Proben war mindestens eines der Tetracycline quantifizierbar, die Konzentrationen bewegten sich hier zwischen 0,2 und 5,2 mg/kg. Indessen konnte in drei Proben CAP auf einem Niveau von 2,0–9,1 mg/kg bestimmt werden. Lediglich bei zwei Probenahmen waren keine Antibiotika nachweisbar.

Tab. 3–31: Antibiotika-Rückstände in Schweinestall-Staub

Die dargestellten Konzentrationen sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Bestimmungen, welche um die substanzspezifischen, mittleren Wiederfindungsraten korrigiert wurden.

PN [Jahr]	OTC [mg/kg]	TC* [mg/kg]	CTC* [mg/kg]	TYL [mg/kg]	CAP [mg/kg]	SMZ [mg/kg]
1981	1,10 \pm 0,20	n. n.	n. n.	0,42 \pm 0,01	n. n.	1,85 \pm 1,03
1982	0,18 \pm 0,03	n. n.	n. n.	0,09 \pm 0,13	n. n.	0,06 \pm 0,02
1983	n. n.	0,19 \pm 0,11	2,12 \pm 0,12	5,65 \pm 0,50	n. n.	2,90 \pm 1,51
1984	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
1985	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
1986	n. n.	n. n.	n. n.	12,18 \pm 1,32	n. n.	0,32 \pm 0,19
1987	n. n.	n. n.	n. n.	8,72 \pm 4,28	n. n.	0,39 \pm 0,29
1988	n. n.	n. n.	n. n.	0,72 \pm 0,03	n. n.	0,43 \pm 0,03
1989	n. n.	n. n.	n. n.	0,45 \pm 0,06	1,96 [#]	0,34 \pm 0,35
1990	n. n.	n. n.	n. n.	0,14 [§]	n. n.	0,09 \pm 0,01
1991	0,43 \pm 0,04	n. n.	0,32 \pm 0,04	0,26 \pm 0,02	9,07 [#]	0,41 \pm 0,08
1992	n. n.	n. n.	n. n.	0,35 \pm 0,04	5,49 [#]	0,05 \pm 0,01
1993	n. n.	0,19 \pm 0,01	n. n.	0,10 \pm 0,01	n. n.	0,12 \pm 0,03
1994	n. n.	0,23 \pm 0,03	n. n.	0,37 \pm 0,01	n. n.	0,12 [§]
1995	n. n.	0,37 \pm 0,06	0,52 \pm 0,02	0,29 [§]	n. n.	n. n.
1996	0,29 \pm 0,08	5,18 \pm 0,36	n. n.	0,55 \pm 0,07	n. n.	0,16 \pm 0,01
1997	n. n.	0,47 \pm 0,18	n. n.	0,16 \pm 0,05	n. n.	n. n.
1998	n. n.	0,50 \pm 0,06	n. n.	0,20 \pm 0,08	n. n.	n. n.
1999	n. n.	0,61 \pm 0,01	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
2000	n. n.	0,19 \pm 0,03	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.

inklusive des 4-Epimers

[§] keine Angabe der Standardabweichung (SA), da berechnete SA = 0

[#] Standardadditionsverfahren

Abk.: PN, Probenahme; n. n., nicht nachweisbar

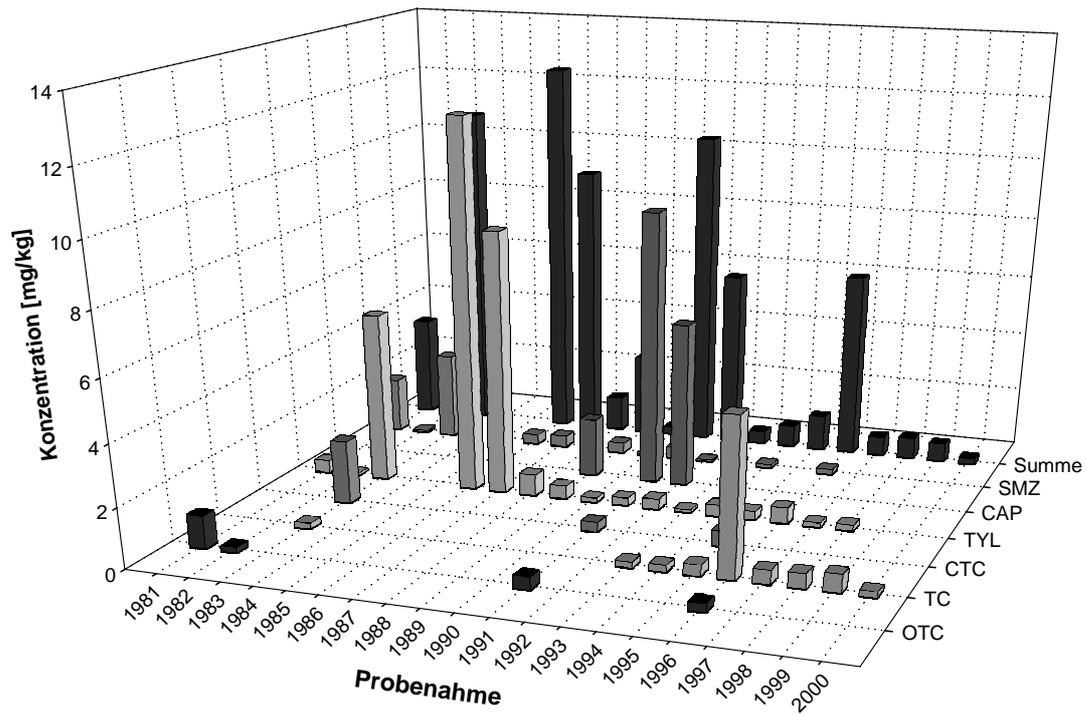


Abb. 3–14: Zeitlicher Verlauf und Verhältnis der Antibiotika-Konzentrationen in Stäuben eines Schweinmastbetriebes von 1981–2000.

Dargestellt ist die Gesamtkonzentration aus den Mittelwerten der einzelnen Antibiotika nach Tab. 3–31.

3.6.2 Legehennenstall

Die untersuchten Staubproben aus dem Legehennenstall wurden im Jahr 1983 an vier Probenahmezeitpunkten innerhalb zweier Monate gesammelt. Auch hier handelte es sich um Sedimentationsstäube, die Probenahme und Lagerung der Proben erfolgte wie unter Abschnitt 5.7.4 beschrieben. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung mit Flüssig/Flüssig-Extraktion aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.5.4.1) und jede Teilprobe einfach mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methoden 1–3, siehe Abschnitt 5.1.4.5) analysiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 3–15 gezeigt. In allen Proben lagen TYL und SMZ nebeneinander vor. Über einen Zeitraum von knapp acht Wochen war eine konstante Antibiotika-Belastung von 0,16–0,20 mg/kg zu beobachten, während sich das Verhältnis der beiden Rückstände untereinander änderte.

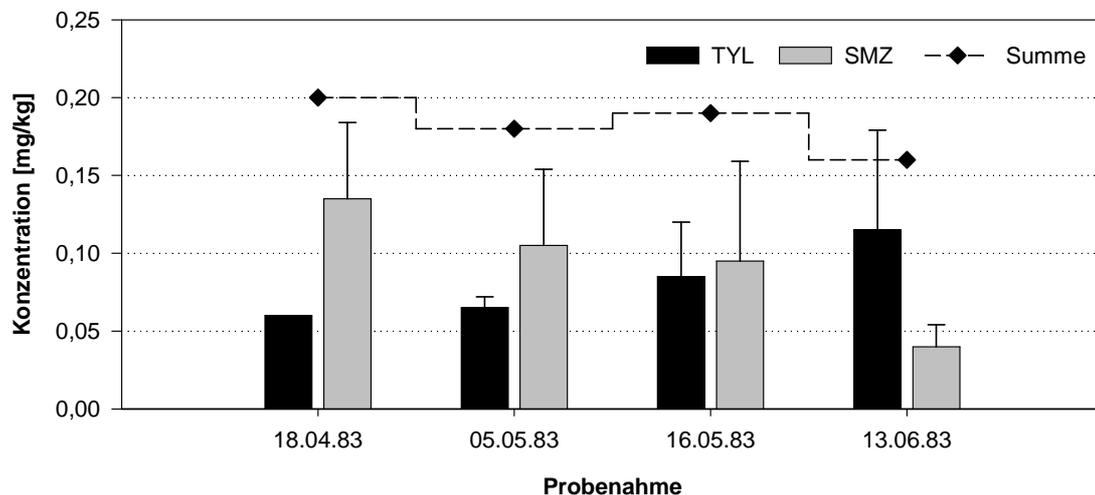


Abb. 3–15: Zeitlicher Verlauf und Verhältnis der Antibiotikakonzentrationen in Stäuben eines Legehennenstalls aus dem Jahr 1983.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Bestimmungen sowie die Gesamtkonzentration als Summe dieser Mittelwerte.

4 Diskussion

4.1 Analytische Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden in verschiedenen Umweltmatrices

HAMSCHER et al. (2002) beschrieben ein sensitives und selektives HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Tetracyclinen und Tylosin in Gülle (nicht anwendbar für TYL), Sandboden, und Sicker- und Grundwasser. Es gelang bei Anwendung derselben Probenvorbereitung und nach Anpassung des HPLC-Gradienten sowie Modifikation der ESI-MS/MS-Methode das beschriebene Verfahren auch auf die Substanzgruppe der Sulfonamidantibiotika zu übertragen. Neben den Leitsubstanzen Sulfadiazin (SDZ) und Sulfamethazin (SMZ) wurden weitere, in der Veterinärmedizin relevante Einzelsubstanzen (STZ, SMR, SMPD, SDM) sowie mit Sulfamethoxazol (SMX) ein vor allem in der Humanmedizin eingesetzter Wirkstoff ausgewählt.

4.1.1 Extraktionsverfahren

Der kritische Punkt, den es bei der Entwicklung der Probenvorbereitung für die Sulfonamide zu berücksichtigen galt, war ihr amphoterer Charakter. Die substanzabhängigen pK_a -Werte der Sulfonamide reichen von 5,7–7,4 für die Sulfonamino- pK_{a1} und von 1,8–2,3 für die Anilingroupen (pK_{a2}). Die Sulfonamide liegen daher bei einem $pH \leq 2$ als Kation vor und bei $pH \geq 5$ als Anion (siehe Tab. 1–8, Abschnitt 1.5.2). Die Löslichkeit in organischen Lösemitteln ist am isoelektrischen Punkt am größten, da die Verbindungen dort ladungsneutralisiert vorliegen. Folglich ist auch die Wechselwirkung mit unpolaren Polymerphasenmaterialien bei der SPE im ladungsneutralen Zustand am größten. Der Ladungszustand der Sulfonamide ist pH-abhängig, die pK_a -Werte der einzelnen Sulfonamide umspannen einen relativ großen Bereich, deshalb kann eine Multimethode nie für alle Verbindungen optimale Ergebnisse bringen.

Unter Beachtung dieser physiko-chemischen Maßgaben galt es die bereits entwickelten Extraktionsverfahren (HAMSCHER et al. 2002) für Tetracycline und Tylosin aus Sandboden, Gülle (nicht anwendbar für TYL) sowie Sicker- und Grundwasser auf die Substanzgruppe der Sulfonamide zu übertragen. Für die Separation der Sulfonamide aus Gülle- und Bodenproben war die bereits zur Analyse der Tetracycline eingesetzte (HAMSCHER et al. 2002) Flüssig/Flüssig-Extraktion mit 1 M Citratpuffer ($pH 4,7$) und Essigsäureethylester ohne Änderungen anwendbar. Bei

diesen schwach sauren Extraktionsbedingungen konnten einerseits Matrix-Wechselwirkungen zurück gedrängt werden und die Sulfonamide waren bei pH 4,7 gleichzeitig unpolar genug, um mit dem organischen Lösemittel extrahiert werden zu können. Der Vorteil bei der Verwendung von Essigsäureethylester lag darin, dass in dem Citratpuffer gelöste Salze und hydrophile Matrixbestandteile nicht mit extrahiert werden (THURMAN und MILLS 1998). Dies verminderte eine mögliche matrixbedingte Signalunterdrückung bei der späteren HPLC-ESI-MS-Analytik (siehe Abschnitt 4.3.2). Somit gelang es mit nur einem Aufarbeitungsverfahren bis zu elf Antibiotika dreier Substanzgruppen zu erfassen und der Analyse zugänglich zu machen.

Für die SPE konnte ebenfalls die für die Tetracyclinanalytik verwendete Polymerphase *Bakerbond SDB-1* verwendet werden. Während C18-Kartuschen gerade geladene Moleküle nur wenig zurückhalten, können von Polymerphasen geladene, neutral polare sowie unpolare Verbindungen retardiert werden (THURMAN und MILLS 1998) und werden daher gerade für Multimethoden verstärkt eingesetzt (LOPEZ DE ALDA et al. 2003). Die für die Tetracyclinanalytik beschriebene Vorelution mit Methanol zur Entfernung von Matrixinterferenzen (HAMSCHEER et al. 2002) führte für die Sulfonamidanalytik schon zu signifikanten Analytverlusten, womit zur Analyse beider Substanzgruppen zwei separate Extraktionen nötig wurden. Die Tendenz der verwendeten *Bakerbond SDB-1*-Kartuschen zur Adsorption von gelösten Huminstoffen ist für pH 7 am geringsten und nimmt für fallende pH-Werte zu (PICHON et al. 1996). Dies scheint aber für den Fall der Sulfonamide keinen nachteiligen Effekt zu haben. PIETSCH et al. (1999) berichten bei der Anreicherung von acht Sulfonamiden an *Bakerbond SDB-1*-Kartuschen von vergleichbaren idealen Extraktionsbedingungen bei pH 5,1 und der Elution mit Methanol/Acetonitril (50:50; v/v). Die Matrixinterferenzen werden auch durch das geringe Probenvolumen von 25 mL minimiert, da gerade bei der Anreicherung großer Probenvolumina koextrahierende Humusstoffe sowohl bei der HPLC als auch bei der SPE als große, unaufgelöste Peaks eluieren können (PICHON et al. 1996).

Im Hinblick auf eine Weiterentwicklung der Methode sollte zukünftig angestrebt werden, beide Substanzgruppen mit nur einem SPE-Verfahren zu erfassen. Neuerdings wurden vermehrt Tandem-SPE-Methoden gerade für die Anreicherung matrixreicher Abwässer oder Oberflächengewässer entwickelt (BLACKWELL et al. 2004; RENEW und HUANG 2004). Hier werden gezielt durch eine vorgeschaltete Anionenaustauscher-(SAX)-Kartusche dissoziierte natürliche organische Bestandteile, vornehm-

lich Fulvin- und Humussäuren, entfernt. Durch die Anreicherung größerer Probenvolumina könnten zudem niedrigere Bestimmungsgrenzen erzielt werden.

4.1.2 HPLC-ESI-MS/MS

Während der HPLC-MS-Messung können sich Matrixbestandteile im Bereich des Probeneinlasses, insbesondere bei der Ionen-Transferkapillare festsetzen und so einen signifikanten Empfindlichkeitsverlust des Messgerätes bewirken. Eine gängige Praxis ist es deshalb, über einen variablen Split nur den relevanten Bereich, während dem die Analyten eluieren, in das Massenspektrometer eintreten zu lassen (GÖBEL et al. 2004; RENEW und HUANG 2004; HALLER et al. 2002). Der Matrixanteil kann aber auch über das Injektionsvolumen reguliert werden. Je höher das injizierte Probenvolumen, desto größer ist auch der Anteil der mit geführten Matrixbestandteile. Gleichzeitig führen maximal injizierte Probenvolumina auch zu einem maximalen Anreicherungsfaktor des Analyten wodurch niedrigere Nachweisgrenzen erzielt werden können. Als Mittelweg zwischen niedrigen Nachweisgrenzen und Vermeidung von Empfindlichkeitsverlusten durch Ionensuppression werden bei den matrixreichen Gülle-Extrakten und erwartungsgemäß hohen Rückstandskonzentrationen (mg/kg-Bereich) standardmäßig nur 2 μL injiziert. Bei den matrixärmeren Boden- und Sickerwasserproben werden standardmäßig 8 μL injiziert, um Nachweisgrenzen im unteren $\mu\text{g/kg}$ - bzw. $\mu\text{g/L}$ -Bereich zu erreichen.

Bei der Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie kann grundsätzlich zwischen den Interfacetechniken ESI und APCI gewählt werden. Die meisten in der Umweltanalytik beschriebenen Methoden basieren auf der ESI⁺-Ionisierung (LINDSEY et al. 2001; YANG et al. 2004). Vereinzelt wurde APCI⁺-Ionisierung, aufgrund der geringeren Matrixanfälligkeit als die effektivere Methode erachtet (PFEIFER et al. 2002). Im Rahmen der Methodenentwicklung zeigte sich, dass mit der ESI-Ionisierung im Positivmodus alle sieben Sulfonamide empfindlich detektiert werden können. Gleichzeitig waren mit der Wahl dieser Methode weitere Vorteile verbunden. Zunächst wurde durch die Anwendung der ESI-Ionisierung ein zeitaufwändiger Wechsel der Ionisierungsquelle vermieden. Zusätzlich ermöglichte die Verwendung des gleichen Fließmittelsystems kurze Äquilibrierzeiten. Damit konnten die Sulfonamide prinzipiell in Serie mit den Tetracyclinen (Ionisierung: ESI⁺) analysiert werden (HAMSCHEER et al. 2002), was eine erheblich Erleichterung bei der angestrebten Nutzung als Multimethode darstellte.

Die Fragmentspektren zeigen das für die Sulfonamide typische Fragmentierungsmuster. So können für alle Sulfonamide die typischen Produktionen von m/z 156 und m/z 108 registriert werden (KLAGKOU et al. 2003). Es zeigte sich, dass die Nachweisempfindlichkeit abhängig von der Anzahl der zu registrierenden Fragmentationen ist. Sulfamethoxazol wies mit der größten Anzahl an Fragmenten auch die geringste Nachweisempfindlichkeit aller Sulfonamide auf. Die Ionenausbeute bei der Ionisierung war dabei für Sulfamethazin mindestens zweifach höher als für alle anderen Sulfonamide. Daraus resultierte die größere Sensitivität der Methode für Sulfamethazin. Diese größere Sensitivität der HPLC-ESI-MS/MS-Methode für Sulfamethazin resultierte in niedrigeren Bestimmungsgrenzen der matrixabhängigen Gesamtmethoden.

4.1.3 Methodvalidierung

4.1.3.1 Gülle

Das Analysenverfahren für die sieben Sulfonamide in Gülle lieferte mittlere Wiederfindungsraten von 72–108 % bei Variationskoeffizienten von durchweg kleiner 10 % (siehe Tab. 3–3, Abschnitt 3.1.3.1). Die Spannweite in den Wiederfindungsraten kann mit den unterschiedlichen pK_a -Werten der Sulfonamide erklärt werden (PIETSCH et al. 1999). Die Bestimmungsgrenzen waren für für Sulfamethazin 0,02 mg/kg und für alle anderen Sulfonamide 0,05 mg/kg.

Vergleichbare Ergebnisse erzielten HALLER et al. (2002) mit der Kombination von LLE und HPLC-MS zur Analyse von sechs Sulfonamiden und Trimethoprim in Gülle (WDF = 47–89 %, CV < 5 %; BG = 0,1 mg/kg). Allerdings ist das Extraktionsverfahren weitaus aufwendiger als das hier beschriebene. PFEIFER et al. (2002) quantifizieren fünf Sulfonamide, einen Acetyl-Metaboliten und Trimethoprim mit HPLC-APCI-MS/MS etwa um den Faktor 10 niedriger. Dies ist aber in erster Linie auf die Messung mit einem wesentlich empfindlicheren Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer zurückzuführen (THERMOQUEST 2000). Eine weitere Multikomponenten-Methode mit SPE HPLC-ESI-MS erreicht unter anderem für Sulfamthazin, Sulfadiazin und Trimethoprim vergleichbare Bestimmungsgrenzen von 0,05 $\mu\text{g/L}$ Gülle (CAMPAGNOLO et al. 2002) während diese für Tetracyclin und Oxytetracyclin um den Faktor 10 unempfindlicher ist.

Die hier weiter entwickelte Multikomponenten-Methoden mit LLE gefolgt von HPLC-ESI-MS/MS, die ursprünglich für die Tetracycline optimiert wurde, ist nach

Literaturstudien das einzige Verfahren, das Tetracyclin- und Sulfonamid-Rückstände (mit Bestimmungsgrenzen von mindestens 0,05 mg/kg) aus Gülle mit Wiederfindungen von generell größer 72 % extrahiert.

4.1.3.2 Sandboden

Wird die LLE zur Extraktion der sieben Sulfonamide auf Sandböden angewendet, so generiert das Verfahren mittlere Wiederfindungsraten von 26–53 %. Die substanzabhängige Methodenpräzision liegt bei ~20 % (siehe Tab. 3–4, Abschnitt 3.1.3.2) und ist vergleichbar mit der der Tetracyclin-Analytik (HAMSCHEER et al. 2002). Trotz der niedrigen Wiederfindung von 36 % für Sulfamethazin, können wegen der hohen Sensitivität bei der HPLC-ESI-MS/MS-Messung bis zu 2 µg/kg Boden quantifiziert und bis zu 0,5 µg/kg detektiert werden. Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für alle anderen Sulfonamide liegen bei 5 µg/kg und 1 µg/kg Boden.

Sulfonamide sorbieren rasch an Bestandteile der Bodenmatrix (TOLLS 2001; THIELE-BRUHN 2003a). Bereits 1990 stellte LANGHAMMER in Laborstudien fest, dass ca. 40 % irreversibel an die Matrix bindet. Durch die hier eingesetzte LLE, mit den relativ milden Extraktionsbedingungen, werden nur die in der Bodenlösung frei verfügbaren Sulfonamide extrahiert, wodurch die niederen Wiederfindungsraten erklärt werden. Rigidere Extraktionsverfahren wie die PLE liefern tatsächlich höhere Extraktionsraten. So wendeten JACOBSEN et al. (2004) dieses Verfahren mit einem ähnlichen Extraktionssystem aus Methanol/0,2 M Citratpuffer (pH 4,7 [50:50; v/v]) an, um unter anderem Sulfadiazin annähernd vollständig aus Boden zu extrahieren. Die Gesamtmethode mit PLE gefolgt von SPE (SAX-HLB) und HPLC-ESI-MS/MS mit einem wesentlich empfindlicheren Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, war dennoch nicht leistungsfähiger.

4.1.3.3 Matrixreiches Grundwasser

Bei der Extraktion von 25 mL matrixreichem Grundwasser betragen die Bestimmungsgrenzen, basierend auf einem S/N-Verhältnis größer als sechs, für Sulfamethazin 0,05 µg/L und für alle anderen Sulfonamide 0,1 µg/L. Damit konnten mit der neu entwickelten SPE-Methode umweltrelevante Rückstandskonzentrationen empfindlich nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.4.3). Vergleichbare Methoden auf der Basis von SPE wurden unlängst zur Analyse von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Grund- und/oder Oberflächenwasser in Kombination mit HPLC-MS (LINDSEY et al. 2001) oder mit HPLC-MS/MS (YANG et al. 2004) angewendet. LINDSEY et al. (2001) erzielten für sechs Sulfonamide eine Bestimmungsgrenze von 0,1 µg/L

(basierend auf einem S/N größer als zehn) bei der Extraktion von 123 mL Grund- und Oberflächenwasser. YANG et al. (2004) erhielten bei der Extraktion von 120 mL Oberflächenwasser für sechs Sulfonamide eine Bestimmungsgrenze von 0,1 µg/L (basierend auf einem S/N größer als sechs).

Neuerdings wurden vermehrt Tandem-SPE-Methoden entwickelt insbesondere zur Extraktion matrixreicher Abwässer oder Oberflächengewässer (BLACKWELL et al. 2004; RENEW und HUANG 2004). Bei der Anreicherung von 1 L Abwasser erreichen RENEW und HUANG Bestimmungsgrenzen von mindestens 0,05 µg/L.

Insofern zeigt die neu entwickelte Methode trotz deutlich niedrigerem Probenvolumen vergleichbare Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Vergleich zu den auf diesem Bereich publizierten Methoden.

4.1.4 Anwendbarkeit

Die umfangreiche Validierung zeigt, dass die ursprünglich zur Tetracyclin-Analytik entwickelte Methode auch angewendet werden kann, um verschiedene Umweltproben auf das Vorkommen von Sulfonamiden zu untersuchen. Die hier beschriebene Methode wurde im Rahmen verschiedener Felduntersuchungen bereits erfolgreich angewendet (siehe Abschnitt 3.4).

Das erzielte Nachweisvermögen in den vergleichsweise komplexen Matrices wie Gülle und Boden ist empfindlich genug, um umweltrelevante Konzentrationen (mg/kg- bzw. µg/kg-Bereich) detektieren zu können. Mit der Erweiterung um die Substanzgruppe der Sulfonamide können mit nur einem Aufreinigungsverfahren die wichtigsten in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika in Sandboden und Gülle parallel extrahiert und innerhalb zweier HPLC-ESI-MS/MS-Durchgänge bestimmt werden. Dies prädestiniert die dargestellte Methode gerade für den Routineeinsatz.

Das beschriebene SPE-Verfahren zur Analyse von verschiedenen Sulfonamiden in Sicker- und Grundwasser ermöglicht eine hochempfindliche Detektion mit HPLC-ESI-MS/MS besonders von Sulfamethazin, das nicht nur in Deutschland zu den am häufigsten in der Veterinärmedizin verabreichten Sulfonamiden zählt.

