

Untersuchungen zum Verhalten von Veterinärpharmaka im Boden

Von der Fakultät für Naturwissenschaften
Department Chemie
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Diplom-Chemiker
Henning Stevens

Paderborn 2009

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen, die in der Zeit von Januar 2004 bis Januar 2007 an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie des Departments Chemie der Fakultät für Naturwissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote durchgeführt worden sind.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

M. Grote, B. Kuhlmann, G. Preuß, U. Schulte-Ebbert, H. Stevens und N. Zullei-Seibert; *Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes*; Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 66, 2007

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche and M. Freitag; *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil*; Landbauforschung Völknerode - FAL Agricultural Research 57, 2007, 25-32

U. Schulte-Ebbert, N. Büchner, B. Kuhlmann, G. Preuß, N. Zullei-Seibert, H. Stevens, M. Grote; *Partikelmedierte Verlagerung und biologische Auswirkungen von güllebürtigem Chlortetracyclin und Sulfadiazin im Boden und Sickerwasser*; Tagungsband: 72. Jahrestagung Wasserchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, 22.-24. Mai 2006, Celle (S. 86 - 91) (ISBN 3-936028-39-7)

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden - Ergebnisse eines Modellversuchs*; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 1, 2006, 38 – 50

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, H. Korste, W. Heyser, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotikaeinträge aus der Tierhaltung in Boden und Nutzpflanzen - Ergebnisse eines Modellversuches*; VDLUFA-Schriftenreihe, Kongressband 2005, VDLUFA-Verlag, LUFA Speyer Kreislaufwirtschaft mit der Landwirtschaft– quo vadis? 27. – 30.09.2005, Bonn, S. 228 – 232 (ISBN 3-922712-92-4)

M. Freitag, H. Stevens, R. Michel, C. Schwake-Anduschus, T. Betsche, M. Grote; *Transfer of Antibiotics Used in Animal Husbandry from Slurry into Food*; Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 10. Symposium 28./29. September 2005, Jena, Tagungsband: Seite 174

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote
2. Referent: Prof. Dr. H. C. Marsmann

Eingereicht am 04.11.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich sehr herzlich für die überaus interessante Themenstellung dieser Arbeit und seine engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. H.C. Marsmann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dipl.-Geogr. U. Schulte-Ebbert (Institut für Wasserforschung GmbH), Frau Prof. Dr. M. Freitag (Fachhochschule Südwestfalen), Frau Dipl.-Ing. N. Zullei-Seibert (Institut für Wasserforschung GmbH) und allen weiteren Mitwirkenden an den beiden interdisziplinären Forschungsprojekten.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises an der Universität Paderborn für ihre kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima, insbesondere den Damen und Herren R. Knaup, Dipl.-Chem.-Ing. D.H. Meriç, Dipl.-Chem.-Ing. R. Michel, Dipl.-Chem.-Ing. H. Korste, Dr. A. Vockel und Dr. M. Borges. Frau R. Jackisch danke ich darüber hinaus für die durchgeführten UV/Vis-Messungen.

Ferner möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin Stefanie Blome für ihre jahrelange Geduld und Unterstützung sehr herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Zielsetzung.....	4
3 Grundlagen - Stand der Forschung -.....	6
3.1 Antimikrobielle Wirkstoffe in Veterinärmedizin und Tierproduktion.....	6
3.1.1 Verwendungspraxis in der Tierproduktion	6
3.1.2 Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen als Futtermittelzusatzstoffe	6
3.1.3 Antibiotikaverbrauch in der Landwirtschaft.....	8
3.2 Antibiotikaresistenzen und Verbrauchergefährdung.....	10
3.2.1 Resistenzentwicklung	10
3.2.2 Resistenzproblematik	12
3.2.3 Verbraucherschutz	14
3.2.4 Risiken durch den Antibiotikaeintrag in Böden	15
3.2.5 Gefährdungspotential resistenter Mikroorganismen.....	17
3.3 Tetracycline und Sulfonamide	20
3.3.1 Tetracycline	20
3.3.2 Sulfonamide.....	27
3.3.3 Trimethoprim	29
3.4 Arzneistoffe im Boden	29
3.4.1 Verhalten von Schadstoffen im Boden	30
3.4.2 Tetracycline und Sulfonamide in der Umwelt – Eintrag, Vorkommen und Verhalten	43
3.4.2.1 Tetracycline	43
3.4.2.2 Sulfonamide.....	49
4 Stand der Analytik zur Bestimmung von Antibiotika im Boden	54
4.1 Bestimmungsmethoden für Tetracycline und Sulfonamide.....	55
4.2 Vorbereitung von Bodenproben	56
4.2.1 Extraktion.....	57
4.2.2 Anreicherung der Analyte und Aufreinigung der Bodenextrakte	57
5 Ergebnisse und Diskussion	59
5.1 Untersuchung auf Antibiotikarückstände in einem gülle-beaufschlagten Boden	59
5.1.1 Ausgangssituation – Projektverlauf	59
5.1.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von CTC, SFD und TMP in Bodenproben	60
5.1.2.1 Entwicklung der HPLC-UV-MS/MS-Methode	60

5.1.2.2 Entwicklung der Probenaufbereitung	71
5.1.3 Methodenvalidierung	78
5.1.3.1 Externe Kalibrierung	78
5.1.3.2 Signalsuppression durch Matrixbestandteile	80
5.1.3.3 Wiederfindung.....	83
5.1.4 Analyse der Bodenproben aus dem „Antiinfektiva-Projekt“	84
5.1.5 Diskussion der Ergebnisse	86
5.1.6 Schlussfolgerungen	88
5.2 Untersuchungen zum Transportverhalten von Tetracyclin- und	
Sulfonamidrückständen im Boden	89
5.2.1 Voruntersuchungen zum Sorptionsverhalten und zur Komplexierung	89
5.2.1.1 Sorption von CTC, iso-CTC und SFD an Modellpartikeln.....	90
5.2.1.1.1 Ergebnisse der Sorptionsuntersuchungen.....	90
5.2.1.2 Untersuchungen zum Komplexierungsverhalten von CTC und	
iso-CTC.....	95
5.2.1.2.1 Eigenschaften von Chlortetracyclinen und	
Untersuchungsmethodik	95
5.2.1.2.2 Spektrophotometrische Untersuchung der Reaktionen von	
Chlortetracyclinen mit Metallionen	97
5.2.1.2.3 Ergebnisse aus den Untersuchungen zum	
Komplexierungsverhalten	98
5.2.1.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen aus den	
Voruntersuchungen.....	106
5.2.2 Modellversuche zum Transportverhalten von SFD, CTC und	
iso-CTC im Boden	107
5.2.2.1 Verlagerung von SFD, CTC und iso-CTC in einem sandigen	
Ackerboden nach Gülleapplikation	109
5.2.2.1.1 Versuchsansatz im Labormaßstab	112
5.2.2.1.2 Naturnaher Versuchsansatz im halbtechnischen Maßstab	117
5.2.2.2 Zusammenfassung: Ergebnisse der Säulenversuche und	
Schlussfolgerungen	124
5.2.3 Ergänzende Untersuchungen zur Rückstandsanalytik.....	125
5.2.3.1 Ergebnisse.....	127
5.2.3.2 Schlussfolgerungen	128
5.2.4 Fluoreszenzuntersuchungen an partikelgebundenem CTC und iso-CTC	132
5.2.4.1 Qualitative Fluoreszenzanalyse.....	132
5.2.4.2 Quantitative Fluoreszenzanalyse.....	137

5.2.4.3 Diskussion	143
6 Zusammenfassung und Ausblick	145
7 Literatur	149
A Anhang	A1

Abkürzungsverzeichnis

AMG:	Arzneimittelgesetz
CTC:	Chlortetracyclin
DAD:	Dioden-Array-Detektor
DIN:	Deutsches Institut für Normung
DOM:	Dissolved Organic Matter
e-CTC:	4-Epichlortetracyclin
e-iso-CTC:	4-Epiisochlortetracyclin
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI:	Electrospray-Ionisation
EU:	Europäische Union
FAL:	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FEDESA:	Fédération Européenne de la Santé Animale
FLI:	Friedrich-Loeffler-Institut
FMG:	Futtermittelgesetz
HPLC:	High-Performance-Liquid-Chromatography (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
iso-CTC:	Isochlortetracyclin
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
K _D :	Verteilungskoeffizient (hier: Boden/Wasser)
K _{OC} :	Verteilungskoeffizient organischer Kohlenstoff/Wasser
K _{OW} :	Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser
λ _{ex} :	Anregungswellenlänge
λ _{em} :	Emissionswellenlänge
MRL:	Maximum Residue Limit
MS:	Massenspektrometrie
MS/MS:	Tandem Massenspektrometrie
MUNLV:	Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalens
n.n.:	nicht nachweisbar
n.b.:	nicht bestimmt
N-SFD:	N4-Acetylsulfadiazin
p.a.:	pro analysi
PAK:	Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PEC:	Predicted Environmental Concentration
pK _a :	Säuredissoziationskonstante
R _t :	Retentionszeit
RFU:	Relative Fluorescence Unit
SFD:	Sulfadiazin
SOM:	Soil Organic Matter
SPE:	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SRM:	Selective Reaction Monitoring
TIC:	Total Ion Current
TM:	Trockenmasse
TNT:	Trinitrotoluol

1 Einleitung und Problemstellung

Antibiotika gehören zu den bedeutendsten und am häufigsten eingesetzten human- und veterinärmedizinischen Arzneistoffen [1]. Auch wenn aktuelle Daten nicht vorliegen, ist allein für den Bereich der Nutztierhaltung von einem europaweiten Antibiotikaverbrauch in einer Größenordnung von mehreren tausend Tonnen pro Jahr auszugehen [2,3,75,78].

Im Gegensatz zur Anwendung bei Heimtieren, wo normalerweise nur einzelne Tiere zu therapeutischen Zwecken behandelt werden, ist in der Tiermast eine Bestandsbehandlung, also die Verabreichung von Antibiotika an eine größere Anzahl von Tieren, üblich [4].

Diese Praxis kann zu hohen und ökotoxisch relevanten Rückstandskonzentrationen von antimikrobiellen Wirkstoffen in Gülle und Mist führen, da die Antibiotika oder deren teilweise pharmakologisch aktiven Metabolite zum überwiegenden Anteil über Urin und Kot ausgeschieden werden [5,6]. Organische Wirtschaftsdünger (Gülle, Mist) können auch noch nach längerer Lagerung erhebliche Rückstandsmengen enthalten [7].

Mit einer organischen Düngung gelangen so auch Antibiotika sowie deren Metabolite auf landwirtschaftliche Nutzflächen [8], wo sie Abbau- und Sorptionsvorgängen als konzentrationsbestimmende Prozesse unterliegen [9]. Von dort aus ist ein Transport der Antibiotika und ihrer Metabolite in Abhängigkeit von ihren physiko-chemischen Eigenschaften, den Bodeneigenschaften und den Wetterbedingungen ins Grundwasser und in Oberflächengewässer möglich [4,9,10]. Über kontaminierte Klärschlämme können Humanpharmaka-Rückstände ebenfalls auf landwirtschaftliche Nutzflächen ebenfalls gelangen [4,10].

Gegenwärtig sind allerdings keine gesicherten Aussagen über das Gefährdungspotential durch Veterinärantibiotika für Mensch und Umwelt möglich, was auch für in die Umwelt eingetragene Humanantibiotika und für Arzneistoffe im Allgemeinen gilt. Ausreichende Erkenntnisse über Rückstandsmengen und Verhalten von Antibiotika in der Umwelt fehlen. Ergebnisse verschiedener Studien sind aufgrund einer hohen Komplexität der Zusammenhänge z.T. widersprüchlich [351-353]. Von zentraler Bedeutung sind daher folgende Fragestellungen:

- Welche Antibiotika (und relevante Metabolite) gelangen in welcher Menge auf landwirtschaftliche Nutzflächen?
- Wie persistent sind die einzelnen Antibiotika in den verschiedenen Umweltkompartimenten (Boden, Wasser, Sediment)?
- Werden Antibiotikarückstände im Boden von lebensmittel- oder futtermittelliefernde Pflanzen aufgenommen?
- Wie wirken sich die Rückstände im Boden auf Mikrobiologie und Fauna aus?

- Welche Bedeutung kommt dem Pfad Boden-Sickerwasser-Grundwasser oder dem Eintrag in Oberflächengewässer (Runoff, Abwasserpfad) zu?
- Wie mobil sind verschiedene Antibiotika in Böden (Verlagerungsmöglichkeit)?
- Welche Faktoren beeinflussen die Mobilität?
- Werden Antibiotika, welche im Boden als immobil eingestuft werden, ins Grundwasser eingetragen?
- Sind Auswirkungen auf die Qualität des Trinkwassers möglich und wie sind diese einzuschätzen?
- Welchen Einfluss haben Antibiotikarückstände im Boden auf die Bildung und Verbreitung von antibiotika-resistenten Mikroorganismen (Resistenzproblematik)?

Für ein effektives Risikomanagement ist es daher erforderlich, die u.a. oben genannten Erkenntnisdefizite zu schließen, um damit zu einer verbesserten Risikoeinschätzung für Mensch und Umwelt zu gelangen.

Der wissenschaftliche Beirat für Tierarzneimittel (CVMP) der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) verabschiedete 1997 einen Leitfaden [11] für die Umweltbewertung von Tierarzneimitteln. In diesem 2-phasigen Konzept steht in Phase I die Abschätzung des Umweltgefährdungspotentials eines Arzneistoffes auf Basis seiner physiko-chemischen Stoffeigenschaften sowie der Anwendungsmengen und Anwendungsmuster im Vordergrund. Bei Überschreitung bestimmter Schwellen- bzw. Triggerwerte ($PEC_{\text{soil}} > 100\mu\text{g/kg}$; $PEC_{\text{water}} > 1\mu\text{g/L}$) wird ein Wirkstoff als relevant für eine mögliche Umweltgefährdung eingestuft [12,13].

Für einen als derartigen Wirkstoff sind in Phase II detaillierte Untersuchungen bezüglich seines Umweltverhaltens und seiner Umweltauswirkungen vorgeschrieben, um die Risiken für die Umwelt beurteilen zu können [13,14].

Nach Richtlinie 2004/27/EG [15] ist für die Zulassung von Humanarzneimitteln eine Umweltprüfung vorgeschrieben. Gleiches gilt nach Richtlinie 2004/28/EG [16] für Tierarzneimittel. Beide Richtlinien unterscheiden sich aber in einem wesentlichen Punkt, denn im Gegensatz zu den Humanarzneimitteln kann die Zulassung aufgrund der Feststellung eines schweren Umweltrisikos nur bei den Tierarzneimitteln versagt werden.

Für die Zulassung von neuen Tierarzneimitteln ist schon seit 1998 eine Umweltbewertung nach dem EMA-Konzept erforderlich. Sogenannte „Altstoffe“, also Tierarzneimittel, die vor 1998 zugelassen worden sind, unterlagen somit keiner geregelten ökotoxikologischen Prüfung [6].

Eine Bewertung der von den „Altstoffen“ ausgehenden Risiken im Sinne von Umwelt- und Verbraucherschutz ist aber angebracht, da sie noch in beträchtlichen Mengen eingesetzt werden [17]. Für die Arzneimittelklasse der Antibiotika kommt die damit verbundene

Resistenzproblematik noch erschwerend hinzu. Neben den durch „Alt-Antibiotika“-Rückständen ausgehenden möglichen Gefahren für Mensch und Umwelt, sind wirtschaftliche Schäden infolge von Störungen im Fermentationsprozess und verminderter Biogasausbeute im Bereich der zur Energieerzeugung immer wichtiger werdenden Biogasproduktion möglich [18,19].

Aus diesen Gründen ist es erforderlich, detaillierte Erkenntnisse über Eintragsquellen von Antibiotika in die Umwelt und deren Verbreitungspfade zu gewinnen.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, Erkenntnisse über das Transportverhalten im Boden und den Transportpfad Gülle-Boden-Sickerwasser-Grundwasser der beiden „Alt-Antibiotika“ Chlortetracyclin und Sulfadiazin zu gewinnen, welche in der Veterinärmedizin zu den einsatzstärksten Antibiotikaklassen der Tetracycline und der Sulfonamide gehören [20]. Diese Erkenntnisse sind dabei unter dem Gesichtspunkt eines nachhaltigen Verbraucherschutzes von wesentlicher Bedeutung, da gesicherte Risikoabschätzungen nur durch fundierte Kenntnisse über die komplexen Zusammenhänge zwischen „Gülledüngung, Antibiotikaverlagerung und Auswirkungen auf die Ressourcen Boden und Grundwasser“ möglich sind.

2 Zielsetzung

Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit lagen nur wenige Daten über Einträge und Verhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden in landwirtschaftlich genutzten Böden vor. Es war unklar, ob bzw. in welchem Umfang die in den Boden über Güllebeaufschlagung eingetragenen Stoffe in zur Trinkwassergewinnung genutzte Grund- und Oberflächengewässer eingetragen werden und über die Aufnahme durch Nutzpflanzen in die Nahrungskette gelangen können. Ferner waren die Auswirkungen (z.B. Resistenzentstehung und -verbreitung) von Antibiotikarückständen und mit den Wirtschaftsdüngern in den Boden eingetragene resistente Mikroorganismen auf die natürliche mikrobielle Besiedlung noch wenig untersucht und daher nicht abschätzbar. Folglich waren keine gesicherten Aussagen über eine Gefährdung von Mensch und Umwelt möglich.

Um nähere Kenntnisse über die o.g. Zusammenhänge zu erlangen, wurden die vom MUNLV (Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz NRW) geförderten Projekte *„Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“* [476] und *„Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes“* [477] durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, welche mit den beiden Projekten in Verbindung steht, sollten Antibiotikarückstände (inkl. ausgewählter Hauptmetabolite und Umwandlungsprodukte) in Böden mittels LC-MS/MS ermittelt und schwerpunktmäßig Erkenntnisse über deren Abbau- und Transportverhalten gewonnen werden. Aufgrund der hohen Sorptionsaffinität von Tetracyclinen zur Bodenmatrix war die Untersuchung des partikelgebundenen Transports, bei dem Metallkomplexbildungs- und Ionenaustauschreaktionen sowie das Verhalten mobiler Festphasen bei Immobilisierungs- und Mobilisierungsprozessen relevant sein können, von zentraler Bedeutung. Das Verhalten der Antibiotika sollte in unterschiedlich dimensionierten Versuchsanlagen (Labor-, Säulen- und Freilandversuche) untersucht werden.

Aus den Zielen dieser Arbeit ergaben sich im Einzelnen folgende Aufgabenstellungen:

- Entwicklung einer LC-MS/MS-basierten Methode zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Böden,
- Identifizierung und Quantifizierung von Chlortetracyclin und Sulfadiazin sowie einiger ausgewählter Metabolite/Umwandlungsprodukte in Bodenproben anhand der entwickelten Methode,

- Untersuchung der Sorptionsaffinität von Tetracyclinen und Sulfadiazin gegenüber Böden und ausgewählten Modellpartikeln,
- Untersuchung des Einflusses von Metallkationen auf das Sorptionsverhalten von Tetracyclinen,
- Identifizierung und Quantifizierung von Chlortetracyclin und Sulfadiazin in Boden- und Sickerwasserproben aus Lysimeterversuchen, um das Transportverhalten und einen möglichen Eintrag ins Grundwasser abschätzen zu können,
- Entwicklung einer Fluoreszenz-basierten Methode zur Bestimmung von partikelgebundenen Tetracyclinen,
- Methodische Vorarbeiten zur Überprüfung der Möglichkeit eines Fluoreszenzscreenings für Tetracycline in Böden.

Detailliertere Angaben zu den Zielen und Aufgabenstellungen der einzelnen Teilbereiche werden in den entsprechenden Kapiteln gegeben.

3 Grundlagen - Stand der Forschung -

3.1 Antimikrobielle Wirkstoffe in Veterinärmedizin und Tierproduktion

3.1.1 Verwendungspraxis in der Tierproduktion

Die Einsatzgebiete antimikrobieller Wirkstoffe in der Veterinärmedizin und der Tierproduktion lassen sich bezüglich ihres Anwendungszweckes in vier Bereiche unterteilen: Therapie, Prophylaxe, Metaphylaxe und Leistungsförderung [52,53].

Antimikrobielle Wirkstoffe dienen bei ihrer *therapeutischen Anwendung* einer gezielten Behandlung bestehender Infektionskrankheiten, welche durch Bakterien bedingt sind [77].

Bei der *prophylaktischen Anwendung* erfolgt eine Antibiotikagabe aus medizinisch notwendigen Gründen im Rahmen einer Einzeltier- oder Tiergruppenbehandlung, ohne dass irgendwelche klinischen Symptome einer bakteriellen Infektion vorliegen. So werden Antibiotika bei einer Einzeltierbehandlung z.B. perioperativ oder bei bevorstehenden Geburten („Trockenstellen“ von Milchkühen vor dem Abkalben) verabreicht. Ein Einsatz von Antibiotika bei ganzen Tiergruppen findet in Form der „Einstallprophylaxe“ im Rahmen der Tiermast (z.B. Schweine, Rinder) statt, wo nach dem Zusammenstellen von Ferkeln und Kälbern aus mehreren kleineren Zuchtbeständen in einen großen Mastbestand die gesamte Tiergruppe antimikrobiell behandelt wird [77].

Eine *metaphylaktische Anwendung* von Antibiotika erfolgt im Unterschied zur prophylaktischen Anwendung an ganzen Tiergruppen, bei denen bereits einzelne Tiere des Bestandes Krankheitssymptome zeigen und eine Ausbreitung der Erkrankung in Kürze zu erwarten ist. Durch die Applikation von Antibiotika an alle Tiere des Bestandes sollen sowohl mögliche nachfolgende Tierverluste vermindert, als auch die zu einem späteren Zeitpunkt erforderliche Antibiotikamenge und die damit verbundenen Kosten für die Behandlung einer großen Zahl klinisch erkrankter Tiere reduziert werden [52,53,77].

3.1.2 Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen als Futtermittelzusatzstoff

In der Tierproduktion werden weltweit verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe als *Leistungsförderer* eingesetzt. Für eine Anwendung von antibiotischen Substanzen zur Leistungsförderung bestehen im Gegensatz zu Therapie, Prophylaxe und Metaphylaxe keine medizinisch notwendigen Gründe. Das Ziel des Einsatzes dieser Stoffe als Leistungsförderer besteht darin, beim Tier die Nährstoffaufnahme in Pansen oder Darm zu optimieren, beispielsweise um in der Schweinemast den Futterverbrauch pro Kilogramm Gewichtszuwachs zu senken. Leistungsförderer mit antibakterieller Wirkung werden ebenso wie Kokzidiostatika als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt [54].

Trotz ihrer pharmakologischen Wirkung fallen antibiotische Leistungsförderer nicht unter das Arzneimittelgesetz (§1 Abs. 3 Satz 5 AMG), sondern sind ausschließlich im Futtermittelrecht geregelt (§ 2 FMG) [55]. Sie bedürfen innerhalb der EU, wie alle anderen Futtermittelzusatzstoffe auch, der Zulassung gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung, welche die bis dahin gültige Zusatzstoffrichtlinie 70/524/EWG ablöste [56,57].

Da viele der als Leistungsförderer verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe auch als Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, wurden aufgrund der sich daraus ergebenden Resistenzproblematik (siehe Kapitel 2.2.2) immer mehr Wirkstoffe für diese Anwendung verboten: Als erste Wirkstoffgruppe bereits 1974 in der EU die Tetracycline [58], welche aber z.B. in den USA immer noch verwendet werden [59]. 1996 erfolgte ein Verbot für Avoparcin als Futtermittelzusatzstoff für die Bundesrepublik Deutschland [60], welches 1997 auf die ganze Europäische Union ausgeweitet wurde [61]. Mit der Verordnung (EG) Nr.2821/98 folgte das Verbot für die Wirkstoffe Zink-Bacitracin, Virginiamycin, Tylosin und Spiramycin [62], woraufhin nach einer Studie der FEDESA der Verbrauch an Leistungsförderern (bezogen auf das Jahr 1997) bis 1999 um 50% zurückging [63]. Bis 2006 waren noch die antimikrobiellen Wirkstoffe Monensin-Natrium, Salinomycin-Natrium, Flavophospholipol und Avilamycin zur Verwendung als Leistungsförderer zugelassen. Durch die Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 gilt seit dem 1/2006 innerhalb der EU ein generelles Verbot für die Verwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen als Leistungsförderer. Als Futtermittelzusatzstoffe sind „Antibiotika“ zum Einsatz als Kokzidiostatika oder Histomonostatika weiterhin erlaubt [56]. Kokzidiostatika und Histomonostatika sind Stoffe, die zur Abtötung oder Wachstumshemmung von Protozoen dienen. Kokzidien sind einzellige Parasiten aus der Gruppe der Protozoen, die zu schweren Darmerkrankungen und hohem (Tier-)Verlustrisiko führen können. Besonders in der Geflügelhaltung stellen Kokzidien ein Problem dar, und in der Kaninchenhaltung gehört die Kokzidiose zu den bedeutendsten parasitären Erkrankungen [64].

Von den ehemals als Leistungsförderer zugelassenen antimikrobiellen Wirkstoffen sind Monensin-Natrium und Salinomycin-Natrium als Kokzidiostatika und damit als Futtermittelzusatzstoffe weiterhin erlaubt bzw. neu zugelassen worden. Der Einsatz von Monensin-Natrium als Futtermittelzusatzstoff ist nach der aktuellen Gesetzeslage innerhalb der EU bei Geflügel zulässig [65,66], ebenso wie die Verwendung von Salinomycin-Natrium bei Geflügel [67-73] und Kaninchen [70,74]. Sulfonamide werden zwar ebenfalls gegen Kokzidien eingesetzt, sind aber nicht als Futtermittelzusatzstoffe zugelassen [354]. Antibiotisch wirksame Futtermittelzusatzstoffe (nach FMG) wie Kokzidiostatika sind von Gesetzes wegen von Fütterungsarzneimitteln (nach AMG) zu unterscheiden [355].

Fütterungsarzneimittel müssen aufgrund der unterschiedlichen Gesetzeszugehörigkeit, im Gegensatz zu den Futtermittelzusatzstoffen, von einem Tierarzt verschrieben werden, wodurch ihre Verwendung einer zusätzlichen Kontrolle unterliegt.

3.1.3 Antibiotikaverbrauch in der Landwirtschaft

Da es bezüglich der Produktion oder des Verbrauchs von Veterinärantibiotika in Deutschland und der Europäischen Union keine Dokumentationspflicht gibt, sind Angaben hierüber nur für einzelne Jahre in einigen Studien zu finden.

Für das Jahr 1997 veröffentlichte die FEDESA (Federation Européenne de la Santé Animale) Daten über das europaweite Verkaufsvolumen (EU und Schweiz) von Antibiotika (Abb. 1) [75,76,77 (korrigierte Daten, ursprünglich Humanmedizin: 5400 t)]. Danach wurden insgesamt 12752 t Antibiotika eingesetzt, davon entfielen 7659 t (60%) auf den humanmedizinischen Einsatz, 3494 t (27%) auf die veterinärmedizinische Verwendung und 1599 t (13%) auf den Einsatz als Leistungsförderer (Futtermittelzusatzstoffe).

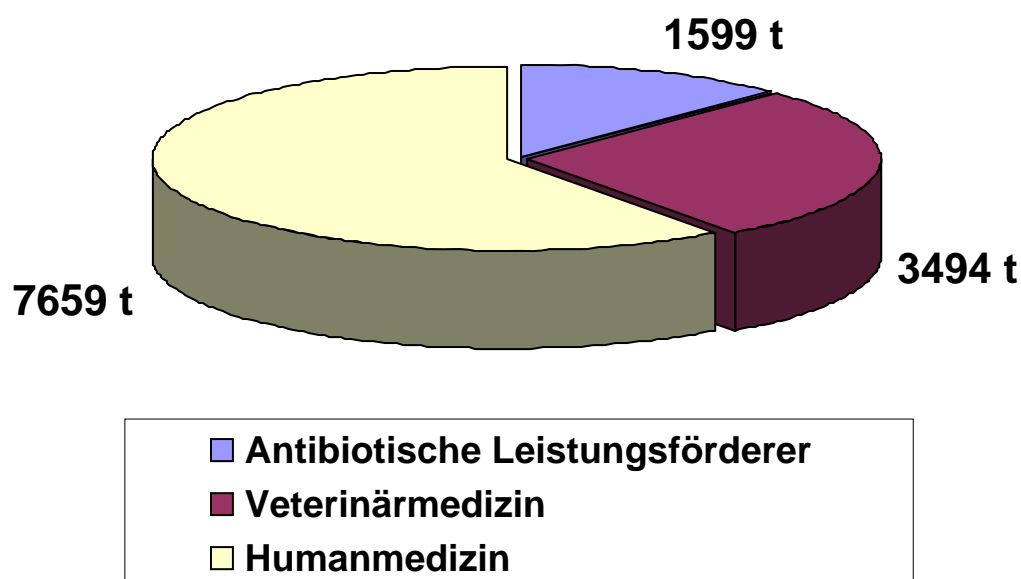


Abb. 1: Verbrauchsmenge von Antibiotika in der EU (inkl. Schweiz) im Jahre 1997 (in Tonnen), FEDESA [75]

Der mit Abstand größte Anteil von den in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika entfällt auf die Tetracycline. Im Bereich der europäischen Union (inkl. Schweiz) betrug im Jahre 1997 der Anteil der Tetracycline mit 2294 t 66% der Gesamtumsatzmenge für veterinärmedizinische Antibiotika (Abb. 2) [75-77].

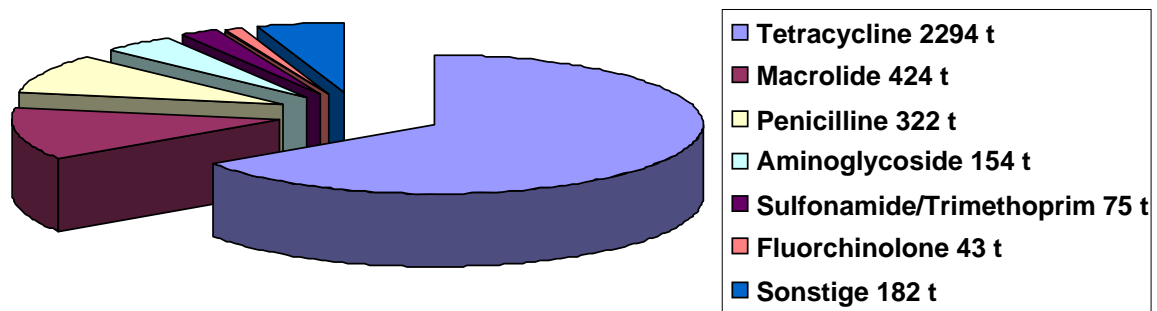


Abb. 2: Verbrauchsmengen der EU-weit in der Tiermedizin eingesetzten Wirkstoffgruppen im Jahre 1997 (in Tonnen), FEDESA [75]

Die Einsatzmengen an Veterinärantibiotika für die Bundesrepublik Deutschland, welche auf einer Schätzung der Verbrauchsmengen des Veterinärpanels der Gesellschaft für Konsumforschung (GfK) in Nürnberg beruhen, beliefen sich für 2003 auf 724,2 t und für 2005 auf 784,4 t [78]. Insgesamt nahm der Verbrauch von Veterinärantibiotika dabei von 2003 auf 2005 um 8,3% (60,2 t) zu (Tab. 1).

Eine deutliche Änderung ergab sich dabei für die Tetracycline, dessen Verbrauchsmenge um 9,2% (35,5 t) abnahm. Dennoch blieben im Jahr 2005 die Tetracycline mit einem Anteil von 44,6% am Gesamtantibiotikaverbrauch die in der Veterinärmedizin mengenmäßig am stärksten eingesetzte Antibiotikaklasse. Der Rückgang bei den Tetracyclinen korrelierte dabei mit dem Auslaufen von Zulassungen von mehreren oralen Tetracyclin-Präparaten im Niedrigpreissegment. Mit 44 t nahm demgegenüber der Verbrauch an β -Lactamen im gleichen Zeitraum stark zu, was wahrscheinlich auf den Preisverfall bei den Amoxicillinen zurückzuführen ist [78].

Tab. 1: Verbrauchsmengen an Veterinärantibiotika in Deutschland [78]

	2003	2005	Veränderungen 2003-2005
	t	t	%
Antibiotika gesamt	724,2	784,4	+8,3
Aminoglycoside	27,3	36,3	+33,0
β -Lactame	155,2	199,2	+28,4
Chinolone	3,5	3,7	+5,7
Lincosamide	7,5	12,1	+61,3
Makrolide	38,6	52,6	+36,3
Phenicole	4,7	4,8	+2,1
Pleuromutiline	6,8	6,4	-5,9
Polypeptide	23,4	21,8	-6,8
Sulfonamide	71,7	97,5	+36,0
Tetracycline	385,5	350,0	-9,2

Winckler und Grafe ermittelten anhand einer Datenbasis aus dem Jahr 1997 für die Gruppe der Tetracycline mit 39,832 t einen ca. 52%igen Anteil an der Gesamtmenge der in sechs Landkreisen der niedersächsischen Weser-Ems-Region abgesetzten Veterinärarzneimittel, wovon wiederum Chlortetracyclin mit 24,130 t (ca. 33% der Gesamtmenge) den größten Anteil ausmachte [79]. Für das Land Brandenburg betrug der Anteil von Tetracyclinen nach Linke und Gratz 1998/1999 etwa 50% [80].

Nach Erhebungen der FEDESA lagen im Jahr 1997 die Sulfonamide bei einem relativen Gesamtverkaufsvolumen von 2,1 % (75 t, inkl. Trimethoprim) innerhalb der europäischen Union (EU) [75]. In wie weit die Erhebungen der FEDESA den wirklichen Verbrauch an Sulfonamiden innerhalb der Europäischen Union widerspiegeln ist fraglich, da aus anderen Quellen ermittelte Verkaufszahlen auf einen deutlich höheren Verbrauch zu schließen ist. Allein in sechs Landkreisen der niedersächsischen Weser-Ems-Region sind 1997 nach Winkler und Grafe ca. 14 t Sulfonamide verwendet worden, was einem Anteil von 19% (inkl. Trimethoprim 2%) der dort abgesetzten Veterinärarzneimittel entspricht [79]. Nach Thiele-Bruhn [81] wurden 2000 allein für Großbritannien 98 t (Anteil: 22%) Sulfonamide verwendet. Die relativen Verbrauchsmengen für Frankreich, Schweden, Dänemark, Schweiz und Großbritannien liegen nach dieser Quelle zwischen 11 und 23%.

3.2 Antibiotikaresistenzen und Verbrauchergefährdung

3.2.1 Resistenzentwicklung

Wenn die native Population einer Spezies von Bakterien unempfindlich gegenüber einem oder mehreren Antibiotika ist, spricht man von natürlicher (synonym: intrinsischer) Resistenz oder auch primärer Resistenz. Diese Spezies liegen dann außerhalb des Wirkungsspektrums dieser Antibiotika [181].

Bei erworbenen (synonym: extrinsischen) Resistenzen oder auch sekundären Resistenzen sind einzelne Stämme von ursprünglich gegenüber einem oder mehreren Antibiotika empfindlichen Bakterien gegen dieses bzw. diese antibiotischen Wirkstoffe unempfindlich geworden. Die sekundäre Resistenz entsteht aufgrund der Behandlung mit einem Antibiotikum, worauf es infolge eines Selektionsdruckes auf die Bakterienspezies durch spontane Mutation zur Resistenzbildung kommt, oder sie wird durch horizontalen Gentransfer erworben [181].

Kreuz- und Ko-Resistenz

Unter Kreuzresistenz wird die gleichzeitige Unempfindlichkeit einer Bakterienspezies gegen zwei oder mehr Antibiotika der gleichen Wirkstofffamilie, also gegen strukturell eng verwandte Substanzen, verstanden, welche nach der Definition von Shah auf einem gemeinsamen Resistenzmechanismus basieren [182].

So wird u.a. durch den Einsatz des Glykopeptid-Antibiotikums Avoparcin, welches 1997 europaweit zur Anwendung als Leistungsförderer verboten wurde [61], eine Vancomycinresistenz bei Enterokokken induziert [158,183]. Eine vollständige Kreuzresistenz besteht z.B. zwischen den strukturell sehr ähnlichen klassischen Tetracyclinen (Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin) [7,122,149,184].

Treten bei einzelnen Bakterienspezies gleichzeitig Resistenzen gegenüber Antibiotika aus verschiedenen Wirkstofffamilien auf, wird dies als Ko-Resistenz bezeichnet. Im Allgemeinen bilden Resistenzgene, welche gemeinsam auf der gleichen mobilen genetischen Gruppe (Transposons, Plasmide) gelegen sind, die Grundlage der Ko-Resistenz [185,186]. So ermittelten z.B. Deflaun und Levy bei *Pseudomonas spp.* ein Plasmid, das die Resistenzinformationen gegen drei unterschiedliche Antibiotika (Spectinomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol) trägt [187].

Einen Sonderfall der Ko-Resistenz stellen „Multidrug-Transporter“ dar. Efflux-Pumpen sind in der Lage, unterschiedliche Stoffe wie Antibiotika (z. B. Chloramphenicol, Tetracycline, Fluorchinolone, Trimethoprim, Fosfomycin), Chemotherapeutika, Antiseptika, Detergentien, Schwermetalle oder kationische Farbstoffe aus der Bakterienzelle auszuschleusen [188,189].

Resistenzstrategien von Bakterien am Beispiel der Tetracycline

Tetracycline besitzen eine sehr hohe Affinität zum ribosomalen Protein S7 der 30S-Untereinheit prokaryontischer Ribosomen. Durch die reversible Bindung von Tetracyclinen in diesem Bereich des Ribosoms wird die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA und damit die Proteinbiosynthese gehemmt [190,191].

Für die Resistenzbildung wurden unterschiedliche bakterielle Strategien identifiziert, welche einer antibiotischen Wirkung von Tetracyclinen entgegenwirken [190]:

- (1) Schutz der Ribosomen als Angriffsort der Tetracycline
- (2) Reduzierung der intrazellulären Tetracyclinkonzentration
- (3) Inaktivierung des Antibiotikums durch modifizierte Enzyme

Im Jahr 2005 waren 38 Tetracyclin-Resistenzgene bekannt, wovon 11 der Strategie (1), 23 der Strategie (2) und 3 der Strategie (3) zuzuordnen sind. Ein Resistenzgen konnte keiner der aufgeführten Strategien zugeordnet werden [192].

3.2.2 Resistenzproblematik

Antibiotika sind die wichtigsten Medikamente zur Therapie bakterieller Infektionen. Ihre Wirksamkeit ist heute und in Zukunft durch das zunehmende Vorkommen resistenter und multiresistenter Erreger stark gefährdet [150, 356, 357]. Durch den Einsatz antimikrobieller Substanzen in Human- und Veterinärmedizin wird ein hoher Selektionsdruck und die Möglichkeit zur Bildung von Resistenzreservoirs in therapierten Individuen generiert [151]. So wird für die weite Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien und der daraus resultierenden Problematik der seit ca. 60 Jahren bestehende Einsatz von Antibiotika zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken verantwortlich gemacht [152].

Der übermäßige Antibiotika-Einsatz führt dazu, dass immer mehr Bakterienstämme, die bei Mensch und Tieren zu Infektionen führen, gegen Antibiotika resistent sind. Das könnte im schlimmsten Fall dazu führen, dass gegen bestimmte Stämme kein Antibiotikum mehr wirkt und Infektionen nicht mehr effektiv behandelbar sind. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken gibt es zwei Möglichkeiten:

Zum einen die Entwicklung und Einführung neuer antibiotischer Substanzen [150], was jedoch in den letzten Jahren kaum noch geschehen ist [153], und zum anderen die Umsetzung von Maßnahmen und Strategien, um die Verbreitung von Resistenzen zu minimieren [150], welche auch bei neu zugelassenen Antibiotika anzuwenden wären.

Resistente Mikroorganismen entstehen immer dort, wo antibiotische Wirkstoffe in großen Mengen eingesetzt werden und die Bakterien somit einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind [154-158]. Der Vorgang der Entstehung von Resistenzen ist dabei sowohl von der Konzentration der Antibiotika, als auch von der Dauer der Einwirkung auf die Mikroorganismen abhängig [159,160]. Der wichtigste Faktor bei der Entstehung, Selektion und Verbreitung resistenter Mikroorganismen ist somit der Einsatz von antibiotischen Substanzen [158,161]. Es werden dadurch nicht nur resistente pathogene Keime sondern auch antibiotikaresistente Stämme der Standortflora selektiert [162,163], welche ihrerseits Resistenzeigenschaften an andere Bakterienspezies weitergeben können. Von Relevanz ist zudem, dass auch subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen zur Entstehung und Selektion von Resistenzen beitragen [358,359].

Seit der Entdeckung des Penicillins sind zahlreiche antibiotisch wirksame Substanzen entwickelt und als Antibiotika auf den Arzneimittelmarkt eingeführt worden. Nach unterschiedlich langer Zeit des Einsatzes sind aber gegen jeden dieser Wirkstoffe Resistenzentwicklungen bekannt geworden. Selbst gegen Linezolid, eine Substanz aus der Stoffgruppe der Oxazolidinone, die seit mehreren Jahrzehnten die erste neue Gruppe von Antibiotika darstellte, wurde nach kurzer Zeit die Entstehung von Resistenzen beobachtet [164,165]. Die Einschätzung, dass eine Resistenzentwicklung gegen diesen Wirkstoff, welcher sehr früh den Prozess der Proteinbiosynthese von Bakterien stört, äußerst unwahrscheinlich ist, wurde damit widerlegt.

Allgemein kann beobachtet werden, dass die Zunahme der gegenüber einem Antibiotikum resistenten Bakterien eng mit den Einsatzmengen dieser Substanz korreliert und die Resistenzraten nach Verminderung des Einsatzes wieder zurückgehen können [166-169]. Die Selektion, Anreicherung und Ausbreitung von resistenten Bakterien erfolgt dabei generell umso schneller, je öfter ein Antibiotikum in einer Region eingesetzt wird [170]. Im Unterschied dazu erfolgt ein Rückgang der Resistenzhäufigkeit sehr viel langsamer als die Resistenzentstehung [171].

Häufig werden in der Veterinärmedizin Bestandsbehandlungen durchgeführt, wobei den Tieren die Antibiotika mit dem Trinkwasser oder dem Futter verabreicht werden. Diese Praxis führt zu einer Verabreichung subtherapeutischer Dosen, häufig über lange Zeiträume, und somit zu einem hohen Selektionsdruck auf die Mikroorganismen [157,173-176].

Eine Verwendung gleicher Antibiotikaklassen in human- und veterinärmedizinischen Bereichen [177,178] trägt zusätzlich zu der Resistenzproblematik für humanmedizinische Antibiotika bei, da die Gefahr zur Bildung von Kreuzresistenzen besteht [179]. So wurden in vielen Untersuchungen die Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen dem Selektionsdruck durch deren veterinärmedizinische Verwendung zugeschrieben [155,166,173]. Die Verwendung von Avoparcin in der Tiermast wird mit dem Auftreten von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Verbindung gebracht [360]. Shea et al. berichten über eine Zunahme der Tetracyclin-Resistenz von ca. 10% auf 90% bei Bakterien nach einem Anwendungszeitraum von 2 Wochen, welche von Oxytetracyclin medikamentiertem Geflügel stammen. Innerhalb von 6 Monaten nahm dabei auch die Tetracyclin-Resistenzrate bei den von Farmbewohnern stammenden Bakterien signifikant zu [175].

Antibiotika, die sowohl human- als auch in der veterinärmedizinischen Verwendung finden, sind u.a. Aminoglykoside, Cephalosporine, Chloramphenicol, Fluorchinolone, Lincosamide, Makrolide, Nitrofurane, Nitroimidazole, Penicilline, Polimyxine, Spectinomycin, Sulfonamide, Tetracycline und Trimethoprim [180].

Der Eintrag von resistenten Bakterien und Antibiotika mit Wirtschaftsdüngern (z.B. Gülle) in den Boden landwirtschaftlicher Nutzflächen führt zu einer weiteren Verbreitung von

Resistenzen [361]. Nach Schmitt et al. scheint diesbezüglich der Eintrag von resistenten Bakterien oder Resistenzgenen mit der Gülle wichtiger zu sein als der Eintrag von Antibiotikarückständen und einer damit verbundenen Resistenzentwicklung im Boden [362]. Dantas et al. legen nahe, dass Bodenbakterien einen unbeachteten Resistenzpool darstellen, welcher zur Entstehung höherer Level multi-resistenter pathogener Bakterien beitragen kann [363].

3.2.3 Verbraucherschutz

Um das Gefährdungspotential für den Menschen durch die in der landwirtschaftlichen Tierhaltung eingesetzten Antibiotika abschätzen zu können, ist es notwendig, die verschiedenen Möglichkeiten der Beeinflussung und Interaktion zwischen Mensch, Tier und Umwelt zu berücksichtigen [7]. Das größte Risiko für den Menschen geht dabei von resistenten Mikroorganismen aus. Zum einen kann es infolge der Aufnahme von Antibiotikarückständen beim Menschen zu einer Resistenzbildung kommen, zum anderen besteht die Möglichkeit einer direkten Übertragung resistenter Mikroorganismen.

Generell birgt jeder Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen das Risiko einer Resistenzselektion in sich [193,194]. Das Resistenzrisiko steigt dabei besonders bei ungezieltem Einsatz, niedriger Dosierung und längerer Anwendungsdauer [194,364]. Ungemach führt als begünstigende Faktoren für die Resistenzentwicklung die Dosishöhe, die Anzahl der behandelten Individuen, die Behandlungsdauer und die Art des verwendeten Wirkstoffs an [76]. Als wichtige Faktoren, die zur Selektion und Ausbreitung resistenter Bakterien im Tier führen, ergeben sich damit:

- subtherapeutische Dosierung
- subinhibitorische Konzentration im Zielgewebe der Tiere (Infektionsort)
- Massenmedikation
- lang anhaltende Behandlung
- Einsatz von Antibiotika mit breitem Wirkspektrum bzw. ihrer Kombinationen
- prophylaktischer und metaphylaktischer Einsatz
- Einsatz als Leistungsförderer

Lebensmittelüberwachung - Höchstmenge

Prinzipiell ist eine Aufnahme von Antibiotikarückständen über Nahrungsmittel tierischer und pflanzlicher Herkunft möglich. Tierische Nahrungsmittel wurden dabei schon vor längerer Zeit als potentielle Quelle der Einnahme von Antibiotikarückständen in Betracht gezogen

[195]. Nicht nur die von den Tieren stammenden Fleischprodukte können Antibiotikarückstände enthalten, sondern auch tierische Produkte wie Milch und Eier. Zurhelle konnte z.B. bei mit Tetracyclinen medikamentierten Legehennen Tetracyclinrückstände in den Eiern nachweisen [114].

Neben der Antibiotika-Belastung der Lebensmittel an sich, spielt auch die Temperatur der Verarbeitung bzw. Zubereitung von Lebensmitteln in Bezug auf die Höhe der aufgenommen Rückstandsmengen eine Rolle, da Antibiotikarückstände bei ungenügender Erhitzung im Fleisch erhalten bleiben [7]. Nach Kühne et al. bleiben z.B. noch 50% der Antibiotika (Tetracycline in Knochen- und Fleischmehl) nach Erhitzung bei 133 °C über einen Zeitraum von 45 min erhalten, gleichzeitig nehmen die Gehalte an Abbauprodukten zu, die toxischer sein können als der Ausgangswirkstoff, wie z.B. Anhydro-Tetracycline [196].

Durch die Aufnahme von Lebensmitteln, die mit Antibiotikarückständen belastet sind, besteht die Gefahr der Resistenzbildung und somit ein Risiko für den Verbraucher. So stellten Großklaus et al. nach dem Verzehr penicillinhaltiger Milch bei sensibilisierten Personen eine plasmidbedingte Resistenzbildung fest [197].

Zum Schutz der Verbraucher ist es die Aufgabe des Gesetzgebers und der für die Lebensmittelüberwachung zuständigen Behörden zu gewährleisten, dass Lebensmittel keine gesundheitsbeeinträchtigenden Rückstandskonzentrationen enthalten [7,57,198].

Rückstände sind nach § 4 des Fleischhygienegesetzes (FIHG) und Artikel 2 Richtlinie 96/23/EG wie folgt definiert: „Rückstand: Rückstand von pharmakologisch wirkenden Stoffen und deren Umwandlungsprodukten sowie von anderen Stoffen, die auf tierische Erzeugnisse übergehen und für den Menschen gesundheitsschädlich sein können“ [199,200].

Die Höchstmengen (Maximum Residue Limits = MRL) für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs, sofern eine Höchstmenge im Interesse des Schutzes der öffentlichen Gesundheit notwendig ist, werden im Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 festgesetzt [195]. Die MRL-Werte dienen zum einen als Beurteilungsgrenze im Rahmen der chemisch-analytischen Untersuchung und Rückstandskontrolle von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Zum anderen werden in den Zulassungsverfahren für Tierarzneimittel auf Basis der MRL-Werte „Wartezeiten“ festgelegt, d.h. diejenige Zeitspanne in der nach Behandlung eines Tieres keine Lebensmittel von diesem Tier gewonnen werden dürfen.

3.2.4 Risiken durch den Antibiotikaeintrag in Böden

Aufgrund des Eintrages von Antibiotikarückständen in Umweltkompartimente bestehen neben Nahrungsmitteln tierischer Herkunft weitere Aufnahme- und damit Gefährdungsquellen für den Menschen.

Da die in der Tiermast verabreichten Antibiotika über Urin und Faeces wieder ausgeschieden werden, gelangen die Wirkstoffe und deren Metabolite in den Wirtschaftsdünger Gülle. Durch den Austrag von Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Felder ist so eine Belastung von aquatischen und terrestrischen Kompartimenten möglich. Ob Antibiotika-Rückstände, wie z.B. Tetracyclin-Rückstände, im Boden bioverfügbar sind und durch Nutzpflanzen aufgenommen werden können, war bis vor wenigen Jahren noch unbekannt. Die Aufnahme von Antibiotika (Chlortetracyclin, Sulfadiazin) über die Wurzel von Winterweizen und Feldsalat wurde von Grote et al. erst kürzlich nachgewiesen. Die Pflanzen wurden in dieser Untersuchung auf Felder (Freilandbedingungen) angebaut, welche zuvor mit belasteter Gülle gedüngt worden waren [96,201]. Kumar et al. berichteten von der Aufnahme von Chlortetracyclin durch Mais, Kohl und Zwiebeln in einer Gewächshausstudie [202]. In Screeninguntersuchungen an Getreide, das aus viehstarken Gebieten stammte, wurden von Freitag et al. ebenfalls Tetracyclin-Rückstände nachgewiesen [203].

Diese Ergebnisse belegen eine Bioverfügbarkeit von Antibiotikarückständen im Boden und folglich einen Kontaminationspfad für Nutzpflanzen. Letztendlich besteht dadurch die Möglichkeit eines Eintrags von Antibiotika in die Nahrungskette und somit ein potentiell Verzeherrisiko. Eine gesicherte Risikoabschätzung ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, da erst wenige Untersuchungsergebnisse vorliegen.

Neben der potentiellen Verbrauchergefährdung durch Resistenzentstehungen bestehen zudem Risiken durch die Antibiotikarückstände selbst. In erster Linie ist hier das Risiko einer Auslösung von Allergien zu nennen [204]. Durch eine dauerhafte Aufnahme von Tetracyclinspuren sind z.B. Allergien, Lichtdermatosen, Schwindel, Gleichgewichtsstörungen und die Unwirksamkeit oraler Kontrazeptiva möglich [7].

Das Verhalten der verschiedenen Antibiotika in der Umwelt ist höchst komplex und hängt von zahlreichen Faktoren ab, was die Einschätzung eines Gefährdungspotentials durch die einzelnen Antibiotika in der Umwelt erschwert. So spielen z.B. bei der Verlagerung im Boden u.a. der vorherrschende pH-Wert, Regenereignisse und die Bodenzusammensetzung eine Rolle. Zudem sind Vorkommen, Ausbreitung und Abbau der in die Umwelt eingebrachten Antibiotika von deren chemo-physikalischen Eigenschaften abhängig [172] und damit für die verschiedenen Antibiotika unterschiedlich. So wurde bei einigen der bisher untersuchten antibiotischen Wirkstoffe eine biologische Abbaubarkeit bzw. Photodegradation beobachtet, andere Antibiotika scheinen demgegenüber wiederum schwer abbaubar zu sein [205,206]. Schwer abbaubare Antibiotika sind z.B. Tetracyclin, Sulfamethoxazol, Amoxicillin, Cefotiam und Ciproflaxin [7, 205].

Alexy et al. untersuchten die biologische Abbaubarkeit von 18 verschiedenen Antibiotika (u.a. Tetracyclin, Chlortetracyclin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim) im geschlossenen Flaschentest (nach OECD 301 D) und konnten keines der Antibiotika als leicht biologisch abbaubar klassifizieren [207]. Von diesen Antibiotika geht damit die Gefahr einer Akkumulation in der aquatischen und terrestrischen Umwelt aus. In Anbetracht der hohen Verbrauchszahlen (Kap. 3.1.3) besteht daher ein potentielles Gefährdungsrisiko für den Menschen.

3.2.5 Gefährdungspotential resistenter Mikroorganismen

Eine Übertragung von resistenten Mikroorganismen aus der Landwirtschaft auf den Menschen ist über eine Vielzahl von Wegen möglich. Mögliche Übertragungswege sind kontaminierte Lebensmittel tierischer Herkunft, der Kontakt mit Nutztieren, der luftgetragene Transport von Stäuben aus landwirtschaftlichen Betrieben, sowie infolge von Gülleausbringung und Umwelteintrag belastetes Trinkwasser und pflanzliche Nahrungsmittel [172,208,209, 361].

Die Übertragung resistenter Bakterien der tierischen Flora auf den Menschen wurde in vielen Studien belegt. Eine Aufnahmemöglichkeit von resistenten Mikroorganismen besteht hierbei neben den tierischen Lebensmitteln [156,210-218] auch durch direkten Tierkontakt [156, 216-220]. Insbesondere rohes Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse und Rohmilch können von Tieren stammende resistente Bakterien enthalten [151,221], welche nach oraler Aufnahme die Magendarmpassage überleben können und im Stuhl der Konsumenten nachweisbar bleiben [222,223]. Die Gefährdung des Verbrauchers durch Aufnahme resistenter Bakterien liegt dabei in der Schwierigkeit der Therapierbarkeit der durch ihnen direkt ausgelösten Infektionen und der Resistenzübertragung an Bakterien der Standortflora oder andere humanpathogene Bakterien [156,177,213,224]. So berichteten z.B. Teuber et al. über die Resistenzübertragung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) aus Fleisch- und Käseprodukten, was durch deren genetischer Übereinstimmung mit klinischen Isolaten gezeigt wurde [217].

Ein Risiko für den Menschen geht insbesondere von Infektionen mit multiresistenten Erregern, wie z.B. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), aus. MRSA bzw. ORSA (Oxacillin-resistente *Staphylococcus aureus*) stellt bei Nosokomialinfektionen weltweit ein besonderes Problem dar [356,357]. MRSA wird in *hospital acquired MRSA* (ha-MRSA) und *community acquired MRSA* (ca-MRSA) unterschieden, wobei ha-MRSA auf in Krankenhäuser erworbene klononale Linien von MRSA zurückzuführen ist [527]. Die Daten mehrerer niederländischer Untersuchungen legen einen Zusammenhang zwischen

Antibiotikaeinsatz und des damit verbundenen Auftretens von Resistenzen in der Tiermast (z.B. Schweinemast) mit der Folge einer erhöhten Gefährdung für Kontaktpersonen der Tiere (z.B. Masttierzüchter, Schlachter) bezüglich einer Infektion mit ca-MRSA nahe [365-368]. Zudem können MRSA-Stämme auch gegenüber weiteren Antibiotikagruppen, wie z.B. Tetracycline, Glykopeptide (z.B. Vancomycin) und/oder β -Lactame resistent sein, was eine Therapierbarkeit erkrankter Personen erschwert und zu steigender Mortalität führt [369]. Die Anzahl der durch ca-MRSA (ca-ORSA) verursachten Infektionen nimmt zu und wird mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität ansonsten gesunder Individuen assoziiert [356]. Allein in den USA sterben jährlich mehr als 18.000 Menschen durch MRSA-Infektionen und damit mehr als durch AIDS [370]. Welchen Anteil ca-MRSA daran besitzt bleibt offen, aber unter der Berücksichtigung, dass 25 - 39% Prozent amerikanischer Schweine MRSA tragen, ist von einem ernsthaften Risiko für den Menschen auszugehen. In einer kanadischen Untersuchung betrug MRSA bei Schweinen ca. 25% und bei Schweinezüchtern 20% [371]. In den Niederlanden wurden MRSA-Raten von 39% bei Schweinen und >20% bei Schweinezüchtern ermittelt [366, 372]. Ein Risiko, sich mit MRSA infizieren zu können, besteht neben dem Tierkontakt auch durch Lebensmittel tierischen Ursprungs, da in Lebensmitteln wie Fleisch, Milch und Käse ebenfalls MRSA nachgewiesen werden konnte [370, 372-375]. Kluytmans et al. beschrieben die Übertragung von MRSA durch kontaminierte Lebensmittel [376]. In diesem Fall wurden die Lebensmittel zwar durch einen mit MRSA-infizierten Menschen kontaminiert, es zeigt aber die grundsätzliche Möglichkeit einer Übertragung durch kontaminierte Lebensmittel.

Einen zusammenfassenden Überblick über den aktuellen (Daten-)Stand der Resistenzverbreitung in Human- und Veterinärmedizin in Deutschland liefert der Resistenzatlas GERMAP 2008 [357].

Da resistente Bakterien tierischer Herkunft über Wirtschaftsdünger auf Anbauflächen für Gemüse oder Getreide gelangen, ist auf diese Weise eine Kontamination pflanzlicher Lebensmittel möglich [151,225,226]. Wie hoch die in Wirtschaftsdünger eingetragenen Resistenzraten von Bakterien mitunter sein können, zeigen die Untersuchungen von Lim et al. anhand von *Escherichia coli* -Stämmen, welche aus den Stuhlproben koreanischer Nutztiere isoliert worden sind. Während die Tetracyclin-Resistenz der aus Rinderkot isolierten *E.coli*-Stämme bei 30,5% (102 von 334) lag, ermittelten sie dagegen bei den aus Kot von Schweinen isolierten Stämmen eine Tetracyclin-Resistenz von 96,3% (395 von 410) [227].

Der Eintragungspfad über Wirtschaftsdünger ist insofern von Bedeutung, da der Verzehr von unbehandelten pflanzlichen Nahrungsmitteln generell als Quelle von Infektionskrankheiten in Frage kommt [225,228,229] und somit auf diesem Wege ebenso eine Aufnahme von

resistenten Bakterien durch den Genuss roher und unbehandelter Lebensmittel wie Gemüse, Salat oder Obst möglich ist. In Untersuchungen von Boehme et al. an 20 verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln (Gemüse), welche auf Wochenmärkten und in Supermärkten gekauft wurden, betrug die Resistenzrate bei den isolierten Bakterienstämmen z.B. gegenüber Tetracyclin 43% [230].

Auch in aquatischen Systemen konnte ein Vorkommen resistenter Bakterien mehrfach nachgewiesen werden [231-233]. Zum einen werden Antibiotikarückstände und resistente Mikroorganismen aus anderen Umweltbereichen wie z.B. der Landwirtschaft eingetragen, zum anderen kommt es durch den Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen zur Resistenzbildung. In entwickelten Ländern ist eine Aufnahme von resistenten Bakterien aufgrund der Wasseraufbereitung über das Trinkwasser unwahrscheinlich. Dagegen ist eine Aufnahme von resistenten Bakterien über nicht aufbereitetes Wasser aus Seen und Flüssen möglich [151].

Eine Resistenzbildung ist nicht allein auf die Entstehungsorte Mensch und Tier beschränkt. Es besteht zudem die Möglichkeit der Resistenzentstehung und –ausbreitung in den verschiedenen Umweltkompartimenten allein durch den Selektionsdruck, den Antibiotikarückstände auf die jeweiligen Bakterienpopulationen ausüben. In der Literatur wird beispielsweise die Möglichkeit einer *in situ*-Resistenzentwicklung in aquatischen Systemen beschrieben [172]. Nach Chander et al. sind auch fest an Bodenpartikel adsorbierte Tetracycline noch biologisch aktiv und können damit die Selektion Antibiotika-resistenter Bakterien in der Umwelt beeinflussen [234].

Der Eintrag von resistenten Mikroorganismen aus der Tiermast in die Umwelt kommt als ein Hauptfaktor der Resistenzverbreitung zusätzlich hinzu. Aus Tests an Boden-, Abwasser und Gülleproben konnten nach Smalla mobile genetische Elemente isoliert werden, die in der Lage sind, nicht-selbsttransferable DNA zu übertragen [185]. Diese genmobilisierende Aktivität war dabei unter Feldbedingungen im begüllten aber nicht im unbegüllten Boden nachweisbar. Nach Smalla konnten übertragbare Resistenzgene gegen Streptomycin, Gentamycin und Tetracyclin in Boden, Rhizosphäre (Wurzelbereich von Pflanzen), Belebtschlamm, Gülle und Meerwasserproben nachgewiesen werden [185]. Untersuchungen von Pote et al. zeigten, dass ein Transport von biologisch aktiver DNA, welche in der Lage ist, Resistenzen auf Bakterien zu übertragen, im wassergesättigten Boden und Grundwasser über beachtliche Distanzen möglich ist [235].

Aufgrund der dargestellten Komplexität und der vielfältigen Risikofaktoren für den Verbraucher, kann heute noch keine gesicherte Risikoanalyse über die Auswirkungen des veterinärmedizinischen und landwirtschaftlichen Einsatzes von Antibiotika und der damit

verbundenen Resistenzbildung beim Menschen gemacht werden. Der Erkenntnisstand hat sich in den letzten Jahren zwar punktuell vertieft, aber viele Zusammenhänge sind immer noch im Unklaren oder nicht eindeutig nachgewiesen. Das gilt sowohl für die Resistenzentstehung und -Verbreitung durch Antibiotika-Rückstände in der Umwelt, als auch für Vorkommen und Verbreitungspfade von Antibiotika in den verschiedenen Umweltkompartimenten.

3.3 Tetracycline und Sulfonamide

3.3.1 Tetracycline

Benjamin Mingo Duggar entdeckte 1947 in den Lederle Laboratories (Pearl River, USA) eine von *Streptomyces aureofaciens* (Strahlenpilz, Bodenbakterie) erzeugte antibiotische Substanz, die er Aureomycin nannte. Diese Substanz ist heute unter der Bezeichnung Chlortetracyclin bekannt [108]. In den darauf folgenden Jahren wurden Oxytetracyclin (1949) und Tetracyclin (1953) entdeckt. Durch chemische Modifikationen der klassischen Tetracycline, welche ihre pharmakologischen Eigenschaften verbessern, wurden verschiedene Tetracyclinderivate wie Rolitetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin entwickelt [7].

Tetracyclin wurde zunächst partialsynthetisch durch katalytische Hydrierung von Chlortetracyclin hergestellt. 1968 gelang Muxfeldt die Synthese von Tetracyclin. 1973 veröffentlichten Muxfeldt et al. die Totalsynthese von Anhydro-Chlortetracyclin. Die Herstellung von Tetracyclinen durch Totalsynthesen konnte sich aber aufgrund des vergleichsmäßig hohen Aufwandes in der Industrie nicht durchsetzen. Daher werden die meisten Tetracyclinderivate partialsynthetisch aus den fermentativ gewonnenen Tetracyclinen erzeugt [7,109,110].

Das Wirkspektrum der bakteriostatisch wirkenden Tetracycline umfasst den größten Teil der grampositiven und –negativen Bakterien, sowie Mykobakterien, Mykoplasmen, Chlamydien, Rickettsien und große Viren [377].

Physikalische und chemische Eigenschaften

Tetracycline sind gelbe, geruchlose und lichtempfindliche Verbindungen, welche im kristallinen Zustand stabil sind. Sie sind starke Komplexbildner (Chelatbildung mit mehrwertigen Metallkationen) und besitzen eine hohe Affinität zu Silanolgruppen [59,378].

Die chemische Grundstruktur der Tetracycline besteht aus vier linear kondensierten Sechseringen, wobei sich die verschiedenen Derivate lediglich in ihren Substituenten unterscheiden (Tab. 2).

Tab. 2: Struktur von Tetracyclin-Wirkstoffen [7,121,133]

Substanz	Abkürzung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tetracyclin	TC	H	OH	CH ₃	H
Oxytetracyclin	OTC	H	OH	CH ₃	OH
Chlortetracyclin	CTC	Cl	OH	CH ₃	H
Doxycyclin	DC	H	H	CH ₃	OH
Rolitetracyclin	RTC	H	OH	CH ₃	
Minocyclin	MC	N(CH ₃) ₂	H	H	H

Tetracycline besitzen charakteristische UV-Spektren, welche allerdings pH-Wert abhängig sind. Der A-Chromophor (s. Tab. 2) absorbiert bei 260 nm. Der BCD-Chromophor besitzt Absorptionsmaxima bei 225, 285, 320 und 360 nm [108,111].

Bei Anhydrotetracyclinen ist die Absorptionsintensität im Wellenlängenbereich von 320-380 nm, aufgrund der durch die Dehydratation hervorgerufenen Veränderung des BCD-Ringsystems, jedoch deutlich vermindert. Da die Absorptionsprofile der Anhydrotetracycline von den gewählten Bedingungen abhängig sind, erfolgt eine Quantifizierung mittels UV-Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen [112-115].

Durch alkalische Behandlung werden viele Tetracycline in iso-Tetracycline umgewandelt. Die Umwandlung geht dabei mit einer pH-abhängigen Änderung der UV-Absorption bei 320-380 nm einher. Nur im alkalischen Milieu besitzen die iso-Tetracycline eine UV-Absorption im

Bereich 320-380 nm [116,117]. Die natürliche Fluoreszenz der Tetracycline wird durch die Isomerisierung deutlich verstärkt, was zur analytischen Bestimmung der Tetracycline ausgenutzt werden kann [118-120].

Tetracycline bilden mit Säuren und Basen in Wasser lösliche, stabile Salze. Sowohl die freien Basen, als auch die Hydrochloride sind in Alkoholen gut löslich. In anderen organischen Lösungsmitteln sind sie hingegen weniger gut löslich [108,111,122]. In wässriger Lösung (innerhalb des physiologischen pH-Bereichs) besitzen die freien Basen der Tetracycline mit ca. 1mg/ml lediglich eine geringe Löslichkeit [108,111,121]. Die Wasserlöslichkeit der Tetracyclin-Hydrochloride ist hingegen größer, so geben Sattelberger et al. für Tetracyclin-Hydrochlorid eine Löslichkeit von 50-100 mg/ml in wässriger Lösung an [4].

Während die Tetracycline, insbesondere deren Hydrochloride, im festen Zustand stabil sind, verlieren sie in wässrigen Lösungen schnell einen Teil oder ihre gesamte antibiotische Wirksamkeit. Für die einzelnen Tetracycline ist die Stabilität in wässriger Lösung sehr unterschiedlich und wird zudem durch verschiedene Faktoren wie z.B. Temperatur und pH-Wert beeinflusst. So sind TC und OTC im sauren bis neutralen pH-Bereich deutlich stabiler als CTC. Im alkalischen Medium zeigt OTC die höchste Stabilität, während CTC besonders alkaliempfindlich ist und zum iso-CTC isomerisiert [7,123-126].

Tetracycline besitzen durch ihre sauren Gruppen und den basischen Dimethylamino-Restes einen amphoteren Charakter. Für Tetracycline sind vier Säurekonstanten bekannt. Sie reagieren aufgrund der OH-Gruppe an Position C-3 als Säuren mit einem pK_{a1} -Wert von 3,3 [121,127]. An der OH-Gruppe der vinylogenen Carbonsäurestruktur (pK_{a2} -Wert = 7,6) an Position C-12 erfolgt eine zweite Deprotonierung. Die basischen Eigenschaften der Tetracycline beruhen auf dem Dimethylamino-Rest an Position C-4. Der dritte pK_{a3} -Wert von 9,7 wird dabei dem protonierten Stickstoffatom des Restes zugeordnet [128,129], ein vierter pK_{a4} -Wert von 12 wird nach Duarte et al. der phenolischen OH-Gruppe an Position C-10 zugeordnet [130].

Tetracycline können in Abhängigkeit von den Substituenten, der Koordinierung von Metall-Ionen und dem Lösungsmittel, insbesondere dem pH-Wert des Lösungsmittels, in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Tetracyclin nimmt dabei in sauren und neutralen Melieu eine „twisted“ Konformation an, bei der die protonierte Dimethylaminogruppe aus sterischen Gründen oberhalb des BCD-Ringsystems liegt. Im basischen Medium oder in nichtwässrigen Lösungsmitteln verschiebt sich das Gleichgewicht zu einer „extended“ Konformation, wobei die Dimethylaminogruppe unterhalb des planaren BCD-Ringsystems liegt [131]. Die Konformation der Tetracycline hat möglicherweise einen Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften [128,132].

Umwandlungs- und Abbaureaktionen

In Abhängigkeit vom Lösungsmittel, von der Temperatur, der Lichteinstrahlung und insbesondere vom pH-Wert kommt es bei den verschiedenen Tetracyclinen (in Lösung) zu einer Vielzahl von Umwandlungs- und Abbaureaktionen. Die verschiedenen Tetracycline zeigen dabei jedoch deutliche Unterschiede in der Art und der Geschwindigkeit dieser Reaktionen [108,122].

Unter Umwandlungsreaktionen werden in dieser Arbeit Reaktionen verstanden, die zu einer Konfigurationsänderung bei gleich bleibender Summenformel führen. Der Begriff der Isomerisierung wird auf die alkalische Umwandlung der Tetracycline in ihre iso-Form verwendet. Bei den verschiedenen Umwandlungsreaktionen wird dabei in Isomerisierung, Epimerisierung und Keto-Enol-Tautomerie unterschieden. Die verschiedenen Tetracycline können zudem einer Dehydratation unterliegen. Die Dehydratation wird dabei aufgrund der Veränderung der Summenformel als eine Abbaureaktion angesehen.

Epimerisierung

Tetracycline unterliegen in schwach saurer Lösung (pH 2 - 6) einer Konfigurationsänderung am asymmetrischen C-Atom in Position 4 (Abb. 3).

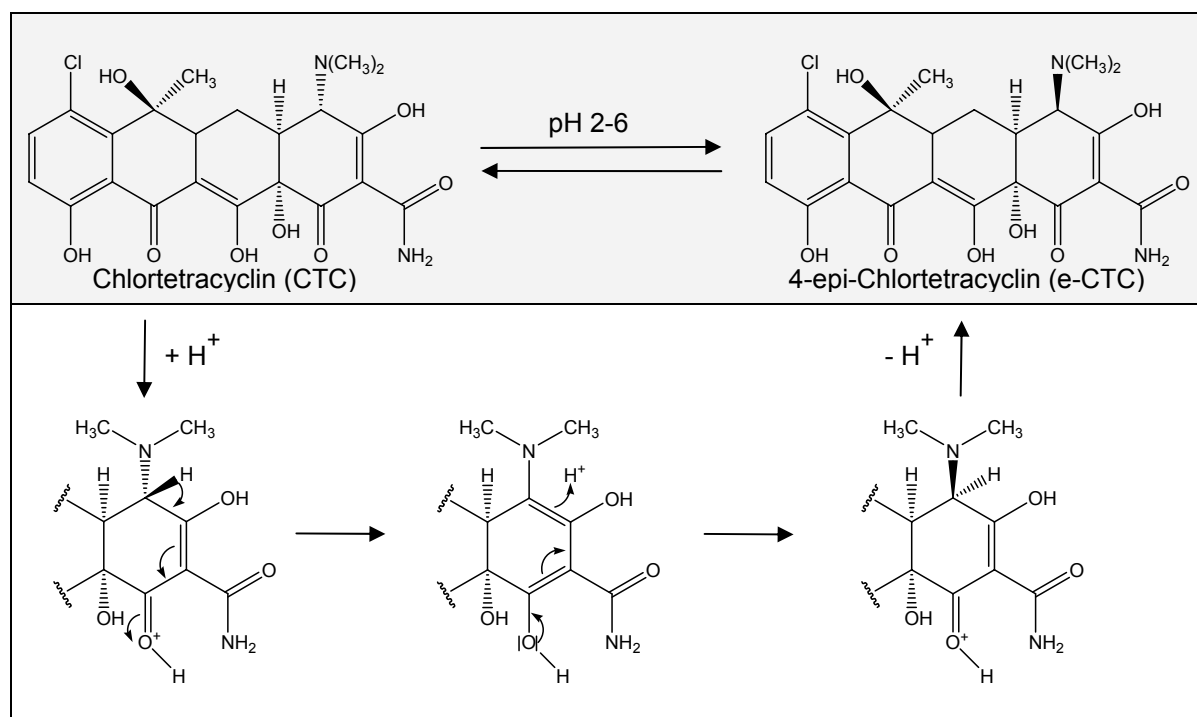


Abb. 3: Epimerisierung von Chlortetracyclin in schwach saurer Lösung [7,118]

Diese Epimerisierung, welche nach einer Reaktion 1. Ordnung verläuft, ist reversibel und wird z.B. durch Harnstoff, Citrat, Phosphat oder mehrwertige Kationen katalysiert [111,116]. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Gleichgewichtslage der Epimerisierung sind im hohen

Maß vom pH-Wert abhängig. Die Geschwindigkeit der Epimerisierung nimmt mit steigendem pH-Wert zu, wobei sich je nach den gewählten Bedingungen das Gleichgewicht bei einem Epimerisierungsgrad von 40-68% einstellt. Unterhalb von pH 1,5 findet jedoch keine Epimerisierung mehr statt [134-136].