4.2 Weiterentwicklung und Robustheit der analytischen Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Boden

Nachdem die in Abschnitt 5.5.2 beschriebene analytische Methode zum Nachweis von Antibiotika in Sandboden erfolgreich etabliert war, sollte diese sukzessive weiter

entwickelt werden. Insbesondere die Robustheit der Analysenmethode wurde unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen (verschiedene HPLC-Trennsäulen, Bodentypen oder Probenvorbereitungen) geprüft. Neben Ansätzen zu einer Methodenoptimierung wurden durch die vorgenommenen Änderungen auch Faktoren ermittelt, die die Leistungsfähigkeit der Methode beeinträchtigen können.

4.2.1 Robustheit der Gesamtmethode

Mit Robustheit wird die Anfälligkeit einer Analysemethode gegenüber Änderungen in den Versuchsbedingungen beschrieben (KROMIDAS 1999). Dabei wurde hier weniger der Einfluss kleiner, zufälliger Änderungen überprüft, als vielmehr die Anwendbarkeit (Robustheit) bei großen, bewussten Änderungen. Im Folgenden wird angegeben, welche Schwankungen das Analysenergebnis beeinflussen können.

4.2.1.1 Einfluss der Trennsäule

Die Trennungsoptimierung sollte in erster Linie die Auflösung der koeluiierenden Peaks von Oxytetracyclin, 4-Epi-Tetracyclin und Tetracyclin verbessern und damit einen zweiten HPLC-Lauf nicht mehr erforderlich machen. Bei einer anschließenden Detektion mit MS/MS wäre eine Trennung koeluiender Peaks nicht unbedingt nötig.

Prinzipiell können während des MS/MS-Experiments im gleichen Retentionszeitfenster mehrere Scan-Ereignisse parallel durchgeführt werden. Diese Variante wurde im Vorfeld getestet, führte aber zu erheblichen Empfindlichkeitsverlusten und wurde deshalb nicht in Betracht gezogen. Verschiedene Tests zeigten, dass einzig die „Polaris C18-A“ dieses Trennproblem zu lösen vermag jedoch nur unter isokratischen Bedingungen. Da dies gerade bei der Trennung von matrixreichen Extrakten problematisch sein könnte, wurde dies nicht weiter verfolgt.

Die verwendete Säule „Puresil C18“ ist in Bezug auf Säulenmaterial eine relativ alte Säule. Tests mit moderneren Säulen zeigten, dass auch neuartige Materialien bei gleichen chromatographischen Bedingungen keine deutlich verbesserten Ergebnisse liefern. Die Selektivität der Trennung der Tetracycline ist bei den Säulen der verschiedenen Hersteller trotz unterschiedlicher Materialien wie *C18*, *C8*, *Phenyl-Hexyl*, mit *Endcapping*, polaren *Endcapping* oder *Embedding*, meist vergleichbar. Gleichzeitig erwies sich die Referenzsäule *Puresil C18* im Langzeiteinsatz als robust und wenig stör anfällig und wurde daher standardmäßig verwendet. Einzig die „Hypersil Gold“ zeigte eine verbesserte Selektivität. Getestet wurde dies allerdings nur unter matrixfreien

Bedingungen. Sollte sich diese Säule auch unter Matrixbedingungen bewähren, könnte damit eine Verbesserung der Selektivität der Methode erzielt werden.

4.2.1.2 Einflussfaktoren auf die Extraktionsrate

Für die Extraktionsraten wurden folgende Parameter als robust bestimmt. Beim Citratpuffer können pH-Wert-Schwankungen $\leq 0,3$ toleriert werden und haben keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Die Substanzen sind relativ unempfindlich gegenüber Ultraschallbehandlung. Für Sulfamethazin wurde eine erhebliche Thermostabilität (12 h, 100 °C) festgestellt, während Tetracyclin erwartungsgemäß zu Anhydrotetracyclin umgewandelt wird. Die Spaltung von etwaigen gebundenen Rückständen konnte durch enzymatische Hydrolyse nicht erzielt werden. Zusätze von Metall-Chelatoren und von Humusbestandteilen führten im Falle von Tetracyclin zu empfindlichen Analytverlusten.

4.2.2 Anwendbarkeit der Gesamtmethode in Abhängigkeit vom Bodentyp

Die umfangreiche Validierung in den verschiedenen Bodentypen zeigte, dass die für Sandboden etablierte HPLC-ESI-MS/MS-Methode (HAMSCHEER et al. 2005) auch angewendet werden kann, um verschiedene Umweltproben auf das Vorkommen von Sulfonamiden zu untersuchen. Aus diesen Untersuchungen ist abzuleiten, dass die Methode mit den meisten untersuchten Bodentypen, die ein breites Spektrum abdecken, zuverlässig und empfindlich arbeitet. Nur für Tylosin haben die Bodenparameter einen entscheidenden Einfluss auf die Wiederfindungsraten. Die Methode kann bei Böden mit Schluffgehalten von mehr als 50 % für Tylosin nicht angewendet werden. Die Wiederfindungsrate für die Sulfonamide war über alle Bodentypen vergleichbar, was dafür spricht, dass für diese Substanzklasse die Matrixwechselwirkungen weniger bedeutend sind. Bei der Oxytetracyclin-Analytik scheint dagegen die Zusammensetzung der Matrix eine Rolle zu spielen. So verschlechtern sich die Wiederfindungsraten mit steigendem C_{org} -Gehalt signifikant ($p < 0,05$). Das unterschiedliche Sorptionsverhalten der Tetracycline und Sulfonamide wird in Abschnitt 4.4.2.2 ausführlich behandelt.

4.3 Entwicklung einer Multimethode zur Bestimmung von Antibiotika in Staub

Basierend auf den bereits etablierten Multi-Methoden für verschiedene Umweltmatrices (HAMSCHEER et al. 2002; 2005), wurde eine analytische Methode zur Bestimmung dieser Substanzen in Staub erarbeitet. Zusätzlich wurde das Analytenspektrum um Chloramphenicol erweitert und MS³-Methoden entwickelt.

4.3.1 Extraktionsverfahren

Bei der Entwicklung der Probenvorbereitung für die Matrix Staub waren von der Analyten Seite her die gleichen Punkte wie in den bereits beschriebenen Methoden zu beachten (siehe Abschnitte 1.5; 1.6; 4.1 und HAMSCHEER et al. 2002; 2005). Es zeigte sich, dass das Verfahren der LLE für Gülle und Boden auch für diese proteinreiche Matrix (20–50 %; HARTUNG 1997) anwendbar war. Da insbesondere Tetracycline an Proteine binden (DUGGAR 1948) und bei pH < 2 degradieren (OKA et al. 2000), war auch hier die Verwendung des schwach sauren Citratpuffers (pH 4,7) optimal. Aufgrund der geringen Partikelgröße von 1–50 µm (HARTUNG 1997) und der damit größeren Oberfläche, wurde die Probeneinwaage auf ein Zehntel reduziert (siehe Abschnitt 3.3.1 und HAMSCHEER et al. 2003b).

4.3.2 HPLC-ESI-MS/MS

Die Charakteristika der HPLC-ESI-MS/MS-Analytik wurden für die Tetracycline, für Tylosin (HAMSCHEER et al. 2002) und für die Sulfonamide (siehe Abschnitt 4.1.2 und HAMSCHEER et al. 2005) bereits an anderer Stelle beschrieben. Daher befasst sich dieser Abschnitt ausschließlich mit der Analytik von Chloramphenicol. Unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen bei pH 2,5 wurde für das Chloramphenicol mit der ESI⁻-Ionisierung die größte Empfindlichkeit erzielt. Aufgrund der zwei Chloratome in der Molekülstruktur (siehe Abb. 1–3, Abschnitt 1.5.4) können im *Full-Scan*-Modus drei Molekül-Ionen mit m/z 321, m/z 323 und m/z 325 detektiert werden. Entsprechend des Isotopenverhältnisses der beiden Chloratome (³⁵Cl, ³⁷Cl), sollte die relative Intensität des ³⁵Cl ³⁷Cl [M–H]⁻-Ions (m/z 323) theoretisch 65 % betragen (MOTTIER et al. 2003). Chloramphenicol wurde im *Full-Scan*-MS/MS-Modus analysiert. Das ³⁵Cl [M–H]⁻-Ion (m/z 321) wurde als Vorläufer-Ion ausgewählt. Die Fragmentspektren enthielten fünf charakteristische Produkt-Ionen:

$[\text{M-H-CHClO}]^-$ (m/z 257), $[\text{M-H-2HCl}]^-$ (m/z 249), $[\text{M-H-CHCl}_2]^-$ (m/z 237), $[\text{M-H-C}_2\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NO}]^-$ (m/z 194) und $[\text{M-H-C}_2\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NO-H}_2\text{O}]^-$ (m/z 176) (siehe Abb. 3–4, Abschnitt 3.3.2).

Wie bereits erwähnt, tritt bei der quantitativen HPLC-MS-Analytik eine matrixbedingte Signalsuppression oder -erhöhung relativ häufig auf. Solange mit dem Matrixeffekt noch ausreichende Bestimmungsgrenzen erreicht werden können, stellen diese Effekte nicht unbedingt ein Problem dar. Jedoch führen Matrixinterferenzen immer zu mangelhafter Genauigkeit und Präzision einer Methode, aufgrund einer offensichtlich geringeren Reproduzierbarkeit des Prozesses (NIESSEN 2003). Für den Fall des Chloramphenicols wurde hier eine matrixbedingte Signalerhöhung festgestellt. Dies ist im Vergleich zum gegenteiligen Effekt relativ selten, da gerade Matrixbestandteile die Ionisierungsrate beeinflussen, indem sie um die Ladungen bei der Ionenbildung konkurrieren (ENKE 1997; REEMTSMA 2003). Gerade um falsch-positive Nachweise zu vermeiden, wurde als zusätzliches Identifizierungskriterium ein MS^3 -Experiment entwickelt. Hierzu wurde der Basis-Peak des MS/MS-Spektrums, m/z 194, als Vorläufer-Ion für einen weiteren MS/MS-Übergang gewählt, der selektiv m/z 176 generiert.

4.3.3 **Methodenvalidierung**

Das Analysenverfahren für die zwölf Antibiotika in Staub lieferte für die einzelnen Substanzgruppen unterschiedliche Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten waren für die Tetracycline 89,4–103 %, für die Sulfonamide 39,3–48,8 % und für Tylosin 27,2 %. Die Präzision der Sulfonamide und von Tylosin liegt dabei zwischen 21 % und 33 %. Die niedrigen Wiederfindungsraten und die geringe Präzision, konnten für diese beiden Substanzklassen auf Matrixinterferenzen hindeuten (NIESSEN 2003). Ein Vergleich der Signalintensitäten des Massendetektors und des DAD-Detektors lieferte jedoch vergleichbare Ergebnisse, so dass ein bei der massenspektrometrischen Detektion auftretender Matrixeffekt ausgeschlossen werden konnte. Da diese Methode vornehmlich als Screeningmethode entwickelt wurde, wurde hier von einer weiteren Optimierung abgesehen. Die Wiederfindungsversuche zeigten aber auch, dass Chloramphenicol aufgrund einer signifikanten Signalverstärkung mit dem Verfahren der Ein-Punkt-Kalibrierung nicht zuverlässig quantifiziert werden kann (KROMIDAS 1999). Da seit 1994 EU-weit die Anwendung dieses Antibiotikums verboten ist, wurden Chloramphenicol-positive Proben mittels des aufwendigen Verfahrens der Standardaddition bestimmt.

4.4 Feldstudien zur Verbreitung von Tierarzneimitteln in der Umwelt über den Eintragspfad Gülle – Boden – (oberflächennahes) Grundwasser

4.4.1 Exposition von Gülle und Güllekrusten mit Antibiotika

Die Antibiotika und Metaboliten enthaltenden Exkreme werden als Wirtschaftsdünger eingesetzt und entweder direkt oder nach einer gewissen Lagerungszeit auf die Felder ausgebracht. Das Risiko einer Boden- und Wassergefährdung ist letztlich abhängig von den Konzentrationen und der Stabilität der Antibiotika in der Gülle und den Antibiotikafrachten in die Umwelt. Vereinzelt Studien in Deutschland, der Schweiz und den USA wiesen bereits signifikante Rückstände von Tetracyclinen (MEYER et al. 2000; WINCKLER und GRAFE 2000; 2001; ZHU et al. 2001, HAMSCHER et al. 2002) und Sulfonamiden (BERGER et al. 1986; LANGHAMMER et al. 1988; HALLER et al. 2002; PFEIFER et al. 2002) in Wirtschaftsdüngern nach.

In Niedersachsen wurde in einer Screeninguntersuchung an 181 Schweinegülleproben (WINCKLER und GRAFE 2000; 2001) in knapp einem Viertel der Proben ein Tetracyclinegehalt von mehr als 0,6 mg/kg Gülle gefunden; der Mittelwert der Positivbefunde lag bei 11,4 mg/kg, im Maximum wurden 66 mg/kg gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten insbesondere die Antibiotikafrachten ermittelt und der Eintrag sowie das Verhalten der Antibiotika in Boden und Wasser unter Feldbedingungen untersucht werden. Die Gülleanalysen sollten eine qualitative und quantitative Bewertung der Boden- und Wasseruntersuchungen ermöglichen. Dafür sollte in Zusammenarbeit mit den Landwirten zu jeder Gülleausbringung eine repräsentative Gülleprobe gesammelt werden. Durch gleichzeitige Kenntnis der Ausbringungsmenge wäre es dadurch möglich gewesen, die theoretischen Antibiotikafrachten zu kalkulieren und mit den in Praxis gemessenen Bodenkonzentrationen zu vergleichen. Da für beide Boden-Dauerbeobachtungsflächen die Probenahme sowie die Bewirtschaftungsdaten nicht lückenlos waren, lassen die hier ermittelten Daten lediglich eine qualitative bzw. semi-quantitative Beurteilung zu.

4.4.1.1 Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche *BDF01*

In allen drei Proben der *BDF01* befanden sich Tetracyclin, Chlortetracyclin sowie Umwandlungsprodukte. Sulfadiazin wurde in den Proben von 2000 und 2001 detektiert und Sulfamethazin lediglich in der Probe aus dem Jahr 2000 (siehe Abschnitt 3.4.1.1). In den Proben aus 2000 und 2001 liegt das Verhältnis von TC:CTC bei unge-

fähr 40:1, was in etwa dem Verhältnis der Rückstandskonzentrationen im Feldversuch entspricht. Trotz mindestens 17-fach höherer Konzentrationen in der Gülle, war Sulfadiazin im Vergleich zu Sulfamethazin im Boden nie nachweisbar. Da die Gülleprobe aus 2002 als einzige das Degradationsprodukt Anhydrotetracyclin enthielt, könnte dies für eine längere Lagerungsdauer der ausgebrachten Gülle sprechen. Dies könnte auch Negativbefunde insbesondere der Sulfonamide erklären, deren Halbwertszeit in Gülle bei ungefähr 30 Tagen liegt (HALLING-SØRENSEN et al. 2001). Der Abbau von Tetracyclin wäre hier wahrscheinlich auf biotische Prozess zurückzuführen, da die chemische Dehydratation von Tetracyclin erst bei $\text{pH} < 2$ abläuft (DÜRCKHEIMER 1975). Der pH-Wert von Gülle liegt in der Regel im neutralen bis schwach basischen Bereich.

Da nicht alle ausgebrachten Güllen zur Verfügung gestellt wurden, konnte eine abschließende Massenbilanz nicht aufgestellt werden. Anhand der drei analysierten Gülleproben kann lediglich eine wahrscheinliche mittlere jährliche Güllefracht für die relevanten Substanzen errechnet werden, die in Relation zu den ermittelten Bodendaten gesetzt werden kann. Nach dieser Kalkulation wurden innerhalb dreier Jahre im Mittel 110 g TC, 2,4 g CTC, 19,1 g Sulfadiazin und 9,3 g Sulfamethazin pro Hektar und Jahr eingetragen (HAMSCHEER et al. 2005).

4.4.1.2 Standort Boden-Dauerbeobachtungsfläche *BDF02*

In beiden Proben der *BDF02* fanden sich Tetracyclin und Chlortetracyclin während Sulfonamide zu keinem Zeitpunkt detektiert wurden (siehe Abschnitt 3.4.1.2). Die Vorkommen und die Verhältnisse der Substanzen zueinander in den analysierten Güllen spiegeln sich in den Felddaten wieder. Im Jahr 2001 betragen die ausgetragenen Antibiotikafrachten für Tetracyclin 15,3 g/ha und für Chlortetracyclin 24,1 g/ha.

4.4.1.3 Standorte Monitoringflächen *MON01–14*

Wie bereits gezeigt, sind Tetracyclinkonzentrationen in Gülle im niederen mg/kg-Bereich relativ häufig anzutreffen und liegen damit im Bereich der minimalen Hemmkonzentration vieler pathogener Mikroorganismen, die mit 0,5–2 mg/L angegeben werden (KROKER et al. 2002). Durch den Eintrag in die Böden wird diese Wirkkonzentration aufgrund der damit einhergehenden Verdünnung oftmals nicht mehr erreicht. Dennoch können auch an der Ackeroberfläche lokal erhöhte Antibiotikakonzentrationen auftreten. So wurden in getrockneten Gülleaggregaten, die auf der Ackeroberfläche der Monitoringflächen gesammelt wurden, Tetracyclinrückstände von 0,02–2,13 mg/kg TS detektiert. Vergleichbare Befunde lieferten Untersuchungen von

HAMSCHER et al. (2002), die ebenso in getrockneten Gülleaggregaten Tetracyclinrückstände von 0,35–1,44 mg/kg TS bestimmten.

4.4.2 Eintrag und Verhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden in güllegedüngten Böden

4.4.2.1 Vorkommen von Antibiotikarückständen im Boden

Durch die relativ hohen Antibiotikakonzentrationen (niedriger bis mittlerer mg/kg-Bereich) in Güllen (siehe Abschnitt 4.4.1) und deren Nutzung als Wirtschaftsdünger, ist auch mit einem flächendeckenden Eintrag dieser Substanzen in den Boden zu rechnen. Basierend auf Daten einer Screeningstudie von WINCKLER und GRAFE (2000; 2001) ergeben sich, bei einer angenommenen jährlichen Güllezufuhr von 30 m³ mit Tetracyclinegehalten von 0,6–66 mg/kg, theoretische Tetracyclinfrachten von 18–1980 g/ha/a. Unter Vernachlässigung von Abbauprozessen würde sich beim Einpflügen dieser Gülle in den Pflughorizont (0–30 cm Bodentiefe, 1,4 g/cm³ Bodendichte) Rückstandsgehalte von 4–471 µg/kg im Boden einstellen. Diese Expositionsabschätzung wurde bereits im Feldversuch von HAMSCHER et al. (2002) bestätigt, die im Boden Tetracyclinrückstände bis zu Konzentrationen von mehr als 300 µg/kg nachwiesen.

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Flächenmonitoring im Raum Weser-Ems basierte auf einer Pilotstudie bei der in 4 von 12 untersuchten, güllegedüngten Ackerböden erstmalig originäre Tetracyclin- und Chlortetracyclinrückstände deutlich über 10 µg/kg nachgewiesen wurden (HAMSCHER et al. 2000). In der nun auf 14 Flächen erweiterten Monitoringstudie wurden die Ergebnisse dieser Bodenuntersuchungen in dem Sinne bestätigt, als dass in 13 von 14 Flächen die Tetracycline Tetracyclin und Chlortetracyclin fortwährend und in relativ hohen Konzentrationen (~50 % der MON-Proben lagen zwischen 10–100 µg/kg) auftraten und Oxytetracyclin nur sporadisch detektiert wurde. Die Häufigkeit des Nachweises der Tetracycline untereinander entspricht in der Relation den für diese Region eingesetzten Wirkstoffmengen (WINCKLER und GRAFE 2000). Durch die Weiterentwicklung der analytischen Methode um die Substanzgruppe der Sulfonamide konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die bedeutendsten Sulfonamide Sulfamethazin und Sulfadiazin (WINCKLER und GRAFE 2000) nur mit wenigen µg/kg im Boden nachweisbar sind, dies aber für den Fall von Sulfamethazin mit hoher Frequenz. Dies deutet auf ein grundsätzlich anderes Umweltverhalten dieser Substanzklasse hin (siehe Abschnitt

4.4.2.2 und Abschnitt 4.4.2.3). Das lange als antibiotischer Leistungsförderer eingesetzte und seit 1999 EU-weit verbotene Tylosin wurde nie detektiert (EG 1998). Lediglich eine der Flächen war über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Monaten frei von Antibiotikarückständen. Dies verdeutlicht den in der Intensivlandwirtschaft üblichen hohen Wirkstoffeinsatz.

Die hier auf 14 Ackerflächen ermittelten Umweltkonzentrationen können für die Region Weser-Ems als typisch betrachtet werden. So wurde eingangs anhand der Daten von WINCKLER und GRAFE (2000; 2001) eine Expositionsabschätzung für diese Region durchgeführt. In dieser Monitoringstudie wurden Tetracyclinkonzentrationen von 5,8–443,2 µg/kg gemessen, wodurch die Repräsentativität dieses Flächenmonitorings gezeigt wird.

4.4.2.2 Sorption und Verteilungsvorgänge von Antibiotika im Boden

Die Antibiotika der verschiedenen Substanzklassen weisen unterschiedliche strukturelle und physiko-chemische Eigenschaften auf. Daher unterscheiden sich die Verteilungskoeffizienten (K_d) in Böden und Sedimenten zwischen den einzelnen Substanzklassen stark. TOLLS (2001) stellte K_d -Werte für Sulfonamide von 0,6–4,9 mL/g, für Tylosin von 8,3–128 mL/g und für Tetracycline von 290–1620 mL/g zusammen. Eigene Adsorptions-Experimente erbrachten vergleichbare Ergebnisse (siehe Abschnitt 3.4.4). Tetracycline weisen damit eine geringe Mobilität auf (RABØLLE und SPLIID 2000; TOLLS 2001). Die Sulfonamide sind deutlich mobiler, werden aber auch vermutlich schneller abgebaut als die Tetracycline (THIELE-BRUHN 2003b). Im Gegensatz zu anderen Stoffgruppen (z. B. Pestizide) können diese Unterschiede nicht allein mit dem unterschiedlichen organischen Kohlenstoffgehalt des Sorbens erklärt werden und korrelieren auch nicht mit der Hydrophobizität der Substanzen (TOLLS 2001). Vielmehr kommt eine Vielzahl weiterer Wechselwirkungen zum Tragen: Chelatisierung, Oberflächeneinschlüsse, Wasserstoffbrückenbildung, Ionen-Austauschreaktionen (THIELE-BRUHN 2003a). Daher können selbst die K_d -Werte für Einzelsubstanzen in verschiedenen Matrices eine erhebliche Spannweite haben. Verteilungsvorgänge im Boden sind für die Sulfonamide oft pH-abhängig (BOXALL et al. 2002) und für die Tetracycline in erster Linie abhängig vom Vorhandensein zweiwertiger Kationen (SITHOLE und GUY 1987a; b). Letzteres wurde hier auch anhand der eigenen Desorptionsexperimente bestätigt (siehe Abschnitt 3.4.4).

Eine Vielzahl von Studien befasste sich kürzlich mit den Sorptions- und Verteilungsvorgängen im Boden unter Laborbedingungen (RABØLLE und SPLIID 2000; BOXALL et al. 2002; FIGUEROA et al. 2004; THIELE-BRUHN 2004).

Anhand der hier durchgeführten Feldstudien konnte erstmalig unter Langzeitbedingungen die Verteilung von Antibiotikarückständen an Bodenbestandteile untersucht werden. Bei allen auch im Unterboden (40–90 cm Bodentiefen) beprobten Flächen, waren Rückstände jeweils nur im Bereich der Pfluggrenze des humusreichen Oberbodens (0–40 cm) nachweisbar. Dies spricht dafür, dass die in der Gülle gelösten oder gebundenen Substanzen durch die mechanische Bodenbehandlung des Unterpflügens in den Boden eingearbeitet werden und dort auch größtenteils festgelegt werden. Eine Verlagerung über die Bodenpartikel findet, wenn überhaupt, nur langsam statt.

4.4.2.3 Persistenz von Antibiotikarückständen im Boden

Eine Anreicherung von Antibiotikarückständen im Boden kann nur stattfinden, wenn diese dort auch persistent sind. Abbauresistente Substanzen (z. B. FCKWs, Dioxine, PCBs) können in der Umwelt nur extrem langsam abiotisch (chemisch, photochemisch) oder biotisch (z. B. mikrobiell) umgewandelt werden. Bislang gibt es nur wenige Feld- und/oder Laborstudien die sich mit den Faktoren der Abbaubarkeit von Antibiotika befassen. Durch Bilanzierung des Stoffeintrags und -verbleibs in der Umwelt sollten in Feldstudien die Größenordnung der Abbaupazität der Umwelt gegenüber Antibiotika abgeschätzt werden. Ausgewählt wurden zwei Standorte, einer mit hohem Stoffeintrag (*BDF01*) und einer mit niedrigem Stoffeintrag (*BDF02*).

An *BDF01* wurde bereits eine 12-monatige Intensivierungsstudie sowohl unter Feld- als auch unter Laborbedingungen durchgeführt (HAMSCHEER et al. 2002). Es wurde beobachtet, dass die Substanzen durch das Unterpflügen der aufgetragenen Gülle im Bereich des Pflughorizontes in den Oberboden (0–40 cm) eingetragen und stark in der Ackerkrume sorbiert werden. Ein signifikanter Abbau der Tetracycline konnte damals zwischen Mai und November 2000 nicht nachgewiesen werden. Nach einer weiteren Güllendüngung im April 2001 waren die Werte im Mai 2001 signifikant höher als im November und Mai des Vorjahres ($p < 0,05$), was den erstmaligen Hinweis auf eine Akkumulation dieser Substanzen im Boden erbrachte. Auch nach einjähriger Lagerung bei 4 °C unter Laborbedingungen konnte kein signifikanter Abbau festgestellt werden.

Die Untersuchungen an dieser BDF wurden im Rahmen dieser Arbeit im Juni 2001 bis zum Mai 2004 fortgesetzt. Die untersuchte Fläche war somit seit über drei Jahren mit einer mittleren Tetracyclinkonzentration von über 100 µg/kg in den oberen 30 cm kontaminiert. Die Konzentrationen für Tetracyclin waren dabei 20–40-fach höher als für Chlortetracyclin, die sich im Bereich der Bestimmungsgrenze von 5 µg/kg bewegten. Sulfamethazin war lediglich bei drei Probenahmen über alle vier Kern-

flächen nachweisbar (siehe Tab. 3–21, Abschnitt 3.4.2.1). Bezogen auf den Oberboden (0–30 cm) traten die höchsten Werte jeweils im Frühjahr zu Beginn einer Vegetationsperiode auf. Es konnte wie schon in der vorhergehenden Studie gezeigt werden, dass im November im Vergleich zum Juni bzw. Mai kein signifikanter Rückgang der Tetracyclin- und Chlortetracyclinkonzentrationen erfolgte (siehe Abb. 3–6, Abschnitt 3.4.2.1). Die relative Abnahme der mittleren Tetracyclinbelastung über einen Zeitraum von sechs Monaten betrug im Jahr 2001 37 %, im Jahr 2002 59 % und im Jahr 2003 34 %. Dies stimmt gut mit der von GALVACHIN und KATZ (1994) bestimmten Halbwertszeit von 300 Tagen für Tetracycline im Boden überein. Trotz regelmäßiger Düngung wurde dagegen in dieser Folgestudie eine weitere Akkumulation in den Sommermonaten nicht festgestellt. Das heißt, es findet offensichtlich ein moderater Abbau oder eine Elimination während der Vegetationsperiode statt. Da dennoch Antibiotika wiederholt in den Boden eingetragen werden, können die Rückstände auch als „pseudo-persistent“ bezeichnet werden (DAUGHTON 2002).

Die Kalkulation der jährlichen mittleren Güllefrachten für diese Fläche verdeutlicht, dass die hier gemessenen Bodenkonzentrationen das Ergebnis eines über die Jahre wiederholten Eintrages sind. Nach den mittleren Analysendaten für das Jahr 2002, enthielt der Oberboden (Bodentiefe 0–30 cm; Bodendichte ~1,4 kg/L) im Mittel 745 g Tetracyclin und 18,5 g Chlortetracyclin. Dies entspricht, ohne Berücksichtigung von Abbauraten, rechnerisch einem 6,7- bzw. 7,7-jährigen Eintrag der ermittelten jährlichen Antibiotikafrachten (siehe Abschnitt 4.4.1.1 und HAMSCHEER et al. 2005) und veranschaulicht die Persistenz von Tetracyclinen in diesem Umweltkompartiment. Bestätigt wird dies durch Laborstudien, in denen bereits die Beständigkeit von Tetracyclin- und Chlortetracyclinrückständen im Boden bei niedrigen Temperaturen (4 °C) nachgewiesen wurde (GALVACHIN und KATZ 1994; HAMSCHEER et al. 2002).

Ein vergleichbares Ergebnis lieferten die Untersuchungen an *BDF02*. Über den gesamten Untersuchungszeitraum lagen die mittleren Tetracyclin- und Chlortetracyclinkonzentrationen bei ~10 µg/kg. Obwohl die Belastung mit Tetracyclinen sehr viel geringer ist als bei Standort *BDF01*, ist auch hier ein konstantes Rückstandsniveau über einen Zeitraum von 36 Monaten feststellbar. Diese Studie verdeutlicht zudem die Konzentrationsunabhängigkeit der Persistenz von Tetracyclinen im Boden.

Im Gegensatz zu den Tetracyclinen zeigen die Sulfonamide ein völlig anderes Umweltverhalten. An Standort *BDF01* wurde von den beiden Sulfonamiden Sulfadiazin in den Jahren 2000 (HAMSCHEER et al. 2002) und 2001 in Gülle jedoch nie im Boden detektiert. Während Sulfamethazin lediglich in der Gülleprobe aus 2000 vorhanden war, wurde es dagegen diskontinuierlich in Bodenproben aus 2001–2003

und beständig von 2002–2004 im Grundwasser detektiert. Die realen Sulfamethazin- (0,5–2 µg/kg) und Sulfadiazinkonzentrationen (< 1 µg/kg) im Boden liegen dabei stets unter den Chlortetracyclinkonzentrationen (≥ 2 µg/kg), obwohl die ermittelten Gehalte der Sulfonamide in Gülle teilweise deutlich größer sind. Dies spricht für eine sehr kurze Halbwertszeit im Boden, bestätigt durch Abbaubersuche unter Feldbedingungen von BOXALL et al. (2004). Für diese geringe Stabilität im Boden sprechen auch die Ergebnisse des Flächenmonitorings (siehe Abschnitt 4.4.2.1) mit der hohen Nachweisfrequenz von Sulfamethazin zwischen 0,5–2 µg/kg. Aufgrund der niedrigen Verteilungskoeffizienten in Boden kann es damit zu einer raschen Elimination durch horizontale oder vertikale Verlagerung (siehe Abschnitt 4.4.2.2) über den Wasserpfad kommen. Auch könnten bislang nicht bekannte biotische oder abiotische Prozesse eine Remobilisierung bewirken. Durch die Bildung von gebundenen Rückständen (*bound residues*) könnten die Substanzen auch einfach analytisch nicht mehr verfügbar sein (LANGHAMMER et al. 1989; LANGHAMMER et al. 1990). In Modellversuche konnte diese Arbeitsgruppe signifikante Einträge von Sulfamethazin aus hochbelasteter Gülle (40 mg/L) in Böden nicht nachweisen. Dennoch konnte in Tracerstudien eine gewisse Bioverfügbarkeit der Sulfonamide gezeigt werden. Diese wiesen eine geringe Aufnahme der Radioaktivität in die Wurzeln von Pflanzen (3–15 %) und eine sehr geringe Verlagerung in den Sproß (0,04 %) nach.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Feldstudie demonstriert eindrucksvoll das unterschiedliche Umweltverhalten in puncto Persistenz und Sorptionsvermögen der beiden bedeutendsten Antibiotikaklassen. Die Tetracycline sind moderat bis hoch persistent im Boden und werden stark an die Bodenmatrix sorbiert. Sulfonamide sind dagegen relativ labil, werden weniger stark sorbiert und weisen damit hohes Verlagerungspotenzial auf (BOXALL et al 2004).

4.4.2.4 Bewertung der Bodenuntersuchungen

Die gemessenen Tetracyclinkonzentrationen im Boden liegen unter Annahme der vollständigen Verfügbarkeit im Bereich der minimalen Hemmkonzentrationen von gesundheitsrelevanten Keimen, die von KROKER et al. (2002) mit 0,5–2 mg/L angegeben werden. Auch wenn hieraus die Wirkung auf Bodenorganismen nicht direkt abgeleitet werden kann, deutet dieser Aspekt jedoch auf ein gewisses Potenzial der betrachteten Wirkstoffe im Hinblick auf eine ökotoxikologische Wirkung hin. Bei der Neuzulassung von Tierarzneimitteln ist dieses nach Maßgaben der EMEA/CVMP/055/96-final-Leitlinie (EMEA 1997) abzuschätzen. Danach werden veterinärmedizinische Produkte u. a. dann als potenziell ökotoxisch angesehen, wenn

im Boden die in einem *Worst-Case-Szenario* geschätzte Konzentration (*predicted environmental concentration*, PEC) einen Wert von 100 µg/kg überschreitet (VICH 2000; bis 2001: 10 µg/kg, EMEA 1997). Bei einer hypothetischen Neuzulassung dieser Tierarzneimittel wären bei Überschreiten dieser Triggerwerte damit Untersuchungen im Hinblick auf ihr Umweltverhalten durchzuführen. Diese weitergehenden ökotoxikologischen Untersuchungen wären dann erforderlich, wenn die Halbwertszeit der Stoffe länger als 60 Tage ist, und nicht mehr als 90 % des Wirkstoffes innerhalb eines Jahres abgebaut werden.

Für den Standort *BDF01* wurde für Tetracyclin bei 58 % der positiven Einzelproben der Wert von 100 µg/kg überschritten. Die Kernflächenmittelwerte der Bodentiefen 0–10 cm, 10–20 cm und 20–30 cm waren in 57,1 %, 71,4 %, und 85,7 % von sieben Probenahmen größer als 100 µg/kg. Die Gesamtbelastung des Oberbodens (0–30 cm) an Tetracyclin lag für alle sieben Zeitpunkte über 100 µg/kg (siehe Abb. 3–6, Abschnitt 3.4.2.1) und damit über den gesamten Untersuchungszeitraum deutlich oberhalb des EMEA-Triggerwertes für Ökotoxikologie von 100 µg/kg. Lokale Maxima betrug teilweise sogar mehr als 500 µg/kg. Unter Berücksichtigung der Gülleausbringung durch den Landwirt und das Unterpflügen ist jedoch insgesamt von einer relativ homogenen Verteilung der Antibiotikarückstände über die Gesamtfläche auszugehen.

Die Ergebnisse des Flächenmonitorings unterstreichen, dass die Beobachtungen an dem oben genannten Standort keine Einzelbefunde sind. Der Triggerwert von 100 µg/kg wurde hier ebenso für die Substanz Tetracyclin bei 5 von 14 Flächen überschritten. Aus dieser für die Region repräsentativen Studie leitet sich somit ab, dass jede dritte Ackerfläche der Region Weser-Ems Tetracyclinrückständen von bis zu 100 µg/kg aufweisen kann. Die Ergebnisse dieser Feldstudien würden daher insbesondere für die Altwirkstoffe der Tetracyclinantibiotika Handlungsbedarf anzeigen, wenn diese neu zu zulassende Arzneimittel wären.

Mit den Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass Boden-Dauerbeobachtungsflächen mit gut dokumentierter Bodennutzung und Bodenbeschaffenheit die Durchführung aussagekräftiger Feldstudien gewährleisten. So sind auch Langzeituntersuchungen, die insbesondere für eine Risikoabschätzung anthropogener Einträge in die Umwelt unabdingbar sind, unter den hier etablierten und umfassend dokumentierten Freilandbedingungen optimal durchführbar und sollten in dem beschriebenen Umfang auch fortgesetzt werden.

4.4.3 Eintrag von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Sicker- und Grundwasser über Gülle und güllegedüngte Böden

Über die Gülle in den Boden eingetragene Tierarzneimittel können von dort aus prinzipiell über zwei Wege ins Grundwasser transportiert werden. Sie können entweder vertikal mit dem Sickerwasser in das Grundwasser verlagert werden oder horizontal über die Oberflächengewässer und dann durch Uferfiltration in das Grundwasser gelangen. Bis vor kurzem waren nur Ergebnisse von Screeninguntersuchungen zum Vorkommen von Tierarzneimitteln in Grund- und Oberflächengewässern bekannt (HIRSCH et al. 1999; LINDSEY et al. 2001). Da diese nur Momentaufnahmen darstellen können ist die Eignung solcher Studien zur Abschätzung eines Gefährdungspotenzials und Umweltverhaltens dieser Stoffe limitiert. Dessen ungeachtet sind keine Langzeitstudien über den Eintrag von Tierarzneimitteln in das Grundwasser unter Feldbedingungen bekannt.

4.4.3.1 Verlagerung mit dem Sickerwasser

In Deutschland führten HIRSCH et al. (1999) erste Screeninguntersuchungen zum Vorkommen von Tierarzneimitteln im Grundwasser durch. In 2 von 52 untersuchten Grundwasserproben aus einer landwirtschaftlich intensiv genutzten Region in Hessen wurde Sulfamethazin, ein Sulfonamid-Antibiotikum das exklusiv in der Veterinärmedizin angewendet wird, detektiert. Die Konzentrationen betragen 0,08 µg/L und 0,16 µg/L. Allerdings wurden die Befunde in einer weiteren Beprobung nicht mehr bestätigt. Die Autoren schätzten daher das Grundwassergefährdungspotenzial von Tierarzneimitteln als gering ein (HIRSCH et al. 1999).

Innerhalb einer Screeningstudie von Grund- und Oberflächenwässern in den USA konnten bei den sechs untersuchten Grundwasserproben zu keinem Zeitpunkt Tetracycline nachgewiesen werden (LINDSEY et al. 2001). Lediglich eine Grundwasserprobe enthielt Sulfamethoxazol (0,22 µg/L), das vornehmlich in der Humanmedizin eingesetzt wird. Da Tetracycline nur in Oberflächengewässern nachgewiesen wurden, scheint nach Ansicht dieser Autoren ein Run-Off der Substanzen in die Oberflächengewässer wahrscheinlicher zu sein als ein Eintrag in das Grundwasser durch Auswaschen der Böden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Langzeitstudien über eine mögliche Verlagerung von Sulfonamiden und Tetracyclinen aus Böden mit dem Sickerwasser in das Grundwasser durchgeführt. Die gewählten Standorte der Grundwasseruntersuchungen waren zwei landwirtschaftliche Nutzflächen in der Region Weser-Ems

mit vornehmlich Maisanbau aus dem Boden-Dauerbeobachtungsprogramm des *NlfB*. Standort *BDF01* wurde vor allem mit Schweinegülle gedüngt, wohingegen Standort *BDF02* mit Mischgülle beaufschlagt wurde. Die Flächen wurden einmal jährlich im Frühjahr gedüngt, dabei wurden ungefähr 30–50 m³ Gülle pro Hektar ausgebracht. Die Probenahme erfolgte an drei (*BDF02*) bzw. vier (*BDF01*) verschiedenen Entnahmestellen in ca. 5 m Abstand, so dass eine repräsentative Probenahme über die Fläche gewährleistet war. Im Unterschied zu einer Pilotstudie an *BDF01* (HAMSCHEER et al. 2002) wurden die damals verwendeten Borosilikat- durch Nylon- Sonden ersetzt, die sich für die Probenahme von tetracyclinhaltigen Wasser als besonders geeignet erwiesen (HAMSCHEER et al. 2003a).

Die innerhalb dieser Arbeit untersuchte *BDF01* wurde einschließlich der Pilotstudie nun seit fast vier Jahren regelmäßig beprobt. Trotz einer hohen Exposition mit einer mittleren Tetracyclinkonzentration von ~150 µg/kg Boden war die Konzentration im oberflächennahen Grundwasser, gewonnen mittels Saugkerzen, für nahezu drei Jahre stets unterhalb der Nachweisgrenze (< 0,05 µg/L). Erst Ende 2003 konnte für diese relativ hochbelastete Fläche gezeigt werden, dass diese Substanz nunmehr das Grundwasser erreicht hat. Die nachgewiesenen Tetracyclinkonzentrationen lagen zwischen 0,05 µg/L und 0,14 µg/L. Untersuchungen des gleichen Standortes von April 2002 bis 2004 auf Sulfamethazin zeigten, dass trotz niedriger Konzentrationen dieses Stoffes im Oberboden (0,05–2 µg/kg) ein kontinuierlicher Eintrag (87 % Positivbefunde) in das oberflächennahe Grundwasser (1,40 m Bodentiefe) in Konzentrationen von bis zu 0,24 µg/L erfolgte (siehe Abb. 3–10, Abschnitt 3.4.3.1 und HAMSCHEER et al. 2005).

Am Standort *BDF02* wurde mittels Peilbrunnen direkt oberflächennahes Grundwasser an zwei Terminen gesammelt und auf Tetracycline und Sulfonamide untersucht. Der Boden dieser Fläche war vergleichsweise gering belastet (TC/CTC ~ 10 µg/kg Boden; SMZ < 0,5 µg/kg Boden). In den analysierten Wasserproben, die über Peilbrunnen in einer Tiefe von 2,5 m bzw. 3,5 m unter der Geländeoberfläche gezogen wurden, konnten keine Tetracycline nachgewiesen werden. Dagegen war in allen analysierten Proben Sulfamethazin mit einer maximalen Konzentration von 0,09 µg/L nachweisbar (siehe Tab. 3–25, Abschnitt 3.4.3.2). Bestätigt wurden die Befunde der Peilbrunnen durch die Ergebnisse der Untersuchung der zu einem späteren Zeitraum gesammelten Sickerwasser dieser Fläche. In mehr als 50 % der Proben kam es zu einem Positivnachweis für Sulfamethazin; Tetracycline waren oberhalb der NWG von 0,05 µg/L nicht nachweisbar (siehe Tab. 3–26, Abschnitt 3.4.3.2).

Erklärbar sind diese Befunde mit den unterschiedlichen Sorptionseigenschaften von Tetracyclinen und Sulfonamiden (siehe Abschnitt 4.4.2.2). Unter Beachtung von Verdünnungs- und Biodegradationsprozessen, scheinen die hier ermittelten Rückstandskonzentrationen für *BDF01* und *BDF02* im oberflächennahen Grundwasser durchaus plausibel. Wie für die *BDF01* gezeigt, können auch lange zurückliegende Sulfamethazineinträge zu kontinuierlichen Nachweisen im oberflächennahen Grundwasser führen.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen insbesondere an *BDF01* zeigten zum ersten Mal eine Verlagerung von Tetracyclinen mit dem Sickerwasser, trotz der starken Sorption an die Bodenmatrix. Bislang wurde dieser Weg als wenig wahrscheinlich beurteilt (HIRSCH et al. 1999; LINDSEY et al. 2001; ZHU et al. 2001; HAMSCHEER et al. 2005). Die Sulfamethazineergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Grundwasseruntersuchungen (HAMSCHEER et al. 2005) decken sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen von Screeningstudien in Deutschland und kürzlich erschienenen Daten aus den USA. Die Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Studien verdeutlicht eindrucksvoll, dass eine mögliche lokale Grundwassergefährdung oftmals erst nach vielen Jahren erkannt werden kann.

4.4.3.2 Verlagerung ins Oberflächenwasser

An der Bodenoberfläche, z. B. bei nicht untergepflügter Gülle oder auch in Güllekrusten, treten relativ hohe Gehalte an Tierarzneimitteln auf, die in Erosionsprozessen in Oberflächengewässer eingetragen werden können. Über den horizontalen Wasserfluss nahe der Bodenoberfläche und über Dräne können ebenfalls Wirkstoffe, häufig direkt nach der Begüllung, in die Oberflächengewässer gelangen. Aktuelle Studien berichten insbesondere über einen Eintrag von Tetracyclinen in Oberflächengewässer (LINDSEY et al. 2001; KOLPIN et al. 2002; YANG und CARLSON 2003).

Bei der Untersuchung von 144 Grund- und Oberflächenwasserproben in den USA enthielten 6 % der Proben Sulfonamide und Tetracycline in Konzentrationen von 0,07–15 µg/L. In sechs Oberflächengewässerproben wurden drei verschiedene Tetracycline nachgewiesen (OTC 0,15 µg/L, TC 0,07–1,34 µg/L und CTC 0,11 µg/L).

Die Untersuchung eines Flusslaufes auf sieben Tetracycline und sechs Sulfonamide ergab eine höhere Rückstandskonzentration an den Standorten, die sowohl durch die Einträge von kommunalen Abwässern, als auch durch den Run-Off von landwirtschaftlichen Flächen affektiert wurden (YANG und CARLSON 2003). Die Konzentration an Tetracyclinen, folglich aus human- und/oder veterinärmedizinischer Anwendungen, reichte von 0,08–0,30 µg/L. Die Sulfonamide Sulfamethoxazol und

Sulfachloropyridazin wurden nur an einem Standort mit Konzentrationen größer als 0,1 µg/L detektiert und lagen weiter flussabwärts unterhalb der NWG von 0,05 µg/L. Am Standort ohne anthropogenen Einfluss wurden keine Antibiotika detektiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in zukünftigen Studienplanungen auch die Untersuchung der Felddrainagen und Oberflächengewässer im Einzugsbereich der hier untersuchten Standorte ein Rolle spielen sollten.

4.4.3.3 Bewertung der Grundwasseruntersuchungen

Momentan gibt es keine gesetzliche Regelung in Deutschland oder in Europa, die eine direkte Bewertung der Befunde zulassen würde. Nach der Trinkwasserverordnung gilt für Pflanzenschutzmittel und Biozide unterschiedslos ein Grenzwert von 0,1 µg/L (TRINKWV 2001). Da Pflanzenschutzmittel ebenso wie Arzneimittel im Hinblick auf eine biologische Wirkung konzipiert sind, erscheint es vernünftig, den Wert der TrinkwV zur vorläufigen Einschätzung eines möglichen Handlungsbedarfes auch für Arzneistoffe zu verwenden. Nach der EMEA-Leitlinie EMEA/CVMP/055/96-final (EMEA 1997), die bei einer Neuzulassung von Veterinärpharmaka heranzuziehen wäre, geht von zuzulassenden Stoffen eine potenzielle Gefahr für das Grundwasser aus, wenn hier eine Konzentration von mehr als 0,1 µg/L vorhergesagt wird. Eine neuere Richtlinie des VICH (2000) stufte diesen Schwellenwert auf 1 µg/L hoch. Die gemessenen Konzentrationen wären somit in einem Bereich, der Handlungsbedarf aufzeigen könnte.

4.5 Aquakultur

Die in Europa in der Aquakultur zugelassenen Antibiotika beschränken sich auf wenige Substanzen; ihre Anwendung ist meist speziesabhängig limitiert. Dennoch wird vermutet, dass der Chemikalien- und insbesondere der Antibiotikaeinsatz in der gegenwärtigen Praxis sehr groß ist. Viele der Wirkstoffe können allerdings erst nach Umwidmung legal eingesetzt werden. Die häufigsten Antibiotika sind auch hier wiederum bei den Tetracyclinen und den Sulfonamiden zu finden. Die Antibiotika werden über das Futter oder direkt in das Wasser gegeben (HIRSCH et al. 1999). Begründet in dieser speziellen Anwendungsform werden die Pharmazeutika kaum metabolisiert und aufgrund der niedrigen Umgebungstemperaturen kaum abgebaut (JACOBSEN und BERGLIND 1988). Der geschätzte Antibiotikaanteil, der sich direkt über das Fischfutter oder über die Ausscheidungen der Fische in den Sedimenten

niederschlägt, liegt bei ~75 % (RICHARDSON und BOWRON 1985; HALLING-SØRENSEN 1998).

Einer der weltweit am häufigsten in der Aquakultur eingesetzten Wirkstoffe ist das Tetracyclinantibiotikum Oxytetracyclin. So detektierte SAMUELSEN (1992) im Sediment einer Fischfarm nach einer Medikation mit Oxytetracyclin diese Substanz in einer beträchtlichen Konzentration von 285 mg/kg. Andere Forschergruppen berichteten ebenfalls von Oxytetracyclinrückständen in marinen Sedimenten, allerdings mit niedrigeren Konzentrationen (CAPONE et al. 1996; JACOBSEN und BERGLIND 1988). Diese Befunde deuten auf einen weit verbreiteten Eintrag von Oxytetracyclin in dieses Umweltkompartiment hin.

Im Rahmen einer Screening-Studie „Aquakulturen in Niedersachsen“ koordiniert vom *Veterinärinstitut für Fische und Fischwaren Cuxhaven* des *Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)* wurden bei 15 Fischhaltungsbetrieben mit Forellenteichwirtschaft, davon 13 mit gewerblicher Nutzung, Proben von Teichwässern und –sedimenten entnommen (siehe Tab. 3–29, Abschnitt 3.5). Nach Betreiberangaben kam es bei acht Betrieben zu einer Tierarzneimittelanwendung. In 4 von 10 untersuchten Teichsedimenten wurden lediglich die Tetracycline Oxytetracyclin und Chlortetracyclin im Konzentrationsbereich von 2,0–25,8 µg/kg TS nachgewiesen (siehe Tab. 3–30, Abschnitt 3.5). In zwei der positiv getesteten Betriebe wurden, laut freiwilligen Angaben der Betreiber, keine Tierarzneimittel angewendet. Bei drei Betrieben wurde innerhalb der letzten 12 Monate vor der Beprobung ein Trimethoprim/Sulfonamid-Präparat angewendet. Sulfonamide waren jedoch in Wasser und Sediment nie nachweisbar. Das spricht für eine rasche Elimination in diesem Umweltkompartiment.

Die hier ermittelten Daten sind auf den ersten Blick betrachtet nicht so alarmierend wie die für die Intensivtierhaltung. Da diese Studie in den Wintermonaten durchgeführt wurde, könnte der im Vergleich zu der wärmeren Jahreszeit im Allgemeinen bessere Hygienestatus für den geringen Antibiotikaeinsatz verantwortlich sein. Weiterhin sollte in einer Folgestudie die Probenahme direkt nach einer Medikation erfolgen, da hier mit punktuell höheren Rückstandskonzentrationen gerechnet werden muss. So zeigten BEBAK-WILLIAMS et al. (2002) bei Fütterungsstudien mit Oxytetracyclin im Wasser- und Sediment einen Anstieg innerhalb der 10-tägigen Anwendung (500 µg/L Wasser; 1900 mg/kg Sediment) und einen signifikanten Abfall bis zum Tag 21 (< 100 µg/L Wasser; < 2 mg/kg Sediment) nach der Anwendung.