Im Vergleich zu ihren jeweiligen Muttersubstanzen besitzen die epimeren Tetracycline eine bessere Löslichkeit in den meisten Lösungsmitteln und eine erhöhte Stabilität gegenüber saurer oder alkalischer Einwirkung [108]. Eine Konfigurationsänderung wie z.B. bei den 4-Epi-Tetracyclinen wirkt sich zudem auf die antibiotische Aktivität aus. Die antibiotische Wirksamkeit der Epimere ist nach verschiedenen Autoren gegenüber der Muttersubstanz um 90-100% vermindert. Es ist dabei aber unklar, ob die Epimere überhaupt eine antibiotische Wirksamkeit besitzen oder da die Epimerisierung reversibel ist, die antibiotische Aktivität auch auf Rückepimerisierung zurückzuführen ist [7,134].

Isomerisierung

Bei Tetracyclinen mit einer Hydroxygruppe an Position C-6 führt eine alkalische Behandlung zum Aufbrechen des Ringes C zu den entsprechenden iso-Tetracyclinen (Abb. 4) [108,111,126]. TC und OTC isomerisieren oberhalb eines pH-wertes von 9-10, CTC hingegen ist besonders labil und isomerisiert schon ab pH 7 zum iso-CTC.

Analog zu den Tetracyclinen epimerisieren im schwach sauren Bereich (pH 2-6) auch die iso-Tetracycline zu 4-epi-iso-Tetracyclinen [137]. Im Gegensatz zur Epimerisierung ist die Isomerisierung der Tetracycline durch alkalische Behandlung eine irreversible Reaktion. Die in ihre iso-Form umgewandelten Tetracycline besitzen keine oder nur noch sehr geringe antibiotische Aktivität [7,117,138-140].

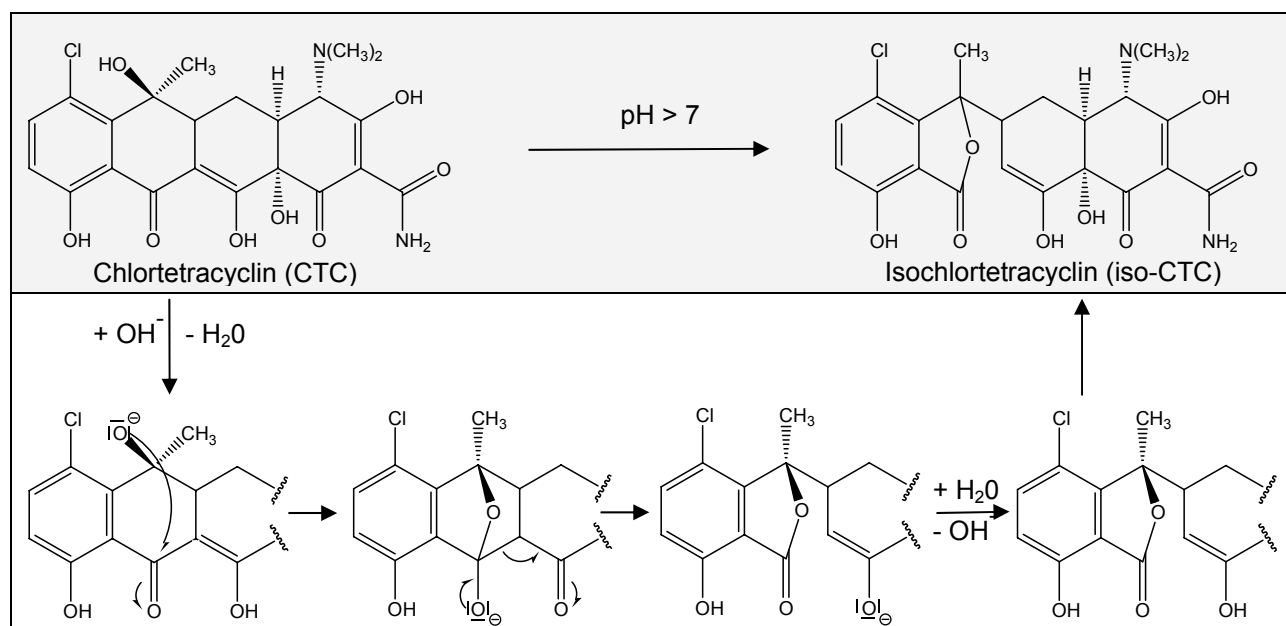


Abb. 4: Isomerisierung von Chlortetracyclin im alkalischen Milieu [7,118]

Keto-Enol-Tautomerie

Die unterschiedlichen Tetracycline können in Abhängigkeit von Polarität und pH-Wert des Lösungsmittels verschiedene tautomere Formen annehmen. Duarte et al. [130] beschreiben für vollständig protonierte Tetracycline neun verschiedene Tautomere. Die tatsächliche Struktur des Tetracyclins lässt sich hierbei als Gleichgewicht aus allen möglichen Keto-Enol-Tautomeren auffassen. In Abhängigkeit vom Dissoziationsgrad der Tetracycline sind unter Einbeziehung von vier den pK_a -Werten entsprechenden Protonierungs- und Deprotonierungszuständen 64 tautomere Formen möglich [7].

Die chromatographische Trennung von Tautomeren des CTC und DC ist erstmalig Naidong et al. an Polymerphasen gelungen. Mittels NMR konnte die Keto-Enol-Tautomerie im Bereich von Position C11, C11a und C12 nachgewiesen werden [141,142].

Das H-Atom an Position C11a kann durch Ausbildung der Ketoform cis- oder transständig zum H-Atom an Position C5a sein, woraus sich eine cis-Ketoform und eine trans-Ketoform ableiten lässt. Die Keto-Enol-Tautomerie (Abb. 5) kann grundsätzlich säuren- oder basenkatalysiert sein. Für CTC ist aufgrund seiner leichten Isomerisierung zum iso-CTC bei alkalischer Behandlung nur der säurekatalysierte Prozess von Bedeutung, da beim iso-CTC eine Tautomerie an Position C11, C11a und C12 nicht mehr möglich ist.

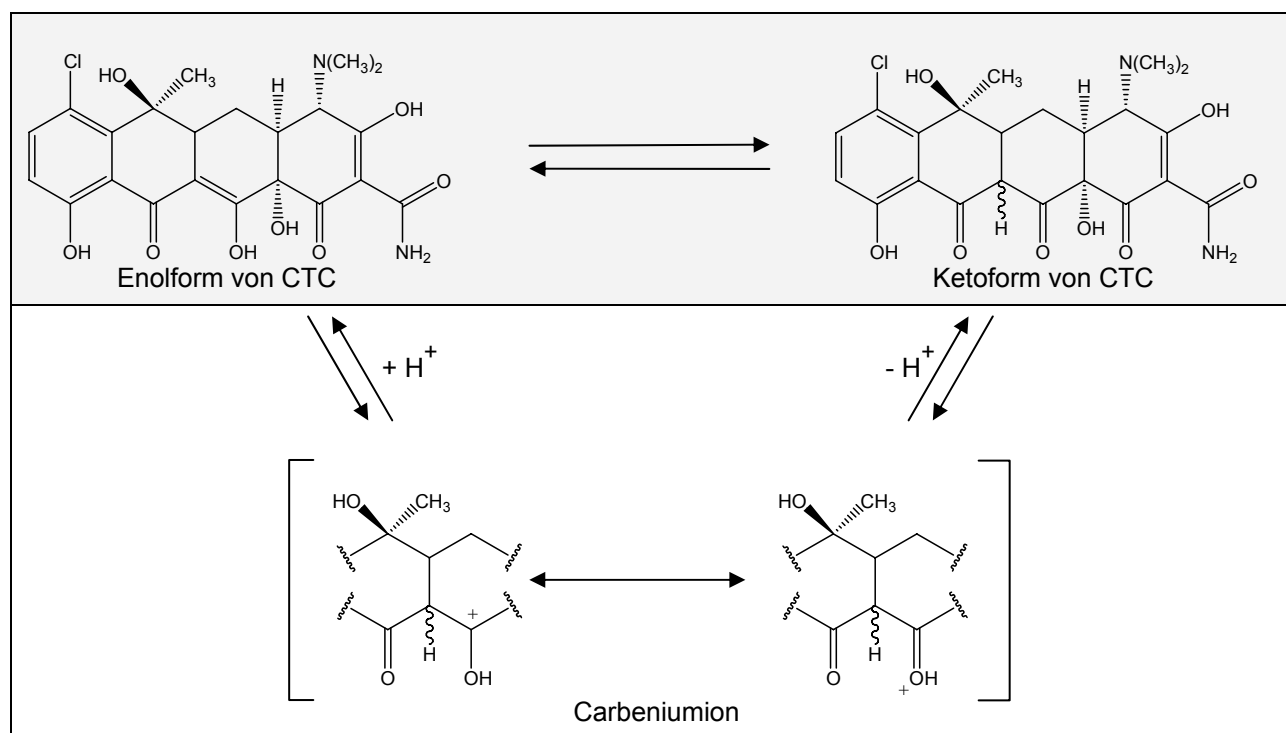


Abb. 5: Keto-Enol-Tautomerie von Chlortetracyclin [7,118]

Dehydratisierung

Als eine Abbaureaktion (Eliminierungsreaktion) ist bei den Tetracyclinen die Dehydratisierung von Bedeutung. Unterhalb von pH 1,5 spaltet sich bei Tetracyclinen mit einer Hydroxygruppe an Position C-6 (z.B. bei CTC) leicht Wasser ab, und es entstehen unter Aromatisierung vom Ring C die entsprechenden Anhydrotetracycline (Abb. 6).

Bei der Dehydratisierung handelt es sich um eine irreversible Reaktion 2. Ordnung. Die Eliminierung von Wasser wird hierbei durch die trans-Stellung der tertiären Hydroxylgruppe an Position C-6 zum H-Atom an C-5a ermöglicht [111,118,126]. Die Anhydrotetracycline unterliegen ebenfalls der Epimerisierung und der Keto-Enol-Tautomerie. Die Epimerisierung der Anhydrotetracycline verläuft dabei schneller und die Deydrierung der 4-epi-Tetracycline langsamer als die entsprechende Reaktion der unveränderten Tetracycline [126]. Die antibiotische Aktivität ist bei den Anhydrotetracyclinen um ca. 70% gegenüber ihren Ausgangsverbindungen reduziert und sie besitzen zudem deutlich toxischere Eigenschaften aufgrund dessen sie keine klinische Anwendung finden. Die Anwendung von Anhydrotetracyclinen ruft schwere Nebenwirkungen hervor, welche auf ihrer nicht selektiven Wirkung auf alle Zellmembranen, also auch auf die von eukaryontischen Zellen, beruht [112, 128]. Die toxischen Effekte von Anhydrotetracyclinen werden der relativen Position der Dimethylamino-Gruppe zugeschrieben [143].

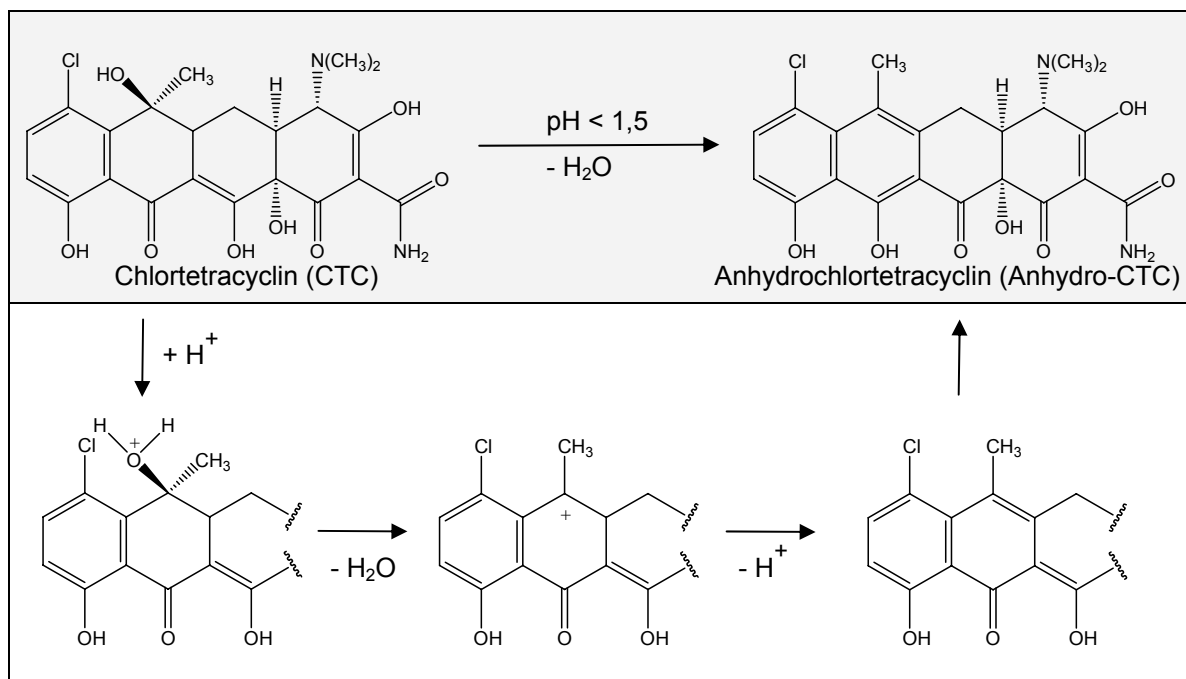


Abb. 6: Dehydratisierung von Chlortetracyclin in stark saurem Medium [7,118]

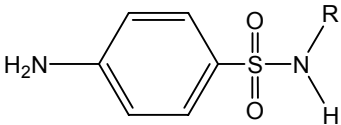
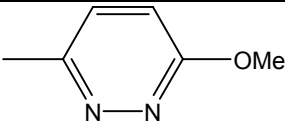
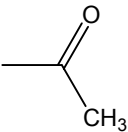
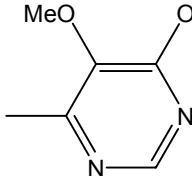
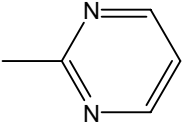
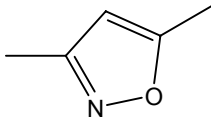
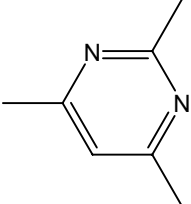
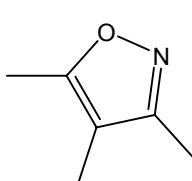
3.3.2 Sulfonamide

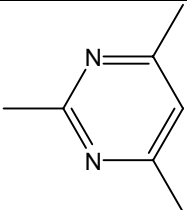
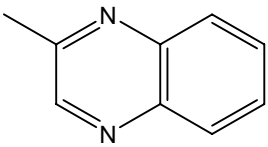
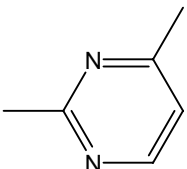
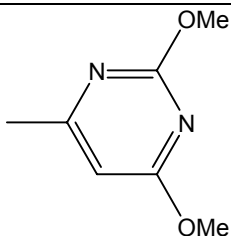
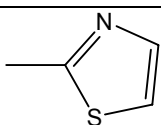
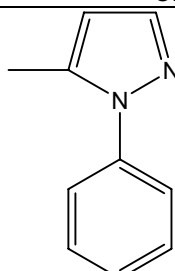
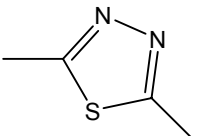
1932 wurde der Azofarbstoff Prontosil (Sulfamidochrysoidin) synthetisiert, welcher 1935 erstmals als Sulfanilamid therapeutisch eingesetzt wurde [144,145]. Das Sulfanilamid entstand dabei durch die Metabolisierung von Sulfamidochrysoidin durch den Organismus.

Auf der strukturellen Basis des Sulfanilamids (para-Aminobenzolsulfonamid) wurde in den nachfolgenden Jahren durch Variation der Substituenten eine große Vielzahl von Derivaten entwickelt (Tab. 3), welche sich in ihren pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften stark unterscheiden. Die größte Wirksamkeit konnte dabei durch Substitution mit Acylderivaten oder heterocyclischen Derivaten erzielt werden. Die Sulfonamide werden in der therapeutischen Anwendung häufig in Kombination mit anderen Antibiotika verwendet [144,146].

Sulfonamide wirken bakteriostatisch, da die kompetitive Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase durch das Sulfonamid zu einer Hemmung der Folsäuresynthese führt [147]. Sie besitzen eine Breitbandwirksamkeit gegenüber grampositiven und viele gramnegativen Bakterien, sowie gegen einige Protozoen (Kokzidien) [377].

Tab. 3: Struktur von Sulfonamid-Wirkstoffen [148]

Grundstruktur			
			
Name	Struktur R	Name	Struktur R
Sulfanilamid	—H	Sulfamethoxy-pyridazin	
Sulfacetanid		Sulfadoxin	
Sulfadiazin		Sulfamethoxazol	
Sulfisomidin		Sulfisoxazol	

Sulfamethazin		Sulfaquinoxalin	
Sulfamerazin		Sulfadimethoxin	
Sulfathiazol		Sulfaphenazol	
Sulfamethizol			

Sulfonamide sind in Wasser relativ schwerlöslich (7,5-1500 mg/l) und verhalten sich amphoter. Sie reagieren als schwache Säuren und bilden Salze in stark sauren oder basischen Lösungen. Für Sulfonamide sind zwei Säurekonstanten bekannt, welche bei $pK_{a1} = 2-3$ und $pK_{a2} = 4,5-10,6$ liegen (Sulfanilamid, Sulfadiazin, Sulfadimidin, Sulfadimethoxin, Sulfapyridin, Sulfamethoxazol). Der pK_{a1} wird der Protonierung der Aminogruppe und der pK_{a2} der Deprotonierung des $R_1SO_2NHR_2$ -Teils zugeordnet [81]. Sulfonamide können daher in Lösung abhängig vom pH-Wert als kationische, neutrale bzw. zwitterionische und/oder anionische Spezies vorliegen [379,380].

Die Sulfonamide werden in der Leber metabolisiert. Durch Acetylierung am primären N4-Anillinstickstoff bildet sich dabei als wichtiger Metabolit ein N4-Acetyl-Sulfonamid [145]. Wooley et al. ermittelten bei Ratten N4-Acetyl-Sulfadiazin (siehe Abb. 7) und N4-Glucuronid-Sulfadiazin als Hauptmetaboliten von Sulfadiazin [381].

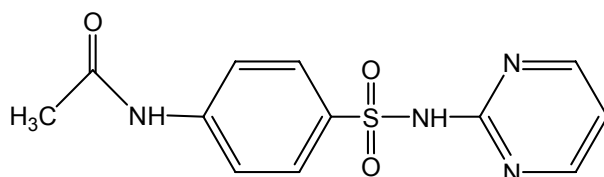


Abb. 7: N4-Acetyl-Sulfadiazin

2.3.3 Trimethoprim

In der Veterinärmedizin wird oft eine Kombination von Sulfonamiden mit Trimethoprim (TMP) eingesetzt, wodurch sich ihre Wirkstärke potenziert. Als Monopräparat fand Trimethoprim jedoch keine wesentliche Anwendung in der Veterinärmedizin.

Trimethoprim, als Vertreter der Antimetaboliten, unterdrückt bakterielle Reduktasen und führt zu einer zweistufigen Hemmung des Folsäuremetabolismus der Bakterien (Sequenzialeffekt) [146,149].

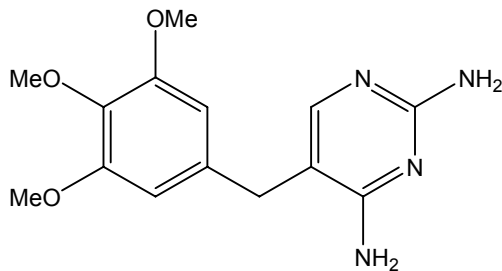


Abb. 8: Struktur von Trimethoprim

3.4 Arzneistoffe im Boden

In den letzten 10 Jahren wurden zahlreiche Human- und Veterinärarzneistoffe in Abwässern, Kläranlagenabflüssen, Oberflächengewässern, Wirtschaftsdüngern und Böden nachgewiesen [81,351]. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Eintrag und Vorkommen von Humanarzneimitteln in aquatischen und terrestrischen Umweltkompartimenten. Demgegenüber waren Tierarzneimittel, obwohl diese in erheblichen Umfang eingesetzt werden, selten Gegenstand von Untersuchungen. Aus diesem Grund liegen bis heute nur wenige Ergebnisse zu Vorkommen und Verhalten von Tierarzneistoffen in der Umwelt vor. Insbesondere bei den Verlagerungswegen/-mechanismen im Boden und dem damit verbundenen möglichen Eintrag von Tierarzneimittel ins Grundwasser ist der gegenwärtige Kenntnisstand unzureichend.

Neben den spezifischen physiko-chemischen Eigenschaften der einzelnen Arzneistoffe ist das Umweltverhalten von dem hoch komplexen System Boden sowie von verschiedenen Umwelteinflüssen abhängig. Daraus ergibt sich eine unüberschaubare Anzahl von Faktoren, welche das Umweltverhalten von Arzneistoffen beeinflussen. In den einzelnen Untersuchungen werden daher nur wenige Faktoren berücksichtigt und letztendlich sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen somit immer nur eingeschränkt untereinander vergleichbar. Zusätzlich kommt hinzu, dass bei den verschiedenen Untersuchungen in der Regel nur die aus dem jeweiligen Boden extrahierbaren Arzneimittelrückstände analytisch ermittelt werden können. Um das Verhalten dieser Umweltschadstoffe [382] im Boden und

deren Verbreitungstendenz verlässlich einschätzen zu können, sind gesicherte Daten über deren Vorkommen im Boden, Oberflächen- und Grundwasser nötig. Des Weiteren müssen die einzelnen Beeinflussungsfaktoren identifiziert und deren Einflussgröße auf das Verhalten der einzelnen Arzneistoffe im Boden ermittelt werden.

3.4.1 Verhalten von Schadstoffen (Arzneimittelrückständen) im Boden

Für das Verhalten von Arzneistoffen im Boden gelten grundsätzlich die gleichen Beeinflussungsfaktoren wie für andere Bodenschadstoffe. In wieweit ihr Verhalten untereinander vergleichbar ist, hängt u.a. vom Übereinstimmungsgrad ihrer physiko-chemischen Eigenschaften ab.

Die verschiedenen Schadstoffe können dabei vereinfacht in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- anorganische Stoffe (z.B. Schwermetalle, Metalloide und Radionuklide)
- organische Schadstoffe (z.B. Chlorkohlenwasserstoffe (CKW), Nitro- und Aminoaromaten, Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffen (PAK), Polychlorierte Biphenyle (PCB), Herbizide, Pestizide, Arzneistoffe)

Die Anzahl der möglichen Eintragspfade in Böden ist für die verschiedenen Schadstoffe vielfältig, daher wird nur auf die im Zusammenhang mit Arzneimittelleinträgen wichtigsten eingegangen.

Die Belastung von Böden mit den verschiedenen Schadstoffen ist abhängig von ihrer geographischen Lage (z.B. Nähe zur Schadstoffquelle) und Nutzung. Für Tierarzneimittel verläuft der wesentliche Eintragspfad, da der Hauptteil an Tierarzneimitteln in der Tiermast verwendet wird, über die Ausscheidungsprodukte der Tiere. Diese gelangen entweder direkt beim Weidegang der Tiere oder indirekt in Form von Gülle oder Festmist auf landwirtschaftliche Nutzflächen (Weide- oder Ackerflächen) [23,24,383].

Für Humanarzneimittel erfolgt dagegen der Haupteintrag über die menschlichen Ausscheidungen und den Abwasserpfad in die Oberflächengewässer. Die Eintragsmenge der einzelnen Arzneistoffe in die Oberflächengewässer wird dabei insbesondere durch den Grad der Elimination (Abbau, Sorption) in den Kläranlagen bestimmt [24]. Durch die Verwendung von Klärschlamm als Düngemittel ist ebenfalls –neben Gülle- ein Eintrag von Arzneistoffen in den Boden landwirtschaftlicher Nutzflächen (Ackerflächen) möglich.

Schadstoffe (z.B. Arzneistoffe) unterliegen dabei stark vernetzten Kreisläufen, in denen natürliche biogeochemische Vorgänge mit anthropogenen Materialflüssen gekoppelt sind (s. Abb. 9) [384].

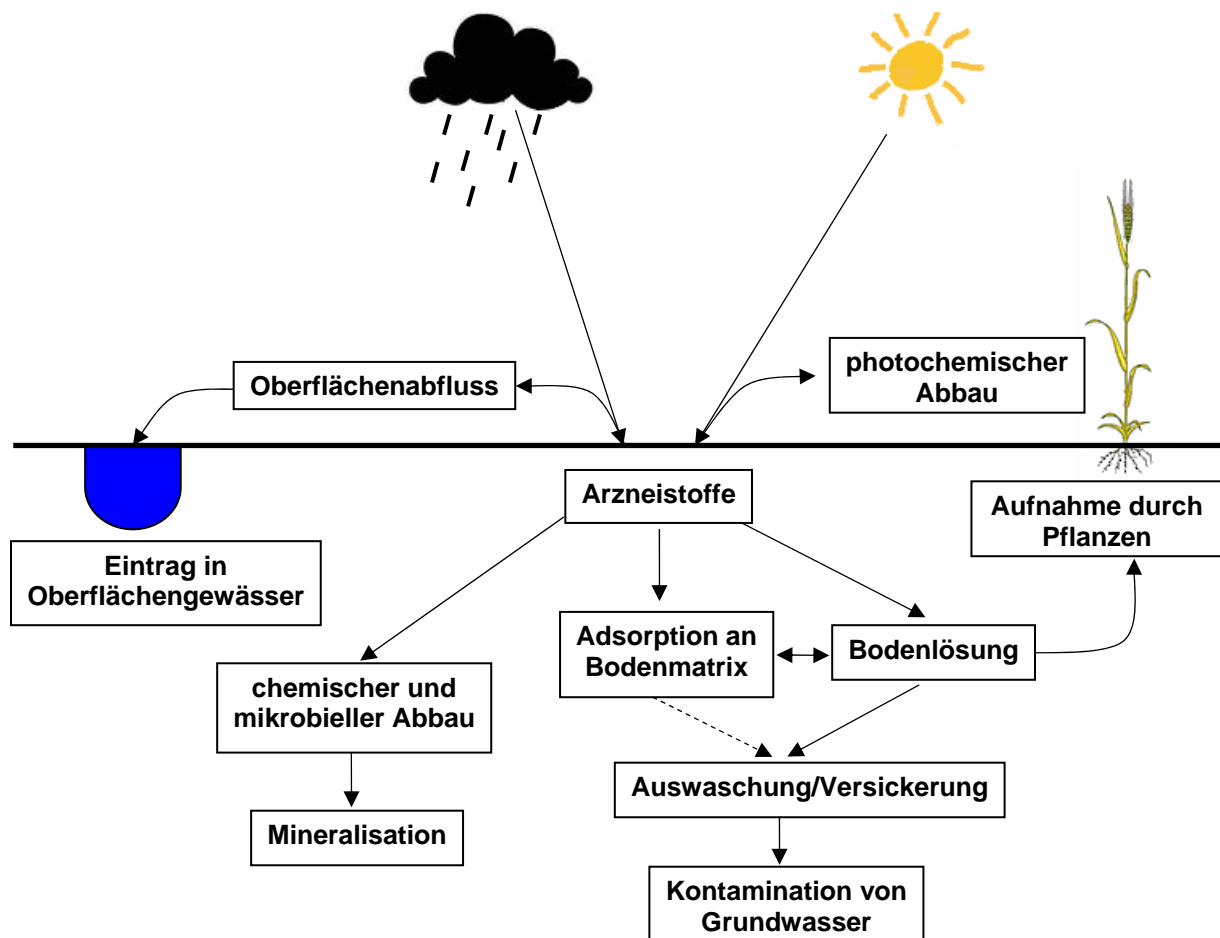


Abb. 9: Potentielles Verhalten in Böden eingetragener Arzneistoffe (geändert nach [384])

Die Verbreitung der Schadstoffe im Boden wird durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, durch Transportprozesse und biogeochemische Mechanismen bestimmt. Folgende Faktoren stehen dabei im Zusammenhang mit der Konzentration und der Verbreitung dieser Stoffe in der Umwelt [384]:

- Quellen, Eintragsmenge und –charakteristik
- physikalisch-chemische Stoffeigenschaften (molekulare Struktur, Dampfdruck, Hydro-/Lipophilie, Adsorptionsfähigkeit, Abbaubarkeit)
- physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften (Temperatur, pH-Wert, Sedimentationsrate, Nährstoffkreisläufe, Redox- und Mischungsverhältnisse)
- Transformationsprozesse (Photolyse, Hydrolyse, Redoxreaktionen und biotischer Abbau)

Allgemein gelten für alle auf den Boden gelangten organischen Schadstoffe der biochemische Abbau (Mineralisierung), die Sorption der Substanzen bzw. deren Abbauprodukte an Bodenbestandteile und der Verbleib in bioverfügbarer Form (Bodenlösung) als Abhängigkeitsfaktoren für deren Verbreitungsverhalten. Die Sorption an Bodenbestandteile beinhaltet dabei die beiden Prozesse der Anlagerung (Adsorption) an

Bodenpartikeln und der Aufnahme (Absorption) in (organische) Bestandteile des Bodens [385]. Eine isolierte Betrachtung einzelner Bodenbestandteile bezüglich ihres Sorptionsverhaltens gegenüber einzelnen Schadstoffen kann nicht grundsätzlich auf natürliche Böden übertragen werden, da Wechselwirkungen der verschiedenen Bodenbestandteile untereinander in der Lage sind, sich auf das Sorptionsverhalten auszuwirken. So können beispielsweise überwiegend hydrophobe Huminstoffe an mineralische Partikel wie Tonminerale adsorbieren und somit zu einer gesteigerten Hydrophobizität führen [386]. Neben den von Natur aus im Boden vorkommenden Huminstoffen wirken sich daher auch anthropogene Einflüsse in Form eines Eintrags huminstoffreicher Düngemittel wie Kompost oder Gülle auf die Hydrophobizität eines Bodens aus.

Eine Sorption an Bodenbestandteile kann z.B. über Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, hydrophobe Bindung, Wasserstoffbrückenbindung, kovalente Bindung, koordinative Bindung oder Ionenaustausch erfolgen [387]. Die auf physikalischen Kräften beruhenden Bindungstypen der Physisorption sind meist schwach und reversibel, demgegenüber sind die starken chemischen Bindungstypen der Chemisorption teilweise irreversibel. Für an der Bodenoberfläche befindliche Schadstoffe ist infolge von Sonneneinstrahlung ein photochemischer Abbau möglich. Durch eindringendes Regenwasser können die Bodenschadstoffe mit dem Sickerwasser in tiefere Bodenregionen transportiert werden und bis ins Grundwasser gelangen. Der Transport ist dabei auf zwei verschiedene Wege möglich. Ein Transport der Schadstoffe ist zum einen in gelöster Form und zum anderen in an Bodenpartikel sorbierter Form über den partikulären Transport (mobile Partikel oder Kolloide) im Boden möglich.

Durch Fällungsreaktionen (einschließlich Mitfällung) können gelöste Kontaminanten selbst Festphasen bilden oder Bestandteil dieser sein. Ein erneuter Übergang von zuvor gefällten oder sorbierten Stoffen durch Auflösungs- und Desorptionsvorgänge in die Bodenlösung ist infolge natürlicher oder anthropogener Umwelteinflüsse / Prozesse möglich.

In welcher Form ein Transport in tiefere Bodenschichten möglich ist, hängt zum einen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Schadstoffe und zum anderen von der jeweiligen Umwelt (Bodenzusammensetzung, Korngrößenverteilung, pH-Wert des Bodens, Redoxpotential u.a.) ab. Der Sorptionsprozess kann dabei für Schadstoffe, welche an der festen Bodenmatrix sorbiert werden, auch eine Retardation und damit eine zeitweise Immobilisierung beinhalten. Partikuläre Stoffe können dabei in Abhängigkeit der Filtereigenschaften des jeweiligen Bodens zurückgehalten werden. Die Stoffmenge, welche durch den Boden bis ins Grundwasser transportiert werden kann, ist von der Verweilzeit der Kontaminanten im Boden abhängig, welche durch die Verlagerungsgeschwindigkeit bestimmt wird [385].

Bei Starkregenfällen ist zudem eine teilweise Ausschwemmung der Schadstoffe mit dem Oberflächenwasser in angrenzende Gewässer (Entwässerungskanäle, Bäche, Flüsse, Seen) möglich, wo sie dann weiter abtransportiert oder in Sedimenten abgelagert werden. Über den Boden können verschiedene Schadstoffe, sofern sie in einer pflanzenverfügbaren Form vorliegen, zudem durch Pflanzen aufgenommen werden.

Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände und Sequestrierung

Untersuchungen aus Feldstudien und Bodensanierungsprojekten zeigen, dass Schadstoffe in Böden und Sedimenten länger persistieren als anhand ihres physikalischen und chemischen Verhaltens abgeschätzt werden kann [388,389]. Solche Beobachtungen, welche sich signifikant von den herkömmlichen Theorien zum Verhalten und Transport von Kontaminanten im Boden unterscheiden, deuten auf eine Fraktion von Schadstoffen im Boden hin, welche eine geringere Verfügbarkeit gegenüber mikrobiellem Abbau und chemischen Reaktionen besitzt [390]. Generell wird angenommen, dass adsorbierte Schadstoffe zuerst in eine wässrige Phase (Bodenwasser) desorbieren müssen, um gegenüber biologischem Abbau und chemischen Reaktionen zugänglich zu sein [390]. So gelten beispielsweise auch Antibiotika, welche durch Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix festgelegt (sequestriert) werden, als nicht mehr verfügbar [391]. Die Entstehung von gebundenen Rückständen „Bound Residues“ bzw. nicht-extrahierbaren Rückständen ist ein aus agrarwissenschaftlichen Untersuchungen bekanntes Phänomen [392]. Die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen ist ein generelles Phänomen, welches bei unterschiedlichen Kontaminanten wie z.B. PAK, Trinitrotoluol (TNT) und auch Substanzen aus der heterogenen Stoffgruppe der Pestizide auftritt. Wechselwirkungen zwischen Bodenmatrix und Schadstoffen, auf welche eine Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen beruhen kann, sind:

- sorptive Wechselwirkungen
- kovalente Bindungen
- physikalischer Einschluss (Sequestrierung, Entrapment)

Die einzelnen Bindungsprozesse unterscheiden sich dabei, sowohl hinsichtlich der benötigten Zeiträume als auch bezüglich des Chemismus, deutlich voneinander.

Unter „Sequestrierung“ sowie „Entrapment“ wird ein unspezifischer Bindungsmechanismus verstanden, welcher einen über die reine Adsorption hinausgehenden physikalischen Einschluss von Schadstoffen in Poren oder Hohlräumen von makromolekularen Huminstoffen darstellt [392]. Des Weiteren wird auch die langsame Diffusion von Schadstoffen in nicht-zugängliche Mikroporen der Bodenmatrix, in denen diese zurückgehalten werden, als Sequestrierung beschrieben [393]. Nach Förster et al. ist

Sequestrierung ein Mechanismus, welcher mit zunehmender Kontaktzeit mit dem Boden, zu einer abnehmenden bioverfügbaren Konzentration führt [394]. Der zugehörige Prozess, welcher die biphasische Abnahme der chemischen und biologischen Verfügbarkeit (organischer) Schadstoffe in Abhängigkeit von der Kontaktzeit mit dem Boden beinhaltet, wird als „Alterung“ bezeichnet [395]. Die Alterung führt zur Bildung von Schadstoffanteilen im Boden, welche gar nicht oder nur mit aggressiven Methoden extrahiert werden können.

Ein Nachweis von sequestrierten und kovalent gebundenen Rückständen kann durch Silylierung des Bodenmaterials erfolgen. Werden die Schadstoffe durch die Silylierung in gelöster Form freigesetzt, waren sie sequestriert. Demgegenüber erfolgt eine Freisetzung kovalent gebundener Schadstoffrückstände mit den an ihnen gebundenen Humuspolymer-Bruchstücken. Zur Unterscheidung von sequestrierten und kovalent gebundenen Rückständen müssen diese daher identifiziert (Molekulare Masse, Chromatographie) werden [392].

Begriffsdefinitionen von gebundenen Rückständen und nicht-extrahierbaren Rückständen

Um zwischen extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückständen zu differenzieren, muss zuvor definiert werden, was unter gebundenen sowie nicht-extrahierbaren Rückständen verstanden wird, da sich die Fraktion von nicht-extrahierbaren Rückständen immer auf das jeweilig angewendete Extraktionsverfahren bezieht. In der Umweltanalytik von Pestiziden (Pflanzenschutzmittel, Biozide) ist die Bildung von gebundenen Rückständen schon lange Zeit bekannt [392]. Viele der ursprünglichen Definitionen gehen daher auf diesen Bereich zurück. Im Laufe der Zeit wurden diese Definitionen mit der Entwicklung neuer Analyseverfahren und im Rahmen von Begriffs-Harmonisierungen für andere Stoffgruppen immer wieder geändert/modifiziert und allgemeiner gehalten. Gebundene Rückstände wurden 1975 auf einem Symposium der American Chemical Society wie folgt definiert:

„Ein **bodengebundener Rückstand** ist der nicht-extrahierbare und chemisch nicht-identifizierbare Wirkstoffrückstand, der in Fulvosäuren, Huminsäuren und Huminfraktionen nach intensiver sequentieller Extraktion mit nicht-polaren organischen und polaren Lösungsmitteln verbleibt“ (Übersetzung durch Eschenbach et al.: [392,396]).

Bereits 1982 wurde diese Definition durch Khan [397] novelliert, da es zwischenzeitlich gelungen war, einen Teil dieser nicht-extrahierbaren oder gebundenen Rückstände auf chemischem Wege zu identifizieren. Khan definiert und unterscheidet demgegenüber zwischen biologisch verfügbaren und biologisch nicht verfügbaren gebundenen Rückständen. Biologisch verfügbar sind dabei jene Rückstände, welche durch Pflanzen und/oder Bodentiere aufgenommen werden können.

In einem von der FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) koordinierten Forschungsprogramm wurde folgende Definition gegeben: „Nicht-extrahierbare

(oder gebundene) Rückstände von Xenobiotika werden als aus der Anwendung von Xenobiotika stammende chemische Spezies definiert, welche nicht durch gebräuchliche Methoden der Rückstandsanalytik und Metabolismusuntersuchung extrahiert werden können“ (Übersetzung aus dem Englischen aus: [398]).

Mit der IUPAC-Definition (International Union of Pure and Applied Chemistry) [399,400], welche den Begriff der nicht-extrahierbaren Rückstände von Pestiziden in Böden und Pflanzen definiert, wurde die Grundlage für spätere allgemeine Definitionen gelegt. In dieser (ersten) Definition wurde zudem darauf hingewiesen, dass anstelle des Begriffs der „nicht-extrahierbaren Rückstände“ manchmal auch die Begriffe „gebundene“ oder „nicht-extrahierte Rückstände“ verwendet werden. Bei den verwendeten Extraktionsprozeduren, wie z.B. Solvent-Extraktion oder Destillation, wird dabei vorausgesetzt, dass diese erschöpfend (exhaustiv) eingesetzt werden. Die IUPAC-Definition wurde z.B. in der Richtlinie 91/414/EWG [401] und in der schweizerischen Pflanzenschutzmittelverordnung [402] wörtlich bzw. sinngemäß übernommen. In der Richtlinie 91/414/EWG [401] heißt es:

„Unter **nicht extrahierbaren Rückständen** sind chemische Stoffe zu verstehen, die aus der Anwendung eines Pflanzenschutzmittels gemäß guter landwirtschaftlicher Praxis stammen und durch Verfahren, welche die chemische Natur dieser Rückstände nicht bedeutend verändern, nicht extrahiert werden können. Durch Stoffwechselprozesse entstandene Bruchstücke, die zu natürlichen Produkten führen, gelten nicht als nicht extrahierbare Rückstände.“

Die IUPAC-Kommission überarbeitete später diese Definition in Hinblick auf eine Definition für gebundene Rückstände von Xenobiotika in Nahrungsmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft [398]. Zum einen wurde berücksichtigt, dass beispielsweise Enzymsysteme durch eine Auflösung der umgebenen Matrix Xenobiotika freisetzen können und zum anderen, dass die Begriffe „nicht-extrahierbare“ und „gebundene Rückstände“ keine gänzlich synonyme (übereinstimmende) Bedeutung besitzen. Nach dieser Definition ist der „gebundene Rückstand“ eines Xenobiotikums ein Rückstand, welcher mit einer oder mehreren Klassen von endogenen Makromolekülen verbunden ist. Dieser Rückstand kann nicht vom natürlichen Makromolekül unter Verwendung einer vollständigen (exhaustiven) Extraktion oder Verdauung getrennt werden, ohne die Beschaffenheit (Struktur) des Xenobiotikums oder der damit verbundenen endogenen Makromoleküle wesentlich zu verändern. Wo die Rückstände nicht im vollen Umfang als „gebunden“ bestimmt werden können, sollen sie als „nicht-extrahierbar“ bezeichnet und das Extraktionsverfahren genannt werden. Die Bezeichnung eines Rückstandes als „gebunden“ soll dabei nur aus Untersuchungen mit radiomarkierten Stoffen abgeleitet werden.

Die überarbeitete IUPAC-Definition wurde z.B. vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) [403] und W. Bodenschatz [404] übernommen. Weiterhin wird in diesen Literaturstellen der Begriff „bioverfügbarer Rückstand“ definiert. Diese Definition lautet [403,404]:

„Ein **bioverfügbarer Rückstand**: z.B. ein Konjugat eines Wirkstoffes oder Metaboliten oder ein anderer gebundener Rückstand, der durch die im Magen vorhandene Säure gespalten werden kann, so dass Wirkstoff oder Metabolit freigesetzt und für den Organismus verfügbar werden.“

Unter Konjugate wird dabei verstanden:

„**Konjugate**: z.B. Verbindungen des Wirkstoffes oder von Metaboliten mit Zuckern/Kohlenhydraten, die in der Pflanze oder im Tier gebildet wurden und in der Regel extrahierbar sind (extrahierbare "gebundene" Rückstände).“

Modifizierte Definitionen auf Grundlage der überarbeiteten IUPAC-Definition, welche untereinander nahezu identisch sind, finden sich bei Führ et. al [404] und in der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 [406]. In der Verordnung (EG) Nr. 440/2008, welche sich u.a. mit der Festlegung von Prüfmethoden zur Bewertung chemischer Stoffe befasst, heißt es [406]:

„**Gebundene Rückstände**: „Gebundene Rückstände“ sind Verbindungen in Boden, Pflanzen oder Tieren, die nach einer Extraktion in der Matrix in Form der Ausgangssubstanz oder deren Metaboliten/Transformationsprodukte(n) verbleiben. Die Extraktionsmethode darf die Verbindungen selbst oder die Matrixstruktur nicht wesentlich verändern. Durch matrixverändernde Extraktionsmethoden und hochentwickelte Analysenverfahren kann die Art der Bindung zum Teil geklärt werden. Bislang werden z.B. kovalente Ionen- und Sorptionsbindungen sowie Einschlüsse auf diese Weise nachgewiesen. In aller Regel bedeutet die Bildung von gebundenen Rückständen eine deutliche Verminderung der Bioverfügbarkeit.“

Für Transformationsprodukte gilt in dieser Definition:

„**Transformationsprodukte**: alle Substanzen, die durch biotische oder abiotische Transformationsreaktionen der Testsubstanz entstehen, einschließlich CO₂ und Reaktionsprodukte in gebundenen Rückständen.“

Transport von Schadstoffen im Boden

Der Boden bildet aufgrund der Vielzahl an seinem Aufbau beteiligten anorganischen und organischen Komponenten ein hochkomplexes heterogenes System. In welchem Umfang und über welche Transferprozesse Umweltschadstoffe im Boden transportiert werden, ist von dem jeweiligen Boden und den vorherrschenden Umweltbedingungen abhängig. Durch chemische und biologische Transformationsprozesse kann es zudem zu einer Änderung der Struktur der Schadstoffe und damit zu einem anderen Transportverhalten kommen.

In Bezug auf die möglichen Stofftransportprozesse ist zwischen der „gesättigten“ und „ungesättigten Bodenzone“ zu unterscheiden. Im Regelfall erfolgt der Stofftransport in der ungesättigten Zone des Bodens durch die gravitativ bedingte vertikale Bewegung des Sickerwassers [407].

Im Unterschied zur ungesättigten Bodenzone ist in der gesättigten Bodenzone, wie sie ab der Tiefe des Grundwasserstandes anzutreffen ist, die Bodenluft in den Hohlräumen des Bodens bzw. der einzelnen Bodenpartikel vollständig durch Wasser verdrängt. Dies hat für die ungesättigte Bodenzone zur Folge, dass die Durchlässigkeit des Bodens nicht wie bei der gesättigten Bodenzone konstant, sondern von der variablen Wassersättigung in der Sickerstrecke abhängig ist [26].

Der Wassergehalt und die Sickerwasserrate ändern sich in der Realität in Abhängigkeit der Witterungsbedingungen („Instationarität“), also im ständigen Wechsel zwischen Niederschlagsereignissen und Trockenphasen. Aufgrund dieser Witterungseinflüsse unterliegt die Sickerwassergeschwindigkeit und infolge dessen auch die advective Transportgeschwindigkeit von Schadstoffen ständigen Veränderungen. In welchem Umfang sich dann das in den Boden eingedrungene Regenwasser frei als Sickerwasser in den Porenräumen bewegen kann oder an der Bodenmatrix adsorbiert wird, hängt von dem dort vorherrschenden Wassergehalt und den jeweiligen Bodeneigenschaften ab.

Zur Beurteilung der Verlagerung von Schadstoffen mit dem Sickerwasser sind folgende Prozesse von Relevanz [407]:

- Advektion (Transport mit der Sickerwasserströmung)
- Dispersion (Vermischung im Porenraum infolge unterschiedlicher Fließgeschwindigkeiten)
- Diffusion (Ausgleichsprozess von Konzentrationsunterschieden durch Konzentrationsgradienten)

Eine Verzögerung oder Verminderung des Stofftransports und damit der transportierten Menge von Schadstoffen ist dabei durch folgende Prozesse möglich:

- Sorption (Ad-, Ab- und Desorptionsverhalten) / Ionenaustausch / Komplexierung
- Abbau / Umbau
- Übergang in die Gasphase (und Vermischung mit der Bodenluft)

Der klassische Ansatz zum Transport von Schadstoffen setzt sich aus einer konvektiven und einer diffusiv-dispersiven Komponente zusammen und geht davon aus, dass das gesamte Wasser im Boden homogen verteilt und am Transport beteiligt ist [408].

Eine alleinige Betrachtung eines homogenen Wasser- und Substanzflusses durch den Boden (Matrixfluss) führt nach heutigen Erkenntnissen allerdings zu falschen Prognosen bei der Einschätzung der Verlagerung von Schadstoffen, da der klassische Ansatz einen

schnellen Transport über präferenzielle Fließwege, welche in der heterogenen Porenstruktur von natürlichem Boden begründet sind, nicht berücksichtigt. Beim präferenziellen Transport wird ein Teil des Gesamtporenvolumens eines Bodens über bevorzugte Leitungsbahnen mit Wasser durchströmt, woraus ein Wasserfluss resultiert, welcher der Wasserbewegung in der (feinporigeren) Matrix vorausseilt [409].

Durch präferenzielle Transportwege können daher auch Bodenschadstoffe in gelöster oder partikulärer Form wesentlich schneller in tiefere Bodenschichten oder das Grundwasser verlagert werden [385,407-410]. Nach Lennartz liegt in Böden unter Wasserteilsättigung praktisch immer ein beschleunigter Stofftransport vor [408]. Die bedeutendsten Einflussfaktoren zur Initialisierung von präferentiell Stofftransport sind Niederschlagsintensität, Infiltrationskapazität, Bodenwassergehalt, Hydrophobizität (hydrophobe Bereiche im Boden), Porenstruktur und relevante Stoffcharakteristika [409].

Im Wesentlichen lassen sich die Mechanismen präferenziellen Fließens anhand verschiedener Entstehungsursachen in Fingerfluss („Fingering“), Trichterfluss („Funneling“) und Makroporenfluss unterteilen [385,408,409].

Fingerfluss:

Ein Fingerfluss entsteht durch Instabilitäten in der Befeuchtungsfront bei denen sich ein fingerförmiger Wasserfluss ausbildet. Als Ursache für die Instabilitäten kommen Hydrophobizitätsunterschiede im Boden in Betracht, welche zu einer schlechteren Benetzbarkeit/Wasserdurchlässigkeit einzelner Bereiche und damit zu einem heterogenen Wasserfluss führen. Eine weitere Ursache für eine fingerförmige Versickerung sind abrupte Texturwechsel im Boden bei denen feinkörnigeres Material über grobkörnigerem Material liegt.

Trichterfluss:

Der Trichterfluss beruht auf einer Kapillarsperre, welche durch geneigte Einlagerungen oder Verdichtungen hervorgerufen wird. So wird z.B. durch Steine oder Tonlinsen die vertikale Bewegung des Wassers eingeschränkt, infolge dessen der Wasserabfluss trichterförmig entlang der eingebetteten Grenzflächen verläuft.

Makroporenfluss:

Der Makroporenfluss ist auf zwei in ihrer Porosität unterschiedlichen Porensystemen (dualporöses Medium), welche im Boden einerseits von Makroporen und andererseits von feinporigerer Matrix gebildet werden, zurückzuführen. Die Bildung von Makroporensystemen kann verschiedene Ursachen haben [407-409,411]. Quell- und Schrumpfprozesse im Boden führen zu einer zur Bildung von Bodenaggregaten, wobei das Makroporensystem als

Nebenprodukt entsteht, und zum anderen zur Entstehung von Rissen und Spalten. Eine Riss- und Spaltenbildung kann aber auch durch andere Prozesse wie Kryoturbation oder Verwitterung hervorgerufen werden. Des Weiteren können Makroporensysteme durch biologische Aktivität von Bodenflora und -fauna z.B. in Form von Wurzelkanälen oder Regenwurmgrabröhren gebildet werden.

Für eine Beurteilung des Verhaltens von Umweltschadstoffen auf Ackerböden kommt noch die Art der Bodenbearbeitung als ein entscheidender Einflussfaktor, welcher hier nur kurz dargestellt wird, hinzu. Die verschiedenen Bodenbearbeitungsverfahren haben zum einen Einfluss auf die Bodenstruktur (Gefüge und Porensysteme), aber auch auf andere Bodeneigenschaften wie Biosystem oder Gehalt und Verteilung von organischem Material [409]. Durch das Pflügen von Ackerböden werden einerseits die (biogenen) Makroporensysteme (Wurmgänge, Wurzelkanäle) zerstört bzw. unterbrochen, andererseits wird der Boden bei diesem Verfahren aber aufgelockert. So weisen pfluglose Bearbeitungsverfahren wie Direktsaat oder Mulchsaat einen etwa 2,5 höheren Durchsatz an (biogenen) Makroporen im Boden auf [411]. Bei einem gepflügten Boden setzt die Oberflächenverschlammung schneller ein, was insbesondere bei Starkregenfällen zu einer geringeren Wasserinfiltration und einem damit verbundenen stärkeren Oberflächenabfluss führt. Durch einen erhöhten Oberflächenabfluss können daher auch Schadstoffe verstärkt über diesen Pfad transportiert werden. Ein mit Makroporen gut durchsetzter Boden führt aber nicht zwangsläufig zu einer verstärkten Verlagerung von Schadstoffen mit dem Sickerwasserstrom. Makroporen stellen so genannte biologische „hot-spots“ dar, wobei der Boden der Makroporenwände durch im Vergleich zur „normalen“ Bodenmatrix höhere Gehalte an organischen und mikrobiell gebundenen Kohlenstoff, sowie eine hohe mikrobielle Aktivität und Diversität charakterisiert ist [411]. Über den mikrobiologisch bedingten Abbau von organischen Schadstoffen in Makroporen ist noch wenig bekannt, dennoch zeigen Untersuchungen, dass organische Schadstoffe in den Makroporen beschleunigt abgebaut bzw. mineralisiert werden können [411]. Zudem werden die Makroporenoberflächen und der angrenzende Boden im Laufe der Zeit mit Humus und Tonmineralien angereichert, wodurch sich ihre chemische Reaktivität und ihr Sorptionsverhalten gegenüber Schadstoffen verändern können. Die Wände der Mikroporen können beispielsweise durch die Bildung von biologischen Mikrofilmen oder durch Absonderung von Schleimsekreten einen hydrophoben Charakter besitzen, was sich ebenfalls auf die Sorptionseigenschaften der Makroporenwände gegenüber Schadstoffen auswirken und zu einer geringeren Schadstoff-Diffusion in die Bodenmatrix führen kann [409,411].

Eine detailliertere Darstellung der Zusammenhänge zwischen Bodenbearbeitung und Stofftransport wird beispielsweise bei Machulla et al. [411] und A. Michels [409] gegeben.

Partikulärer Transport

Die Pfade des Lösungstransports, des Transports von Schadstoffen in Festphase und der diffusiven Ausbreitung von leichtflüchtigen Schadstoffen in der Bodenluft, sowohl in der gesättigten, als auch in der ungesättigten Bodenzone sind meist gut untersucht.

Dem gegenüber wird die potenzielle Verlagerung von an mobilen Partikeln gebundenen Schadstoffen im Sickerwasser oft vernachlässigt, obwohl zahlreiche anorganische und organische Schadstoffe sowohl gegenüber der immobilen Bodenmatrix als auch gegenüber mobilen Partikeln im Sickerwasser, eine starke Sorptionstendenz aufweisen [27]. Diese Transportsituation wird nicht von 2-phasigen Transportmodellen, welche traditionell von einer mobilen flüssigen Phase und einer immobilen festen Phase ausgehen, beschrieben. Der Boden sollte daher als 3-phasiges (dual-)poröses Medium mit zwei festen Phasen, also einer mobilen partikulären Phase und einer stationären festen Phase, aufgefasst werden [412].

Der Einfluss von Partikeln auf den Schadstofftransport aus dem Bereich des Grundwassers, also der gesättigten Bodenzone, ist in zahlreichen Studien untersucht worden [28-32]. Die Prozesse im Bereich des partikelgebundenen Schadstofftransports in der ungesättigten Bodenzone sind der gegenwärtigen Kenntnislage nach jedoch unzureichend erforscht, was insbesondere für den Bereich der Arzneistoffe gilt.

Um zwischen gelösten und partikulären Transport von Schadstoffen unterscheiden zu können, ist zuvor zu definieren, was unter Partikel und partikulärem Transport zu verstehen ist. In der Literatur findet sich hierzu keine einheitliche Definition. Kolloidale Teilchen sind nach Definition von Sposito Feststoffteilchen mit einer sehr geringen Wasserlöslichkeit und einem Durchmesser von 0,01 - 10 µm [33]. Kolloide sind demgegenüber nach Stumm und Morgan kleine Partikel in einer Größenordnung von 1 nm bis 1 µm [25]. Der Begriff „Kolloid“ wird von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) für Feststoffteilchen verwendet, bei denen mindestens eine Dimension im Bereich von 1 nm bis 1 µm liegt [34]. Sigg und Stumm nehmen eine Unterteilung nach Teilchengröße vor und unterscheiden zwischen kleineren Kolloiden (1 – 1000 nm) und größeren suspendierten Partikeln (1 – 5µm) [35].

In der Wasserchemie wird klassisch eine Trenngrenze bei 0,45 µm zwischen gelöstem und partikulärem Zustand festgelegt, wobei die so definierte Trenngrenze mitten durch den Größenbereich der Kolloide (siehe Abb. 10) schneidet [36].

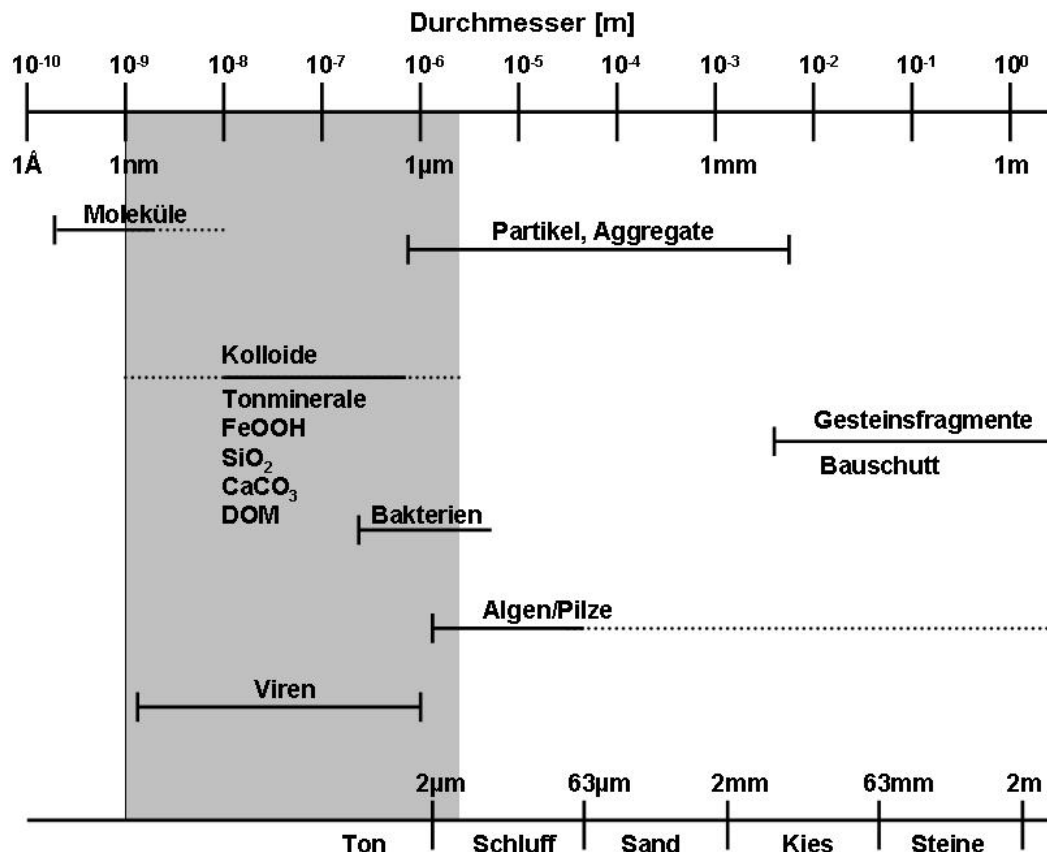


Abb. 10: Größenverteilung von Bodenbestandteilen (geändert nach [36])

In dieser Arbeit werden unter dem partikulären Transportweg mit dem Sickerwasser transportierte Feststoffphasen in der Größenordnung von wenigen Nanometern bis mehreren Mikrometern verstanden. Transportierte Schadstoffe können dabei an Feststoffphasen gebunden (sorbiert/sequestriert) oder selbst die transportierten Partikel sein.

Partikel besitzen aufgrund ihrer großen spezifischen Oberfläche gegenüber Schadstoffen eine hohe Sorptionskapazität [37,38]. Hierbei kann der Anteil der Intrapartikeloberfläche an der Gesamtoberfläche deutlich höher als der Anteil der äußeren Partikeloberfläche sein. So beträgt z.B. bei quellfähigen Tonmineralien der intrapartikuläre Anteil an der Gesamtoberfläche 90% [26]. Über den partikulären Transportweg können daher Schadstoffe, die aufgrund ihres starken Sorptionsverhaltens gegenüber der Bodenmatrix als immobil eingeschätzt werden, in tiefere Bodenschichten gelangen und bis ins Grundwasser transportiert werden [27]. Neben den verschiedenen anorganischen Partikeln und gelösten Stoffen wird mit dem Sickerwasser auch organisches Material (Huminstoffe) transportiert. Diese Stoffe können entweder gelöst (Dissolved Organic Matter = DOM) oder partikulär weitertransportiert werden. Huminstoffe werden in Huminsäuren, Fulvosäuren und Humine unterteilt, welche bei Abbauprozessen (Humifizierung) organischen Materials im Boden entstehen. Der Einfluss von organischem Material auf den Transport von Schadstoffen

wurde in zahlreichen Untersuchungen dargelegt [31,39-41]. Untersuchungen von Schulte-Ebbert et al. und Johnson et al. zeigten einen verstärkten Transport von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) durch den Einfluss von organischem Material [44,45]. Im Gegensatz dazu ist nach Fetter der Anteil von an reinen Mineraloberflächen sorbierten organischen Schadstoffen eher gering [46]. Gerade für den Transport von hydrophoben Schadstoffen ist der Gehalt an organischem Material im Boden von großer Bedeutung. So hängt u.a. die Sorption/Sequestration dieser Schadstoffe an innere und äußere Partikeloberflächen vom Gehalt des organischen Materials in der Bodenmatrix und der Partikel ab. McCarthy et al. und Georgi untersuchten den Einfluss von (gelösten) Huminstoffen auf die Sorption von hydrophoben Schadstoffen [42,43].

Die Migration von Partikel-sorbierten bzw. sequestrierten Schadstoffen oder partikulären Schadstoffen hängt von der Partikelmobilität im Boden ab. Diese wird in der ungesättigten Bodenzone, welche durch ein hohes Maß an Instationarität gekennzeichnet ist, von verschiedenen hydraulischen und hydrochemischen Parametern gesteuert. Gerade durch eine Änderung des Wassergehaltes in der Bodenzone variierten diese Parameter, welche auf die Partikel im Sickerwasser einwirken, zeitlich sehr stark [27,47-49]. Eine Änderung des Wassergehaltes im Boden wird dabei insbesondere durch Regenereignisse hervorgerufen. Zuvor festgelegte Partikel können durch diese instationären Verhältnisse mobilisiert und mit dem Sickerwasser in tiefere Bodenschichten bis hin zum Grundwasser transportiert werden. Über diesen Transportpfad können die an diesen mobilen Partikeln sorbierten Schadstoffe mit verlagert werden. Es ist dabei davon auszugehen, dass dieser Transportweg mit steigender Sorptionstendenz der Schadstoffe an Bodenpartikel einen zunehmenden Anteil an der transportierten Gesamtmasse besitzt. In Hinblick auf einen partikulären Ko-Transport von Umweltschadstoffen im Boden ist zudem der Faktor Gülleausbringung von Bedeutung. So muss aufgrund einer im Vergleich zu Boden- und Regenwasser höheren Ionenstärke von Wirtschaftsdüngern mit einer erhöhten Verlagerungswahrscheinlichkeit für Partikel und Mikroorganismen gerechnet werden [409].

Sprague et al. konnten in Lysimeter-Versuchen einen mit durchschnittlich 15% der transportierten Gesamtmasse stark von Partikeln beeinflussten Transport von Atrazin nachweisen [50]. Die Anwesenheit von Bentonitpartikeln erhöhte nach Untersuchungen von Möri et al. den Anteil von transportiertem Americium und Plutonium von 20-30% (in Abwesenheit von Partikeln) auf 60-80%. Neben dem favorisierten Transportweg über Bentonit-Trägerpartikel wurde dabei auch der Transport dieser Radionuklide über partikuläre Feststoffphasen nachgewiesen [51]. Inwieweit ein partikulärer Stofftransport in Böden eingetragener Arzneistoffe zu ihrer Verbreitung in terrestrischen (und aquatischen) Umweltkompartimenten beiträgt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sicher abgeschätzt werden, da die Transportpfade bzw. das Umweltverhalten für Arzneimittel unzureichend

untersucht sind. In Anbetracht der Zusammenhänge zwischen Antibiotikaeinsatz in der Landwirtschaft und einer damit zusammenhängenden Resistenzentwicklung (s. Kap. 3.2) besteht gerade für diese Arzneimittelgruppe ein dringender Forschungsbedarf bezüglich ihres Verhaltens im Boden und der weiteren Verbreitung in andere Umweltkompartimente.

3.4.2 Tetracycline und Sulfonamide in aquatischen und terrestrischen Kompartimenten – Eintrag, Vorkommen und Verhalten

3.4.2.1 Tetracycline

Der Haupteintragsweg für Tetracycline in die Umwelt resultiert aus der Aufbringung von kontaminierten Wirtschaftsdüngern (Gülle, Mist) auf landwirtschaftliche Nutzflächen. Bis 80% der verabreichten Tetracyclinmenge werden nach Kroker über den Kot wieder ausgeschieden [82]. Nach Vockel [7] wurde eine vergleichbare relative Ausscheidungsmenge für Chlortetracyclin bei Schweinen ermittelt. Diese betrug hier 1-4% über Urin und 55-83% über Kot. Winckler und Grafe geben bei Schweinen für Tetracyclin eine Ausscheidungsgrad von bis zu 72% über Urin und Faeces an [83].

Über diesen Weg gelangen die Tetracycline schließlich in Wirtschaftsdünger wie Gülle oder Mist. Insbesondere in Wirtschaftsdüngern aus der Schweine- und Geflügelproduktion, wo die dortigen Tierbestände mit Tetracyclinen behandelt worden sind, wurden mit bis zu 203,3 mg/kg Chlortetracyclin erhebliche Rückstandsmengen festgestellt [4,84]. Nach Hamscher et al. können nach Modellrechnungen bei Bestandsbehandlungen von 10 Tagen Tetracyclin-Rückstände von maximal 52 g/m³ für Schweinegülle und bis zu 878 g/t für Putenmist erreicht werden [85]. Durch Ausbringung belasteter Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftliche Nutzflächen gelangen die Tetracycline in den Boden, wo Gehalte bis zu 810 µg/kg (Chlortetracyclin) nachgewiesen wurden [4,86,87]. In an der Bodenoberfläche getrockneten Güllekruste wurde von Hamscher et al. ein Chlortetracyclingehalt von 1,435 mg/kg ermittelt [92]. Tetracycline wurden im Boden bis zu einer Tiefe von 40 cm nachgewiesen [413,414]. Durch Ausschwämmungen (Oberflächenabfluss/Runoff) kontaminierter Böden können Tetracyclinrückstände ins Oberflächenwasser und in Kläranlagen gelangen [341]. So stellten Kay et al. Oxytetracyclin-Rückstände im Drainagewasser landwirtschaftlicher Flächen fest [88]. Heberer und Stan konnten in Oberflächengewässern maximale Tetracyclin-Konzentrationen von 1 µg/l nachweisen [89]. Tetracyclinkonzentrationen von max. 0,26 µg/L wurden von Yang et al. in deutschen und von max. 0,977 µg/L von Göbel in kanadischen Kläranlagenab- bzw. zuläufen nachgewiesen [90,91]. Batt et al. fanden in den Abläufen verschiedener amerikanischer Kläranlagen Tetracyclinkonzentrationen von 0,061-1,1 µg/L [415].

Eine Eliminierung der Tetracycline in Kläranlagen erfolgt im Wesentlichen durch die Sorption an Klärschlamm oder sich im Wasser befindlicher Partikel (Biomasse, anorganische und organische Stoffe) [332].

Tetracycline adsorbieren stark an der Bodenmatrix (Tonminerale, organische Bestandteile) und werden daher in Böden als immobil eingestuft [416]. Nach einer Untersuchung von Hamscher et al. sind Tetracycline unter Feldbedingungen als persistent zu klassifizieren und neigen in Böden zur Akkumulation [92]. Untersuchungen zum Sorptionsverhalten von Chlortetracyclin von Sassman et al. und Allaire et al. zeigten eine schnelle Sorption an der Bodenmatrix, mehr als 95% wurden innerhalb der ersten 10 min adsorbiert [94,95]. Der Adsorptionsgrad war dabei mit steigendem pH-Wert geringer. Tolls weist auf die Möglichkeit der Verlagerung von Tetracyclinen durch dispersiven als auch konvektiven Fluss (inkl. Makroporenfluss) im Boden hin [95]. Die Tetracycline könnten dabei durch gelöste organische Substanz, wie sie z.B. dem Boden über Gülle zugeführt wird, mit verlagert werden. Thiele-Bruhn vermutet, dass ein signifikanter Transport von Tetracyclinen auf schnelle präferenzielle Fließwege und Makroporenfluss, sowie Ko-Transport mit mobilen Kolloiden (z.B. DOM) begrenzt ist [81]. Nach Henkelmann et al. kann es für CTC lediglich durch Makroporenfluss oder Dränagen zu einem schnellen Eintrag in oberflächennahes Grundwasser kommen [417,418]. Untersuchungen von Aust et al. ergaben Hinweise auf eine horizontale Verlagerung („Runoff“) von CTC infolge von Makroporenfluss und partikulärem Ko-Transport im Boden [419]. Ein Eintrag von Tetracyclinen in Oberflächen- und Grundwasser ist diesen Autoren zufolge möglich, allerdings wären noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Nach neueren Untersuchungen können Tetracyclinrückstände über güllebeaufschlagte Böden auch bis ins Grundwasser gelangen. So wiesen Hamscher et al. nach einem fast 4-jährigen Untersuchungszeitraum Tetracyclinkonzentrationen von max. 0,13 µg/L in oberflächennahen Grundwasserproben (Proben-Tiefe: 1,4 m) nach [85]. Über den Transportweg bzw. die beteiligten Transportprozesse gibt es keine Erkenntnisse. Den Autoren zufolge ist ein Eintrag von Tetracyclinen durch Runoff (Oberflächenabfluss) in Oberflächengewässer aber wahrscheinlicher als ein Eintrag ins Grundwasser. Für das Trinkwasser sind jedoch keine positiven Tetracyclinbefunde bekannt.

Neben ihrer Verwendung in der (Land-)Tierzucht werden Tetracycline auch in Aquakulturen, also bei der Fisch- und sonstigen Meeresfrüchteproduktion, eingesetzt [97]. Tetracycline wurden in hohen Konzentrationen in Sedimenten unterhalb von Fischfarmen nachgewiesen [98,99].

Transfer Boden-Pflanze

Im Sinne des Verbraucherschutzes ist die Aufnahme der im Boden eingetragenen Tetracycline durch Nutzpflanzen (Winterweizen, Feldsalat) von großer Relevanz. Grote et al. stellten diesbezüglich erstmalig die Aufnahme von Chlortetracyclin durch Nutzpflanzen unter Freilandbedingungen fest [96].

Pflanzen ihrerseits können nach Farkas et al. mit einer signifikant erhöhten Aktivität pflanzlicher Stressproteine wie Glutathion-S-Transferase und Peroxidase reagieren, wenn sie auf CTC-behandelte Böden wachsen. Infolge enzymatischer Reaktionen werden dadurch Chlortetracyclin-Glutathion-Konjugate gebildet. Dieses Verhalten ist aber von der Pflanzenart abhängig. So zeigte Mais ein solches Verhalten, Pintobohnen aber nicht [420].

Mobilität von Tetracyclinen im Boden

Als Kenndaten zur Beurteilung der Mobilität von Schadstoffen im Boden dienen verschiedene Verteilungs-/Sorptionskoeffizienten wie K_{OW} (Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser), K_{OC} (Sorptionskoeffizient Organischer Kohlenstoff) und K_D (Verteilungskoeffizient Boden/Wasser). Die aus der Literatur bekannten Koeffizienten für Tetracycline sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Verteilungs- und Sorptionkoeffizienten von Tetracyclinen

	Log K_{OW}	K_{OC} [L/kg]	K_D [L/kg]	Literatur
Tetracyclin	-1,19	4206-6059 ¹⁾	12,8-312447 1140-1620 ²⁾	[2 93 421]
Chlortetracyclin	-0,41	-	17,1-352911	[93 421]
Oxytetracyclin	-1,22	27790-93320	417-1026 13,5-269097	[2 81 93 421]

1) Adsorption an gelöstem organischen Kohlenstoff

2) Adsorption an Torf

Es ist aber zu beachten, dass zum einen der K_{OW} kein verlässlicher Parameter für die Einschätzung der Mobilität von Tetracyclinen in Böden ist [259,421,422] und zum anderen das K_{OC} -Konzept auf polare Arzneistoffe nicht anwendbar ist [59,423], da diese nicht die Wechselwirkungen mit dem anorganischen Bodenmaterial berücksichtigen. Wie an den Sorptionskoeffizienten (K_D) der Tetracycline an Böden zu sehen ist (Tab. 4), umfassen die ermittelten K_D -Werte einen Bereich von mehr als vier Dekaden, was u.a. auf die Abhängigkeit der Tetracyclin-Sorption von der Bodenzusammensetzung und dem

vorliegenden pH-Wert zurückzuführen ist. So zeigt z.B. eine Untersuchung von Allaire et al., dass an ein schwerer Tonboden etwa die doppelte Menge an Chlortetracyclin im Vergleich zu einem sandigen Lehm Boden sorbiert [94]. Die Sorption von Tetracyclinen an die Bodenmatrix ist abhängig von der Spezies (kationisch, zwitterionisch, anionisch), in welcher das Tetracyclin vorliegt. So ermittelten Laak et al. unterschiedliche K_D -Werte für die verschiedenen Spezies [424]. In dieser Untersuchung mit verschiedenen Böden war der Sorptionsgrad an die Bodenmatrix für die kationischen und zwitterionischen Tetracyclinspezies höher als für die anionischen Spezies. Weiterhin ist zu beachten, dass sich die Adsorption der Metabolite und Abbauprodukte von der des ursprünglichen Tetracyclins unterscheiden kann [81].