4.6 Mögliche Effekte von Antibiotika aus dem landwirtschaftlichen Umfeld in der Umwelt

Die pharmakologische Wirkung der Antibiotika beruht auf der Schädigung oder Abtötung von Mikroorganismen und Prokaryonten bei Konzentrationen, die für den Wirtsorganismus weitgehend untoxisch sind. Die selektive Toxizität der Antibiotika ist darauf zurückzuführen, dass sie gezielt in Strukturen oder Mechanismen eingreifen, die alleinig beim Zielorganismus vorhanden sind. Nachteilige Effekte von Antibiotikarückständen in der Umwelt sind daher potenziell bei terrestrischen und aquatischen Mikroorganismen zu erwarten und weniger bei eukaryontischen Nichtzielorganismen oder auch Pflanzen. Das Ausmaß der Umweltwirkung ist wiederum sehr eng mit den Umweltkonzentrationen der Antibiotika und deren Bioverfügbarkeit (TOLLS 2001) verknüpft. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass Antibiotika in erheblichen Mengen in Gülle (mg/kg-Bereich) und Boden ($\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich) nachgewiesen werden können. Da Antibiotika in verschiedenen biotischen oder abiotischen Prozessen abgebaut werden können, müssen zudem die Degradationsprodukte mit berücksichtigt werden.

4.6.1.1 Boden und Sediment

Umfassende systematische Untersuchungen zu möglichen Effekten von Antibiotika in Böden sind auf Grund der enorm hohen Komplexität des Lebensraumes Bodens bislang nicht durchgeführt worden. Diskutierte Effekte sind Änderungen der Struktur bzw. der Funktion mikrobieller Biozöosen. Auch könnte die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft durch den Eintrag von Antibiotika-Resistenzgenen und dem einhergehenden horizontalen Gentransfer beeinflusst werden (NWOSU 2001).

Wie erwartet, konnte eine ökotoxikologische Wirkung auf höhere Bodenorganismen bislang nicht festgestellt werden. Selbst hohe Konzentrationen von mehreren mg/kg Boden an Oxytetracyclin und Tylosin übten keine nachteiligen Effekte auf die Mortalität und Reproduktion von Regenwürmern, Collembolen und Enchyträen aus (BAGUER et al. 2000).

Als weitere Wirkung, ist auch eine Beeinflussung der Pflanzenwelt in Betracht zu ziehen. Bislang konnten nur in *in vitro* Phytotoxizitätstudien Effekte auf Wachstum und Entwicklung bei verschiedenen Feldfrüchten (*Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Zea mays*) festgestellt werden (JEMBA 2002). Die Effektkonzentrationen lagen dort im mittleren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich. Das heißt, nur bei 100 %iger Biover-

füchtigkeit der hier maximal gemessenen Umweltkonzentrationen wäre mit einer phytotoxischen Wirkung zu rechnen.

Marine Sedimente und getrocknete Gülleaggregate stellen, unter Annahme der vollständigen Bioverfügbarkeit, zumindest zwei bekannte „Hot-Spots“ dar, die lokale Tetracyclinkonzentrationen im Bereich der minimalen Hemmkonzentration für die verschiedensten Bakterien von 0,5–2 mg/L aufweisen (KROKER et al. 2002). Verschiedene Studien (HAMSCHEER et al. 2000; 2002; HÖPER et al. 2002; SCHLÜSENER et al. 2003a) und die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten inzwischen, dass die Antibiotikakonzentrationen im Boden (niedriger bis mittlerer µg/kg-Bereich) in der Regel unter den minimalen Hemmkonzentrationen liegen. Für Tetracyclin wurden aber auch lokale Maxima bis zu 500 µg/kg gemessen. Gerade für diese Substanz scheint aber die Bioverfügbarkeit limitiert, da insbesondere die Tetracycline stark in Böden sorbiert werden. Biotische oder abiotische Faktoren, die gegebenenfalls ihre Remobilisierung bewirken sind bislang nur vereinzelt bekannt (HALLING-SØRENSEN et al. 2002). Da die Mehrzahl der bislang gemessenen Umweltkonzentrationen im subtherapeutischen Bereich liegt, sind die zu erwartenden Effekte eher subtiler Natur und ihr Nachweis scheitert an dem Nicht-Vorhandensein adäquater Testmethoden.

Die Mehrzahl der beschriebenen Studien zu Umwelteffekten von Antibiotika befasst sich somit mit dem Thema des Eintrages und des Vorkommens von antibiotikaresistenten Bakterien. So berichten CHEE-SANFORD et al. (2001) über das Vorkommen von Tetracyclinresistenzgenen in Gülle-Lagunen zweier Schweinemastbetriebe und den Eintrag ins Grundwasser. Nicht vollständig geklärt ist allerdings, ob es durch die Ausbringung von Gülle längerfristig zu einer Verschiebung von Antibiotikaresistenzspektren in den Bodenmikroorganismen-Gemeinschaften kommen kann. JENSEN et al. 2001 fanden in Ackerböden antibiotikaresistente Stämme von *Pseudomonas* spp. und *Bacillus cereus* (z. B. Resistenz gegen TC, Streptomycin und Erythromycin). Jedoch war der Effekt nur gering und kurzfristig zu beobachten, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass die resistenten Bakterien bereits in der Gülle vorhanden waren. Auch SENDELØV et al. (2003) erkannten einen temporären Anstieg der tetracyclineresistenten Bakterien im Boden nach Düngung mit tetracyclinhaltiger Gülle (0,04–0,7 mg/L). Ferner entdeckten ONAN und LAPARA (2003) einen nachhaltigen Zusammenhang zwischen der Exposition von Ackerland mit Wirtschaftsdüngern aus Betrieben mit subtherapeutischer Tylosinanwendung und der Zunahme von tylosinresistenten Bakterien bei der Gesamtheit der kultivierbaren Bodenmikroorganismen. Diese Studien deuten auf einen postulierten generellen

Zusammenhang zwischen Antibiotikaexposition und dem prozentualen Anteil antibiotikaresistenter Bodenbakterien (NWOSU 2001) hin. Völlig ungeklärt ist dennoch, ob die Antibiotikarückstände die Resistenzbildung in der Umwelt fördern oder den gegebenen Resistenzstatus lediglich aufrechterhalten.

4.6.1.2 Grundwasser

Obwohl die Sulfonamidantibiotika offensichtlich in Gülle und Boden schnell abgebaut werden, sind sie dennoch stabil genug, um ins oberflächennahe Grundwasser vorzudringen (ng/L-Bereich). Die Tetracycline sind dagegen in Gülle und Boden persistent. Da sie stark an Bestandteile der Bodenmatrix sorbiert werden, kann nur ein Bruchteil der Tetracyclinfrachten als bioverfügbar erachtet werden. Degradationsprozesse könnten dabei die Remobilisierung beeinflussen, da Abbauprodukte im Vergleich zur Muttersubstanz veränderte Mobilitätseigenschaften aufweisen können (z. B. TC versus ATC; HALLING-SØRENSEN et al. 2002).

Es wird angenommen, dass die Exposition von Bakterien mit Konzentrationen unterhalb des therapeutischen Bereichs die Selektion antibiotikaresistenter Stämme beschleunigt. Zudem können Resistenzeigenschaften durch Gentransfer auf andere aquatische Bakterien übertragen werden (KÜMMERER 2003a/b). Im Falle des Sulfonamides Sulfamethazin könnten somit die wiederholten Einträge in das Grundwasser im subtherapeutischen Konzentrationsbereich die Resistenzbildung bei aquatischen Bakterien fördern. Der erstmalige Nachweis von Tetracyclin in Grundwasserproben unterhalb einer seit vielen Jahren hoch belasteten landwirtschaftlichen Nutzfläche zeigt, dass auch der Faktor Zeit bei der zukünftigen Durchführung von Feldstudien eine wichtige Rolle spielen wird. CHEE-SANFORD et al. (2001) stellten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Tetracyclinresistenzgenen im Grundwasser und der Landwirtschaft fest. Nach Meinung dieser Autoren könnte das Grundwasser eine potenzielle Quelle für Antibiotikaresistenzen in der Nahrungskette sein.

4.6.1.3 Andere Effekte

Wiederholt wurde über Störungen beim Betrieb von Fermentern und Biogasanlagen bei der Verwendung antibiotikahaltigen Güllen berichtet (LALLAI et al. 2002; MASSÉ et al. 2000). Da dies auch zu beträchtlichen wirtschaftlichen Schäden führen kann, wäre eine Reduktion des Eintrages von Antibiotika in die Gülle ein prioritäres Ziel.

4.7 Luftgetragene Antibiotikarückstände in Stallstäuben

4.7.1 *Der Stallstaub als neue Quelle von Tierarzneimittel und deren Freisetzung über die Luft in die Umwelt*

Im Vergleich zu den anerkannten Expositionswegen von Antibiotika aus der veterinärmedizinischen Anwendung in die Umwelt (JJEMBA 2002; JØRGENSEN und HALLING-SØRENSEN 2000) und deren Vorkommen in diesen Kompartimenten (BOXALL et al. 2003; THIELE-BRUHN 2003a) stellen die Ergebnisse bzgl. Antibiotikarückständen in Stallstäuben einen völlig neuen Eintragsweg dar. Das Vorkommen zahlreicher Antibiotika (bis zu Fünf in einer Probe) in beträchtlichen Konzentrationen (mg/kg-Bereich; siehe Tab. 3–31, Abschnitt 3.6.1) im Schwebstaub von Stallluft, könnte ein in diesem Zusammenhang noch nicht beschriebenes Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen. Die partikelgebundenen Antibiotika in der Stallluft können dabei aus verschiedenen Quellen stammen. Wahrscheinlich rührt der Hauptanteil der Belastung von antibiotikahaltigen Futterstoffen her. Bei der Verfütterung kann es durch diese pelletierten oder pulverisierten Futterstoffe zu einer erheblichen Staubbelastung kommen. Weiterhin tragen auch getrocknete Güllepartikel zur Gesamtheit des Stallstaubes bei (DONHAM 1993).

4.7.2 *Luftgetragene Antibiotikarückstände - Ein Gesundheitsrisiko für den Menschen?*

Während einer retrospektiven Studie in einem Schweinestall wurde über einen Zeitraum von 20 Jahren eine fortwährende Belastung des Stallstaubes mit den am häufigsten eingesetzten Antibiotika in einem Konzentrationsbereich von 0,19–12,5 mg/kg Staub nachgewiesen. Auch ein Kurzzeitmonitoring einer Hühnerstallung führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Staubproben wurden bis zum Zeitpunkt der Analyse bis zu 20 Jahre bei 4 °C gelagert, was für die Persistenz der Antibiotika in dieser Matrix spricht. Zwei Einzelbefunde von THIELE-BRUHN et al. (2003b) in Stallabluftstaub bestätigen die Relevanz von Stallstäuben als Träger von Antibiotikarückständen.

Aufgrund des hohen Bakterien- und Endotoxingehaltes, gilt Stallstaub seit langem als Risikofaktor insbesondere in der Ausbildung von Atemwegserkrankungen (IVERSEN et al. 2000; NOWAK 1998; PLATZ et al. 1995; RADON et al. 2002). Der hier erstmalig erbrachte Nachweis von Antibiotikarückständen in Stallstäuben könnte

somit ein zusätzliches, bislang nicht berücksichtigtes, gesundheitliches Risiko darstellen. Die langfristige Belastung der Stallluft mit Antibiotika könnte ein allergenes Risiko für die exponierten Menschen darstellen. Insbesondere gelten Tylosin und Sulfamethazin, die in beiden Studien in hoher Frequenz detektiert wurden, als Wirkstoffe mit allergenem Potenzial (BARBERA und DE LA CUADRA 1989; CARAFFINI et al. 1994; DANESE et al. 1994; HJORTH und ROED-PETERSEN 1980). Der Schwebstaub des Schweinestalls war zeitweise auch mit Chloramphenicol belastet, das in seltenen Fällen erhebliche Nebenwirkungen zeigen kann (HOLT et al. 1993). Seit 1994 ist der Einsatz als Tierarzneimittel für Lebensmittelliefernde Tiere verboten und gemäß der Ratsverordnung 2377/90 (EWG), Anhang IV, gilt in der europäischen Union eine Null-Toleranz (EG 1990). Die therapeutische Einnahme von Chloramphenicol führt mit einer sehr geringen Inzidenz zu irreversiblen und tödlichen Knochenmarksaplasien. Das Auslösen der aplastischen Anämie beim Menschen ist dosisunabhängig. Genotoxizitätstests und Toxizitätsstudien führten bei der Beurteilung von Chloramphenicol dazu, dass kein ADI-Wert (*acceptable daily intake*) festgelegt werden konnte (JEFCA 1994) und folglich die Aufnahme in Anhang IV gemäß Artikel 5 der VO 2377/90 (EWG) erfolgte (EG 1990, EMEA 1996).

Des Weiteren kann die Inhalation eines ganzen Antibiotiakocktails über Staubpartikel die Selektion antibiotikaresistenter Keime fördern. HAMSCHER et al. (2003b) berechnete eine tägliche inhalierbare Antibiotikamenge von 0,02 µg auf Basis einer mittleren Antibiotikagesamtmenge von 3,4 mg/kg Staub. In Praxis können diese Konzentrationen weitaus höher sein (siehe Tab. 3–31, Abschnitt 3.6.1). Obwohl die so ermittelten lokalen Konzentrationen in der Lunge noch weit unter den Effektkonzentrationen der einzelnen Wirkstoffe liegen, stellt die permanente Exposition mit subtherapeutischen Wirkdosen optimale Bedingungen zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzen dar (GAVALCHIN und KATZ 1994). Dennoch könnte auch durch die Inhalation von antibiotikaresistenten Keimen eine direkte Verbreitung der Resistenzeigenschaften erfolgen. So stellte ZAHN (2001) in einem ventilierten Schweinestall, bei einer Tylosinkonzentration von 8 ng/L Luft, eine Resistenz gegenüber Tylosin bei 80 % der kultivierbaren Bakterien fest. Bei der zukünftigen Beurteilung von gesundheitsrelevanten Stoffen in Stallstäuben sollten neben Schimmelpilzen, Getreidemilben, Endotoxinen und mineralischen Partikeln auch Antibiotika Berücksichtigung finden. Darüber hinaus wären weitergehende Untersuchungen z. B. bezüglich des Allergie- oder Resistenzstatus von Personen wichtig, die im landwirtschaftlichen Bereich beschäftigt sind.

4.7.3 Stallstäube als Informationsquelle zur landwirtschaftlichen Praxis

Die Daten der retrospektiven Studie können auch noch unter einem anderen Aspekt betrachtet werden. So stellt das Vorkommen der einzelnen Antibiotika in den verschiedenen Staubproben einen Fingerabdruck der in diesem Zeitabschnitt verabreichten Wirkstoffe dar. Die Größenordnung der Antibiotikakonzentrationen lassen Rückschlüsse auf den Gesundheitsstatus des Tierbestandes zu. Der untersuchte Schweinestall wurde 1984 komplett neu umgebaut, was sich offensichtlich kurzfristig positiv auf den Hygienestatus auswirkte. So wurden in den Jahren 1984 und 1985 keine Antibiotikarückstände im Staub detektiert. Weitergehend können anhand dieser Studiendaten sogar die Verbrauchspräferenzen in der Intensivtierhaltung reflektiert werden. In den 1980er Jahren wurde in der Schweinemast vor allem Tylosin in großen Mengen eingesetzt, demonstriert durch die Studiendaten der Proben aus 1983 und 1986–1987. In der Europäischen Union wurde im Jahr 1998 Tylosin endgültig als Leistungsförderer verboten und war folglich in den Staubproben von 1990 und 2000 nicht mehr nachweisbar. Die drei Chloramphenicol-positiven Staubproben datieren alle vor 1994, dem Jahr des EU-weiten Anwendungsverbotes für Chloramphenicol bei lebensmittelliefernden Tieren. Anhand einer Staubanalyse könnte zukünftig auch ein illegaler Wirkstoffeinsatz nachgewiesen werden.

5 Experimentelles

5.1 Geräte und sonstiges Labormaterial

5.1.1 *Probenvorbereitung*

Dispenser:	„EM-Dispenser“ 0,4–2 mL und 2–10 mL (<i>Hirschmann Laborgeräte</i> , Eberstadt, Deutschland)
Dispergiergeräte:	„Ultraturrax T25 basic“ (<i>IKA Labortechnik</i> , Staufen, Deutschland) Kaffeemühle „MC 23200“ (<i>Siemens</i> , München, Deutschland)
Rotationsverdampfer: (mit Vakuumpumpe)	„Laborota-4002 digital“ (<i>Heidolph Instruments</i> , Schwabach, Deutschland)
Rührer:	Magnetrührer „RTC basic“ (<i>IKA Labortechnik</i> , Staufen, Deutschland)
Schüttler:	Rotationsschüttler „KS 125 basic“ und „KS 130 basic“ (<i>IKA Labortechnik</i> , Staufen, Deutschland)
Sieb:	Analysensieb aus rostfreiem Stahl, cut-off: 2 mm (200 mm Ø x 50 mm) (<i>Retsch</i> , Haan, Deutschland)
SPE-Vakuum-Einheit:	„Baker spe 12G System“ (<i>Mallinckrodt Baker</i> , Griesheim, Deutschland)
Vakuumpumpe: (für Rotationsverdampfer)	„Vacuubrand CVC 2“ für Rotationsverdampfer (<i>Heidolph Instruments</i> , Schwabach, Deutschland)
Waagen:	Analysenwaage „MC 210P“ (<i>Sartorius</i> , Göttingen, Deutschland) Laborwaage „OL 3100-P“ (<i>Omnilab-Laborzentrum</i> , Bremen, Deutschland)
Zentrifugen:	„CS 15R“ mit Festwinkelrotor „F0850“ und Schwenkrotor „S4180“ und „Microfuge R“ mit Festwinkelrotor „F241.5“ (<i>Beckman Instruments GmbH</i> , München, Deutschland)

5.1.2 Verbrauchsmaterial

Kunststoffspritzen:	„Braun-Injekt“ 10 und 20 mL (<i>B. Braun</i> , Melsungen, Deutschland)
Membranfilter:	„ME 25“, Cellulosemischester, Porengröße 0,45 µm, Ø 50 mm (Artikelnr. 10 401614; <i>Schleicher & Schuell</i> , Dassel, Deutschland)
Mikroeingsätze:	„G30“, 225 µL und „G30/5-zyl“, 260 µL für Probenfläsch- chen (Artikelnr. 300405 und 300403; <i>CS Chromatographie</i> <i>Service</i> , Langerwehe, Deutschland)
Pasteurpipetten:	150 mm und 230 mm, Glas (<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen:	Standardtips, 20 µL, 100 µL, 1000 µL und 2,5 mL (<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland)
Probenfläschchen:	1,5 mL, klar, Schraubkappe (Artikelnr. 100010; <i>Thermo Electron Corporation</i> , Egelsbach, Deutschland)
Reaktionsgefäße:	„Safe-Lock Reaktionsgefäße“ 1,5 mL und 2 mL, farblos (<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland)
SPE-Kartuschen:	„Bakerbond SDB-1“, 200 mg, 6 mL (Artikelnr. 7519-05; <i>Mallinckrodt Baker</i> , Griesheim, Deutschland)
Zentrifugenbecher:	Zentrifugenbecher aus PP mit Schraubdeckel aus PA, 200 mL (Artikelnr. 361 245; <i>Beckman Instruments</i> , München, Deutschland)

5.1.3 Sonstiges

Backofen:	Ofen mit Pyrolysefunktion „Competence“ (<i>AEG</i> , Frankfurt am Main, Deutschland)
Glas-Filtrationsgerät:	1-L-Auffangflasche und 250-mL-Aufsatz (<i>Schleicher & Schuell</i> , Dassel, Deutschland)
Laborspülmaschine: (mit Reinstwasserspülanlage)	„Mielabor G7783 Multitronic“ (<i>Miele</i> , Gütersloh, Deutschland)
pH-Meter:	pH-Meter mit pH-Elektrode „BlueLine 14 pH mit Temperatursensor“ (<i>Schott</i> , Mainz, Deutschland)
Reinstwasseranlage:	„MilliQ PF Plus“ mit Elektroentionisierungssystem „Elix 3“ (<i>Millipore</i> , Billerica, MA, USA)

Reinstwasserspülanlage:	„Aqua Purifikator G7795“ (<i>Miele</i> , Gütersloh, Deutschland) (für Laborspülmaschine)
Spülmittel:	„RBS Solid Konzentrat“ (für Laborspülmaschine) (<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland)
Trockenschrank:	Umlufttrockenschrank „UT 6“ (<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau, Deutschland)
Ultraschallbad:	„Sonorex Super RK 514 BH“ (<i>Bandelin Electronic</i> , Berlin, Deutschland)
Variable Pipetten:	„Eppendorf Reference [®] Variabel“ 1–10 µL, 2–20 µL, 10–100 µL, 50–200 µL, 100–1000 µL und 500–2500 µL (<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland)
Vortex-Mixer:	„Reax 2000“ (<i>Heidolph Instruments</i> , Schwabach, Deutschland)

5.1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie/ Tandemmassenspektrometrie

5.1.4.1 HPLC-System

Entgaser:	Vacuum Membran Degasser (<i>Thermo Separation Products</i> , San Jose, CA, USA)
Pumpe:	P4000 (<i>Thermo Separation Products</i> , San Jose, CA, USA)
Autosampler:	AS3000 (<i>Thermo Separation Products</i> , San Jose, CA, USA) mit 250-µL-Probenspritze und 20-µL-Probenschleife; Tray-Temperatur: 10 °C
Injektion/Injektor:	„Push-Loop“-Injektion, 8 µL (Standardinjektionsvolumen); Spüllösung: Methanol/10 mM Oxalsäure (90/10; v/v), Spülvolumen: 3 mL
Diodenarraydetektor:	UV6000LP, Detektorzelle: 50 mm, 10 µL (<i>Thermo Separation Products</i> , San Jose, CA, USA)
Controller:	SN4000 (<i>Thermo Separation Products</i> , San Jose, CA, USA)

5.1.4.2 HPLC-Bedingungen

Alle verwendeten HPLC-Methoden basieren auf einem binären Fließmittelsystem mit 5 M Ammoniumacetat/Ameisensäure/Wasser (0,02/0,5/99,48; v/v/v) (pH 2,5) und Acetonitril. Die entsprechenden Gradienten sind in Tab. 5–1 aufgeführt.

Tab. 5–1: HPLC-Gradienten

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Gradient 1		Gradient 2		Fluss [mL/min]	Gradient 3	
		A ^a [%]	B ^b [%]	A ^a [%]	B ^b [%]		A ^a [%]	B ^b [%]
0	1,0	100	0	100	0	1,5	100	0
1	1,0	100	0	100	0	1,5	100	0
7	1,0	–	–	–	–	1,5	60	40
7,5	1,0	–	–	–	–	1,5	60	40
8	1,0	–	–	–	–	1,5	1	99
10	1,0	50	50	75	25	1,5	1	99
11	1,0	50	50	50	50	1,5	100	0
12	1,0	1	99	–	–	–	–	–
14	1,0	–	–	50	50	–	–	–
15	1,0	1	99	1	99	–	–	–
16	1,0	100	0	–	–	1,5	100	0
18	1,0	–	–	1	99	–	–	–
19	1,0	–	–	100	0	–	–	–
24	1,0	100	0	–	–	–	–	–
27	1,0	–	–	100	0	–	–	–

^a Fließmittel A: 5 M Ammoniumacetat/Ameisensäure/Wasser (0,02/0,5/99,48; v/v/v) (pH 2,5)

^b Fließmittel B: Acetonitril

5.1.4.3 HPLC-Trennsäulen

Bei den etablierten HPLC-MS-Methoden werden die Analyten standardmäßig auf der Trennsäule „Puresil C18“ von *Waters* getrennt. Diese Referenzsäule und alle weiteren im Rahmen einer Methodenoptimierung getesteten Trennsäulen sind in Tab. 5–2 aufgeführt.

Tab. 5–2: HPLC-Trennsäulen: Referenzsäule* und getestete[#] Säulen

Hersteller	Material	Dimension	Partikelgröße	Porendurchmesser
		[mm]	[µm]	[Å]
<i>Waters</i>	*Puresil™ C18	150 × 4,6	5	120
<i>Phenomenex</i>	[#] Luna Phenyl-Hexyl	150 × 4,6	5	100
<i>Phenomenex</i>	[#] Luna RP8	150 × 4,6	5	100
<i>Phenomenex</i>	[#] Luna RP18	150 × 4,6	5	100
<i>Thermo Hypersil</i>	[#] Hypersil®	100 × 4,0	5	250
<i>Thermo Hypersil</i>	[#] Hypersil Gold	150 × 4,6	5	175
<i>Varian</i>	[#] MetaSil AQ RP18	150 × 4,6	5	100
<i>Varian</i>	[#] Polaris C18-A	250 × 4,6	5	180

5.1.4.4 Massenspektrometer

Massenspektrometer:	Finnigan LCQ Ion Trap-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
Druckluftkompressor:	MGK-N421/90 (Mahle, Stuttgart, Deutschland)
Stickstoff-Generator:	Ecoinert 2 ESP (DWT-GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland)
ESI-Koppelkapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (100 µm i. D.) (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
ESI-Nadel-Spannung:	+5 kV/−3 kV
Positiv-Modus:	alle Verbindungen außer Chloramphenicol
Negativ-Modus:	Chloramphenicol
Trockengas:	Stickstoff
Sheathgas:	100 Einheiten
Auxgas:	0 Einheiten
Dämpfungsgas:	Helium 5.0
Temperatur Kapillare:	150 °C
Auswertung:	Xcalibur™ (Thermo Electron Corporation, Egelsbach, Deutschland)

5.1.4.5 MSⁿ-Methoden

Anmerkung: Die im Rahmen der Methodenentwicklung verwendeten MS-Methoden und deren zugrunde liegenden Massensegmente betreffen für die Gruppen der Tetracycline m/z 400–500 und der Sulfonamide m/z 200–350 sowie für die Substanzen Tylosin m/z 850–950 und Chloramphenicol m/z 250–350.

Methode 1: Detektion von OTC, TC, CTC, TYL und CAP

Trennsäule:	Puresil C18
Fluss:	1 mL/min
Gradient:	Gradient 1
MS/MS-Modus:	<u>Segment 1</u> Dauer: 7,20 min (+) MS/MS (461,1) → (130,0–500,0) Kollisionsenergie (CE): 20,0 %; Isolation Width (IsoW): 1,6 $m/z = 443,1$

Segment 2

Dauer: 0,50 min
(+) MS/MS (445,1) → (130,0–500,0)
CE: 20,0 %; IsoW: 1,4
 $m/z = 427,1$

Segment 3

Dauer: 1,10 min
(+) MS/MS (479,1) → (130,0–500,0)
CE: 27,0 %; IsoW: 1,6
 $m/z = 444,1 + 461,1 + 462,1$

Segment 4

Dauer: 1,40 min
(+) MS/MS (916,5) → (700,0–950,0)
CE: 28,0 %; IsoW: 2,0
 $m/z = 772,1$

Segment 5

Dauer: 0,80 min
(–) MS/MS (321,1) → (85,0–350,0)
CE: 24,0 %; IsoW: 1,4, Source Induced Dissociation (SID): 10 V
 $m/z = 194,1 + 237,1 + 249,1$

**Methode 2: Detektion von TC, CTC und ATC
(inklusive Epi- und/oder Iso-Verbindungen)**

Trennsäule: Puresil C18

Fluss: 1 mL/min

Gradient: Gradient 1

MS/MS-Modus: Segment 1
Dauer: 7,70 min
(+) MS/MS (445,1) → (130,0–500,0)
CE: 20,0 %; IsoW: 1,4
 $m/z = 427,1$

Segment 2

Dauer: 1,10 min
(+) MS/MS (479,1) → (130,0–500,0)
CE: 27,0 %; IsoW: 1,6
 $m/z = 444,1 + 461,1 + 462,1$

Segment 3

Dauer: 1,20 min
(+) MS/MS (427,1) → (130,0–500,0)
CE: 22,0 %; IsoW: 1,5
 $m/z = 410,0$

Methode 3: Detektion der Sulfonamide

Trennsäule: Puresil C18

Fluss: 1 mL/min

Gradient: Gradient 2

MS/MS-Modus: Segment 1

Dauer: 8,75 min

(+) MS/MS (251,1) → (85,0–300,0)

CE: 29,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 156,1 + 174,1$ Segment 2

Dauer: 0,55 min

(+) MS/MS (256,1) → (85,0–300,0)

CE: 28,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 156,1$ Segment 3

Dauer: 0,65 min

(+) MS/MS (265,1) → (85,0–300,0)

CE: 30,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 156,1 + 174,1 + 190,1$ Segment 4

Dauer: 0,90 min

(+) MS/MS (279,1) → (85,0–300,0)

CE: 30,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 204,1$ Segment 5

Dauer: 1,55 min

(+) MS/MS (281,1) → (85,0–300,0)

CE: 30,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 108,1 + 126,1 + 156,1 + 215,1$ Segment 6

Dauer: 1,00 min

(+) MS/MS (254,1) → (85,0–300,0)

CE: 34,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 147,1 + 156,1 + 188,1 + 190,1 + 194,1$ Segment 7

Dauer: 1,10 min

(+) MS/MS (311,1) → (85,0–320,0)

CE: 34,0 %; IsoW: 1,0

 $m/z = 156,1 + 218,1 + 245,1$

Methode 4: Detektion von OTC (inklusive Epi- und Apo-Verbindungen)

Trennsäule: Puresil C18

Fluss: 1 mL/min

Gradient: Gradient 1

MS/MS-Modus: Segment 1
Dauer: 7,20 min
(+) MS/MS (461,1) → (130,0–500,0)
CE: 20,0 %; IsoW: 1,6
 $m/z = 443,1$

Segment 2
Dauer: 3,80 min
(+) MS/MS (443,1) → (130,0–500,0)
CE: 22,0 %; IsoW: 1,6
 $m/z = 426,1$

Methode 5: Detektion von CAP

Trennsäule: Puresil C18

Fluss: 1 mL/min

Gradient: Gradient 1

MS³-Modus: Segment 1
Dauer: 11,00 min
(-) MS/MS/MS (321,1) → (194,1) → (50,0–200,0)
CE: 24,0 %; IsoW: 1,4, SID: 10 V
 $m/z = 176,1$

5.2 Material

5.2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen in der Regel p.a.-Qualität, die benutzten Lösungsmittel für HPLC und Probenvorbereitung hatten alle HPLC-Gradientenqualität (siehe Tab. 5–3). Das Wasser zur Herstellung der Eluenten für die HPLC, von Reagenzien- und Pufferlösungen sowie für sonstige Verwendungszwecke wurde aus einer Millipore-QF-Anlage (siehe Abschnitt 5.1.3) entnommen.

Tab. 5–3: Chemikalien und Lösungsmittel für die HPLC und zur Probenvorbereitung

Substanz	Reinheit	Hersteller	Artikelnummer
Acetonitril	HPLC grade	<i>Mallinckrodt Baker</i>	8143
Ameisensäure 98–100 %	p.a.	<i>Riedel-de Haen</i>	33015
Ammoniumacetat	p.a.	<i>Merck</i>	1.01116.
Citronensäure-Monohydrat	p.a.	<i>Merck</i>	1.00244.
Essigsäure 100 %	HPLC grade	<i>Mallinckrodt Baker</i>	6152
Essigsäureethylester	HPLC grade	<i>Aldrich</i>	27,052-0
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz-Dihydrat	ultrarein	<i>Sigma</i>	E-1644
Helium	5.0	<i>Linde AG</i>	k. A.
Humussäure	techn.	<i>Fluka</i>	53680
Methanol	HPLC grade	<i>Mallinckrodt Baker</i>	8402
Calciumchlorid-Dihydrat	p.a.	<i>Merck</i>	1.02382.
Natriumhydroxid-Plätzchen	p.a.	<i>Merck</i>	1.06498.
Oxalsäure-Dihydrat	p.a.	<i>Merck</i>	1.00495.

Abk.: k. A., keine Angabe

5.2.2 Standardsubstanzen

Ausgehend von den in Tab. 5–4 aufgeführten Standardsubstanzen werden Stammlösungen mit einer effektiven Massenkonzentration von 1 mg Reinsubstanz/mL Methanol hergestellt. Die Reinheitsangaben der Substanzen laut Hersteller, Hydratwasseranteile oder das Vorliegen als Hydrochloridsalze werden in einem Korrekturfaktor berücksichtigt und die Einwaagen mittels dieses Faktors korrigiert (siehe Tab. 5–5). Für massenspektrometrische Untersuchungen werden aus den Stammlösungen (1,0 mg/mL) verschiedene Standardmixturen in Methanol durch Verdünnen um den Faktor 100 (10 µg/mL) bzw. 1000 (1 µg/mL) hergestellt. Alle Lösungen werden bei –20 °C gelagert.

Stammlösungen (1 mg/mL) bleiben so gelagert über einen Zeitraum von mindestens 12 Monaten stabil. Die 10 µg/mL-Standardmixturen können für drei Monate und die 1 µg/mL-Standardmixturen für eine Woche verwendet werden. Arbeitsstandards werden arbeitstäglich frisch hergestellt.

Tab. 5-4: Standardsubstanzen

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Anhydrotetracyclin-HCl	13803-65-1	Riedel de Haen	37919
α -Apooxytetracyclin	18695-01-7	Acros Organics	257721000
β -Apooxytetracyclin	18751-99-0	Acros Organics	257731000
Chloramphenicol	56-75-7	Riedel de Haen	46110
Chlortetracyclin-HCl	64-72-2	Riedel de Haen	46133
4-Epianhydrotetracyclin-HCl	4465-65-0	Riedel de Haen	37921
4-Epichlortetracyclin-HCl	101342-45-4	Acros Organics	268231000
4-Epioxytetracyclin	14206-58-7	Acros Organics	257711000
4-Epitetracyclin-HCl	23313-80-6	Riedel de Haen	37918
Isochlortetracyclin-HCl	89835-80-3	Acros Organics	268211000
Oxytetracyclin-HCl	2058-46-0	Riedel de Haen	46598
Sulfadiazin	68-35-9	Riedel de Haen	35033
Sulfadimethoxin	122-11-2	Riedel de Haen	46794
Sulfamerazin	127-79-7	Riedel de Haen	46826
Sulfamethazin	57-68-1	Riedel de Haen	46802
Sulfamethoxazol	723-46-6	Riedel de Haen	46850
Sulfamethoxypyridazin	80-35-3	Riedel de Haen	46858
Sulfathiazol	72-14-0	Riedel de Haen	46902
Tetracyclin-HCl	64-75-5	Riedel de Haen	46935
Tylosin $\times \frac{1}{2}\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$	57607-40-6	Riedel de Haen	46992

Tab. 5-5: Korrekturfaktoren

Substanz (Molmasse [g/mol])	Analyt (Molmasse [g/mol])	Reinheit [%]	Korrektur- faktor
Anhydrotetracyclin-HCl (462,88)	Anhydrotetracyclin (426,44)	98,5	0,9075
α -Apooxytetracyclin (442,42)	α -Apooxytetracyclin (442,42)	95,1	0,9510
β -Apooxytetracyclin (442,42)	β -Apooxytetracyclin (442,42)	88,6	0,8860
Chloramphenicol (323,13)	Choramphenicol (321,13)	99,9	0,9990
Chlortetracyclin-HCl (515,34)	Chlortetracyclin (478,88)	83,0	0,7713
4-Epianhydrotetracyclin-HCl (462,88)	4-Epianhydrotetracyclin (426,44)	97,4	0,8973
4-Epichlortetracyclin-HCl (515,34)	4-Epichlortetracyclin (478,88)	87,2	0,8103
4-Epioxytetracyclin (460,44)	4-Epioxytetracyclin (460,44)	98,4	0,9840
4-Epitetracyclin-HCl (480,88)	4-Epitetracyclin (444,44)	97,9	0,9048
Isochlortetracyclin-HCl (515,34)	Isochlortetracyclin (478,88)	98,3	0,9135
Oxytetracyclin-HCl (496,88)	Oxytetracyclin (460,44)	96,2	0,8914
Sulfadiazin (250,28)	Sulfadiazin (250,28)	99,9	0,9990
Sulfadimethoxin (310,33)	Sulfadimethoxin (310,33)	99,9	0,9990
Sulfamerazin (264,31)	Sulfamerazin (264,31)	99,5	0,9950
Sulfamethazin (278,33)	Sulfamethazin (278,33)	99,9	0,9990
Sulfamethoxazol (253,28)	Sulfamethoxazol (253,28)	99,9	0,9990
Sulfamethoxypyridazin (280,31)	Sulfamethoxypyridazin (280,31)	99,8	0,9980
Sulfathiazol (255,32)	Sulfathiazol (255,32)	99,9	0,9990
Tetracyclin-HCl (480,88)	Tetracyclin (444,44)	97,1	0,8974
Tylosin $\times \frac{1}{2}\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ (1027,19)	Tylosin (916,11)	90,8	0,8098

5.2.3 Referenzmaterialen

5.2.3.1 Gülle für Wiederfindungsversuche

Als Matrix für die Wiederfindungsversuche von Sulfonamiden in Gülle diene eine rückstandsfreie Schweinegülle aus dem *Lehr- und Forschungsgut Ruthe* der *Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover*. Das Referenzmaterial wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.3.2 Sandboden für Wiederfindungsversuche

Für die Wiederfindungsversuche von Sulfonamiden in Sandboden wurde eine Mischprobe aus zehn Böden von der Region um *BDF01*, mit zu diesem Standort vergleichbaren Bodeneigenschaften ($C_{\text{org}} \sim 2\%$), hergestellt. Die Mischprobe enthielt keine Rückstände an Tetracyclinen und Sulfonamiden oberhalb der entsprechenden Nachweisgrenzen. Das Referenzmaterial wurde trocken und dunkel bei 4 °C gelagert.

5.2.3.3 Sickerwasser für Wiederfindungsversuche

Als Matrix für die Wiederfindungsversuche von Sulfonamide in oberflächennahem Grundwasser diene eine Mischprobe aus realen Sickerwasserproben des Standortes *BDF01*, die keine Rückstände an Tetracyclinen und Sulfonamiden oberhalb der entsprechenden Nachweisgrenzen aufwiesen. Das Referenzmaterial wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.3.4 Sandboden für Robustheitsversuche

Für die Versuche zur Robustheit der analytischen Methode zum Nachweis von Antibiotika aus Sandboden wurden Bodenmatrices mit originären TC-Rückständen ($60\text{--}120\text{ }\mu\text{g/kg}$, *BDF01*) verwendet. SMZ, als einziges nachweisbares Sulfonamid, lag in diesen Proben nur in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze vor.

5.2.3.5 Referenzböden für Wiederfindungsversuche

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten für Tetracycline, Sulfonamide und Tylosin in unterschiedlichen Bodentypen wurden die unter Abschnitt 3.2.3 in Tab. 3–9 aufgeführten Referenzböden verwendet. Diese zehn Böden sind im Rahmen des Forschungsvorhabens *Erprobung und Vorbereitung einer praktischen Nutzung ökotoxikologischer Testsysteme (ERNTE)* als Referenzböden ausgewählt und im Zuge dessen umfangreich charakterisiert worden. Die Referenzböden wurden in Schraubdeckelgläsern aus Braunglas bei 4 °C trocken gelagert.

5.2.3.6 Staub für Wiederfindungsversuche

Für die Ermittlung der Wiederfindungsraten zur Extraktion von Tetracyclinen, Sulfonamiden und Tylosin aus Staub fehlte es an geeignetem Referenzmaterial. Da es sich bei dem Großteil der später untersuchten Proben um Stäube aus einem Schweinemastbetrieb handeln sollte, wurde für die Wiederfindungsexperimente eine repräsentative Mischprobe aus den Leerproben (kein Nachweis von Antibiotika oberhalb der jeweiligen substanzspezifischen Grenzen des Verfahrens) der Jahre 1984 und 1985 dieses Schweinestalls hergestellt.

5.2.3.7 Ackerboden und Regenwasser für Adsorptions-/Desorptions-Experimente

Das Regenwasser (pH 6,5) für die Adsorptions-/Desorptionsexperimente wurde am 17.07.2002 über Nacht in zwei großen Plastikeimern gesammelt, über einen Faltenfilter in Kunststoffkannister abgefüllt und im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

Als feste Testmatrix wurde eine Mischprobe des Oberbodens von *BDF01* hergestellt. Die in diesem Sandboden enthaltenen originären Rückstände wurden mit HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Die verwendete Testmatrix enthielt letztlich an TC 316 µg/kg Boden und an SMZ 1,86 µg/kg Boden.

5.3 Allgemeine Vorschriften

5.3.1 Reinigen und Ausheizen von Laborglaswaren

Zu reinigende Glaswaren wurden in einem Laborspülautomaten unter Verwendung des Spülmittels „RBS-solids“ bei 85 °C gewaschen und mit entionisiertem Wasser nachgespült. Zusätzlich werden nach dem Spülvorgang alle Glaswaren in einem handelsüblichen Backofen mit einem Pyrolyseprogramm bei 450 °C für mindestens 1 h ausgeheizt. Dadurch werden noch vorhandene organische Verunreinigungen zersetzt und gleichzeitig freie Silanolgruppen an der Glasoberfläche wieder vernetzt, resultierend in einer erneuten Passivierung der Oberfläche (OEHME 1998).

5.3.2 Vorbehandlung von Glaswaren

Alle gereinigten Laborglaswaren die im Laufe der Probenaufarbeitung direkt mit dem Analyten in Berührung kommen (z. B. Zentrifugengläser, Spitzbodenkolben) wurden

zunächst mit einer gesättigten methanolischen EDTA-Lösung gespült. Hierzu gibt man 2 mL der Spüllösung in das Gefäß und schüttelt bzw. vortext dieses 1 min, gießt die Lösung ab und lässt die Glasware überkopfstehend an der Luft abtrocknen.

5.3.3 Bestimmung der Trockensubstanz

20 g Probenmaterial werden in ein 100-mL-Becherglas exakt eingewogen und bei 100 °C in einem Trockenschrank mindestens 8 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im Trockenschrank wird das Probenmaterial erneut ausgewogen. Der Trockensubstanzanteil wird aus dem Quotienten von Trocken- und Feuchtgewicht bestimmt.

5.4 Analyse von verschiedenen Antibiotika mit HPLC-ESI-MSⁿ

Nachweis und Quantifizierung der Tetracycline und von Tylosin erfolgte mit dem bei HAMSCHER et al. (2002) beschriebenen HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren. Alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-MSⁿ-Verfahren für verschiedene Antibiotika wurden auf Basis dieses Verfahrens entwickelt. Die einzelnen Verfahrensschritte werden in den folgenden Abschnitten detailliert dargestellt.

5.4.1 HPLC-Trennung

Mit der unter Abschnitt 5.1.4.1 beschriebenen HPLC-Anlage wurden die Analyten standardmäßig an einer RP-C18-Phase („Puresil C18“) mittels verschiedener linearer, binärer Gradientensysteme aus 5 M Ammoniumacetat/Ameisensäure/Wasser (pH 2,5 [0,02/0,5/99,48; v/v/v]) und Acetonitril bei einem Fluss 1 mL/min getrennt. Der Fluss wurde vor Einlass in das Massenspektrometer gesplittet, wobei letztlich ca. 10 % zur tandemmassenspektrometrischen Detektion eingesetzt wurden. Standardmäßig wurden die in Tab. 5–1 (siehe Abschnitt 5.1.4.2) beschriebenen Gradienten eingesetzt; zur Trennung der Tetracycline, Tylosin und Chloramphenicol, Gradient 1 und zur Trennung der Sulfonamide, Gradient 2.

5.4.2 Tandemmassenspektrometrie und MS³

Massenspektrometrie wurde in einer LCQ Ionenfalle durchgeführt. Die Kopplung mit der HPLC erfolgte über ein Elektrospray-Interface, das im Positiv-Modus betrieben wurde (Ausnahme: CAP). Die detaillierten Geräteparameter sind in Abschnitt 5.1.4.3 zu finden. Bei Entwicklung einer neuen MS/MS-Methode wurde das Massenspektrometer zunächst im *Single Ion*-Modus auf maximale Empfindlichkeit getuned.

Die Systemoptimierung erfolgte gesondert für die Substanzklassen der Tetracycline und Sulfonamide bzw. für die Einzelsubstanzen TYL und CAP. Jeweils 10 ng/μL Standardlösungen dieser Substanzen in Methanol wurden hierzu über die Spritzenpumpe mit 3 μL/min mittels einer T-Verbindung bei isokratischen Bedingungen (Fließmittel A/B [70/30; v/v]) und mit einem Fluss von 100 μL/min direkt in das Massenspektrometer infundiert. Die Optimierung der einzelnen Systemparameter erfolgte automatisch über den Modus "Tune Plus" der Gerätesoftware und wurde für jede Substanzklasse getrennt durchgeführt. Im Positiv-Modus wurde dafür für die Tetracycline auf m/z 461,1, für die Sulfonamide auf m/z 279,1 und für TYL auf m/z 916,5 gescannt. Die Optimierung auf m/z 321,1 für CAP wird im Negativ-Modus durchgeführt.

Mit dem gleichen Versuchsaufbau wurden nach dem Tuning im MS-Modus die substanzspezifischen MSⁿ-Parameter manuell eingestellt und optimiert. Durch Variation der einzelnen Parameter IsoW, CE sowie SID wurde im MS/MS-Modus die Einstellung gesucht, bei der das Molekül-Ion ($[M + H]^+$) zu ungefähr 95 % in mindestens zwei charakteristische Tochter-Ionen fragmentierte und woraus gleichzeitig die größte Signalintensität resultierte. Einen Überblick über die substanzspezifischen MS/MS-Parameter aller Substanzen gibt Tab. 5–7 (siehe Abschnitt 5.4.4).

5.4.3 Kalibrierung

Für jede Muttersubstanz wurde eine externe Standardkalibrierung durchgeführt. Der Arbeitsbereich des Verfahrens wurde mit 0,1–10 ng/Injektion festgelegt und deckte den zu erwartenden Konzentrationsbereich für reale Proben ab. Durch Injektion von je zehn Standards der Ober- und Untergrenze des Arbeitsbereiches wurde zunächst auf Varianzhomogenität geprüft. Es schloss sich die Kalibrierung mit mindestens fünf äquidistanten Kalibrierstandards an, wobei eine Messreihe mindestens dreimal in Serie gemessen wurde. Alle Kalibrierstandards wurden unabhängig hergestellt. Mittels Regressionsanalyse wurde der lineare Zusammenhang zwischen Messgröße und

Konzentration bestimmt und die entsprechende Kalibrierfunktion $y = a + bx$ für jeden Analyten erstellt.

Für Bestimmtheitsmaße von größer gleich 0,99 galt die Methode als linear. Die Kenngrößen der linearen Regression ($y = a + bx$) für exemplarische Grundkalibrierungen der einzelnen Antibiotika sind in Tab. 5–6 (Tetracycline, TYL, CAP) und in Tab. 3–1 (Sulfonamide; siehe Abschnitt 3.1.2) dargestellt. Die Auswertung realer Proben erfolgte mittels Ein-Punkt-Kalibrierung durch Vergleich mit einem arbeitstäglich frisch hergestellte Referenzstandard. Voraussetzung hierfür war ein bei der Grundkalibrierung nicht signifikant von Null verschiedener Achsenabschnitt (siehe Tab. 5–6 und Tab. 3–1, Abschnitt 3.1.2).

Tab. 5–6: Grundkalibrierung der einzelnen Tetracycline, von Tylosin und Chloramphenicol über den Arbeitsbereich von 0,1–10 ng* nach Bestimmung mit HPLC-ESI-MS/MS#

Analyt	a	b	r^2	S_{xy}	S_{x_0}	V_{x_0} [%]	VB_a
OTC**	-95860,93	1090345,04	0,9922	404127,85	0,37	11,14	± 318788,34
TC	-209336,56	1554898,38	0,9944	473758,15	0,30	9,04	± 351980,12
CTC	-321643,63	1692743,20	0,9916	627016,57	0,37	11,14	± 465843,96
TYL	1909035,62	24016211,84	0,9980	4434983,30	0,18	5,42	± 3294984,92
CAP	4782,76	102446,38	0,9956	27715,66	0,27	8,13	± 20591,43

nach Methode 1, siehe Abschnitt 5.1.4.5

* Gesamtzahl der Kalibriermessungen $n = 15$

** Gesamtzahl der Kalibriermessungen $n = 13$

Abk.: a, Ordinatenabschnitt; b, Steigung der Geraden; S_{xy} , Reststandardabweichung; r^2 , Bestimmtheitsmaß; S_{x_0} , Verfahrensstandardabweichung; $VB_a = S_a \pm t(f, P\%)$; VB_a , Vertrauensbereich des Ordinatenabschnitts a; S_a , Standardabweichung des Ordinatenabschnitts a; t, Quantile der t-Verteilung als Funktion der Freiheitsgrade $f = n - 2$ und Signifikanzniveau $P = 95\%$

5.4.4 Qualifizierung

5.4.4.1 Chromatographische Leistungskriterien

Die Retentionszeit des Analyten in der Analysenprobe musste im Vergleich mit derjenigen des Kalibrierstandards innerhalb des vorgegebenen Retentionszeitfensters von $\pm 2,5\%$ liegen. Im rekonstruierten Massenchromatogramm galt ein Peak bis zu einem Signal/Rausch-Verhältnis (S/N, signal to noise) von 3/1 als nachweisbar; dies wurde durch visuelle Betrachtung abgeschätzt. Die typischen Retentionszeiten der einzelnen Analyten sind in Tab. 5–7 aufgeführt.

Tab. 5–7: Leistungskriterien für den chromatographischen und massenspektrometrischen Nachweis verschiedener Antibiotika und optimierte MSⁿ-Parameter.