Die Sorption von Tetracyclinen an die hochkomplexe Boden-Matrix und damit die Mobilität in Böden ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Die Sorption der Tetracycline an Böden bzw. Bodenbestandteilen wird u.a. durch den pH-Wert, die Ionenstärke, der Kationenaustauschkapazität und den Gehalt an multivalenten Metallkationen beeinflusst [93,81,421,425-429]. Turku et al. ermittelten zudem einen (geringen) Einfluss der Temperatur auf die Sorption von Tetracyclin an mesoporösem Siliziumdioxid [430].

Böden können in ihrer Zusammensetzung stark variieren, wobei die Anteile an den verschiedenen Bodenbestandteilen wie Tonminerale, organischem Material (z.B. Huminstoffe, DOM (Dissolved Organic Matter)) und Metalloxide wesentliche Einflussfaktoren für das Sorptions-Verhalten von Tetracyclinen darstellen [81,426,427,429,431-436]. Die einzelnen Einflussfaktoren können zur Charakterisierung des Sorptions-Verhaltens von Tetracyclinen im Boden nicht isoliert betrachtet werden, da untereinander Abhängigkeiten bestehen, welche die einzelnen Faktoren selbst beeinflussen. So ist beispielsweise die Sorption von Tetracyclinen sowohl an organischem Material als auch an Tonmineralen vom Gehalt an Metallkationen abhängig [426,437]. Wang et al. zeigten einen durch die Gegenwart von Cu(II)-Ionen stark erhöhten Freundlich-Sorptionskoeffizienten (K_F) für die Absorptionsisotherme von Tetracyclin an dem Tonmineral Montmorillonit. Der K_F -Wert erhöhte sich in der Gegenwart von Cu(II)-Ionen (0,25 mmol/L) von 5230 auf 36200 [437]. Andererseits vermindert gelöstes organisches Material (DOM) die Sorption von Tetracyclinen an Tonmineralien. DOM könnte somit nach Kulshresta et al. zu einer erhöhten Mobilität von Tetracyclinen in natürlichen Umgebungen führen [427], wohingegen nach MacKay et al. die gemeinsame Gegenwart von polyvalenten Metallkationen (Al, Fe(III)) und organischen Bodenmaterial eine verringerte Mobilität bewirken kann [426].

Die Sorption von Tetracyclinen an Boden kann durch zwei Prozesse unterschiedlicher Kinetik charakterisiert werden. Nach einer anfänglich schnellen Sorption an äußere Oberflächen folgt eine Einlagerung in die Zwischenschichten von Tonmineralien und Mikroporen [81].

Neben dem Anteil an einzelnen Bodenbestandteilen spielen auch dessen Eigenschaften eine Rolle. So müssen die Abstände der Tonmineralzwichenschichten und Mikroporen über ausreichend räumliche Abmessungen verfügen um ein Eindringen der Tetracycline zuzulassen. Ein Tetracyclin-Molekül besitzt im vollständig protonierten Zustand eine Abmessung von 12,9Å (Länge), 6,2Å (Höhe) und 7,5Å (Breite) [438]. Für Tonminerale mit entsprechend großen räumlichen Abmessungen der Zwischenschichten, wie z.B. Montmorillonit (Struktur siehe Abb. 11) wurde die Einlagerung von Tetracyclin nachgewiesen [440-443].

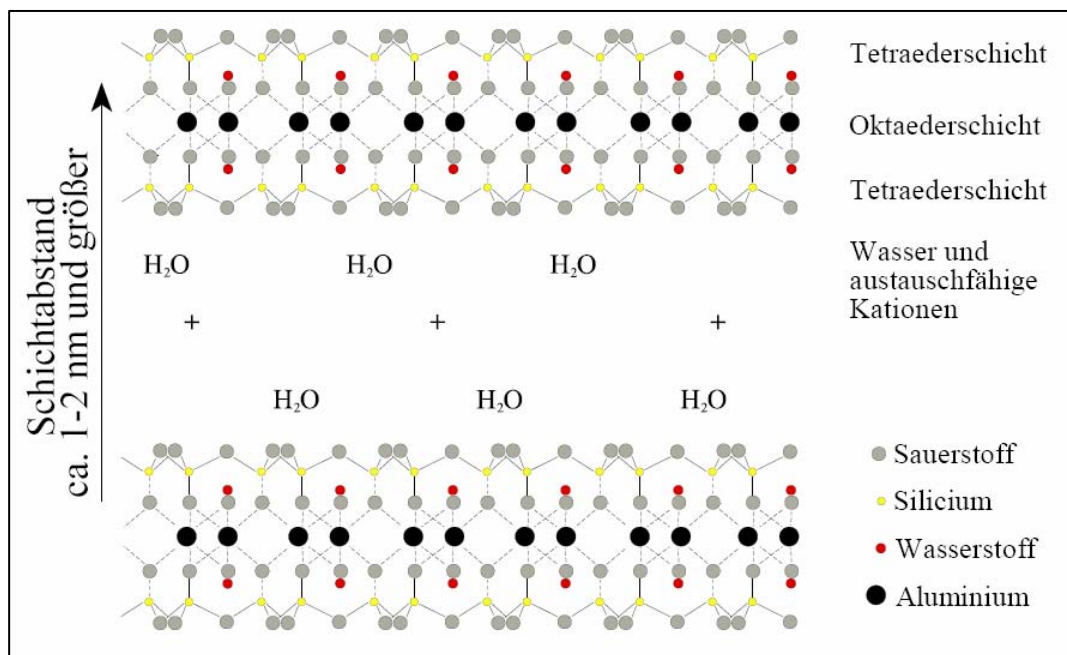


Abb. 11: Struktureller Aufbau von Montmorillonit [439]

Für Tonminerale, welche die räumliche Voraussetzungen nicht besitzen, ist nur die Sorption an den äußeren Oberflächen von Bedeutung. Laborversuche von Henkelmann et al. machten deutlich, dass die Sorption der Tetracycline im Boden vorwiegend an Tonminerale und Ton-Humuskomplexe erfolgt [417]. Auch nach Pils et al. werden Tetracycline in Böden bevorzugt an Tonmineralien gebunden, wobei Huminstoffe die Sorptionsplätze der Tonoberflächen maskieren oder die Diffusion von Tetracyclin in die Zwischenschichten behindern [440]. In der Untersuchung von Pils et al. nahm der Sorptionsgrad von Tetracyclinen (TC, CTC) in folgender Reihenfolge ab: Tonmineralien > Huminstoffe > Ton-Humin-Komplexe.

Als weitere Faktoren, welche die Verlagerbarkeit (Mobilität) von Tetracyclinen in Böden beeinflussen, wurden die Bodentextur und der anthropogene Prozess der Bodenbearbeitung (z.B. Pflügen) ermittelt [2,88,340-342,428]. Welche Auswirkungen die Bodenbearbeitung auf die Verlagerbarkeit von Tetracyclinen im Boden hat, bleibt allerdings unklar. Nach Kay et al.

wird das Auswaschen von Oxytetracyclin durch die Bodenbearbeitung vor dem OTC-Eintrag mit Gülle vermindert, was auf die Zerstörung von Makroporen zurückgeführt wurde [340]. Winckler et al. konnten in Lysimeterversuchen mit Bodenbearbeitung vereinzelt Tetracyclin-Spuren in den Sickerwasserproben detektieren [2]. In den Sickerwasserproben von Lysimetern ohne Bodenbearbeitung konnte kein Tetracyclin nachgewiesen werden. Die Bodenbearbeitung wurde in dieser Studie durch das Ziehen von Furchen mit einem Pikierstab vor der Gülleaufbringung simuliert.

Abbau von Tetracyclinen in Böden

In den verschiedenen Umweltkompartimenten vorkommende Tetracycline unterliegen biotischen und abiotischen Abbauprozessen, welche deren Gehalt bzw. Konzentration im Laufe der Zeit vermindern.

Biotischer Abbau:

Tetracycline werden zwar biologisch abgebaut [444,445], doch sind sie nach Alexy et al. (geschlossener Flaschentest, OECD 301 D) als nicht leicht biologisch abbaubar einzustufen [207].

Abiotischer Abbau:

Verschiedene Untersuchungen zeigen einen Abbau bzw. eine Umwandlung von Tetracyclinen durch chemische Reaktionen [446-448]. Es wurde gezeigt, dass natürlich im Boden vorkommende Oxidantien wie z.B. Mangan(IV)oxid in der Lage sind, Tetracycline abzubauen [446,447]. In welchem Umfang Tetracycline durch chemische Reaktionen abgebaut werden, ist noch nicht untersucht worden.

Da Tetracycline insbesondere in Lösungen Photoabbau zeigen ist dieser Abbaupfad für Oberflächengewässer von Relevanz. An der direkten Bodenoberfläche findet zwar ein Photoabbau statt [382], doch sobald die Tetracycline in den Boden (z.B. durch Regen oder mit Gülle) gelangen, kann das Sonnenlicht sie nicht mehr erreichen. Dem Photoabbau ist daher keine große Bedeutung zuzumessen.

In welchem Umfang Tetracycline im Boden (biotisch und abiotisch) abgebaut werden können ist anhand der Literatur nicht eindeutig abzuschätzen. Thiele-Bruhn gibt in einer Übersichtsarbeit u.a. zwei Literaturstellen an in denen nach 180 Tagen noch kein Abbau von Tetracyclinen (Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Tetracyclin) im Boden festgestellt wurde [81]. Demgegenüber geben Kay et al. für Oxytetracyclin eine Halbwertszeit von 18,2 Tagen im Boden an [88]. Halling-Sørensen et al. ermittelten Halbwertszeiten von 20 bis 42 Tagen für Chlortetracyclin in Böden [449].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Verhalten von Tetracyclinen in Böden von einer Vielzahl von Faktoren abhängt. Der gegenwärtige Kenntnisstand ist dabei noch unzureichend. Insbesondere fehlen Untersuchungen und Erkenntnisse über die Verlagerung von Tetracyclinen und relevanter Metabolite ins Grundwasser. Dies betrifft sowohl die möglichen Verlagerungswege (partikulärer Ko-Transport, präferenzzieller Fluss usw.) im Boden, als auch eine Einschätzung über die Menge der ins Grundwasser verlagerbaren Tetracycline.

3.4.2.2 Sulfonamide

Der Haupteintragsweg für Sulfonamide in die Umwelt ist wie bei den Tetracyclinen der Eintrag über belastete Wirtschaftsdünger (Gülle, Mist).

Sulfonamide werden überwiegend mit dem Harn ausgeschieden. Die Ausscheidungsrate von Sulfonamiden beträgt bis zu 90% [100]. Für das Sulfonamid Sulfadiazin liegt die Ausscheidungsrate nach Halling-Sörensen et al. bei Schweinen und Rindern ebenfalls bei 90% (inkl. Metaboliten) [101]. Neben Sulfadiazin werden nach Lamshöft et al. 4-Acetyl- und 4-Hydroxysulfadiazin als Hauptmetabolite ausgeschieden [450], wobei das Acetylsulfadiazin während der Güllelagerung wieder mit der Zeit deacetyliert wird und es so zu einer Zunahme der Sulfadiazinkonzentration kommt [294]. Für die Ausscheidung (Harn) von nicht-metabolisierten Sulfadiazin ermittelten Sattelberger et al. eine Rate von 50% [4].

Sulfonamid-Rückstände wurden in verschiedenen Untersuchungen mit einem Gehalt von bis zu 40 mg/kg FS in Wirtschaftsdüngern nachgewiesen [84,102], z.B. Sulfadiazin mehr als 10 mg/kg [4,84]. Martinez-Carballo et al. konnten maximale Gehalte von 91 mg/kg für Sulfadiazin und 17 mg/kg für den Synergisten Trimethoprim in Geflügelmist nachweisen [103]. In Geflügelmist-gedüngten Feldern wurde kein Sulfadiazin und Trimethoprim nur zweimal unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,1 mg/kg) nachgewiesen. Nach Höper et al. wurden in Ackerböden mit regelmäßiger Gülledüngung nur Sulfonamidgehalte im unteren µg/kg-Bereich gefunden [104]. In einem mit kontaminierter Gülle beaufschlagten Boden konnten Stoob et al. nach 3 Monaten noch Sulfonamidkonzentrationen von über 100 µg/kg nachweisen [451]. Nach Danisch EPA wurden für Sulfadiazin allerdings auch in Oberböden Konzentrationen von etwa 9,5 mg/kg gemessen, wobei der Zeitpunkt der Probennahme aber unmittelbar nach der Ausbringung von Wirtschaftsdüngern lag [105].

Über die belasteten Böden können die Sulfonamide durch horizontale und vertikale Transportvorgänge weiter ins Oberflächen- und ins Grundwasser transportiert werden [9,10,312,414,452,453]. Durch Abfluss aus drainierten landwirtschaftlichen Nutzflächen und durch Oberflächenabfluss an geneigten Flächen wird dabei das Kontaminationsrisiko von

Oberflächengewässern mit Sulfonamiden erhöht [341,454]. In Oberflächengewässern wurden Sulfonamidkonzentrationen von max. 0,22 µg/L und in Kläranlagenzu- und abläufen von max. 0,68 µg/L ermittelt [90,106]. Sulfadiazin wurde in Kläranlagenabläufen in Konzentrationen von bis zu 0,019 µg/L gefunden [91], in Grundwasserproben Sulfonamid-Rückstände von maximal 0,47 µg/L [106,107].

Ebenso wie die Tetracycline können auch Sulfonamide durch Pflanzen aufgenommen werden, wie Untersuchungen in Hydrokultur und unter Freilandbedingungen zeigen [201,455,456].

Das Verhalten der Sulfonamide in den verschiedenen Umweltkompartimenten ist von einer Vielzahl von Einflussfaktoren abhängig, bei denen es sich in der Regel um die gleichen Faktoren handelt, welche bei den Tetracyclinen genannt wurden. Die physiko-chemischen Eigenschaften der Sulfonamide unterscheiden sich aber von denen der Tetracycline und daher wirken sich die einzelnen Faktoren in Bezug auf ihre Einflussgröße bzw. das Verhalten auch unterschiedlich aus. Über das Umweltverhalten von Sulfonamiden liegen in der Literatur nur wenige Informationen vor, welche im Folgenden dargelegt werden.

Sulfonamide besitzen gegenüber der Bodenmatrix eine geringe Sorptionsaffinität (s. Tab. 5) und gelten daher im Boden als sehr mobil, weshalb sie in hohen Maße als Tetracycline ins Grundwasser ausgewaschen zu werden können [451,457-461].

Tab. 5: Verteilungs- und Sorptionkoeffizienten von Sulfonamiden

	Log K _{OW}	K _{OC} [L/kg]	K _D [L/kg]	Literatur
Sulfonamide	-0,1-1,7	48-323	0,9-10	[81]
Sulfadiazin	-0,1	18,9-837,9 1301,9-4698,4 ¹⁾	0,1-24,3 6,9-40,2 ¹⁾	[453 462 463]
N4-Acetylsulfadiazin	0,5			[462 463]

1) in zusätzlicher Gegenwart von Gülle

Ebenso wie für die Tetracycline ist das K_{OC}-Konzept basierend auf linearen Sorptionsisothermen zur Beurteilung der Sorption und Mobilität von Sulfonamiden in Böden ungeeignet [423,464,465]. Für die Sulfonamidmetabolite können die Mobilitäten im Boden abweichen. So besitzen beispielsweise die Acetylsulfonamide höhere K_{OW}-Werte als ihre Ausgangswirkstoffe [462,463].

Das Sorptionsverhalten und damit auch das Transportverhalten von Sulfonamiden in Böden hängen stark vom pH-Wert und der Bodenzusammensetzung ab. Ter Laak et al. ermittelten eine mit zunehmendem pH-Wert abnehmende Sorption von Sulfachloropyridazin an verschiedene Böden [425]. Für die Sorption von Sulfonamiden an Tonmineralien und

organischem Material (Huminsäure, Kompost, Gülle) kamen Gao et al. [466] bzw. Kahle et al. [467] zu der gleichen Abhängigkeit. In beiden Untersuchungen wurde folgende Affinitätsreihe für die Sulfonamidspezies gegenüber den Sorbentien ermittelt: kationisches Sulfonamid >> neutrales Sulfonamid > anionisches Sulfonamid.

Die Sorption der kationischen Sulfonamidspezies folgte in beiden Fällen der Kationenaustauschkapazität der anorganischen und organischen Sorbentien. Im Gegensatz zu Ter Laak et al. stellten diese aber auch eine Abhängigkeit der Sorption von der Ionenstärke fest. Für natürliche Böden wird nahegelegt, dass die kationische Sulfonamidspezies an organisches Bodenmaterial sorbiert [467], während die Sorption der anionischen Sulfonamidspezies überwiegend an die positiv geladenen Oberflächen pedogener Oxide stattfindet [423].

Die Sorption von Sulfonamiden an anorganische Sorbentien (Tonminerale, pedogene Oxide) ist nach Kahle et al. -unabhängig vom pH-Wert- mehr als eine Größenordnung geringer als an organische Sorbentien, was den Autoren zufolge eine geringere Einflussgröße für anorganische Bodenbestandteile (Sorbentien) impliziert [468].

Die Sorption von Sulfonamiden an Böden wird nicht nur vom Gehalt an organischem Material beeinflusst, sondern hängt auch von dessen Qualität (z.B. Art und Anzahl funktioneller Gruppen) ab [423,469].

In Batchversuchen wurde gezeigt, dass die Wiederfindung von Sulfonamiden in Böden mit der Kontaktzeit abnimmt [414,462]. Gleiches Verhalten wurde sowohl für organisches Material wie Kompost und Huminsäure [467] als auch für anorganisches Material wie Tonminerale und Eisenhydroxide (pedogene Oxide) nachgewiesen [468].

Ein zeitabhängiger Rückgang der Wiederfindung bzw. des extrahierbaren Anteils von Sulfonamiden in Böden ist von folgenden Faktoren abhängig [9,10,452,470]:

- Abbau der Wirkstoffe
- Transformation bzw. Metabolitenbildung
- Zunahme des Anteils nicht extrahierbarer Sulfonamidrückstände

Die einzelnen Faktoren sind allerdings nicht einzeln voneinander abgrenzbar, da jeder Abbau Transformationsprozesse beinhaltet und der Anteil nicht extrahierbarer Rückstände entstandene Transformationsprodukte teilweise mit einschließt.

Nicht extrahierbare Rückstände von Sulfonamiden werden z.B. durch kovalente Bindung an organisches Bodenmaterial gebildet. Eine Bildung dieser nicht extrahierbaren Transformationsprodukte ist durch mikrobiologische, enzymatische oder rein chemische Prozesse möglich [471-473].

Kreuzig et al. konnten in Untersuchungen mit verschiedenen radiomarkierten Sulfonamiden (^{14}C -Sulfonamide) eine nach dem Eintrag in Böden sofortige Bildung nicht zu extrahierender Rückstände feststellen [9,10,452,470,474]. Die Extrahierbarkeit (mit Ethylacetat) der Sulfonamide aus den beregneten Versuchsböden nahm mit zunehmender Kontaktzeit schnell ab. Unter Freilandbedingungen waren bereits nach 28 Tagen keine Sulfonamide (Sulfadiazin, Sulfaimidin, Sulfamethoxazol) oberhalb der Bestimmungsgrenze nachweisbar. Kreuzig et al. schlossen auf eine schnelle Bildung nicht extrahierbarer Rückstände (durchschnittlich 96% der applizierten Radioaktivität), da die Mineralisationsrate vernachlässigbar war und keine oder nur ein geringer Teil der applizierten Sulfonamide (keine Verlagerung im Freilandversuch; im Lysimeterversuch ca. 5% der Radioaktivität im Perkolat) mit dem Sickerwasser transportiert wurden. Da es sich bei der Extraktion mittels Ethylacetat aber nicht um eine erschöpfende (exhaustive) Extraktionsmethode handelt können die ermittelten Rückstandswerte nicht eindeutig bzw. vollständig den „nicht extrahierbaren Rückständen“ im Sinne der IUPAC-Definition (siehe Kapitel 3.4.1) zugeordnet werden. Durch weitere Behandlung mit saurem Methanol und Silylierung mit Chlortrimethylsilan konnten Kreuzig et al. bis zu 30% der applizierten Radioaktivität extrahieren, wobei der Anteil des unveränderten Sulfonamids (Sulfadiazin) lediglich bis zu 3% betrug [9]. Um welche Art von Rückständen es sich bei der verbleibenden extrahierten Radioaktivität handelt blieb unklar. Wahrscheinlich handelt es sich dabei teilweise um verschiedene Transformationsprodukte/Metabolite, da in den Bodenproben auch N4-Acetyl-Sulfonamide und weitere nicht identifizierte Transformationsprodukte nachgewiesen werden konnten. Nach Kreuzig et al. ist davon auszugehen, dass die nach der Silylierung nicht freigesetzten Sulfonamide kovalent an die Bodenmatrix gebunden sind. Es ist ergänzend anzumerken, dass es sich aber bei der nicht zugeordneten extrahierten Radioaktivität (teilweise) auch um an Humuspolymer-Bruchstücke kovalent gebundene Sulfonamidrückstände handeln kann (siehe Kap. 3.4.1).

Neueste Untersuchungen von Förster et al. zeigten dagegen, dass Sulfonamide (Sulfadiazin) im Boden zu einem großen Teil sequestriert vorliegen [353]. In diesen Untersuchungen wurde ein exhaustives Extraktionsverfahren durch sequentielle Extraktion mit CaCl_2 -Lösung, Methanol und Acetonitril/Wasser (mit Mikrowellenunterstützung, Temperatur: 150°C) verwendet. Während die Extrahierbarkeit mit CaCl_2 -Lösung und Methanol in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kreuzig et al. schnell abnahm und sehr gering wurde, konnten aus den Bodenproben durch die mikrowellenunterstützte Extraktion mit Acetonitril/Wasser auch noch nach über 200 Tagen mit ca. 45% noch bedeutende Anteile von Sulfonamiden (Summe: Sulfadiazin und N4-OH-Sulfadiazin) extrahiert werden. Der Anteil der durch Acetonitril/Wasser extrahierbaren Sulfonamide nahm mit der Zeit ab, wobei der Rückgang in der Extrahierbarkeit zum Großteil innerhalb der ersten Tage stattfand und

sich danach langsam ein annähernd konstantes Extraktionsniveau einstellte. Anhand dieser und weiterer Daten der Untersuchungen ist abzuschätzen, dass Sulfonamide über Jahre in Böden persistieren und auch die Möglichkeit einer langsamen Freisetzung von sequestrierten Sulfonamiden besteht.

Alexy et al. stuften das Sulfonamid Sulfamethoxazol als nicht leicht biologisch abbaubar ein [207] und Kreuzig et al. ermittelten für Sulfonamide (Sulfamethoxazol, Sulfadiazin) für einen Zeitraum von 102 Tagen eine vernachlässigbare Mineralisationsrate von 2% [9,10,470]. Ein Photoabbau ist für Sulfonamide zwar möglich, wobei dieser aber nur an der direkten Bodenoberfläche bzw. bei der Gülleausbringung von Relevanz ist [382,475].

In welchem Umfang Sulfonamide im Boden tatsächlich abgebaut werden geht aus der Literatur nicht eindeutig hervor. Blackwell et al. ermittelten Halbwertszeiten von 2,8 Tage und 3,5 Tage für das Sulfonamid Sulfachloropyridazin in einem sandigen Lehm Boden bzw. einem lehmigen Tonboden [343]. Für Sulfadiazin im Boden ermittelten Kreuzig et al. eine Halbwertszeit von 3 Tagen [474]. Demgegenüber wurden nach Thiele-Bruhn für Sulfaimidin (lehmiger Sand- und toniger Schluffboden) Abbauraten von nur 0,2-0,7% innerhalb von 64 Tagen ermittelt [81]. Diese großen Unterschiede in den Abbauraten der Sulfonamide in Böden sind auch durch weitere Untersuchungen belegt [81,351]. Eine Erklärung für diese deutlichen Unterschiede in den Abbauraten liefern die Untersuchungen Förster et al., welche für Sulfadiazin in verschiedenen Böden Halbwertszeiten zwischen 10 und 490 Tagen ermittelten [353]. Die Unterschiede in den Halbwertszeiten sind dabei maßgeblich auf das verwendete Extraktionsverfahren zurückzuführen. Bei milden Extraktionsverfahren betrugen die ermittelten Halbwertszeiten 10-24 Tage, während sie bei der mikrowellenunterstützten Extraktion mit Acetonitril/Wasser zwischen 290 und 490 Tagen lagen.

Werden sequestrierte Sulfonamide analytisch nicht mit erfasst, wie es bei milden Extraktionsverfahren z.B. bei Blackwell et al. und Kreuzig et al. der Fall ist, können zwangsläufig nur niedrige Halbwertszeiten ermittelt werden. Diese Halbwertszeiten sind daher nicht mit einem Abbau gleichzusetzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Böden eingetragene Sulfonamide zwar in Oberflächengewässer und ins Grundwasser verlagert werden, aber es bezüglich ihres Abbau-Verhaltens in der Literatur keine einheitliche Auffassung/Datenlage gibt. Da die Extrahierbarkeit von Sulfonamiden (und ihrer Metabolite) von dem eingesetzten Extraktionsverfahren abhängig ist und ältere Untersuchungen in der Regel auf milden Extraktionsverfahren beruhen, sind keine gesicherten Aussagen über das mengenmäßige Vorkommen von Sulfonamiden in Böden möglich. Es ist davon auszugehen, dass der Gehalt von Sulfonamiden (und ihrer Metabolite) in der Vergangenheit unterschätzt wurde.

4 Stand der Analytik zur Bestimmung von Antibiotika im Boden

Zum Nachweis und zur Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden existieren eine Vielzahl von Methoden und Verfahren. Für die Bestimmung dieser Antibiotika in Umweltmatrices sind im Gegensatz zur Analytik von Lebensmitteln nur wenige leistungsfähige Analysemethoden beschrieben worden [81,482]. Dies gilt insbesondere für komplexere Matrices wie Boden und Gülle, welche im Vergleich zu wässrigen Matrices meist einer aufwendigeren Probenvorbereitung und LC/MS-Analytik bedürfen. Grote et al. entwickelten diesbezüglich schon eine auf LC-MS/MS basierende Methode zur Bestimmung von Chlortetracyclin und Sulfadiazin in Gülle [478].

Ein wesentlicher Punkt für die Effektivität und Effizienz der einzelnen Methoden und Verfahren in Bezug auf einen bestimmten Analyten liegt darin begründet, ob nur ein Analyt oder gleichzeitig mehrere z.T. völlig verschiedene Analyte nachgewiesen bzw. quantifiziert werden sollen. Tetracycline und Sulfonamide unterscheiden sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften, so dass bei einer gleichzeitigen Bestimmung von Analyten aus diesen beiden Gruppen die Optimierung der Methoden und Verfahren für alle Einzelanalyte einen Kompromiss darstellt. Gleiches gilt, zwar in geringerem Ausmaß, für die Methoden und Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von verschiedenen Tetracyclinen bzw. Sulfonamiden. Der Vorteil einer Methode bzw. Verfahrens für Einzelanalyte liegt damit bei der Möglichkeit der maximalen Optimierung von Nachweisfähigkeit und Wiederfindung dieser in einer bestimmten Matrix. Demgegenüber bieten Multimethoden bzw. –verfahren den Vorteil einer Zeit- und Kostenersparnis durch ganz oder zumindest teilweise gleichzeitige Arbeitsschritte für die zu untersuchenden Analyte und führen damit zu einem höheren Probendurchsatz bei gleicher Zeit. Des Weiteren müssen die Probenvorbereitung (Extraktion, Anreicherung, Aufreinigung) und die Bestimmungsmethode auf die Matrix, in der die Analyte vorliegen, abgestimmt werden.

Im Folgenden werden einzelne Bestimmungsmethoden für die Tetracyclin- und Sulfonamidanalytik aufgeführt und im Anschluss wird eine Übersicht der angewendeten Probenvorbereitung zur Spurenanalyse dieser Antibiotika im Boden gegeben.

4.1 Bestimmungsmethoden für Tetracycline und Sulfonamide

Die überwiegende Anzahl der Bestimmungsmethoden für Tetracycline und Sulfonamide beruht auf einer chromatographischen Trennung mit anschließender Detektion, da auf diese Weise in einem Analysengang mehrere Analyte bestimmt werden können. Die am häufigsten in der Tetracyclin- und Sulfonamidanalytik eingesetzte chromatographische Methode ist die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), welche mit einer Vielzahl von Detektoren koppelbar ist. Die Trennleistung der HPLC wird dabei von den instrumentellen Einstellungen (z.B. Flussrate) und der Wahl der HPLC-Säule (Material, Durchmesser, Länge, Partikelgröße) beeinflusst. Für die Analytik dieser Antibiotikagruppen sind mit der HPLC gekoppelte optische Detektoren (UV, UV/vis, DAD) weit verbreitet [137,236-259]. Als Bestimmungsmethode werden diese HPLC-Systeme für Messproben, welche aus verschiedenen Matrices wie z.B. Blutplasma [248], Knochen [249], Fleisch [250], Milch [251], Shrimps [251], Fisch [252,253], Honig [254-256], Abwasser [257] oder Gülle/Mist [258,259] stammen, eingesetzt.

Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften der Tetracycline wird bei der Tetracyclinanalytik auch der Fluoreszenzdetektor (FLD) eingesetzt, da die Eigenfluoreszenz der Tetracycline allerdings nur schwach ist, erfolgt eine Nachsäulenderivatisierung zu den iso-Tetracyclinen oder zu stark fluoreszierenden Tetracyclin-Metall-Komplexen [119,143,260-266].

Sulfonamide werden durch entsprechende Nachsäulenderivatisierung ebenfalls mittels FLD bestimmt [267-269]. Für die Bestimmung von Tetracyclinen sind neben der nach Anregung mittels elektromagnetischer Strahlung (im UV-Bereich) ermittelten Fluoreszenz auch Verfahren bekannt, die auf Chemilumineszenzmethoden aufbauen [270-273]. Des Weiteren werden elektrochemische Detektoren zur Tetracyclin- und Sulfonamidanalytik verwendet [274-278].

Neben der HPLC finden noch Kapillarelektrophorese (CE) [314-320], Dünnschichtchromatographie (TLC) [321,322] und Gaschromatographie (GC) [323-326] als weitere Trenntechniken in der Tetracyclin- und Sulfonamidanalytik Anwendung. Für eine Bestimmung mittels Gaschromatographie ist allerdings eine Derivatisierung der Analyte nötig. Eine Derivatisierung der Tetracycline zu den Trimethylsilyl-Derivaten ist zwar möglich, hat aber wegen der hohen Siedepunkte dieser Derivate im Unterschied zu den Sulfonamiden keine praktische Bedeutung [327]. Tetracycline und Sulfonamide können zudem durch mikrobiologische Tests wie Eclipse 100® [328] oder Rezeptortests wie Tetrasensor® [329] nachgewiesen werden. Auch immunologische Verfahren wie ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [258,330-335] werden aufgrund ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit zunehmend als Screening-Tests eingesetzt. Die Kopplung von HPLC mit einem mikrobiologischen Assay stellt ein besonders selektives Verfahren dar, welches zur Identifizierung von aktiven Metaboliten geeignet ist [336].

Im zunehmenden Umfang werden Massenspektrometrische Detektoren (MS, MS/MS) eingesetzt [279-311], da bei diesen Methoden, dies gilt insbesondere für Tandem-Systeme, eine große Selektivität und Empfindlichkeit bei gleichzeitiger Möglichkeit einer Strukturabsicherung erreicht werden kann. Da insbesondere bei der Extraktion von Bodenproben oftmals hohe Anteile von störenden Matrix-Komponenten ko-extrahiert werden, sind hier vor allem HPLC-MS/MS-Methoden im Einsatz.

HPLC-MS-Methoden werden ebenso wie die zuvor genannten HPLC-UV (-UV/vis, -DAD)-Methoden für die Tetracyclin- und Sulfonamid-Bestimmung in einer großen Anzahl verschiedener Matrices wie Wasser (Ab-, Oberflächen- und Grundwasser) [279-289], Urin [290-291], Gülle [292-294], Boden [295-296], tierisches Gewebe [297-299], Pflanzen [96,201,203] und Nahrungsmittel tierischen Ursprungs (Eier [138,300], Milch [301-303], Fleisch [304-306], Shrimps [307], Fisch [308], Honig [309-311]) angewendet.

Die HPLC bietet neben einer großen Auswahl der verschiedenen mit ihr gekoppelten Detektionsmethoden auch die Möglichkeit, eine online-SPE für die Sulfonamid- und Tetracyclinanalytik zu integrieren [312,313]. Durch den Einsatz einer mit einem HPLC-System gekoppelten online-SPE kann im Vergleich zu einer herkömmlichen (manuellen bzw. externen) SPE die Reproduzierbarkeit erhöht, die Wiederfindung verbessert und Analysezeit eingespart werden [313].

Im Rahmen dieser Arbeit wird daher die LC-MS/MS zur Bestimmung von Arzneimittelrückständen in Böden eingesetzt.

4.2 Vorbereitung von Bodenproben

Die bekannten leistungsfähigen Analyseverfahren für die Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Böden beinhalten einen Extraktionsschritt, die Reinigung und Aufkonzentrierung der Extrakte mittels SPE (Solid Phase Extraction) und eine Bestimmungsmethode für die Analyte. Für die Bestimmung von Rückstandsspuren dieser Arzneistoffe im Boden sind HPLC-MS/MS-Verfahren [103,296,337-339] oder nach entsprechender Probenreinigung (Cleanup) auch HPLC-UV-Verfahren [340-344] im Einsatz. Raich-Montiu et al. bestimmten Spurenkonzentrationen von Sulfonamiden mittels HPLC-FLD unter Verwendung einer Nachsäulenderivation mittels Fluorescamin [479].

Für die Probenvorbereitung sind vor allem die physiko-chemischen Eigenschaften der unterschiedlichen Tetracycline und Sulfonamide zu berücksichtigen (s. Kap. 3.3).

4.2.1 Extraktion

Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften der Analyte werden meist schwach saure Puffer in Kombination mit einem organischen Lösungsmittel eingesetzt. Eine Komplexbildung soll dabei durch eine Zugabe von Agenzien wie EDTA, Citrat oder Oxalsäure unterbunden werden. Zur Extraktion von Tetracyclinen und Sulfonamiden wurde hauptsächlich die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) eingesetzt. Lösungsgemische, die zur Extraktion von Tetracyclinen und Sulfonamiden aus Bodenproben mittels LLE eingesetzt wurden, sind Gemische aus Zitronensäure/Aceton/Ameisensäure [331], Methanol/McIlvaine-Puffer [345], Methanol/EDTA/McIlvaine-Puffer [103,344], Citrat-Puffer/Ethylacetat [92], Methanol/Citrat-Puffer [339], EDTA/Zitronensäure/Phosphat-Puffer [340] und NaCl/Oxalsäure/Wasser [93]. In einigen Fällen wurde auch eine Pressurized Liquid Extraktion (PLE) [337,339,346,462], eine Soxhlet-Extraktion (mit Methanol) [338] oder eine Mikrowellen-unterstützte Extraktion (mit Acetonitril) [479] für Tetracyclin- und/oder Sulfonamid-Antibiotika verwendet. Durch sequentielle Extraktion, wie z.B. mit CaCl_2 -Lösung, Methanol und Acetonitril/Wasser (mit Mikrowellenunterstützung, Temperatur: 150°C), ist eine bewertende Einteilung in eine (bio-)verfügbare, potentiell bioverfügbare und eine nicht verfügbare Rückstandsfraktion von Sulfonamiden möglich [353,480].

4.2.2 Anreicherung der Analyte und Aufreinigung der Bodenextrakte

Nach der Extraktion erfolgten eine Anreicherung der Analyte und eine Aufreinigung (Clean-Up) der extrahierten Lösungen mittels Festphasenextraktion (SPE). Als Sorbens werden dabei häufig relativ unspezifische Polymerphasen wie z.B. bei der Oasis-HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) [331,338-344,347,348] eingesetzt, aber auch für die jeweiligen Antibiotika finden spezifische Sorbensmaterialien Anwendung. Dazu zählt für Tetracycline die Metall-Chelat-Affinitäts-Chromatographie (MCAC), welche die Komplexbildungseigenschaften der Tetracycline ausnutzt [345]. Für Sulfonamide ist die Aminopropyl-SPE eine geeignete Methode [349].

Um Huminstoffe, welche Matrixbestandteile der Bodenextrakte sind, besser entfernen zu können, werden Polymerphasen wie die HLB auch mit Anionenaustauscherharzen (SAX) gekoppelt [331,339-344].

Erst durch eine Kopplung von HLB- und SAX-SPE-Kartuschen ist es Blackwell et al. möglich gewesen, die HPLC-UV als leistungsfähige Bestimmungsmethode von Antibiotikaspuren in komplexen Umweltmatrices wie Gülle und Boden einzusetzen [344].

Auch spezielle Methoden wie die Solid-Phase-Immuno-Extraction (SPIE) wurden schon durch Grant et al. für die weitere Aufreinigung von Sulfamethazine and N4-Acetylsulfamethazine aus Bodenextrakten eingesetzt. Bei dieser Methode wurde eine herkömmliche HLB-SPE mit einer Immuno-Affinitäts-Chromatography (IAC) gekoppelt [350].

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Untersuchung auf Antibiotikarückstände in einem gülle-beaufschlagten Boden

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns war keine sichere Aussage über Vorkommen und Verhalten von Antibiotika in den Böden landwirtschaftlicher Nutzflächen, sowie ihrer Exposition in andere Umweltkompartimente wie Oberflächen- und Grundwasser, möglich.

Als Konsequenz konnten auch keine Prognosen über den denkbaren Transfer Boden – Pflanze und einer davon abhängigen Risikoeinschätzung für den Menschen gemacht werden. Das Projekt „*Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente*“ [476] (kurz: „*Antiinfektiva-Projekt*“) sollte daher einen Beitrag zur Aufklärung dieser Zusammenhänge und zur Abschätzung der Umweltbelastung liefern.

Um realistische Aussagen über den Verbleib der durch organische Düngung in den Boden eingetragenen Antibiotika treffen zu können, wurden unter praxisnahen landwirtschaftlichen Bedingungen arzneimittelfrei aufgezogene Ferkel mit Sulfadiazin (SFD), Trimethoprim (TMP) und Chlortetracyclin (CTC) kontrolliert medikamentiert, die erhaltene Arzneistoff-belastete Schweinegülle (nach 8-monatiger Lagerung) auf Versuchspartzellen ausgebracht, Nutzpflanzen (Feldsalat und Winterweizen) ausgesät und beerntet.

Diese Arbeit befasst sich im Rahmen des oben geschilderten Projektes nur mit dem Bereich des Rückstands- und Transportverhaltens der Arzneistoffe bzw. ihrer Metabolite und Umwandlungsprodukte im Gülle-beaufschlagten Boden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren schon Teilbereiche des Projekts abgeschlossen, deren Ergebnisse für die Interpretation und Schlussfolgerungen in dieser Arbeit von wesentlicher Bedeutung sind. Daher soll der damit im Zusammenhang stehende Projektverlauf mit den dazu nötigen Teilergebnissen in einer Beschreibung der Ausgangssituation im Vorfeld dargestellt werden.

5.1.1 Ausgangssituation - Projektverlauf

Zu Beginn des Projektes war Arzneistoff-belastete Gülle aus einer Ferkelaufzucht unter kontrollierter Fütterung und Medikation (CTC, SFD, TMP) an der FAL Braunschweig (heute: FLI Braunschweig) gewonnen worden. Diese wurde über einen Zeitraum von 7-8 Monaten entsprechend landwirtschaftlich üblicher Praxis gelagert und monatlich beprobt (FH Südwestfalen, Abteilung Soest). Während der 8-monatigen Lagerung wurden in der Gülle CTC und SFD nur bis zu 50 - 60 % abgebaut, TMP war dagegen schon nach 1-monatiger Lagerung nicht mehr nachweisbar. Nach 8-monatiger Lagerung enthielt die Gülle noch hohe Rückstandsmengen der eingesetzten Antibiotika von 181,3 mg/kg für SFD und 16,2 mg/kg

CTC (inkl. e-CTC). Als Metaboliten bzw. Umwandlungsprodukte waren noch 10,9 mg/kg N4-SFD, 39,8 mg/kg iso-CTC (inkl. e-iso-CTC) und 1,4 mg/kg anhydro-CTC in der Gülle enthalten [476].

Diese Gülle wurde zur organischen Düngung von Versuchsfeldern ausgebracht. Mit der Gülle wurden auch erhebliche Antibiotikafrachten in den Boden eingetragen. Die Untersuchung der Bodenproben, welche über einen mehrmonatigen Zeitraum von diesen Feldern aus unterschiedlichen Bodentiefen genommen wurden, stand noch aus. Erste Versuche zur Bestimmung der Rückstandskonzentrationen in den Bodenproben waren zu Beginn dieser Arbeit schon unternommen worden.

5.1.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von CTC, SFD und TMP in Bodenproben

5.1.2.1 Entwicklung der HPLC-UV-MS/MS-Methode

Außer e-iso-CTC und N4-SFD waren alle zur Methodenentwicklung eingesetzten Standardsubstanzen kommerziell erhältlich. N4-SFD wurde im Arbeitskreis durch Acetylierung von SFD an N-4 und e-iso-CTC durch Epimerisierung von iso-CTC in schwach saurer Lösung hergestellt (siehe Anhang A.1.3.4).

Die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen wurden im Rahmen der Methodenentwicklung durchgeführt:

- Entwicklung der MS/MS-Detektion durch Aufnahme von Vorläufer- und Produkt-Ionen-Scans aller Substanzen
- Optimierung der Trennleistung des chromatographischen Systems
- Optimierung der UV-Detektion
- Anwendbarkeit der UV- und MS/MS-Detektion auf Bodenproben

Entwicklung der MS/MS-Detektion

Zur Entwicklung der MS/MS-Detektion mittels Ion-Trap-Massenspektrometer wurden die Fragmentierungsmuster aller Substanzen ($\beta=10$ mg/L, in Laufmittel A) im positiven ESI-Modus (ESI^+) ermittelt und die sich daraus ergebenden (Fragment-)Ionen anhand des gemessenen Masse/Ladungs-Verhältnisses einzelnen Vorläufer- und Produkt-Ionen zugeordnet. Die in Tab. 6 aufgeführte Zuordnung der Fragment-Ionen aufgrund ihres m/z-Verhältnisses wurde anhand der Literaturdaten von Hirsch et al. [481], Hamscher et al. [482], Zhu et al. [483], Sacher et al. [484], Hartig et al. [485], A. Vockel [7], Petrovic et al. [486] und Eichhorn et al. [487] erstellt.

Tab. 6: MS/MS-Detektion, Fragmentierung der Analyte

Analyt	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ion 1 [m/z]	Produkt-Ion 2 [m/z]	Produkt-Ion 3 [m/z]
SFD	251 [M+H] ⁺	156 [H ₂ NPhSO ₂] ⁺	174 [H ₂ NPhSO ₂ NH+H] ⁺	-
N4-SFD	293 [M+H] ⁺	198 [CH ₃ COHNPhSO ₂] ⁺	136 [CH ₃ COHNPh+H] ⁺	227 -
TMP	291 [M+H] ⁺	123 [M-C ₆ H ₃ -3CH ₃ O+H] ⁺	230 [M+H-CH ₂ O-CH ₃ O] ⁺	258 [M+H-CH ₃ O-3H] ⁺
iso-CTC	479 [M+H] ⁺	462 [M-NH ₃ +H] ⁺	-	-
CTC	479 [M+H] ⁺	462 [M-NH ₃ +H] ⁺	444 [M-H ₂ O-NH ₃ +H] ⁺	-
anhydro- CTC	461 [M+H] ⁺	444 [M-NH ₃ +H] ⁺	-	-

Durch Änderung der Stoßenergien für die einzelnen Analyte im Ion-Trap-Massenspektrometer wurden gegenüber der ursprünglichen Methode intensitätsstärkere MS-Signale erhalten. Anhand der ermittelten Fragmentierungsmuster, insbesondere unter Einbeziehung der relativen Intensitäten der Fragmentionen, wurden in den Messproben die einzelnen Substanzen im SRM-Modus (Selected Reaction Monitoring) des Ion-Trap-Massenspektrometers identifiziert und quantifiziert (Tab. 7).

Tab. 7: Kenndaten der Analyte für die MS/MS-Detektion

Analyt	M_r [g/mol]	Vorläufer-Ion [m/z]	Stoßenergie [%]	Produkt-Ionen [m/z]	Peakintensitäten [%]
SFD	251,06	251	38	156 173	80-100 80-100
N4-SFD	292,31	293	38	136 198 227	60-85 100 20-50
TMP	290,32	291	45	123 230 258	40-70 100 40-70
e-iso-CTC	478,89	479	28	462	100
iso-CTC	478,89	479	28	462	100
e-CTC	478,89	479	28	444 462	40-70 100
CTC	478,89	479	28	444 462	40-70 100
e-anhydro-CTC	460,87	461	35	444	100
anhydro-CTC	460,87	461	35	444	100

Trennleistung des chromatographischen Systems

Für die chromatographische Trennung der Analyte aus den Güllemessproben wurde eine YMC-Säule (ODS-AM, 150 x 3,0 mm, 5µm) eingesetzt [7].

Wie in Abb. 12 zu sehen ist, sind alle Substanzen mit Ausnahme von SFD und TMP im chromatographischen Lauf getrennt worden.

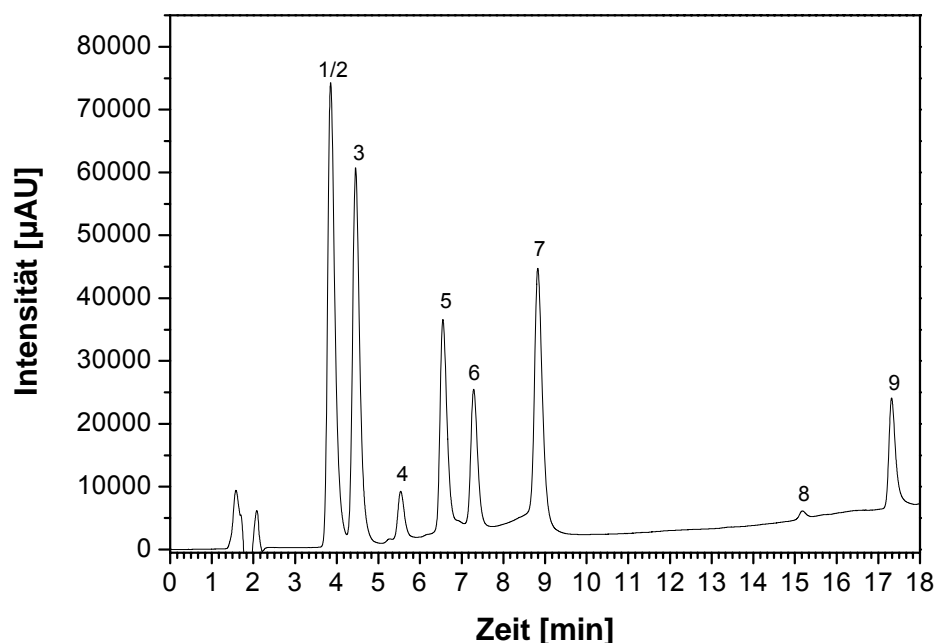


Abb. 12: Trennung der Arzneistoffe im Laufmittelgradienten (s. Anhang A.1.2.1), UV-Detektion (HPLC-DAD-MS/MS, YMC, Total Scan: 190-800 nm)
1: SFD, 2: TMP, 3: N4-SFD, 4: e-iso-CTC, 5: iso-CTC, 6: e-CTC, 7: CTC, 8: e-anhydro-CTC, 9: anhydro-CTC (β =10 mg/L)

Die Retentionszeiten (R_t) für SFD und TMP lagen lediglich 4 Sekunden (MS/MS-Detektion, Abb. 13) auseinander, daher war nur ein gemeinsamer Peak der beiden Analyten im HPLC-DAD-Chromatogramm zu erkennen. Da bei SFD und TMP das UV-Maximum bei 268 nm liegt, war eine Unterscheidung durch UV-Detektion nicht möglich. SFD und TMP unterscheiden sich aber in ihrer Molekülmasse bzw. in ihren m/z -Verhältnissen, und somit kann auch bei nicht getrennten Peaks eine Bestimmung beider Substanzen mittels LC-MS erfolgen. Die chromatographische Trennung von e-iso-CTC, iso-CTC, e-CTC und CTC bleibt sehr wichtig, da diese Substanzen alle die gleiche Molekülmasse (Vorläufer-Ionen) besitzen. Die dafür erforderliche Trennleistung gewährleistet das chromatographische Verfahren. Entsprechendes gilt für die Trennung von e-anhydro-CTC und anhydro-CTC. Um aber alle Analyte mittels HPLC-UV bestimmen zu können, musste die Trennleistung des chromatographischen Systems weiter optimiert werden.

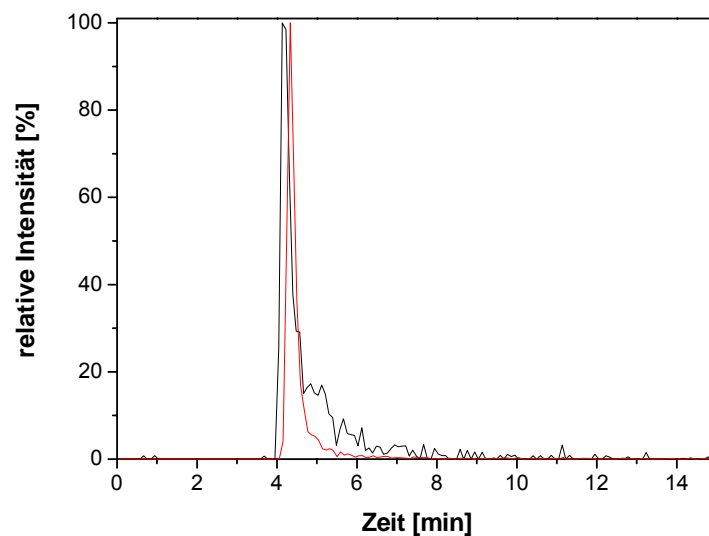


Abb. 13: Chromatogramme von SFD (schwarz) und TMP (rot), HPLC-MS/MS (YMC, TIC-SRM MS², β =10 mg/L)

Optimierung der HPLC-Methode

Die Trennung der Analyte mittels HPLC ist zum einen von der Laufmittelzusammensetzung und zum anderen von der HPLC-Säule abhängig. Eine Verbesserung der Trennung (Abb. 14) von SFD und TMP bei gleicher Trennleistung für die übrigen Substanzen brachte die Verwendung einer Phenomenex-Säule (Synergi 4 μ Hydro-RP, 250 x 2,00 mm). Somit war eine Bestimmung dieser beiden Komponenten auch mittels UV-Detektion möglich. Um die analytische Säule vor Verunreinigungen durch Matrixbestandteile der Bodenproben zu schützen, wurde dieser eine Vorsäule (Phenomenex C18-ODS, 4 x 2 mm) vorgeschaltet. Ein weiterer Peak (Abb. 14; 6a) konnte neben e-CTC (Enolstruktur) dem durch Keto-Enol-Tautomerie gebildeten e-CTC (Ketostruktur) mittels Spektrenvergleich zugeordnet werden. Die ermittelten Retentionszeiten der einzelnen Substanzen, welche als Merkmal zur Identifizierung dienen, sind in Tab. 8 aufgeführt.

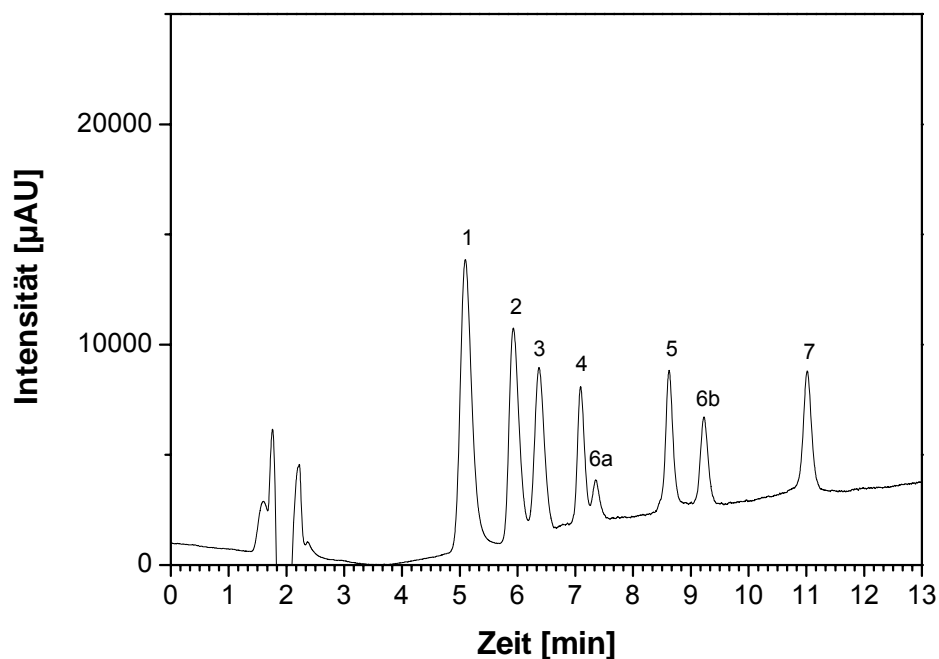


Abb. 14: Trennung der Analyte, UV-Detektion (HPLC-DAD-MS/MS, Phenomenex, Total Scan: 190-800 nm)
1: SFD, 2: TMP, 3: N4-SFD, 4: e-iso-CTC, 5: iso-CTC, 6a: e-CTC (Keto), 6b: e-CTC (Enol), 7: CTC (β =2 mg/L)

Entwicklung der UV-Detektion

Zur Entwicklung der UV-Detektion mittels Dioden-Array-Detektor wurden die UV/vis-Spektren (Abb. 15) während des chromatographischen Laufes aufgenommen und die Messwellenlängen anhand der Absorptionsmaxima ermittelt. Das Absorptionsmaximum bei 232 nm stammt dabei vom chromatographischen Laufmittel (Acetonitril/Wasser/Ameisensäure). Die Absorptionsmaxima der einzelnen Analyte und ihre Retentionszeiten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

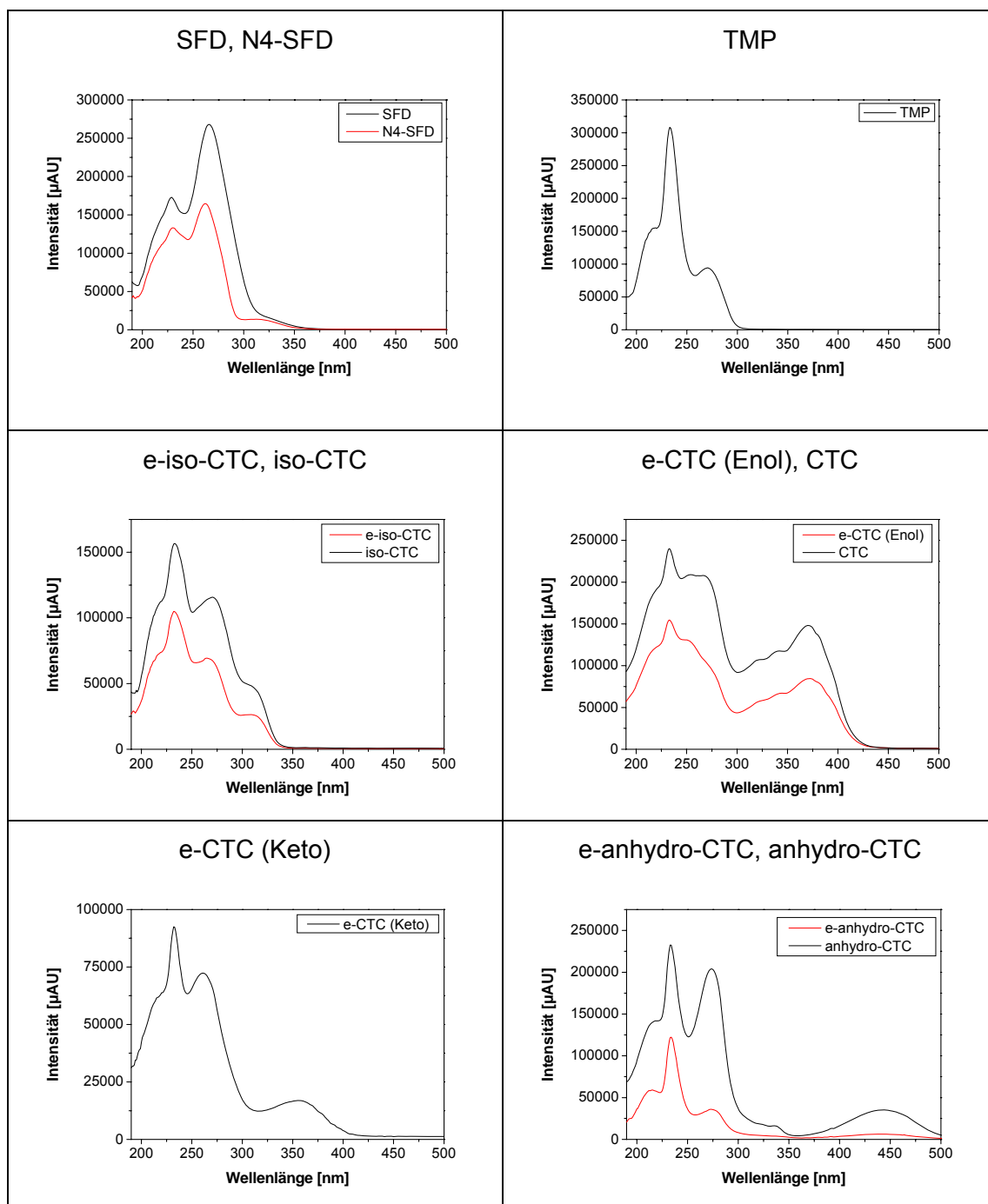


Abb. 15: Aus dem chromatographischen Lauf ermittelte UV/vis-Spektren (HPLC-DAD-MS/MS, Phenomenex, Total Scan: 190-800 nm, β = 10 mg/L, Laufmittelgradient: Acetonitril/Wasser/Ameisensäure)

Tab. 8: UV-Absorptionsmaxima und Retentionszeiten der einzelnen Analyte (HPLC-DAD-MS/MS, Phenomenex, Total Scan: 190-800 nm, β = 10 mg/L, Laufmittelgradient: Acetonitril/Wasser/Ameisensäure)

Substanz	R _t [min]	Absorptionsmaximum [nm]
SFD	5,1	266
N4-SFD	5,9	263
TMP	6,4	270
e-iso-CTC	7,1	270 308
iso-CTC	8,6	270 308
e-CTC (Keto)	7,3	265 357
e-CTC (Enol)	9,2	265 370
CTC	11,1	265 370
e-anhydro-CTC	17,9	273 444
anhydro-CTC	19,7	273 444

Zur Quantifizierung wurden anhand der ermittelten Absorptionsmaxima die Wellenlängen 270 nm und 370 nm als Messwellenlängen festgelegt.

Die Bestimmung von e-CTC (Keto), e-CTC (Enol) und CTC mittels UV-Detektion erfolgte bei 370 nm, da hier die iso-CTC's keine UV-Adsorption zeigten (Abb. 16). Alle übrigen Substanzen sollten bei 270 nm bestimmt werden.

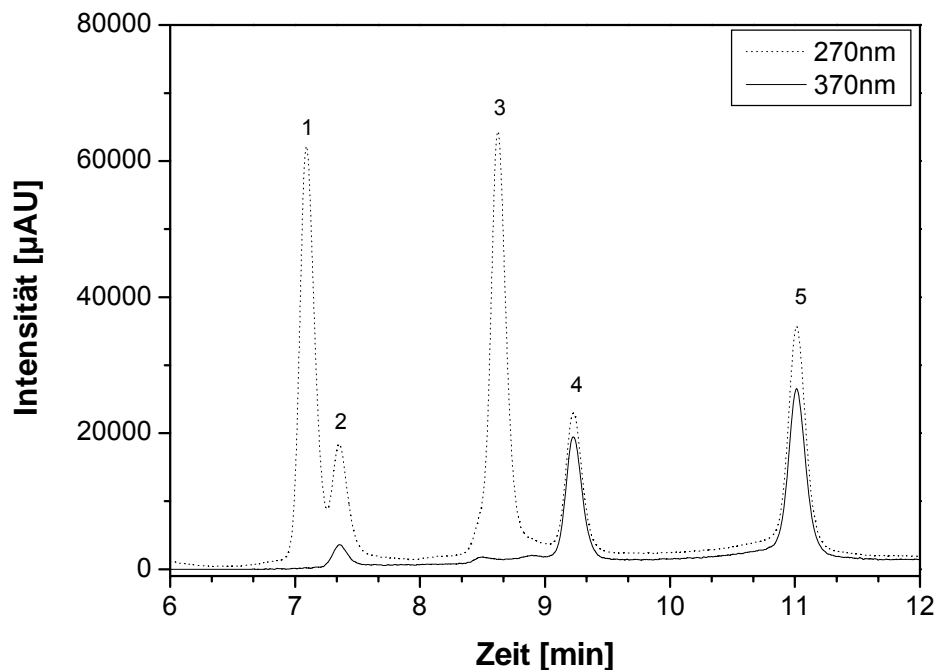


Abb. 16: Identifizierung der CTC's durch Variation der Messwellenlänge, UV-Detektion bei 270 und 370 nm (HPLC-DAD-MS/MS, Phenomenex, Total Scan: 190-800 nm, β = 10 mg/L, Laufmittelgradient: Acetonitril/Wasser/Ameisensäure), 1: e-iso-CTC, 2: e-CTC (Keto), 3: iso-CTC, 4: e-CTC (Enol), 5: CTC

Überprüfung der Anwendbarkeit von UV- und MS/MS-Detektion bei Bodenproben

Matrixkomponenten dürfen die Bestimmungsverfahren nur bis zu einem gewissen Grad störend beeinflussen [81]. Es war daher zu überprüfen, in welchem Maße ko-extrahierte Matrixbestandteile der Bodenproben die Bestimmungsverfahren mit UV- und MS/MS-Detektion beeinflussen. Zu diesem Zeitpunkt waren Verfahren zur Extraktion und SPE entwickelt bzw. überprüft worden (s. Kap. 5.1.2.2), so dass zwei aufgearbeitete unbelastete Bodenproben („Nullprobe“, Anhang A.1.4.2) zur Verfügung standen.

Der Vergleich der Chromatogramme bei UV-Detektion (270 und 370 nm) zwischen der aufgearbeiteten Bodenprobe und dem reinen Laufmittel zeigt, dass Matrixbestandteile in diesen Messbereichen Absorption zeigen (Abb.17). Die Intensität der Peaks der Bodenextrakte liegt dabei um ein Vielfaches über der des Laufmittels, was einen hohen Anteil mitextrahierter Bodenmatrix anzeigt. Zusätzlich fallen die Retentionszeiten einiger Peaks im Chromatogramm der extrahierten Bodenmatrix mit denen der zu detektierenden Substanzen zusammen. Eine Bodenmatrixlösung mit je 250 µg/L SFD, e-iso-CTC, iso-CTC, e-CTC und CTC zeigte keine erkennbaren Peaks im Chromatogramm, da die Bodenmatrix hier die entsprechenden Peaks überlagerte (Abb. 18).

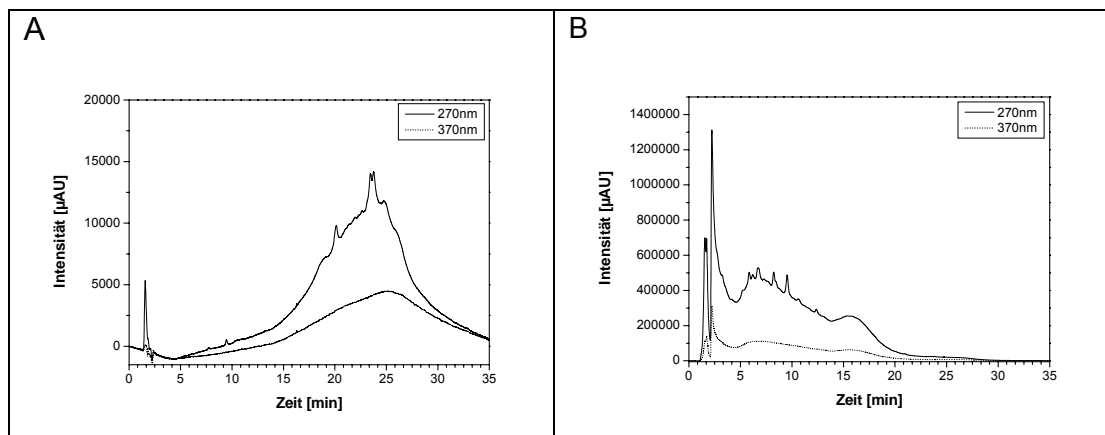


Abb. 17: Einfluss der Bodenmatrix auf die UV-Detektion, HPLC-UV (Wellenlänge: 270 und 370 nm) A: Laufmittel, B: Bodenmatrix

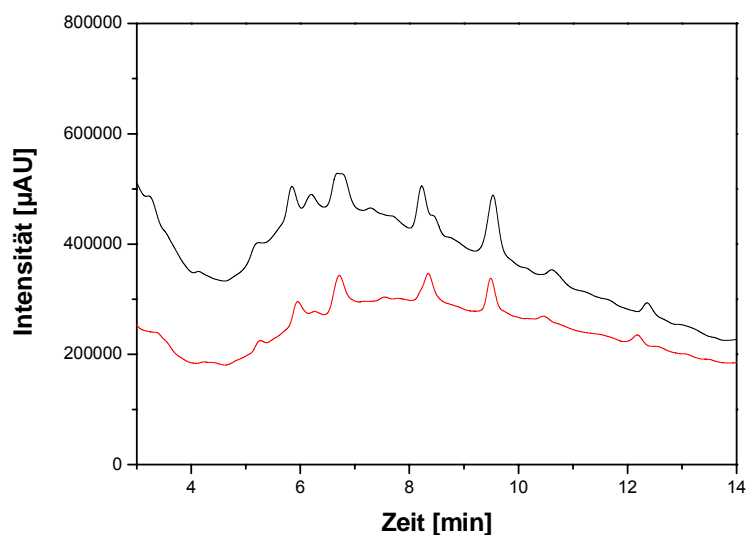


Abb. 18: Vergleich HPLC-UV (270 nm) zwischen extrahierter Bodenmatrix (rot) und SFD, e-iso-CTC, iso-CTC, e-CTC, CTC ($\beta = 250 \mu\text{g/L}$, in Bodenmatrix, schwarz)

Eine quantitative Bestimmung der Substanzen im Boden mittels UV-Detektion war somit bei niedriger Analytkonzentration nicht möglich gewesen.

Bei der MS/MS-Detektion war hingegen das Rauschen in dem Chromatogramm der aufgearbeiteten Bodenprobe, welche mit einer Kalibrierlösung einer Konzentration von $250 \mu\text{g/L}$ aufgenommen wurde, gering. Die maximale Intensität des Rauschens sowohl für SFD (Abb. 19), als auch die CTC's (e-iso-CTC, iso-CTC, e-CTC, CTC, (Abb. 20)) lagen jeweils unter 10% (relative Intensität) bzw. es lag ein Signal/Rausch Verhältnis von größer 10:1 vor. Die MS/MS-Detektion wurde daher zur quantitativen Analyse der güllebeaufschlagten Bodenproben eingesetzt.

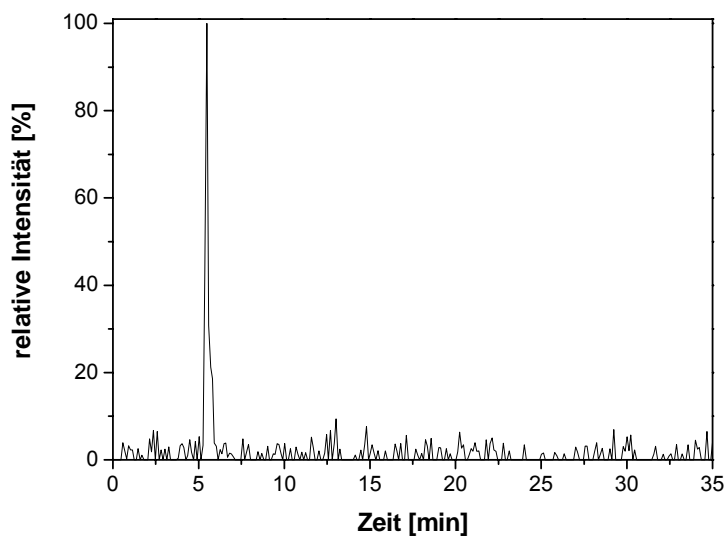


Abb. 19: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm, SFD (m/z 251 > 156, 174; TIC-SRM MS^2 , $\beta=250$ $\mu\text{g/L}$ in (Boden-)Matrix)

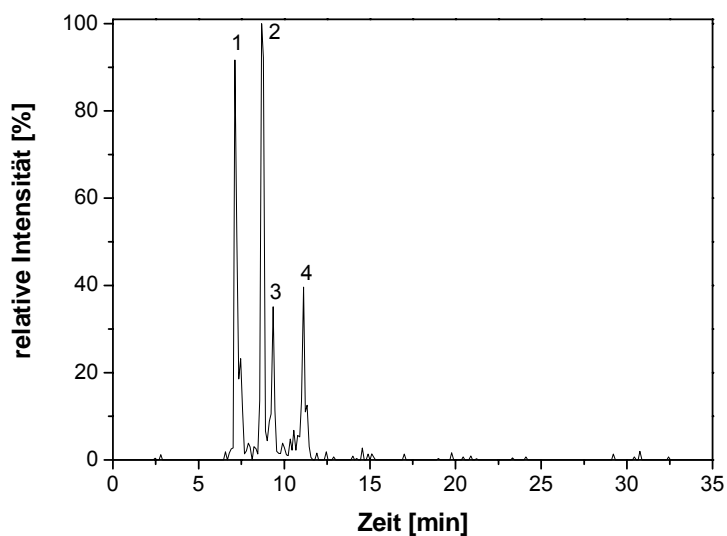


Abb. 20: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm (m/z 479 > 462, 444; TIC-SRM MS^2 , $\beta=250$ $\mu\text{g/L}$ in (Boden-)Matrix) 1: e-iso-CTC, 2: iso-CTC, 3: e-CTC, 4: CTC

Die Fragmentierungsmuster und relativen Peakintensitäten der Analyte in Matrix entsprachen dabei denen in Laufmittel A. Das war insofern von Bedeutung, da nur bei Übereinstimmung der Fragmentierungsmuster und zugehörigen prozentualen Intensitäten, das größte Signal oder der Mittelwert aus allen Signalen quantitativ ausgewertet werden darf [488,489].

Die Quantifizierung erfolgte über den Totalionenstrom (TIC) der einzelnen Fragmentionen (MS^2), da dieser eine höhere Intensität aufwies.

5.1.2.2 Entwicklung der Probenaufbereitung

Ausgangs-Problematik des Analyseverfahrens für die Bodenproben

Ein im Arbeitskreis entwickeltes Verfahren (Extraktion, SPE, HPLC-UV-MS/MS) zur Bestimmung von SFD, N4-SFD, CTC, e-CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, anhydro-CTC und TMP in Gülle [478] sollte auf die Analyse von Bodenproben übertragen werden.

Zur Extraktion der Analyte wurde ein wässriger McIlvaine-Puffer (0,1 mol/L EDTA, pH 4) eingesetzt. In den aus den Bodenextrakten gewonnenen Messproben ließen sich damit aber aufgrund zu geringer Konzentrationen keine Analytspuren quantifizieren. Auch andere Extraktionsmittel/-methoden wurden daraufhin erfolglos erprobt:

- Citratpuffer verschiedener pH-Werte; ohne und mit EDTA-Zusatz, ohne und mit Mikrowellenunterstützung,
- verdünnte Salzsäure (10^{-3} – 1,0 mol/L HCl), mit und ohne Methanolzusatz, bei Raumtemperatur und unter Erwärmen,
- Essigsäureethylester zur ergänzenden Solventextraktion organisch gebundener Tetracycline.

Die abgeschätzten Konzentrationen für die daraus gewonnenen Messproben hätten mit der verwendeten HPLC-UV-MS/MS-Methode jedenfalls sicher zu erfassen sein sollen. Darauf folgende Sorptionsuntersuchungen (s. Abb. 21) kamen zu dem Ergebnis, dass SFD und N4-SFD nur geringfügig vom Boden sorbiert werden, die anderen dotierten Komponenten, TMP und die Tetracyclinderivate (CTC, iso-CTC, Anhydro-CTC), aber in hohem Maße. Fast unmittelbar nach Vereinigung von Bodenphase und Arzneistofflösung stellten sich die Sorptionsgleichgewichte ein. Die Auswaschbarkeit (simulierter Regen) der Adsorbate verhielt sich dabei erwartungsgemäß reziprok zum Sorptionsgrad [476].

Aufgrund dieser Ergebnisse war zu erwarten, dass die in der Gülle vorliegenden Chlortetracyclin-Komponenten und Trimethoprim nach der Güllebeaufschlagung in den oberen Bodenhorizonten angereichert wurden. Dagegen könnten die Sulfonamid-Einträge, obwohl diese in erheblich höherer Konzentration in vorlagen, durch Starkregen, der nach Gülleausbringung aufgetreten ist, in tiefere Bodenschichten verlagert worden sein.