Die Angaben der Retentionszeiten und relativen Ionen-Intensitäten sind keine absoluten Angaben und unterliegen arbeitstäglichen Schwankungen; für die verwendeten Geräteparameter siehe Abschnitt 5.1.4

Substanz	RT [min]	IsoW [m/z]	CE [%]	[M+H] ⁺ [m/z]	Fragment-Ionen [m/z], (rel. Intensität [%])
Methode 1					
OTC	7,0	1,6	20	461	426 (7), <u>443*</u> (100), 444 (9)
TC	7,4	1,4	20	445	410 (4), <u>427*</u> (100), 428 (6)
Iso-CTC ^b	7,8	1,6	27	479	444* (4), 461(6)*, <u>462*</u> (100)
4-Epi-CTC ^b	8,1	1,6	27	479	444* (11), 461* (17), <u>462*</u> (100)
CTC	8,4	1,6	27	479	444* (43), 461* (53), <u>462*</u> (100)
TYL	9,4	2,0	28	917	754 (3), <u>772*</u> (100)
CAP	10,3	1,4	24 [§]	321	176 (9), <u>194*</u> (100), 237* (8), 249* (13), 257 (10)
Methode 2					
4-Epi-TC ^a	7,1	1,4	20	445	410 (6), <u>427*</u> (100), 428 (8)
TC	7,4	1,4	20	445	410 (4), <u>427*</u> (100), 428 (6)
Iso-CTC ^b	7,8	1,6	27	479	444* (4), 461 (6)*, <u>462*</u> (100)
4-Epi-CTC ^b	8,0	1,6	27	479	444* (11), 461* (17), <u>462*</u> (100)
CTC	8,4	1,6	27	479	444* (43), 461* (53), <u>462*</u> (100)
4-Epi-ATC ^a	8,8	1,5	22	427	409 (1), <u>427*</u> (100)
ATC ^a	9,2	1,5	22	427	409 (2), <u>427*</u> (100)
Methode 3					
SDZ	8,4	1,0	29	251	92 (7), 94 (10), 108 (10), 156* (68), <u>174*</u> (100)
STZ	9,2	1,0	28	256	108 (5), <u>156*</u> (100), 174 (2)
SMR	9,6	1,0	30	265	92 (5), 108 (5), 156* (19), 174* (56), <u>190*</u> (100)
SMZ	10,4	1,0	30	279	124 (6), 156 (3), 174 (4), <u>204*</u> (100)
SMPD	11,2	1,0	30	281	108* (9), 126* (28), <u>156*</u> (100), 188 (11), 215* (21)
SMX	13,1	1,0	34	254	108 (9), 147* (45), 156* (72), <u>188*</u> (100), 190* (42), 194* (13)
SDM	13,6	1,0	34	311	108 (9), <u>156*</u> (100), 218* (29), 245* (97)
Methode 4					
4-Epi-OTC	6,9	1,6	20	461	426 (15), <u>443*</u> (100), 444 (36)
α-APO-OTC	7,5	1,6	22	443	425 (2), <u>426*</u> (100)
β-APO-OTC	9,2	1,6	22	443	425 (2), <u>426*</u> (100)
Methode 5					
CAP	10,3	1,4	24 [§]	321 194	<u>176*</u>

Basis-Peak

* Ionen, die zur Quantifizierung aufsummiert werden

^{a, b} Quantifizierung erfolgt über TC- bzw. CTC-Referenzsubstanz

[§] zusätzlich SID: 10 V

Abk.: RT, Retentionszeit; CE, collision energy; IsoW, isolation width;
SID, source induced dissociation, [M+H]⁺, Molekülion

5.4.4.2 Massenspektren

Das Massenspektrum der Analysenprobe sollte dem des jeweiligen Kalibrierstandards visuell entsprechen. Alle diagnostischen Ionen (Molekül-Ion, charakteristische Fragment-Ionen) mit einer relativen Intensität von mehr als 10 % mussten vorhanden sein. Der Basis-Peak musste mit dem des Referenzspektrums übereinstimmen. Nichtspezifische Ionen sollten generell nicht vorhanden sein. Die charakteristischen MSⁿ-Daten der einzelnen Analyten sind in Tab. 5–7 aufgeführt.

5.4.5 Quantifizierung

Die Auswertung realer Proben erfolgte mittels Ein-Punkt-Kalibrierung durch Vergleich der Peakfläche des Analyten mit der eines arbeitstäglich frisch hergestellten Referenzstandards. Die Signalintensität der zu vermessende Probelösung durfte die obere Grenze des linearen Arbeitsbereichs nicht überschreiten. Der Arbeitsstandard sollte die erwartete Konzentration der zu vermessenden Analysenproben aufweisen. Die Konzentration des Analyten in der Probelösung ergibt sich aus Gleichung 1.

$$c_x = \frac{m_{std}}{A_{std}} \cdot A_x \cdot \frac{I}{V_{inj}} \quad [\text{ng}/\mu\text{L}] \quad (1)$$

- mit:
- c_x - Konzentration des Analyten [ng/μL]
 - m_{std} - injizierte Masse des Referenzstandards [ng]
 - A_{std} - Peakflächeneinheiten des Referenzstandards
 - A_x - Peakflächeneinheiten des Analyten
 - V_{inj} - injiziertes Volumen der Probelösung [μL]

5.5 Analysenvorschriften

5.5.1 *Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Gülle*

(siehe auch: HAMSCHEER et al. 2002 und 2005)

5.5.1.1 **Probenvorbereitung**

Alle für die Probenvorbereitung benötigten Glaswaren sind zunächst mit einer gesättigten methanolischen EDTA-Suspension vorzuspülen (siehe Abschnitt 5.3.2). Die Gülleproben werden je nach Beschaffenheit durch Schütteln oder Rühren sorgfältig homogenisiert. In ein 10-mL-Spitzbodenzentrifugenglas werden ca. 1 g Gülle exakt eingewogen (Laborwaage), mit 1,2 mL 1 M Citratpuffer (pH 4,7) versetzt und mit Hilfe eines Vortex-Mixers 1 min aufgeschüttelt. Nach Zugabe von 6 mL Essigsäureethylester wird erneut 1 min gevortext und anschließend auf einem Rotationsschüttlers für weitere 15 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (1000 g, 4 °C, 10 min) wird der Überstand in einen 25-mL-Spitzkolben überführt und der Rückstand auf dem Vortex-Mixer kurz aufgeschüttelt. Nach Zugabe von nochmals 6 mL Essigsäureethylester wird der eben beschriebene Extraktionsschritt wiederholt. Beide Extrakte werden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C; Druck: 130 ± 10 mbar → 25 ± 5 mbar). Der Rückstand wird mit 1 mL Acetonitril/100 mM Ammoniumacetat (90/10; v/v) versetzt, nach kurzem Ultraschallen wieder aufgenommen und die erhaltene Probelösung in ein 1,5-mL-Probenfläschchen überführt. Sollte der zu erwartende Gehalt die obere Grenze des Arbeitsbereichs (vgl. Abschnitt 5.4.3) überschreiten, so ist die Probelösung entsprechend mit Acetonitril/100 mM Ammoniumacetat (90/10; v/v) zu verdünnen.

5.5.1.2 **Messung**

Der massenspektrometrische Nachweis und die Bestimmung der Antibiotika erfolgt mit dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen HPLC-MS/MS-Verfahren unter Verwendung der in Abschnitt 5.1.4 aufgeführten apparativen Ausstattung. Im Einzelnen werden die Proben mit den in Abschnitt 5.1.4.5 beschriebenen MS-Experimenten auf die drei Tetracycline und Tylosin (Methode 1), die Epimere von TC und CTC, dessen Isoverbindung (Methode 2), sowie alle sieben Sulfonamide (Methode 3) untersucht. Die Proben werden doppelt aufgearbeitet und einmal analysiert, standardmäßig werden je 8 µL injiziert.

5.5.1.3 Auswertung

Die Konzentration der Analyten wird mittels der Methode des externen Standards bestimmt. Die Ergebnisse werden um die mittlere Wiederfindung korrigiert und in mg/kg angegeben (siehe Gleichung 2).

$$x_x = \frac{c_x \cdot V_0 \cdot VF}{m_{Probe} \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{100}{WDF} \quad [\text{mg/kg}] \quad (2)$$

- mit:
- x_x - Konzentration des Analyten in der Probe [mg/kg]
 - c_x - Konzentration des Analyten in der Probelösung [ng/ μ L] nach Gleichung (1)
 - VF - Verdünnungsfaktor
 - V_0 - Gesamtvolumen des Probenextraktes [μ L]
 - 10^{-3} - Umrechnungsfaktor von ng nach μ g
 - m_{Probe} - Probeneinwaage [g]
 - WDF - substanzspezifischer Wiederfindungsfaktor für Gülle [%]

5.5.1.4 Methodvalidierung

Die *Bestimmungs-* und *Nachweisgrenzen* des Verfahrens werden anhand des S/N-Verhältnisses ermittelt. Die Bestimmungsgrenze (BG) bzw. Nachweisgrenze (NWG) wird definiert als die niedrigste Konzentration, bei der das Verfahren mit einem S/N-Verhältnis von mindestens 6/1 bzw. 3/1 detektiert (siehe auch Tab. 5–8).

Tab. 5–8: Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Gülle

Substanz	Referenz	Gülle [§]		
		WDF (0,2–1,0 mg/kg) [%]	BG [μ g/kg]	NWG [μ g/kg]
OTC	HAMSCHER et al. 2002	93,7	50	20
TC	HAMSCHER et al. 2002	93,2	50	20
CTC	HAMSCHER et al. 2002	110,6	50	20
SDZ	Abschnitt 3.1.3.1	89,9	50	20
STZ	Abschnitt 3.1.3.1	78,8	50	20
SMR	Abschnitt 3.1.3.1	85,8	50	20
SMZ	Abschnitt 3.1.3.1	90,6	20	5
SDM	Abschnitt 3.1.3.1	99,2	50	20
SMPD	Abschnitt 3.1.3.1	72,3	50	20
SMX	Abschnitt 3.1.3.1	108,2	50	20

[§] Rückstandsfreie Schweinegülle aus dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Abk.: WDF, Wiederfindungsrate; BG, Bestimmungsgrenze; NWG, Nachweisgrenze.

Die *Wiederfindung* wird durch Untersuchungen mit dotierter Leerwertmatrix ermittelt. Hierzu werden 16 1-g-Aliquots einer rückstandsfreien Gülle (siehe Abschnitt 5.2.3.1) entnommen und je acht Aliquots zu 0,2 mg/kg und 1,0 mg/kg dotiert. Die Analyten werden in methanolischer Lösung (100 μ L einer Standardlösung von 2 μ g/mL bzw. 10 μ g/mL) zugegeben und die Proben nach 10-minütiger Äquilibrierzeit aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.5.1.1). Die Extrakte werden gemessen (siehe Abschnitt 5.1.4.5, Methode 3) und nach Gleichung 6 (siehe Abschnitt 5.5.4.4) ausgewertet. Die Wiederfindung wird für jede Probe berechnet. Aus jeder Konzentration werden die mittleren Wiederfindungen ermittelt. Daraus wird die Wiederfindungsrate für den gesamten Konzentrationsbereich von 0,2–1,0 mg/kg ermittelt (siehe auch Tab. 5–8).

5.5.2 Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen, Tylosin und Sulfonamiden in Sandboden

(siehe auch: HAMSCHEER et al. 2002 und 2005)

5.5.2.1 Probenvorbereitung

Alle für die Probenvorbereitung benötigten Glaswaren sind zunächst mit einer gesättigten methanolischen EDTA-Suspension vorzuspülen (siehe Abschnitt 5.3.2). Die Bodenproben werden von sichtbaren Fremdstoffen (z. B. Steinchen, Wurzeln, Bodenlebewesen) befreit und sorgfältig durchmischt. In ein 10-mL-Spitzboden-zentrifugenglas werden ca. 1 g Boden exakt eingewogen (Laborwaage), mit 1,2 mL 1 M Citratpuffer (pH 4,7) versetzt und mithilfe eines Vortex-Mixers 1 min aufgeschüttelt. Nach Zugabe von 6 mL Essigsäureethylester wird erneut 1 min gevortext und anschließend auf einem Rotationsschüttler für weitere 15 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (1000 g, 4 °C, 10 min) wird der Überstand in einen 25-mL-Spitzkolben überführt und der Rückstand auf dem Vortex-Mixer kurz aufgeschüttelt. Nach Zugabe von nochmals 6 mL Essigsäureethylester wird der eben beschriebene Extraktionsschritt wiederholt. Beide Extrakte werden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C; Druck: 130 ± 10 mbar \rightarrow 25 ± 5 mbar). Der Rückstand wird mit 200 μ L Acetonitril/100 mM Ammoniumacetat (90/10; v/v) versetzt, nach kurzem Ultraschallen wieder aufgenommen und die erhaltene Probelösung in ein 1,5-mL-Probenfläschchen mit 250- μ L-Mikroeinsatz überführt.

5.5.2.2 Messung

Der massenspektrometrische Nachweis und die Bestimmung der Antibiotika erfolgt mit dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen HPLC-MS/MS-Verfahren unter Verwendung der in Abschnitt 5.1.4 aufgeführten apparativen Ausstattung. Im Einzelnen werden die Proben mit den in Abschnitt 5.1.4.5 beschriebenen MS-Experimenten auf die drei Tetracycline und Tylosin (Methode 1), die Epimere von TC und CTC, dessen Isoverbindung (Methode 2), sowie alle sieben Sulfonamide (Methode 3) hin untersucht. Die Proben werden einfach aufgearbeitet und einmal analysiert, standardmäßig werden je 8 µL injiziert.

5.5.2.3 Auswertung

Die Analyten werden mittels der Methode des externen Standards unter Berücksichtigung der substanzspezifischen Wiederfindungsraten ausgewertet. Die Ergebnisse werden in µg/kg angegeben (siehe Gleichung 3).

$$x_x = \frac{c_x \cdot V_0 \cdot VF}{m_{Probe} \cdot TS} \cdot \frac{100}{WDF} \quad [\mu\text{g}/\text{kg}] \quad (3)$$

- mit:
- x_x - Konzentration des Analyten in der Probe [µg/kg]
 - c_x - Konzentration des Analyten in der Probelösung [ng/µL]
 - V_0 - Gesamtvolumen des Probenextraktes [µL]
 - VF - Verdünnungsfaktor
 - m_{Probe} - Probeneinwaage [g]
 - TS - Trockensubstanzanteil
 - WDF - substanzspezifischer Wiederfindungsfaktor für Boden [%]

5.5.2.4 Methodvalidierung

Die *Bestimmungs-* und *Nachweisgrenzen* des Verfahrens werden anhand des S/N-Verhältnisses ermittelt. Die BG bzw. NWG wird definiert als die niedrigste Konzentration bei der das Verfahren mit einem S/N-Verhältnis von mindestens 6/1 bzw. 3/1 detektiert (siehe auch Tab. 5–9).

Die *Wiederfindung* wird durch Untersuchungen mit dotierter Leerwertmatrix ermittelt. Hierzu werden 24 1-g-Aliquots eines rückstandsfreien Sandbodens (siehe Abschnitt 5.2.3.2) entnommen und je acht Aliquots zu 5 µg/kg, 10 µg/kg und 50 µg/kg dotiert. Die Analyten werden in methanolischer Lösung (50 µL einer Standardlösung

von 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL bzw. 1,0 µg/mL) zugegeben und die Proben nach 10-minütiger Äquilibrierzeit aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.5.2.1). Die Extrakte werden gemessen (siehe Abschnitt 5.1.4.5, Methode 3) und nach Gleichung (6) (siehe Abschnitt 5.5.4.4) ausgewertet. Die Wiederfindung wird für jede Probe berechnet. Aus jeder Konzentration werden die mittleren Wiederfindungen ermittelt. Daraus wird die Wiederfindungsrate für den gesamten Konzentrationsbereich von 5–50 µg/kg ermittelt (siehe auch Tab. 5–9).

Tab. 5–9: Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Sandboden

Substanz	Referenz	Sandboden [§]		
		WDF [%]	BG [µg/kg]	NWG [µg/kg]
OTC	HAMSCHER et al. 2002	74,2 [†]	5	1
TC	HAMSCHER et al. 2002	37,7 [†]	5	1
CTC	HAMSCHER et al. 2002	69,8 [†]	5	2
TYL	HAMSCHER et al. 2002	64,2 [†]	5	1
SDZ	Abschnitt 3.1.3.2	41,8 [‡]	5	1
STZ	Abschnitt 3.1.3.2	25,5 [‡]	5	1
SMR	Abschnitt 3.1.3.2	38,4 [‡]	5	1
SMZ	Abschnitt 3.1.3.2	36,4 [‡]	2	0,5
SDM	Abschnitt 3.1.3.2	34,5 [‡]	5	1
SMPD	Abschnitt 3.1.3.2	42,5 [‡]	5	1
SMX	Abschnitt 3.1.3.2	52,5 [‡]	5	1

[§] Mischprobe aus 10 Böden aus der Region um Standort *BDF01*, antibiotikafrei, mit vergleichbaren Bodenparametern ($C_{org} \sim 2\%$) (siehe Abschnitt 5.2.3.2)

[†] Konzentrationsbereich: 5–100 µg/kg

[‡] Konzentrationsbereich: 5–50 µg/kg.

Abk.: WDF, Wiederfindungsrate; BG, Bestimmungsgrenze; NWG, Nachweisgrenze.

5.5.3 Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen, Tylosin und Sulfonamiden in matrixreichem Wasser

(siehe auch: HAMSCHER et al. 2002 und 2005)

5.5.3.1 Probenvorbereitung

Alle für die Probenvorbereitung benötigten Glaswaren sind zunächst mit einer gesättigten methanolischen EDTA-Suspension vorzuspülen (siehe Abschnitt 5.3.2). In einem 100-mL-Becherglas (hohe Form) werden 25 mL einer Wasserprobe mit 25 mL 1 M Citratpuffer (pH 4,7) versetzt und 1 min lang auf einem Magnetrührer gerührt. Die so behandelten Probelösungen werden anschließend zur Festphasen-Extraktion

mit *Bakerbond SDB-1*-Kartuschen (200 mg, 6 mL) eingesetzt. Bei gleichzeitiger Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden sind jeweils zwei Aliquots so zu behandeln, da sich die Arbeitsvorschriften für die folgende Festphasen-Extraktion der je nach Substanzklasse unterscheiden.

(a) *Festphasen-Extraktion für Tetracycline*

1. Äquilibrieren mit 10 mL essigsauerm Methanol (pH 2,5) und 5 mL Methanol
2. Konditionieren mit 12 mL 0,5 M Citratpuffer (pH 4,7)
3. Probenaufgabe von 50 mL Probelösung
4. Spülen mit 12 mL Wasser
5. Voreluieren mit 2 mL Methanol, Verwerfen des Voreluates
6. Elution mit 10 mL essigsauerm Methanol (pH 2,5)

(b) *Festphasen-Extraktion für Sulfonamide*

1. Äquilibrieren mit 10 mL essigsauerm Methanol (pH 2,5) und 5 mL Methanol
2. Konditionieren mit 12 mL 0,5 M Citratpuffer (pH 4,7)
3. Probenaufgabe von 50 mL Probelösung
4. Spülen mit 12 mL Wasser
5. Elution mit 10 mL Methanol und Elution mit 10 mL Acetonitril

Im weiteren Ablauf der Probenvorbereitung werden die Eluate beider Substanzklassen wieder identisch behandelt. Die gesammelten Eluate werden am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C; Druck: 130 ± 10 mbar \rightarrow 25 ± 5 mbar) und mit 200 μ L Methanol versetzt. Nach kurzem Ultraschallen wird die wieder aufgenommene Probe in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß gegeben, zentrifugiert (10 000 g, 4 °C, 2 min) und anschließend in ein 1,5-mL-Probenfläschchen mit 250- μ L-Mikroinsert überführt.

5.5.3.2 Messung

Der massenspektrometrische Nachweis und die Bestimmung der Antibiotika erfolgt mit dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren unter Verwendung der in Abschnitt 5.1.4 aufgeführten apparativen Ausstattung. Im Einzelnen werden die Proben mit den in Abschnitt 5.1.4.5 beschriebenen MS-Experimenten auf die drei Tetracycline (Methode 1), die Epimere von TC und CTC, dessen Isoverbindung (Methode 2), sowie alle sieben Sulfonamide (Methode 3) hin

untersucht. Die Proben werden je Substanzgruppe einfach aufgearbeitet und einmal analysiert, standardmäßig werden je 8 µL injiziert.

5.5.3.3 Auswertung

Die Konzentration der Analyten wird mittels der Methode des externen Standards bestimmt, die Ergebnisse um die mittlere Wiederfindung korrigiert und in µg/L angegeben (siehe Gleichung 4).

$$x_x = \frac{c_x \cdot V_0}{V_{Probe}} \cdot \frac{100}{WDF} \quad [\mu\text{g/L}] \quad (4)$$

- mit:
- x_x - Konzentration des Analyten in der Probe [µg/L]
 - c_x - Konzentration des Analyten in der Probelösung [ng/µL] nach Gleichung (1)
 - V_0 - Gesamtvolumen des Probenextraktes [µL]
 - V_{Probe} - Probenvolumen [mL]
 - WDF - substanzspezifischer Wiederfindungsfaktor für Wasser [%]

5.5.3.4 Methodvalidierung

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen des Verfahrens werden anhand des S/N-Verhältnisses ermittelt. Die BG bzw. NWG wird definiert als die niedrigste Konzentration bei der das Verfahren mit einem S/N-Verhältnis von mindestens 6/1 bzw. 3/1 detektiert (siehe auch Tab. 5–10).

Bestimmung der Wiederfindungsraten. Die Wiederfindung wird durch Untersuchungen mit dotierter Leerwertmatrix bestimmt. Hierzu werden 16 25-mL-Aliquots eines rückstandsfreien Sickerwassers (siehe Abschnitt 5.2.3.3) entnommen und davon je acht zu 0,20 µg/L und 1,0 µg/L dotiert. Die Analyten werden in methanolischer Lösung (50 µL einer Standardlösung von 0,1 µg/mL bzw. 0,5 µg/mL) zugegeben und die Proben nach 10-minütiger Äquilibrierzeit aufgearbeitet (siehe Abschnitt (b)). Die Extrakte werden gemessen (siehe Abschnitt 5.1.4.5, Methode 3) und nach Gleichung 6 (siehe Abschnitt 5.5.4.4) ausgewertet. Die Wiederfindung wird für jede Probe berechnet. Aus jeder Konzentration werden die mittleren Wiederfindungen ermittelt. Daraus wird die Wiederfindungsrate für den gesamten Konzentrationsbereich von 0,2–1,0 µg/L ermittelt (siehe auch Tab. 5–10).

Tab. 5–10: Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in matrixreichem Grundwasser

Substanz	Referenz	Grundwasser (matrixreich) [§]		
		WDF (0,2–1,0 µg/L) [%]	BG [µg/L]	NWG [µg/L]
OTC	HAMSCHER et al. 2002	83,5	0,1	0,05
TC	HAMSCHER et al. 2002	92,1	0,1	0,05
CTC	HAMSCHER et al. 2002	88,2	0,1	0,05
TYL	HAMSCHER et al. 2002	70,3	0,1	0,05
SDZ	Abschnitt 3.1.3.3	65,6	0,1	0,03
STZ	Abschnitt 3.1.3.3	57,3	0,1	0,03
SMR	Abschnitt 3.1.3.3	65,2	0,1	0,03
SMZ	Abschnitt 3.1.3.3	72,5	0,05	0,01
SDM	Abschnitt 3.1.3.3	54,0	0,1	0,03
SMPD	Abschnitt 3.1.3.3	55,9	0,1	0,03
SMX	Abschnitt 3.1.3.3	92,7	0,1	0,03

[§] Mischprobe aus 10 Sickerwässern aus der Region um Standort *BDF01* (siehe Abschnitt 5.2.3.3).
 Abk.: WDF, Wiederfindungsrate; BG, Bestimmungsgrenze; NWG, Nachweisgrenze.

5.5.4 Analytische Methode zur Bestimmung von Tetracyclinen, Sulfonamiden, Tylosin und Chloramphenicol in Staub

(siehe auch: HAMSCHER et al. 2003b)

5.5.4.1 Probenvorbereitung

Alle für die Probenvorbereitung benötigten Glaswaren sind zunächst mit einer gesättigten methanolischen EDTA-Suspension vorzuspülen (siehe Abschnitt 5.3.2). In ein 12-mL-Spitzbodenzentrifugenglas werden ca. 0,1 g Staub exakt (Analysenwaage) eingewogen, mit 1 mL 1 M Citratpuffer (pH 4,7) versetzt und mithilfe eines Vortex-Mixers 1 min geschüttelt. Nach Zugabe von 6 mL Essigsäureethylester wird erneut 1 min gevortext und anschließend auf einem Rotationsschüttler für 15 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (1000 g, 4 °C, 10 min) wird der Überstand in einen 25-mL-Spitzkolben überführt und der Rückstand auf dem Vortex-Mixer kurz aufgeschüttelt. Nach Zugabe von nochmals 6 mL Essigsäureethylester wird die eben beschriebene Extraktion wiederholt. Beide Extrakte werden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt (Wasserbadtemperatur: 40 °C; Druck: 130 ± 10 mbar → 25 ± 5 mbar). Der Rückstand wird mit 1 mL Acetonitril/100 mM Ammoniumacetat (90/10; v/v) versetzt, nach kurzem Ultraschallen wieder aufgenommen, in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert

(10000 g, 4 °C, 2 min). Die Probelösung wird schließlich in ein 1,5-mL-Probenfläschchen überführt.

5.5.4.2 Messung

Der massenspektrometrische Nachweis und die Bestimmung der Antibiotika erfolgt mit dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen HPLC-ESI-MSⁿ-Verfahren unter Verwendung der in Abschnitt 5.1.4 aufgeführten apparativen Ausstattung. Im Einzelnen werden die Proben mit den in Abschnitt 5.1.4.5 beschriebenen MS-Experimenten auf die drei Tetracycline, TYL und CAP (Methode 1), die Epimere von TC und CTC, dessen Isoverbindung (Methode 2), sowie alle sieben Sulfonamide (Methode 3) hin untersucht. Für CAP wird bei Nachweis im MS/MS-Experiment zusätzlich ein Bestätigungsverfahren mittels MS³ (Methode 5) durchgeführt. Die Proben werden doppelt aufgearbeitet und einmal analysiert, standardmäßig werden je 8 µL injiziert.

5.5.4.3 Auswertung

Mit Ausnahme von Chloramphenicol (siehe Abschnitt 5.5.4.4) werden die Analyten mittels der Methode des externen Standards unter Berücksichtigung der substanzspezifischen Wiederfindungsraten ausgewertet (siehe Gleichung 5).

$$x_x = \frac{c_x \cdot V_0 \cdot VF}{m_{Probe}} \cdot \frac{100}{WDF} \quad [\text{mg/kg}] \quad (5)$$

- mit:
- x_x - Konzentration des Analyten in der Probe [mg/kg]
 - c_x - Konzentration des Analyten in der Probelösung [ng/µL] nach Gleichung (1)
 - V_0 - Gesamtvolumen des Probenextraktes [µL]
 - VF - Verdünnungsfaktor
 - m_{Probe} - Probeneinwaage [mg]
 - WDF - substanzspezifische Wiederfindungsrate für Staub [%]

5.5.4.4 Methodvalidierung

Die *Bestimmungs-* und *Nachweisgrenzen* des Verfahrens werden anhand des S/N-Verhältnisses ermittelt. Die BG bzw. NWG wird definiert als die niedrigste Konzentration bei der das Verfahren mit einem S/N-Verhältnis von mindestens 6/1 bzw. 3/1 detektiert (siehe auch Tab. 5–11).

Die *Wiederfindung* wird durch Untersuchungen mit dotierter Leerwertmatrix bestimmt. Hierzu werden 12 100-mg-Aliquots einer rückstandsfreien Staubmatrix (siehe Abschnitt 5.2.3.6) entnommen und davon je drei zu 0,2 und 0,5 mg/kg sowie je sechs zu 1,0 mg/kg dotiert. Die Analyten werden in methanolischer Lösung (20, 50 und 100 µL einer Standardlösung von 10 µg/mL) zugegeben und die Proben nach 10-minütiger Äquilibrierzeit aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.5.4.1). Die Extrakte werden gemessen (siehe Abschnitt 5.1.4.5, Methoden 1–3) und nach Gleichung 6 ausgewertet. Die Wiederfindung wird für jede Probe berechnet. Aus jeder Konzentration werden die mittleren Wiederfindungen ermittelt. Daraus wird die Wiederfindungsrate für den gesamten Konzentrationsbereich von 0,2–1,0 mg/kg ermittelt (siehe auch Tab. 5–11).

$$WDF = \frac{A_x}{A_{dot}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (6)$$

mit: *WDF* - Wiederfindungsrate [%]
A_x - Peakflächeneinheiten des zudotierten Analyten
*I*00 - Umrechnungsfaktor auf Prozent
A_{dot} - Peakflächeneinheiten der Dotierungslösung

Tab. 5–11: Substanzspezifische mittlere Wiederfindungsraten, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika in Staub

Substanz	Referenz	Staub [§]		
		WDF (0,2–1,0 mg/kg) [%]	BG [mg/kg]	NWG [mg/kg]
OTC	Abschnitt 3.3.3.1	103,0	0,10	0,050
TC	Abschnitt 3.3.3.1	89,4	0,10	0,050
CTC	Abschnitt 3.3.3.1	93,8	0,10	0,050
SDZ	Abschnitt 3.3.3.1	43,3	0,05	0,025
STZ	Abschnitt 3.3.3.1	40,5	0,05	0,025
SMR	Abschnitt 3.3.3.1	39,3	0,05	0,025
SMZ	Abschnitt 3.3.3.1	48,8	0,05	0,025
SDM	Abschnitt 3.3.3.1	40,7	0,05	0,025
SMPD	Abschnitt 3.3.3.1	42,7	0,05	0,025
SMX	Abschnitt 3.3.3.1	42,6	0,20	0,100
TYL	Abschnitt 3.3.3.1	27,2	0,10	0,050
CAP	Abschnitt 3.3.3.1	–	0,10	0,050

[§] Mischprobe aus 2 rückstandsfreien Schweinestallstäuben (siehe Abschnitt 5.2.3.6).
 Abk.: WDF, Wiederfindungsrate; BG, Bestimmungsgrenze; NWG, Nachweisgrenze.

Bei der Bestimmung von CAP ist das Verfahren des inneren Standards (Standard-addition) anzuwenden. Zunächst wird die unveränderte Analysenprobe analysiert. Anschließend werden weitere Teilproben mit mindestens drei Konzentrationen einer CAP-Standardlösung aufgestockt. Die Menge des zugesetzten CAP soll zwischen dem Zwei- und Fünffachen der geschätzten Menge des Analyten in der Probe liegen. Anschließend werden aus dem Messwert der Probe und den Aufstockmesswerten eine Regressionsgerade ($y = a + bx$) aufgestellt. Die Konzentration der Probe x ergibt sich nach Auflösung der Aufstockkalibrierung für $y = 0$.

5.6 Modellversuche zur Untersuchung der Sorptionsprozesse von Tetracyclin und Sulfamethazin in Sandboden

5.6.1 Desorptionsexperimente

(siehe auch: OECD 2000)

Zur Bestimmung der Mobilität von matrixgebundenen Rückständen wurden Batch-Equilibrium-Experimente in Anlehnung an die OECD Richtlinie 106 zur Durchführung von Adsorption-Desorption-Experimenten (OECD 2000) entwickelt. Als Testmatrix wurde ein Sandboden mit originären TC- (316 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und SMZ-Rückständen (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) verwendet. Die Hintergrundelektrolyten waren einmal eine 0,01 M CaCl_2 -Lösung und zum zweiten Regenwasser (siehe Abschnitt 5.2.3.7). Für jeden Hintergrundanalyt wurde jeweils eine separate Testserie durchgeführt. Hierzu wurden in je 16 PP-Zentrifugenbecher 10 g Boden eingewogen (Laborwaage) und mit dem Hintergrundelektrolyt versetzt (Boden/Hintergrundelektrolyt: 1/5; w/w). Die Bodenlösung wurde homogenisiert, für 24 h auf einem Rotationsschüttler sanft geschüttelt und anschließend zentrifugiert (2000 g, 4 °C, 20 min). Ein Anteil von 40 mL des Überstandes wurde schließlich mittels Festphasen-Extraktion angereichert und der Probenextrakt mittels HPLC-ESI-MS/MS in Doppelbestimmung analysiert (siehe Abschnitt 5.5.3).

Die Mobilität ($\%$, w/w) von TC und SMZ für den jeweiligen Hintergrundelektrolyt wurde aus dem Verhältnis der Konzentration des desorbierten Rückstandes ($\mu\text{g}/\text{kg}$) zur ursprünglichen Rückstandskonzentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) im Boden berechnet. Die Gehalte der desorbierten Rückstände in ng/L wurden hierzu auf den entsprechenden Anteil in $\mu\text{g}/\text{kg}$ bezogen.

5.6.2 Bestimmung von Adsorptionskoeffizienten

(siehe auch: OECD 2000)

Zur Bestimmung von Adsorptionskoeffizienten wurden Batch-Equilibrium-Experimente in Anlehnung an die OECD Richtlinie 106 zur Durchführung von Adsorptions-Desorptions-Experimenten (OECD 2000) entwickelt. Als Testmatrix wurde ein Sandboden mit originären TC- (316 µg/kg) und SMZ-Rückständen (2 µg/kg) verwendet. Als Hintergrundelektrolyten wurde Regenwasser (siehe Abschnitt 5.2.3.7) verwendet. In zehn PP-Zentrifugenbecher wurden je 10 g Boden eingewogen (Laborwaage). In Dupletts werden je 50 mL Regenwasser bzw. TC- und SMZ-Lösungen von 0,04 mg/L, 0,2 mg/L, 1,0 mg/L und 5,0 mg/L Regenwasser zugegeben. Die Bodenlösung wurde homogenisiert, für 24 h auf einem Rotationschüttler sanft geschüttelt und anschließend zentrifugiert (2000 g, 4 °C, 20 min). Ein Anteil von 40 mL des Überstandes wurde schließlich mittels Festphasen-Extraktion angereichert und der Probenextrakt mittels HPLC-ESI-MS/MS in Doppelbestimmung analysiert (siehe Abschnitt 5.5.3).

Im Gleichgewichtszustand beschreibt der Quotient aus der Konzentration des Analyten in der festen Phase (C_s) und in der flüssigen Phase (C_{aq}) den Sorptionskoeffizienten ($K_{d,solid}$). Die Beschreibung von $K_{d,solid}$ in Abhängigkeit von C_{aq} kann mittels Sorptionsisothermen erfolgen. Ein gebräuchliches Modell ist die empirische *Freundlich* Isotherme ($C_s = K_f C_{aq}^{1/n}$) mit dem *Freundlich*schen Sorptionskoeffizienten K_f und dem Linearitätsfaktor n ($n = 1 \Rightarrow$ linear).

5.7 Feldstudien

5.7.1 Standorte der Bodenuntersuchungen und Probenahme von Boden- und Gülleproben

Die Bodenuntersuchungen wurden in Kooperation mit dem *NLfB* auf landwirtschaftlichen Nutzflächen aus dem Raum Weser-Ems durchgeführt. Für die Studien wurden zwei BDF (*BDF01* und *BDF02*) aus dem Boden-Dauerbeobachtungsprogramm sowie die 14 Monitoringflächen (*MON01–14*) des Bodenmonitoringprogramms des *NLfB* ausgewählt. Die beprobten Flächen wurden regelmäßig mit Gülle (Schweine-, Rinder-, oder Mischgülle) beaufschlagt. Die Probenahme wurde von Mitarbeitern des *NLfB* durchgeführt.

Bei den beiden BDF, mit einer Fläche von bis zu 5 ha, sind jeweils vier Kernflächen von je 16 x 16 m markiert, welche unabhängig beprobt wurden. Mithilfe von Kernbohrern verschiedener Länge wurden entlang der Kernflächenkanten Segmente von Ober- und Unterboden (0–30 cm bzw. > 30 cm Bodentiefe) entnommen und aus jeweils 16 Einstichen eine Mischprobe erstellt.

Am Standort *BDF01* fand eine erste Probenahme im Juni 2001 statt; bis einschließlich Mai 2004 folgten in halbjährlichem Abstand sechs weitere Beprobungen. Bei den ersten drei Probenahmen wurden die 10-cm-Segmente der Bodentiefen von 0–90 cm gesammelt, bei den folgenden Termine wurden nur noch die 10-cm-Segmente bis zu einer Bodentiefe von 60 cm beprobt.

Ab November 2001 wurde Standort *BDF02* für insgesamt 24 Monate jeweils im Sommer- und im Winterhalbjahr beprobt. Bei der ersten Probenahme wurden Bodenproben der Tiefen von 0–90 cm in 30-cm-Segmenten gezogen. Für die nachfolgenden Termine wurde der Boden bis zu einer maximalen Tiefe von 60 cm in 10-cm-Segmenten beprobt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

Die Probenahmezeitpunkte für die BDF lagen jeweils im Frühjahr und im Herbst nach einer Düngeperiode. Die Gülleproben wurden vom Landwirt entnommen und bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

Die Monitoringflächen sind alle in der näheren Umgebung von *BDF01* gelegen (Abstand Luftlinie 0,2–5 km). Da hier im Gegensatz zu den BDF keine Kernflächen definiert sind, wurde hier eine Mischprobe aus 16 zufällig ausgewählten Entnahmestellen auf einer Teilfläche von ca. 400 m² hergestellt. Die Beprobung wurde auf den Oberboden (0–30 cm) beschränkt, der wiederum in 10-cm-Segmenten beprobt wurde. Auf den Monitoringflächen erfolgten die Probenahmen diskontinuierlich, zumindest aber jeweils im Frühjahr, über den Zeitraum von Juni 2002 bis Mai 2004. Die Proben wurden bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

Zu den Monitoringflächen lagen keine Betriebsinformationen und keine Informationen über Gülleausbringungen vor. Die Probenahmezeitpunkte waren dennoch so gewählt, dass sie nach einer möglichen Gülleausbringung lagen, angezeigt durch schon vorhandene Feldfrüchte. Für diese Flächen konnten demnach auch keine Gülleproben analysiert werden, dennoch konnte man auf einigen Flächen vertrocknete Gülleaggregate, so genannte Güllekrusten sammeln. Die Güllekrusten wurden bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

5.7.2 Standorte der Sicker- und Grundwasserbeprobungen und Probenahme

Die Sicker- und Grundwasseruntersuchungen wurden ebenfalls in Kooperation mit dem *NLfB* durchgeführt. Die Studien wurden auf den zwei bereits genannten BDF (*BDF01* und *BDF02*) durchgeführt. Die Probenahmen wurden von Mitarbeitern des *NLfB* durchgeführt.

Am Standort *BDF01* wurde an vier Entnahmestellen oberflächennahes Grundwasser durch Saugsonden mit Polyamidmembranen (*Ecotech*, Bonn, Deutschland) entnommen. Die Entnahmetiefe des oberflächennahen Grundwassers lag bei 1,4 m unter der Geländeoberfläche. Das oberflächennahe Grundwasser wurde bei leichtem Unterdruck (200–400 hPa) und einer Vorlage aus 1 mL 5 M Ammoniumacetat in Glasflaschen gesammelt und bis zur Analyse bei –20 °C gelagert. Die Probenahmen erfolgten diskontinuierlich jeweils im Herbst und Frühjahr eines Jahres.

Am Standort *BDF02* wurde an vier Entnahmestellen oberflächennahes Grundwasser durch Saugsonden mit Polyamidmembranen (*Ecotech*, Bonn, Deutschland) entnommen. Die Entnahmetiefe des oberflächennahen Grundwassers lag hier bei 1,2 m unter der Geländeoberfläche. Das oberflächennahe Grundwasser wurde bei leichtem Unterdruck (200–400 hPa) und einer Vorlage aus 1 mL 5 M Ammoniumacetat in Glasflaschen gesammelt. Zusätzlich wurden an drei Entnahmestellen über Peilrohre in 2,5-m-Bodentiefe Grundwasserproben, bei einem Grundwasserstand von 2 m unter Geländeoberfläche, entnommen. Alle Proben werden bis zur Analyse bei –20 °C gelagert. Die Probenahmen erfolgten diskontinuierlich jeweils im Herbst und Frühjahr eines Jahres.

5.7.3 Standorte der Aquakulturbetriebe und Probenahme von Teichwässern und Sedimenten

Im Rahmen einer Screeningstudie „Aquakulturen in Niedersachsen“ koordiniert vom *Veterinärinstitut für Fische und Fischwaren Cuxhaven* des *Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)* wurden bei 15 Fischhaltungsbetrieben mit Forellenteichwirtschaft einmalig Proben von Teichwässern und -sedimenten entnommen (siehe Tab. 3–29, Abschnitt 3.5). Die Beprobung der Standorte wurde im Zeitraum von Dezember 2003 bis Februar 2004 durch Mitarbeiter des *LAVES* vorgenommen. Die Entnahme der Sedimente erfolgte mit einem Sedimentstecher, die Proben wurden bis zur Analyse in Schraubdeckelgläsern bei 4 °C

aufbewahrt. Bei der Entnahme der Teichwässer wurde darauf geachtet diese nicht im Bereich des Zu- oder Ablaufes zu entnehmen. Die Proben wurden in Schraubdeckelgläsern gesammelt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

5.7.4 Herkunft und Probenahme der Stallstäube

Für die Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Standorte ausgewählt, ein Schweinemastbetrieb und eine Legehennenstallung. Es wurden ausschließlich Sedimentationsstäube gesammelt. Die Probenahme wurde durch Mitarbeiter des *Instituts für Hygiene und Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* durchgeführt. Als selbst konstruierte Probenahmeverrichtung diente hierbei eine Metallplatte mit einer Fläche von 38 x 79 cm, die zentral und zugleich an einer Stelle mit geringer Luftverwirbelung, in 1,5-m-Höhe aufgestellt war. Die Plattform war mit einer Aluminiumfolie bestückt, die in Abständen von 14–30 Tagen nach Entnahme der angefallenen Sedimentationsstäube erneuert wurde. Vor der Entnahme werden sichtbare Verunreinigungen wie tote Insekten, Spinnen oder sonstige Fremdstoffe entfernt. Die Stäube wurden mit Hilfe eines neuen, sauberen Pinsels sorgfältig in Glasröhrchen überführt, mit einem Gummistopfen verschlossen und bei 4 °C trocken und dunkel gelagert.

5.8 Statistik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Berechnungen mit Microsoft® Excel 2002 (*Microsoft Corporation*) durchgeführt. Für die graphischen Darstellungen wurde das Grafikprogramm SigmaPlot® 8.0 (*Systat Software, Erkrath, Deutschland*) genutzt. Für die statistischen Auswertungen wurden SigmaStat Version 3.0 (*Systat Software, Erkrath, Deutschland*) und SPSS 12.0 (*SPSS GmbH Software, München, Germany*) für Windows verwendet.

6 Literatur

- Aga, D. S., Goldfish, R. und Kulshrestha, P. (2003). Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst*, **128**, (6), 658-662.
- AG Boden (1996). *Bodenkundliche Kartieranleitung*. 4. Aufl., Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, S. 392.
- Baguer, A. J., Jensen, J. und Krogh, P. H. (2000). Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*, **40**, (7), 751-757.
- Barbera, E. und de la Cuadra, J. (1989). Occupational airborne allergic contact dermatitis from Tylosin. *Contact Dermatitis*, **20**, (4), 308-309.
- Bebak-Williams, J., Bullock, G. und Carson, M. C. (2002). Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*, **205**, (3-4), 221-230.
- Berger, K., Petersen, B. und Büning-Pfaue, H. (1986). Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **37**, (4), 99-102.
- BfT (2004). Tierarzneimittelmarkt 2003 Deutschland. *Tiergesundheit im Blickpunkt*, **45**, (Juni-Ausgabe), S. 3, Bundesverband für Tiergesundheit e.V. (BfT).
- BLAC (1998). *Auswirkungen der Anwendungen von Clofibrinsäure und anderer Arzneimittel auf die Umwelt und Trinkwasserversorgung*. Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC). Bericht an die 50. Umweltministerkonferenz (UMK) am 03./04.11.1998 in Hamburg. Hamburg, Umweltbehörde Hamburg.
- BLAC (1999). *Arzneimittel in der Umwelt. Konzept für ein Untersuchungsprogramm*. Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC). Bericht an die 53. Umweltministerkonferenz (UMK) am 27./28. Oktober 1999 in Augsburg. Hamburg, Umweltbehörde Hamburg.
- BLAC (2003). *Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse*. Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC). Bericht an die 61. Umweltministerkonferenz (UMK) am 19./20. November 2003 in Hamburg. Hamburg, Umweltbehörde Hamburg.
- Blackwell, P. A., Lutzhöft, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sørensen, B., Boxall, A. B. A. und Kay, P. (2004). Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection. *Journal of Chromatography A*, **1045**, (1-2), 111-117.

- Boxall, A. B. A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P. und Tolls, J. (2002). The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters*, **131**, (1-2), 19-28.
- Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Halling-Sørensen, B. und Tolls, J. (2003). Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science & Technology*, **37**, (15), 286A-294A.
- Boxall, A. B. A., Kay, P., Blackwell, P. A. und Fogg, L. A. (2004). Fate of veterinary medicines applied to soils. In: K. Kümmerer (Hrsg.), *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 2. Aufl., Berlin [u. a.], Springer-Verlag, S. 165-180.
- Bruins, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, **794**, (1-2), 345-357.
- Campagnolo, E. R., Johnson, K. R., Karpati, A., Rubin, C. S., Kolpin, D. W., Meyer, M. T. et al. (2002). Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *The Science of the Total Environment*, **299**, (1-3), 89-95.
- Capone, D. G., Weston, D. P., Miller, V. und Shoemaker, C. (1996). Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, **145**, (1-4), 55-75.
- Caraffini, S., Assalve, D., Stingeni, L. und Lisi, P. (1994). Tylosin, an airborne contact allergen in veterinarians. *Contact Dermatitis*, **5**, 327-328.
- Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N. und Mackie, R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied Environmental Microbiology*, **67**, (4), 1494-1502.
- Cooper, A. D., Stubbings, G. W., Kelly, M., Tarbin, J. A., Farrington, W. H. und Shearer, G. (1998). Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. *Journal Chromatography A*, **812**, (1-2), 321-326.
- Danese, P., Zanca, A. und Bertazzoni, M. G. (1994). Occupational contact dermatitis from tylosin. *Contact Dermatitis*, **30**, (2), 122-123.
- Daughton, C. G. und Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, **107**, (6), 907-938.
- Daughton, C. G. (2002). Environmental stewardship and drugs as pollutants. *The Lancet*, **360**, 1035-1036.

- De Liguoro, M., Cibirin, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B. und Montesissa, C. (2003). Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, **52**, (1), 203-212.
- Domagk, C. (1935). Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektion. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **61**, 250-253.
- Donham, K. J. (1993). Respiratory disease hazards to workers in livestock and poultry confinement structures. *Seminars in Respiratory Medicine*, **14**, (1), 49-59.
- Duggar, B. M. (1948). Aureomycin - a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **51**, (2), 177-181.
- Dürkheimer, W. (1975). Tetracyclines - chemistry, biochemistry, and structure-activity relations. *Angewandte Chemie - International Edition in English*, **14**, (11), 721-734.
- EG (1990). Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (2377/90/EWG). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, **L 224**, S. 1-8. Brüssel, Rat der Europäischen Gemeinschaften (EG).
- EG (1998). Verordnung (EG) Nr. 2788/98 der Kommission vom 22. Dezember 1998 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung hinsichtlich der Rücknahme der Zulassung bestimmter Wachstumsförderer (2788/98/EG). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, **L 347**, S. 31-32. Brüssel, Kommission der Europäischen Gemeinschaften (EG).
- EG (2002). Entscheidung 2002/657/EG 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 (2002/657/EG). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, **L 221**, S. 8-36. Brüssel, Kommission der Europäischen Gemeinschaften (EG).
- Ehrlich, J., Bartz, Q. R., Smith, R. M., Joselin, D. A. und Burkholder, P. R. (1947). Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science*, **106**, (2757), 417-419.
- EMA (1996). Chloramphenicol. Summary Report. *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP)* [online]. Verfügbar im Internet unter: <http://www.ema.eu.int/pdfs/vet/mrls/chloramphenicol.pdf>.
- EMA (1997). *Note for guidance: environmental risk assessment of veterinary medical products other than GMO-containing and immunological products.*

- EMEA/CVMP/055/96-final. London, UK, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), 17.01.1997.
- Enke, C. G. (1997). A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Analytical Chemistry*, **69**, (23), 4885-4893.
- FEDESA (1997). Antibiotics and Animals - Fast Facts. In: *IFAH-Europe Kit on Antibiotics: Antibiotics and Animals*. European Federation for Animal Health (FEDESA) [online]. Verfügbar im Internet unter: <http://www.fedesa.be/europe/topics/antibio/Kit3.htm#B5>
- FEDESA (2001). *Antibiotic Use in Farm Animals does not threaten Human Health. FEDESA/FEFANA Press release*. Brussels, Belgium, European Federation of Animal Health (FEDESA), 13 July 2001.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1990). Electrospray ionization - principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, **9**, (1), 37-70.
- Fenn, J. B. (2003). Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, **42**, (33), 3871-3894.
- Figuroa, R. A., Leonard, A. und MacKay, A. A. (2004). Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environmental Science & Technology*, **38**, (2), 476-483.
- Gaskell, S. J. (1997). Electrospray: Principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, (7), 677-688.
- Gavalchin, J. und Katz, S. E. (1994). The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *Journal of AOAC International*, **77**, (2), 481-485.
- Gottlieb, D., Bhattacharyya, P. K., Anderson, H. W. und Carter, H. E. (1948). Some properties of an antibiotic obtained from a species of *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology* **55**, (3), 409-417.
- Göbel, A., McArdell, C. S., Suter, M. J. und Giger, W. (2004). Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **76**, (16), 4756-4764.
- Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C. und Giger, W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, **74**, (21), 5455-5462.
- Gräfe, U. (1992). *Biochemie der Antibiotika: Struktur - Biosynthese – Wirkmechanismus*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

- Haller, M. Y., Müller, S. R., McArdeell, C. S., Alder, A. C. und Suter, M. J. (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., Nielsen, N. S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhøft, H. C. H. und Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere*, **36**, (2), 357-393.
- Halling-Sørensen, B., Jensen, J., Montforts, M. H. M. M. und Tjørnelund, J. (2001). Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC). In: K. Kümmerer (Hrsg.), *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 1. Aufl., Berlin [u. a.], Springer-Verlag, S. 143-157.
- Halling-Sørensen, B., Sengelov, G. und Tjørnelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, **42**, (3), 263-271.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höper, H. und Nau, H. (2000). Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **107**, (8), 332-334.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H. und 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.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H. (2003a). Ermittlung von Tierarzneimittelkonzentrationen in Gülle, Böden und Grundwasser im Rahmen der Bund-/Länder Untersuchungsprogramms - Arzneimittel in der Umwelt - Konzept für ein Untersuchungsprogramm - UMK-Beschluss vom 27./28. Oktober 1999 (Forschungsbericht 201 91 217). Berlin, Umweltbundesamt.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Sczesny, S., Nau, H. und 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., Pawelzick, H. T., Höper, H. und Nau, H. (2004). Antibiotics in soil: routes of entry, environmental concentrations, fate and possible effects. In: K. Kümmerer (Hrsg.), *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 2. Aufl., Berlin [u. a.], Springer-Verlag, S. 139-147.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H. und 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.