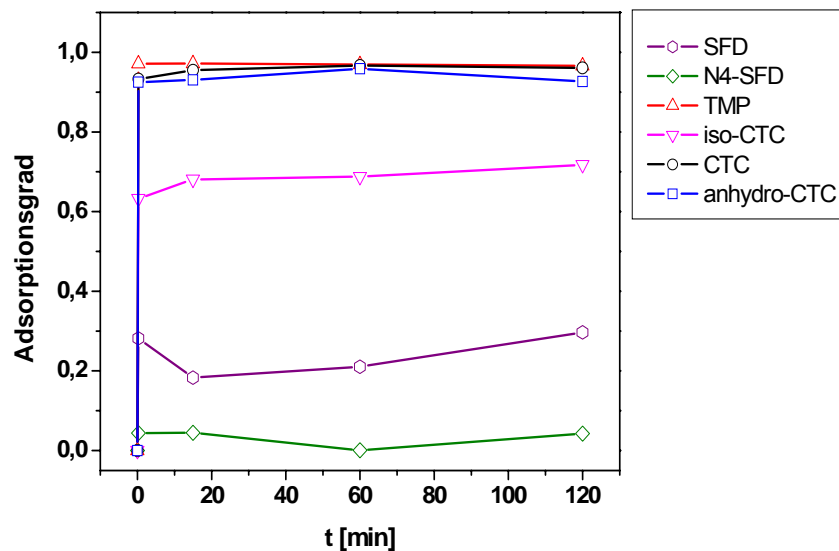


Abb. 21: Sorption von Antibiotika (Wirkstoffe/Metabolite) an Boden (Batch-Versuche: 5 g Boden, 20 mL wässrige Lösung (CTC, iso-CTC, anhydro-CTC, SFD, N4-SFD, TMP; $\beta = 10 \text{ mol/L}$)) [476]

In Wiederfindungsstudien wurden danach die verschiedenen Extraktionsmittel auf ihr Extraktionsvermögen bezüglich der Analyte in diesem Boden untersucht. Es zeigte sich dabei, dass die verwendeten Extraktionsmittel nur ein sehr geringes Extraktionsvermögen aufwiesen (Tab. 9).

Tab. 9: Wiederfindung (%) von Antibiotika aus dotiertem Boden (CTC, SFD und TMP; $\beta = 10 \text{ mg/L}$; Einwaage Boden = 5 g, Einwirkzeit = 30 min, Mittelwerte $N=2$)

Extraktionsmittel	SFD	TMP	CTC
Citrat-Puffer pH 4,7	6	~ 0	~ 0
Methanol / Eisessig 5 % (v/v) / pH 1,8	14	~ 0	~ 0
Mcllvain-Puffer / 0,1 mol/L EDTA, pH 4	~ 0	~ 0	7
Salzsäure (1 mol/L HCl)	~ 0	~ 0	6
Methanol / Citrat-Puffer pH 4,7 (20/80, v/v)	38	~ 0	~ 0
Zweistufige Extraktion			
1.) Methanol / Eisessig 5 % (v/v) /, pH 1,8			
2.) Citrat-Puffer pH 4,7/ 0,1 mol/L EDTA (20/80, v/v)	40	3	~ 0

Entwicklung der Probenaufbereitung

Ziel der Probenvorbereitung war, eine Extraktionsmethode zu entwickeln, die einen möglichst hohen Anteil der Tetracyclin- und Sulfonamid-Analyten aus der Bodenmatrix zu extrahieren, damit dieser auch quantitativ bestimmbar ist.

Aus der Literatur war die unbefriedigende Situation der Tetracyclinbestimmung in Bodenproben bekannt [81,482]. Die Problematik basiert auf der schwierigen Extrahierbarkeit dieses Antibiotikums einschließlich seiner Derivate und Metabolite. Teilweise koordinationschemisch begründbar, resultieren daraus – in Abhängigkeit von der jeweiligen Bodenzusammensetzung – sehr niedrige Wiederfindungswerte (teilweise $<< 30\%$) [81,482]. Die bei den Wiederfindungsstudien (s. Ausgangsproblematik) eingesetzten Extraktionsmittel enthielten Reagenzien, die bei der Analyse von Pharmakarückständen im Boden vielfach eingesetzt wurden, wie Zitronensäure, Salzsäure und EDTA [81]. In diesen Untersuchungen wurde der pH-Wert variiert, Methanol zugesetzt und auch zweistufig mit verschiedenen Mitteln extrahiert. Ausgehend von komplexchemischen Überlegungen wurde daraufhin erstmalig ein ammoniakalischer EDTA-haltiger Extraktand (pH 10) eingesetzt (siehe Anhang Experimentelles), um Chlortetracyclin-Derivate effektiver von Bodenpartikeln zu desorbieren, an denen sie u.a. über Koordination von Metallionen (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) und an Humusfraktionen gebunden sein können.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit wurde der ammoniakalische EDTA-haltige Extraktand in einen ersten Extraktionsversuch an einer dotierten Bodenprobe (SFD, TMP, CTC) eingesetzt. Die nach der SPE erhaltene Messprobe zeigte deutliche Analytsignale (Abb. 22).

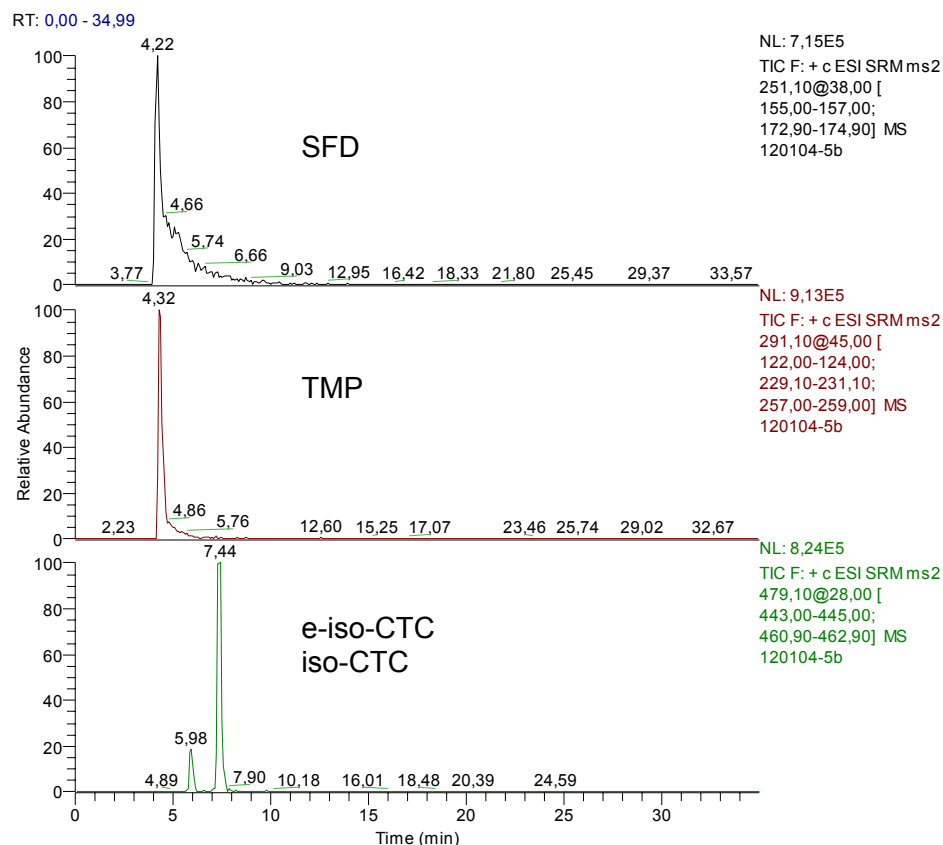


Abb. 22: HPLC-MS/MS mit YMC-Säule, dotierte Bodenproben (500 μ L SFD, TMP, CTC in Methanol (β =10 mg/L); Bodeneinwaage: 5 g)
schwarz: SFD, rot: TMP, grün: CTC

Im nächsten Schritt wurde die Extraktionsmethode an einer aus dem MUNLV-Projekt stammenden Bodenprobe angewendet, um die Anwendbarkeit der $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Mischung auf die Bodenproben zu überprüfen und einen ersten Eindruck von der Bodenbelastung zu bekommen. In der gewonnenen Messproben konnten dann SFD (Abb. 23), sowie e-iso-CTC (Abb. 24) und iso-CTC (Abb. 25) nachgewiesen werden. TMP, N-4-SFD, sowie die anhydro-CTC's konnten nicht nachgewiesen werden, wobei dies für TMP auch zu erwarten war, da es schon in der eingesetzten Gülle nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Eventuell vorhandenes CTC und e-CTC werden bei der ammoniakalischen Extraktion zu iso-CTC und e-iso-CTC umgewandelt.

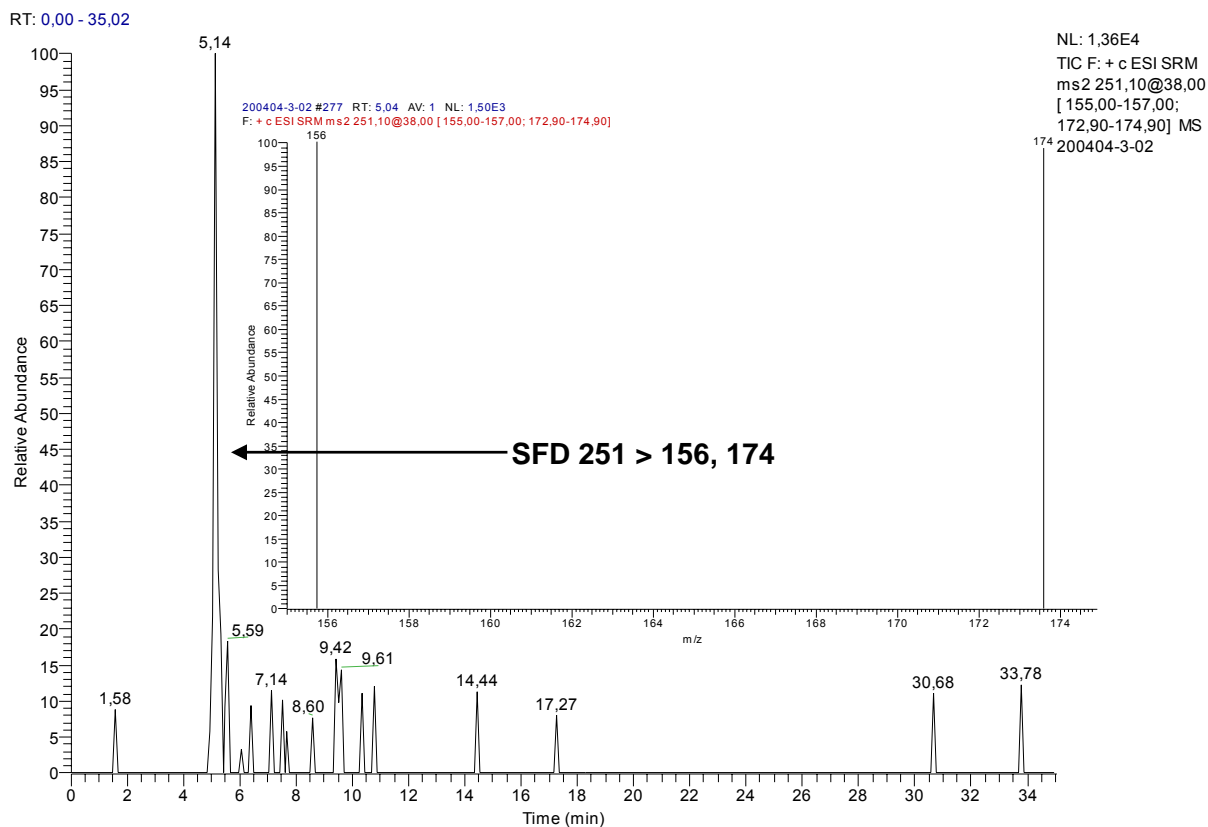


Abb. 23: HPLC-MS/MS (TIC-SRM MS², Fragmentierung von SFD (m/z 251) > 156, 174; Bodenprobe: W2-1-25)

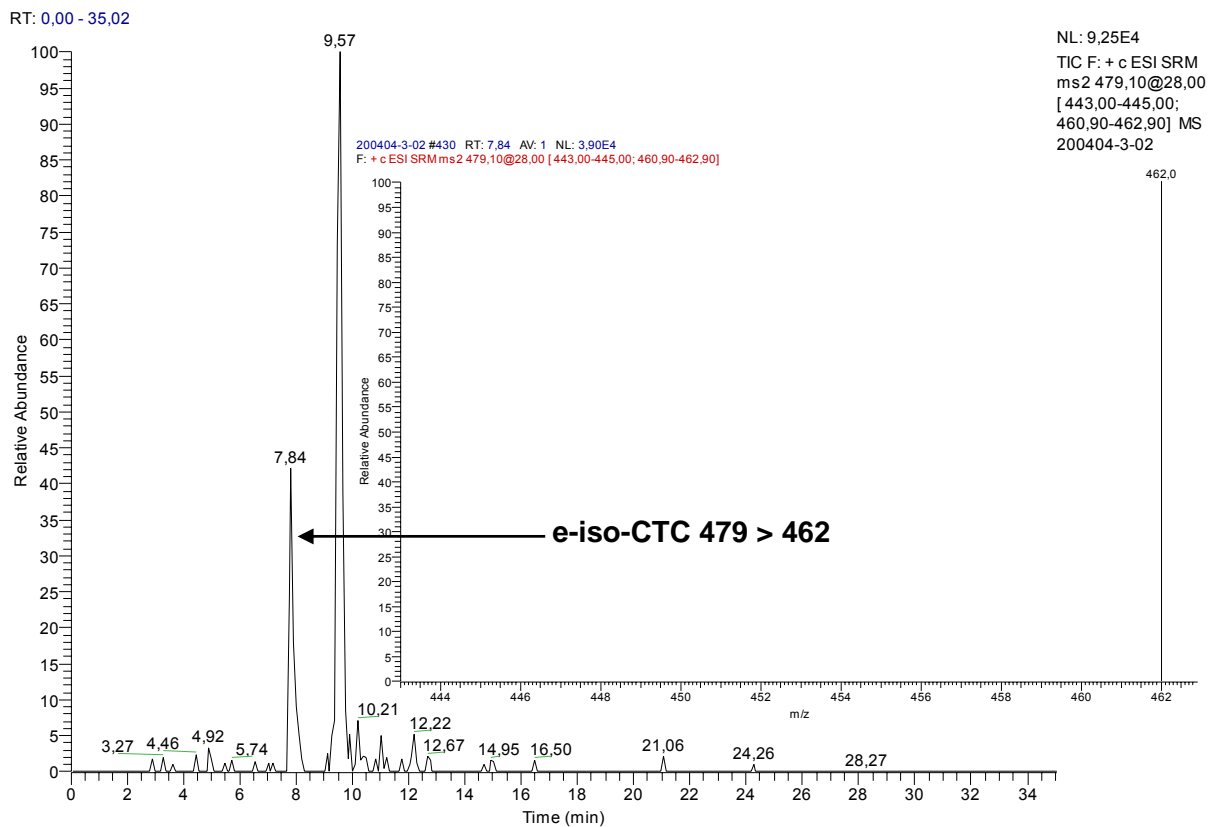


Abb. 24: HPLC-MS/MS (TIC-SRM MS², Fragmentierung von e-iso-CTC (m/z 479) > 462; Bodenprobe: W2-1-25)

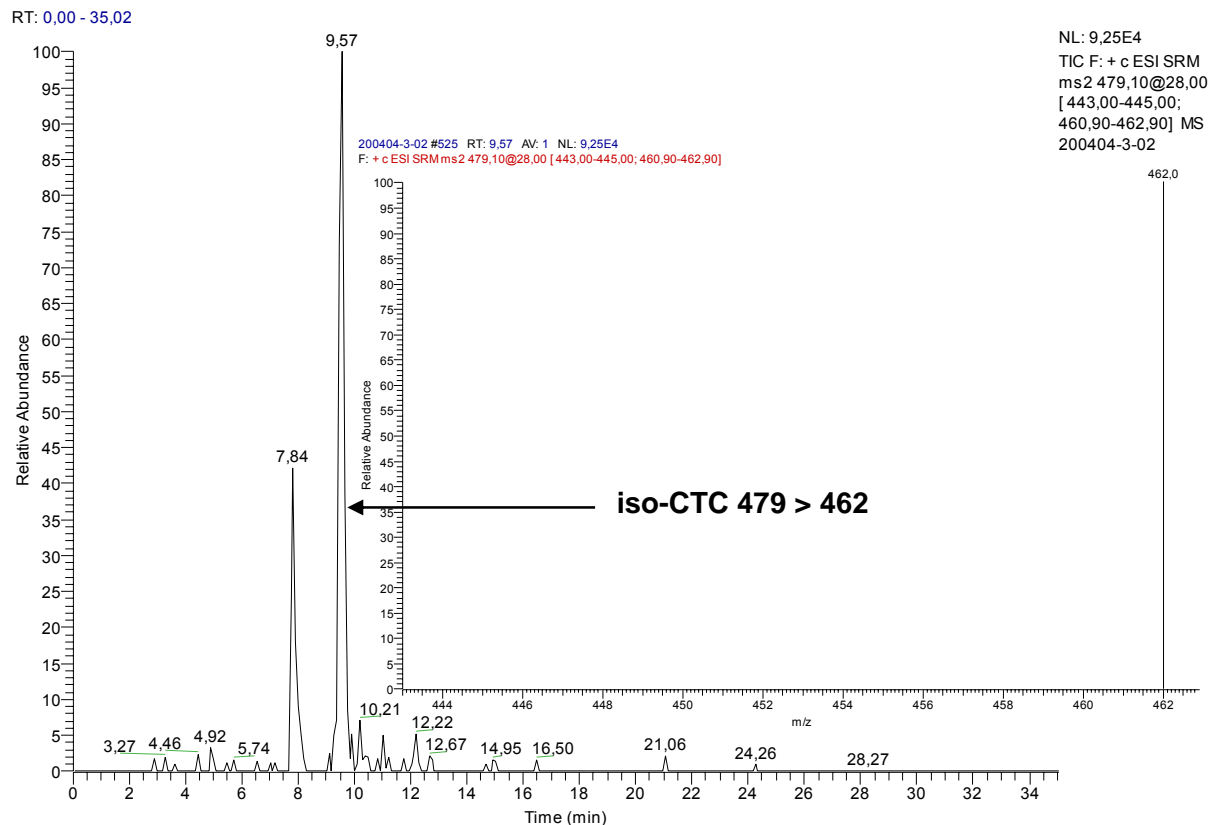


Abb. 25: HPLC-MS/MS (TIC-SRM MS², Fragmentierung von iso-CTC (m/z 479) > 462; Bodenprobe: W2-1-25)

Um die Leistungsfähigkeit der entwickelten Probenvorbereitung zu ermitteln wurde eine Wiederfindungsstudie (für SFD, TMP, CTC) durchgeführt, welche gleichzeitig dazu dienen sollte, den Arbeitsschritt der zur Probenaufreinigung und –aufkonzentration eingesetzten SPE-Methode mittels dotiertem Extraktionsmittel zu überprüfen (Tab. 10).

Tab. 10: Wiederfindung (%) von Arzneistoffen aus dotiertem Boden (5 g Boden, 500 µL Mischstandardlösung (SFD, TMP, CTC; β =10 mg/L; Lösungsmittel: Methanol); suspensiert; Einwirkzeit: 30min)

EDTA/Ammoniak-Puffer, pH 10	SFD	TMP	*e-iso-CTC	*iso-CTC	*e-CTC	CTC	Summe CTC
dotierte Bodenprobe (N=6)	59±7%	41±4%	24±3%	47±4%	~0	~0	71±7%
dotiertes Extraktionsmittel (N=10)	91±10%	81±9%	34±5%	75±7%	~0	~0	109±12%

(* bezogen auf dotiertes CTC)

Die Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchung zeigen, dass Sulfadiazin und TMP nur in mäßigen Ausbeuten von 59% bzw. 41% von dem dotierten Boden extrahierbar war. Erwartungsgemäß wird das CTC bei der Extraktion im alkalischen Mileu vollständig

isomerisiert [487], so dass das gebildete Epimerenpaar iso-CTC und e-iso-CTC als CTC-Summenparameter quantifizierbar ist. Eine Erfassung der organischen Konzentration war daher mit dieser Extraktionsmethode nicht möglich.

Besonders bemerkenswert waren die Ergebnisse für das dotierte CTC, denn im alkalischen Milieu (pH 10) wird eine relativ hohe Wiederfindung erreicht (Summe CTC 71%). Möglicherweise wird unter diesen Bedingungen das Komplexierungsvermögen der EDTA gesteigert, so dass im Kontakt mit der Bodenphase partikelgebundene Chlortetracyclin-Komponenten leichter desorbiert werden. Zusätzlich kommt hinzu, dass die Sorption von Anionen aufgrund der überwiegend negativen Oberflächenladung im Boden wesentlich geringer und stärker vom pH-Wert abhängig ist, als die Kationensorption [490]. Bei pH 10 liegen die CTC's bzw. iso-CTC's fast ausschließlich anionisch vor (s. Kap. 5.2.1.1, Abb. 33, 34 und 38).

Nach Parolo et al. [441] erreicht Tetracyclin unterhalb von pH 4, also wenn es in seiner kationischen Form vorliegt (Ladungszustand: + 0 0), nahezu die Kationenaustauschkapazität von Montmorillonit. In dieser Form ist die Affinität von Tetracyclin gegenüber diesem Tonmineral viel größer als die von Natriumionen. Die Adsorptionskapazität ist aber auch im pH-Bereich 5-7 hoch. Für pH 11 wird dagegen nur noch eine geringfügige Adsorption von Tetracyclin erwartet. Diese Untersuchung liefert damit einen weiteren Anhaltspunkt für die relativ hohe Wiederfindung von CTC im Boden mittels der $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -EDTA-Mischung und Erklärungsansätze für die sehr niedrige Wiederfindung der übrigen für diesen Boden ausprobierten Extraktionsmittel. Denn nach Pils et al. scheinen Tonminerale in Hinblick auf die Sorption von Tetracyclinen der dominierende Bodenbestandteil zu sein [440]. Aber auch andere Bodensubstanzen wie Huminstoffe, Eisen- und Aluminiumoxide besitzen im alkalischen Milieu (pH 10) nur noch eine geringe Adsorptionsaffinität für Tetracycline [429, 435]. Eigene Untersuchungen (siehe Kapitel 5.2.1.1) zeigten für iso-CTC schon bei pH 9,5 einen im Gegensatz zu CTC sehr geringen Adsorptionsgrad an Montmorillonit. Vor dem Hintergrund, dass CTC unter den verwendeten Extraktionsbedingungen vollständig in iso-CTC umgewandelt wird, erklärt sich u.a. daraus die relativ gute Wiederfindungsrate für die CTC-Bestimmung nach der $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -EDTA-Methode.

Ein Vergleich mit den Wiederfindungen anderer publizierter Extraktionsmethoden gestaltet sich schwierig, da diese von der jeweiligen Bodenzusammensetzung abhängig sind. So ermittelten beispielsweise Blackwell et al. für Oxytetracyclin eine Wiederfindung von $65 \pm 7\%$ für einem sandigen Lehmboden und $38 \pm 4\%$ für einen tonigen Lehmboden. Für das ebenfalls untersuchte Sulfonamid Sulfachloropyridazin betrug die Wiederfindung $80 \pm 1\%$ im sandigen und $68 \pm 10\%$ im tonigen Lehmboden [343].

Die Bodenkenndaten werden aber oftmals nur unvollständig angegeben, so dass ein direkter Vergleich der Wiederfindung nicht möglich ist. Hamscher et al. geben 57-76% für die Wiederfindung von CTC in einem Sandboden an [482].

Nach der $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Methode ist der Extrakt vor der Festphasenextraktion mit Salzsäure auf pH 4 einzustellen. Die bei dem dotierten Extraktionsmittel erreichten Wiederfindungen (Tab. 10) lassen weiteren Optimierungsbedarf für SFD und insbesondere für TMP in diesem Teilschritt erkennen.

Die relativen Standardabweichungen aller Analyten für das dotierte Extraktionsmittel (gesamte Probenvorbereitung) liegen um 10% und sind damit deutlich über den relativen Standardabweichungen der jeweiligen Messmethode (siehe Kapitel 5.1.3.1; Anhang A.2). Eine Verbesserung der Präzision könnte hier z.B. durch eine automatisierte SPE erfolgen. Eine online-SPE könnte demgegenüber noch zu einer besseren Wiederfindung führen, da Analytverluste durch Transferprozesse zwischen SPE und Messung reduziert würden [491]. Diese stand für die geplanten Untersuchungen aber nicht zu Verfügung.

Zur weiteren Methodenvvalidierung (Kapitel 5.1.3) wurden der Einfluss der Matrix auf das Messverfahren und die Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung, als Einflussgrößen für die Methodenpräzision, Richtigkeit und Robustheit, untersucht. Ohne Zweifel stellte aber die ammoniakalische Extraktion die bisher effektivste Methode für CTC in diesem Boden dar. Daher wurde Sie auf die Analysen der Bodenkerne aus den güllebeaufschlagten Versuchsparzellen angewendet.

5.1.3 Methodenvvalidierung

5.1.3.1 Externe Kalibrierung

Anhand der mittels HPLC-MS² erhaltenen Peakflächen verschieden konzentrierter Kalibrierlösungen von SFD, e-iso-CTC und iso-CTC (Konzentrationsbereiche von 0,05 bis 10 mg/L; siehe Anhang A.2) wurden Kalibriergeraden erstellt. Die linearen Kalibrationsbereiche (Linearitätstest nach Mandel) wurden dabei nach DIN 38402-Teil 51 [520] ermittelt und zur Minimierung der Varianzinhomogenität eingeschränkt (siehe Anhang A.2.5). Als Verfahrenskennndaten für die einzelnen Messbereiche wurden die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} und relative Verfahrenstandardabweichung V_{x0} berechnet (Tab. 11).

Tab. 11: Funktioneller Zusammenhang zwischen Messsignal (\bar{y} : Mittelwert der Peakflächen) und Analytkonzentration (\bar{x}) sowie Angabe von Verfahrenskennwerten (Verfahrensstandardabweichung s_{x0} und rel. Verfahrenstandardabweichung V_{x0})

Lineare Kalibration $\bar{y} = a + b \cdot \bar{x}$							
Analyt	Konzentrations-Bereich [µg/L]	a	b	Reststandard- abweichung s_{y_1}	Bestimmtheits- maß R^2	s_{x0} [µg/L]	V_{x0} [%]
SFD	100-1000	142868	4585	73730	0,9986	16,08	3,15
e-iso-CTC	100-1000	224387	11575	167486	0,9988	14,47	2,83
e-iso-CTC	1000-10000	175032	12952	1400178	0,9994	108,11	2,12
iso-CTC	78-1170	306225	16651	208044	0,9994	12,49	2,50
iso-CTC	1170-11707	-4368538	20984	1406152	0,9998	67,01	1,32

Die nach DIN 32645 [521] ermittelten Nachweis- (x_{NG}), Erfassungs- (x_{EG}) und Bestimmungsgrenzen (x_{BG}) für die externe Kalibrierung sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12: Nachweis- (x_{NG}), Erfassungs- (x_{EG}) und Bestimmungsgrenzen (x_{BG}) für die externe Kalibrierung

Analyt	Arbeitsbereich [µg/L]	x_{NG} [µg/L]	x_{EG} [µg/L]	x_{BG} [µg/L]
SFD	100-1000	48,81	97,62	184,00
e-iso-CTC	100-1000	43,92	87,84	166,68
iso-CTC	78-1170	35,90	71,79	140,10

Unter der Voraussetzung einer Wiederfindung von 100% und keiner Beeinflussung der Signalintensitäten der Messproben durch koeluierte Matrixbestandteile, ergeben sich bei aufgearbeiteten Bodenproben für SFD eine Nachweisgrenze von 4,88 µg/kg und eine Bestimmungsgrenze von 18,4 µg/kg. Für CTC (als Summenwert von e-iso-CTC und iso-CTC) in Bodenproben beträgt die Nachweisgrenze 7,98 µg/kg und die Bestimmungsgrenze 30,7 µg/kg.

5.1.3.2 Signalsuppression durch Matrixbestandteile

Koeluierte Matrixbestandteile, insbesondere aus Umweltproben, können die Ergebnisse einer quantitativen Bestimmung mittels LC-ESI-MS verfälschen, da es zu einer Beeinflussung der Ionisierung in der ESI-Quelle kommen kann. Matrixbestandteile können dabei zu einer Signalsuppression oder einer Erhöhung der Signalfächen führen [285,486,522-524]. Müller et al. [312] ermittelten eine Signalsuppression von 20% für SFD durch Flusswasser. Schwake-Anduschuss [455] beobachtete eine Signalsuppression für SFD sowie für höhere iso-CTC-Konzentrationen (≥ 5 mg/L) durch Pflanzenmatrix. Da diese Effekte bei einer externen Kalibrierung nicht mit erfasst werden, wurde der Einfluss der koeluierten Bodenmatrix auf das entwickelte LC-ESI-MS/MS-Verfahren überprüft. Hierzu wurden unbelastete Bodenproben (Nullprobe) aufgearbeitet, um die koeluiierenden Matrixbestandteile zu erhalten. Der Einfluss der Matrixbestandteile auf die Bestimmung von SFD, e-iso-CTC und iso-CTC wurde durch Vergleich der Signalfächen von Kalibrierlösungen mit Bodenmatrix und ohne (reines Lösemittel) ermittelt.

Für SFD ist eine deutliche Suppression des Signals durch Matrixbestandteile über den gesamten Kalibrationsbereich festzustellen (Abb. 26). Folglich liefern die durch externe Kalibrierung ermittelten Messwerte der Bodenproben einen kalibrierungsbedingten Minderfund.

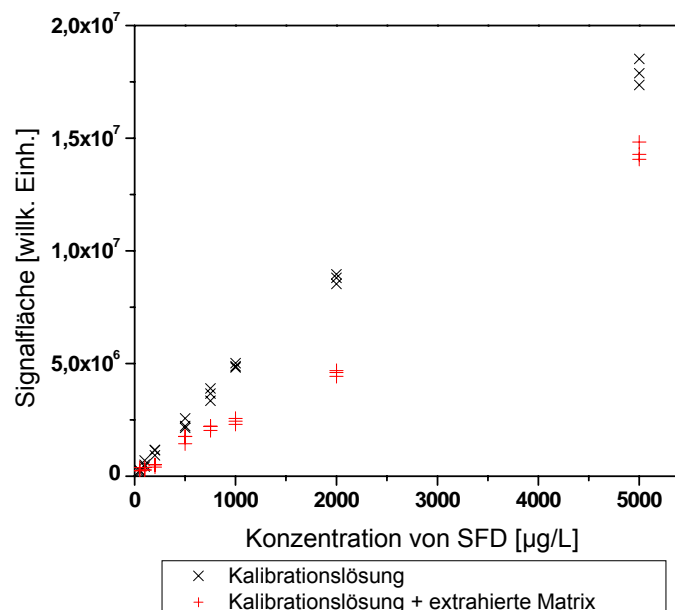


Abb. 26: Matriceinflüsse für SFD, Vergleich der Signalfächen der SFD-Peaks (SRM-Modus), 3 Wiederholproben für Kalibrierlösungen mit Bodenmatrix und ohne (reines Lösungsmittel), je dargestellten Messpunkt Mittelwert (N=2) der Signalfächen

Für e-iso-CTC scheint es eine geringe Erhöhung (Abb. 27) und für iso-CTC eine sehr leichte Suppression des Messsignals durch Matrixbestandteile (Abb. 28) zu geben. Allerdings ist auch eine Verschiebung des Epimerisierungsgleichgewichts zwischen e-iso-CTC und iso-CTC durch Matrixbestandteile möglich.

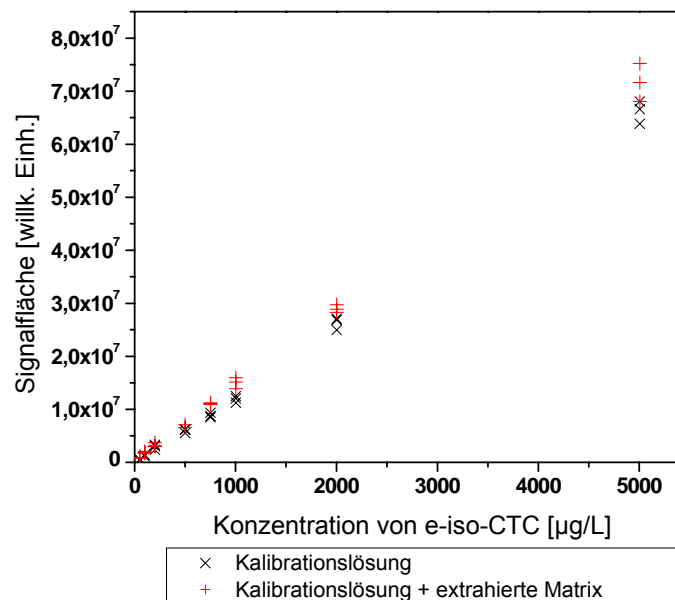


Abb. 27: Matriceinflüsse für e-iso-CTC, Vergleich der Signallächen der e-iso-CTC-Peaks (SRM-Modus), 3 Wiederholproben für Kalibrierlösungen mit Bodenmatrix und ohne (reines Lösungsmittel), je dargestellten Messpunkt Mittelwert (N=2) der Signallächen

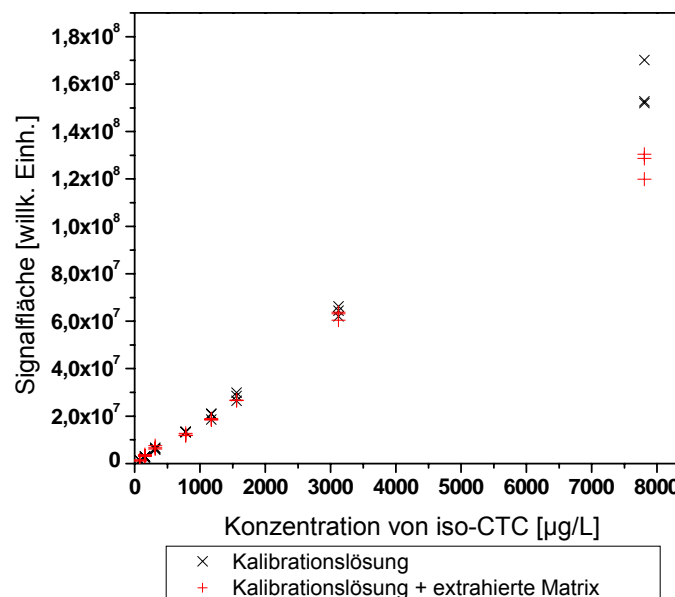


Abb. 28: Matriceinflüsse für iso-CTC, Vergleich der Signallächen der iso-CTC-Peaks (SRM-Modus), 3 Wiederholproben für Kalibrierlösungen mit Bodenmatrix und ohne (reines Lösungsmittel), je dargestellten Messpunkt Mittelwert (N=2) der Signallächen

Setzt man eine durch Matrixbestandteile verursachte Verschiebung im Epimerisierungsgleichgewicht von e-iso-CTC und iso-CTC voraus, liefert eine Summenbestimmung beider Signale, unter der Annahme eines annähernd identischen Ionisierungsverhaltens der beiden Epimere, den besseren Bezug, da hier eventuelle Gleichgewichtsverschiebungen der beiden Epimere durch Matrixbestandteile mit berücksichtigt werden. Ein Einfluss der Matrix auf die Bestimmung von e-iso-CTC und iso-CTC als Summengehalt ist nicht erkennbar und somit vernachlässigbar (Abb. 29). Die externe Kalibrierung ist daher für die Bestimmung von CTC als Summengehalt von e-iso-CTC und iso-CTC eine akzeptable Methode. Eine Signalsuppression bei der höchsten Konzentration ist zwar erkennbar, allerdings liegt dieser Kalibrationswert nicht mehr im Konzentrationsbereich, der für Bodenproben relevant ist.

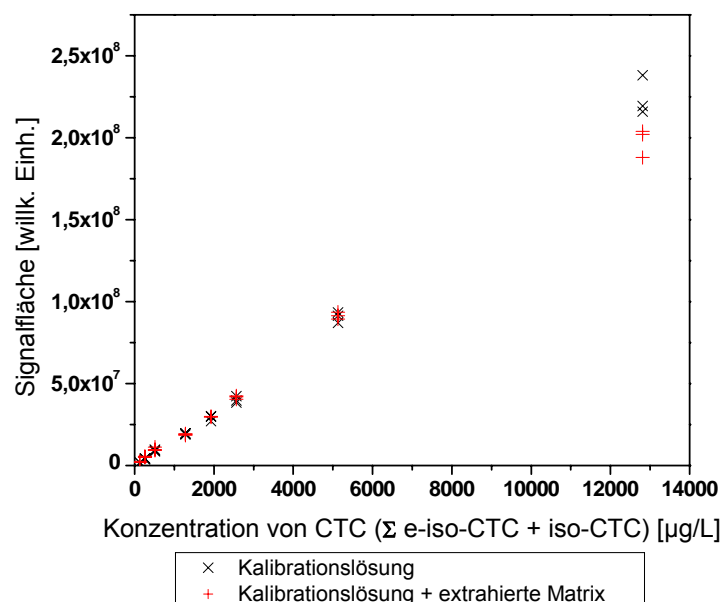


Abb. 29: Matriceinflüsse auf die Summenbestimmung von CTC (Σ e-iso-CTC + iso-CTC), Vergleich der Signallächen der e-iso-CTC + iso-CTC-Peaks (SRM-Modus), 3 Wiederholproben für Kalibrierlösungen mit Bodenmatrix und ohne (reines Lösungsmittel), je dargestellten Messpunkt Mittelwert (N=2) der Signallächen

Fazit: Die externe Kalibrierung ist für die Bestimmung von CTC im Boden eine geeignete Methode. Für die Bestimmung von SFD liefert sie aber Minderbefunde, so dass hier die Verwendung eines internen Standards oder die Bestimmung mittels Standardaddition angebracht wäre. Da diese aber wesentlich zeit- und kostenintensiver sind, wurden die Gehalte der Bodenproben mittels externer Kalibrierung bestimmt.

Das Verfahren der Standardaddition nach DIN 32633 [525] hätte im vorliegenden Fall (Anwendung auf Bodenproben) für SFD und CTC auch nur unter Vorbehalt angewendet werden dürfen. So heißt es in der DIN 32633:

„Die Empfindlichkeit der Analysenmethode (Steigung b der Kalibriergeraden) muss unabhängig sein von der Bindungsform des Analyten und des Standardzusatzes und darf nicht durch sonstige Einflüsse (z.B. Absorption) gestört werden.“

5.1.3.3 Wiederfindung

Zu 5 g unbelasteter Bodenprobe (Nullprobe) wurden definierte Mengen an CTC und SFD zugegeben und suspensiert. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten erfolgten die Extraktion nach der entwickelten Probenaufbereitungsvorschrift und die Bestimmung des Gehaltes an CTC und SFD. Die ermittelten konzentrationsabhängigen Wiederfindungen sind für SFD und für CTC (als Summe von e-iso-CTC und iso-CTC; Einzelergebnisse siehe Anhang A.4.1) in Tabelle 13 aufgeführt.

Tab. 13: Wiederfindung aus Bodenproben (Für CTC Summenbestimmung aus e-iso-CTC und iso-CTC)

Analyt	Anzahl der Wiederholproben	zugesetzte Menge [$\mu\text{g}/5\text{g}$]	gefundene Menge [$\mu\text{g}/5\text{g}$]	Wiederfindung [%]
SFD	4	5,000	2,525 \pm 0,421	51 \pm 8
SFD	4	0,500	0,196 \pm 0,069	39 \pm 14
SFD	4	0,125	0,035 \pm 0,004	28 \pm 3
CTC	4	5,000	2,954 \pm 0,515	59 \pm 10
CTC	4	0,500	0,312 \pm 0,052	62 \pm 10
CTC	4	0,125	0,095 \pm 0,002	76 \pm 2

Die Wiederfindungen für CTC in Bodenproben liegen mit 59-76% im akzeptablen Bereich für den gesamten Konzentrationsbereich. Demgegenüber wird SFD in Bodenproben schon nach kurzer Kontaktzeit mit dem Boden nur zu 28-51% wiedergefunden. Eine Ursache für die vergleichsweise niedrige Wiederfindung für SFD sind die in Kap. 5.1.3.2 gezeigten Suppressionseffekte durch Matrixbestandteile bei der massenspektrometrischen Bestimmung. Aber auch eine schnelle Bildung von nicht-extrahierbaren bzw. nicht zu extrahierenden Anteilen kann zu einer insgesamt geringeren Wiederfindung beigetragen haben [492]. Dies gilt sowohl für SFD als auch für CTC.

5.1.4 Analyse der Bodenproben aus dem „Antiinfektiva-Projekt“

Bodencharakterisierung

Die Freilandversuche wurden in der Soester Börde (Niederbörde) Flurstück 27, Bezeichnung Tünnerkamp bei einer Höhenlage von ca. 80 m über NN in Merklingsen durchgeführt. Die Bodenentwicklung wurde durch stark schwankenden Grundwasserstand (Pseudogley-Parabraunerde) mit einem Humusgehalt meist unter 2% beeinflusst. Die Wasserkapazität des Bodens ist hoch. Weitere Daten von Bodenuntersuchungen liegen vor (siehe Anhang A.3.1).

Von den entnommenen Bodenproben wurde nach DIN ISO 11465 der Trockenrückstand bzw. Wassergehalt bestimmt (siehe Anhang A.3.1). Die Wassergehalte der feldfeuchten Proben lagen nach der Güllebeaufschlagung jeweils zwischen ~15 % (Bodenhorizonte 25 – 50 cm) und maximal 25 % (Horizonte 0 – 25 cm). Die pH-Werte liegen im Bereich zwischen 6,5 und 7,0.

Gülleausbringung und Probennahmen

Die Beaufschlagung von Versuchspartzen mit Antibiotika-belasteter Gülle, welche nach 8-monatiger Lagerung noch erhebliche Rückstandskonzentrationen aufwies, war mit der Aussaat von Feldsalat und Winterweizen zu koordinieren. Daraus resultierte der zeitliche Ablauf zur Entnahme von Bodenproben (siehe [96,476]).

Ergebnisse der Rückstandsuntersuchung der Bodenproben

Zur Ermittlung der Bodenbelastung wurden exemplarisch die Bodenprobenreihen von 2 Versuchspartzen, auf denen Winterweizen angebaut worden war, nach der NH₃/NH₄Cl/EDTA-Methode und anschließender SPE (Probenaufbereitung s. Anhang A.1.5.2) mittels LC-MS/MS untersucht. Um die Auswirkungen auf den Rückstandsgehalt infolge einer wiederholten Düngung abschätzen zu können wurden Versuchspartzen 1 (zweimalige Düngung mit Antibiotika-belasteter Gülle) und 4 (einmalige Düngung mit Antibiotika-belasteter Gülle, zweite Düngung mit Mineraldünger) ausgewählt. Zusätzlich wurden die Bodenmischproben der feiner unterteilten Bodenhorizonte aus Versuchspartze 1, auf der Feldsalat angebaut worden war, untersucht, da dadurch ein detaillierterer Einblick in die Verlagerungstendenz der Rückstände in tiefere Bodenschichten erwartet wurde.

Aus jeder Bodenmischprobe wurden zwei Stichproben (Doppelbestimmung) genommen und pro Stichprobe der Gehalt von SFD, iso-CTC und e-iso-CTC dreimal mittels HPLC-MS/MS bestimmt. Korrekturfaktoren (z.B. auf Grundlage der Wiederfindung oder Signalsuppression) wurden nicht verwendet.

Die im Anhang A.4.2 (Tabellen A21-A28) zusammengefassten und beispielhaft graphisch ausgewerteten Analysendaten (Abb. 30 und 31) lassen folgende Erkenntnisse zu:

- ▶ SFD und CTC (quantifiziert als Summenparameter iso-CTC/e-iso-CTC) wurden in den oberen Bodenschichten (0 – 10 cm bzw. 0 – 25 cm (Pflugbereich)) eindeutig identifiziert und quantitativ bestimmt.
- ▶ Die Massenkonzentrationen sind für CTC deutlich höher (maximal bis zu 240 µg/kg Trockenmasse, TM) als für SFD (maximal 90 µg/kg TM). Dabei treten die höchsten Werte jeweils nach der 2. Begüllung auf (Aufstockeffekt), wie in Abb. 30A und 31A gezeigt.
- ▶ Innerhalb von 3 Monaten nach der 2. Gülleaufbringung nehmen die Konzentrationen der (extrahierbaren) Arzneistoffrückstände deutlich bis in den Bereich der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen ab.
- ▶ Der Aufstockeffekt tritt nicht ein, wenn die 2. Düngung mineralisch ist (Abb. 30B und 31B).
- ▶ In den tieferen Bodenschichten konnten SFD und CTC nicht nachgewiesen werden.
- ▶ Trimethoprim und der N4-Acetyl-Metabolit des Sulfadiazins waren in keiner Bodenprobe nachweisbar.
- ▶

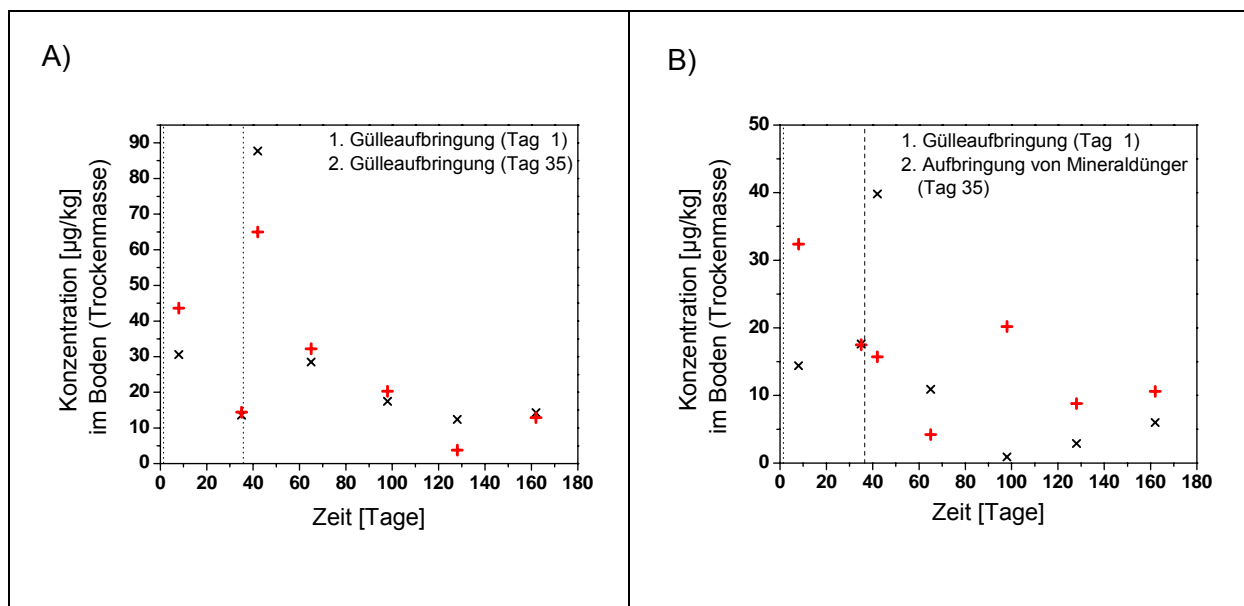


Abb. 30: SFD-Gehalte in Bodenproben („Winterweizen“, Bodentiefe 0 cm – 25 cm), A: Parzelle 1, B: Parzelle 4, pro dargestellten Messpunkt eine Bodenprobe (N=3), zwei Probenaufarbeitungen pro Bodenmischprobe (schwarz, rot)

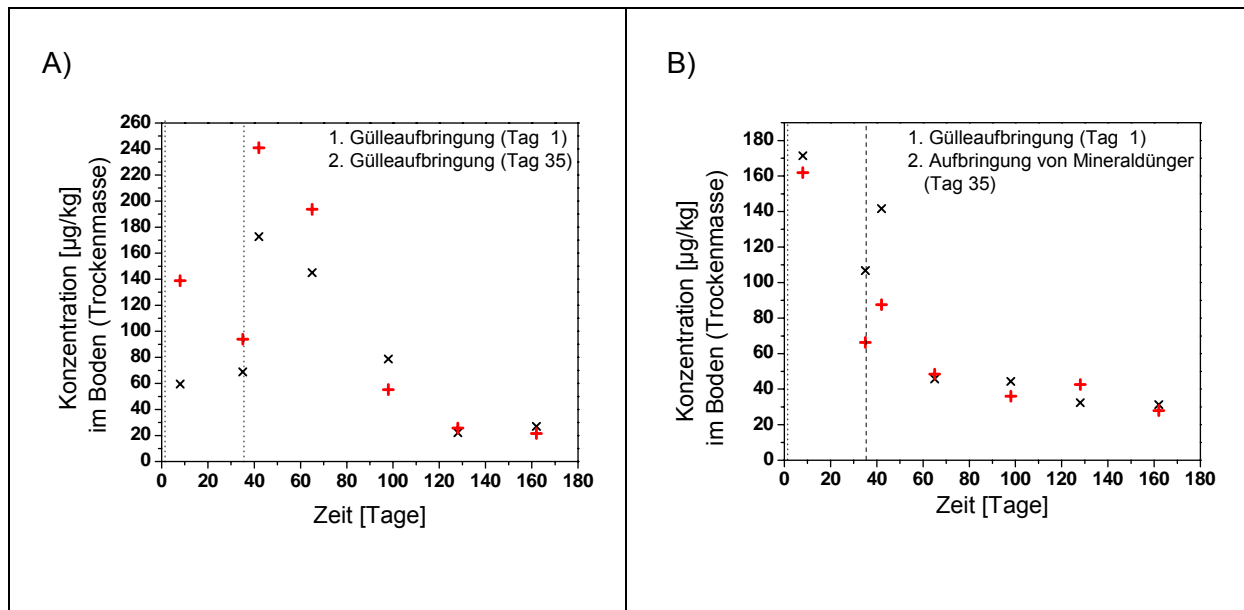


Abb. 31: CTC-Gehalte (Summe iso-CTC/e-iso-CTC) in Bodenproben („Winterweizen“, Bodentiefe 0 cm – 25 cm), A: Parzelle 1, B: Parzelle 4, pro dargestellten Messpunkt eine Bodenprobe (N=3), zwei Probenaufarbeitungen pro Bodenmischprobe (schwarz, rot)

5.1.5 Diskussion der Ergebnisse

Die gefundenen unterschiedlichen Bodenbelastungen sind u.a. durch die unterschiedliche Adsorbierbarkeit von CTC (hoch) und SFD / N4-SFD (gering) plausibel und stimmen tendenziell mit publizierten Ergebnissen vergleichbarer Bodenuntersuchungen überein [81]. Hamscher et al. untersuchten mit belasteter Gülle gedüngten Boden und fanden ebenfalls nur in einer Bodentiefe von 0 cm – 30 cm (Pflugtiefe) Tetracycline, in tieferen Bodenschichten und im Grundwasser aber nicht [482]. Anhand der sehr starken Adsorption der CTC's an die Matrix „Boden“ ist ein Transport über die flüssige Phase in tiefere Bodenschichten sehr unwahrscheinlich - abgesehen vom partikelgebundenen Transport, der speziell im Rahmen des MUNLV-Projekts „Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes“ [477] untersucht wurde (siehe Kap. 5.2). Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass Tetracycline überwiegend partikelgebunden mit Kotbestandteilen der Gülle auf den Boden gelangen. Entsprechend wurden Tetracycline hauptsächlich an der Bodenoberfläche in getrockneter Gülle gefunden [482].

Der im Boden wiedergefundene Gehalt an Sulfadiazin ist verglichen mit dem sehr hohen Gehalt in der Gülle, wo es überwiegend in der flüssigen Phase vorliegt, relativ gering. Offensichtlich ist nur ein geringer Anteil des SFD nach der Gülleausbringung vom Boden adsorbiert worden und unmittelbar ins Bodenwasser (Porenwasser) gelangt. Aus den vorliegenden Wetterdaten [476] geht hervor, dass es während und nach der

Gülleausbringung starke Niederschläge gab, wodurch vermutlich ein Teil des SFD in Bodenschichten unterhalb der Beprobungstiefe und dadurch Richtung Grundwassersohle ausgetragen wurde. Aquifer-Experimente im Rahmen des o.a. Projektes sollten hierüber zu genaueren Aussagen über Verlagerungstendenzen führen.

Jedenfalls ist ein sehr schneller bzw. vollständiger (mikrobiologischer) Abbau von SFD während der Bodenpassage unwahrscheinlich, und auch andere Austragspfade (z.B. (Überland-)Abschwemmungen mit Regenwasser, Luftverwehungen) können sich nicht so stark auswirken. Allgemein ist die Mobilität von Sulfonamiden im Boden durch andere Studien belegt und eine Ursache für das Auftreten in Oberflächen- und Grundwässern [107,457]. Demgegenüber kommen Martinez-Carballo et al. zu dem Schluss, dass SFD schon während der Lagerung von Geflügelmist schnell abgebaut wird, da sie trotz erheblicher Rückstände von SFD (max. 91 mg/kg) in Bodenproben mit Geflügelmist gedüngten Feldern kein SFD nachweisen konnten [103]. Als eine weitere Ursache für die im Verhältnis zur Gülle geringen wiedergefundenen Gehalte an SFD im Boden kommt auch eine Bildung von sequestrierten und nicht-extrahierbaren SFD-Anteilen in Betracht, welche mit dem angewendeten Extraktionsverfahren analytisch nicht erfassbar sind. Kreuzig et al. ermittelten für SFD (^{14}C -Radiotracer) bei einem güllebeaufschlagten Boden innerhalb eines Zeitraums von 3 Tagen einen schnellen Transfer vom extrahierbaren zum nicht-extrahierbaren SFD-Anteil (93%), während bei der untersuchten Rindergülle der extrahierbare Anteil überwiegte [492]. Wogegen beim Boden ohne Güllenzusatz der nicht-extrahierbare Anteil erst nach 28 Tagen 90% betrug. Nach Untersuchungen von Bialk et al. kann eine chemische Bindung (kovalente Bindung) von Sulfonamiden an organisches Bodenmaterial der Grund für die Bildung nicht-extrahierbarer Anteile im Boden sein [473]. Die 2009 veröffentlichten Ergebnisse von Förster et al. [353] lassen darauf schließen, dass auch die Bildung von sequestrierten SFD-Anteilen zu den verhältnismäßig niedrigen nachgewiesenen SFD-Befunden beigetragen hat. Auch besteht die Möglichkeit, dass sich weitere Metabolite (z.B. 4-OH-SFD) und Abbauprodukte gebildet haben [353], welche bei der Analytik nicht berücksichtigt wurden.

Den beobachteten Effekt der Akkumulation von Antibiotika im Boden infolge einer wiederholten Düngung mit Antibiotika-belasteter Gülle, sowie die Abnahme der Konzentration durch Regenereignisse, zeigten ebenfalls Untersuchungsergebnisse von Stoob et al. für das Sulfonamid Sulfamethazin [493].

5.1.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse belegen, dass bereits eine einmalige Düngung eines unbelasteten Bodens mit Antibiotika-haltiger Gülle zu einer mehrmonatig nachweisbaren Kontamination der oberen Bodenschichten führt. Daraus kann u.a. eine signifikante Zunahme Tetracyclin-resistenter Bodenbakterien resultieren [494]. Die Verwendung (stark) Antibiotika belasteter Gülle als Wirtschaftsdünger birgt also ein zusätzliches Risiko zur Verbreitung von Resistenzen in terrestrischen Kompartimenten.

Von besonderer Relevanz für den Verbraucherschutz ist dabei, dass durch Grote et al. in Kornproben des auf diesen Feldern gewachsenen Winterweizens CTC nachgewiesen werden konnten [96]. Die Aufnahme von Sulfonamiden und Tetracyclinen durch Nutzpflanzen bestätigten Grote et al. durch Versuche in Hydrokultur mit ^3H -Sulfamethazin und ^3H -Tetracyclin [495].

Dies zeigt, dass CTC-Rückstände im Boden pflanzenverfügbar sind und damit auch ein Transportpfad in die Nahrungskette besteht. Um eine Belastung von pflanzlichen Nahrungs- und Futtermitteln abschätzen zu können, sind daher ausreichende Erkenntnisse über das Vorkommen von Antibiotikarückständen im Boden und die möglichen Verlagerungspfade nötig.

5.2 Untersuchungen zum Transportverhalten von Tetracyclin- und Sulfonamidrückständen im Boden

Nach der Untersuchung der Bodenproben aus den Freilandversuchen blieb die Frage einer möglichen Verlagerung von Antibiotikarückständen mit dem Sickerwasser ungeklärt, da diese in tieferen Bodenschichten nicht nachgewiesen werden konnten. Die ermittelten Abnahmen der Rückstände mit der Verweildauer im Boden konnten weder einer Verlagerung noch einem Abbau eindeutig zugeordnet werden. Durch Starkregenereignisse unmittelbar nach der Güllung könnten insbesondere Anteile der als im Boden mobil eingeschätzten Sulfonamide mit dem Sickerwasser verlagert worden sein. Vor dem Hintergrund, dass sowohl Sulfonamide als auch die im Boden als immobil eingeschätzten Tetracycline im Grundwasser nachgewiesen wurden (s. Kap. 3.4), stellte sich generell die Frage nach deren Transport-Verhalten und ihres Eintrags ins Grundwasser. Über das Transport-Verhalten von Tetracyclin- und Sulfonamidrückständen im Boden waren zu Beginn der Untersuchungen keine gesicherten Aussagen möglich. Da in Böden eine Verlagerung von eingetragenen Arzneistoffen gelöst oder an Partikel gebunden stattfinden kann, sollten beide Transportmöglichkeiten in den Untersuchungen berücksichtigt werden. Ziel war es dabei, Aussagen über das Transport- und Abbauverhalten von Tetracyclin- und Sulfonamidrückständen im System Boden-Wasser zu treffen und Aufschluss über die Bedeutung des partikulären Transports und der Verlagerungsprozesse mit mobilen Festphasen (Modellpartikel) zu gewinnen. Die durchgeführten Untersuchungen waren Bestandteil des MUNLV-Projekts *„Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes“* [477].

5.2.1 Voruntersuchungen zum Sorptionsverhalten und zur Komplexierung

Da organische Komponenten (Xenobiotika) sowohl in der Bodenlösung in freier oder Metallionen-gebundener, komplexierter Form, als auch in partikulär gebundener Form transportiert werden können, wurden mit ausgewählten Arzneistoffen exemplarische Untersuchungen zum Sorptionsverhalten und zur Komplexierung durchgeführt. Die Ergebnisse waren Grundlage für die Methodik der Säulenexperimente und dienten zur Interpretation der Schlussfolgerungen, die aus diesen Versuchen abgeleitet wurden. Ferner waren die Sorptionsuntersuchungen die Grundlage zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften CTC- und iso-CTC-beladener Partikel (Kap. 5.2.4).

5.2.1.1 Sorption von CTC, iso-CTC und SFD an Modellpartikel

Unter statischen Bedingungen wurden als Modellpartikel verschiedene Adsorbentien mit zunehmender Komplexität der sorptionsaktiven Gruppen und Sorptionsmechanismen. Hierzu wurden Kieselgel, Sand (Quarz- und Rheinsand), Aluminiumoxide, Tonminerale (Montmorillonit (Bentonit) und Kaolinit (Ton1550)), und Ackerboden mit Lösungen, die verschiedene Tetracycline oder Sulfadiazin enthielten, äquilibriert (Durchführung und Kenndaten der Adsorbentien s. Anhang A.1.5.5).

5.2.1.1.1 Ergebnisse der Sorptionsuntersuchungen

In allen Versuchen war das Sorptionsgleichgewicht zwischen den Antibiotika und den Modellpartikeln spätestens nach 3 Stunden erreicht, in einigen Fällen bereits nach wenigen Minuten. Dabei spielen für die Kinetik zwei Vorgänge eine wesentliche Rolle:

- zum einen die schnelle Sorption an der äußeren Oberfläche der Partikel, die z.B. bei Kieselgel dominiert,
- und zum anderen die langsamere Diffusion in Makroporen und Zwischenschichten von Tonmineralien, die den verzögerten Verlauf der Sorption an die Partikel des Oberbodens erklären können.

Tetracycline

In Abb. 32 ist der nach 3-stündiger Beladungszeit erreichte Sorptionsgrad [%] von CTC- und iso-CTC-beladenen Modellpartikeln graphisch dargestellt. Tabelle 14 zeigt die den Sorptionsgraden entsprechenden Beladungskapazitäten für CTC- und iso-CTC. Wie erkennbar ist, liegen die Werte für die eingesetzten Modellpartikel zwischen 0,6 (Quarz) und 19 $\mu\text{mol/g}$ (Aluminiumoxid).

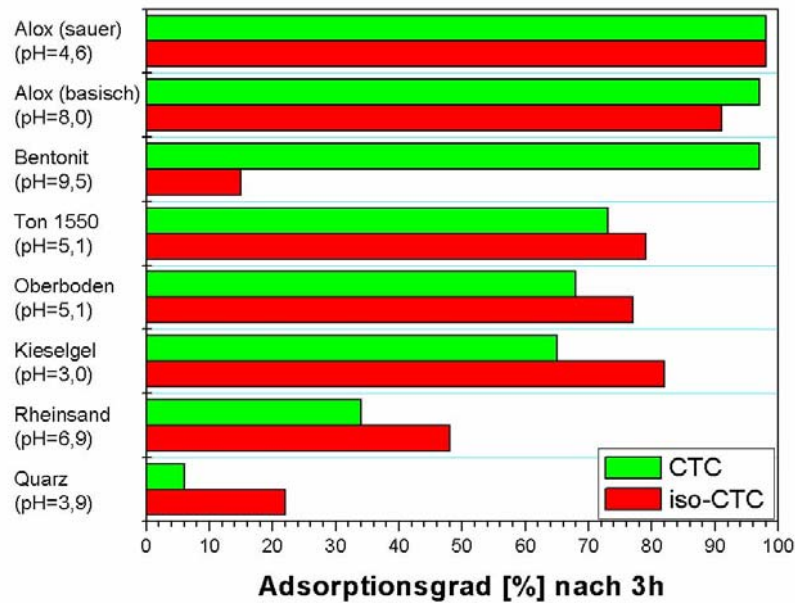


Abb. 32: Sorptionsgrade von CTC und iso-CTC an Modellpartikel (Alox = Aluminiumoxid)

Tab. 14: Beladungskapazität der Modellpartikel für CTC und iso-CTC

Modellpartikel	CTC		iso-CTC	
	[mg/g]	[$\mu\text{mol/g}$]	[mg/g]	[$\mu\text{mol/g}$]
Aluminiumoxid (basisch)	9,7	18,8	9,1	17,7
Aluminiumoxid (sauer)	9,8	19,0	9,8	19,0
Bentonit	9,7	18,8	1,5	2,9
Kieselgel	6,5	12,6	8,2	15,9
Oberboden	6,8	13,2	7,7	14,9
Quarz	0,6	1,2	2,2	4,3
Rheinsand	3,4	6,6	4,8	9,3
Ton 1550	7,3	14,2	7,9	15,3

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende Affinitätsreihen:

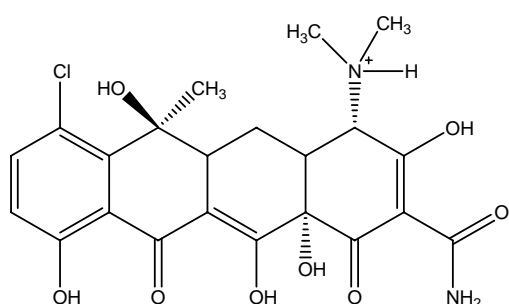
CTC:

Aluminiumoxid (sauer) \approx Aluminiumoxid (basisch) \approx Bentonit > Ton 1550 > Oberboden > Kieselgel >> Rheinsand >> Quarz.

iso-CTC:

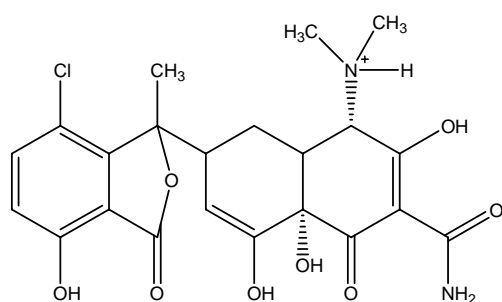
Aluminiumoxid (sauer) > Aluminiumoxid (basisch) > Kieselgel \approx Ton 1550 \approx Oberboden >> Rheinsand >> Quarz \approx Bentonit.

Neben strukturellen bzw. morphologischen Unterschieden der Partikel (z.B. spezifische Oberfläche, funktionelle Gruppen, Poren etc.) spielt der pH-Wert der Umgebung eine wichtige Rolle für die Sorption. Mit der Änderung des Milieus ändert sich der Protolysezustand des Arzneistoffes (protoniert, deprotoniert) und auch der Protolysezustand funktioneller, sorptionsaktiver Gruppen an der Oberfläche der Modellpartikel. Die Struktur der protonierten Chlortetracycline ist in Abb. 33 und 34 dargestellt. Die angegebenen Säurekonstanten (pK_a -Werte) geben Aufschluss über den Protonierungsgrad bei verschiedenen pH-Werten. So liegt iso-CTC bei pH 9,5 fast ausschließlich anionisch vor, ein Teil des CTC aber in einer nach außen elektrisch neutralen (zwitterionischen) Form, was u.a. die großen Unterschiede der Sorptionsgrade an Bentonitpartikel erklärt (Abb. 32).



Solvent	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Wasser	3,33 $\pm 0,30$	7,55 $\pm 0,02$	9,33 $\pm 0,30$
Wasser:Methanol 50 : 50 (w/w)	4,26	7,61	9,36

Abb. 33: Struktur von protonierten CTC und pK_a -Werte [496] (Zuordnung der pK_a -Werte s. Kap. 3.3.1)



Solvent	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Wasser:Methanol 50 : 50 (w/w)	4,19	7,23	7,83

Abb. 34: Struktur von protonierten iso-CTC und pK_a -Werte [496]

Da die Oberflächen des Bentonits negativ teilgeladen sind, wirkt sich die elektrostatische Abstoßung infolge der unterschiedlichen Coulombschen Wechselwirkungen zwischen Bentonit und dem Ladungszustand der verschiedenen Chlortetracycline unterschiedlich aus. Dieses Verhalten zeigen tendenziell auch die verschiedenen Aluminiumoxide (unterschiedlicher pH-Wert). Da bei einem pH-Wert von 8,0 aber nur ein kleinerer Teil des iso-CTC negativ geladen vorliegt, ist der Effekt hier gering.

Wie in Tab. 15 zu sehen ist, zeigen die anderen eingesetzten Tetracycline gegenüber Kieselgel ein sehr ähnliches Sorptionsverhalten, was auch anhand ihrer fast identischen Struktur und den damit fast gleichen pK_a -Werten zu erwarten ist. Einzig iso-CTC weist einen signifikant höheren Beladungsgrad auf. Dieser könnte in einer größeren räumlichen Strukturflexibilität des nicht-planaren Ringsystems im Gegensatz zu den anderen Tetracyclinen begründet sein, die es ermöglicht, eine größere Anzahl von verfügbaren Sorptionsplätzen zu erreichen. Iso-CTC (Abb. 34) besitzt nicht das relativ unflexible strukturtypische Tetracyclin-Vierring-System ABCD (s. Abb. 37) und es kann sich daher der D-Ring (zumindest teilweise) um das AB-Ringsystem drehen.

Tab. 15: Beladungsgrad verschiedener Tetracycline an Kieselgel ($\beta_{\text{Tetracyclin}}=100$ mg/L, Volumen der Lösung: 100 mL (bidest. Wasser), Menge an Kieselgel: 1 g, pH=3, Zeit:3h)

Tetracyclin-Derivat	Beladungsgrad nach 3h [%]
CTC	65
e-CTC	64
anhydro-CTC	66
TC	65
OTC	66
DoxyC	63
DemecloC	67
iso-CTC	82

Sulfadiazin

Für SFD sind die Sorptionsgrade (Abb. 35) und Beladungskapazitäten (Tab. 16) im Vergleich zu den Chlortetracyclinen relativ gering, was den Ergebnissen des „Antiinfektiva-Projekts“ [476] entspricht.

Folgende Affinitätsreihenfolge wurde für SFD ermittelt:

Oberboden > Aluminiumoxid > Ton 1550 \approx Kieselgel \approx Glaspartikel (Trisopor micro) > Rheinsand \approx Bentonit.

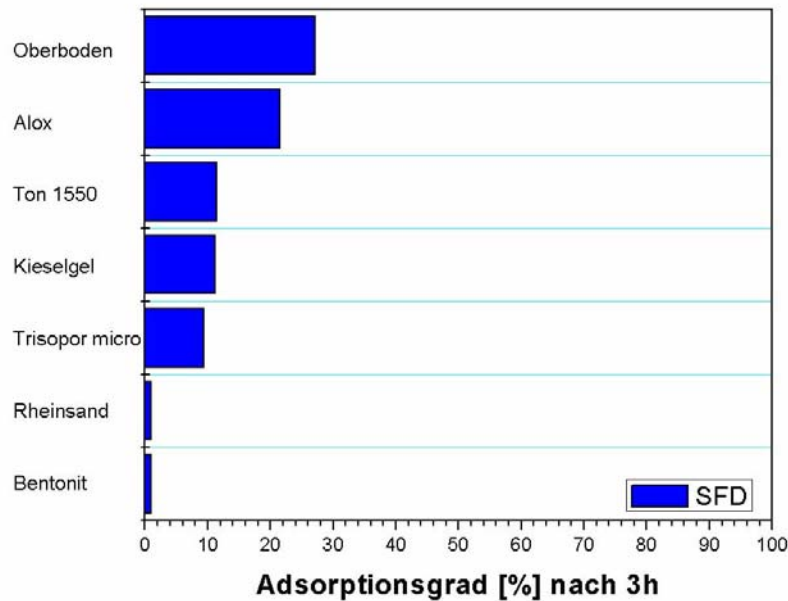
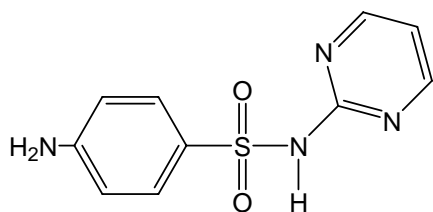


Abb. 35: Sorptionsgrade von Sulfadiazin an Modellpartikel

Tab. 16: Beladungskapazität der Modellpartikel für SFD

Modellpartikel	[mg/g]	[$\mu\text{mol/g}$]
Aluminiumoxid	2,2	8,6
Bentonit	0,1	0,4
Glaspartikel	0,9	3,8
Kieselgel	1,1	4,5
Oberboden	2,7	10,8
Rheinsand	0,1	0,4
Ton 1550	1,1	4,5

Abb. 36 zeigt die Struktur und die pK_a -Werte von SFD. Der pK_{a1} korrespondiert mit der Protonierung der basischen Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) und der pK_{a2} mit der Deprotonierung der relativ sauren Amidgruppe ($-\text{NH}-$). Bei einem pH-Wert oberhalb des pK_{a2} -Wertes liegt das Sulfadiazin also in einem überwiegend negativ geladenen Protolysezustand vor. Da die Modellpartikel - abhängig vom pH-Wert - an ihren Oberflächen negative Teilladungen tragen, ist die schlechtere Sorbierbarkeit unter den Versuchsbedingungen im Vergleich zu den Chlortetracyclinen erklärbar. So zeigt SFD an Bentonit eine geringe Sorptionskapazität, die mit der des iso-CTC an Bentonit vergleichbar ist, da es bei pH 9,5 ebenfalls anionisch vorliegt. Die unterschiedlichen Affinitätsreihen lassen sich somit überwiegend auf die unterschiedlichen pK_a -Werte zurückführen.



Solvent	pK _{a1}	pK _{a2}
Wasser	2,10	6,28

Abb. 36: Struktur von SFD und pK_a-Werte [497]

5.2.1.2 Untersuchungen zum Komplexierungsverhalten von CTC und iso-CTC

Im Vorfeld der Transportuntersuchungen mit freien und partikelgebundenen Arzneistoffen in Laborsäulen wurde das koordinationschemische Verhalten der Chlortetracyclin-Komponenten CTC und iso-CTC gegenüber ausgewählten bodentypischen Metallionen (z.B. Fe³⁺, Al³⁺, Ca²⁺) in Lösung UV-Vis-spektrophotometrisch charakterisiert. Die bekannte ausgeprägte Tendenz der Tetracycline, Metallionen zu koordinieren [7], könnte bei den beabsichtigten Transportuntersuchungen zu analytisch „maskierten“ Verlagerungsmöglichkeiten führen. Ein gelöster Transport wäre durch die Bildung von CTC- bzw. iso-CTC-Komplexen, z.B. in Form von Huminsäure-Metallkation-Tetracyclin-Komplexen [429], durchaus möglich. Zudem ist die Metallkomplexbildung von Tetracyclinen als Sorptionsmechanismus von Bedeutung (siehe Kapitel 3.4). Daher ist mit einer Beeinflussung der aus der Analyse von ammoniakalischen Bodenextrakten gewonnenen Bilanzierungsdaten (s. Kap. 5.2.2: Ermittlung gelöster und partikulärer Anteile) durch Sorptionseffekte an oxidisch/hydroxidischen Bodenkomponenten (z.B. pedogene Metalloxide) zu rechnen.

Die folgenden Versuche sollten eine Einschätzung der zu erwartenden Effekte erlauben.

5.2.1.2.1 Eigenschaften von Chlortetracyclinen und Untersuchungsmethodik

Der Chlortetracyclinstruktur in Abb. 37 sind die möglichen Koordinationsstellen des CTC für Metallkationen zu entnehmen. Die Koordinationstendenz der einzelnen Donoratome ist abhängig vom Metallkation, Lösungsmittel und pH-Wert. Nach Sharma findet die Chelatbildung von Tetracyclinen mit Metallkationen im Bereich O10 bis O12 statt [498], was in Abb. 37 den Positionen I und II entspricht. Bei höheren Metallkonzentrationen ist eine gleichzeitige Koordinierung mehrerer Kationen an verschiedenen Positionen möglich.

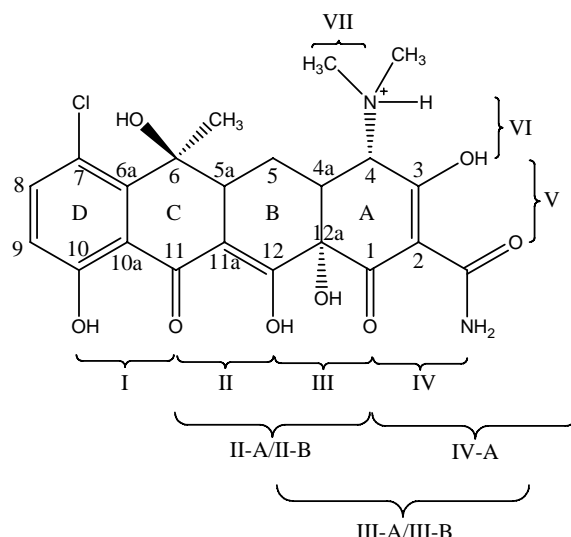
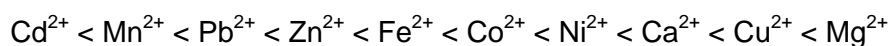


Abb. 37: Koordinationsstellen für Metallkationen an CTC (Unterscheidung der Koordinationsstellen durch römische Ziffern nach Dos Santos [499])

In wässrigen Lösungen ist z.B. für Fe^{3+} , Al^{3+} und Mg^{2+} das β -Diketonsystem in Position II eine bevorzugte Koordinationsstelle. Dos Santos [499] zeigte dies am Beispiel der Reaktion von Al^{3+} mit Anhydro-Tetracyclin und Schneider [500] für Mg^{2+} mit Tetracyclin.

Für divalente 1:1 Tetracyclin-Metallkomplexe wurde die folgende Rangfolge nach der Größe ihrer Stabilitätskonstanten aufgestellt:



Die Komplexbildungskonstanten für CTC-Metallkomplexe können recht hoch sein, was ein Vergleich mit Komplexbildungskonstanten anderer organischer und anorganischer Liganden verdeutlicht (Tab. 17).

Tab. 17: Komplexbildungskonstanten ($\log K$) nach Gu [435]

Metallkomplex	$\log K$
Fe(III)-CTC	12,5
Al-CTC	13,4
Al-EDTA	19,07
Fe(III)-EDTA	25
Fe(III)-Zitronensäure	11,4
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$	13,3

Infolge der pH-Abhängigkeit der Metallkomplexbildung des Chlortetracyclins waren bei den durchgeführten Messreihen die Versuchslösungen entsprechend zu konditionieren. So

wurden die pH-Werte 3, 5,5 und 8,7 ausgewählt, um in Lösung jeweils einen möglichst einheitlichen Ladungszustand zu gewährleisten. Bei pH 3 liegen Tetracycline (s. Abb. 38) überwiegend als protonierte kationische Spezies und ein größerer zwitterionischer Anteil vor. Ein niedrigerer pH-Wert wurde nicht gewählt, da dann mit einer Umwandlung in anhydro-CTC zu rechnen wäre. Bei pH 5,5 bildet CTC fast ausschließlich ein ladungsneutrales Zwitterion und bei pH 8,7 überwiegend eine anionische Spezies mit einer positiven und zwei negativen Ladungen.

Ab pH>7 ist aber mit der Bildung von iso-CTC zu rechnen, was bei der Interpretation der UV/vis-Spektren der Metall-Ligandgemische mit zu berücksichtigen ist (s.u.).

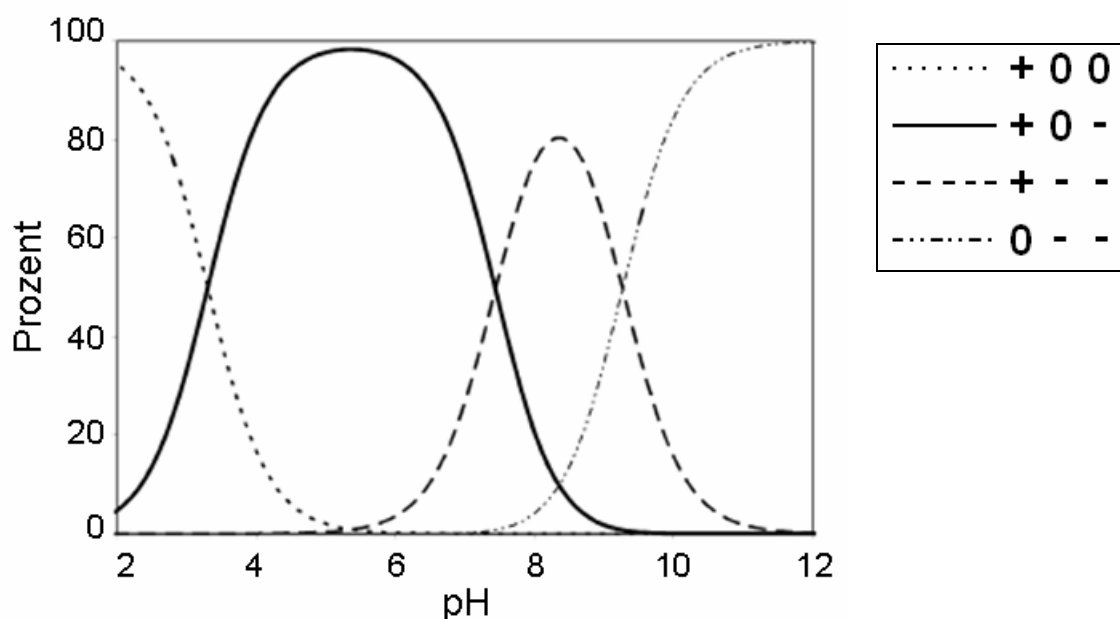


Abb. 38: Protolysegleichgewichte von Tetracyclin-Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Sassman [93] mit:
 +: positive Ladung (protonierte funktionelle Gruppe)
 0: keine Ladung (nicht protonierte und nicht deprotonierte funktionelle Gruppe)
 -: negative Ladung (deprotonierte funktionelle Gruppe)
 Bsp.: + 0 - bedeutet protonierte Dimethylamingrouppe (C4), keine Ladung im β -Diketonsystem (C10-C12) und negative Ladung im Tricarbonylsystem (C1-C3) (s. Abb. 37)

5.2.1.2.2 Spektrophotometrische Untersuchung der Reaktionen von Chlortetracyclinen mit Metallionen

Zur Durchführung der Versuche wurden Aliquote einer CTC- bzw. iso-CTC Stammlösung (0,1 mmol/L) mit verd. Salzsäure oder Ammoniakpuffer auf die pH-Werte 3, 5,5 oder 8,7 eingestellt und mit Metallsalzlösung versetzt, so dass definierte Metall-Ligand-Verhältnisse vorlagen. Diese Lösungen wurden nach der Vereinigung entweder unmittelbar oder nach Zeitintervallen (mit und ohne Einfluss von Tageslicht) gegen entsprechende

Referenzlösungen spektrophotometrisch vermessen. Die allgemeine Vorgehensweise ist in Anhang A.1.5.6 näher beschrieben.

Nach dieser Versuchsdurchführung konnten neben Hinweisen auf die Bildung von Metallkomplexen und der Isomerisierung des CTC auch Erkenntnisse über die Sorbierbarkeit der Arzneistoffe an frisch gefällte, kolloidale Metallhydroxide gewonnen werden.

5.2.1.2.3 Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Komplexierungsverhalten

Alterungseffekte metallfreier CTC-Lösungen

Der Einfluss von pH, Tageslicht und Lagerungszeit auf CTC- und iso-CTC-Lösungen wird aus den Spektrenprofilen in Abb. 39 erkennbar. Bei pH 3 und pH 5,5 können nur geringe Veränderungen der Spektren unter dem Einfluss von Zeit und Licht festgestellt werden. Eine deutliche Veränderung zeigt sich nach 4 Tagen bei pH 8,7, was auf die Bildung von iso-CTC zurückgeführt werden kann. Indizien für die Isomerisierung sind die Verschiebung des Maximums von 277 nm (CTC-typisch) nach 290 nm (iso-CTC-typisch) und die leichte Verschiebung des Maximums bei 369 nm (CTC-typisch) sowie die Abnahme der Intensitäten.

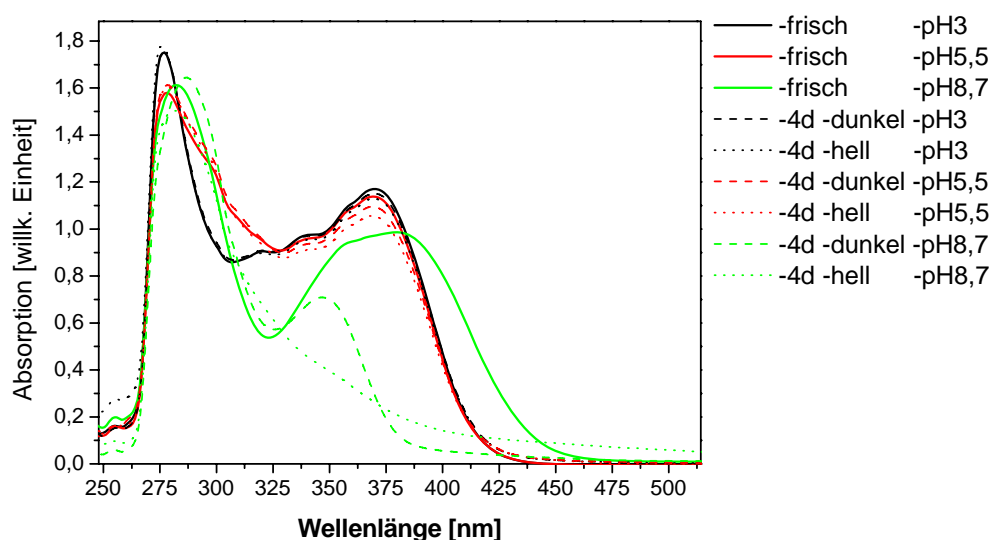


Abb. 39: Alterungseffekte von CTC ($\beta=0,1$ mmol/L) bei verschiedenen pH-Werten mit und ohne Einfluss von Tageslicht

Um die Unterschiede genauer zu erkennen, wurden in Abb. 40 die Spektren einer alkalischen Lösung von iso-CTC und CTC dargestellt.

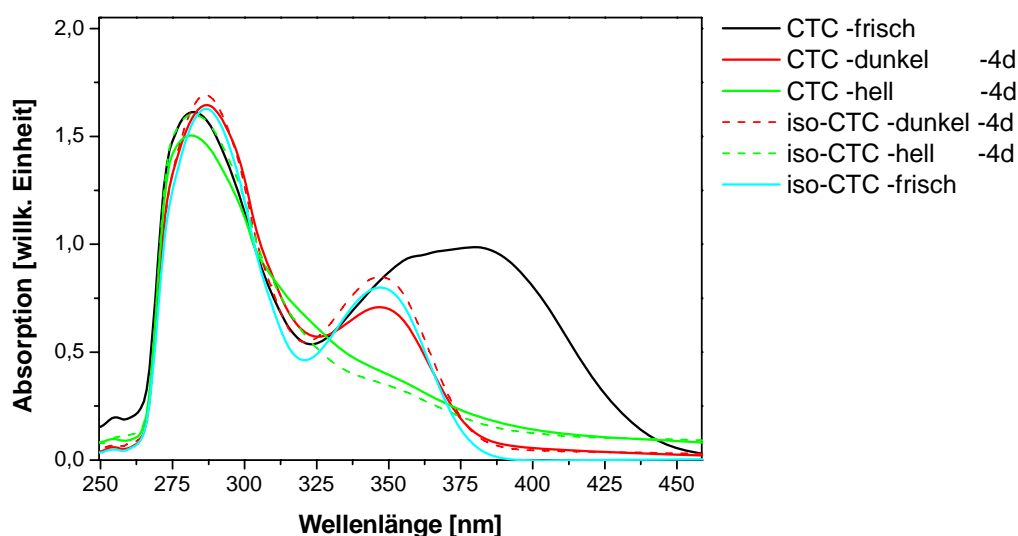


Abb. 40: Vergleich der Alterung von CTC und iso-CTC (jeweils $\beta = 0,1$ mmol/L) mit und ohne Einfluss von Tageslicht bei pH 8,7

Das Absorptionsprofil der frischen CTC-Lösung zeigt additiv die Spektren von CTC mit partiellen Anteilen des unter den alkalischen Bedingungen zu erwartenden Umwandlungsprodukts iso-CTC.

Nach vier Tagen gleicht das Spektrum des dunkel gelagerten CTC dem der frischen und der vier Tage alten, dunkel gelagerten iso-CTC-Lösung. Das bei Tageslicht gelagerte CTC hat sich aber vollständig in eine spektrenidentische Spezies umgewandelt, die iso-CTC unter Lichteinwirkung bildet. Das ursprüngliche Maximum bei 348 nm ist völlig eliminiert. Offensichtlich hat eine Umwandlung zu einem oder mehreren Photo(oxidations)produkten stattgefunden. Nach D.L.J. Clive bildet sich Anhydro-Tetracycline durch Einwirkung von Sauerstoff und Licht aus der Hydroxygruppe an C6 ein Hydroperoxid [501].

Die Spektren einer iso-CTC-Lösung zeigten bei pH 3 und pH 5,5 nur geringfügige Abweichungen durch Alterung und Lichteinwirkung (ohne Abb.), im alkalischen Milieu führt aber Lichteinwirkung ebenfalls zu den bereits erwähnten Photo(oxidations)produkten.

Die nähere Betrachtung des Mechanismus der Isomerisierung von CTC zum iso-CTC (Abb. 41) lässt eine Beeinflussung dieser Reaktion durch Metallionen erwarten:

Im ersten Schritt erfolgt eine Deprotonierung der Hydroxygruppe an C6 und eine anschließenden $-C-O-C-$ Brückenbildung zwischen C6 und C11. Im zweiten Schritt wird die C-C-Bindung zwischen C11 und C11a gespalten, wobei das bindende Elektronenpaar eine C=C-Doppelbindung zwischen C11a und C12 bildet. Der zweite Schritt ist dabei irreversibel.

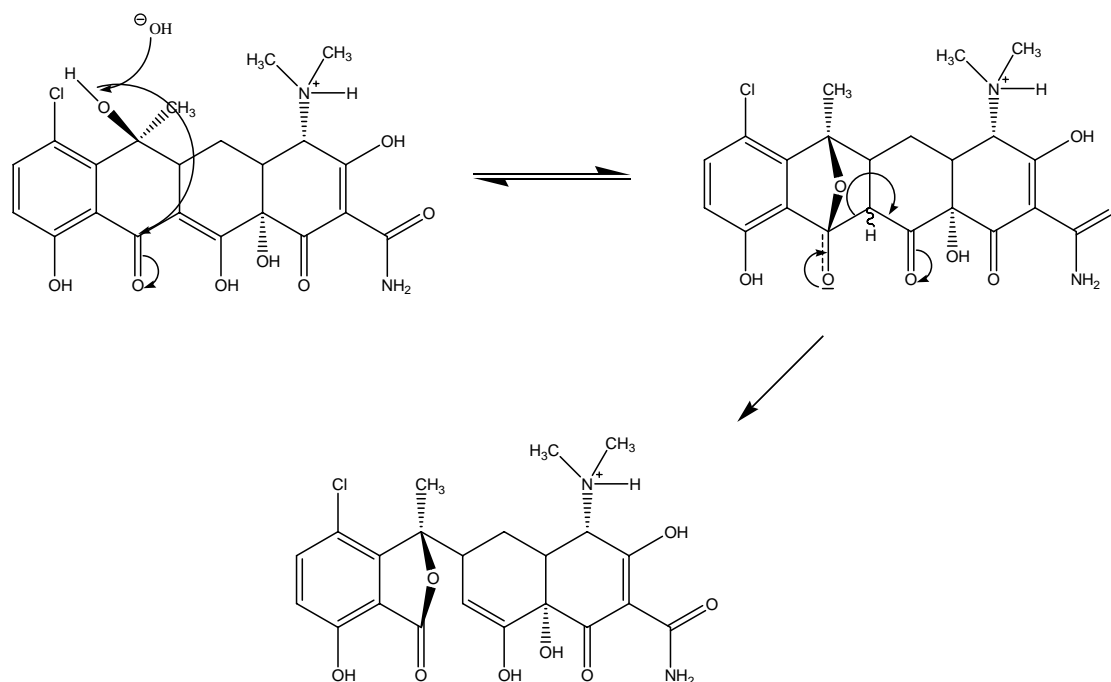


Abb. 41: Isomerisierungsmechanismus von CTC zu iso-CTC nach D.L.J. Clive [501]

Die Koordination von Metallkationen an Position II führt nun zu einer Stabilisierung des CTC bzw. seines reversiblen Produktes aus Reaktionsschritt 1, da sie sich auf die elektronischen Eigenschaften des β -Diketonsystems auswirken und somit den Bindungsbruch zwischen C11 und C11a entgegen wirken. Bei der Komplexbildung handelt es sich jedoch um einen reversiblen Prozess, wobei die Konzentration der gebildeten Metallkomplexe im zeitlichen Mittel u.a. von der Konzentration an Metallkationen abhängt. Dies hat zur Folge, dass die Isomerisierung durch Komplexbildung nicht völlig verhindert wird, sondern dass die Isomerisierungsgeschwindigkeit mit steigender Metallkationenkonzentration abnimmt.

Einige der im Folgenden beschriebenen Untersuchungsergebnisse lassen auf derartige Effekte schließen.

Reaktionen von CTC und iso-CTC mit Fe^{3+} -Ionen

Bei diesen spektrophotometrischen Untersuchungen wurde die jeweilige „Reaktionslösung“ (Metallsalz- und CTC-/iso-CTC-Lösung, pH-konditioniert) gegen eine „Blindlösung“ (Metallsalzlösung, pH-konditioniert) gemessen.

Blind- und Reaktionslösungen, bei denen Fällungen erkennbar waren, wurden entweder nach Homogenisierung durch Schütteln, direkt oder nach Zentrifugation photometriert.

Reaktion mit Fe^{3+}

Bei Zugabe von gelöstem CTC zu einer Fe^{3+} Lösung tritt sofort eine intensive Farbvertiefung der zunächst hellgelben Lösung auf, die sich mit steigendem pH-Wert vertieft.

Im schwach sauren Milieu ($\text{pH}=3$) sind die Maxima der 3:1 (Ligand:Metall-Verhältnis) und 2:1- Ansätze nur geringfügig vom Maximum des CTC-Spektrums bei 372 nm verschoben. Die Lösungen mit höherer Metallkonzentration lassen, weitgehend lage- und Intensitätskonstant ein Maximum bei 378 nm erkennen (Abb. 42). Dies lässt darauf schließen, dass sich nach Erreichung eines 1:1-Ligand-Verhältnisses die Komplexstöchiometrie nicht mehr nachweisbar ändert.

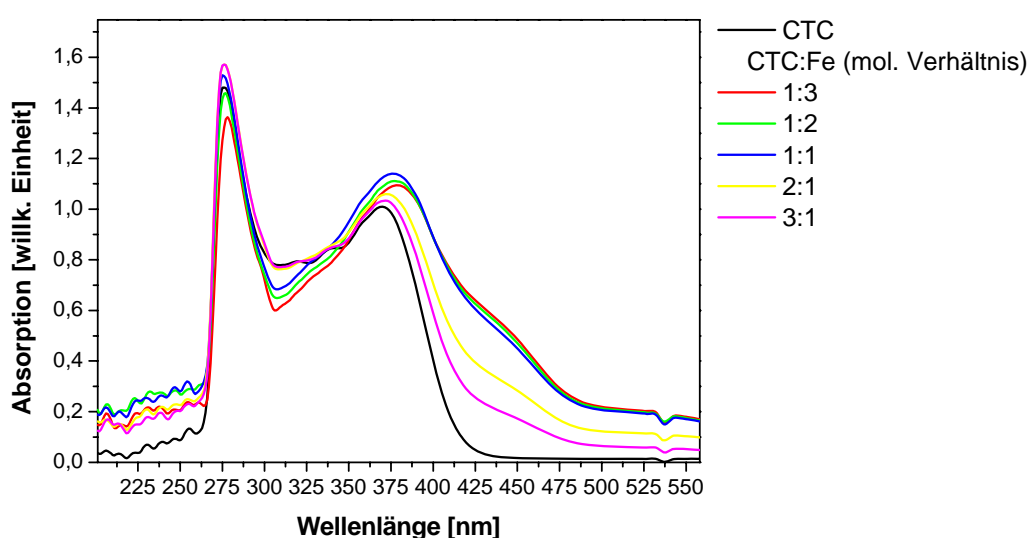


Abb. 42: Veränderung der Spektrenprofile frischer CTC-Fe-Lösungen ($\text{CTC}; \beta=0,1 \text{ mmol/L}$) bei $\text{pH } 3$ in Abhängigkeit vom molaren Ligand-Metall-Verhältnis

Der Fällungsbeginn für Eisen(III)oxid-Hydrate liegt – je nach Bedingungen - bei $\text{pH } 2,2$ bis $7,0$ [502]. Erwartungsgemäß traten in der Blindlösung bei $\text{pH}=5,5$ Eisenhydroxidfällungen auf.

In den frischen, noch klaren (bei 3:1, und 2:1 CTC-Fe-Verhältnis) bis leicht getrübbten (bei 1:3, und 1:2-Verhältnis) „Blindlösungen“ (reine Eisenlösung, pH -konditioniert) und (bei 1:10 Verhältnis) „Messlösung“ (Eisen- und CTC-Lösung, pH -konditioniert) hatte sich nach 24 Stunden ein Eisenhydroxid-Niederschlag gebildet. Die Spektren der frischen, zentrifugierten Messlösungen (ohne Abb.) weisen allgemein eine geringere Absorptionsintensität auf als nach 24 h Standzeit (s. Abb. 43). Mit zunehmender Eisen-Konzentration zeigten die Spektren der zentrifugierten CTC-Fe-Lösungen eine höher werdende Absorptionsintensität, weil Eisenhydroxid in Form größerer kolloidaler, aggregierbarer Partikel aus den zugehörigen

Blindlösungen abgeschieden und der partikuläre Streulichtanteil bei der Differenzbildung zwischen Blind- und Messlösung nicht mit erfasst wurde.

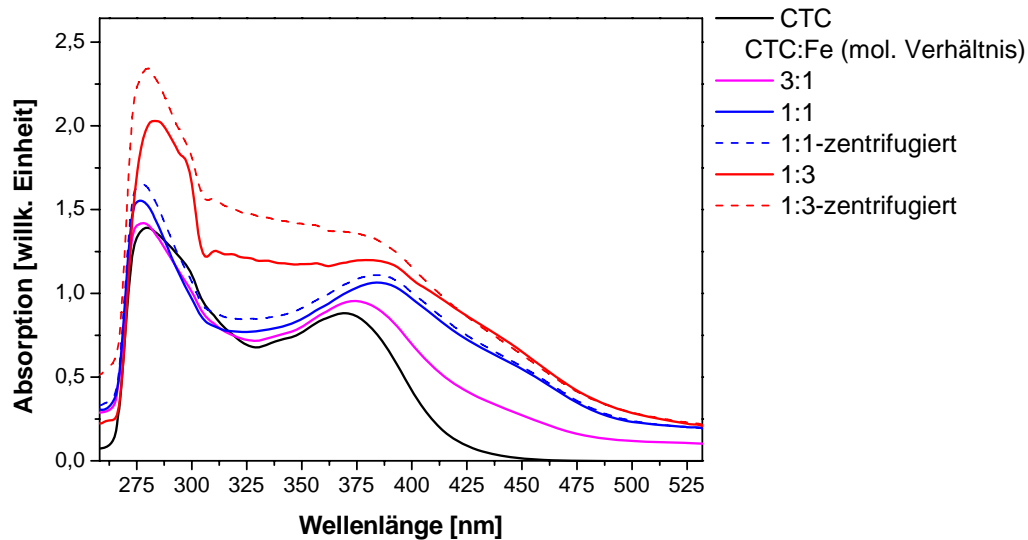


Abb. 43: Veränderung der Spektrenprofile von CTC-Fe-Lösungen (CTC; $\beta=0,1$ mmol/L) nach 24 h bei pH 5,5 nach Zentrifugation

Auffällige Änderungen des Absorptionsverlaufes in diesen Spektren – im Vergleich zum CTC – sind ebenfalls auf Streueffekte zurückzuführen, wobei nicht-zentrifugierbare kolloidale Anteile des in der Lösungsphase verbliebenen Eisenhydroxids adsorptiv CTC bzw. CTC-Fe-Komplexe gebunden haben können (Abb. 44).



Abb. 44: Zentrifugierte Blind- (links, ohne CTC) und Messlösung (rechts, mit CTC ($\beta=0,1$ mmol/L)) der CTC-Fe Reihe bei pH 5,5; mol. CTC-Fe-Verhältnis: 1:10

Im alkalischen Milieu der bei pH 8,7 aufgenommenen Spektren sind durch die Bildung von Fe-CTC-Komplexen und den oben beschriebenen Streueffekten geprägt, aber zusätzlich durch die Bildung von iso-CTC (Abb. 45). CTC hat sich nach 7 Tagen nahezu vollständig in iso-CTC umgewandelt.

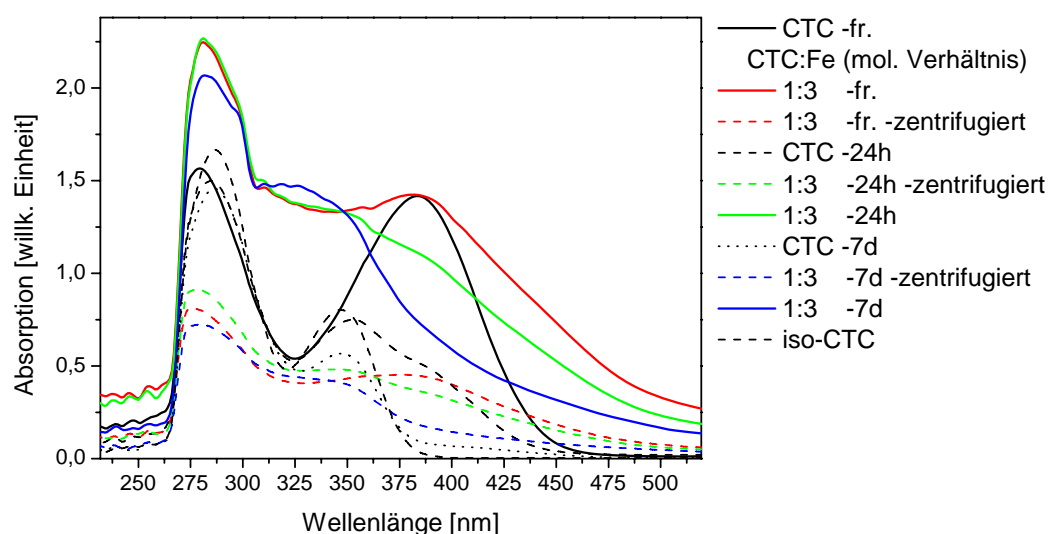


Abb. 45: Veränderung des CTC-Spektrenprofils (CTC; $\beta=0,1$ mmol/L) in Abhängigkeit von der Zeit (fr.: frisch, 24h: 24 Stunden, 7d: 7 Tage) und der Fe-Konzentration bei pH 8,7; schnelle Sorption an Eisenhydroxid (zentrifugierte Lösungen)

Vergleicht man die Spektren zentrifugierter CTC-Fe- und iso-CTC-Fe-Lösungen bei pH 8,7 nach einer Alterungszeit von 7 Tagen (ohne Abbildung), so finden sich spektrale Hinweise (UV-Banden im Bereich von 306 – 500 nm) auf die Bildung von Fe-Komplexen des CTC, die zumindest über diesen Zeitraum stabil sind. Tetracyclinkomplexe mit Metallkationen zeigen charakteristische UV-Spektren mit Maxima bei 275 nm und - in Abhängigkeit von der Konzentration und Spezies des Metallkations - zwischen 370-390 nm [7,128].

In den Zentrifugaten scheint nur noch ein geringer Teil des CTC bzw. iso-CTC verblieben zu sein, da die Absorptionsintensität der Spektren stark abnahm. Offensichtlich werden merkliche Anteile der Arzneistoffe vom Eisenhydroxid gebunden. Durch die Untersuchungsreihen ergaben sich somit im pH-Bereich von 3 - 8,7 spektrometrische Befunde für die Bildung von CTC-Fe-Komplexen und im Alkalischen von iso-CTC. Auch die Verhinderung der Fällung von Eisenhydroxid bei pH 5,5 in Gegenwart des Antibiotikums kann auf die Bildung von löslichen CTC-Fe-Komplexen zurückgeführt werden. CTC wird bei pH 8,7 an ausgefälltem Eisenhydroxid effektiv sorbiert, iso-CTC zu einem geringeren Anteil (Abb. 46).

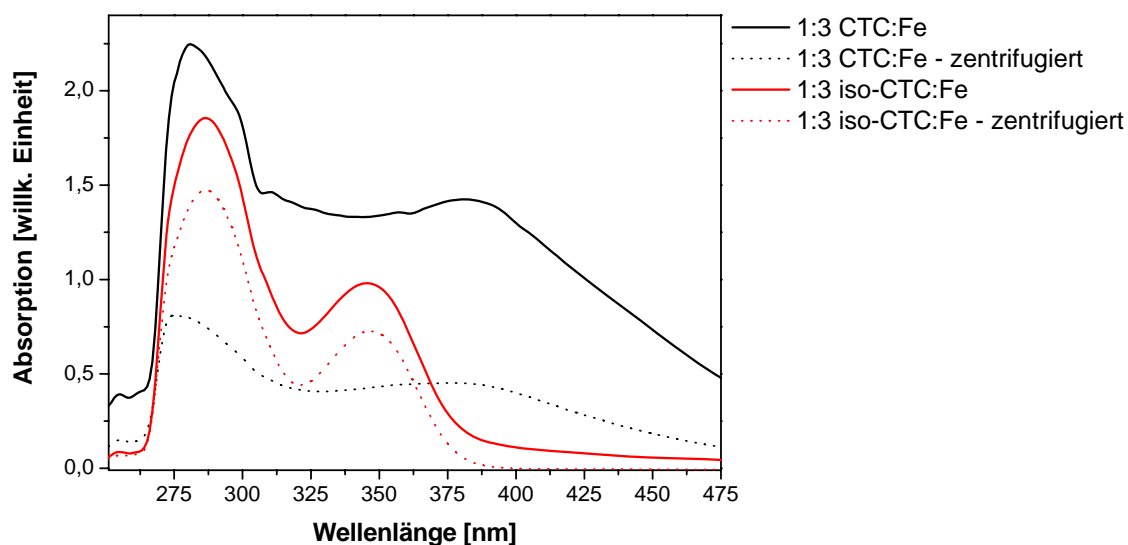


Abb. 46: Vergleich der Spektrenprofile von iso-CTC- und CTC-Fe(III)-Lösungen (iso-CTC bzw. CTC mit $\beta=0,1$ mmol/L) bei pH 8,7 nach Zentrifugation frischer Fällungen; unterschiedliches Sorptionsverhalten der CTC's

Hier spielen die unterschiedlichen Protolyseeigenschaften und damit der Ladungszustand der im alkalischen Bereich dominierenden CTC- und iso-CTC-Spezies eine entscheidende Rolle (siehe auch Kapitel 5.2.1.1). Entsprechend wird bei pH 8,7 durch die negative Oberflächenladung des Eisenhydroxids bevorzugt CTC sorbiert.

Die Deutung der Messergebnisse korreliert mit Literaturdaten: Gu et al. fanden, dass die Sorbierbarkeit von Tetracyclin an Eisenhydroxid bis pH 6 steigt, dann aber sinkt, wobei gleichzeitig die Konzentration an gelöstem Eisen zunimmt [435]. Als plausible Ursache für diesen Effekt wäre die Bildung von löslichen CTC-Fe-Komplexen anzunehmen. Oxytetracyclin wird bei pH 8 von verschiedenen Eisenoxiden maximal sorbiert, wie Figueroa et al. herausfanden [436].

Somit bieten die koordinativen Eigenschaften der Tetracycline Voraussetzungen, die im Boden sowohl einen Transport in fluiden Phase als auch partikulär prinzipiell ermöglichen.

Reaktionen mit weiteren Metallionen

Die Untersuchungen wurden in analoger Art und Weise wie mit Eisen-(III)-Salzen zusätzlich mit anderen Schwermetall-, bzw. Übergangsmetall- und Erdalkalimetallionen durchgeführt. Dazu zählen Al^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} und Zn^{2+} .

Da sich die erzielten Ergebnisse und Beobachtungen im Vergleich zu den Versuchsreihen mit Fe^{3+} recht ähneln, werden im Folgenden nur Auffälligkeiten bzw. Besonderheiten angeführt.

Auch in Gegenwart anderer Metallionen verläuft die Isomerisierung des CTC zum iso-CTC bei pH 8,7 verlangsamt. Die Geschwindigkeit der Isomerisierung nimmt dabei mit steigender Metallionenkonzentration ab. Dies ist in Abb. 47 am Beispiel des Einflusses von Al^{3+} deutlich zu erkennen.

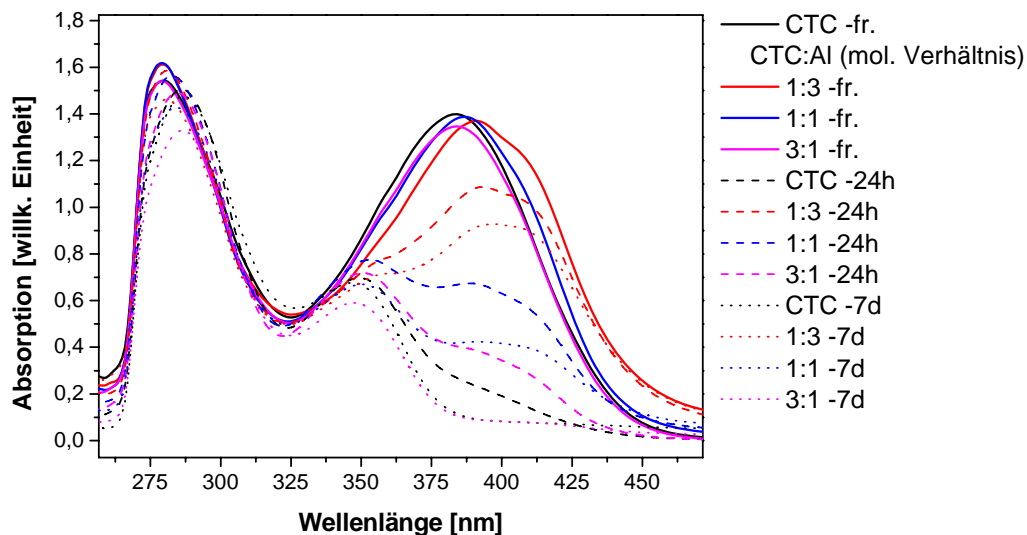


Abb. 47: Einfluss von Al^{3+} auf die Isomerisierung des CTC (CTC; $\beta=0,1$ mmol/L) bei pH 8,7 in Abhängigkeit von der Zeit (fr.: frisch, 24h: 24 Stunden, 7d: 7 Tage) und dem CTC:Metallverhältnis

Infolge der teilweise hohen Stabilitätskonstanten von CTC-Metallkomplexen (s. Tab. 17), kann die Fällung von Schwermetallhydroxiden unterdrückt werden [477], aber auch die Bildung konkurrierender Komplexe, wie es am Beispiel des Kupfers beobachtet wurde (Abb. 48). So kann die als qualitative Nachweisreaktion bekannte Bildung des tiefblauen $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ -Komplexes durch den Zusatz von CTC ebenfalls unterdrückt werden. Auch die Bildung des bläulich- bräunlichen Niederschlags aus Kupferhydroxid und Kupferoxid, der sich bei pH 8,7 in der Kupferlösung (ohne CTC) bildet, zeigt einen anderen Verlauf durch den Einfluss des Arzneistoffes.



Abb. 48: Einfluss von CTC auf die $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ -Komplexbildung

links: mit NH_3 versetzte Cu-Lösung (ohne CTC)

rechts: Fällung in der Cu-Lösung (ohne CTC)

links: suspendierte CTC-Cu-Fällung versetzt mit Überschuss NH_3

rechts: gelb-grün-bräunliche Fällung in der CTC-Cu-Lösung

5.2.1.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen aus den Voruntersuchungen

Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die unter Batchbedingungen ermittelten Sorptionsdaten stimmen tendenziell mit den bekannten Literaturdaten überein [427,431,432,435,436,441]. Sowohl CTC als auch iso-CTC zeigten eine hohe Sorptionsaffinität gegenüber anorganischem Material (Partikel oder Metallhydroxidfällungen). Die unterschiedlichen CTC-Isomere zeigten dabei ein vom pH-Wert abhängiges unterschiedliches Sorptionsverhalten. Insbesondere ein alkalisches Milieu führte bei iso-CTC zu einer geringeren Sorption. Es konnte gezeigt werden, dass CTC und iso-CTC in Metallhydroxidlösungen mitgefällt werden und auch als CTC-Metallkomplexe in Lösung bleiben können.

Konkurrenzeffekte zwischen natürlich vorkommenden Komplexbildnern, koordinationsfähigen Arzneistoffen (bzw. Antibiotikaeinträgen und Metallionen) können im Boden bei Transportvorgängen eine Rolle spielen, wie auch in dem 2009 veröffentlichten Review von Pan et al. deutlich wird [503]. Aber auch in der Aufbereitung von Bodenproben sind derartige Reaktionen von Bedeutung, da an Bodenpartikel adsorbierte Antibiotikarückstände mit starken Metallkomplexbildnern extrahiert werden, wie z.B. das in dieser Arbeit verwendete Gemisch aus $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer und EDTA (s. Kap. 5.2.2).

Die spektrophotometrisch erhaltenen Ergebnisse bieten zusätzliche Informationen, um Analysendaten der Säulenversuche („Bilanzierungsversuche“) kritisch zu interpretieren (Kap. 5.2.2/5.2.3).

Anhand der Sorptionsdaten wurden schließlich Montmorillonit, Kaolinit, Aluminiumoxid sowie ein Montmorillonit-Huminsäurekomplex im zugrunde liegenden Projekt für den Einsatz in Laborsäulen ausgewählt (Modellversuche zum partikelgebundenen Transport [477]). Die Verlagerung in Form von Metallkomplexen bleibt dabei vorerst unberücksichtigt.

Über die Fluoreszenzeigenschaften Tetracyclin-beladener Modellpartikel wird in Kap. 5.2.4 berichtet.

5.2.2 Modellversuche zum Transportverhalten von SFD, CTC und iso-CTC im Boden

Ein Ziel des Projektes *„Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes“* [477] war Erkenntnisse über das Transportverhalten von Arzneistoffen am Beispiel von SFD und CTC (inkl. iso-CTC) im Boden zu gewinnen. Hierzu wurden u.a. auf Grundlage der Ergebnisse der vorherigen Kapitel vom Institut für Wasserforschung (IfW, Dortmund) Versuche mit unterschiedlichen Säulensystemen durchgeführt. Dabei sollte aufgrund der starken Sorption von CTC's an mineralische Partikel (Kap. 5.2.1.1) insbesondere die Rolle einer Verlagerungsmöglichkeit durch partikelgebundenen Transport untersucht werden.

Die bei diesen Versuchen anfallenden Säuleneluat (Sickerwasserproben), sowie Boden- und Gülle-Extrakte wurden an der Universität Paderborn auf ihre Antibiotika-Gehalte analysiert.

Vom IfW zuvor durchgeführte Modellversuche mit Laborsäulen (Modellfilterkörper: Glasperlen, Quarzsand, sandiger Ackerboden; Modellpartikel (als Suspension im „Regen“): Aluminiumoxid, Kaolinit, Montmorillonit, Montmorillonit-Huminsäure-Komplex; Randbedingung: starke Beregnung) zeigten, dass sowohl CTC als auch SFD partikelgebunden und „gelöst“ (gelöst: freie Arzneistoffe, nicht sorbierte Arzneistoff-Komplexe, nicht durch Zentrifugation abtrennbare partikelgebundene Arzneistoffe) mit dem Sickerwasser verlagert werden können [477]. Da diese Säulenversuche eine wichtige Grundlage zur Ergebnisinterpretation darstellen, sollen die wichtigsten Ergebnisse hier kurz dargelegt werden.

SFD und CTC zeigten, wie zu erwarten war (siehe Kapitel 5.1 und 5.2.1.1), ein unterschiedliches Transportverhalten. SFD wurde in Gegenwart rein anorganischer Partikel (Aluminiumoxid, Kaolinit, Montmorillonit) nur „gelöst“ transportiert, aber bei den Versuchen mit Montmorillonit-Huminsäure-Komplex-Partikeln wurden auch signifikante Anteile (11-33%) des SFD partikelgebunden verlagert [477]. Der partikelgebundene Anteil vom verlagerten CTC betrug bis zu 100% (Modellfilterkörper: sandiger Ackerboden). Auffällig war allerdings, dass bei Verwendung von Montmorillonit-Huminsäure-Komplexen als Trägerpartikel in den Versuchssäulen mit den „einfachen“ Filtermaterialien Glas und Quarzsand CTC zu 99% bzw. 100% gelöst mit den Sickerwasser ausgetragen wurde, während beim „komplexen“ Filtermaterial Ackerboden CTC zu 100% partikelgebunden eluiert wurden. Dem damaligen Kenntnisstand nach, waren die bei diesen Versuchen gemachten Beobachtungen nur zum Teil erklärbar. Neuere Erkenntnisse liefern aber weitere Erklärungsansätze für die geschilderten Beobachtungen. Der beobachtete partikelgebundene Anteil am Transport von SFD in Gegenwart von Montmorillonit-Huminsäure-Komplexen als Trägerpartikel ist vor dem

Hintergrund, dass Sulfonamide weitaus stärker an organischem als an anorganischem (Boden-)Material sorbieren, plausibel [468].

Die Beobachtung, dass CTC bei den Filtermaterialien Glas und Quarz nur bis zu max. 8% partikelgebunden ko-eluiert wurde, ist aufgrund der geringeren Sorption von CTC's an mineralische Partikel in alkalischer Umgebung (pH-Werte der Eluate: 8-9) erklärbar (siehe Kapitel 5.2.1). Eine zumindest teilweise Umwandlung von CTC in das unter diesen Bedingungen schlechter sorbierende iso-CTC hat sicherlich auch dazu beigetragen. Ein wesentlich geringerer partikulärer Transportanteil (max. 1%) bei den Ton-Huminsäure-Komplexen ist auf die Sorption von Huminsäuren an die mineralischen Partikel zurückzuführen [503]. Hierdurch werden die Sorptionsplätze für CTC blockiert, sowie ein Eindringen in die Zwischenschichten von Montmorillonit verhindert [440]. Im Ackerboden wurde CTC dagegen bis zu 100% partikelgebunden transportiert. Ausschlaggebend hierfür sind vermutlich die niedrigeren pH-Werte (pH=6,5-7,2) und ein dadurch bedingter höherer Sorptionsgrad von gelösten CTC's an die immobile Bodenmatrix und mobile Bodenpartikel.

Die Versuche zeigten für CTC einen von den Filtereigenschaften der Bodenkörper (spezifische Oberfläche, Korngrößenverteilung, Sorption an die immobile Filtermatrix) abhängigen Rückhalt in den Modellfilterkörpern. SFD wurde demgegenüber von den rein anorganischen Filtermaterialien (Glas, Quarz; pH=8-9) nur gering bis gar nicht zurückgehalten. Einzig im Ackerboden erfolgte ein etwa 30-40%iger Rückhalt von SFD, welcher auf die Sorption an die (organische) Bodenmatrix (pH=6,6-7,4) zurückzuführen ist.

Versuche zur Remobilisierung von CTC durch simulierten Regen zeigten, dass CTC's infolge von Niederschlagsereignissen remobilisiert werden und sowohl gelöst als auch partikelgebunden mit dem Sickerwasser transportiert werden.

Um Erkenntnisse über das Transportverhalten von Arzneistoffen in (natürlichen) Böden unter natur- und praxisnahen Bedingungen (Niederschlagsbedingungen, Eintrag mit Gülle) zu erlangen, wurden vom IfW Versuche mit zwei unterschiedlichen Säulensystemen durchgeführt. Die bei diesen Versuchen anfallenden Messproben (Boden, Eluate, Gülle) wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels LC-MS untersucht und hinsichtlich der in Tabelle 18 aufgeführten Fragestellungen bewertet. Für eine Beurteilung des Verhaltens der Arzneistoffe im Boden wurden vom IfW ermittelte bedeutsame Parameter wie pH-Wert, Leitfähigkeit (als Summenparameter für den Gehalt an gelösten Ionen), Partikelkonzentration, gelöstes Eisen (Fe^{2+}) und mikrobielle Aktivität (Esterase) in die Ergebnisdarstellung und –Diskussion mit einbezogen (Messung und Einzelheiten siehe [477]).

Tab. 18: Zusammenfassung der Versuchsansätze des IfW zur Untersuchung des Transports von CTC, iso-CTC und SFD im Boden

Säulensystem	Untersuchungsansatz	Fragestellungen
Säule im Labormaßstab	starke Beregnung Ackerboden Gülle + CTC+ iso-CTC + SFD	unter Gesichtspunkten des Labormaßstabs und extremer Randbedingungen: Verlagerung der Antibiotika-Wirkstoffe mit dem Sickerwasser Rolle des partikelgebundenen Transports von Antibiotika-Wirkstoffen Matrixeinfluss von Boden und Gülle Bilanzierung des Verbleibs der Antibiotika-Wirkstoffe
Säule im halbtechnischen Maßstab	naturnahe Beregnung Ackerboden Gülle + CTC + iso-CTC + SFD	Wie im Labormaßstab jedoch unter Gesichtspunkten des halbtechnischen Versuchs und naturnaher Randbedingungen

5.2.2.1 Verlagerung von SFD, CTC und iso-CTC in einem sandigen Ackerboden nach Gülleapplikation

Die Verlagerung von SFD, CTC und iso-CTC wurde mit zwei Säulensystemen in unterschiedlichen Maßstäben untersucht. Der Versuch im Labormaßstab erfolgte unter extremen Niederschlagsbedingungen, um eine schnelle Sickerwasserströmung und hohe Mobilisierung von Partikeln zu erreichen. Um das Verhalten der Arzneistoffe unter realitätsnahen Bedingungen untersuchen zu können, wurden bei der Konzeption und Durchführung des Versuchs im halbtechnischen Maßstab die Randbedingungen den natürlichen Bedingungen auf dem Feld so weit wie möglich angepasst. Die wichtigsten Randbedingungen der beiden Säulensysteme sind in Tabelle 19 gegenübergestellt.

Tab. 19: Kenngrößen der vom IfW eingesetzten Säulensysteme

	Labormaßstab	halbtechnischer Maßstab
Säulenmaterial	Borosilikatglas	Borosilikatglas
Durchmesser der Säule	16 cm	45 cm
Mächtigkeit der Ackerbodenschicht	12 cm	60 cm
Applizierte Güllemenge	flächenbezogen landwirtschaftsüblich	flächenbezogen landwirtschaftsüblich
Einarbeitungstiefe der Gülle	2 cm	30 cm (Pflugtiefe)
Mit der Gülle applizierte Arzneistoffe	CTC, iso-CTC, SFD	CTC, iso-CTC, SFD
Strömungsverhältnisse in der Säule	ungesättigt + transient	ungesättigt + transient
Druckverhältnisse am Säulenauslauf	max. 10 hPa Unterdruck	offener Abfluss
Art der Berechnung	Abfolge von extremen Niederschlagsereignissen gleicher Intensität und Dauer	Abfolge naturnaher Niederschlagsereignisse unterschiedlicher Intensität und Dauer
Versuchsdauer	42 Tage	98 Tage

Untersuchungsmethodik

Um zwischen partikelgebundenen und gelöstem CTC- und SFD-Anteil unterscheiden zu können, wurde vom IfW die für die Analyse von Bodenproben entwickelte Probenaufbereitung (Anhang A.1.5.2) für die wässrigen Proben der Säuleneluat modifiziert (s. Abb. 49).

Hierzu wurde ein Probenaliquot des Säuleneluates vor der Extraktion mit EDTA-Ammoniak-Puffer zentrifugiert, um Partikel und die daran gebundenen Arzneistoffe abzutrennen. Aus der im Idealfall nahezu partikelfreien Lösung wurde die Konzentration von CTC und SFD bestimmt. Ein zweites Probenaliquot wurde vor der Extraktion nicht zentrifugiert und enthielt daher sowohl die „gelösten“ als auch partikelgebunden SFD- und CTC-Anteile. Durch diese

Vorgehensweise ergibt sich eine „Gesamtkonzentration“ und eine „gelöste Konzentration“, sowie durch Differenzbildung der partikelgebundene Anteil.

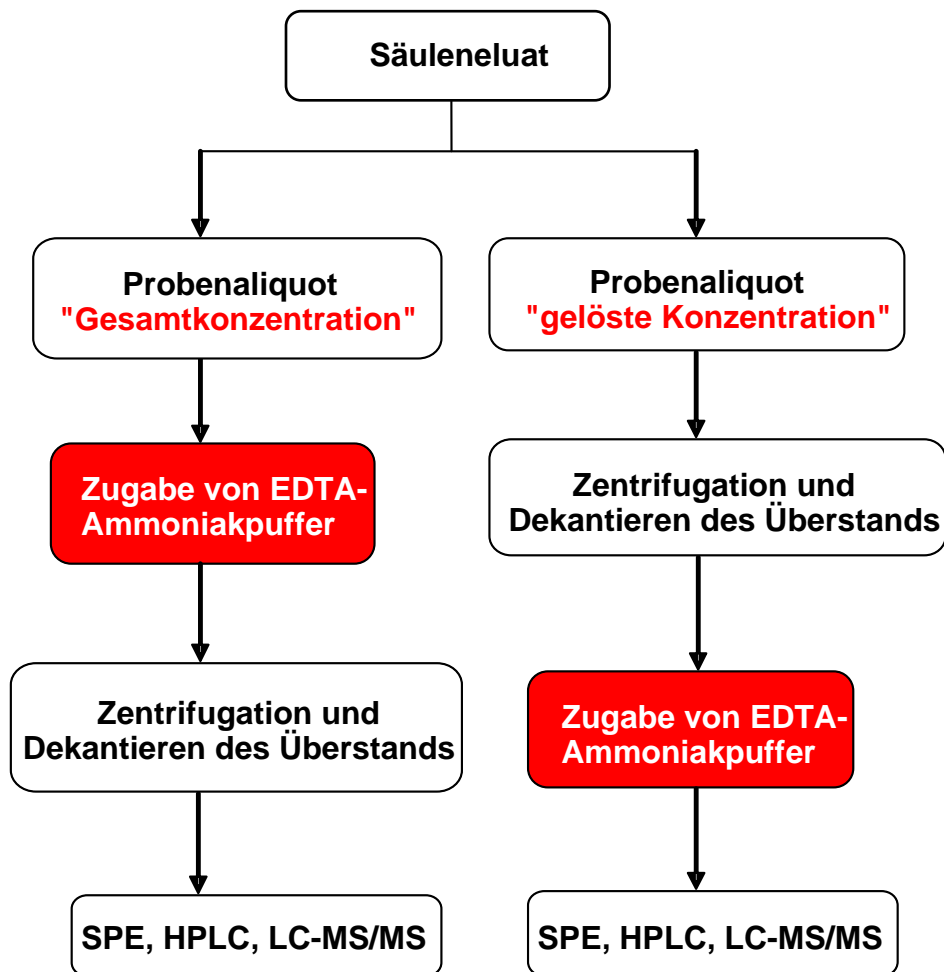


Abb. 49: Probenaufbereitung zur Ermittlung gelöster und partikelgebundener CTC- und SFD-Anteile [nach 477]

Aufgrund der eingesetzten Probenvorbereitung und der sich dadurch einstellenden pH-Werte konnten in den aufbereiteten Proben überwiegend nur iso-CTC und e-iso-CTC vorliegen. Alle Angaben zu CTC-Konzentrationen sind als Summe aller in der Originalprobe vorliegenden Isomere und Epimere des CTC zu verstehen [477].

Die besondere Problematik bei der Bewertung der Modellversuche

Eine quantitativ-analytische Erfassung Festphasen (Partikel-) gebundenen CTC und SFD ist nicht ohne weiteres möglich. Deshalb wurde vom IfW mit Hilfe des EDTA-Ammoniak-Puffers eine Verdrängung der Antibiotika von den Festphasen-Oberflächen vorgenommen. Alle bekannten leistungsfähigen Verfahren zur Bestimmung von Arzneistoffen in Böden beruhen auf einer vorherigen Extraktion der Analyte (s. Kap. 4). Direkte Bestimmungsmethoden (für

nicht radioaktiv markierte Analyte) sind diesbezüglich nicht bekannt und konnten auch im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich entwickelt werden (siehe Kap. 5.2.4). Jedenfalls kam es, insbesondere in der „Gesamtprobe“, zu erheblichen Minderbefunden, die u.a. mit den in Kapitel 5.2.3 beschriebenen Gründen erklärbar sind. Da dadurch eine Berechnung der partikelgebundenen Anteile nicht möglich war, werden die Ergebnisse der Analysen der jeweiligen Probenaliquote angegeben („vor-Probe“ = Pufferzugabe vor der Zentrifugation = „Gesamtkonzentration“; „nach-Probe“ = Pufferzugabe nach der Zentrifugation = „gelöste Probe“). Bei der Interpretation der dargestellten Daten ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der genutzten Trenngrenze zwischen gelösten und partikelgebundenen CTC sowie SFD um eine operationelle Grenze handelt. Die „gelöste“ Fraktion („nach-Probe“) enthält noch Partikel mit gegebenenfalls anhaftendem CTC und SFD. Dies gilt insbesondere für Partikel < 100 nm und Partikel mit spezifischen Gewichten nahe 1 g/cm³ (z.B. organische Stoffe) [477]. Ferner werden bei der Abtrennung komplexiertes CTC und SFD (z.B. Huminstoff- oder Metall-Komplexe) zur gelösten Fraktion gerechnet. Weiterhin ist zu keinem Zeitpunkt eine analytische Unterscheidung zwischen CTC und iso-CTC möglich. Aufgrund des in Kap. 5.2.1 beschriebenen teilweise sehr unterschiedlichen Sorptionsverhaltens (pH- und Sorbensabhängig) der CTC-Isomere und der Komplexität der beteiligten Faktoren im Boden, sind keine differenzierenden Aussagen bezüglich des Verhaltens der jeweils dotierten CTC-Verbindungen möglich. Es könnte, wenn auch unwahrscheinlich, sowohl nur CTC als auch nur iso-CTC verlagert worden sein.

Faktoren die sich auf die Sorptions- und Desorptionsprozesse auswirken, z.B. Ionenstärke und pH-Wert, könnten sich im Sickerwasser (während des Transports) und im Eluat (im Probensammelgefäß, nach Bodenpassage) unterschieden haben. Eine Bildung von Partikeln (z.B. Eisenhydroxid) war daher auch im Eluat möglich. Der Nachweis von partikelgebundenen CTC- bzw. SFD-Anteilen in den Eluatproben ist somit nicht gleichbedeutend mit den tatsächlich mit der Sickerwasserströmung transportierten partikelgebundenen Anteilen.

Alle Proben wurden zudem auf N4-SFD als mögliches Metabolisierungsprodukt von SFD hin untersucht, welches aber in keiner der Proben nachweisbar war.

5.2.2.1.1 Versuchsansatz im Labormaßstab

Versuchsaufbau und Durchführung

Für die Untersuchung im Labormaßstab wurde der in Abbildung 50 dargestellte Versuchsaufbau (Dimensionen: siehe Tabelle 19) mit einem seit mehr als 10 Jahre

brachliegenden stark humosen Ackerboden verwendet. Der Boden ist ein feinsandiger Podsol mit einem hohen Schluffanteil (genauere Charakterisierung siehe Anhang A.3.2), in welchem keine SFD- und CTC-Rückstände nachgewiesen werden konnten. Es wurden 65 ml Gülle (siehe [477]), welche 17 Tage zuvor mit 6,51 mg CTC, 6,50 mg iso-CTC und 6,51 mg SFD dotiert wurde, in die oberen 2 cm der Säulenfüllung eingearbeitet. In einen Zeitraum von 42 Tagen wurden 13 Beregnungsereignisse (B1-B13) durchgeführt, welche sich aus einer 10-stündigen Abfolge von 14 Beregnungen mit jeweils 170 ml künstlichem Regen (siehe [477]) in 15 Minuten und 30 Minuten Trockenheit zusammensetzten. Die Abstände zwischen den Beregnungsereignissen lagen zwischen 1 und 6 Tagen, wobei die zeitlichen Abstände zum Ende hin zunahmten. Auf der Seite des Eluataustritts aus der Versuchssäule wurde ein Unterdruck von maximal 10 hPa angelegt, um eine ausreichende Belüftung des Bodens zur Verhinderung anaerober Milieubedingungen zu erreichen.

Das gesamte Säuleneluat aus je einem Beregnungsereignis ergab eine Sammelprobe, wovon jeweils ein Probenaliquot zur Ermittlung der „Gesamtkonzentration“ und „gelösten Konzentration“ entnommen wurde.

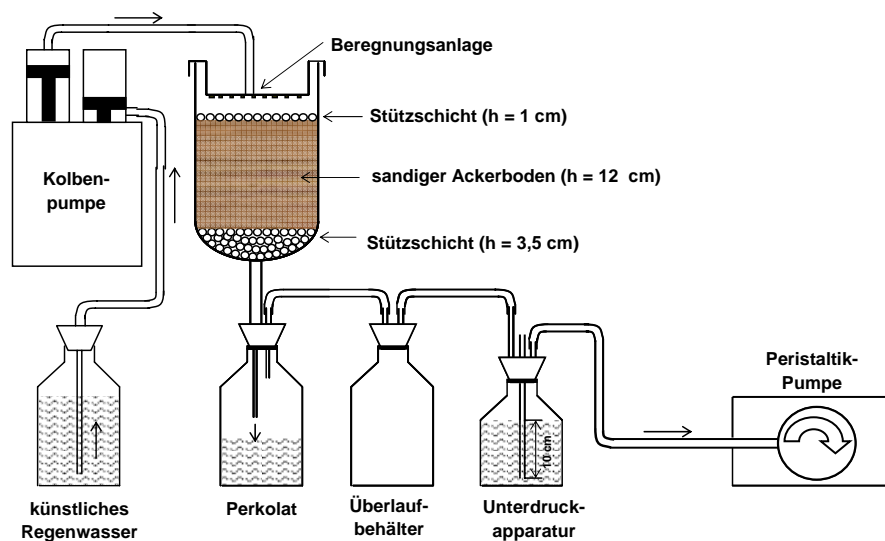


Abb. 50: Schematischer Aufbau des Laborsäulensystems mit Ackerboden und Gülle nach IfW [477]

Partikelkonzentration

Voraussetzung für die Untersuchung eines partikelgebundenen Transports der Arzneistoffe ist, dass ausreichend Partikel mit dem Sickerwasser während des Säulenversuchs transportiert werden. Weiterhin müssen die transportierten Partikel nahezu vollständig vom Säuleneluat abtrennbar sein, um die Bedeutung des partikelgebundenen Transportweges für die Arzneistoffe einschätzen zu können. Die Bestimmung der

Partikelkonzentration in den Säuleneluaten (unzentrifugiert/zentrifugiert) lieferte die in Abbildung 51 dargestellten Ergebnisse [477].

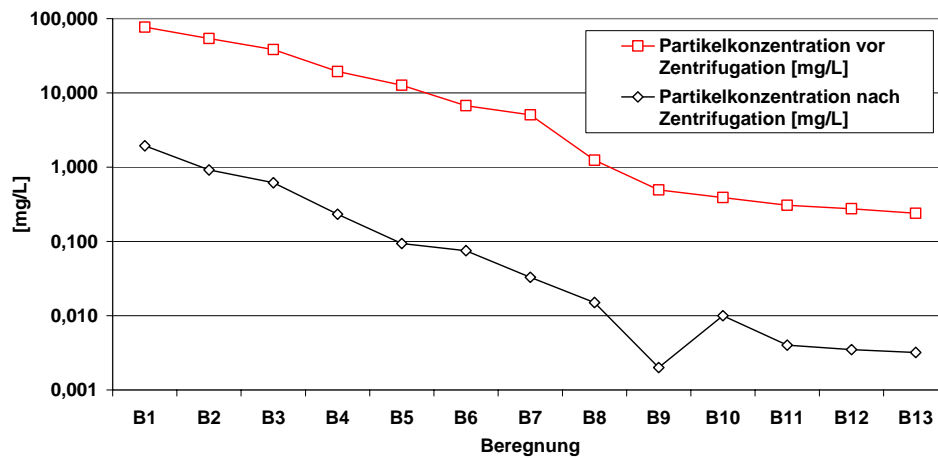


Abb. 51: Entwicklung der Partikelkonzentration im Eluat des Laborsäulensystems [IfW, 477]

Die Partikelkonzentration fiel im Eluat der einzelnen Beregnungsereignisse von anfänglich 1,94 mg/L kontinuierlich ab und stagnierte schließlich bei etwa 0,3 mg/L. Somit stand bis zum Versucheende ein Partikelkollektiv für einen partikelgebundenen Transport der Arzneistoffe zur Verfügung. In den einzelnen Bodeneluaten konnten ca. 99% der Partikelmasse durch Zentrifugation abgetrennt werden.

Ergebnisse des Versuchs im Labormaßstab

Bereits in den Eluaten der ersten drei Beregnungen erfolgte ein Durchbruch von CTC (Abb. 52) und SFD (Abb. 53). Die höchsten Konzentrationen von CTC (660 ng/L) und SFD (2100 ng/L) wurden im Eluat der zweiten Beregnung (Probe B2) ermittelt. Diese hohen Konzentrationen gingen mit einem erheblichen Anstieg des pH-Wertes um 1 Einheit einher, welcher auf einen niedrigeren pH-Wert des „Regenwassers“ von B1 zurückzuführen ist. Beim Regenwasser des Regenereignisses B1 betrug bei pH-Wert 5,81. Bei allen anderen Regenereignissen lag dieser um pH = 6,5.

Im Rahmen mikrobiologischer Untersuchungen des IfW wurde zudem eine Zunahme der Esterase-Aktivitäten beobachtet, welches auf einen vermehrten Stoffwechsel der Mikroorganismen im begüllten Bereich des Ackerbodens hindeutet [477].

In den darauffolgenden vier Eluaten konnte bei (leicht) fallender Tendenz der pH-Werte und gleich bleibender Leitfähigkeit weder CTC noch SFD nachgewiesen werden. Mit den Eluaten der Proben B8 und B9 erfolgte ein zweiter Durchbruch von CTC mit einer Konzentration von bis 450 ng/L. Dieser Durchbruch ging einher mit einer nahezu doppelt so hohen Leitfähigkeit der Eluate wie in den Proben zuvor. Mit Probe B10 ging die Leitfähigkeit wieder auf das vorherige Niveau zurück und bis Versuchsende konnte in den Eluaten kein CTC nachgewiesen werden. Für SFD konnte kein zweiter Durchbruch festgestellt werden. Eine

Berechnung des partikelgebundenen transportierten Anteils der Arzneistoffe war nicht möglich, dennoch kann die höhere Konzentration von CTC in der „vor-Probe“ (Gesamtkonzentration) der Eluate B1 und B8 auf einen partikelgebundenen Ko-Transport von CTC hindeuten. Gleiches gilt für SFD in der Probe B1, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Allerdings könnten auch organische Bestandteile, insbesondere aus der Gülle, welche mit ins Sammelgefäß gelangt waren, zu einer erhöhten Sorption von SFD geführt haben.

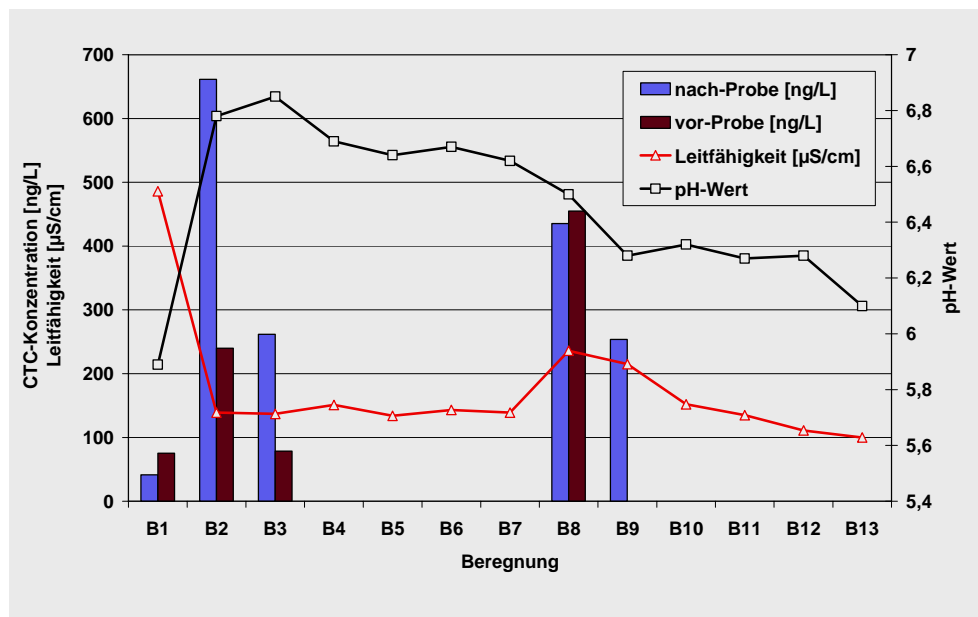


Abb. 52: CTC-Konzentrationen, pH-Werte und Leitfähigkeiten im Eluat des Laborsäulensystems (geändert nach [477])

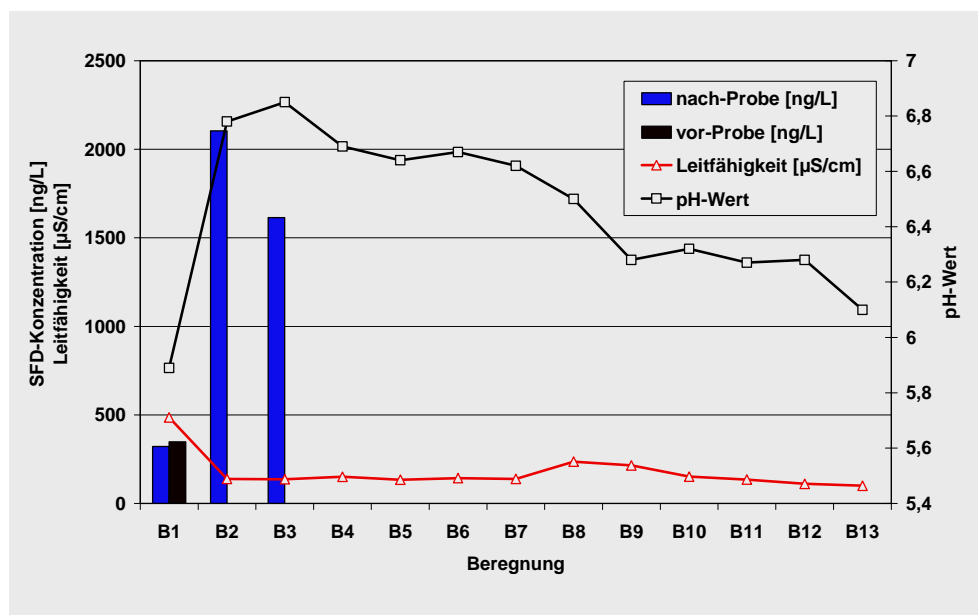


Abb. 53: SFD-Konzentrationen, pH-Werte und Leitfähigkeiten im Eluat des Laborsäulensystems (geändert nach [477])

Nach Beendigung des Versuchs wurden Bodenproben als tiefengestufte Mischproben aus der Säule entnommen. In der begüllten Bodenschicht (0-2 cm) wurden höhere Gehalte an CTC gefunden als in der darunter liegenden unbegüllten Bodenschicht (Tab. 20). In geringem Umfang fand mit dem Sickerwasser eine Verlagerung von CTC in tiefere Bodenschichten statt, was auf einen retardierten Transport und/oder partikulären Ko-Transport von CTC hinweist. SFD konnte in den Bodenproben nicht nachgewiesen werden.

Tab. 20: Antibiotika-Wirkstoffe im Boden am Ende des Säulenversuchs im Labormaßstab

Probe aus Bodentiefe [cm]	Gehalt [$\mu\text{g/kg TM}$]	
	Summe CTC	SFD
0-2	78,38	n.n.
2-10	23,52	n.n.

Auf Grundlage der in den Messproben ermittelten CTC- und SFD-Konzentrationen ist in Tabelle 21 eine vom IfW erstellte Bilanz der wiedergefundenen Gehalte bzw. Konzentrationen von CTC- und SFD zusammengefasst. Von den dotierten CTC-Verbindungen konnten nur 0,01 % im Sickerwasser gefunden werden. Auch im Boden waren die wiedergefundenen CTC-Gehalte mit 0,7 % sehr niedrig. SFD war im Sickerwasser nur zu 0,06 % der dotierten Menge nachweisbar und konnte im Boden nicht nachgewiesen werden. In der Gülle wurden 35 Tage nach der Dotierung nur 3,67 % der dotierten CTC-Verbindungen und 1,62 % des dotierten SFD wiedergefunden.

Tab. 21: Wiederfindung der Antibiotika-Wirkstoffe im Versuch in der Säule im Labormaßstab

Dotierte Wirkstoffmenge = 100% (bezogen auf dotierte Gülle)		Summe CTC [%]	SFD [%]
Wiederfindung der dotierten Wirkstoffmengen	im Boden	0,70	0
	im Eluat	0,01	0,06
	im Boden + Eluat	0,71	0,06

Alle Messproben (Eluate, Boden, Gülle) wurden zudem auf den SFD-Metaboliten N4-Acetyl-SFD untersucht, welcher aber in keiner der Proben nachweisbar war.

Eine Zusammenstellung der Messwerte des Versuchs im Laborsäulensystem befindet sich in Anhang A.4.3.

5.2.2.1.2 Naturnaher Versuchsansatz im halbtechnischen Maßstab

Versuchsaufbau und Durchführung

Für das Säulensystem im halbtechnischen Maßstab wurde vom IfW eine 1 m lange Säule mit einem Innendurchmesser von 45 cm eingesetzt. Der Versuchsaufbau ist in den Abbildungen 54 und 55 dargestellt. Die Unterschiede zum Versuch im Labormaßstab sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Über einer Filterstützschicht wurde ein sandiger Ackerboden mit 60 cm Mächtigkeit gestört und trocken eingebaut. Als Ackerboden wurde ein humoser Sandboden mit über 70 % Feinsand eingesetzt. Er wurde einem Acker entnommen, der seit mehr als 10 Jahren brach lag und nur sporadisch als Kuhweide genutzt wurde. Es konnten weder CTC noch SFD nachgewiesen werden. In die oberen 30 cm des Bodens wurde, in Anlehnung an den Pflughorizont eines Ackers, Gülle eingearbeitet. Entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis wurde mit 500 ml Gülle die Güllemenge eingearbeitet, die der maximal zulässigen jährlichen Nährstoffzufuhr entspricht. 9 Tage vor der Einarbeitung wurden zu der ursprünglich unbelasteten Gülle 49,98 mg CTC, 48,25 mg iso-CTC und 50,25 mg SFD dotiert [477].



Abb. 54: Bodensäule des halbtechnischen Säulenversuchs (für das Foto wurde die Lichtschutzverkleidung abgenommen) [IfW, 477]

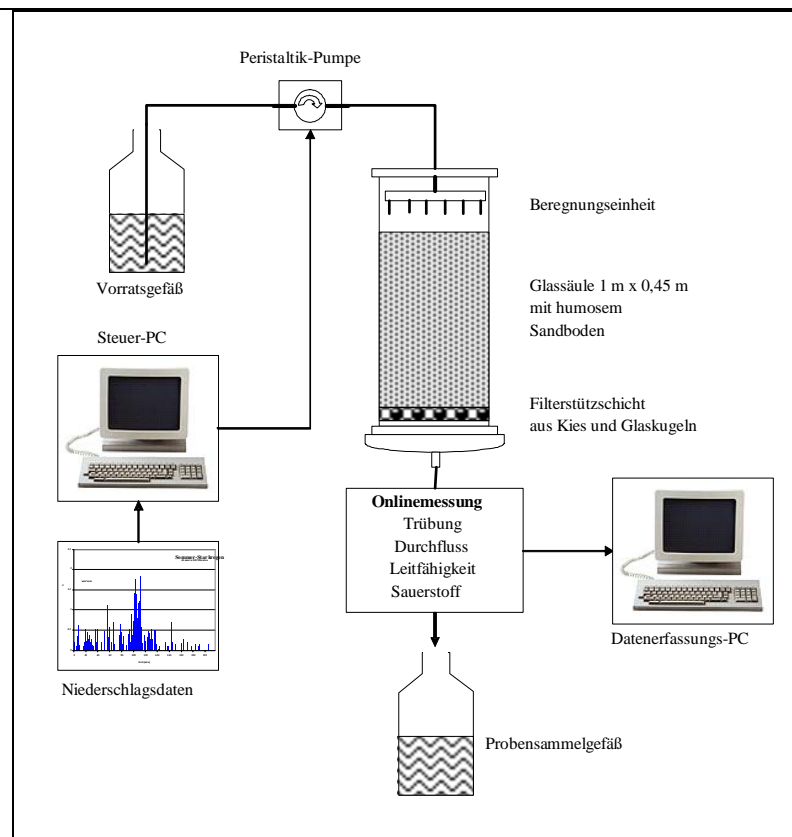


Abb. 55: Schematischer Aufbau des halbtechnischen Säulenversuchs [IfW, 477]

Die Beregnung erfolgte über eine PC-gesteuerte Beregnungsanlage. Verschiedene naturnahe Beregnungsszenarien mit Trockenphasen zwischen den Niederschlagsereignissen wurden nachgefahren (Abb. 56). Für eine naturnahe Beregnung wurden typische Regenereignisse von einer realen Niederschlagsmessreihe abgeleitet [477]:

- Landregen: 27 mm Niederschlagshöhe in einem Zeitraum von 80h (ca. 4 L auf der Säule)
- Starkregen: 46 mm Niederschlagshöhe in einem Zeitraum von 248 Minuten (ca. 7 L auf der Säule)
- Platzregen: 16 mm Niederschlagshöhe in einem Zeitraum von 16 Minuten (ca. 2 L auf der Säule)

Vom IfW wurden im Ablauf der Säule Durchfluss, Trübung (zur Berechnung der Partikelkonzentration), elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt und Temperatur kontinuierlich aufgenommen. Teilweise erfolgte zudem in den Eluatn eine Bestimmung der Eisen(II)-Konzentration und des Gehalts an organischen Material (Summenparameter: SAK-254 nm). Die vom IfW ermittelten Versuchsparameter werden, sofern ihnen eine relevante Bedeutung zukommt, in die Ergebnisdarstellung und Diskussion mit einbezogen. Für nähere Erläuterungen zu den Niederschlagsereignissen und den ermittelten Versuchsparametern sei auf den Projektbericht [477] verwiesen.

Das Sickerwasser wurde in einem Glasbehälter als Sammelprobe für jedes Beregnungsszenario aufgefangen und zur Analyse von CTC und SFD aufbereitet.

Konditionierung 11 d	Trocken- phase 11 d	Eintrag der CTC/SFD-belasteten Gülle	Trockenphase 10 d		
Landregen 1 80 h	Trocken- phase 3,5 d	Starkregen 1 248 min	Trocken- phase 2 d	Platzregen 1 16 min	Trocken- phase 5 d
Landregen 2 80 h	Trocken- phase 3,5 d	Starkregen 2 248 min	Trocken- phase 2 d	Platzregen 2 16 min	Trocken- phase 5 d
Landregen 3 80 h	Trocken- phase 3,5 d	Starkregen 3 248 min	Trocken- phase 2 d	Platzregen 3 16 min	Trocken- phase 5 d
Landregen 4 80 h	Trocken- phase 3,5 d	Starkregen 4 248 min	Trocken- phase 2 d	Platzregen 4 16 min	Trocken- phase 5 d
Ausbau des Bodens					

Abb. 56: Abfolge und Dauer der Beregnungs- und Trockenphasen des naturnahen Versuchsansatzes im halbtechnischen Maßstab [IfW, 477]

Partikelkonzentration

Durch eine hohe Aufzeichnungsdichte der am Säulenauslauf erfassten Daten (publiziert in [477]) war es möglich, sehr detaillierte Informationen über das zeitliche Auftreten von Sickerwasser und die Elution von Partikeln zu erhalten. Mit dem Sickerwasser wurden dabei kontinuierlich Partikel transportiert, wobei deren Konzentration auch bei niedrigen Sickerwasserabflüssen nicht unter 2 mg/L gefallen ist. Bei hohen Sickerwasserabflüssen traten häufig Spitzenkonzentrationen von über 50 mg/L auf. Mit einem erhöhten Sickerwasserabfluss wurde auch eine erhöhte Partikelkonzentration eluiert. Nach Berechnungen des IfW stand bis zum Versuchende ein Partikelkollektiv für einen partikelgebundenen Transport von Stoffen zur Verfügung. Die vom IfW ermittelten Daten zu Partikelfracht und -Konzentration sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Wie bei den Eluaten aus der Säule im Labormaßstab, konnte durch Zentrifugation der größte Teil der Partikelmasse abgetrennt werden.

Tab. 22: Partikelfracht und Partikelkonzentration im Eluat der im halbtechnischen Maßstab durchgeführten Säulenversuche (erstellt nach [477])

Regenereignis	Partikelfracht [mg]	Eluat	
		Partikelkonzentration vor Zentrifugation [mg/L]	Partikelkonzentration nach Zentrifugation [mg/L]
Landregen 1	7,1	2,4	0,5
Starkregen 1	29,9	4,7	2,2
Platzregen 1	40,2	5,9	6,4
Landregen 2	20,0	28,5	3,5
Starkregen 2	20,8	660,5	5,5
Platzregen 2	59,5	279,3	3,1
Landregen 3	111,4	43,2	1,9
Starkregen 3	39,6	1219,2	40,3
Platzregen 3	15,5	1219,2	3,3
Landregen 4	32,7	1219,2	4,4
Starkregen 4	23,0	1219,2	5,5
Platzregen 4	8,3	438,8	7,5

Besonderheiten während der Versuchsdurchführung

Nach IfW stellten sich zwischen Platzregen 1 und Landregen 2 infolge vermehrter mikrobieller Aktivitäten und mangelnder Sauerstoffzufuhr über die Bodenluft im Boden anaerobe hydrochemische Milieubedingungen ein, wodurch erhebliche Mengen von Fe(II) aus den Mineralien des Bodens gelöst wurden. Dieses führte wahrscheinlich auch zur Bildung von CTC-Fe-Komplexen (s. Kap. 5.2.1.2). Durch den Zutritt von Sauerstoff im Probensammelgefäß wurde das gelöste Fe(II) oxidiert und als Eisen(III)-(hydr)oxid gefällt. Dieser Vorgang hatte einen erheblichen Einfluss auf die Aufbereitung der Proben und die anschließende analytische Bestimmung der Antibiotikawirkstoffe (siehe auch Kap. 5.2.3).

Ergebnisse des Versuchs im halbtechnischen Maßstab

Das erste Auftreten von CTC im Sickerwasser wurde in den Proben der dritten Beregnung festgestellt (Abb. 57 und 58). Gleichzeitig nahm der pH-Wert der Eluatprobe leicht zu. In dieser Probe lag trotz der zu erwartenden Minderbefunde durch die Probenaufbereitung mit über 400 ng/L eine deutlich höhere „Gesamtkonzentration“ als die „gelöste“ Konzentration vor. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf einen partikelgebundenen Transport von CTC zu diesem Zeitpunkt des Versuchs. In der anschließenden Probe konnte CTC nur noch im Probenaliquot zur Bestimmung der „gelösten“ Konzentration ermittelt werden.

In den beiden sich weiter anschließenden Eluaten konnte kein CTC nachgewiesen werden.

Ein erneuter CTC-Durchbruch erfolgt mit Landregen 3. In der „gelösten“ Fraktion wurde mit etwa 580 ng/L die höchste im Eluat der Säule gemessene CTC-Konzentration bestimmt. Das Auftreten des zweiten CTC-Durchbruchs ging mit einem deutlichen Anstieg in der Partikelfracht (Tab. 22) einher, gleichzeitig nahm auch der pH-Wert des Säuleneluates wieder zu. Ein dritter CTC-Durchbruch erfolgte mit Platzregen 3, welcher auch hier wieder mit einem Anstieg des pH-Wertes einherging. Bereits im Eluat davor war der pH-Wert um mehr als eine Einheit abgefallen und es pendelte bis Versuchsende ein insgesamt niedrigeres pH-Niveau ein. Mit dem niedrigen pH-Werten nahm gleichzeitig die Partikelkonzentration in den Säuleneluaten enorm zu und blieb bis Versuchsende auf einem sehr hohen Niveau (siehe Tab. 22). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass mit Starkregen 3 die Pufferkapazität des Versuchsbodens durch die ständige Beregnung (Regenwasser: ca. pH 6,5) erreicht wurde und es infolge der sich neu eingestellten niedrigeren pH-Bedingungen zu einem erhöhten Eisenaustrag (insbesondere Fe^{2+}) mit dem Sickerwasser gekommen. Eine erhöhte mikrobielle Aktivität kommt allerdings auch in Betracht. Aufgrund der komplexen Vorgänge in Böden lässt sich der Hintergrund anhand der vorhandenen Daten nicht klären. Jedenfalls wurde das Fe(II) in den Sammelproben durch

den Zutritt von Sauerstoff im Probensammelgefäß oxidiert und als Eisen(hydr)oxid gefällt. Dies erklärt auch die Beobachtung einer stark erhöhten Partikelkonzentration in Sammelproben dieser Eluate.

Ein Nachweis von SFD war im Gegensatz zum Versuch im Labormaßstab in keinem der Eluate nachweisbar. Hier spielt möglicherweise die extreme Beregnung im Versuch des Labormaßstabes und die damit verbundene relativ schnelle Ausspülung von flüssigen Güllebestandteilen eine Rolle. Im Versuch des halbtechnischen Maßstabs bestanden jedenfalls deutlich längere Kontaktzeiten der Antibiotika-Wirkstoffe mit der Bodenmatrix.

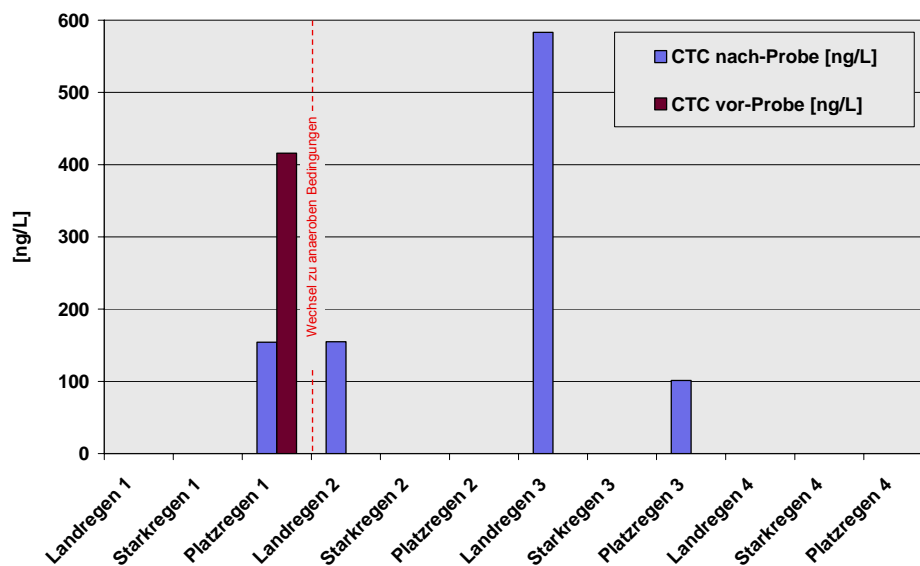


Abb. 57: CTC-Konzentrationen im Eluat des halbtechnischen Säulensystems (geändert nach [477])

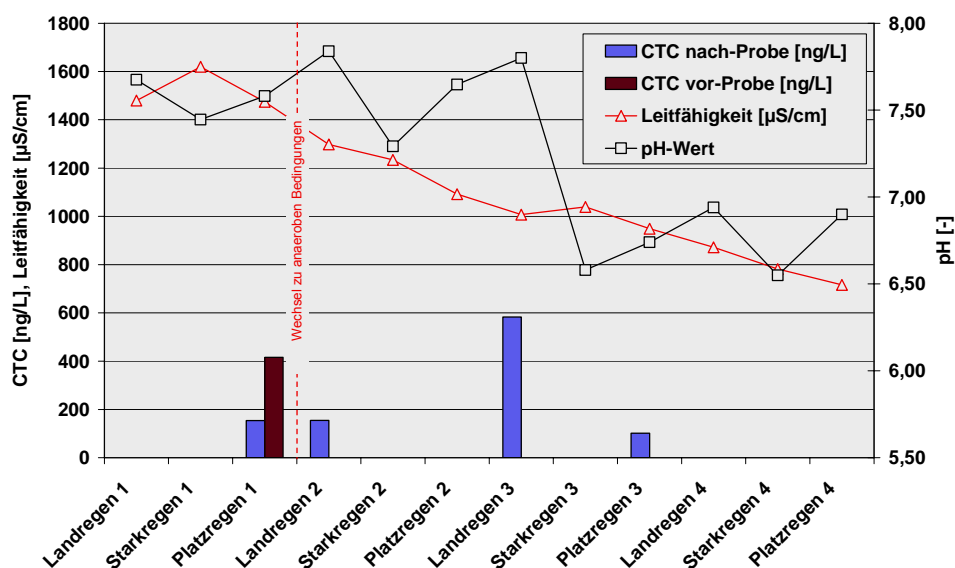


Abb. 58: CTC-Konzentrationen, pH-Werte und Leitfähigkeiten und pH-Werte im Eluat des halbtechnischen Säulensystems (geändert nach [477])

Nach Versuchsende wurden Bodenproben als tiefengestufte Mischproben aus der Säule entnommen. CTC konnte ausschließlich in den begüllten Bodenschichten nachgewiesen werden (Abb. 59). Innerhalb des begüllten Bodenbereichs steigen die Gehalte mit zunehmender Bodentiefe an. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Einarbeitung der Gülle betrugen die CTC-Gehalte, bezogen auf die der Gülle zudosierten CTC-Menge, im begüllten Bodenbereich etwa 1500 µg/kg TM.

Die Gehalte in der untersten begüllten Bodenschicht lagen bei 820 µg/kg TM. In den darüber liegenden Bodenschichten hatten die CTC-Gehalte dagegen deutlich abgenommen. Als mögliche Ursachen hierfür kommen sowohl Verlagerungsprozesse als auch eine biotische oder abiotische Umsetzung von CTC-Verbindungen in Frage. Eine Verlagerung von CTC-Verbindungen in die Bodenschichten unterhalb des begüllten Bereichs konnte nicht nachgewiesen werden. Im Sickerwasser konnten nur geringe Anteile der dosierten CTC-Verbindungen gefunden werden. Vor dem Hintergrund der Entwicklung anaerober hydrochemischer Milieubedingungen im Boden der Säule war mit zunehmender Bodentiefe mit abnehmenden Sauerstoffgehalten der Bodenluft zu rechnen. Dies könnte eine Erklärung für eine geringere Umsetzung von CTC-Verbindungen mit zunehmender Bodentiefe sein.

Auch SFD konnte nur in den begüllten Bodenschichten nachgewiesen werden (Abb. 59).

Mit zunehmender Bodentiefe im begüllten Bereich des Bodens wurden leicht ansteigende SFD-Gehalte ermittelt. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Einarbeitung der Gülle und auf Basis der zudosierten SFD-Menge betrugen SFD-Gehalte bei Versuchsstart etwa 1500 µg/kg TM.

Die im begüllten Bereich ermittelten SFD-Gehalte lagen weit unter dieser Größe. Es konnten nur SFD-Gehalte von maximal 43 µg/kg TM nachgewiesen werden. Hierfür kommen dieselben Ursachen wie für das Verhalten der CTC-Verbindungen in Frage. Teilweise könnte SFD auch als 4-OH-SFD vorgelegen haben [353]. Dieser Metabolit wurde aber bei der Analyse nicht untersucht.

Insbesondere wird aber vermutet, dass die niedrigen Gehalte von SFD im begüllten Bodenbereich auf die Bildung von sequestrierten und nicht-extrahierbaren SFD-Anteilen zurückzuführen sind (siehe Diskussion Kap. 5.1.5). Auch das SFD nicht im Sickerwasser des halbtechnischen Maßstabes nachgewiesen werden konnte, kann ein Indiz hierfür sein, da diese Bindungsprozesse mit zunehmender Kontaktzeit ein größeres Gewicht besitzen [9,10,452,470,474].

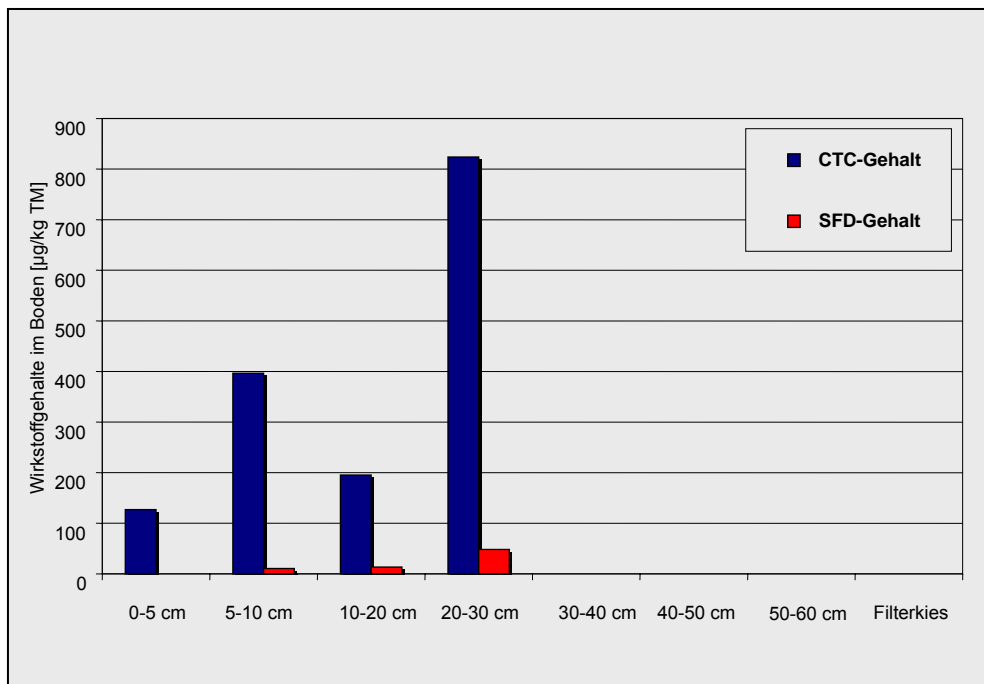


Abb. 59: Gehalte von CTC und SFD im Boden des halbtechnischen Säulensystems nach Abschluss der Beregnung (geändert nach [477])

Eine berechnete Bilanz der wiedergefundenen CTC- und SFD-Gehalte bzw. Konzentrationen ist in Tabelle 23 zusammengefasst. Es konnten nur 0,002 % der dotierten CTC-Verbindungen im Sickerwasser gefunden werden. Im Boden (nur begüllter Bereich) betrug die wiedergefundene Menge an dotierten CTC insgesamt 28 %. SFD war im Sickerwasser nicht nachweisbar, und im Boden konnten nur 2,9 % des zur Gülle dotierten SFD analytisch nachgewiesen werden.

In der Gülle wurden 3 Monate nach der Dotierung 28,15 % der zugesetzten CTC-Verbindungen und nur 0,02 % des SFD wiedergefunden.

Tab. 23: Wiederfindung von CTC und SFD im Versuch des halbtechnischen Maßstabs

Dotierte Wirkstoffmenge = 100% (bezogen auf dotierte Gülle)		Summe CTC [%]	SFD [%]
Wiederfindung der dotierten Wirkstoffmengen	im Boden	28,0	2,9
	im Eluat	0,002	0
	im Boden + Eluat	28,0	2,9

Wie es zu den geringen wiedergefundenen Gehalten von SFD und CTC in der Gülle gekommen ist, kann aufgrund der komplexen Zusammenhänge nicht gesagt werden. Gleiches gilt im Übrigen auch für die im Labormaßstab eingesetzten Gülle. Hier spielen auch wieder abiotischer und biotischer Abbau, sowie die Bildung von nicht-extrahierbaren und sequestrierten Anteilen eine Rolle.

Eine Zusammenstellung der Messwerte der Versuche im halbtechnischen Maßstab befindet sich in Anhang A.4.3.

5.2.2.2 Zusammenfassung: Ergebnisse der Säulenversuche und Schlussfolgerungen

Die wichtigsten Ergebnisse aus den Säulenversuchen lassen sich wie folgt zusammenfassen und interpretieren:

Die Ergebnisse der Sickerwasserproben vom Säulenversuch im halbtechnischen Maßstab zeigen, dass CTC auch durch Bodenschichten von 60 cm Tiefe verlagert werden kann. Daher besteht die Möglichkeit einer Verlagerung bis in Grundwasser. Auch SFD kann, wie der Versuch im Labormaßstab zeigt, bei einem extremen Niederschlagsereignis im Boden potentiell verlagert werden. Hamscher et al. konnten bei einer Feldstudie nach vier Jahren ein erstmaliges auftreten von CTC im Grundwasser nachweisen [85]. In Lysimeterversuchen fanden Henkelmann et al. im Sickerwasser Spuren von CTC und SFD unterhalb einer Bestimmungsgrenze von 3 µg/L [418]. Boxall et. al wiesen in Lysimeterversuchen einen Transport des Sulfonamids Sulfachloropyridazine mit dem Sickerwasser auch schon unter typischen Niederschlagsbedingungen nach [504].

Da der in den Versuchen verwendete Boden vor den Einbau in die Säule manuell zerkleinert und homogenisiert wurde, ist ein Transport von SFD und CTC auch in Böden ohne ausgeprägte Makroporensysteme (z.B. Wurmgänge, Wurzelkanäle) möglich.

Auffällig war, dass die CTC-Durchbrüche mit einer steigenden pH-Tendenz oder Leitfähigkeit in der Sammelprobe einhergingen. Der Einfluss von pH und Ionenstärke auf Sorptions- und Desorptionsprozesse bei Tetracyclinen ist bekannt (siehe Kap. 3.4), doch wie diese sich auf den Transportweg ausgewirkt haben, kann anhand der Analysen und der vom IFW ermittelten Parameter nicht gesagt werden.

Hinsichtlich der Tiefenverlagerung und Immobilisierung der Antibiotika-Wirkstoffe im Boden ergaben die durchgeführten Versuche unterschiedliche Ergebnisse. So konnte im Boden des Laborsäulensystems eine Verlagerung von SFD und CTC unterhalb des begüllten Bereichs festgestellt werden. Im Boden des Säulenversuchs im halbtechnischen Maßstab wurde dagegen keine Verlagerung über den begüllten Bodenbereich hinaus festgestellt. Ursache hierfür ist eventuell die starke Beregnung der Säule im Labormaßstab bei einer Bodentiefe von nur 2 cm für den begüllten Bereich. Möglicherweise spielen hier aber auch die unterschiedlichen hydrochemischen Randbedingungen (z.B. pH-Wert) in den Säulensystemen eine Rolle.

Eine Bilanzierung des Verbleibs der mit der Gülle in den Boden eingebrachten Antibiotika-Wirkstoffe war in keinem der untersuchten Systeme möglich. Es wurde grundsätzlich nur ein

Teil der dotierten Wirkstoffe wiedergefunden. Doch die niedrigen Werte, die von SFD in der Gülle und Boden wiedergefunden wurden, stimmen tendenziell mit vergleichbaren Untersuchungen überein. Für Sulfadiazin im Boden ermittelten z.B. Kreuzig et al. eine Halbwertszeit von 3 Tagen [474].

Der in den Böden wiedergefundene SFD-Gehalt ist im Vergleich zu der dotierten Güllemenge sehr gering. Demgegenüber ist der wiedergefundene CTC-Gehalt in den Böden um ein vielfaches höher. Dies stimmt tendenziell mit den Ergebnissen des „Antiinfektiva-Projekts“ [476] überein (siehe Kap. 5.1).

Es gibt Hinweise auf einen partikulären Transport von CTC, es ist aber nicht abzuschätzen, in welchem Umfang dieser zum Transport von CTC mit dem Sickerwasser beigetragen hat.

5.2.3 Ergänzende Untersuchungen zur Rückstandsanalytik „Differenzierung gelöster und partikelgebundener Spezies“

Wie zu Beginn von Kap. 5.2.2 erwähnt, gab es Probleme bei der analytischen Differenzierung zwischen *gelösten* (eluierten) und *partikelgebundenen* (eluierten) Antibiotika-Wirkstoffen. Durch Analyse zentrifugierter und nicht-zentrifugierter Probenaliquote wurde eine „Gesamtkonzentration“ und eine „gelöste Konzentration“ erhalten, und durch Differenzbildung schließlich der „partikelgebundene Anteil“. Da mit der angewandten rückstandsanalytischen Methode (Desorption, HPLC-UV-MS/MS-Bestimmung) eine direkte Bestimmung von Festphasen-gebundenem CTC und SFD nicht möglich ist, wurden mit dem schon erwähnten EDTA-Ammoniak-Puffer die Antibiotika von den Festphasen-Oberflächen desorbiert. Mit dieser Methode gab es bei „natürlichen“ Ackerboden-Proben – aber nicht bei den Modellfilterkörpern und Modellpartikeln - erhebliche Minderbefunde, vor allem in der „Gesamtprobe“. Auffällig war, dass diese Minderbefunde mit ansteigender Eisenkonzentration korrelieren. Deshalb wurden sowohl Modellversuche auf der Basis der in Kap. 5.2.1.2 beschriebenen Metallkomplexierungsstudien durchgeführt, um die Ursachen der beschriebenen Effekte aufzuklären, als auch Voruntersuchungen zur Anwendbarkeit einer alternativer (Screening-) Methoden mit Hilfe der Fluoreszenzspektrometrie (s. Kap. 5.2.4).

Einfluss der Eisen(III)hydroxid-Fällung auf die Wiederfindung

Bei diesen Modellversuchen wurden die experimentellen Bedingungen bei den entscheidenden (analytischen) Stadien der Laborexperimente näherungsweise simuliert.

Untersuchungsmethodik

In zwei getrennten Ansätzen (Version I und II, s. Abb. 60) wurde aus schwach salzsaurer FeCl_3 -Lösung Eisen(III)-hydroxid mit $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (pH 10) ausgefällt und dann die

erhaltene Suspension mit Salzsäure auf pH 7 eingestellt. Bei der **Version I** der Versuchsdurchführung wurde CTC nach der Fällung der Suspension zudosiert, bei der **Version II** vor der Fällung zu der Fe^{3+} -Lösung, wie den Schemata der Abb. 60a und b zu entnehmen ist. Die erhaltenen Reaktionsgemische wurden jeweils parallel nach zwei unterschiedlichen Varianten aufgearbeitet, analog zu der Probenvorbereitung der Boden- und Modellpartikelproben:

- Direkte „Extraktion“ des Hydroxid-sorbierten CTC durch Zusatz von $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ /EDTA-Puffer (pH 10), anschließend Zentrifugation und nachfolgend Analyse des Zentrifugates.
- Sofortige Zentrifugation, anschließende Extraktion des Zentrifugates mit dem Puffer und nachfolgende Analyse.

Die genaue Versuchsdurchführung ist in Anhang A.1.5.8 beschrieben. Die Analyse der Extrakt-Proben erfolgte nach SPE-Aufarbeitung mittels HPLC-DAD- MS^2 .

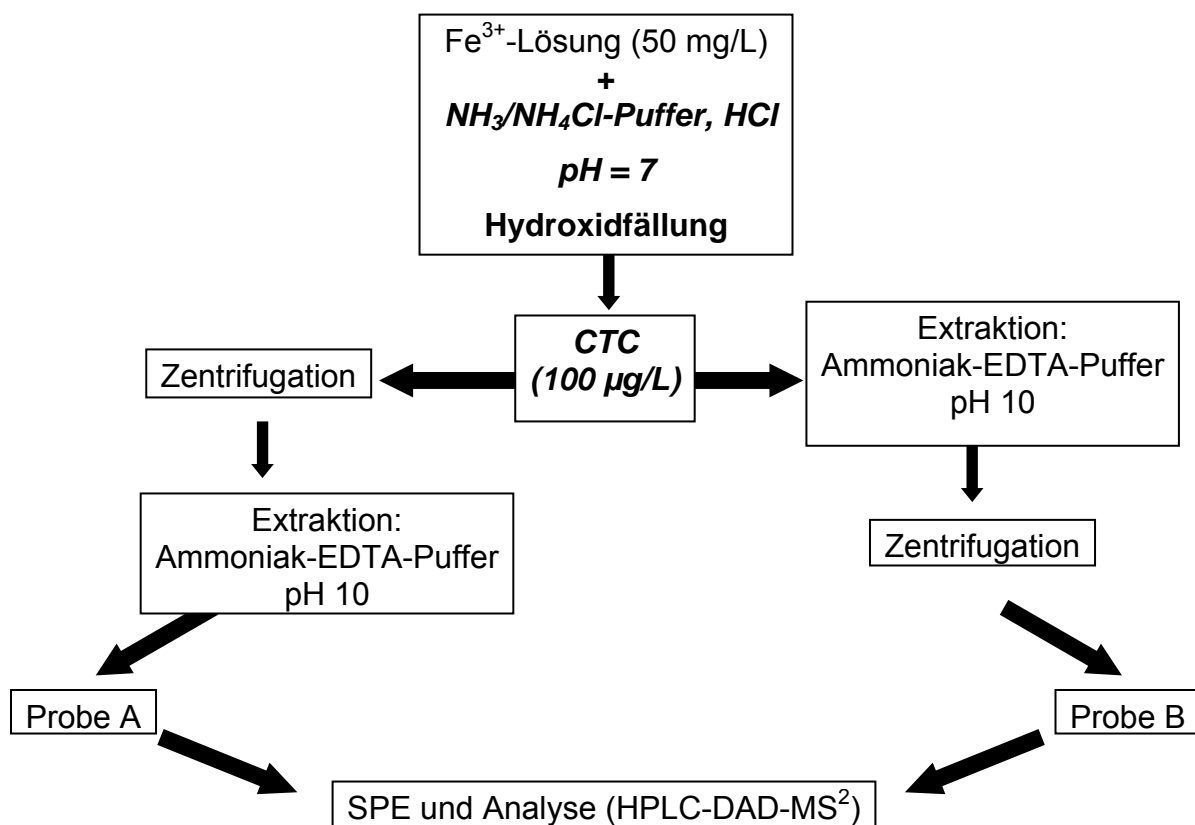


Abb. 60a: Versuchsschema zur Untersuchung des Einflusses der Eisenhydroxidfällung auf die Sorption und Extrahierbarkeit von CTC; **Version I: CTC-Dotierung nach der Fällung**

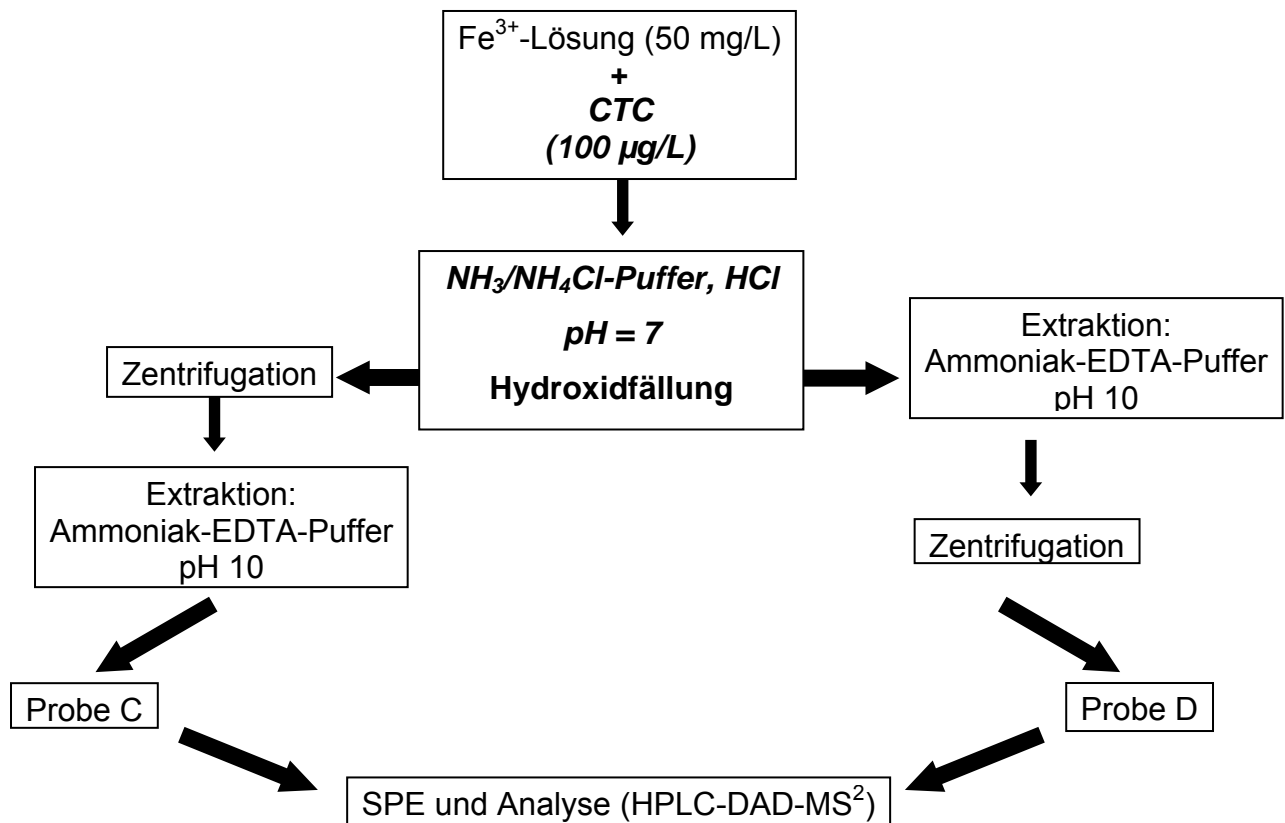


Abb. 60b: Versuchsschema zur Untersuchung des Einflusses der Eisenhydroxidfällung auf die Sorption und Extrahierbarkeit von CTC; **Version II: CTC-Dotierung vor der Fällung**

Es wurde erwartet, dass nach Version I der Fällungsabläufe das zugegebene CTC bevorzugt adsorptiv an die Oberflächen des Hydroxidgelkörpers gebunden wird, während nach der Version II mit Einschluss- bzw. Okklusionseffekten („Mitfällung“ von CTC) zu rechnen wäre.

5.2.3.1 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 24 aufgeführt. Daraus ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Reihenfolge von Fällung und CTC-Dotierung und der Extrahierbarkeit bzw. Wiederfindung von CTC (während der Extraktion zum iso-CTC umgewandelt).

In der Probe B der Versuchversion I (CTC-Dotierung nach der Fällung) ist die Wiederfindung mit 91,7% CTC am höchsten (Tab. 24), in der analogen Probe der Version II (Dotierung vor der Fällung) mit 26,3% aber erheblich niedriger. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass die desorbierende Wirkung des Extraktionspuffers überwiegend auf die zugänglichen äußeren (und inneren) Oberflächen des Eisenhydroxidgels bzw. Kolloids beschränkt ist, während mitgefällte, teilweise okkludierte Anteile des Chlortetracyclins nur zu einem geringen Teil erfassbar sind. Um CTC/iso-CTC vollständig extrahieren zu können, müsste das Eisenhydroxid vollständig in Lösung gebracht werden.

Wie aus den Ergebnissen der Sorption an Modellpartikeln zu erwarten war, ist der gelöste Anteil an CTC in den Proben sehr gering. Die Wiederfindungen von Probe A (0,4%) und Probe C (3,3%) belegen dies eindeutig. In Probe C ist der gelöste Anteil des Antibiotikums höher als in Probe A. Wahrscheinlich wurde bei der Dotierung vor der Fällung (Version II) eine relativ höhere Konzentration an gelösten CTC-Fe-Komplexen gebildet als bei der Versuchsversion I. Diese gelösten Anteile werden offenbar bei der anschließenden Eisenhydroxidfällung nur teilweise mitgefällt (s. Kap. 5.2.1.2).

Tab. 24: Ergebnisse zum Einfluss der Eisen(III)-Fällung auf die Wiederfindung von CTC (HPLC-MS/MS, 3-fach Injektion) (s. Schemata in Abb. 60a und b; 100% Wiederfindung bei 10000 µg/L)

Probe	e-iso-CTC [µg/L]	iso-CTC [µg/L]	Summe CTC [µg/L]	Wiederfindung [%]
Version I (CTC-Dotierung <u>nach</u> Fällung)				
A (Zentrifugat)	15±2	29±4	44±6	0,4±0,1
B (direkte Extraktion)	2032±117	7141±541	9173±658	91,7±6,6
Version II (CTC-Dotierung <u>vor</u> Fällung)				
*C (Zentrifugat)	155±17	171±23	326±40	3,3±0,4
D (direkte Extraktion)	837±98	1795±102	2632±200	26,3±2,0

*enthält noch Spuren von CTC

5.2.3.2 Schlussfolgerungen

Die beschriebenen Ergebnisse aus den Modellversuchen bieten einen Erklärungsansatz für die beschriebene Diskrepanz bei den Analysendaten der Proben aus den Bodensäulen zwischen „Gesamtkonzentration“ und „gelöster Konzentration“. Dabei sind jedoch verschiedene Einflussgrößen zu unterscheiden:

Zusammensetzung der Bodenproben

Die Zusammensetzung der einzelnen Proben der Säulenversuche waren höchst unterschiedlich, was u.a. aus den unterschiedlichen pH-Werten, Leitfähigkeitswerten und Partikelkonzentrationen sowie Gehalten an Eisen und anderen Metallionen (nicht bestimmt) resultiert, die alle einen Einfluss auf das Sorptionsmilieu für die Antibiotika ausüben.

Denkbar ist, dass bei den Säuleneluaten ein Teil der dotierten Antibiotika in dem Zentrifugationsrückstand als eine Art „bound residue“ vorlag, d.h. durch Okklusion für das Extraktionsmittel nur schwer zugänglich war. Nach Auflösung des Rückstandes vom „Landregen 2“ mit Salzsäure und anschließender Extraktion, wurde jedenfalls CTC, bedingt durch die Extraktionsbedingungen, als iso-CTC und e-iso-CTC, nachgewiesen (siehe Tab. 25). Der Einfluss anderer bodenrelevanter Metallionen, die ebenfalls schwerlösliche Hydroxide bilden, kann hierbei eine zusätzliche Rolle spielen. Im Rückstand von „Platzregen 3“ konnte kein CTC nachgewiesen werden, daher sind die Minderbefunde nicht allein auf diesen Zusammenhang zurückzuführen.

Tab. 25: Konzentration in den mit HCl aufgelösten Zentrifugationsrückständen aus "Vor-Proben" nach Zugabe von EDTA-Ammoniak-Puffer (Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS; Konzentrationen bezogen auf das zentrifugierte Probenvolumen der Säuleneluat)

Probe	e-iso-CTC [ng/L]	iso-CTC [ng/L]	Summe CTC [ng/L]	SFD [ng/L]
Rückstand Landregen 2	115±7	201±4	315±11	n.n.
Rückstand Platzregen 3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Wie in Kap. 5.2.2 berichtet, wurde Eisen(III) während der Säulenversuche infolge mikrobieller Aktivität unter anaeroben Bedingungen im Boden zu Eisen(II) reduziert und zusammen mit dem künstlichen Regenwasser und mobilem CTC transportiert. Abgesehen davon, dass Fe(III)-Hydroxid im Vergleich zu Fe(II)-Hydroxid ein kleineres Löslichkeitsprodukt besitzt und die Fällung bei einem anderen pH-Wert eintritt (siehe Tab. 26), sind Sorptions- und Okklusionsmechanismen auch bei der Fällung von Fe(OH)₂-Gelen zu erwarten, entsprechend den Ergebnissen der Modellversuche (siehe Kap. 5.2.1). Der Übergang zu aeroben Bedingungen führt darüber hinaus zu einer (partiellen) Reoxidation der Fe(II)-Anteile mit u.U. lokalen pH-Änderungen, so dass während der Säulenversuche kein homogenes Sorptions- und Desorptionsmilieu vorgelegen haben kann.

Tab. 26: Löslichkeitsprodukte (nach ChemDat[®] [505]) und Fällungsbeginn (nach J. Strähle [502]) von Eisenhydroxiden

Substanz	Löslichkeitsprodukt bei 18 °C [mol/L]	Fällungsbeginn
Fe(II)-Hydroxid	$1,64 \times 10^{-14}$	pH 5,8-8,5
Fe(III)-Hydroxid	$1,10 \times 10^{-36}$	pH 2,2-7,0

Die Komplexität der Vorgänge wird durch die folgenden, in der Fachliteratur beschriebenen Beobachtungen ebenfalls deutlich: Figueroa et al. untersuchten die Sorption von Oxytetracyclin (OTC) an oxidische Eisenerze und eisenreichen Böden und die Wirkung verschiedener Extraktionsmittel, wie z.B. 0,25 mol/L EDTA bei pH 8,9 [436]. Aus den

oxidischen Eisenerzen konnten damit 36-40% des OTC extrahiert werden, aus den eisenreichen Böden war aber keine Extraktion nachweisbar. OTC zeigte in den Versuchen mit oxidischen Eisenerzen ein Sorptionsmaximum bei pH 8. Gu et al. untersuchten die Interaktion von Tetracyclin mit Eisen(III)- und Aluminiumhydroxid. Sie ermittelten für Eisenhydroxid eine Abnahme der Sorption ab pH 6 und für Aluminiumhydroxid ein Sorptionsmaximum bei pH 7 [435].

Aufgrund dieser und der eigenen Untersuchungsergebnisse wird erkennbar, dass die desorbierende Wirkung von EDTA in (alkalischen/ammoniakalischen) Extraktionsmitteln im hohen Maße von der mineralischen Zusammensetzung der (Boden-) Proben abhängt – aber auch organische Komponenten können einen markanten Einfluss ausüben:

So zeigen Untersuchungen von Sithole et al. [431,432], dass der Sorptionsgrad von Tetracyclin an Tonmineralien, Torf und Huminsäuren mit steigenden pH-Werten (ab pH 4) unterschiedlich stark abnimmt und bei allen Sorbentien im alkalischen pH-Bereich ein annähernd konstantes Minimum erreicht. Neben dem Einfluss des pH-Werts auf die Sorptionsgrade zeigen diese Untersuchungen auch die Abhängigkeit der Sorption von der Ionenstärke. Kulshrestha et al. fanden heraus, dass sich durch Gülle und Huminsäuren (gelöstes organisches Material) die Sorbierbarkeit von Oxytetracyclin an Ton im pH-Bereich von 1,5 - 11 erheblich verringert [427].

Die Komplexität der Zusammenhänge im Boden wird dadurch deutlich, dass die Sorption von Arzneistoffen an organische Komponenten (SOM) von der Konzentration an Metallkationen abhängt und die Sorption an mineralischen Komponenten vom Gehalt an gelöstem organischem Material (DOM). Der Einfluss der Bildung von ternären Komplexen (z.B. Arzneistoff-Metallkation-SOM) auf die Sorption von Arzneistoffen in Böden ist jedoch unzureichend untersucht [503].

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Proben in den Säuleneluat sind die Minderbefunde nicht allein auf die Okklusion von CTC in Metallhydroxidfällungen während der Probenaufarbeitung zurückzuführen. Denn sonst hätte auch im Rückstand der Probe von „Platzregen 3“ CTC nachweisbar gewesen sein müssen. In wie weit auch organische Komponenten oder die Komplexbildung Einfluss auf die Probenaufarbeitung und Bestimmung von SFD und CTC hatten, bleibt offen.

Analysenmethodik

Die uneinheitliche Extraktionseffektivität von EDTA-Ammoniak-Puffer in Abhängigkeit der Probenzusammensetzung wurde bereits erwähnt. Die daraus resultierende Variationsbreite der Extraktzusammensetzung kann ein kritischer Faktor bei der anschließenden Festphasenextraktion (SPE) sein, zumal bei den Wiederfindungsstudien nicht alle Faktoren berücksichtigt werden konnten. Dazu zählen sicherlich – neben den „echt“ gelösten

Antibiotikarückständen - die partikelgebundenen Anteile in den unterschiedlichen Extrakten der Zentrifugate und Rückstände, bzw. den Fraktionen der „gelösten Konzentration“ und der „Gesamtkonzentration“.

Da durch die Zentrifugation Partikel oberhalb eines bestimmten Dichtebereiches sedimentieren, blieben neben den „gelösten“ CTC's auch partikulär gebundene im Zentrifugat zurück. Man kann davon ausgehen, dass in den Messproben der „gelösten Konzentration“ - also in den Eluaten der Festphasenextraktion - im Vergleich zu den Messproben der „Gesamtkonzentration“ - eine erheblich geringere Partikelkonzentration vorlag, aber vermutlich eine ähnliche Konzentration an gelösten organischen Substanzen.

Jedenfalls sind Beeinträchtigungen bei Anwendung der SPE-Methode möglich, die vermutlich mit dazu beigetragen haben, dass in einigen Proben der „Gesamtkonzentration“ kein CTC nachzuweisen war, wohl aber in Proben der „gelösten Konzentration“. Derartige Effekte sind sowohl bei Bestimmung der Rückstände an Chlortetracyclin als auch an Sulfadiazin möglich.

Wie beschrieben, wurden die jeweiligen Eluate der Festphasenextraktion als Messprobe mit dem LC-MS-System auf Antibiotikarückstände analysiert. Besonders bei Sulfonamiden - im Unterschied zu Tetracyclinen – können Matrixeffekte zu einer Unterdrückung der MS-Signale führen. Derartige Suppressionseffekte leisten ebenfalls einen Beitrag zu Minderbefunde, die mit zusätzlichem Aufwand, z.B. durch das Standardadditionsverfahren, kompensierbar sind, sofern ausreichend Probenmaterial verfügbar ist (s. Kap. 5.1.3.2).

Eine ausführlichere Untersuchung derartiger Effekte war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Fazit

Generell ist der verwendete Ammoniak-EDTA-Extraktionspuffer auf Tetracyclin-beladene Metalloxide und -hydroxide anwendbar, wie die Untersuchungen des Vorgängerprojektes „Antiinfektivaeinträge“ und die Rückstandsuntersuchungen an den Säulenböden zeigen. Dabei ermöglicht der Puffer die Analyse extrahierbarer Anteile von bestimmten Antibiotika-Wirkstoffgruppen in Böden, versagt aber - wie andere Puffersysteme – bei der Erfassung gebundener Anteile („bound residues“). Der im Rahmen des Projekts angestrebten Bestimmung des partikelgebundenen und gelösten Anteils von CTC und SFD sind daher Grenzen gesetzt, die chemisch und analytisch- methodisch ansatzweise erklärbar sind.

5.2.4 Fluoreszenzuntersuchungen an partikelgebundenem CTC und iso-CTC

Die in Kap. 5.2.2 beschriebenen Analysenverfahren zur Bestimmung von Arzneistoffrückständen in Bodenproben (partikelgebundene und gelöste Anteile) und die kritische Ergebnisdiskussion ließen die Grenzen der angewandten indirekten Methode – Fest-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion, Eluatanalyse – deutlich werden.

Allgemein sind mit den einsetzbaren Extraktionsmitteln (verschiedene Puffergemische, z.T. mit Lösemittelzusätzen) in Abhängigkeit von Bodentyp und -beschaffenheit unterschiedliche Extraktionsgrade bzw. Wiederfindungen erreichbar, woraus ebenso unterschiedliche Anteile nicht-extrahierbarer, gebundener Rückstände resultieren.

Alternativ wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, das methodische Defizit der indirekten Methode durch Ausnutzung der Fluoreszenzeigenschaften von Tetracyclinen (Abb. 61) auszugleichen, indem Rückstände dieser Wirkstoffklasse fluoreszenzspektrometrisch direkt in fester Phase bestimmt werden, u.U. mit der Erfassung gebundener Rückstände. Untersuchungen zeigten, dass Tetracycline in Knochen fluoreszenzspektrometrisch quantifizierbar sind [7,506]. Ob Fluoreszenzmethoden auch bei Bestimmung von Tetracyclinen in der komplexen Bodenmatrix anwendbar sind, war nicht bekannt. In der Literatur ist beschrieben, dass fluoreszierende Tracer (z.B. Brilliant Sulfaflavine, Sulforhodamine B, Oxazine 170) bei der Identifikation von Transportprozessen in Böden eingesetzt werden [507-510]. Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob prinzipiell fluorometrische Screeningmethoden LC-UV-MS-Methoden sinnvoll ergänzen oder – je nach Zielsetzung der geplanten Untersuchungen - sogar ersetzen könnten.

5.2.4.1 Qualitative Fluoreszenzanalyse

Zunächst wurden Vorversuche mit CTC- und iso-CTC-beladenen Modellpartikeln durchgeführt, die im Kap. 5.2.1.1 beschrieben sind.

Ein Mikrolöffel der unbeladenen Modell-Partikel, beladenen Partikel (lyophilisiert) und „freien“ Tetracycline (Feststoffe) wurden in eine Mikrotiterplatte (Thermo Microtiter 96-well plate) gegeben. Die Fluoreszenz wurde im Reflexionsmodus (spitzer Winkel) gemessen (Varioskan, Spektrofluorometer und Spectrophotometer (Thermo Electron), siehe Anhang A.1.2.3). Die Aluminiumoxidpartikel wurden zusätzlich mit einer UV-Lampe (CAMAG UV-Lampen und UV-Betrachter) qualitativ untersucht.

Alle eingesetzten Tetracyclin-Derivate zeigen als Feststoff eine deutliche Fluoreszenz (Abb. 61), wobei Lage und Intensität der Fluoreszenzmaxima sehr unterschiedlich sind.

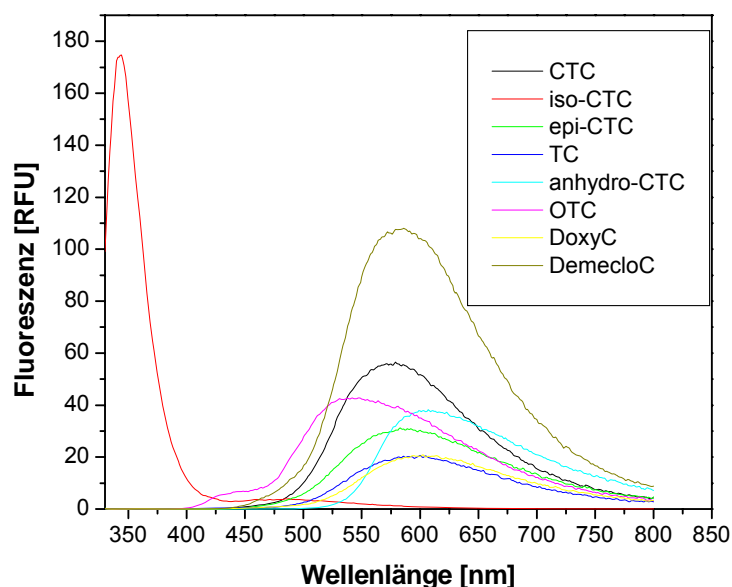


Abb. 61: Fluoreszenzspektren der „freien“ Tetracycline (Feststoff; $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$)

Die deutliche Fluoreszenz von Aluminiumoxid, das mit Chlortetracyclinen beladen wurde, ist bereits mit bloßem Auge unter einer UV-Lampe erkennbar (Abb. 62). CTC-beladenes Aluminiumoxid zeigt gelbe ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) und iso-CTC-beladenes Aluminiumoxid blaue Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 398 \text{ nm}$), so dass auch eine qualitative Unterscheidung möglich ist.

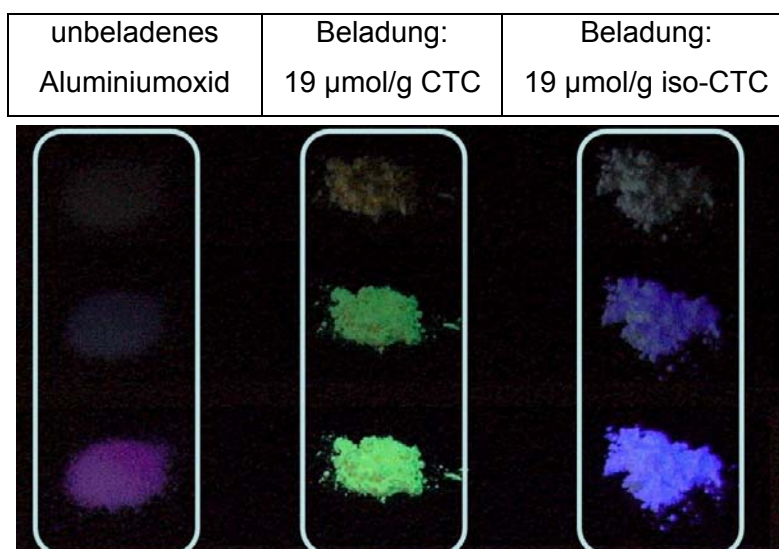


Abb. 62: Fluoreszenz CTC- und iso-CTC-beladener Aluminiumoxide
(von oben nach unten: ohne Anregung, $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$)

Die intensivsten Fluoreszenzeffekte wurden beim beladenen Aluminiumoxid (sauer) und Aluminiumoxid (basisch) beobachtet (Abb. 63 und 64).

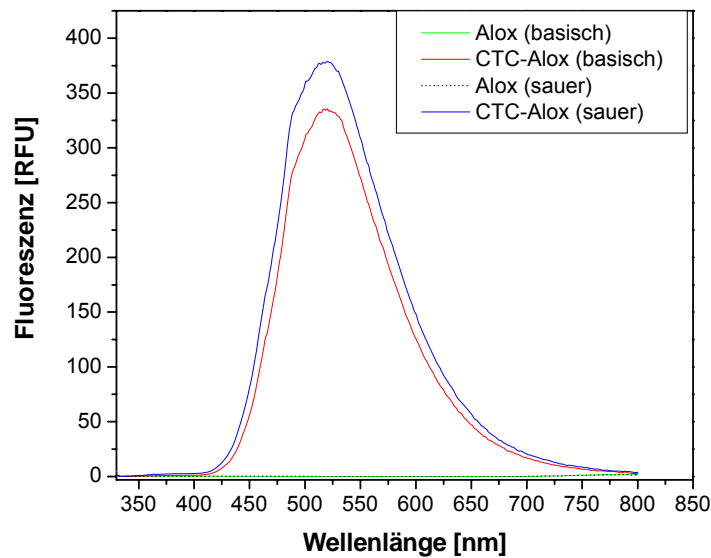


Abb. 63: Fluoreszenzspektren CTC-beladener und unbeladener Aluminiumoxide ($\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$) (schwarze und grüne Basislinie: keine Eigenfluoreszenz); Al_2O_3 sauer $19,0 \mu\text{mol/g}$, Al_2O_3 basisch $18,8 \mu\text{mol/g}$ CTC)

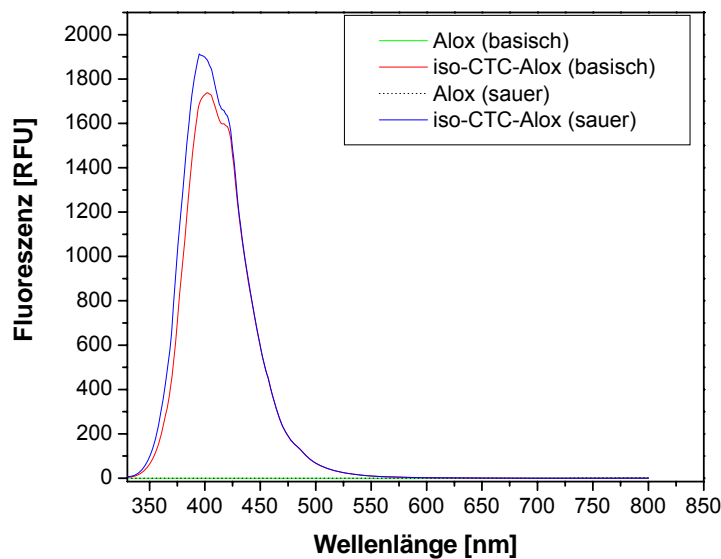


Abb. 64: Fluoreszenzspektren iso-CTC-beladener und unbeladener Aluminiumoxide ($\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$) (schwarze und grüne Basislinie: keine Eigenfluoreszenz); Al_2O_3 sauer: $19,0 \mu\text{mol/g}$, Al_2O_3 basisch: $17,7 \mu\text{mol/g}$ CTC)

Die übrigen beladenen Partikel zeigen nur schwache Fluoreszenz (vergl. Abb. 65 und 66). Hier spielen Quenchingeffekte durch das Sorptionsmittel, Einlagerung der Antibiotika in Zwischenschichten des Montmorillonits (Bentonit), geringe Sorptionskapazität, pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität u.a. Faktoren eine Rolle.

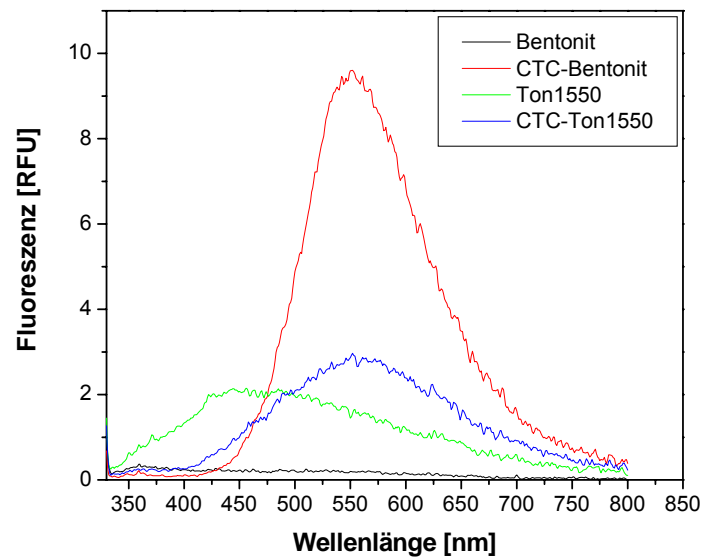


Abb. 65: Fluoreszenzspektren CTC-beladener und unbeladener Tonminerale
(Bentonit: 18,8 $\mu\text{mol/g}$, Ton1550: 14,2 $\mu\text{mol/g}$ CTC, $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$)

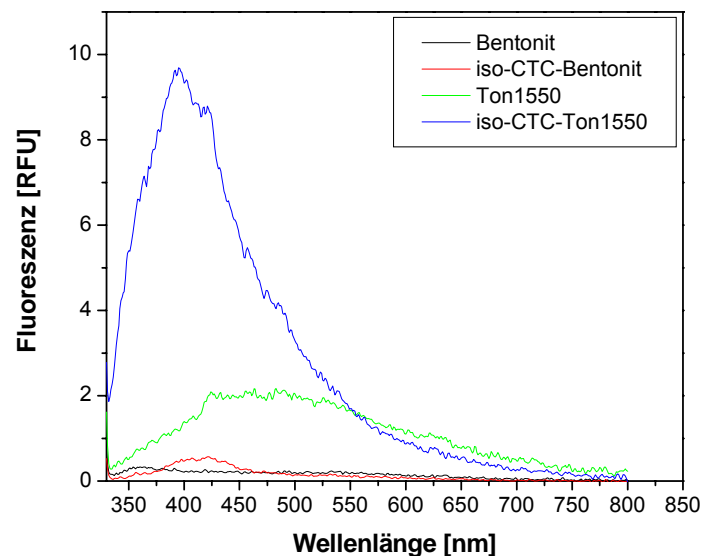


Abb. 66: Fluoreszenzspektren iso-CTC-beladener und unbeladener Tonminerale
(Bentonit : 2,9 $\mu\text{mol/g}$, Ton1550: 15,3 $\mu\text{mol/g}$, $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$)

Die Lage und Intensität der Fluoreszenzmaxima wird in hohem Maße von der Partikelart bzw. Trägermatrix beeinflusst. Somit wäre eine einfache Kalibrierung des Fluoreszenzspektrometers nur für festgelegte Antibiotika-Modellpartikel-Paare möglich. Durch manuelle oder automatisierte Bearbeitung der Spektren kann aber die Lage der Fluoreszenzmaxima korrigiert werden, was allerdings die Messung über einen größeren Wellenlängenbereich voraussetzt.

Die starke Matrix-Abhängigkeit der Fluoreszenz von Chlortetracyclinen wird bei der Messung an Realproben deutlich. Ein CTC-beladener Oberboden (Nullprobe) zeigte keinen eindeutigen und auswertbaren Verlauf des Fluoreszenzspektrums (Abb. 67) und der mit iso-CTC beladene Oberboden eine mit 1,3 RFU (Relative Fluorescence Unit) nur relativ niedrige Intensität des Fluoreszenzmaximums (Abb. 68).

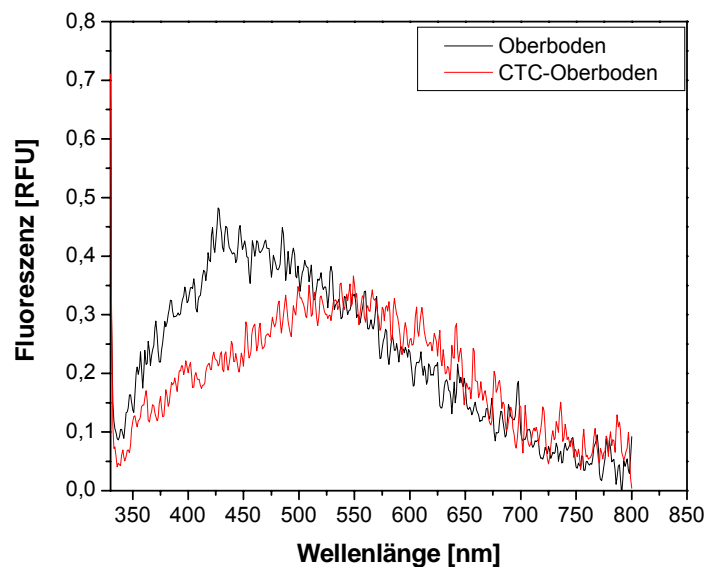


Abb. 67: Fluoreszenzspektren von CTC-beladenem (13,2 µmol/g) und unbeladenem Oberboden ($\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$)

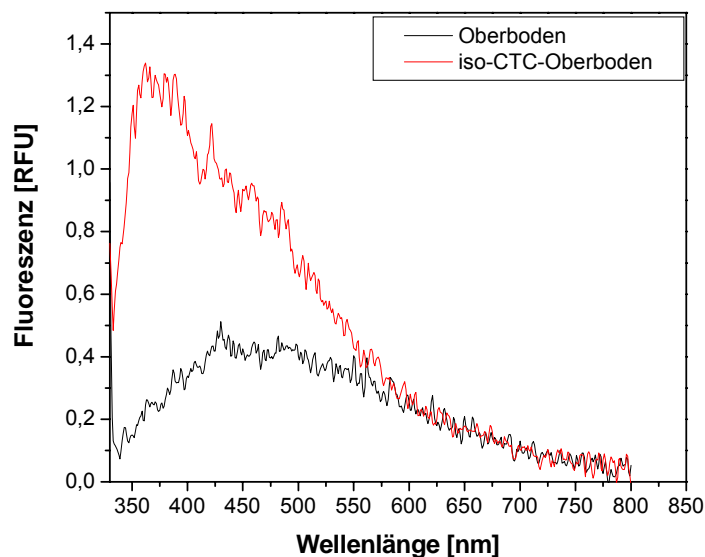


Abb. 68: Fluoreszenzspektren von iso-CTC-beladenem (14,9 µmol/g) und unbeladenem Oberboden ($\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$)

5.2.4.2 Quantitative Fluoreszenzanalyse

Zur Vorbereitung einer quantitativen fluoreszenzspektrometrischen Bestimmung von partikelgebundenem CTC bzw. iso-CTC wurden Aluminiumoxidpartikel (sauer) bei pH 7 mit steigenden Mengen an CTC bzw. iso-CTC nach der allgemeinen Sorptionsvorschrift in Anhang A.1.5.5 belegt. Die sorbierten CTC-Mengen wurden indirekt durch Analyse der wässrigen Phasen mit HPLC-DAD-MS² bestimmt.

Die Beladungen mit CTC bzw. iso-CTC betrugen etwa 0,1, 1, 10, 100, 500, 1000 und 2000 µg/g. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -30°C gelagert.

Die Analyse der beladenen Partikel erfolgte mittels des „Luminescence spectrometer Perkin-Elmer LS50B“ in Mikrotiterplatten. Hierzu wurden die Partikel in die Probenbehälter der Mikrotiterplatte gefüllt und die optimale Anregungswellenlänge ermittelt. Für CTC betrug diese 410 nm und für iso-CTC 342 nm. Jede Probe wurde dreimal vermessen.

Der Zusammenhang zwischen Konzentration und Lichtemission (Gleichung 1) ist bei der Fluoreszenz aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ableitbar und gilt streng genommen für Lösungen [511]; auf Besonderheiten zur Messung der Fluoreszenz von Festkörpern wird am Ende des Kapitels eingegangen.

Gleichung 1: $I_f = \Phi I_0 (1 - 10^{-\epsilon c x})$

I_f : Intensität der Fluoreszenz (in [W m⁻²])

I_0 : Intensität der einfallenden Strahlung (in [W m⁻²])

Φ : Quantenausbeute

ϵ : Extinktionskoeffizient (in [mol⁻¹ L cm⁻¹])

c : Konzentration (in [mol L⁻¹])

x : optische Weglänge (in [cm])

Kalibrierfunktion für CTC-beladenes Aluminiumoxid

Abb. 69 zeigt die Einzelspektren der mit CTC beladenen Aluminiumoxide bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm. Die Fluoreszenzintensität steigt dabei mit zunehmender CTC-Konzentration an und die Messungen derselben Probe zeigen keine signifikanten Abweichungen. Um Aussagen über die Möglichkeit zur Entwicklung einer quantitativen Analysenmethode treffen zu können, wurde die Intensität beim Maximum der Fluoreszenz (490 nm) ausgewählt.

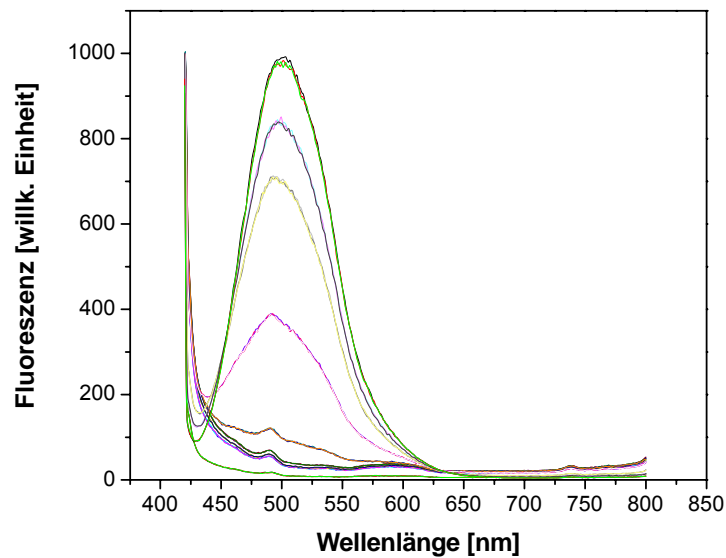


Abb. 69: Fluoreszenzspektren von CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$): Steigende Intensität mit steigender Konzentration im Bereich von 0,1-2000 $\mu\text{g/g}$

Wenn die oben erwähnte Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität gilt, wird in halblogarithmischer Darstellung in einem gewissen Konzentrationsbereich Linearität vorausgesetzt. Dieser Bereich wird visuell zwischen 100 und 2000 $\mu\text{g/g}$ lokalisiert (Abb. 70).

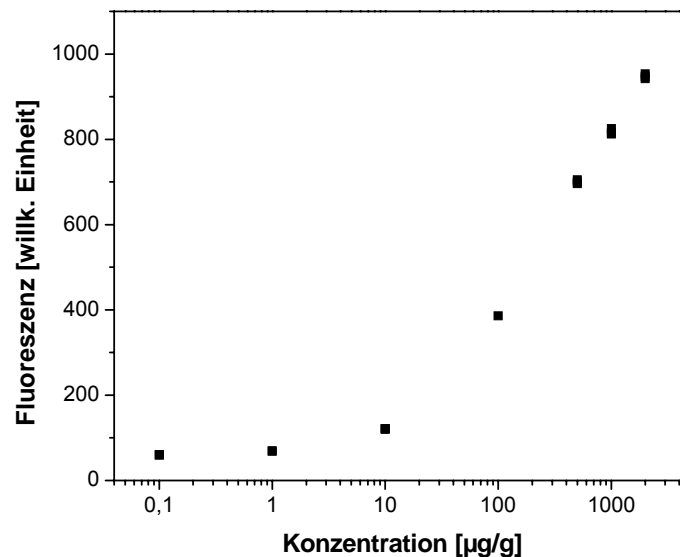


Abb. 70: Halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Konzentration von CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$)

Ob eine Exponentialfunktion 1. Ordnung vorliegt, wurde mit dem Programm Origin 7.0 überprüft (Abb. 71). Die Parameter der Exponentialfunktion wurden dabei mittels Levenberg-

Marquardt-Algorithmus ermittelt [512,513]. Der R^2 -Wert liegt hier bei 0,9858. Die relative Standardabweichung der Messpunkte liegt zwischen 0,01 und 1,67% was zeigt, dass eine hohe Präzision des Messverfahrens vorliegt.

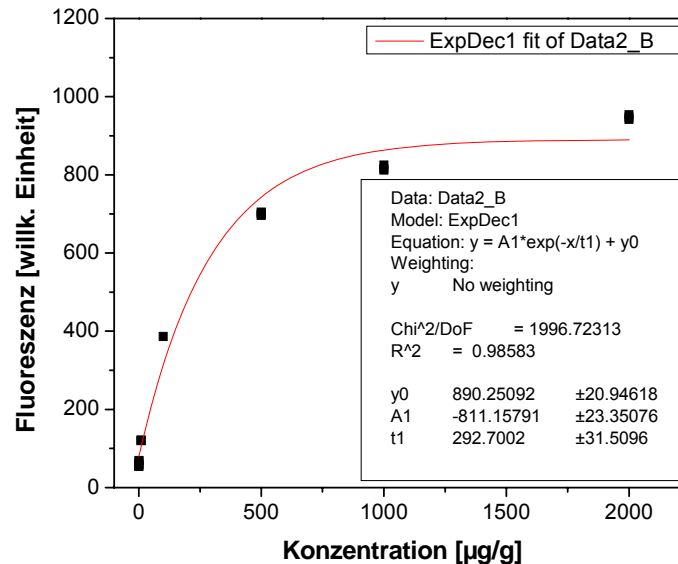


Abb. 71: Funktionaler Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität bei Aluminiumoxid-sorbiertem CTC ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$)

Nachdem der funktionelle Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration ermittelt worden ist, wurde der Bereich von 100-2000 µg/g hinsichtlich eines linearen Zusammenhanges überprüft. Besitzt das Lambert-Beer'sche Gesetz im vorliegenden Fall Gültigkeit, ist die Fluoreszenz direkt proportional zum Logarithmus der Fluorophorkonzentration und damit ein linearer Zusammenhang gegeben. Wie in Abb. 72 zu sehen ist, zeigt sich dieser lineare Zusammenhang im untersuchten Konzentrationsbereich. Hier ist somit eine lineare Kalibrierung möglich.

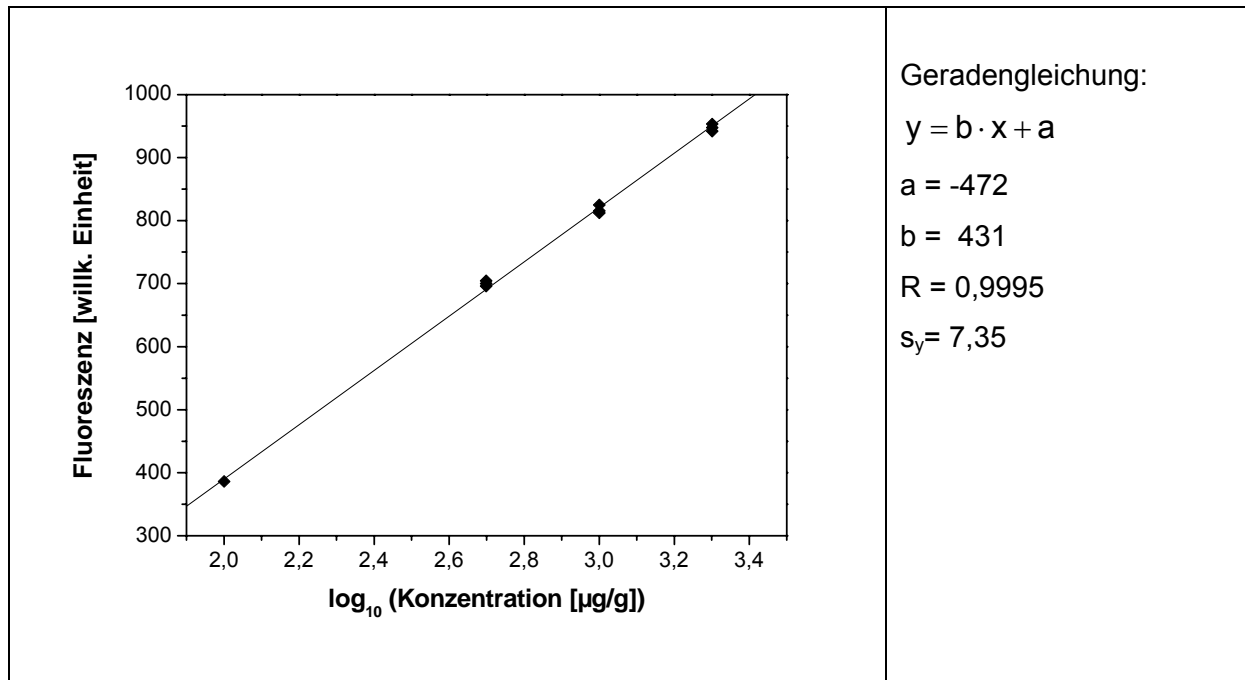


Abb. 72: Kalibrierfunktion zur fluorometrischen Bestimmung von Aluminiumoxid-sorbiertem CTC ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$)

Kalibrierfunktion für iso-CTC-beladenes Aluminiumoxid

Abb. 73 zeigt die Einzelspektren der mit iso-CTC beladenen Aluminiumoxide bei einer Anregungswellenlänge von 342 nm. Die Spektren verhalten sich hier analog zu dem CTC-beladenen Aluminiumoxid. Für die Messung mit iso-CTC mussten allerdings die Geräteeinstellung etwas modifiziert werden, da die Fluoreszenzintensitäten deutlich höher waren. Bei gleicher Geräteeinstellung führte dies zu einer Überlastung des Detektors, was auf eine deutlich höhere Quantenausbeute und/oder einen größeren Extinktionskoeffizienten für iso-CTC hinweist. Das Fluoreszenzmaximum liegt hier bei 410 nm. Die gemessenen Intensitäten sind in Abhängigkeit von der Konzentration in Abb. 74 dargestellt.

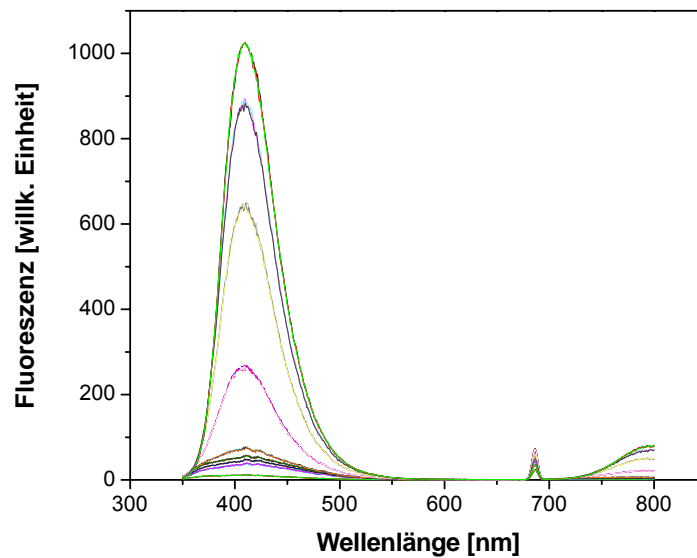


Abb. 73: Fluoreszenzspektren von iso-CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln ($\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$):
Steigende Intensität bei steigender Konzentration im Bereich von 0,1-2000 $\mu\text{g/g}$

In halblogarithmischer Darstellung ist ein linearer Bereich im Konzentrationsbereich zwischen 100 und 2000 $\mu\text{g/g}$ erkennbar (Abb. 74). Die zugehörige Exponentialfunktion 1. Ordnung, dargestellt in Abb. 75, belegt die Güte der Korrelation mit einem R^2 -Wert von 0,9983 bei einer relativen Standardabweichung der Messpunkte von 0,05% bis 3,95%.

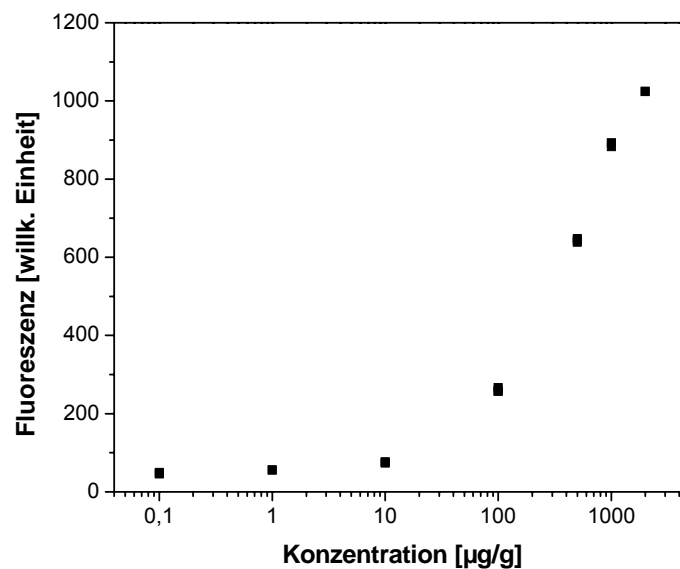


Abb. 74: Halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Konzentration von iso-CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln ($\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$)

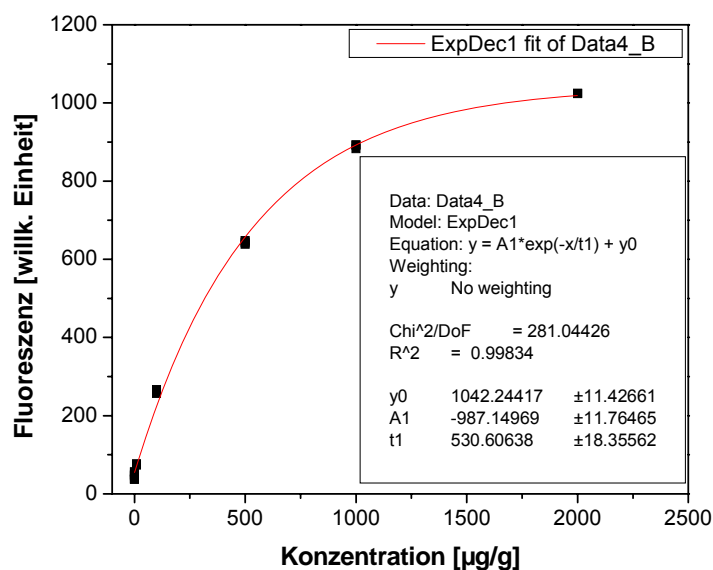


Abb. 75: Funktionaler Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität bei Aluminiumoxid-sorbiertem iso-CTC ($\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$)

Wie Abb. 76 zeigt wird, ist im untersuchten Konzentrationsbereich auch für an Aluminiumoxid-sorbiertes iso-CTC eine lineare Kalibrierung möglich.

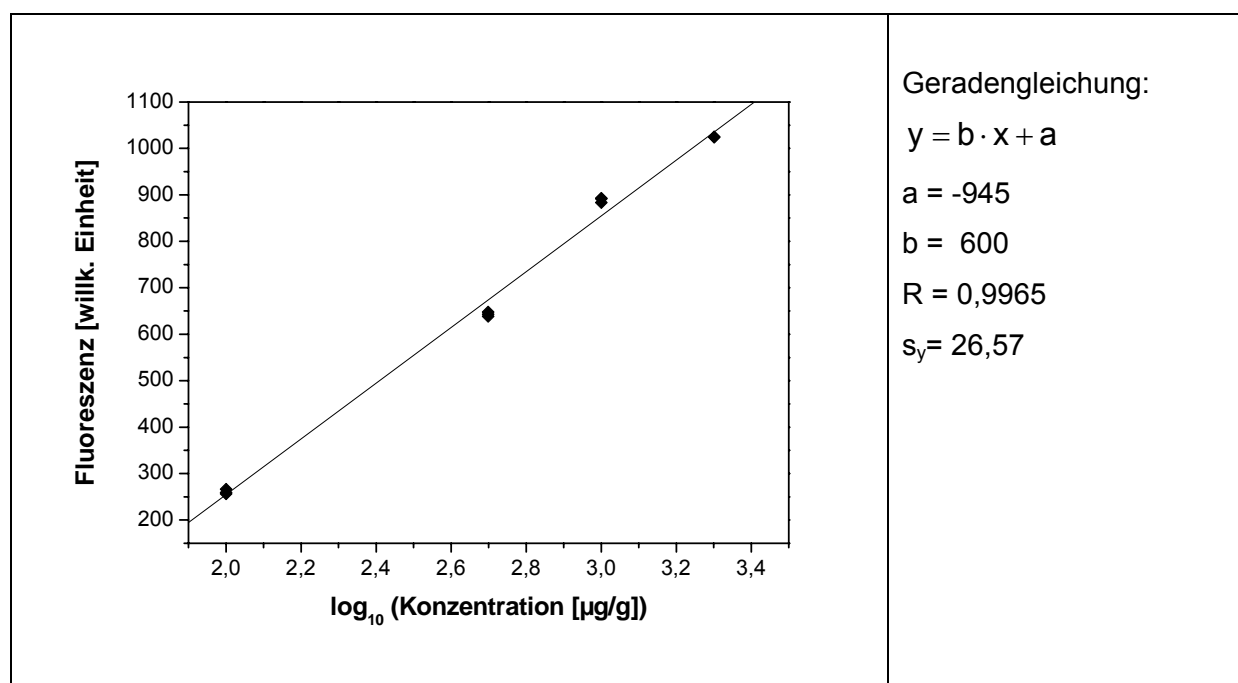


Abb. 76: Kalibrierfunktion zur fluorometrischen Bestimmung von Aluminiumoxid-sorbiertem iso-CTC ($\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$)

5.2.4.3 Diskussion

Die fluoreszenzspektrometrischen Messungen an Modellpartikeln – Chlortetracyclin- und iso-Chlortetracyclin belegtes Aluminiumoxid - zeigen, dass prinzipiell eine direkte, quantitative Analyse von Partikeln auf Tetracyclinrückstände möglich ist. Aluminiumoxid wurde ausgewählt, da es die Fluoreszenzintensität von CTC und iso-CTC im Vergleich zum nicht adsorbierten, d.h. reinem Feststoff noch verstärkt. Hierdurch wären Bestimmungsbereiche erfassbar, die dem Triggerwert für Boden (100 µg/kg) [12,13] für Tetracycline entsprächen.

Jedoch waren die Messungen von CTC-beladenem Ackerboden durch erhebliche Quenchingeffekte gekennzeichnet, so dass eine Quantifizierung von Tetracyclinkonzentrationen im benötigten Konzentrationsbereich nicht möglich war.

Ob zusätzliche Probenvorbereitungstechniken zu einer Empfindlichkeitssteigerung führen würden, bleibt vorerst offen. Auch die Anwendung chemometrischer Methoden zur optimalen Ausnutzung geringer Unterschiede in den Spektrenprofilen wäre denkbar. Bei unterschiedlichen Korngrößenverteilungen von Proben, wie es bei Bodenproben der Fall wäre, ist die unterschiedliche Lichtstreuung aufgrund sich in der Korngrößenverteilung unterscheidenden Proben zu berücksichtigen. Dies könnte z.B. durch Anwendung von chemometrischen Methoden oder der Kubelka-Munk-Funktion [514] erreicht werden. So konnten z.B. S. Ebel und H. Kußmaul unter Anwendung der Kubelka-Munk-Funktion die Genauigkeit bei der Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen verbessern [515].

Fluoreszenzuntersuchungen von Tetracyclinen in Knochen zeigen, wie stark die Einflüsse der Lichtstreuung sind und wie diese durch chemometrische Verfahren – bei entsprechend großer Anzahl von Messdaten - „gefiltert“ werden können [506]. In Knochen sind Streuungszentren inhomogen verteilt, so dass lokal unterschiedliche Streuerkonzentrationen auftreten, die eine Korrektur nötig machen. Dies gilt ebenfalls für die komplexe Bodenmatrix. Auch hier liegt keine homogene Korngrößenverteilung, bedingt durch Sandpartikel, Tonminerale etc., vor. Zudem weisen verschiedene Bodenbestandteile unterschiedliche Sorptionsaffinitäten gegenüber Tetracyclinen auf (Kap. 5.2.1.1), was zwangsläufig zu inhomogener Fluoreszenzintensität an der Messoberfläche führt.

Weiterführende Untersuchungen sind erforderlich, um die Realisierung fluorometrischer Screening-Tests für Tetracyclin-belastete Böden weiter zu entwickeln. So könnte z.B. direkt nach der Extraktion den abgetrennten Extraktionslösungen Aluminiumoxid zugegeben werden, an welches sich unter den einzustellenden Bedingungen die Tetracycline sorbieren. Dieses könnte im Anschluss fluorometrisch untersucht werden. Ein solches Verfahren wäre generell nicht nur auf Bodenproben beschränkt und würde im Rahmen von Grenzwertkontrollen oder Screenings eine Proben-Selektierung ermöglichen, so dass nur noch relevante Proben eingehender untersucht werden müssten. Chen et al. entwickelten in

dieser Richtung schon ein Verfahren, in dem Tetracyclin mittels der Sorption an einer C-18 modifizierten Silicagel-Festphase aus dotierter Milch extrahiert wurde und danach semiquantitativ durch zeitaufgelöste Lumineszenz der Festphase bestimmt wurde [516,517]. Eine Möglichkeit für eine direkte Bestimmung von Tetracyclinen in Böden bietet, in Anlehnung an Methoden zur direkten Bestimmung von PAH's in Böden [518,519], eventuell der Einsatz von Laserinduzierter Fluoreszenz (LIF) in Kombination mit chemometrischen Methoden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Veterinärarzneistoffe, vor allem Tetracycline und Sulfonamide, werden über die Wirtschaftsdünger Gülle und Mist in erheblichen Mengen in die Böden landwirtschaftlicher Nutzflächen eingetragen, doch ihrem Vorkommen und Verhalten ist in der Vergangenheit wenig Beachtung geschenkt worden. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Eintrag von Antibiotika zu, da ein Zusammenhang mit der Verbreitung und dem Erhalt von Antibiotikaresistenzen nicht ausgeschlossen werden kann. Dies ist insofern besonders problematisch, da Antibiotikaklassen wie z.B. die Tetracycline und Sulfonamide auch in der Humanmedizin zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt werden. Der Mangel an Informationen zum Verhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden in der Umwelt ist vor allem darauf zurückzuführen, dass erst seit 1998 für neu zugelassene Arzneimittel eine Umweltverträglichkeitsprüfung vorgeschrieben ist. Für sogenannte „Altpräparate“ wie Tetracycline und Sulfonamide ist dies nicht der Fall, obwohl diese im großen Umfang in der Nutztierhaltung eingesetzt werden. So wurden 2005 allein in Deutschland 350 t Tetracycline und 97,5 t Sulfonamide in der Veterinärmedizin verbraucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Verhalten (Persistenz, Mobilität) von Antibiotikarückständen im Boden am Beispiel von Chlortetracyclin und Sulfadiazin zu untersuchen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Bodenprobe von Feldern untersucht, welche mit Antibiotika-belasteter Gülle beaufschlagt worden waren, um einen Beitrag zur Abschätzung der möglichen Antibiotikabelastung von Ackerflächen zu leisten. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Transportverhalten von Chlortetracyclin und Sulfadiazin unter Modellbedingungen in Bodenlysimetern untersucht, um so einen Beitrag zur Risikoabschätzung einer möglichen Grundwassergefährdung zu leisten.

Zu Beginn der Arbeit wurde eine LC-MS/MS basierte Methode zur Bestimmung von SFD und CTC sowie ausgewählter Umwandlungsprodukte, in Böden entwickelt. Dabei wurde erstmalig ein ammoniakalischer Puffer zur Extraktion von Arzneistoffen aus Böden eingesetzt. Die Probenaufarbeitung basiert dabei auf einer Extraktion mittels ammoniakalischen EDTA-Puffer mit anschließender Festphasenextraktion (SPE). Der Nachweis und die quantitative Bestimmung der Antibiotika erfolgten dann mittels LC-MS/MS. Während der Extraktion werden allerdings CTC und e-CTC vollständig in die Isomere iso-CTC und e-iso-CTC umgewandelt. So das CTC als Summe aus e-iso-CTC und iso-CTC bestimmt wird. Die Wiederfindung betrug bei dieser Methode $71\pm 7\%$ für CTC-dotierte Bodenproben und $59\pm 7\%$ für SFD.

Das entwickelte Verfahren wurde danach angewandt um Bodenproben aus dem Forschungsprojekt „*Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente*“ [476] zu untersuchen. Dazu waren Felder nach einmaliger und zweimaliger Düngung mit Antibiotika-haltiger Gülle beprobt worden. Um eine mögliche Verlagerung der Antibiotika ermitteln zu können, waren die Proben tiefengestuft entnommen worden.

Die Analysen der Bodenextrakte belegen, dass bereits eine einmalige Düngung eines unbelasteten Bodens mit Antibiotika-haltiger Gülle zu einer mehrmonatig nachweisbaren Kontamination der oberen Bodenschichten führt. Eine wiederholte Düngung führt dabei insbesondere zur Akkumulation von CTC im Boden, da die Massenkonzentrationen dabei für CTC deutlich höher (bis zu 240 µg/kg TM) als für SFD (bis zu 90 µg/kg TM) waren. Eine Verlagerung von CTC oder SFD in tiefere Bodenschichten konnte nicht festgestellt werden. Die Bodenproben wurden zudem alle auf N4-SFD, einem Hauptmetaboliten des SFD, untersucht. Dieser konnte aber in keiner Probe nachgewiesen werden.

Da in der eingesetzten Gülle der Gehalt an SFD deutlich über dem von CTC lag wurde eine Verlagerung von SFD in Bodentiefen unterhalb der Beprobungstiefe angenommen, zumal es während und nach der Güllung starke Niederschläge gab. SFD gilt im Boden als mobil und CTC als immobil. Von daher lag dieser Zusammenhang nahe.

Folglich wurde im zweiten Teil dieser Arbeit das Transportverhalten von CTC und SFD untersucht. Hierbei sollte insbesondere die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das wegen seiner starken Sorption an die Bodenmatrix als immobil geltende CTC über den partikulären Ko-Transport mit dem Sickerwasser verlagert werden könnte. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen des Projekts „*Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes*“ [477] durchgeführt.

In Vorversuchen wurden das Sorptionsverhalten von CTC, iso-CTC und SFD gegenüber mineralischen Partikeln, sowie das koordinationschemische Verhalten von CTC und iso-CTC gegenüber ausgewählten bodentypischen Metallionen untersucht. Die hierbei in Batchversuchen unter statischen Bedingungen ermittelten Sorptionskapazitäten zeigen, dass CTC und iso-CTC in hohem Maße an mineralische Partikel sorbieren, während die Sorption von SFD vergleichsweise gering ist. Ferner werden CTC und iso-CTC bei verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Maß an die Partikel sorbiert. Während die Unterschiede im Säuren noch gering sind, zeigte iso-CTC im Gegensatz zu CTC bei pH 9,5 nur noch eine sehr geringe Sorption an dem Tonmineral Montmorillonit.

In photometrischen Untersuchungen zum koordinationschemischen Verhalten von CTC und iso-CTC konnte gezeigt werden, dass die Isomerisierung von CTC im alkalischen Milieu (pH 8,7) durch die Bildung von CTC-Metallkomplexen verlangsamt abläuft. Weiterhin zeigte

sich, dass die CTC's in hohem Maße von frisch gefällten Metallhydroxiden sorbiert bzw. mitgefällt werden. Dabei gab es auch eindeutige Hinweise, dass ein Teil der CTC's als Metallkomplexe in Lösung bleiben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass beim Transportverhalten von CTC im Boden nicht nur die Sorption, sondern auch die Komplexbildung zu berücksichtigen ist, wobei noch der Einfluss von organischen Bodenkomponenten zu untersuchen bleibt.

Im Rahmen des obigen Projekts wurden vom Institut für Wasserforschung (IfW) zwei Versuche mit Bodensäulen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten ob und in welchem Umfang durch mit Gülle-eingetragenes SFD und CTC im Boden verlagert wird und ob mit einem Eintrag ins Grundwasser zu rechnen ist. Der eine Säulenversuch mit einer Bodenhöhe von 10 cm wurde dabei unter extremen Niederschlagsbedingungen und der andere mit einer Bodenhöhe von 60 cm unter naturnahen Niederschlagsbedingungen durchgeführt. Die bei diesen Untersuchungen anfallenden Messproben von Gülle, Boden und Sickerwasser wurden mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Die Ergebnisse belegen, dass CTC auch unter naturnahen Niederschlagsbedingungen durch Bodenschichten von 60 cm Tiefe verlagert werden kann, und somit eine potentielle Möglichkeit eines Grundwassereintrages besteht. Von der dabei in die Gülle dotierten CTC-Menge wurden allerdings nur 0,002% mit dem Sickerwasser ausgetragen. Ferner gab es Hinweise, dass CTC auch partikelgebunden verlagert wird. Unter extremen Niederschlagsbedingungen (Starkregen) wurde auch SFD in den Sickerwasserproben nachgewiesen, allerdings nur bei der Säule mit einer Bodenhöhe von 10 cm. In den am Ende der Versuche entnommen tiefengestufteten Bodenproben der Säule mit 60 cm Bodenhöhe war weder CTC noch SFD unterhalb des begüllten Bereichs nachweisbar. Dagegen waren CTC und SFD bei der Säule mit 10 cm Bodenhöhe (extreme Beregnung) auch im Boden unterhalb des begüllten Bereichs nachweisbar. Tendenziell stimmen die Ergebnisse mit denen aus der Untersuchung im ersten Teil dieser Arbeit („Antiinfektiva-Projekt“ [476]) überein.

Bei den Säulenversuchen kam es infolge sich einstellender anaerober Milieubedingungen allerdings zu erheblichen Minderbefunden für CTC in den Sickerwasserproben. Als Ursache wurden dabei hohe Eisen(II)-Konzentrationen in Betracht gezogen, welches durch Einfluss von Luftsauerstoff zu Fe(III) oxidierte und im Säuleneluat als Hydroxid gefällt wurde. In diesem Zusammenhang wurden die einzelnen Stufen der Probenaufarbeitung mit ammoniakalischem Puffer in Modell-Lösungen überprüft. Es zeigte sich dabei, dass CTC infolge von Okklusionseffekten größtenteils nicht mehr extrahiert werden kann. Der Extraktion mit ammoniakalischem Puffer sind somit von der Probenzusammensetzung abhängige Grenzen gesetzt, welche zu erheblichen Minderbefunden an CTC führen können. Daher sollten die Extraktionsbedingungen weiterentwickelt werden (evtl. mehrstufig). Zur Ermittlung

der tatsächlichen Belastung (alle durch physikalische, chemische und biologische Prozesse wieder freisetzbaren Antibiotika bzw. deren Metabolite) von landwirtschaftlich genutzten Böden sollten in weiterführenden Untersuchungen die in die Bodenmatrix eingeschlossenen CTC-Anteile (Sequestrierung, Entrapment, Okklusion) berücksichtigt werden. Auch in Hinblick auf eine Risikobewertung von Einträgen ins Grundwasser und Nutzpflanzen und damit in die Nahrungskette ist das (Langzeit-)Verhalten von eingeschlossenen CTC-Anteilen zu berücksichtigen.

Um eine direkte Bestimmung von Tetracyclinrückständen im Boden mittels Fluoreszenz zu ermöglichen, wurden Voruntersuchungen an CTC und iso-CTC beladenen Modellpartikeln (Aluminiumoxid, Sand, Tonminerale, Boden) durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, dass prinzipiell partikelgebundenes CTC quantifizierbar ist. Ob ein Fluoreszenzscreening auf Realböden anwendbar sein wird bleibt noch offen, da bei CTC-belasteten Böden nur sehr geringe, durch Quenchingeffekte bedingte, Fluoreszenzintensitäten auftraten. Weitere methodische Untersuchungen sind daher notwendig, wobei zur Datenanalyse die Anwendung chemometrischer Methoden mit einzubeziehen wäre.

7 Literatur

- [1] R. Sattelberger; *Arzneimittelrückstände in der Umwelt - Bestandsaufnahme und Problemdarstellung*; Bericht des Umweltbundesamtes; ISBN 3-85457-510-6, Wien, **1999**
- [2] C. Winckler, H. Engels, K. Hund-Rinke, T. Luckow, M. Simon, G. Steffens; *Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*; Umweltbundesamt, Texte 44/04, Forschungsbericht 200 73 248, **2004**
- [3] Bayerisches Landesamt für Umwelt; *Arzneistoffe in der Umwelt*; Umweltwissen, **2008**
http://www.lfu.bayern.de/umweltwissen/doc/uw_8_arzneistoffe_umwelt.pdf
- [4] R. Sattelberger, O. Gans, E. Martínez; *Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*; Berichte BE-272, Umweltbundesamt GmbH, Wien, **2005**
- [5] A. Vockel, B. Brand, K. Röwer, M. Vogel, A. Mehlich, M. Stolz, M. Grote; *Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung*; Sonderprogramm Verbraucherschutz 2000-2002, Abschlußbericht, Hrsg.: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW, Düsseldorf, Juni **2004**
- [6] J. Koschorreck; *Die Notwendigkeit einer umfassenden Umweltbewertung von Tierarzneimitteln*; in Umweltbundesamt, Texte 29/05, Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt, **2005**
- [7] A. Vockel; *Bestimmung von Chlortetracyclintrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS – Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien*; Dissertation, Universität Paderborn, **2005**
- [8] T. Ternes, D. Löffler, M. Meller, J. Römbke; *Behaviour of selected human and veterinary pharmaceuticals in aquatic compartments and soil*; Umweltbundesamt, Texte 05/05, Forschungsbericht 299 67 401/01, **2005**
- [9] R. Kreuzig, S. Höltge, J. Heise, M. Kolb, N. Berenzen, T. Hahn, St. Jergentz, J. Wogram, R. Schulz; *Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide*; UBA-Texte 24/07, Forschungsbericht 202 67 435, Umweltbundesamt, **2007**
- [10] R. Kreuzig, C. Kullmer, B. Matthies, B. Plaga, H. Dieckmann, S. Höltge; *Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsystemen "Modellsystem Boden"*; Umweltbundesamt, Texte 11/05, Forschungsbericht 201 67 401/02, **2005**
- [11] EMEA, EMEA/CVMP/055/96-FINAL; *Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products other than GMO containing and Immunological Products*; **1997**
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/regaffair/005596en.pdf>
- [12] CVMP/VICH Topic GL6 (Ecotoxicity Phase I); *Guideline on Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products - Phase I*; CVMP/VICH/592/98-FINAL, London, June **2000**
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/vich/059298en.pdf>
- [13] COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR VETERINARY USE (CVMP); *Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products in Support of the VICH Guidelines GL6 and GL 38*; London, June **2008**
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/era/41828205-Rev1.pdf>
- [14] CVMP/VICH Topic GL38; *Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products - Phase II*; CVMP/VICH/790/03-FINAL, London, October **2005**
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/vich/079003en.pdf>
- [15] RICHTLINIE 2004/27/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 31. März 2004 zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel; ABl. L 136 vom 30.4.**2004**
- [16] RICHTLINIE 2004/28/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 31. März 2004 zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel; ABl. L 136 vom 30.4.**2004**
- [17] R. Kreuzig; *Untersuchungen zum Verhalten von Pharmakarückständen in Böden – eine Herausforderung an das Design von Labortestsystemen –*; Mitt. Fachgr. Umwelchem. Ökotox. 3, **2002**, 9-12

- [18] A. Lallai, G. Mura, N. Onnis; *The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry*; Bioresour. Technol. 82, **2002**, 205-208
- [19] O.A. Arikan, L.J. Sikora, W. Mulbry, S.U. Khan, C. Rice, G.D. Foster; *The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves*; Process Biochemistry, 41, **2006**, 1637-1643
- [20] F.R. Ungemach; *Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation*; Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum 93, **2000**, 89-97
- [21] Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV); Vom 12. Juli 1999, BGBl. I S. 1554, **1999**
- [22] K. Fent; *Ökotoxikologie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1998**
- [23] BLAC (Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit); *Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse*; Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, **2003**
- [24] M. Salomon; *Pharmazeutische Wirkstoffe und Umweltschutz*; UWSF – Z. Umwelt. Chem. Ökotox. 19, **2007**, 155-167
- [25] W. Stumm & J. Morgan; *Aquatic chemistry*; John Wiley & Sons, New York, **1996**
- [26] F. Scheffer, P. Schachtschabel; *Lehrbuch der Bodenkunde*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2002**
- [27] J. Mc Carthy, J. Zachara; *Subsurface transport of contaminants*; Environ. Sci. Technol. 23, **1989**, 496-502
- [28] R. Kretzschmar, M. Borkovec, D. Grolimund, M. Elimelech; *Mobile subsurface colloids and their role in contaminant transport*; Advances in Agronomy 66, **1999**, 121-193
- [29] S.B. Roy, D.A. Dzombak; *Chemical factors influencing colloid-facilitated transport of contaminants in porous media*; Environ. Sci. Technol. 31, **1997**, 656-664
- [30] R.W. Puls, R.M. Powell; *Transport of inorganic colloids through natural aquifer material: Implications for contaminant transport*; Environ. Sci. Technol. 26, **1992**, 614-621
- [31] D.I. Kaplan, P.M. Bertsch, D.C. Adriano, W.P. Miller; *Soil-borne colloids as influenced by water flow and organic carbon*; Environ. Sci. Technol. 27, **1993**, 1193-1200
- [32] J.F. Mc Carthy, C. Degueldre; *Sampling and Characterisation of Colloids and Particles in Groundwater for Studying Their Role in Contaminant Transport*; in: J. Buffle, H.P. van Leeuwen (Hrsg.): Environmental Particles; Lewic Publishers, London, Vol. 2, **1993**, 247-315
- [33] G. Sposito; *"Bodenchemie"*; Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag, **1998**
- [34] D.H. Everett; *Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry*; Pure & Appl. Chem. 31, **1972**, 577-638
- [35] L. Sigg, W. Stumm; *Aquatische Chemie - Eine Einführung in die Chemie wässriger Lösungen und in die Chemie natürlicher Gewässer*; Teubner Verlag, Stuttgart, 4. Aufl. **1996**
- [36] T. Hofmann; *Die Welt der vernachlässigten Dimensionen –Kolloide-*; Chem. Unserer Zeit 38, **2004**, 24 – 35
- [37] L.M. Mosley, K.A. Hunter, W.A. Ducker; *Forces between Colloid Particles in Natural Waters*; Environ. Sci. Technol. 37, **2003**, 3303-3308
- [38] W. Um, C. Papelis; *Geochemical effects on colloidfacilitated metal transport through zeolitized tuffs from the Nevada Test Site*; Environmental Geology 43, **2002**, 209-218
- [39] J.B. Christensen, D.L. Jensen, T.H. Christensen; *Effect of dissolved organic carbon on the mobility of cadmium, nickel and zinc in leachate polluted groundwater*; Water Research, 30, **1996**, 3037-3049
- [40] F.H. Frimmel, L. Huber; *Influence of humic substances on the aquatic adsorption of heavy metals on defined mineral phases*; Environment International 22, **1996**, 507-517
- [41] C.C. Davis, W.R. Knocke, M. Edwards; *Implications of aqueous silica sorption to iron hydroxide: mobilization of iron colloids and interference with sorption of arsenate and humic substances*; Environ. Sci. Technol. 35, **2001**, 3158-3162

- [42] J.F. McCarthy, B.D. Jimenez; *Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: Binding and dissociation*; Environ. Sci. Technol. 19, **1985**, 1072–1076
- [43] A. Georgi; *Sorption von hydrophoben organischen Verbindungen an gelösten Huminstoffen*; Dissertation, Universität Leipzig, **1998**
- [44] W.P. Johnson, G.L. Amy; *Facilitated Transport and Enhanced Desorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Natural Organic Matter in Aquifer Sediments*; Environ. Sci. Technol. 29, **1995**, 807–817
- [45] U. Schulte-Ebbert, U. Schöttler; *Transport polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) bei der Untergrundpassage. Einfluss organischer und anorganischer mobiler Festphasen auf die Mobilität von PAK*; Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH, Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 62, **2003**
- [46] C.W. Fetter; *Contaminant Hydrogeology*; Macmillan (Verlag), New York, **1992**
- [47] J. Wan, J.L. Wilson; *Colloid Transport in Unsaturated Porous Media*; Water Resources Research 30, **1994**, 857-864
- [48] J. Wan, J.L. Wilson; *Visualization of the Role of the Gas-Water Interface on the Fate and Transport of Colloids in Porous Media*; Water Resources Research 30, **1994**, 1-23
- [49] J. Bergendahl, D. Grasso; *Prediction of colloid detachment in a model porous media: hydrodynamics*; Chem. Eng. Sci. 55, **2000**, 1523-1532
- [50] L.A. Sprague, J.S. Herman, G.M. Hornberger, A.L. Mills; *Atrazine Adsorption and Colloid-Facilitated Transport through the Unsaturated Zone*; J. Environ. Qual. 29, **2000**, 1632-1641
- [51] A. Möri, W.R. Alexander, H. Geckeis, W. Hauser, T. Schäfer, J. Eikenberg, Th. Fierz, C. Degueldre, T. Missana; *The colloid and radionuclide retardation experiment at the Grimsel Test Site: influence of bentonite colloids on radionuclide migration in a fractured rock*; Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 217, **2003**, 33-47
- [52] S. Schwarz, E. Chaslus-Dancla; *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*; Vet. Res. 32, **2001**, 201-225
- [53] S. Schwarz, C. Kehrenberg, T.R. Walsh; *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*; Int. J. Antimicrob. Agents 17, **2001**, 431-437
- [54] A. Richter, W. Löscher; *Zusatzstoffe mit pharmakologischer Wirkung*; In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. H.H. Frey, W. Löscher (Hrsg.), 2. Aufl. Enke Berlin, **2002**, 592-597
- [55] Futtermittelgesetz in der Fassung vom 16. Juli 1998, BGBl. I S. 1850, **1998**
- [56] VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung; ABl. L 268 vom 18.10. **2003**
- [57] Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in der Tierernährung; Amtsblatt Nr. L 270 vom 14.12. **1970**
- [58] BGVV – BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN; *BgVV fordert zu zurückhaltendem und sorgsamem Umgang mit Tierarzneimitteln und Futterzusatzstoffen auf*; Pressemitteilung 07/ **1997** (14.4.1997)
- [59] A.K. Sarmah, M.T. Meyer, A.B.A. Boxall; *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*; Chemosphere 65, **2006**, 725-759
- [60] BGVV – BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN; *Avoparcin als Futterzusatzstoff in der Tierernährung vorläufig verboten*; Pressemitteilung 1/ **1996** (29.01.1996)
- [61] BGVV – BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN; *Einsatz des Futtermittelzusatzstoffes Avoparcin wird europaweit verboten*; Pressemitteilung 24/ **1996** (20.12.1996)
- [62] VERORDNUNG (EG) Nr.2821/98 DES RATES vom 17. Dezember 1998 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung; ABl. L 351 vom 29.12. **1998**

- [63] T. CHRISTIAN; *Antibiotika in Oberflächengewässern Nordrhein-Westfalens*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2004**
- [64] F. BAGER; DANMAP 2000 – *Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*; Danish Veterinary & Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark, ISSN 1600-2032, **2001**
- [65] Verordnung (EG) Nr. 108/2007 der Kommission vom 5. Februar 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1356/2004 hinsichtlich der Bedingungen für die Zulassung des zur Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel zählenden Futtermittelzusatzstoffes Elancoban; ABl. L 31 vom 6.2. **2007**
- [66] Verordnung (EG) Nr. 109/2007 der Kommission vom 5. Februar 2007 zur Zulassung von Monensin-Natrium (Coxidin) als Futtermittelzusatzstoff; ABl. L 31 vom 6.2. **2007**
- [67] Verordnung (EG) Nr. 1852/2003 der Kommission vom 21. Oktober 2003 zur Zulassung eines Kokzidiostatikums in Futtermitteln für zehn Jahre; ABl. L 271 vom 22.10. **2003**
- [68] Verordnung (EG) Nr. 1463/2004 der Kommission vom 17. August 2004 über die Zulassung des zur Gruppe der Kokzidiostatika und andere Arzneimittel gehörenden Zusatzstoffes «Sacox 120 microGranulat» in Futtermitteln für zehn Jahre; ABl. L 270 vom 18.8. **2004**
- [69] Verordnung (EG) Nr. 600/2005 der Kommission vom 18. April 2005 über die Neuzulassung eines Kokzidiostatikums als Zusatzstoff in Futtermitteln für zehn Jahre, die vorläufige Zulassung eines Zusatzstoffes und die Zulassung bestimmter Zusatzstoffe in Futtermitteln für unbefristete Zeit; ABl. L 99 vom 19.4. **2005**
- [70] Verordnung (EG) Nr. 249/2006 der Kommission vom 13. Februar 2006 zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 2430/1999, (EG) Nr. 937/2001, (EG) Nr. 1852/2003 und (EG) Nr. 1463/2004 hinsichtlich der Bedingungen für die Zulassung bestimmter Futtermittel-Zusatzstoffe der Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel; ABl. L 42 vom 14.2. **2006**
- [71] Verordnung (EG) Nr. 496/2007 der Kommission vom 4. Mai 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 600/2005 hinsichtlich der Einführung eines Rückstandshöchstgehalts für den zur Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel zählenden Futtermittelzusatzstoff Salinomax 120G; ABl. L 117 vom 5.5. **2007**
- [72] Verordnung (EG) Nr. 500/2007 der Kommission vom 7. Mai 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1463/2004 hinsichtlich der Einführung eines Rückstandshöchstgehalts für den zur Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel zählenden Futtermittelzusatzstoff Sacox 120 microGranulat; ABl. L 118 vom 8.5. **2007**
- [73] Verordnung (EG) Nr. 167/2008 der Kommission vom 22. Februar 2008 über die Neuzulassung eines Kokzidiostatikums als Zusatzstoff in Futtermitteln für zehn Jahre; ABl. L 50 vom 23.2. **2008**
- [74] Verordnung (EG) Nr. 937/2001 der Kommission vom 11. Mai 2001 zur Zulassung neuer Verwendungszwecke für Zusatzstoffe und einer neuen Zusatzstoffzubereitung in der Tierernährung, zur Verlängerung vorläufiger Zulassungen und zur Zulassung eines Zusatzstoffes für zehn Jahre; ABl. L 130 vom 12.5. **2001**
- [75] FEDESA; *Verbrauch von Antibiotika*; Deutsches Tierärzteblatt 11, **1998**, 1093
- [76] F.R. Ungemach; *Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang*; 1999; Tierärztl. Prax. 27, **1999**, 335-340
- [77] S. Schwarz, C. Werckenthin; *Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*; Chemotherapie Journal 6, **2001**, 197-202
- [78] Bundesverband für Tiergesundheit (BfT), M. Schneidereit; *Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen*; Vortrag, Bonn, 14. September **2006**
http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf
- [79] C. Winckler, A. Grafe; *Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden*; Umweltbundesamt, Texte 44/00, Forschungsbericht 297 33 911, **2000**
- [80] I. Linke, W. Kratz; *Tierarzneimittel in der Umwelt*; In: Studien und Tagungsberichte, Schriftenreihe des Landesumweltamtes Brandenburg, Landesumweltamt Brandenburg (Hrsg.) Band 29, **2001**, 1-35
- [81] S. Thiele-Bruhn; *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review*; J. Plant Nutr. Soil Sci. 166, **2003**, 145-167
- [82] R. Kroker; *Aspekte zur Ausscheidung antimikrobiell wirksamer Substanzen nach der chemotherapeutischen Behandlung von Nutztieren*; Wissenschaft und Umwelt 4, **1983**, 305-309

- [83] C. Winckler, A. Grafe A.; *Use of veterinary drugs in intensive animal production - Evidence for persistence of tetracyclines in pig slurry*; Journal of Soils and Sediments 2, **2001**, 66-70
- [84] C. Winckler, H. Engels, K. Hund-Rinke, T. Luckow, M. Simon, G. Steffens; *Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*; Umweltbundesamt, Texte 44/04, Forschungsbericht 200 73 248, **2004**
- [85] G. Hamscher, H. Pawelzick; H. Höper, H. Nau; *Tierarzneimittel in Böden - eine Grundwassergefährdung?* In: Arzneimittel in der Umwelt. Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt; Umweltbundesamt (Hrsg.), Texte 29/05, 175-184, **2005**
- [86] O. Gans, E. Pfundtner, C. Winkler; *Reduktion des Antibiotikaeintrages in landwirtschaftlich genutzten Boden durch Biogasanlagen?*; Zwischenbericht, Umweltbundesamt GmbH, Wien, **2007**
https://www.dafne.at/prod/dafne_plus_common/attachment_download/ab61256c3ee2c76ec42ec14c630293cf/Zwischenbericht_FV.pdf
- [87] G. Hamscher, S. Sczesny, A. Abu-Qare, H. Höper, H. Nau; *Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in Gülle-gedüngten Böden*; Deutsche Tierärztliche Wochenschau 107, **2000**, 293-348
- [88] P. Kay, P. A. Blackwell, A.B.A. Boxall; *Fate of veterinary antibiotics in a macro porous tile drained clay soil*; Environ. Toxicol. Chem. 23, **2004**, 1136-1144
- [89] T. Heberer, H.-J. Stan; *Arzneimittelrückstände im aquatischen System*; Wasser & Boden 50, **1998**, 20-25
- [90] S. Yang, K. Carlson; *Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique*; Water Research 38, **2004**, 3155-3166
- [91] A. Göbel; *Occurrence and fate of sulfonamide and macrolide antimicrobials in wastewater treatment*; Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule ETH Zürich, **2004**
- [92] G. Hamscher, S. Sczesny, H. Höper, H. Nau; *Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by highperformance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry*; Analytical Chemistry 74, **2002**, 1509-1518
- [93] S.A. Sassman, L.S. Lee; *Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange*; Environ. Sci. Technol. 39, **2005**, 7452-7459
- [94] S.E. Allaire, J.D. Castillo, V. Juneau; *Sorption kinetics of chlortetracycline and tylosin on sandy loam and heavy clay soils*; J. Environm. Qual. 35, **2006**, 969-972
- [95] J. Tolls; *Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review*; Environ. Sci. Technol. 35, 2001, 3397-3405
- [96] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden - Ergebnisse eines Modellversuchs*; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1, **2006**, 38 – 50
- [97] A.B.A. Boxall, L.A. Fogg, P.A. Blackwell, P. Kay, E.J. Pemberton, A. Croxford; *Veterinary medicines in the environment*; Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 180, **2004**, 1-91
- [98] O.B. Samuelsen, V. Torsvik, A. Ervik; *Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication*; Sci. Total Environ. 114, **1992**, 25-36
- [99] R. Coyne, M. Hiney, B. O'Connor, J. Kerry, D. Cazabon, P. Smith; *Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm*; Aquaculture 123, **1994**, 31-42
- [100] R. Böhm; *Auswirkungen von Rückständen von Antiinfektiva in tierischen Ausscheidungen auf die Güllebehandlung und den Boden*; Deutsche tierärztliche Wochenschrift 103, **1996**, 237-284
- [101] B. Halling-Sørensen, J. Jensen, J. Tjörnelund, M.H.M.M. Montforts; *Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture*; in: K. Kümmerer (Hrsg.), Pharmaceuticals in the Environment, 1. Ed., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 143-157, **2001**
- [102] G. Hamscher, H. Pawelzick, H. Höper, H. Nau; *Antibiotics in soil: Routes of entry, environmental concentrations, fate and possible effects*; in: K. Kümmerer (Hrsg.), Pharmaceuticals in the Environment, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, **2004**

- [103] E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, S. Scharf, O. Gans; *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*; Environmental Pollution 148, **2007**, 570-579
- [104] H. Höper, J. Kues, H. Nau, G. Hamscher; *Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden*; Bodenschutz 4, **2002**, 141-148
- [105] Danish Environmental Protection Agency; *Environmental fate and occurrence of veterinary medicinal products in Denmark*; Danish EPA (Hrsg.), **2000**
- [106] R. Alexy, K. Kümmerer; *Antibiotika in der Umwelt*; KA - Abwasser Abfall 5, **2005**, 563-571
- [107] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz; *Occurrence of antibiotics in aquatic environment*; Sci. Total Environ. 225, **1999**, 109-118
- [108] R. Brunner, A. Rank, K. Riedl; in: *Die Antibiotika*, Band 1 (Die großen Antibiotika), Teil 2 (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline); Verlag Hans Carl, Nürnberg, **1962**, 311-625
- [109] J. Koza; *Synthesis of 7-Substituted Tetracycline Derivatives*; 2000; Org. Lett. 2, 2000, 815-817
- [110] H. Muxfeldt, H. Döpp, J.E. Kaufman, J. Schneider, P.E. Hansen, A. Sasaki, T. Geiser; *Totalsynthese des Anhydro-aureomycins*; Angew. Chem. 85, **1973**, 508-510
- [111] W. Dürckheimer; *Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungsbeziehungen*; Angew. Chem. 87, **1975**, 751-784
- [112] E. Weidenberg; *Vergleich verschiedener Aufschlußverfahren zur Herstellung von Gelatine aus Knochen im Hinblick auf Rückstände von Tetracyclinen*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, **2002**
- [113] F. Krämer-Horaczynska; *High-Performance Liquid Chromatographic Procedures for the Quantitative Analysis of 15 Tetracycline Derivatives in Small Blood Samples*; J. Chromatogr. Sci. 29, **1991**, 107-113
- [114] G. Zurhelle; *Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen*; Dissertation, Bergische Universität-Gesamt-hochschule Wuppertal, **2000**
- [115] K. De Braekeleer, A. de Juan, D.L. Massart; *Purity assessment and resolution of tetracycline hydrochloride samples analysed using high-performance liquid chromatography with diode array detection*; J. Chromatogr. A 832, **1999**, 67-86
- [116] J.R.D. McCormick, S.M. Fox, L.L. Smith, B.A. Bitler, J. Reichenthal, V.E. Origoni, W.H. Muller, R. Winterbottom, A.P. Doerschuk; *Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines*; J. Am. Chem. Soc. 79, **1957**, 2849-2858
- [117] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, M.P. Carey, W.J. Blanchflower, S.A. Hewitt; *Iso-and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*; J. Chromatogr. A 812, **1998**, 327-337
- [118] P.D. Bryan, K.R. Hawkins, J.T. Stewart, A.C. Capomacchia; *Analysis of Chlortetracycline by High Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Alkaline-induced Fluorescence Detection*; Biomed. Chromatogr. 6, **1992**, 350-310
- [119] W.J. Blanchflower, R.J. McCracken, D.A. Rice; *Determination of Chlortetracycline Residues in Tissues Using High-Performance Liquid Chromatography With Fluorescence Detection*; Analyst 114, **1989**, 421-423
- [120] Y. Zhao, Y. Ci, W. Chang; *Fluorescence enhancing by alkaline degradation of tetracycline antibiotics and its application*; Science in China B 40, **1997**, 434-441
- [121] H. Auterhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje; in: *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart; 13. Aufl., **1994**, 741-795
- [122] A.M. Walter, L. Heilmeyer; in: *Antibiotika-Fibel*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl., **1975**, 2-108, 319-361
- [123] Y. Liang, M.B. Denton, R.B. Bates; *Stability studies of tetracycline in methanol solution*; J. Chromatogr. A 827, **1998**, 45-55
- [124] V. Naggar, N.A. Daabis, M.M. Motawi; *Effect of Solubilizers on the Stability of Tetracycline*; Pharmazie 29, **1974**, 126-129

- [125] V. Naggar, N.A. Daabis, M.M. Motawi; *Solubilization of Tetracycline and Oxytetracycline*; Pharmazie 29, **1974**, 122-125
- [126] T. Strittmatter, M. Siewert; *Zur Qualitätsbeurteilung der Tetracycline: Übersicht zur Stabilität und Analytik der Tetracyclinderivate*; Pharm. Ztg. 126, **1981**, 1951-1954
- [127] C.R. Stephens, K. Murai, K.J. Brunings, R.B. Woodward; *Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics*; J. Am. Chem. Soc. 78, **1956**, 4155-4158
- [128] J.M. Wessels, W.E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider; *The Complexation of Tetracycline and Anhydrotetracycline with Mg²⁺ and Ca²⁺: A Spectroscopic Study*; J. Phys. Chem. B 102, **1998**, 9323-9331
- [129] J.L. Claizzi, P.R.Klink; *pH-Partition behavior of Tetracyclines*; J. Pharm. Sci. 58, **1969**, 1184-1189
- [130] H.A. Duarte, S. Carvalho, E.B. Paniago, A.M. Simas; *Importance of Tautomers in the Chemical Behavior of Tetracyclines*; J. Pharm. Sci. 88, **1999**, 111-120
- [131] H. Lanig, M. Gottschalk, S. Schneider, T. Clark; *Conformational Analysis of Tetracycline using Molecular Mechanical and Semiempirical MO-Calculations*; J. Mol. Model. 5, **1999**, 46-62
- [132] H.F. Dos Santos, W.B. De Almeida, M.C. Zerner; *Conformational Analysis of the Anhydrotetracycline Molecule: A Toxic Decomposition Product of Tetracycline*; J. Pharm. Sci. 87, **1998**, 190-195
- [133] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim; 5. Aufl., **1988**, 580-715
- [134] D.A. Hussar, P.J. Niedergall, E.T. Sugita, J.T. Doluisio; *Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives*; J. Pharm. Pharmac. 20, **1968**, 539-546
- [135] E.G. Remmers, G.M. Sieger, A.P. Doerschuk; *Some Observations on the Kinetics of the C-4 Epimerization of Tetracycline*; J. Pharm. Sci. 52, **1963**, 752-756
- [136] E.E. Martinez, W. Shimoda; *Liquid Chromatographic Determination of Epimerization of Chlortetracycline Residue to 4-epi-Chlortetracycline Residue in Animal Feed, Using McIlvaine's Buffer as Extractant*; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72, **1989**, 848-850
- [137] J. Diana, L. Vandenbosch, B. De Spiegeleer, J. Hoogmartens, E. Adams; *Evaluation of the stability of chlortetracycline in granular premixes by monitoring its conversion into degradation products*; J. Pharm. Biomed. Anal. 36, **2005**, 523-530
- [138] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, S.A. Hewitt, J.D.G. McEvoy; *Metabolism of chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg*; Analyst 123, **1998**, 2443-2447
- [139] S. Sczesny; *Analytik von Tetracyclinen in Umwelt- und Lebensmittelproben mittels selektiver Extraktionsverfahren und sensitivem Nachweis durch HPLC gekoppelt mit mikrobiologischem Assay und Tandem-Massenspektrometrie*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, **2001**
- [140] S. Sczesny, H. Nau, G. Hamscher; *Residue Analysis of Tetracyclines and Their Metabolites in Eggs and in the Environment by HPLC Coupled with a Microbiological Assay and Tandem Mass Spectrometry*; J. Agric. Food Chem. 51, **2003**, 697-703
- [141] W. Naidong, E. Roets, R. Busson, J. Hoogmartens; *Separation of keto-enol-tautomers of chlortetracycline and 4-epichlortetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene)copolymer*; J. Pharm. Biomed. Anal. 8, **1990**, 881-889
- [142] W. Naidong, S. Hua, E. Roets, R. Busson, J. Hoogmartens; *Investigation of keto-enol tautomerism and ionization of doxycycline in aqueous solutions*; Int. J. Pharm. 96, **1993**, 13-21
- [143] A. Pena, A. Carmona, A. Barbosa, C. Lino, I. Silveira, B. Castillo; *Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection*; J. Pharm. Biomed. Anal. 18, **1998**, 839-845
- [144] H.-H. Frey, W. Löscher; *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*; 1. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, **1996**
- [145] J.W. Spoo, J.E. Riviere; *Sulfonamides*; in: H.R. Adams (Hrsg.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Iowa State University Press, Ames (USA), 8. Edition, 796-817, **2001**

- [146] D. Adam, K. Thoma; *Antibiotika Neuere Wirkstoffe und Darreichungsformen*; 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1994**
- [147] G.K. McEvoy; *AHFS Drug Information*; American Society of Hospital Pharmacists Inc., Bethesda (USA), **1992**
- [148] C. Hartig; *Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt*; Dissertation, Technische Universität Berlin, **2000**
- [149] U. Gräfe; *Biochemie der Antibiotika*; 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, **1992**
- [150] J.T. Smith, C.S. Lewin; *Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology*; Vet. Microbiol. 35, **1993**, 233-242
- [151] W. Witte; *Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment*; Int. J. Antimicrob. Agents 14, **2000**, 321-325
- [152] J.L. Martinez, F. Baquero; *Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance*; Clinical Microbiology Reviews 15, **2002**, 647-679
- [153] S.G. Amyes; *The rise in bacterial resistance is partly because there have been no new classes of antibiotics since the 1960s*; BMJ 320, **2000**, 199-200
- [154] F. Møller Aarestrup; *Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals*; Int. J. Antimicrob. Agents 12, **1999**, 279-285
- [155] American Public Health Association; *Addressing the use of fluoroquinolone antibiotics in agriculture*; Am. J. Public Health 91, **2001**, 518-519
- [156] A.E. van den Bogaard, E.E. Stobberingh; *Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans*; Int. J. Antimicrob. Agents 14, **2000**, 327-335
- [157] Dr. Wilke; *Einsatz von Antibiotika; Empfehlung zur Verminderung von Resistenzentwicklung- Beitrag der Veterinärmedizin, Stand: 1999*; Bundesgesundheitsbl. –Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz 43, **2000**, 234
- [158] W. Witte; *Medical consequences of antibiotic use in agriculture*; Science 279, **1998**, 996-997
- [159] D.L. Smith, A.D. Harris, J.A. Johnson, E.K. Silbergeld, J.G. Morris; *Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, **2002**, 6434-6439
- [160] M. Kresken, D. Hafner; *Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975 and 1995*; Infection 27, **1999**, 2-8
- [161] H.C. Neu; *The crisis in antibiotic resistance*; Science 257, **1992**, 1064-1073
- [162] L.J. Piddock; *Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?*; J. Antimicrob. Chemother. 38, **1996**, 1-3
- [163] A.E. van den Bogaard; *Antimicrobial resistance--relation to human and animal exposure to antibiotics*; J. Antimicrob. Chemother. 40, **1997**, 453-454
- [164] S. Tsiodras, H.S. Gold, G. Sakoulas, G.M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman; *Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus*; The Lancet 358, **2001**, 207-208
- [165] R.D. Gonzales, P.C. Schreckenberger, M.B. Graham, K. DenBesten, S. Kelkar, J.P. Quinn; *Infections due to vancomycin-resistant Enterococcus faecium resistant to linezolid*; The Lancet 357, **2001**, 1179
- [166] J. Engberg, F. Møller Aarestrup, D.E. Taylor, P. Gerner-Smidt, I. Nachamkin; *Quinolone and macrolide resistance in Campylobacter jejuni and C. coli: resistance mechanisms and trends in human isolates*; Emerg. Infect. Dis. 7, **2001**, 24-34
- [167] J. Engberg, J. Neimann, E. Møller Nielsen, F. Møller Aarestrup, V. Fussing; *Quinolone-resistant Campylobacter Infections in Denmark: Risk Factors and Clinical Consequences*; Emerg. Infect. Dis. 10, **2004**, 1056-1063

- [168] F. Møller Aarestrup, A.M. Seyfarth, H.D. Emborg, K. Pedersen, R.S. Hendriksen, F. Bager; *Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark*; Antimicrob. Agents Chemother. 45, **2001**, 2054-2059
- [169] H.-D. Emborg, O.E. Heuer; *DANMAP 2002*; Danish Veterinary Institute, Danish Veterinary and Food Administration, Statens Serum Institut, Danish Medicines Agency, **2002**
- [170] Bayerisches Landesamt für Umwelt; *Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Lebensmitteln und Umwelt*; Umweltwissen, **2002**
http://www.lfu.bayern.de/umweltwissen/doc/uw_7_antibiotika.pdf
- [171] D.J. Austin, K.G. Kristinsson, R.M. Anderson; *The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, **1999**, 1152-1156.
- [172] R.L. Mach, A.H. Farnleitner; *Antibiotika und Resistenzproblematik*; in: H. Kroiß (Hrsg.), Arzneimittel in der aquatischen Umwelt, Wiener Mitteilungen 178, **2002**, 151-178
- [173] R. Helmuth; *Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin - Zum Stand der Diskussion*; Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz 42, **1999**, 26-34.
- [174] C. Mlot; *Antimicrobials in Food Production: Resistance and Alternatives*; ASM News 67, **2001**, 196- 120.
- [175] K.M. Shea; *Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics*; PEDIATRICS 114, **2004**, 862-868
- [176] M. Wierup; *The experience of reducing antibiotics used in animal production in the Nordic countries*; Int. J. Antimicrob. Agents 18, **2001**, 287-290
- [177] A.M. Johnston; *Use of antimicrobial drugs in veterinary practice*; BMJ 317, **1998**, 665-667
- [178] S. Schwarz, C. Werckenthin; *Risiken des Antibiotika- Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*; Chemotherapie Journal 6, **2001**, 197-202
- [179] P. Butaye, L.A. Devriese, F. Haesebrouck; *Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on grampositive bacteria*; Clin. Microbiol. Rev. 16, **2003**, 175-188
- [180] M. Teuber; *Antibiotika - Vom Segen zum Alptraum*; uni-eth zürich, Magazin der Universität Zürich Nr. 285 (1/02), **2002**, 31-34
- [181] I. Stock, B. W. Wiedemann; *Die Bestimmung der natürlichen Antibiotikaempfindlichkeit*; Chemotherapie Journal 7, **1998**, 127-135
- [182] P.M. SHAH; *The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline?*; Clinical Microbiology and Infection 11, **2005**, 36-42
- [183] C.M. Franz, W.H. Holzapfel, M.E. Stiles; *Enterococci at the crossroads of food safety?*; International Journal of Food Microbiology 47, **1999**, 1-24
- [184] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim, 5. Aufl., **1988**, 580-715
- [185] K. Smalla; *Antibiotika-Resistenzgene und horizontaler Gentransfer*; Forschungs Report „Biovision – Zukunft mit Pflanzen“, Zeitschrift des Senats der Bundesforschungsanstalten Verbraucherschutz / Ernährung / Landwirtschaft 1, **2003**, 36-39
- [186] M.J. Schwaber, S. Navon-Venezia, D. Schwartz, Y. Carmeli; *High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamaseproducing Enterobacteriaceae*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, **2005**, 2137-2139
- [187] M.F. DeFlaun, S.B. Levy; *Genes and their varied hosts*; In: S.B. Levy, R.V. Miller: Gene Transfer in the Environment, New York, Donnelly and Sons, **1989**
- [188] A. Alonso, E. Campanario, J.L. Martinez; *Environmental selection of antibiotic resistance genes*; Environmental Microbiology 3, **2001**, 1-10
- [189] K. Nishino, A. Yamaguchi; *Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli*; Journal of Bacteriology 183, **2001**, 5803-5812

- [190] D. Schnappinger, W. Hillen; *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*; Arch. Microbiol. 165, **1996**, 359–369
- [191] E. Chartone-Souza, T. L. Loyola, Monica Bucciarelli-Rodriguez, M. A. de B.C. Menezes, N. A. Rey, E. C. Pereira-Maia; *Synthesis and characterization of a tetracycline-platinum(II) complex active against resistant bacteria*; Journal of Inorganic Biochemistry 99, **2005**, 1001–1008
- [192] M.C. Roberts; *Update on acquired tetracycline resistance genes*; FEMS Microbiology Letters 245, **2005**, 195–203
- [193] F.R. Ungemach; *Antibiotika und Resistenzproblematik*; Dt. Tierärzteblatt 47, **1999**, 224–226
- [194] Bundestierärztekammer (BTK), Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Veterinärbeamten (ArgeVET, 2000); *Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln mit Erläuterungen*; Dt. Tierärzteblatt 48 (11), **2000**, Beilage
- [195] 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; ABl. L 224 vom 18.8.1990
- [196] M. Kühne, G. Hamscher, U. Körner, D. Schedl, S. Wenzel; *Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline*; Food Chemistry 75, **2001**, 423–429
- [197] D. Großklaus; in: *Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln*; Verlag Paul Parey Berlin, 1. Aufl., **1989**, 35–39
- [198] B. Jülicher; *Tierarzneimittelrückstände und Lebensmittelüberwachung – Auswirkungen des EG-Rechts*; Bundesgesundhbl. 6, **1992**, 281–286
- [199] Fleischhygienegesetz (FIHG); Neufassung vom 30. Juni 2003, BGBl. I, S. 1242, **2003**
- [200] Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG, Amtsblatt Nr. L 125 vom 23/05/1996
- [201] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil*; Landbauforschung Völkenrode - FAL Agricultural Research 57, **2007**, 25–32
- [202] K. Kumar, S.C. Gupta, S.K. Baidoo, Y. Chander, C. Rosen; *Antibiotics uptake by plants from soil fertilised with animal manure*; J. Environ. Qual. 34, **2005**, 2082–2085
- [203] M. Freitag, D. H. Yolcu, H. Hayen, T. Betsche, M. Grote; *Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen*; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 3, **2008**, 174–184
- [204] A. C. Strasser; *Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch - Herstellung der immunochemischen Komponenten*; Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2003**
- [205] B. Halling-Sørensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jørgensen; *Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A Review*; Chemosphere 36, **1998**, 357–393
- [206] C.G. Daughton, T.A. Ternes; *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change*; Environ. Health Perspec. Supplement 107 (6), **1999**, 907–939
- [207] R. Alexy, T. Kümpel, K. Kümmerer; *Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test*; Chemosphere 57, **2004**, 505–512
- [208] B. Gooß; *Erstellung des internetbasierten Antibiotika-Informationssystems „VetAbis“ für einen verantwortungsvollen Umgang mit Antibiotika in der Rinderpraxis*; Dissertation, Freie Universität Berlin, **2001**
- [209] M. Salomon; *Pharmazeutische Wirkstoffe und Umweltschutz*; UWSF – Z. Umwelt. Chem. Ökotox. 19, **2007**, 155–167

- [210] F. Bager, F.M. Aarestrup, N.E. Jensen, M. Madsen, A. Meyling, and H.C. Wegener; *Design of a system for monitoring antimicrobial resistance in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria from food animals*; Acta Vet. Scand. Suppl. 92, **1999**, 77-86
- [211] J. Bates; *Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection*; J. Hosp. Infect. 37, **1997**, 89-101
- [212] E.F. Dunne, P.D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, K. Stamey, T.J. Barrett, J.K. Rasheed, F.C. Tenover, E.M. Ribot, F.J. Angulo; *Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant Salmonella infections associated with AmpC beta-lactamase*; Jama 284, **2000**, 3151-3156
- [213] D.J. Mevius, M.J. Sprenger, H.C. Wegener; *EU conference 'The Microbial Threat'*; Int. J. Antimicrob. Agents 11, **1999**, 101-105
- [214] M. Teuber; *Veterinary use and antibiotic resistance*; Curr. Opin. Microbiol. 4, **2001**, 493-499
- [215] D.G. White, S. Zhao, R. Sudler, S. Ayers, S. Friedman, S. Chen, P.F. McDermott, S. McDermott, D.D. Wagner, J. Meng; *The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats*; N. Engl. J. Med. 345, **2001**, 1147-1154
- [216] A.E. van den Bogaard, R. Willems, N. London, J. Top, E.E. Stobberingh; *Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers*; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49, **2002**, 497-505
- [217] M. Teuber, V. Perreten, F. Wirschin; *Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension*; Lebensmittel-Technologie 29, **1996**, 182-199
- [218] M. Lipsitch, R.S. Singer, B.R. Levin; *Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door?*; PNAS 99, **2002**, 5752-5754
- [219] C.H. Chiu, T.L. Wu, L.H. Su, C. Chu, J.H. Chia, A.J. Kuo, M.S. Chien, T.Y. Lin; *The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in Salmonella enterica serotype choleraesuis*; N. Engl. J. Med. 346, **2002**, 413-419
- [220] P.D. Fey, T.J. Safranek, M.E. Rupp, E.F. Dunne, E. Ribot, P.C. Iwen, P.A. Bradford, F.J. Angulo, S.H. Hinrichs; *Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle*; N. Engl. J. Med. 342, **2000**, 1242-1249
- [221] M.A. Schouten, A. Voss, J.A. Hoogkamp-Korstanje; *VRE and meat*; The Lancet 349, **1997**, 1258
- [222] A.H. Linton, K. Howe, P.M. Bennett, M.H. Richmond, and E.J. Whiteside; *The colonization of the human gut by antibiotic resistant Escherichia coli from chickens*; J. Appl. Bacteriol. 43, **1977**, 465-469
- [223] T.L. Sorensen, M. Blom, D.L. Monnet, N. Frimodt-Moller, R.L. Poulsen, F. Espersen; *Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant Enterococcus faecium from chicken and pork*; N. Engl. J. Med. 345, **2001**, 1161-1166
- [224] M. Webber, L.J. Piddock; *Quinolone resistance in Escherichia coli*; Vet. Res. 32, **2001**, 275-284
- [225] M.T. Brandl; *Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety*; Annual Review of Phytopathology, 44, **2006**, 367-392
- [226] H.C. Wegener; *Antibiotics in animal feed and their role in resistance development*; Current Opinion in Microbiology 6, **2003**, 439-445
- [227] S. Lim, H. Lee, H. Nam, Y. Cho, J. Kim, S. Song, Y. Park, S. Jung; *Antimicrobial resistance observed in Escherichia coli strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004*; International Journal of Food Microbiology 116, **2007**, 283–286
- [228] M. Österblad, O. Pensala, M. Peterzéns, H. Helenius, P. Huovinen; *Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from vegetables*; J. Antimicrob. Chemother. 43, **1999**, 503-509
- [229] J.M.T. Hamilton-Miller, S. Shah; *Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables*; International Journal of Antimicrobial Agents 18, **2001**, 81-83
- [230] S. Boehme, G. Werner, I. Klare, R. Reissbrodt and W. Witte; *Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs*; Mol. Nutr. Food Res. 48, **2004**, 522 – 531
- [231] E. Alcaide, E. Garay; *R-plasmid transfer in Salmonella spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters*; Appl. Environ. Microbiol. 48, **1984**, 435-438

- [232] E. Tzelepi; *Antibiotic susceptibilities of Yersinia enterocolitica and Y. intermedia isolates from aquatic environments*; J. Med. Microbiol. 48, **1999**, 157-160
- [233] P.M. Koenraad; *Antibiotic susceptibility of campylobacter isolates from sewage and poultry abattoir drain water*; Epidemiol. Infect. 115, **1995**, 475-483
- [234] Y. Chander, K. Kumar, S.M. Goyal, S.C. Gupta; *Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics*; J. Environm. Qual. 34, **2005**, 1952-1957
- [235] J. Poté, M. T. Ceccherini, V. T. Van, W. Rosselli, W. Wildi, P. Simonet, T. M. Vogel; *Fate and transport of antibiotic resistance genes in saturated soil columns*; European Journal of Soil Biology 39, **2003**, 65-71
- [236] J. Kochansky; *Analysis of oxytetracycline in extender patties*; Apidologie 31, **2000**, 517-524
- [237] S. Skulason, E. Ingolfsson, T. Kristmundsdottir; *Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33, **2003**, 667-672
- [238] M.K. Cody, G.B. Clark, B.O.B. Conway, N.T. Crosby; *Identification of Medicinal Additives in Animal Feedingstuffs by High-performance Liquid Chromatography*; Analyst 115, **1990**, 1-8
- [239] Y. Wu, R. Fassih; *Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination*; International Journal of Pharmaceutics 290, **2005**, 1-13
- [240] N.P. Gujarathi, B.J. Haney, H.J. Park, S.R. Wickramasinghe, J.C. Linden; *Hairy Roots of Helianthus annuus: A Model System to Study Phytoremediation of Tetracycline and Oxytetracycline*; Biotechnology progress 21, **2005**, 775-780
- [241] I. Pecorelli, R. Bibi, L. Fioroni, A. Piersanti, R. Galarini; *Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches*; Analytica Chimica Acta 529, **2005**, 15-20
- [242] R. Ueno, A. Kinoshita, J. Wakabayashi; *Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment*; Aquaculture 235, **2004**, 53-63
- [243] C.J. Wilson, R.A. Brain, H. Anderson, D.J. Johnson, K.T. Bestari, P.K. Sibley, K.R. Solomon; *Structural and Functional Responses of Plankton to a Mixture of Four Tetracyclines in Aquatic Microcosms*; Environ. Sci. Technol. 38, **2004**, 6430-6439
- [244] V.C. Honnorat-Benabbou, A.A. Lebugle, B. Sallek, D. Duffaut-Lagarrigue; *Stability study of tetracyclines with respect to their use in slow release systems*; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 12, **2001**, 107-110
- [245] F. Ingerslev, L. Toräng, M. Loke, B. Halling-Sørensen, N. Nyholm; *Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems*; Chemosphere 44, **2001**, 865-872
- [246] T. Polubesova, D. Zadaka, L. Groisman, S. Nir; *Water remediation by micelle-clay system: Case study for tetracycline and sulfonamide antibiotics*; Water Research, 40, **2006**, 2369-2374
- [247] K. Pilorz, I. Choma; *Isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tetracyclines and flumequine controlled by a chaotropic effect*; J. Chromatogr. A 1031, **2004**, 303-305
- [248] M.J.B. Mengelers, E.R. van Gogh, M.B.M. Huveneers, P.E. Hougee, H.A. Kuiper, A. Pijpers, J.H.M. Verheijden, A.S.J.P.A.M. van Miert; *Pharmacokinetics of Sulfadimethoxine and Sulfamethoxazole in Combination with Trimethoprim after Oral Single- and Multiple-Dose Administration to Healthy Pigs*; Veterinary Research Communications 25, **2001**, 461-481
- [249] M. Kühne, S. Wegmann, A. Kobe, R. Fries; *Tetracycline residues in bones of slaughtered animals*; Food Control 11, **2000**, 175-180
- [250] L.I. Sokolova, A.P. Chernyaev; *Determination of Benzylpenicillin, Levomycetin (Chloramphenicol), and Tetracycline in Food Products by High-Performance Liquid Chromatography*; Journal of Analytical Chemistry 56, **2001**, 1032-1034
- [251] W.C. Andersen, J.E. Roybal, S.A. Gonzales, S.B. Turnipseed, A.P. Pfennig, L.R. Kuck; *Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry*; Analytica Chimica Acta 529, **2005**, 145-150

- [252] Y. Wen, Y. Wang, Y. Feng; *Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography*; Talanta 70, **2006**, 153–159
- [253] V.M. Moretti, G.L. Maggi, A. Albertini, F. Bellagamba, U. Luzzana, G. Serrini, F. Valfre; *High-performance Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Muscle Tissue*; Analyst 119, **1994**, 2749–2751
- [254] G. Pagliuca, T. Gazzotti, G. Serra, A.G. Sabatini; *A scientific note on the determination of oxytetracycline residues in honey by high-performance liquid chromatography with UV detection*; Apidologie 33, **2002**, 583–584
- [255] M. Saridaki-Papakonstadinou, S. Andredakis, A. Burriel, I. Tsachev; *Determination of Tetracycline Residues in Greek Honey*; Trakia Journal of Sciences 4, **2006**, 33–36
- [256] W. Heering, E. Usleber, R. Dietrich, E. Märklbauer; *Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey*; Analyst 123, **1998**, 2759–2762
- [257] S. Babić, D. Ašperger, D. Mutavdžić, A.J.M. Horvat, M. Kaštelan-Macan; *Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater*; Talanta 70, **2006**, 732–738
- [258] O.A. Arikan, L.J. Sikora, W. Mulbry, S.U. Khan, G.D. Foster; *Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves*; Bioresource Technology 98, **2007**, 169–176
- [259] M. Loke, J. Tjornelund, B. Halling-Sorensen; *Determination of the distribution coefficient ($\log K_d$) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure*; Chemosphere 48, **2002**, 351–361
- [260] R.J. McCracken, W.J. Blanchflower, S.A. Haggan, D.G. Kennedy; *Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Animal Tissues Using Liquid Chromatography, Post-column Derivatization With Aluminium, and Fluorescence Detection*; Analyst 120, **1995**, 1763–1766
- [261] S. Croubels; C. Van Peteghem; W. Baeyens; *Sensitive Spectrofluorimetric Determination of Tetracycline Residues in Bovine Milk*; Analyst 119, **1994**, 2713–2716
- [262] H. Lu, Y. Jiang, H. Li, F. Chen, M. Wong; *Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Doxycycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Tetracycline Antibiotics by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*; Chromatographia 60, **2004**, 259–264
- [263] K.E. Maudens, G. Zhang, W.E. Lambert; *Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection*; J. Chromatogr. A 1047, **2004**, 85–92
- [264] M. Granados, M. Encabo, R. Compano, M.D. Prat; *Determination of Tetracyclines in Water Samples Using Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection*; Chromatographia 61, **2005**, 471–477
- [265] A. Pena, N. Pelantova, C.M. Lino, M.I.N. Silveira, P. Solich; *Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection*; J. Agric. Food Chem. 53, **2005**, 3784–3788
- [266] A. Pena, C.M. Lino, R. Alonso, D. Barcelo; *Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Edible Swine Tissues by Liquid Chromatography with Spectrofluorometric Detection and Confirmation by Mass Spectrometry*; J. Agric. Food Chem. 55, **2007**, 4973–4979
- [267] T.A. Gehring, L.G. Rushing, H.C. Thompson; *Determination of sulfonamides in edible salmon tissue by liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection*; Journal of AOAC International 80, **1997**, 751–755
- [268] T.A. Gehring, L.G. Rushing, M.I. Churchwell, D.R. Doerge, K.M. McErlane, H.C. Thompson; *HPLC determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*; Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, **1996**, 3164–3169
- [269] T.A. Gehring, B. Griffin, R. Williams, C. Geiseker, L.G. Rushing, P.H. Siitonen; *Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection*; J. Chromatogr. B 840, **2006**, 132–138
- [270] G. Wan, H. Cui, H. Zheng, J. Zhou, L. Liu, X. Yu; *Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate–sodium sulfite– β -cyclodextrin chemiluminescence detection*; J. Chromatogr. B 824, **2005**, 57–64

- [271] A. Pena, L.P. Palilis, C.M. Lino, M.I. Silveira, A.C. Calokerinos; *Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence*; Analytica Chimica Acta 405, **2000**, 51–56
- [272] S. Han, E. Liu, H. Li; *Determination of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline by flow injection with inhibitory chemiluminescence detection using copper(II) as a probe ion*; Luminescence 21, **2006**, 106–111
- [273] A. Townshend, W. Ruengsitagoon, C. Thongpoon, S. Liawruangrath; *Flow injection chemiluminescence determination of tetracycline*; Analytica Chimica Acta 541, **2005**, 103–109
- [274] N. Wangfuengkanagul, W. Siangproh, O. Chailapakul; *A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode*; Talanta 64, **2004**, 1183–1188
- [275] F. Zhao, X. Zhang, Y. Gan; *Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system*; J. Chromatogr. A 1055, **2004**, 109–114
- [276] S. Treetepvijit, A. Preechaworapun, N. Praphairaksit, S. Chuanuwatanakul, Y. Einaga, O. Chailapakul; *Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines*; Talanta 68, **2006**, 1329–1335
- [277] Y. Cai, Y. Cai, Y. Shi, S. Mou, Y. Lu; *Optimizing the integrated pulsed amperometric multicycle step waveform for the determination of tetracyclines*; J. Chromatogr. A 1118, **2006**, 35–40
- [278] M.A. Alawi, H.A. Rüssel; *Determination of sulphonamides in milk by HPLC with electrochemical detection*; Fresenius Z. Anal. Chem. 307, **1981**, 382–384
- [279] S. Yang, J. Cha, K. Carlson; *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 Commun. Mass Spectrom. 18, **2004**, 2131–2145
- [280] M.E. Lindsey, M. Meyer, E.M. Thurman; *Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*; Anal. Chem. 73, **2001**, 4640–4646
- [281] A.L. Batt, D.S. Aga; *Simultaneous Analysis of Multiple Classes of Antibiotics by Ion Trap LC/MS/MS for Assessing Surface Water and Groundwater Contamination*; Anal. Chem. 77, **2005**, 2940–2947
- [282] M.J. Hilton, K.V. Thomas; *Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. A 1015, **2003**, 129–141
- [283] J. Zhu, D.D. Snow, D.A. Cassada, S.J. Monson, R.F. Spalding; *Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. A 928, **2001**, 177–186
- [284] S. Yang, J. Cha, K. Carlson; *Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. A 1097, **2005**, 40–53
- [285] R. Lindberg, P. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind; *Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards*; Chemosphere 57, **2004**, 1479–1488
- [286] K.G. Karthikeyan, M.T. Meyer; *Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA*; Science of The Total Environment 361, **2006**, 196–207
- [287] R.H. Lindberg, P. Wennberg, M.I. Johansson, M. Tysklind, B.A.V. Andersson; *Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden*; Environ. Sci. Technol. 39, **2005**, 3421–3429
- [288] D. Bendz, N.A. Paxéus, T.R. Ginn, F.J. Loge; *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden*; Journal of Hazardous Materials 122, **2005**, 195–204
- [289] X. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfe; *Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada*; Environ. Sci. Technol. 38, **2004**, 3533–3541
- [290] A. Weimann, G. Bojesen; *Analysis of tetracyclines in raw urine by column-switching highperformance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. B 721, **1999**, 47–54

- [291] T.A.M. Msagati, M.M. Nindi; *Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection*; Talanta 64, **2004**, 87–100
- [292] M. Loke, S. Jespersen, R. Vreeken, B. Halling-Sørensen, J. Tjørnelund; *Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems*; J. Chromatogr. B 783, **2003**, 11–23
- [293] P. Eichhorn, D.S. Aga; *Identification of a Photooxygenation Product of Chlortetracycline in Hog Lagoons Using LC/ESI-Ion Trap-MS and LC/ESI-Time-of-Flight-MS*; Anal. Chem. 76, **2004**, 6002–6011
- [294] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Investigation on the fate of antibiotics used in Pig farming in food chain and environment (Part 1)*; Fresenius Environmental Bulletin - FEB 13, **2004**, 1216-1224
- [295] M. Rabolle, N. H. Spliid; *Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil*; Chemosphere 40, **2000**, 715-722
- [296] G. Sengeløv, Y. Agersø, B. Halling-Sørensen, S.B. Baloda, J.S. Andersen, L.B. Jensen; *Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry*; Environment International 28, **2003**, 587– 595
- [297] T. Goto, Y. Ito, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Oka; *High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition*; J. Chromatogr. A 1100, **2005**, 193–199
- [298] M. Cherlet, M. Schelkens, S. Croubels, P. De Backer; *Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry*; Analytica Chimica Acta 492, **2003**, 199–213
- [299] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganà, G. Rizzuti; *A Rapid Confirmatory Method for Analyzing Tetracycline Antibiotics in Bovine, Swine, and Poultry Muscle Tissues: Matrix Solid-Phase Dispersion with Heated Water as Extractant followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*; J. Agric. Food Chem. 54, **2006**, 1564–1570
- [300] D. Heller, C.B. Nochetto, N.G. Rummel, M.H. Thomas; *Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Hydrophilic Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis of Tetracycline, Fluoroquinolone, Sulfonamide, and β -Lactam Residues*; J. Agric. Food Chem. 54, **2006**, 5267-5278
- [301] U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatiboon; *Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk*; J. Chromatogr. A 1149, **2007**, 102–111
- [302] U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatiboon; *Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk*; J. Chromatogr. A 1140, **2007**, 147–156
- [303] H. De Ruyck, H. De Ridder; *Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*; Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, **2007**, 1511–1520
- [304] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, M. Sergi, C. Olmi, R. Curini; *Accelerated Solvent Extraction and Confirmatory Analysis of Sulfonamide Residues in Raw Meat and Infant Foods by Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry*; J. Agric. Food Chem. 52, **2004**, 4614-4624
- [305] B. Shao, D. Dong, Y. Wu, J. Hu, J. Meng, X. Tu, S. Xu; *Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*; Analytica Chimica Acta 546, **2005**, 174–181
- [306] Bing Shao, Xiaofei Jia, Yongning Wu, Jianying Hu, Xiaoming Tu, Jing Zhang; *Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*; Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, **2007**, 3487–3496
- [307] H. Li, P.J. Kijak, S.B. Turnipseed, W. Cui; *Analysis of veterinary drug residues in shrimp: A multi-class method by liquid chromatography–quadrupole ion trap mass spectrometry*; J. Chromatogr. B 836, **2006**, 22-38
- [308] R. Romero-Gonzalez, J.C. Lopez-Martinez, E. Gomez-Milan, A. Garrido-Frenich, J.L. Martinez-Vidal; *Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead seabream (Sparus Aurata) by liquid chromatography–mass spectrometry*; J. Chromatogr. B 857, **2007**, 142–148

- [309] S. Khong, Y. Hammel, P.A. Guy; *Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*; Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, **2005**, 493–502
- [310] L. Verzeznassi, M.-C. Savoy-Perroud, R.H. Stadler; *Application of liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey*; J. Chromatogr. A 977, **2002**, 77–87
- [311] H. Nakazawa, S. Ino, K. Kato, T. Watanabe, Y. Ito, H. Oka; *Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. B 732, **1999**, 55–64
- [312] S.R. Müller, H. Singer, K. Stöb, M. Burkhardt, N. Hartmann, C. Götz, C. Stamm, C. Waul; *Occurrence and fate of antibiotics in manure, soil and water*; Mitt. Lebensm. Hyg. 94, **2003**, 574–578
- [313] K. Choi, S. Kim, C. Kim, S. Kim; *Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD*; Chemosphere 66, **2007**, 977–984
- [314] K.P. Bateman, S.J. Locke, D.A. Volmer; *Characterization of Isomeric Sulfonamides Using Capillary Zone Electrophoresis Coupled with Nano-Electrospray Quasi-MS/MS/MS*; J. Mass Spectrom. 32, **1997**, 297–304
- [315] J. Tjornelund, S.H. Hansen; *Use of metal complexation in non-aqueous capillary electrophoresis systems for the separation and improved detection of tetracyclines*; J. Chromatogr. A 779, **1997**, 235–243
- [316] L. Nozal, L. Arce, B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel; *Rapid determination of trace levels of tetracyclines in surface water using a continuous flow manifold coupled to a capillary electrophoresis system*; Analytica Chimica Acta 517, **2004**, 89–94
- [317] C. García-Ruiz, A.L. Crego, J.L. Lavandera, M.L. Marina; *Rapid separation of tetracycline derivatives and their main degradation products by capillary zone electrophoresis*; Electrophoresis 22, **2001**, 2775–2781
- [318] S. Casado-Terrones, A. Segura-Carretero, S. Busi, G. Dinelli, A. Fernández-Gutiérrez; *Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection*; Electrophoresis 28, **2007**, 2882–2887
- [319] S.M. Santos, M. Henriques, A.C. Duarte, V.I. Esteves; *Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples*; Talanta 71, **2007**, 731–737
- [320] M.C.V. Mamani, J.A. Farfán, F.G. Reyes Reyes, S. Rath; *Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design*; Talanta 70, **2006**, 236–243
- [321] Y. Liang, R.E. Simon, M. Bonner Denton; *Utilization of a scientifically operated charge-coupled device detector for high-performance thin-layer chromatographic analysis of tetracyclines*; Analyst 124, **1999**, 1577–1582
- [322] W. Naidong, S. Hua, E. Roets, J. Hoogmartens; *Assay and purity control of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline in animal feeds and premixes by TLC densitometry with fluorescence detection*; J. Pharm. Biomed. Anal. 33, **2003**, 85–93
- [323] V.B. Reeves; *Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography–positive chemical ionization mass spectrometry*; J. Chromatogr. B 723, **1999**, 127–137
- [324] A. Cannavan, S.A. Hewitt, W.J. Blanchflower, D.G. Kennedy; *Gas chromatographic-mass spectrometric determination of sulfamethazine in animal tissues using a methyl/trimethylsilyl derivative*; Analyst 121, **1996**, 1457–1461
- [325] V. Ascalone; *Specific gas-chromatographic determination of trimethoprim, sulfamethoxazole, and its N4-acetylated metabolite in human body fluids, at therapeutic and subtherapeutic concentrations, using a new nitrogen detector*; Boll. chim. Farm. 117, **1992**, 176–186
- [326] J.A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer; *Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography–mass-selective detection and liquid chromatography–mass spectrometry*; J. Chromatogr. B 729, **1999**, 127–138
- [327] K. Tsuji, J.H. Robertson; *Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantification by gas-liquid chromatography*; Analytical Chemistry 45, **1973**, 2136–2140
- [328] A. Montero, R.L. Althaus, A. Molina, I. Berruga, M.P. Molina; *Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100®) for ewe milk*; Small Ruminant Research 57, **2005**, 229–237

- [329] G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, A. Lundström; *Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC–MS/MS*; *Analytica Chimica Acta* 529, **2005**, 47–51
- [330] M. Jeon, J. Kim, K. Paeng, S. Park, I. Rhee Paeng; *Biotin–avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk*; *Microchemical Journal* 88, **2008**, 26–31
- [331] D.S. Aga, S. O'Connor, S. Ensley, J.O. Payero, D. Snow, D. Tarkalson; *Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and their Degradates in Manure-Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; *J. Agric. Food Chem.* 53, **2005**, 7165–7171
- [332] S. Kim, P. Eichhorn, J.N. Jensen, A.S. Webber, D.A. Aga; *Removal of Antibiotics in Wastewater: Effect of Hydraulic and Solid Retention Times on the Fate of Tetracycline in the Activated Sludge Process*; *Environ. Sci. Technol.* 39, **2005**, 5816–5823
- [333] A. Mascher, S. Lavagnoli, M. Curatolo; *Determination of residual oxytetracycline in honey with an immunoassay kit*; *Apidologie* 27, **1996**, 229–233
- [334] R. Braham, W.D. Black, J. Claxton, A.J. Yee; *A Rapid Assay for Detecting Sulfonamides in Tissues of Slaughtered Animals*; *Journal of Food Protection*, 64, **2001**, 1565–1573
- [335] K. De Wasch, L. Okerman, S. Croubels, H. De Brabander, J. Van Hoof, P. De Backer; *Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests*; *Analyst* 123, **1998**, 2737–2741
- [336] S. Sczesny, H. Nau, G. Hamscher; *Residue analysis of Tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry*; *J. Agric. Food Chem.* 51, **2003**, 697–703
- [337] T. Christian, R.J. Schneider, H.A. Färber, D. Skutlarek, M.T. Meyer, H.E. Goldbach; *Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters*; *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31, **2003**, 36–44
- [338] A.B.A. Boxall, P. Johnson, E.J. Smith, C.J. Sinclair, E. Sturr, L.S. Levy; *Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants*; *J. Agric. Food Chem.* 54, **2006**, 2288–2297
- [339] A.M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S.H. Hansen; *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*; *J. Chromatogr. A* 1038, **2004**, 157–170
- [340] P. Kay, P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall; *Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land*; *Chemosphere* 60, **2005**, 497–507
- [341] P. Kay, P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall; *Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land*; *Chemosphere* 59, **2005**, 951–959
- [342] P. Kay, P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall; *A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data*; *Environmental Pollution* 134, **2005**, 333–341
- [343] P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall, P. Kay, H. Noble; *Evaluation of a Lower Tier Exposure Assessment Model for Veterinary Medicines*; *J. Agric. Food Chem.* 53, **2005**, 2192–2201
- [344] P.A. Blackwell, H. Holten Lützhøft, H. Ma, B. Halling-Sørensen, A.B.A. Boxall, P. Kay; *Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection*; *Talanta* 64, **2004**, 1058–1064
- [345] M. De Liguoro, V. Cibir, F. Capolongo, B. Halling-Sørensen, C. Montesissa; *Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil*; *Chemosphere* 52, **2003**, 203–212
- [346] A. Göbel, A. Thomsen, C.S. McArdell, A.C. Alder, W. Giger, N. Theiß, D. Löffler, T.A. Ternes; *Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge*; *J. Chromatogr. A* 1085, **2005**, 179–189
- [347] S. Boleas, C. Alonso, J. Pro, C. Fernandez, G. Carbonell, J.V. Tarazona; *Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS-3) and influence of manure co-addition*; *Journal of Hazardous Materials* 122, **2005**, 233–241
- [348] C. Fernandez, C. Alonso, M.M. Babin, J. Pro, G. Carbonell, J.V. Tarazona; *Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems*; *Science of the Total Environment* 323, **2004**, 63–69

- [349] T. Pfeifer, J. Tuerk, K. Bester, M. Spiteller; *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, **2002**, 663-669
- [350] G.A. Grant, S.L. Frison, P. Sporns; *A Sensitive Method for Detection of Sulfamethazine and N4-Acetylsulfamethazine Residues in Environmental Samples Using Solid Phase Immunoextraction Coupled with MALDI-TOF MS*; J. Agric. Food Chem. 51, **2003**, 5367-5375
- [351] A. Hembrock-Heger; *Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie*; Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV, Hrsg.), LANUV-Fachbericht 2, **2007**
- [352] H. Engels; *Verhalten von ausgewählten Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und in Böden*; Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, **2004**
- [353] M. Förster, V. Laabs, M. Lamshöft, J. Groeneweg, S. Zühlke, M. Spiteller, M. Krauss, M. Kaupenjohann, W. Amelung; *Sequestration of Manure-Applied Sulfadiazine Residues in Soils*; Environ. Sci. Technol. 43, **2009**, 1824–1830
- [354] Europäische Kommission; *Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003*, Appendixes 3&4, Annex: List of additives; Online-Dokument, Rev. 40, Stand 09.03.2009
http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf
Zuletzt zugegriffen am 11.03.2009
- [355] Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; *Futtermittel-Zusatzstoffe*; Online-Dokument, 16.04.2007
<http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/futtermittelzusatzstoffe.htm>
Zuletzt zugegriffen am 11.03.2009
- [356] T. Doan, H.B. Fung, D. Mehta, P.F. Riska; *Tigecycline: A Glycylcycline Antimicrobial Agent*; Clinical Therapeutics 28, **2006**, 1079-1106
- [357] GERMAP 2008; *Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.), 1. Auflage, **2008**
- [358] B. Berger-Bächi; *Mechanismen der Antibiotika-Resistenzbildung in Bakterien*; Mitt. Lebensm. Hyg. 92, **2001**, 3–9
- [359] C.A.A. Fischer; *Resistenzentwicklung von S. pneumoniae, S. pyogenes und anderer Streptokokken-Spezies gegenüber Fluorchinolonen*; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2003**
- [360] W.K. Jung, J.Y. Lim, N.H. Kwon, J.M. Kim, S.K. Hong, H.C. Koo, S.H. Kim, Y.H. Park; *Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea*; Int. J. of Food Microbiology 113, **2007**, 102–107
- [361] N. Kemper; *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*; Ecological Indicators 8, **2008**, 1-13
- [362] H. Schmitt, B. Martinali, K. Stoob, G. Hamscher, P. van Beelen, E. Smit, K. van Leeuwen, W. Seinen; *Fortschritte in Ökotoxikologie & Umweltchemie: Antibiotika als Umweltkontaminanten – Effekte auf Bodenbakterien*; UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 18, **2006**, 110-118
- [363] G. Dantas, M.O.A. Sommer, R.D. Oluwasegun, G.M. Church; *Bacteria Subsisting on Antibiotics*; Science 320, **2008**, 100-103
- [364] M. Kietzmann, A. Böttner, H.M. Hafez, C. Kehrenberg, D. Klarmann, P. Krabisch, T. Kühn, G. Luhofer, A. Richter, S. Schwarz, W. Traeder, K. Waldmann, J. Wallmann, Christiane Werckenthin; *Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Überlegungen zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) aus klinisch-pharmakologischer Sicht*; Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, **2004**, 81–87
- [365] A. Voss, F. Loeffen, J. Bakker, C. Klaassen, M. Wulf; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*; Emerg. Infect. Dis. 11, **2005**, 1965–1966
- [366] A.J. de Neeling, M.J.M. van den Broek, E.C. Spalburg, M.G. van Santen-Verheuevel, W.D.C. Dam-Deisz, H.C. Boshuizen, A.W. van de Giessen, E. van Duijkeren, X.W. Huijsdens; *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*; Vet. Microbiol. 122, **2007**, 366–372

- [367] E. van Duijkeren, R. Ikawaty, M.J. Broekhuizen-Stins, M.D. Jansen, E.C. Spalburg, A.J. de Neeling, J.G. Allaart, A. van Nes, J.A. Wagenaar, A.C. Fluit; *Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms*; Vet. Microbiol. 126, **2008**, 383–389
- [368] M.M.L. van Rijen, P.H. van Keulen, J.A. Kluytmans; *Increase in a Dutch Hospital of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Related to Animal Farming*; Clinical Infectious Diseases 46, **2008**, 261–263
- [369] S. J. Dancer; *The effect of antibiotics on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, **2008**, 246–253
- [370] N.D. Kristof; *Pathogens in Our Pork*; The New York Times, 15.März **2009**
<http://www.nytimes.com/2009/03/15/opinion/15kristof.html>
Zuletzt zugegriffen am 24.03.2009
- [371] T. Khanna, R. Friendship, C. Dewey, J.S. Weese; *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*; Veterinary Microbiology 128, **2008**, 298–303
- [372] M. Wulf and A. Voss; *MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen?*; Clin. Microbiol. Infect. 14, **2008**, 519–521
- [373] G. Normanno, M. Corrente, G. La Salandra, A. Dambrosio, N.C. Quaglia, A. Parisi, G. Greco, A.L. Bellacicco, S. Virgilio, G.V. Celano; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy*; International Journal of Food Microbiology 117, **2007**, 219–222
- [374] M. Corrente, G. Normanno, V. Martella, A.L. Bellacicco, N.C. Quaglia, A. Dambrosio, D. Buonavoglia, M. D'Abramo, C. Buonavoglia; *Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates from food products*; Letters in Applied Microbiology 45, **2007**, 535–539
- [375] S. Pu, F. Han, B. Ge; *Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Louisiana Retail Meats*; Applied and Environmental Microbiology 75, **2009**, 265–267
- [376] J. Kluytmans, W. van Leeuwen, W. Goessens, R. Hollis, S. Messer, L. Herwaldt, H. Bruining, M. Heck, J. Rost, N. van Leeuwen, A. van Belkum, H. Verbrugh; *Food-Initiated Outbreak of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Analyzed by Pheno- and Genotyping*; Journal of Clinical Microbiology 33, **1995**, 1121–1128
- [377] H. Pawelzick; *Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten – Untersuchungen von Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie*; Dissertation, Universität Hannover, **2005**
- [378] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto; *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*; J. Chromatogr. A 882, **2000**, 109–133
- [379] W. Tappe, C. Zarfl, S. Kummer, P. Burauel, H. Vereecken, J. Groeneweg; *Growth-inhibitory effects of sulfonamides at different pH: Dissimilar susceptibility patterns of a soil bacterium and a test bacterium used for antibiotic assays*; Chemosphere 72, **2008**, 836–843
- [380] C. Zarfl, M. Matthies, J. Klasmeier; *A mechanistical model for the uptake of sulfonamides by bacteria*; Chemosphere 70, **2008**, 753–760
- [381] J.L. Woolley, C.W. Sigel; *Metabolism and disposition by the rat of sulfadiazine-S-35 alone and in the presence of trimethoprim*; Drug Metabolism and Disposition 7, **1979**, 94–99
- [382] S. Thiele-Bruhn, Dirk Peters; *Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces*; Landbauforschung Völknerode - FAL Agricultural Research 57, **2007**, 13–23
- [383] M. Grote; *Antibiotika in der Umwelt und in Nahrungsmitteln – Ein Risiko für den Konsumenten?*; internist. prax. 47, 919–926, **2007**
- [384] J. Kollmus; *Extraktion organischer Schadstoffe aus Böden mit überkritischem Wasser und Evaluation von Extraktionsmodellen*; Dissertation, Technische Universität Bergakademie Freiberg, **2006**
- [385] T. Gimmi; *Verlagerung gelöster Stoffe durch den Boden ins Grundwasser*; Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL, Schweiz), Schriftenreihe Umwelt Nr. 349, **2004**
- [386] S. Abiven, S. Menasseri, C. Chenu; *The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability – A literature analysis*; Soil Biology & Biochemistry 41, 1–12, **2009**

- [387] I. Savric; *Einflussfaktoren auf die Bindung und Mobilität organischer und anorganischer Stoffe in kontaminierten Rieselfeldböden*; Dissertation, Technische Universität Berlin, **2001**
- [388] D.G. Linz, D.V. Nakles; *Environmentally Acceptable Endpoints in Soil: Risk-Based Approach to Contaminated Site Management Based on Availability of Chemicals in Soil*; American Academy of Environmental Engineers (Verlag), Annapolis, MD, **1997**
zitiert in: D.M. Beckles, W. Chen, J.B. Hughes; *Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Sequestered in Sediment: Microbial Study and Model Prediction*; Environmental Toxicology and Chemistry, 26, **2007**, 878–883
- [389] R.L. Lipnick, J.L.M. Hermens, K.C. Jones, D.C.G. Muir; *Persistent, Accumulative, and Toxic Chemicals. I: Fate and Exposure*; ACS Symposium Series 772, American Chemical Society, Washington, DC, **2001**
zitiert in: D.M. Beckles, W. Chen, J.B. Hughes; *Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Sequestered in Sediment: Microbial Study and Model Prediction*; Environmental Toxicology and Chemistry, 26, **2007**, 878–883
- [390] D.M. Beckles, W. Chen, J.B. Hughes; *Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Sequestered in Sediment: Microbial Study and Model Prediction*; Environmental Toxicology and Chemistry, 26, **2007**, 878–883
- [391] K. Smalla, C.T.T. Binh, C. Kopmann, H. Heuer; *Effekte von Veterinärantibiotika auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden*; Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 60, **2008**, 236
- [392] A. Eschenbach, H. Mescher, R. Wienberg, B. Mahro; *Humifizierung von Schadstoffen*; in J. Michels, T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Fachredaktion), Umweltbundesamt (Hrsg.): Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grün-Weiße Reihe des BMBF, S. 147-190, **2001**
- [393] M. Alexander; *How toxic are toxic chemicals in soil?*; Environ. Sci. Technol. 29, **1997**, 2713-2717
zitiert in: A. Eschenbach, H. Mescher, R. Wienberg, B. Mahro; *Humifizierung von Schadstoffen*; in J. Michels, T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Fachredaktion), Umweltbundesamt (Hrsg.): Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grün-Weiße Reihe des BMBF, S. 147-190, **2001**
- [394] M. Förster, V. Laabs, M. Lamshöft, J. Groeneweg, S. Zühlke, M. Spiteller, M. Krauss, M. Knapenjohn, W. Amelung; *Sequestration of Sulfadiazine in Soil*; Präsentation: Workshop – Fate and Effects of Pharmaceuticals in Soil, Gustav-Stresemann-Institut Bonn, 30.09.-02.10. **2008**
- [395] R. Becker; *Einflussfaktoren auf die Mobilisierbarkeit von PCB und PAK in Rieselfeld-Bodenproben*; Dissertation, Technische Universität Berlin, **2006**
- [396] America Institute of Biological Science – Environmental Task Group; *Registration of pesticides in the United States – proposed guidelines*; Fed. Reg. 40, **1975**, 123
zitiert in: A. Eschenbach, H. Mescher, R. Wienberg, B. Mahro; *Humifizierung von Schadstoffen*; in J. Michels, T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Fachredaktion), Umweltbundesamt (Hrsg.): Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grün-Weiße Reihe des BMBF, S. 147-190, **2001**
- [397] S.U. Khan; *Bound pesticide residues in soil and plants*; Residue Reviews 84, **1982**, 1-25
- [398] M.W. Skidmore, G.D. Paulson, H.A. Kuiper, B. Ohlin, S. Reynolds; *Bound Xenobiotic Residues in Food Commodities of Plant and Animal Origin*; Pure & Appl. Chem. 70, **1998**, 1423-1447
- [399] T.R. Roberts, W. Klein, G.G. Still, P.C. Kearney, N. Drescher, J. Desmoras, H.O. Esser, N. Aharonson, J.W. Vonk; *Non-Extractable Pesticide Residues in Soils and Plants*; Pure & Appl. Chem. 56, **1984**, 945-956
- [400] P.C. Kearney; *Definition of non-extractable pesticide residues in plants and soils*; J. Ass. Offic. Anal. Chem. 65, **1982**, 1031-1032
- [401] Richtlinie 95/36/EG der Kommission vom 14. Juli 1995 zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln; Amtsblatt Nr. L 172 vom 22.07. **1995**
- [402] Verordnung über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (Pflanzenschutzmittelverordnung, PSMV) vom 18. Mai 2005, Schweiz, Online-Dokument, Stand 1. Februar **2009**
<http://www.admin.ch/ch/d/sr/9/916.161.de.pdf>
- [403] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); *Informationen zu Höchstmengen für Pflanzenschutzmittelrückstände in oder auf Lebensmitteln*; Online-Dokument, Aktualisierte Fassung vom 24. März **2003**
http://www.bfr.bund.de/cm/218/hoechstmengen_fuer_pflanzenschutzmittelrueckstaende.pdf
- [404] W. Bodenschatz; *Handbuch für den Schädlingsbekämpfer in Ausbildung und Praxis*; Loseblattausgabe Grundwerk 1995, B. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg **2006**

- [405] Führ, F., H. Ophoff, P. Burauel, U. Wanner, and K. Haider; *Modification of the definition of bound residues*; in Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.): *Pesticide bound residues in soil*, Wiley-VCH (Verlag), Weinheim, 175-177, **1998**
- [406] Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), ABl. L 142 vom 31.5. **2008**
- [407] Bund-/Länderarbeitsgemeinschaft Bodenschutz (LABO), Altlastenausschuss (ALA), Unterausschuss Sickerwasserprognose; *Arbeitshilfe Sickerwasserprognose bei Detailuntersuchungen*; online Dokument, Stand 12/ **2008**
http://www.mufv.rlp.de/fileadmin/img/inhalte/boden/ALEX/ALEX_12neu_Stand_Dezember_2008.pdf
- [408] B. Lennartz; *Ausgewählte Aspekte der Sickerwasserprognose – Aktivitäten der AG „Sickerwasser und Stofftransport“ der DWA*; in S. Melchior, K. Berger (Hrsg.): *Abfallverwertung und Rekultivierung von Deponien, Altlasten und Bergbaufolgelandschaften*. Hamburger Bodenkundliche Arbeiten, Band 56, S. 55-70, **2005**
- [409] A. Michels; *Charakterisierung des Transportverhaltens von Mikrosphären in Böden unterschiedlicher Nutzung und Bearbeitung*; Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, **2005**
- [410] Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME); *Präferenzierter Transport von Pflanzenschutzmitteln durch Makroporen in strukturierten Böden*; IME-Jahresbericht, **2001**
http://www.ime.fraunhofer.de/fhg/Images/2001_PSM_Boden%20Makroporentransport_tcm279-63526.pdf
- [411] G. Machulla, O. Nitzsche, W. Schmidt; *Veränderte Pflanzenschutzmittel- und Nährstoffausträge bei bodenschonender Bewirtschaftung – Risikoanalyse und –vorsorge*; Landesamtes für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Schriftenreihe Stoffaustag und Bodenbearbeitung, Nr. 29, **2008**
- [412] T.K. Sen, N. Nalwaya, K.C. Khilar; *Colloid-Associated Contaminant Transport in Porous Media: 2. Mathematical Modeling*; AIChE Journal 48, **2002**, 2375-2385
- [413] J.C. Carlson, S.A. Mabury; *Dissipation Kinetics and Mobility of Chlortetracycline, Tylosin and Monensin in an Agrigultural Soil in Northumberland County, Ontario, Canada*; Environ. Toxicol. Chem. 25, **2006**, 1–10
- [414] G. Hamscher, H.T. Pawelzick, H. Höper, H. Nau; *Different Behavior of Tetracyclines and Sulfonamides in Sandy Soils after Repeated Fertilization with Liquid Manure*; Environ. Toxicol. Chem. 24, **2005**, 861-868
- [415] A.L. Batt, S. Kim, D.S. Aga; *Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations*; Chemosphere 68, **2007**, 428–435
- [416] M. Burkhardt, C. Stamm; *Depth Distribution of Sulfonamide Antibiotics in Pore Water of an Undisturbed Loamy Grassland Soil*; J. Environ. Qual. 36, **2007**, 588–596
- [417] G. Henkelmann, K. Mosandl; *Sorption und Abbau von Tetracyclinen und Sulfonamiden im Boden*; Online-Dokument, **2006**
<http://www.stmugv.bayern.de/umwelt/boden/download/doc/mbodentage2006/seite112.pdf>
Zuletzt zugegriffen am 17.03.2009
- [418] G. Henkelmann, *Chlortetracyclin und Sulfadiazin im Boden – Feld- und Lysimeterversuche*, In: Bayerisches Landesamt für Umwelt (Hrsg.), *Tierarzneimittel in der Umwelt*, Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie 58, **2007**, 105-114
- [419] M.-O. Aust, F. Godlinski, G.R. Travis, X. Hao, T.A. McAllister, Peter Leinweber, Sören Thiele-Bruhn; *Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle*; Environmental Pollution 156, **2008**, 1243–1251
- [420] M.H. Farkas, J.O. Berry, D.S. Aga; *Chlortetracycline Detoxification in Maize via Induction of Glutathione S-Transferases after Antibiotic Exposure*; Environ. Sci. Technol. 41, **2007**, 1450–1456
- [421] S. O'Connor, D.S. Aga; *Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification*; Trends in Analytical Chemistry 26, **2007**, 456-465
- [422] B. Halling-Sørensen, A. Lykkeberg, F. Ingerslev, P. Blackwell, J. Tjørnelund; *Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC–MS–MS*; Chemosphere 50, **2003**, 1331–1342
- [423] S. Thiele-Bruhn, T. Seibicke, H.-R. Schulten, P. Leinweber; *Sorption of Sulfonamide Pharmaceutical Antibiotics on Whole Soils and Particle-Size Fractions*; J. Environ. Qual. 33, **2004**, 1331–1342

- [424] T.L. Ter Laak, W.A. Gebbink, J. Tolls; *Estimation of Soil Sorption Coefficients of Veterinary Pharmaceuticals from Soil Properties*; Environ. Toxicol. Chem. 25, **2006**, 933–941
- [425] T.L. Ter Laak, W.A. Gebbink, J. Tolls; *The Effect of pH and Ionic Strength on the Sorption of Sulfachloropyridazine, Tylosin, and Oxytetracycline to Soil*; Environ. Toxicol. Chem. 25, **2006**, 904–911
- [426] A.A. MacKay, B. Canterbury; *Oxytetracycline Sorption to Organic Matter by Metal-Bridging*; J. Environ. Qual. 34, **2005**, 1964–1971
- [427] P. Kulshrestha, R.F. Giese, D.S. Aga; *Investigating the Molecular Interactions of Oxytetracycline in Clay and Organic Matter: Insights on Factors Affecting Its Mobility in Soil*; Environ. Sci. Technol. 38, **2004**, 4097–4105
- [428] A.D. Jones, G.L. Bruland, S.G. Agrawal, D. Vasudevan; *Factors Influencing the Sorption of Oxytetracycline to Soils*; Environ. Toxicol. Chem. 24, **2005**, 761–770
- [429] C. Gu, K.G. Karthikeyan, S.D. Sibley, J.A. Pedersen; *Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid*; Chemosphere 66, **2007**, 1494–1501
- [430] I. Turku, T. Sainio, E. Paatero; *Thermodynamics of tetracycline adsorption on silica*; Environ. Chem. Lett. 5, **2007**, 225–228
- [431] B.B. Sithole and R.D. Guy, *Models for Tetracycline in Aquatic Environments I. Interaction with Bentonite Clay Systems*, Water, Air, and Soil Pollution 32, **1987**, 303–314
- [432] B.B. Sithole and R.D. Guy, *Models for Tetracycline in Aquatic Environments II. Interaction with Humic Substances*, Water, Air, and Soil Pollution 32, **1987**, 315–321
- [433] C. Aguzzi, C. Viseras, P. Cerezob, S. Rossi, F. Ferrari, A. Lopez-Galindo, C. Caramella; *Influence of dispersion conditions of two pharmaceutical grade clays on their interaction with some tetracyclines*; Applied Clay Science 30, **2005**, 79–86
- [434] A.J. Carrasquillo, G.L. Bruland, A.A. MacKay, D. Vasudevan; *Sorption of Ciprofloxacin and Oxytetracycline Zwitterions to Soils and Soil Minerals: Influence of Compound Structure*; Environ. Sci. Technol. 42, **2008**, 7634–7642
- [435] C. Gu, K.G. Karthikeyan, *Interaction of Tetracycline with Aluminum and Iron Hydrous Oxides*; Environ. Sci. Technol. 39, **2005**, 2660–2667
- [436] R.A. Figueroa, A.A. MacKay, *Sorption of Oxytetracycline to Iron Oxides and Iron Oxide-Rich Soils*, Environ. Sci. Technol. 39, **2005**, 6664–6671
- [437] Y. Wang, D. Jia, R. Sun, H. Zhu, D. Zhou; *Adsorption and Cosorption of Tetracycline and Copper(II) on Montmorillonite as Affected by Solution pH*; Environ. Sci. Technol. 42, **2008**, 3254–3259
- [438] F. Gambinossi, B. Mecheri, M. Nocentini, M. Puggelli, G. Caminati; *Effect of the phospholipid head group in antibiotic–phospholipid association at water–air interface*; Biophys. Chem. 110, **2004**, 101–117
- [439] Andreas Trepte, Wikipedia, Online-Grafik, Version vom 9. April **2008**
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8b/Montmorillonit.svg>
Zuletzt zugegriffen am 12.04.2009
- [440] J.R.V. Pils, D.A. Laird; *Sorption of Tetracycline and Chlortetracycline on K- and Ca-Saturated Soil Clays, Humic Substances, and Clay-Humic Complexes*; Environ. Sci. Technol. 41, **2007**, 1928–1933
- [441] M.E. Parolo, M.C. Savini, J.M. Vallés, M.T. Baschini, M.J. Avena; *Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects*; Applied Clay Science 40, **2008**, 179–186
- [442] P. Chang, J. Jean, W. Jiang, Z. Li; *Mechanism of tetracycline sorption on rectorite*; Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 339, **2009**, 94–99
- [443] P. Chang, Z. Li, T. Yu, S. Munkhbayer, T. Kuo, Y. Hung, J. Jean, K. Lin; *Sorptive removal of tetracycline from water by palygorskite*; Journal of Hazardous Materials 165, **2009**, 148–155
- [444] F. Ingerslev, L. Toräng, M. Loke, B. Halling-Sørensen, N. Nyholm; *Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems*; Chemosphere 44, **2001**, 865–872
- [445] M. Kühne, D. Ihnen, G. Möller, O. Agthe; *Stability of tetracycline in water and liquid manure*; J. Vet. Med. Ser. A-Physiol. Pathol. Clin. Med. 47, **2000**, 379–384

- [446] H. Zhang, W. Chen, C. Huang; *Kinetic Modeling of Oxidation of Antibacterial Agents by Manganese Oxide*; Environ. Sci. Technol. 42, **2008**, 5548–5554
- [447] K.F. Rubert, J.A. Pedersen; *Kinetics of Oxytetracycline Reaction with a Hydrous Manganese Oxide*; Environ. Sci. Technol. 40, **2006**, 7216–7221
- [448] W. Chen, C. Huang; *Transformation of Tetracyclines Mediated by Mn(II) and Cu(II) Ions in the Presence of Oxygen*; Environ. Sci. Technol. 43, **2009**, 401–407
- [449] B. Halling-Sørensen, A.M. Jacobsen, J. Jensen, G. Sengeløv, E. Vaclavik, F. Ingerslev; *Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: a field-scale study in southern Denmark*; Environ. Toxicol. Chem. 24, **2005**, 802–810
- [450] M. Lamshöft, P. Sukul, S. Zühlke, M. Spiteller; *Metabolism of ¹⁴C-labelled and non labelled Sulfadiazine after administration to pigs*; Analytical and Bioanalytical Chemistry 388, **2007**, 1733–1745
- [451] K. Stoob, H.P. Singer, S.R. Mueller, R.P. Schwarzenbach, C.H. Stamm; *Dissipation and Transport of Veterinary Sulfonamide Antibiotics after Manure Application to Grassland in a Small Catchment*; Environ. Sci. Technol. 41, **2007**, 7349–7355
- [452] R. Kreuzig; *Abschwemmung von Veterinärpharmaka von Ackerland und Weide – Das Runoff-Projekt*; In: Arzneimittel in der Umwelt. Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt; Umweltbundesamt (Hrsg.), Texte 29/05, 141–152, **2005**
- [453] P. Sukul, M. Lamshöft, S. Zühlke, M. Spiteller; *Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems*; Chemosphere 73, **2008**, 1344–1350
- [454] M. Burkhardt, C. Stamm, C. Waul, H. Singer, S. Müller; *Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland*; J. Environ. Qual. 34, **2005**, 1363–1371
- [455] C. Schwake-Anduschus; *Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen*; Dissertation, Universität Paderborn, **2008**
- [456] R.J. Schneider; *Plant Uptake of Pharmaceuticals from Soil - Determined by ELISA*; Seite 179–198 in: D.S. Aga (Hrsg.), Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems; CRC Press Inc. (Verlag), 1. Auflage, 17. Dezember **2007**
- [457] A. B.A. Boxall, P. Blackwell, R. Cavallo, P. Kay, J. Tolls; *The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems*; Toxicology Letters 131, **2002**, 19–28
- [458] Q. Wang, M. Guo, S.R. Yates; *Degradation Kinetics of Manure-Derived Sulfadimethoxine in Amended Soil*; J. Agric. Food Chem. 54, **2006**, 157–163
- [459] S. Thiele-Bruhn, T. Seibicke, H.-R. Schulten, P. Leinweber; *Sorption of Sulfonamide Pharmaceutical Antibiotics on Whole Soils and Particle-Size Fractions*; J. Environ. Qual. 33, **2004**, 1331–1342
- [460] M. Unold, R. Kasteel, J. Groeneweg, H. Vereecken; *Der Transport des Antibiotikums Sulfadiazin in Böden: Welchen Effekt hat die Gülle?*; Mitt. Umweltchem. Ökotox. 4, **2008**, 98–101
- [461] M. Unold, R. Kasteel, J. Groeneweg, H. Vereecken; *Transport and transformation of sulfadiazine in soil columns packed with a silty loam and a loamy sand*; Journal of Contaminant Hydrology 103, **2009**, 38–47
- [462] K. Stoob, H.P. Singer, S. Stettler, N. Hartmann, S.R. Mueller, C.H. Stamm; *Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction*; Journal of Chromatography A 1128, **2006**, 1–9
- [463] K. Stoob; *Veterinary Sulfonamide Antibiotics in the Environment: Fate in Grassland Soils and Transport to Surface Waters*; Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, **2005**
- [464] S. Thiele-Bruhn, M.-O. Aust; *Effects of Pig Slurry on the Sorption of Sulfonamide Antibiotics in Soil*; Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47, **2004**, 31–39
- [465] A. Wehrhan, R. Kasteel, J. Simunek, J. Groeneweg, H. Vereecken; *Transport of sulfadiazine in soil columns - Experiments and modelling approaches*; Journal of Contaminant Hydrology 89, **2007**, 107–135
- [466] J. Gao, J.A. Pedersen; *Adsorption of Sulfonamide Antimicrobial Agents to Clay Minerals*; Environ. Sci. Technol. 39, **2005**, 9509–9516

- [467] M. Kahle, C. Stamm; *Sorption of the Veterinary Antimicrobial Sulfathiazole to Organic Materials of Different Origin*; Environ. Sci. Technol. 41, **2007**, 132-138
- [468] M. Kahle, C. Stamm; *Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite*; Chemosphere 68, **2007**, 1224–1231
- [469] S. Thiele; *Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess chernozem*; J. Plant Nutr. Soil Sci. 163, **2000**, 589-594
- [470] S. Hölte, R. Kreuzig; *Laboratory Testing of Sulfamethoxazole and its Metabolite Acetyl-Sulfamethoxazole in Soil*; Clean 35, **2007**, 104 – 110
- [471] H.M. Bialk, J.A. Pedersen; *NMR Investigation of Enzymatic Coupling of Sulfonamide Antimicrobials with Humic Substances*; Environ. Sci. Technol. 42, **2008**, 106–112
- [472] H.M. Bialk, C. Hedman, A. Castillo, J.A. Pedersen; *Laccase-Mediated Michael Addition of ¹⁵N-Sulfapyridine to a Model Humic Constituent*; Environ. Sci. Technol. 41, **2007**, 3593-3600
- [473] H.M. Bialk, A.J. Simpson, J.A. Pedersen; *Cross-Coupling of Sulfonamide Antimicrobial Agents with Model Humic Constituents*; Environ. Sci. Technol. 39, **2005**, 4463–4473
- [474] R. Kreuzig, S. Hölte; *Investigations on the Fate of Sulfadiazine in Manured Soil: Laboratory Experiments and Test Plot Studies*; Environ. Toxicol. Chem. 24, **2005**, 771-776
- [475] P. Sukul, M. Lamshöft, S. Zühlke, M. Spiteller; *Photolysis of ¹⁴C-sulfadiazine in water and manure*; Chemosphere 71, **2008**, 717–725
- [476] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; „Antinfektiva-einträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente, Abschlußbericht vom 14.01.2005 des Forschungsauftrages IIA5 – 2038.06.06.01 – B/T /01“; Ministerium für Verbraucherschutz des Landes NRW, **2005**
- [477] M. Grote, B. Kuhlmann, G. Preuß, U. Schulte-Ebbert, H. Stevens und N. Zullei-Seibert; *Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes*; Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH Dortmund, Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 66, **2007**
- [478] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Investigation on the fate of antibiotics used in Pig farming in food chain and environment (Part 1)*; Fresenius Environmental Bulletin - FEB 13, **2004**, 1216-1224
- [479] J. Raich-Montiu, J. Folch, R. Compano, M. Granados, M.D. Prat; *Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence*; Journal of Chromatography A 1172, **2007**, 186–193
- [480] M. Förster, V. Laabs, M. Lamshöft, T. Pütz, W. Amelung; *Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry*; Anal. Bioanal. Chem. 391, **2008**, 1029–1038
- [481] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.L. Kratz; *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. A 815, **1998**, 213-223
- [482] G. Hamscher, S. Sczesny, H. Höper, H. Nau; *Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by HPLC-ESI-MS-MS*; Anal. Chem. 74, **2002**, 1509–1518
- [483] J. Zhu, D.D. Snow, D.A. Cassada, S.J. Monson, R.F. Spalding; *Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. A 928, **2001**, 177-186
- [484] F. Sacher, F.T. Lange, H.J. Brauch, I. Blankenhorn; *Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany*; J. Chromatogr. A 938, **2001**, 199-210
- [485] C. Hartig, T. Storm, M. Jekel; *Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry*; J. Chromatogr. A 854, **1999**, 163-173
- [486] M. Petrovic, M.D. Hernando, M.S. Diaz-Cruz, D. Barceló, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*; J. Chromatogr. A 1067, **2005**, 1-14

- [487] P. Eichhorn, P. L. Ferguson, S. Perez, D.S. Aga; *Application of Ion Trap-MS with H/D Exchange and QqTOF-MS in the Identification of Microbial Degradates of Trimethoprim in Nitrifying Activated Sludge*; Anal. Chem. 77, **2005**, 4176-4184
- [488] Deutsche Forschungsgesellschaft; *Validierung der Verfahren zur Rückstandsanalyse von Pflanzenschutzmitteln*; Gesamtentwurf der ad hoc-Unterarbeitsgruppe Validierungskonzepte der AG Fortschritte in der Analytik von Pflanzenschutzmitteln, Mitteilung 3, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2000**
- [489] Empfehlung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft auf Vorschlag ihrer Arbeitsgruppe -Pharmakologisch wirksame Stoffe-; *Validierung von Verfahren zur Untersuchung auf pharmakologisch wirksame Stoffe im Routinelabor*; Lebensmittelchemie 57, **2003**, 73-104
- [490] Petra Mersmann; *Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wassergesättigten und -ungesättigten Zone*; Dissertation Technische Universität Berlin, **2003**
- [491] K. Choi, S. Kim, C. Kim, S. Kim; *Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD*; Chemosphere 66, **2007**, 977-984
- [492] R. Kreuzig, C. Kullmer, B. Matthies, S. Höltge, H. Dieckmann; *Fate and Behaviour of Pharmaceutical Residues in Soils*; Fresenius Environmental Bulletin 12, **2003**, 550-558
- [493] K. Stoob, H. Schmitt, M. Wanner; *Antibiotikaeinsatz in der Landwirtschaft-Folgen für die Umwelt*; in: Landwirtschaft und Wasserqualität, EAWAG-News 3, **2005**, 12-15
- [494] Michal Rysz, Pedro J.J. Alvarez; *Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments*; Water Research 38, **2004**, 3705-3712
- [495] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil.*, Landbauforschung Völkrode - FAL Agricultural Research 57, **2007**, 25-32
- [496] Z. Qiang, C. Adams; *Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics*; Water Research 38, **2004**, 2874-2890
- [497] C. Lin, C. Chang, W. Lin; *Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. III. Citrate buffer as a background electrolyte*; J. Chromatogr. A 768, **1997**, 105-112
- [498] R.K. Sharma, S. Joseph; *Formation constants and molecular modelling studies of metal ion-tetracycline complexes*; Indian J. Chem. 35A, **1996**, 639-642
- [499] H.F. Dos Santos, E.S. Xavier, M.C. Zerner, W.B. De Almeida; *Spectroscopic investigation of the Al(III)-anhydrotetracycline complexation process*; Journal of Molecular Structure (Theochem) 527, **2000**, 193-202
- [500] S. Schneider, M.O. Schmitt, G. Brehm, M. Reiher, P. Matousek, M. Towrie; *Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg^{2+} and Ca^{2+}* ; Photochem. Photobiol. Sci. 2, **2003**, 1107-1117
- [501] D.L.J. Clive; *Chemistry of Tetracyclines*; Quart. Rev. (London) 22, **1968**, 435-456
- [502] J. Strähle, E. Schweda, Jander · Blasius *Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum*, S.Hirzel Verlag, 14. Aufl., **1995**
- [503] B. Pan, P. Ning, B. Xing; *Humic Substances - Review Series: Part V: sorption of pharmaceuticals and personal care products*; Environ. Sci. Pollut. Res. 16, **2009**, 106-116
- [504] P.A. Blackwell, P. Kay, R. Ashauer, A.B.A. Boxall; *Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils*; Chemosphere 75, **2009**, 13-19
- [505] ChemDat®: http://chemdat.merck.de/mda/int_de/labtool/table_solvol.html
- [506] A. Klein; *Untersuchung zur fluoreszenzspektroskopischen Erfassung von Tetracyclin*; Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover **2004**
- [507] P.G. Aeby; *Quantitative Fluorescence Imaging of Tracer Distributions in Soil Profiles*; Dissertation, ETH Zürich, **1998**
- [508] P. Aeby, U. Schultze, D. Braichotte, M. Bundt, F. Moser-Boroumand, H. Wydler, H. Flühler; *Fluorescence Imaging of Tracer Distributions in Soil Profiles*; Environ. Sci. Technol. 35, **2001**, 753-760

- [509] J. Vanderborght, P. Gähwiler, H. Wyder, U. Schultze, H. Flühler; *Imaging Fluorescent Dye Concentrations on Soil Surfaces: Uncertainty of Concentration Estimates*; Soil Sci. Soc. Am. J. 66, **2002**, 760–773
- [510] J. Vanderborght, P. Gähwiler, H. Flühler; *Identification of Transport Processes in Soil Cores Using Fluorescent Tracers*; Soil Sci. Soc. Am. J. 66, **2002**, 774–787
- [511] K. Cammann; *Instrumentelle Analytische Chemie*; Spektrum, Akademischer Verlag, **2001**
- [512] K. Levenberg; *A Method for the Solution of Certain Problems in Least Squares*; Quart. Appl. Math. 2, **1944**, 164–168
- [513] D. Marquardt; *An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters*; SIAM J. Appl. Math. 11, **1963**, 431–441
- [514] P. Kubelka, F. Munk; *Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche*; Z. technische Physik 1, **1931**, 593–601
- [515] S. Ebel S., H. Kussmaul; *Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen über die Kubelka-Munk-Funktion*; Chromatographia 7, **1974**, 197–199
- [516] G. Chen, L. Liu; *Hyphenation of Sorbent Extraction and Solid-Matrix Time-Resolved Luminescence Using Tetracycline in Milk as a Model Analyte*; J. Agric. Food Chem. 52, **2004**, 7199–7205
- [517] L. Liu, G. Chen, M. L. Fishman; *A single sorbent for tetracycline enrichment and subsequent solid-matrix time-resolved luminescence*; Analytica Chimica Acta 528, **2005**, 261–268
- [518] E.J. Ko, C.K. Lee, Y.J. Kim, K.W. Kim; *Monitoring PAH-Contaminated Soil using Laser-Induced Fluorescence (LIF)*; Environmental Technology 24, **2003**, 1157–1164
- [519] C.K. Lee, E.J. Ko, K.W. Kim, Y.J. Kim; *Partial Least Square Regression Method for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Soil Environment using Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy*; Water, Air, and Soil Pollution 158, **2004**, 261–275
- [520] Deutsche Institut für Normung e.V.; DIN 38402-Teil 51; *Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen*; **1986**
- [521] Deutsche Institut für Normung e.V.; DIN 32645; *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung*; **1994**
- [522] M. Stüber, T. Reemtsma; *Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS*; Anal. Bioanal. Chem. 378, **2004**, 910–916
- [523] T. Reemtsma; *Liquid chromatography–mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants*; Journal of Chromatography A 1000, **2003**, 477–501
- [524] A. Klopfer, J.B. Quintana, T. Reemtsma; *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples*; Journal of Chromatography A 1067, **2005**, 153–160
- [525] Deutsche Institut für Normung e.V.; DIN 32633; *Verfahren der Standardaddition-Verfahren, Auswertung*; **1998**
- [526] S. Kromidas; *Handbuch Validierung in der Analytik*; WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1. Aufl., 2. Nachdruck, **2003**
- [527] F.C. Leonard, B.K. Markey; *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: A review*; The Veterinary Journal 175, **2008**, 27–36

A Anhang

Inhaltsverzeichnis

A.1 Experimentelles	4
A.1.1 Chemikalien	4
A.1.2 Geräte	5
A.1.2.1 HPLC-DAD-MS/MS	5
A.1.2.2 HPLC-UV	6
A.1.2.3 Spektrometer	7
A.1.2.4 UV-Lampe	7
A.1.2.5 Probenhomogenisierung	7
A.1.2.6 Zentrifuge	7
A.1.2.7 SPE-Extraktionseinheit	8
A.1.2.8 Probentrocknung/-einengung	8
A.1.2.9 pH-Meter	8
A.1.3 Lösungen und Reagenzien	8
A.1.3.1 Mobile Phasen	8
A.1.3.2 Herstellung des $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Extraktanten (pH 10)	9
A.1.3.3 Antibiotika-Stammlösungen	9
A.1.3.4 Herstellung der e-iso-CTC/iso-CTC-Stammlösung	9
A.1.3.5 Kalibrierlösungen	9
A.1.3.6 Mischstandardlösungen	9
A.1.3.7 Antibiotikallösungen für die Sorptionsversuche	10
A.1.3.8 Herstellung des Ammoniak-Puffers	10
A.1.3.9 Metallstandardlösungen	10
A.1.4 Proben	10
A.1.4.1 Bodenproben des Feldversuchs	10
A.1.4.2 Nullprobe	10
A.1.4.3 Proben der Säulenversuche	11
A.1.5 Durchführungen	11
A.1.5.1 HPLC-DAD-MS ² -Methodenentwicklung	11
A.1.5.2 Probenaufarbeitung für Bodenproben	11
A.1.5.2.1 Extraktionsmethode	11
A.1.5.2.2 Festphasenextraktion (SPE)	12
A.1.5.2.3 Wiederholbarkeit der Probenaufarbeitung	12
A.1.5.3 Methodenvvalidierung	13

A.1.5.3.1 Externe Kalibrierung	13
A.1.5.3.2 Signalsuppression durch Matrixbestandteile	13
A.1.5.3.3 Wiederfindung	13
A.1.5.4 Rückstandsuntersuchung von Bodenproben	14
A.1.5.5 Sorptionsversuche	14
A.1.5.5.1 Sorptionsbedingungen	15
A.1.5.5.2 Herstellung von CTC- und iso-CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln	15
A.1.5.6 Photometrische Untersuchung von Metall-CTC bzw. –iso-CTC- Komplexen	16
A.1.5.7 Rückstandsuntersuchung aufgearbeiteter Boden-, Gülle- und Sickerwasserproben der Säulenversuche	17
A.1.5.8 Versuchsdurchführung zur Extrahierbarkeit von Eisenhydroxid- gebundenem CTC	17
A.1.5.9 Fluoreszenzuntersuchungen an partikelgebundenem CTC und iso-CTC.....	19
A.1.5.9.1 Qualitative Fluoreszenzuntersuchung	19
A.1.5.9.2 Quantitative Fluoreszenzuntersuchung.....	19
A.2 Validierung	19
A.2.1 Ausreißertest nach Grubbs	19
A.2.2 Kalibrierdaten	20
A.2.3 Kalibrierung und Regressionsanalyse.....	22
A.2.4 Korrelationskoeffizient.....	26
A.2.5 Überprüfung der Linearität	26
A.2.5.1 Visueller Linearitätstest nach Funk	27
A.2.5.2 Anpassungstest nach Mandel	28
A.2.5.3 Varianzenhomogenität	29
A.2.5.4 Residualanalyse	32
A.2.6 Verfahrenskennndaten.....	34
A.2.7 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	35
A.2.7.1 Nachweisgrenze.....	35
A.2.7.2 Erfassungsgrenze	35
A.2.7.3 Bestimmungsgrenze	35
A.2.8 Wiederfindungsrate	37
A.3 Kennwerte zu den untersuchten Böden	38
A.3.1 Boden „Soest“	38
A.3.2 Boden „Hamm“	40

A.4 Ergebnisse	42
A.4.1 Ergebnisse der Wiederfindung	42
A.4.2 Ergebnisse der Rückstandsuntersuchung der Bodenproben der Feldversuche	43
A.4.3 Ergebnisse zu den Messproben der Säulenversuche	47
A.4.3.1 Gülle	47
A.4.3.2 Säulenelutate	48
A.4.3.3 Boden	49

A.1 Experimentelles

A.1.1 Chemikalien

Acetonitril (HPLC Grade; Merck)

Ameisensäure reinst, 98-100 % (Merck)

Ammoniaklösung, 25% (w/w; p.a.; Merck)

Ammoniumchlorid (NH₄Cl p.a.; Merck)

Anhydrochlortetracyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl₂ · 2 H₂O; p.a.; Merck)

Chlortetracyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Demeclocyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Doxycyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Eisen-II-sulfat Heptahydrat (FeSO₄ · 7 H₂O; p.a.; Merck)

Epichlortetracyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Ethylendiamintetraessigsäure Dihydrat Dinatriumsalz, EDTA (Triplex III:

C₁₀H₁₄N₂Na₂O₆·2H₂O; p.a.; Merck)

Isochlortetracyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Methanol (p.a.; Merck)

N4-Acetylsulfadiazin (im Arbeitskreis hergestellt)

Oxytetracyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Pufferlösungen, pH 2 und pH 7 (gebrauchsfertig; Merck)

Salzsäure, 25 % (w/w; p.a.; Merck)

Sulfadiazin min. 99 % (Sigma-Aldrich)

Tetracyclin Hydrochlorid, ≥ 97 % (Acros)

Titrisol- Aluminium-Standard (Merck)

Titrisol- Blei-Standard (Merck)

Titrisol- Eisen(III)-Standard (Merck)

Titrisol- Kupfer-Standard (Merck)

Titrisol- Magnesium-Standard (Merck)

Titrisol- Nickel-Standard (Merck)

Titrisol- Zink-Standard (Merck)

Trimethoprim (Sigma-Aldrich)

Wasser (bidestilliert über Quarzglas mit Destamat Bidest von Heraeus/Hanau)

A.1.2 Geräte

A.1.2.1 HPLC-DAD-MS² (HPLC-MS/MS)

Für die Methodenentwicklung (Kap. 5.1.2), die Analyse der Bodenproben (Kap. 5.1.4), die Antibiotikabestimmung in den aufgearbeiteten Proben aus den Säulenversuchen (Kap. 5.2.2) sowie der Untersuchungen zur Extrahierbarkeit von an Eisenhydroxid gebundenem CTC wurde ein HPLC-Komplettsystem (Thermo Finnigan/Thermo Electron) mit dem massenselektivem Detektor LCQ-Advantage ESI-Ion Trap verwendet. Die Datenauswertung erfolgte mit Xcalibur-Software (Version 1.3). Die detektierten Analyten und die zur massenspektrometrischen Bestimmung erforderlichen Kenngrößen der Analyte sowie deren Retentionszeiten sind in Kap. 5.1.2 (Tab. 6-8) aufgeführt.

Die aus dem Signal zu Rauschverhältnissen abgeschätzten Nachweisgrenzen (NWG: S/N = 3:1) im Boden liegen für SFD bei 10 µg/kg TM und für CTC bei 10 µg/kg TM. Die abgeschätzten Bestimmungsgrenzen (BG: S/N = 10:1) im Boden liegen für SFD bei 40 µg/kg TM und für CTC bei 25 µg/kg TM. Für die Säuleneluatate liegen die abgeschätzten Nachweisgrenzen (NWG: S/N = 3:1) für SFD bei 20 ng/L und für CTC bei 10 ng/L. Die abgeschätzten Bestimmungsgrenzen (BG: S/N = 10:1) für die Säuleneluatate liegen für SFD bei 50 ng/L und für CTC bei 20 ng/L.

HPLC-System (Spectra): Degasser: SCM 1000 Vakuum Membrane Degasser; Pumpe: P 4000 Gradient Pumpe; Injektionsautomat: AS 3000, Autosampler (gekühlt: 10 °C) mit integriertem Säulenofen (temperiert: 30 °C); UV-Detektor: UV 6000 LP; Messbereich: 190 – 800 nm, Detektionswellenlänge: 267 nm; Injektionsvolumen: 20-40 µL; Fluss: 0,4 mL/min; Vorsäule: Phenomenex C18-ODS, 4 mm Länge, 2 mm i.D., Analytische Säule: Phenomenex 250 x 2,0 mm, Synergi 4µ Hydro-RP;

Gradientenelution: Laufmittel A: 89,9% bidest. Wasser, 0,1% Ameisensäure,
10% Acetonitril (v/v/v)

Laufmittel B: 39,9% bidest. Wasser, 0,1% Ameisensäure,
60% Acetonitril (v/v/v)

Gradient: ist in Abbildung A1 dargestellt.

Ionisierungsmethode: Electrospray Ionization (ESI), positiv-Mode $[M+H]^+$, MS/MS-Stoßexperimente (He), Precursor- und Produkt-Ionen.

Tune-Page-Parameter: Mass Range: 80 – 2000 [m/z]; Sheat Gas Flow Rate: 47 [arb]; Auxillary Gas Flow Rate: 0 [arb]; Ion Spray Voltage: 5 kV; Capillary Temperature: 250 °C; Capillary Voltage: 9 V; Tube Lens Offset: - 5,0 V; Multipole 1 Offset: - 1,5 V; Lens Voltage: - 32 V; Multipole 2 Offset: - 5,5 V.

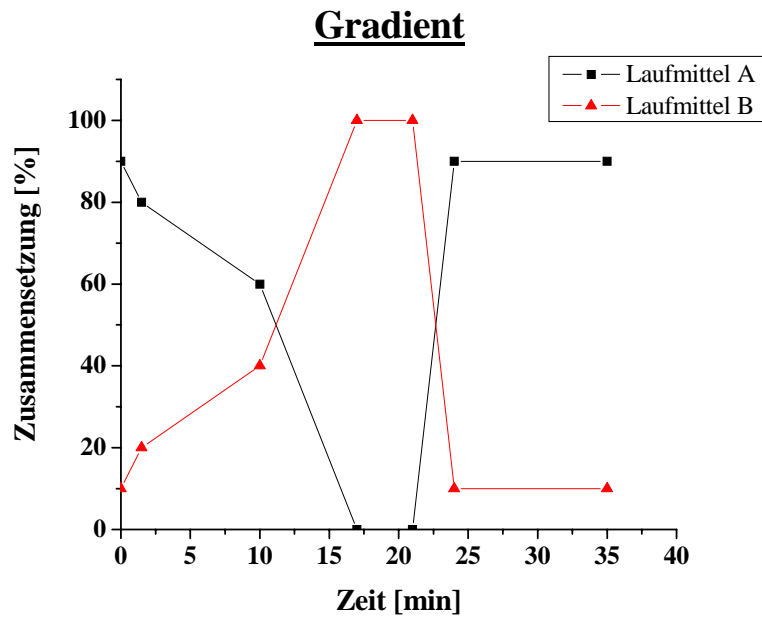


Abb. A1: Gradient der HPLC-DAD-MS²-Bestimmung

A.1.2.2 HPLC-UV

Für die Analyse der Proben aus den Sorptionsexperimenten (Kap. 5.2.1.1) wurde die HPLC-UV eingesetzt, da hier keine Matrix in den Proben mit Ausnahme des Oberbodens zu erwarten war, welche die Bestimmung von Tetracyclinen oder SFD mittels UV-Detektion beeinträchtigte. Für den Oberboden wurden die Proben zusätzlich mit der HPLC-DAD-MS² analysiert.

HPLC-UV-System

Degasser : Knauer WellChrom Degasser K-5004

Autosampler : Gynkotec GINA 50

HPLC-Säule : Synergi 4 μ Hydro-RP, 250 x 2,00 mm (Phenomenex)

HPLC-Pumpe : Gynkotec P580 Pump

Säulenofen : Gynkotec STH Column Oven

Detektor : Gynkotec UVD 340S DAD

Gradientenelution: Laufmittel A: 89,9% bidest. Wasser, 0,1% Ameisensäure,
10% Acetonitril (v/v/v)

Laufmittel B: 39,9% bidest. Wasser, 0,1% Ameisensäure,
60% Acetonitril (v/v/v)

Gradient: siehe Abb. A1

A.1.2.3 Spektrometer

UV/VIS:

Für die photometrischen Messungen in Kapitel 5.2.1.2 wurde ein Lambda 11 UV/Vis Spektrometer von Perkin-Elmer benutzt. Als Strahlungsquelle diente für den UV-Bereich von 200-326 nm eine Deuterium-Gasentladungslampe und für den Vis- und nahen Infrarot-Bereich von 326-900 nm eine Halogenlampe.

CTC und iso-CTC, sowie die entsprechenden Komplexe absorbieren ab ca. 225 nm bis 600 nm. Es wurde somit ein Messbereich von 200 – 700 nm gewählt ihren gesamten Absorptionsbereich abzudecken.

Fluoreszenz:

Zur qualitativen Fluoreszenzanalyse Tetracyclin-beladener Partikel (Kap. 5.2.4.1) wurde das Varioskan (Spectrofluorometer und Spectrophotometer) der Firma Thermo Electron verwendet. Als Probenbehälter dienten Mikrotiterplatten.

Einstellungen: Anregungswellenlänge (λ_{ex}): 314 nm; Emissionswellenlänge (λ_{em}): 580 nm; Excitation bandwidth: 5 nm; Step size: 1 nm; Measurement time: 100 ms; Automatische Mittelung von 10 Einzelspektren (Measurement time: 10ms / Spektrum)

Die quantitative Fluoreszenzanalyse von CTC- und iso-CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln (Kap. 5.2.4.2) erfolgte mittels eines Spektrometers der Firma Perkin Elmer (Luminescence spectrometer LS50B). Für CTC betrug die Anregungswellenlänge 410 nm und für iso-CTC 342 nm. Als Probenbehälter dienten Mikrotiterplatten.

A1.2.4 UV-Lampe

Zur Untersuchung der Fluoreszenz Tetracyclin-beladener Partikel wurde eine UV-Lampe der Firma Camag (REPROSTAR II) mit zwei wählbaren Wellenlängen ($\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$) benutzt.

A1.2.5 Probenhomogenisierung

Horizontalschüttler (IKA Labortechnik)

Vortex-Rüttler, IKA Vibrax VXR basic (IKA Labortechnik)

A1.2.6 Zentrifuge

Rotofix 32 (Hettich)

Bei diesem Zentrifugentyp entsprechen 4000 U/min einer RZB (relativen Zentrifugalbeschleunigung) von 2325 g.

A1.2.7 SPE-Extraktionseinheit

Zur Festphasenextraktion wurde eine Absaugeinheit (LiChrolut) der Firma Merck eingesetzt. Das für die SPE erforderliche Vakuum wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe erzeugt und durch einen Regler an der Absaugeinheit eingestellt. Die Durchflussgeschwindigkeit durch die SPE-Kartuschen erfolgte objektiv anhand der Tropfenanzahl pro Zeiteinheit und wurde anhand von zwischen Absaugeinheit und Kartusche liegenden Kunststoffhähnen reguliert.

A.1.2.8 Probentrocknung/-einengung

Bei der Probenaufarbeitung wurde ein Metallblockthermostat mit Vaporisationsvorrichtung (RSC/Reinhardshagen) zum Abblasen des Lösungsmittels (Methanol) im Druckluftstrom verwendet.

Zur Trocknung partikulärer Proben wurde eine Gefriertrocknungsanlage der Firma Christ (Alpha 1-4) eingesetzt.

A.1.2.9 pH-Meter

Zur Bestimmung und Einstellung von pH-Werten wurde ein Digital-Mikroprozessor-pH-Meter (pH-Meter 766, Calimatic) der Firma Knick verwendet.

Zu Beginn jeder pH-Bestimmung wurde das Gerät mittels gebrauchsfertiger Pufferlösungen (pH 2 und pH 7) kalibriert.

A.1.3 Lösungen und Reagenzien

A.1.3.1 Mobile Phasen

Laufmittel A: In einem 3000 mL-Becherglas wurden 1800 mL bidest. H₂O vorgelegt und 2 mL konz. Ameisensäure (reinst) sowie 200 mL Acetonitril (HPLC Grade) zugegeben. Die Lösung wurde durch Rühren (Magnetrührer) gut gemischt und im Anschluss filtriert (Phenomenex Filter Membranes: Nylon66 0,2µ, 47 mm).

Laufmittel B: In einem 3000 mL-Becherglas wurden 800 mL bidest. H₂O vorgelegt und 2 mL konz. Ameisensäure (reinst) sowie 1200 mL Acetonitril (HPLC Grade) zugegeben. Die Lösung wurde durch Rühren (Magnetrührer) gut gemischt und im Anschluss filtriert (Phenomenex Filter Membranes: Nylon66 0,2µ, 47 mm).

A.1.3.2 Herstellung des $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Extraktanten (pH 10) „Ammoniak-EDTA-Puffer“

54,0 g Ammoniumchlorid wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und in 200 mL bidest. Wasser gelöst. Danach wurden 37,224 g EDTA Dinatriumsalz und 350 mL konz. Ammoniaklösung (25% w/w) zugesetzt. Im Anschluss wurde mit bidest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der pH-Wert des Extraktionspuffers betrug 10,0.

A.1.3.3 Antibiotika-Stammlösungen

Die Stammlösungen aller eingesetzten Analyt-Substanzen (mit Ausnahme von e-iso-CTC) wurden als Einzellösungen hergestellt. Hierzu wurden 10,0 mg des Feststoffes (Pulver) in einen 10 mL-Messkolben eingewogen, welcher im Anschluss mit Methanol (p.a.) aufgefüllt und gut gemischt wurde. Die Stammlösungen ($\beta=1000$ mg/L) wurden danach bei -30°C gelagert.

A.1.3.4 Herstellung der e-iso-CTC/iso-CTC-Stammlösung

Da e-iso-CTC nicht erhältlich ist wurde eine e-iso-CTC/iso-CTC Mischstammlösung durch Epimerisierung einer iso-CTC-Stammlösung hergestellt. Dazu wurden in einen 10 mL-Messkolben 3 mL Methanol mittels einer Eppendorf-Pipette vorgelegt und 2 mL aus einer iso-CTC-Stammlösung ($\beta=1000$ mg/L) zugegeben. Des Weiteren wurden ca. 4,5 mL Laufmittel A zugegeben. Die Lösung wurde durch 10maliges Umdrehen des Messkolbens durchmischt und im Anschluss mit Laufmittel A auf 10 mL Gesamtvolumen aufgefüllt und die Lösung erneut durchmischt. Der Messkolben wurde im Anschluss für 60min mittels eines Wasserbades (60°C) erwärmt. Die iso-CTC-Konzentration dieser Lösung wurde mittels HPLC-UV bestimmt. Die Differenz zur Ausgangskonzentration (200 mg/L) entsprach der e-iso-Konzentration dieser Lösung. Die so erhaltene Stammlösung wurde bei -30°C gelagert.

A.1.3.5 Kalibrierlösungen

Die Kalibrierlösungen wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Laufmittel A hergestellt.

A.1.3.6 Mischstandardlösungen

Die Mischstandardlösung I (CTC, SFD, TMP) wurde bei der Ermittlung der Wiederfindungen in Kap. 5.1.2.2 eingesetzt und durch Verdünnung der Stammlösungen von CTC, SFD und TMP mit Methanol hergestellt. Die Mischstandardlösung II (CTC, SFD) wurde bei der Ermittlung der Wiederfindungen in Kap. 5.1.3.3 eingesetzt und durch Verdünnung der Stammlösungen von CTC und SFD mit bidest. H_2O hergestellt.

A.1.3.7 Antibiotikallösungen für die Sorptionsversuche

Die Antibiotikallösungen aller in den Sorptionsversuchen (Kap. 5.2.1.1) eingesetzten Analyt-Substanzen wurden als Einzellösungen hergestellt. Hierzu wurden 100 mg des Feststoffes (Pulver) in einen 1000 mL-Messkolben eingewogen, welcher im Anschluss mit bidest. H₂O aufgefüllt und gut gemischt wurde.

A.1.3.8 Herstellung des Ammoniak-Puffers

54,0 g Ammoniumchlorid wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und in 200 mL bidest. Wasser gelöst. Danach wurden 350 mL konz. Ammoniaklösung (25% w/w) zugesetzt und im Anschluss mit bidest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der pH-Wert des Ammoniakpuffers betrug 10,0.

A.1.3.9 Metallstandardlösungen (Me⁺-Standardlösungen)

Aus Metallsalzstammlösungen (β =1000 mg/L; Titrisol- Aluminium-Standard; Titrisol- Blei-Standard; Titrisol- Eisen(III)-Standard; Titrisol- Kupfer-Standard; Titrisol- Magnesium-Standard; Titrisol- Nickel-Standard; Titrisol- Zink-Standard; Calcium-Standard (aus Calciumchlorid-Dihydrat in bidest. H₂O) und Eisen(II)-Standard (aus Eisen-II-sulfat Heptahydrat in bidest. H₂O)) wurden durch Verdünnung mit bidest. Wasser Me⁺-Standardlösungen der Konzentration 0,01 mol/L hergestellt.

A.1.4 Proben

Die zu untersuchenden Proben wurden im Rahmen der zugrunde liegenden Forschungsprojekte durch die jeweils beteiligten Kooperationspartner entnommen.

A.1.4.1 Bodenproben des Feldversuchs

Die Güllebeaufschlagungen (