- Hartung, J. (1997). Staubbelastung in der Nutztierhaltung. *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie*, **47**, (2), 65-72.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, **131**, (1-2), 5-17.
- Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F. und Kratz, K. L. (1998). Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **815**, (2), 213-223.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. und Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, **225**, (1-2), 109-118.
- Hjorth, N. und Roed-Petersen, J. (1980). Allergic contact-dermatitis in veterinary surgeons. *Contact Dermatitis*, **6**, (1), 27-29.
- Holt, D., Harvey, D. und Hurley, R. (1993). Chloramphenicol Toxicity. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews*, **12**, (2), 83-95.
- Höper, H., Kues, J., Nau, H. und Hamscher, G. (2002). Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden. *Bodenschutz*, **7**, 141-148.
- Horie, M. (1995). Chemical analysis of macrolide antibiotics. In: H. Oka u. a. (Hrsg.), *Chemical analysis for antibiotics used in agriculture*. Arlington, VA, AOAC International, S. 165-206.
- Iversen, M., Kirychuk, S., Drost, H. und Jacobson, L. (2000). Human health effects of dust exposure in animal confinement buildings. *Journal of Agricultural Safety and Health*, **6**, 283-288.
- Jacobsen, P. und Berglind, L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*, **70**, (4), 365-370.
- Jacobsen, A. M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F. und Hansen, S. H. (2004). Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1038**, (1-2), 157-170.
- JEFCA (1994). *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Prepared by the forty-second Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives in Rome, Italy, 1 - 10 February 1994. Geneva, World Health Organization, WHO Food Additives Series, **33**.

- Jensen, L. B., Baloda, S., Boye, M. und Aarestrup, F. M. (2001). Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environment International*, **26**, 581-587.
- Jjemba, P. K. (2002). The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **93**, (1-3), 267-278.
- Jørgensen, S. E. und Halling-Sørensen, B. (2000). Drugs in the environment. *Chemosphere*, **40**, (7), 691-699.
- Kauppila, T. J., Kuuranne, T., Meurer, E. C., Eberlin, M. N., Kotiaho, T. und Kostianen, R. (2002). Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Analytical Chemistry*, **74**, (21), 5470-5479.
- Kay, P., Blackwell, P. A. und Boxall, A. B. A. (2004). Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, (5), 1136-1144.
- Kebarle, P. und Tang, L. (1993). From molecules in solution to ions in the gas-phase - the mechanism of electrospray mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*, **65**, (22), A972-A986.
- Kebarle, P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, (7), 804-817.
- Klagkou, K., Pullen, F., Harrison, M., Organ, A., Firth, A. und Langley, G. J. (2003). Fragmentation pathways of sulphonamides under electrospray tandem mass spectrometric conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**, (21), 2373-2379.
- Kleefisch, B. und Kues, J. (1997). Das Boden-Dauerbeobachtungsprogramm von Niedersachsen. Methodik und Ergebnisse. *Arbeitshefte Boden*, **2**, 1-122.
- Koester, C. J., Simonich, S. L. und Esser, B. K. (2003). Environmental analysis. *Analytical Chemistry*, **75**, (12), 2813-2829.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. et al. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, **36**, (6), 1202-1211.
- Kroker, R. (1983). Aspekte zur Ausscheidung antimikrobiell wirksamer Substanzen nach der chemotherapeutischen Behandlung von Nutztieren. *Wissenschaft und Umwelt*, **4**, 305-308.

- Kroker, R., Scherkl, R. und Ungemach, F. (2002). Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: H. H. Frey und W. Löscher (Hrsg.), *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag, S. 353-393.
- Kromidas, S. (1999). *Validierung in der Analytik*. 1. Aufl., Weinheim [u. a.], Wiley-VCH.
- Kühne, M., Ihnen, D., Möller, G. und Agthe, O. (2000). Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **47**, (6), 379-384.
- Kümmerer, K. (2001a). Drugs, diagnostics agents and disinfections in waste and water - a review. *Chemosphere*, **45**, (7), 957-969.
- Kümmerer, K. (Hrsg.) (2001b). *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 1. Aufl., Berlin [u. a.], Springer-Verlag.
- Kümmerer, K. (2003a). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**, (1), 5-7.
- Kümmerer, K. (2003b). Significance of antibiotics in the environment - Corrigendum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**, (2), 317.
- Kümmerer, K. (Hrsg.) (2004). *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 2. Aufl., Berlin [u. a.], Springer-Verlag.
- Lallai, A., Mura, G. und 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.
- Langhammer, J. P., Büning-Pfaue, H., Winkelmann, J. und Körner, E. (1988). Chemotherapeutika-Rückstände und -Resistenzverhalten bei der Bestandsbehandlung von Sauen post partum. *Tierärztliche Umschau*, **43**, (6), 375-382.
- Langhammer, J. P., Führ, F. und Büning-Pfaue, H. (1989). Bewertung von Arzneistoff-Rückständen aus der Gülle im Boden. *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie*, **43**, 108.
- Langhammer, J. P., Führ, F. und Büning-Pfaue, H. (1990). Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanze. *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie*, **44**, 93.
- Levy, S. B. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**, (1), 25-30.
- Lin, C. E., Chang, C. C. und Lin, W. C. (1987). Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A*, **768**, (1), 105-112.

- Lindsey, M. E., Meyer, M. T. und Thurman, E. M. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **73**, (19), 4640-4646.
- Linke, I. und Kratz, W. (2001). *Tierarzneimittel in der Umwelt – Erhebungen von Tierarzneimittelmengen im Land Brandenburg für den Zeitraum von Juli 1998 bis Juni 1999*. Potsdam, LUA Brandenburg.
- Loke, M. L., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. und Tjornelund, J. (2000). Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, **40**, (7), 759-765.
- Lopez de Alda, M. J., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M. und Barcelo, D. (2003). Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, **1000**, (1-2), 503-526.
- Massé, D. I., Lu, D., Masse, L. und Droste, R. L. (2000). Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, **75**, 205-211.
- McFarland, J. W., Berger, C. M., Froshauer, S. A., Hayashi, S. F., Hecker, S. J., Jaynes, B. H. et al. (1997). Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: In vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**, (9), 1340-1346.
- Merck (2001). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 13. Aufl., Whitehouse Station, NJ, Merck & CO., Inc.
- Meyer, M. T., Bumgarner, J. E., Varns, J. L., Daughtridge, J. V., Thurman, E. M. und Hostetler, K. A. (2000). Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*, **248**, (2-3), 181-187.
- Mitscher, L. A. (1978). *The chemistry of the tetracycline antibiotics*. 1. Aufl., New York [u. a.], Marcel Dekker.
- Montforts, M. H. M. M., Kalf, D. F., van Vlaardingen, P. L. A. und Linters, J. B. H. J. (1999). The exposure assessment of veterinary medicinal products. *The Science of the Total Environment*, **225**, (1-2), 119-133.
- Mottier, P., Parisod, V., Gremaud, E., Guy, P. A., Stadler, R. H. (2003). Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **994**, (1-2), 75-84.

- Niessen, W. M. (2003). Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal of Chromatography A*, **1000**, (1-2), 413-436.
- Norpoth, K., Nehr Korn, A., Kirchner, M., Holsen, H. und Teipel, H. (1973). Investigations on problem of solubility and stability of steroid ovulation inhibitors in water, waste-water and activated-sludge. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Serie B - Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Präventive Medizin*, **156**, (6), 500-511.
- Nowak, D. (1998). Health effects of airborne pollutants particularly in swine confinement houses - a review focusing on aspects of occupational medicine. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **105**, (6), 225-234.
- Nwosu, V. C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology*, **152**, (5), 421-430.
- OECD (2000). *Adsorption/desorption using batch equilibrium method*. OECD guidelines for testing of chemicals, test guideline 106, revised draft document. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).
- Oehme, M. (1998). Organische Spurenanalytik: Praktische Probleme und ihre Lösung. Kontaminationen und Lösemittelverluste. *LABO, Sonderdruck*, (3).
- Oka, H. und Patterson, J. (1995). Chemical analysis of tetracycline antibiotics. In: H. Oka u. a. (Hrsg.), *Chemical analysis for antibiotics used in agriculture*. Arlington, VA, AOAC International, S. 333-406.
- Oka, H., Ito, Y. und Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, **882**, (1-2), 109-133.
- Onan, L. J. und LaPara, T. M. (2003). Tylosin-resistant bacteria cultivated from agricultural soil. *FEMS Microbiology Letters*, **220**, (1), 15-20.
- Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K. und Spiteller, M. (2002). Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**, (7), 663-669.
- Pichon, V., Coumes, C. C. D., Chen, L., Guenu, S. und Hennion, M. C. (1996). Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. *Journal of Chromatography A*, **737**, (1), 25-33.
- Pietsch, J., Ricordel, D., Imhof, L., Schmidt, W., Werner, P., Croue, J.-P. et al. (1999). Trace analysis of veterinary chemotherapeutic residues in water by high-performance liquid chromatography. *Vom Wasser*, **92**, 51-59.

- Platz, S., Scherer, M. und Unshelm, J. (1995). Studies on load of immission of fattening pigs and the environment outside of pig-fattening farms caused by lung passing dust particles, pighthouse specific airborne bacteria and ammonia. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, **196**, (5), 399-415.
- Rabølle, M. und Spliid, N. H. (2000). Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*, **40**, (7), 715-722.
- Radon, K., Danuser, B., Iversen, M., Monso, E., Weber, C., Hartung, J. et al. (2002). Air contaminants in different European farming environments. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **9**, (1), 41-48.
- Rauha, J. P., Vuorela, H. und Kostianen, R. (2001). Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **36**, (12), 1269-1280.
- Reemtsma, T. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *Journal of Chromatography A*, **1000**, (1-2), 477-501.
- Renew, J. E. und Huang, C. H. (2004). Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1042**, (1-2), 113-121.
- Richardson, M. L. und Bowron, J. M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **37**, (1) 1-12.
- Römbke, J., Knacker, T., Stahlschmidt-Allner, P. (1996). *Umweltprobleme durch Arzneimittel, Literaturstudie* (Forschungsbericht 106 04 121). Berlin, Umweltbundesamt.
- Salvatore, M. J. und Katz, S. E. (1993). Solubility of antibiotics used in animal feeds in selected solvents. *Journal of AOAC International*, **76**, (5), 952-956.
- Samuelson, O. B., Torsvik, V. und Ervik, A. (1992). Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *The Science of the Total Environment*, **114**, 25-36.
- Schenck, F. J. und Callery, P. S. (1998). Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, **812**, (1-2), 99-109.
- Schlüsener, M. P., Bester, K. und Spittler, M. (2003a). Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375**, (7), 942-947.

- Schlüsener, M. P., Spiteller, M. und Bester, K. (2003b). Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1003**, (1-2), 21-28.
- Sczesny, S. (2001). *Analytik von Tetracyclinen in Umwelt- und Lebensmittelproben mittels selektiver Extraktionsverfahren und sensitivem Nachweis durch HPLC gekoppelt mit mikrobiologischem Assay und Tandem-Massenspektrometrie* [Dissertation]. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, ZA für Lebensmitteltoxikologie.
- Sczesny, S., Nau, H. und Hamscher, G. (2003). Residue analysis of Tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, (3), 697-703.
- Sengeløv, G., Agerso, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S. B., Andersen, J. S. und Jensen, L. B. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, **28**, (7), 587-595.
- Sithole, B. B. und Guy, R. D. (1987a). Models for tetracycline in aquatic environments. 1. Interaction with bentonite clay systems. *Water Air and Soil Pollution*, **32**, (3-4), 303-314.
- Sithole, B. B. und Guy, R. D. (1987b). Models for tetracycline in aquatic environments. 2. Interaction with humic substances. *Water Air and Soil Pollution*, **32**, (3-4), 315-321.
- Sonneborn, M. (1978). Zum Vorkommen von Steroiden mit biologische wirksamer Östrogensaktivität im Wasserkreislauf. In: K. Aurand (Hrsg.), *Organische Verunreinigungen in der Umwelt*. Berlin, E. Schmidt Verlag, S. 205-207.
- Spaepen, K. I., van Leemput, L. J. J., Wislocki, P. und Verschueren, C. (1997). A uniform procedure to estimate the predicted environmental concentration of the residues of veterinary medicines in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1977-1982.
- Stahlmann, R. und Lode, H. (2001a). Antibiotika und Chemotherapeutika. Sulfonamide. In: W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Aufl., München [u. a.], Urban & Fischer Verlag, S. 798-804.
- Stahlmann, R. und Lode, H. (2001b). Antibiotika und Chemotherapeutika. Chloramphenicol. In: W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Aufl., München [u. a.], Urban & Fischer Verlag, S. 835-836.

- Stahlmann, R. und Lode, H. (2001c). Antibiotika und Chemotherapeutika. Tetracycline. In: W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Aufl., München [u. a.], Urban & Fischer Verlag, S. 837-840.
- Stahlmann, R. und Lode, H. (2001d). Antibiotika und Chemotherapeutika. Makrolid-Antibiotika In: W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Aufl., München [u. a.], Urban & Fischer Verlag, S. 852-855.
- Stan, H.-J. und Linkerhänger, M. (1992). Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methylpropionsäure im Grundwasser mittels Kapillargaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie. *Vom Wasser*, **79**, 85-88.
- Stan, H.-J., Heberer, T. und Linkerhänger, M. (1994). Vorkommen von Clofibrinsäure im Gewässersystem - Ist der humanmedizinische Gebrauch Ursache für die Kontamination von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? *Vom Wasser*, **83**, 57-68.
- Tabak, H. H. und Bunch, R. L. (1970). Steroid hormones as water pollutants. In: *Developments in Industrial Microbiology*, Washington, S. 367-376.
- ThermoQuest (2000). Triple quads or ion traps: which is best for your application? *Analytical News*, 7-9.
- Thiele-Bruhn, S. (2003a). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **166**, (2), 145-167.
- Thiele-Bruhn, S., Mogk, A. und Freitag, D. (2003b). Einsatz von Tierarzneimitteln zur Anwendung bei landwirtschaftlichen Nutztieren in Mecklenburg-Vorpommern. *Berichte Über Landwirtschaft*, **81**, (2), 374-391.
- Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H. R. und Leinweber, P. (2004). Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environment and Quality*, **33**, (4), 1331-1342.
- Thurman, E. M. und Mills, M. S. (1998). *Solid-phase extraction principles and practice*. New York, John Wiley & Sons, S. 232-233.
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science & Technology*, **35**, (17), 3397-3406.
- TrinkwV (2001). *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch*. In der ab dem 01. Januar 2003 [BGBl. I 2003, S. 2304] gültigen Fassung „Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung“ vom 21. Mai [BGBl. I S. 959], zuletzt geändert am 25. November 2003.
- VICH (2000). *Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products (VMPs) - Phase I*. COMISA. Brüssel, International Cooperation on

- Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH).
- Vree, T. B. und Hekster, Y. A. (1987). *Clinical pharmacokinetics of sulfonamides and their metabolites: an encyclopedia*. Basel [u. a.], Karger, S. 1-214, Antibiotic and Chemotherapy (37), H. Schönfeld.
- Winckler, C. und Grafe, A. (2000). *Abschätzung des Stoffeintrags in Böden durch Tierarzneimittel und pharmakologisch wirksame Futterzusatzstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Tetracycline* (Forschungsbericht 297 33 911). UBA-FB000074, Berlin, Umweltbundesamt.
- Winckler, C. und Grafe, A. (2001). Use of veterinary drugs in intensive animal production: evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of Soils and Sediments*, **1**, (2), 66-70.
- Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, **279**, (5353), 996-997.
- Yamashita, M. und Fenn, J. B. (1984). Negative-ion production with the electrospray ion-source. *Journal of Physical Chemistry*, **88**, (20), 4671-4675.
- Yang, S. und Carlson, K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research*, **37**, (19), 4645-4656.
- Yang, S., Cha, J. und Carlson, K. (2004). Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, (18), 2131-2145.
- Zahn, J. (2001). Evidence for transfer of tylosin and tylosin-resistant bacteria in air from swine production facilities using therapeutic concentrations of tylosin in feed. In: *Proceedings of the International Animal Agriculture and Food Science Conference*. Indianapolis, IN, USA.
- Ziechmann, W. (1996). *Huminstoffe und ihre Wirkung*. Heidelberg [u. a.], Spektrum Akademischer Verlag.
- Zhu, J., Snow, D. D., Cassada, D. A., Monson, S. J. und Spalding, R. F. (2001). Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **928**, (2), 177-186

7 Publikationsliste

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab in folgenden Beiträgen veröffentlicht.

Publikationen

- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Sczesny, S., Nau, H. und Hartung, J. (2003). 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., Pawelzick, H. T., Höper, H. und 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.

Forschungsberichte

- Hamscher, G., Pawelzick, H. T. und Höper, H. (2003). *Ermittlung von Tierarzneimittelkonzentrationen in Gülle, Böden und Grundwasser im Rahmen des Bund-/Länder Untersuchungsprogramms - Arzneimittel in der Umwelt - Konzept für ein Untersuchungsprogramm - UMK-Beschluss vom 27./28. Oktober 1999* (Forschungsbericht 201 91 217). Berlin, Umweltbundesamt.
- Hamscher, G. und Pawelzick, H. T. (2004). *Entwicklung und Validierung von Verfahren zur Analytik von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Böden und Gülle* (Abschlussbericht zu Projekt-Nr. B 6.01). Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz (LABO).
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T. und Nau, H. (2005). Rückstände von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Teichwässern und Teichsedimenten. In: Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.), *Forschungsprojekt 2004 „Aquakulturen in Niedersachsen“*, Cuxhaven, Land Niedersachsen, 03/2005, S. 56-59. Veröffentlicht im Internet unter:
http://www.laves.niedersachsen.de/master/9331820_N1223_L20_D0_I826.html.

Tagungsbeiträge

- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Pawelzick, H. T. und Nau, H. (2002). Tetracycline als neue persistente organische Umweltkontaminanten in landwirtschaftlichen Nutzflächen. In: J. W. Metzger (Hrsg.), *Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt - eine Bedrohung? – 2. Hydrochemisches und Hydrobiologisches Kolloquium am 14. März 2002*. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 168, München, Oldenbourg-Industrieverlag, ISBN 3-486-26533-4, S. 51–57.

- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Nau, H. und Hartung, J. (2002). Detection of antibiotics in dust originating from a pig fattening farm. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.), *Abstract Book SETAC Europe 12th Annual Meeting*, Vienna, Austria, 12–16 May 2002, 03-08, S. 11.
- Höper, H., Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Schäfer, W. und Nau, H. (2003). Occurrence and fate of tetracyclines and sulfonamides in soils fertilized with animal manure. In: Institut für Grundwasserwirtschaft, Technische Universität Dresden (Hrsg.), *Proceedings of the Workshop Diffuse input of chemicals into soil and groundwater*, Dresden, 26.–28.02.2003. Mitteilung, Heft 3, Dresden, Institut für Grundwasserwirtschaft, ISSN 1430-0311, S. 117-124.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H. und Nau, H. (2003). Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils fertilized with animal slurry. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.), *Abstract Book SETAC Europe 13th Annual Meeting*, Hamburg, Germany, 27 April–1 May 2003, TH6/4, S. 72.
- Pawelzick, H. T., Höper, H., Nau, H., Hamscher, G. (2003). Mobility of tetracycline and sulfamethazine in sandy soils fertilized with liquid manure. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.), *Abstract Book SETAC Europe 13th Annual Meeting*, Hamburg, Germany, 27 April–1 May 2003, WEP/45, S. 173.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H. und Nau, H. (2004). Influence of soil properties on the extraction rates for tetracyclines, sulfonamides, and tylosin in reference soils. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.), *Abstract Book SETAC Europe 14th Annual Meeting*, Prague, Czech Republic, 18–22 April 2004, MOPO9/030, S. 136.
- Pawelzick, H. T., Höper, H., Nau, H., Hamscher, G. (2004). A survey of the occurrence of various tetracyclines and sulfamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.), *Abstract Book SETAC Europe 14th Annual Meeting*, Prague, Czech Republic, 18–22 April 2004, WEPO22/013, S. 292.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H. und Nau, H. (2004). Tierarzneimittel in Böden – eine Grundwassergefährdung? In: Umweltbundesamt (Hrsg.), *Tagungsband des Fachgespräches "Umweltbewertung von Arzneimitteln"*, Berlin, 29.–30.09.2004 (im Druck).

Kues, J., Höper, H., Pawelzick, H. T., Pluquet, E., Hamscher, G. (2004). Einträge potenzieller Schadstoffe in den Boden über Wirtschaftsdünger. Wirkung auf Bodenorganismen und Verlagerung. In: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen und Bundesverband Boden (Hrsg.), *Tagungsband der Fachtagung "Bodenschutz – europäisch und lokal"*, S. 55–62.

Buchbeiträge

Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H., Nau, H. (2003). Tierarzneimittelrückstände in Wirtschaftsdüngern, Boden, Sicker- und Grundwasser. In: T. Track und G. Kreysa (Hrsg.), *Spurenstoffe in Gewässern: Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen*. Weinheim, Wiley-VCH, ISBN 3-527-31017-7, S. 107-122. 41. Tutzing-Symposium „Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen in Gewässern“. Tutzing, DECHEMA, Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie, 16.–19. März 2003.

Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H., Nau, H. (2004). Antibiotics in Soil: Routes of entry, environmental concentrations, fate and possible effects. In: K. Kümmerer (Hrsg.), *Pharmaceuticals in the Environment, Sources, Fate, Effects and Risks*. 2. Aufl., Berlin [u. a.], Springer-Verlag, ISBN: 3-540-21342-2, S. 139-147.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2001 bis Januar 2005 am *Institut für Lebensmitteltoxikologie* (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Heinz Nau) der *Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover* unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Gerd Hamscher angefertigt.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Heinz Nau danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in dem Rückstandslabor der *Lebensmitteltoxikologie* anfertigen und an zahlreichen Tagungen und Fortbildungen teilnehmen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Gerd Hamscher für die interessante Themenstellung und für die vortreffliche Betreuung. Seine kompetenten Hilfestellungen am MS, seine jederzeit bereitwilligen Erklärungen und nicht zuletzt die nützlichen Diskussionen und Anregungen trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Professor Dr. Ralf Günter Berger, *LCI, Universität Hannover*, danke ich für die Übernahme des Referates und Herrn Privatdozent Dr. Holger Zorn, *LCI, Universität Hannover*, danke ich für den Prüfungsvorsitz bei der mündlichen Doktorprüfung.

Bei allen Kooperationspartnern bedanke ich mich herzlich:

- für die Durchführung der Feldstudien und der Entnahme der Gülle-, Boden- und Wasserproben bei den Mitarbeitern des *NLFB*, Bremen, insbesondere bei den Herren Dr. Bernd Kleefisch, Dr. Heinrich Höper und Hans Groh,
- für das „Staubprojekt“ und der Bereitstellung der Proben bei Herrn Professor Dr. Jörg Hartung und Mitarbeitern, *Institut für Tierhygiene und Tierschutz, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*,
- für das Forschungsprojekt „Aquakulturen in Niedersachsen“ bei den Herren Dirk Willem Kleingeld und Reinhard Kruse, *LAVES Niedersachsen*, Cuxhaven.

Des Weiteren gilt mein Dank:

- Herrn Dr. Jörg Römbke und Mitarbeitern, *ECT Ökotoxikologie GmbH*, Flörsheim/Main, für die Bereitstellung und Charakterisierung der Referenzböden,
- Frau Judith McAlister-Hermann, *English Editorial Office, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*, für die sorgfältige Korrektur der englischen Kurzfassung.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen der *Lebensmitteltoxikologie* möchte ich meine Anerkennung für die „gute Chemie“ aussprechen, insbesondere:

- Beate Prieß für ihre jederzeit kompetente Unterstützung im Laboralltag und für ihren Beitrag bei der Aufarbeitung zahlreicher Umweltproben,
- Frau Dr. Silke Sczesny für die sorgfältige Einarbeitung in die veterinärmedizinischen Aspekte dieser Arbeit,
- Frau Dr. Ute Gravemann für die Korrektur des Manuskripts und ihre konstruktive Kritik.

Zu guter Letzt sind noch das *Umweltbundesamt (UBA)* und der *Länderausschuss Bodenschutz (LABO)* für die Bewilligung der Forschungs-/Entwicklungsvorhaben und damit der Bereitstellung der finanziellen Mittel zu nennen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Heike Pawelzick
Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
* 23.03.1976 in Würzburg

Wissenschaftliche Tätigkeit

- 03/2005 Promotion zum Dr. rer. nat. an der Universität Hannover
- 06/2001 – 01/2005 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Lebensmitteltoxikologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Heinz Nau
- Doktorarbeit
- Thema: „Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten – Untersuchungen zu Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels HPLC-MS/MS“
 - Leitung: Priv.-Doz. Dr. Gerd Hamscher

Ausbildung

- 02/2000 – 04/2001 Berufspraktische Ausbildung und Staatsprüfung am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen, Nürnberg und Würzburg
- 04/2001 Abschluss zur Staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin
- 03/2001 Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
- 02/2000 – 01/2001 Berufspraktische Ausbildung für Lebensmittelchemiker
- WS/1995 – WS/1999 Lebensmittelchemie-Studium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- AK Prof. Dr. Peter Schreier
- 12/1999 Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
- SS/1999 Wissenschaftliche Abschlussarbeit
- Thema: „Tryptophan-Glykokonjugate: Relevanz der primären Maillard-Produkte im Proteinverband“
 - Leitung: Priv.-Doz. Dr. Markus Herderich
- 10/1997 Vorprüfung für Lebensmittelchemiker
- 09/1986 – 06/1995 Friedrich-Koenig-Gymnasium in Würzburg
- 06/1995 Allgemeine Hochschulreife

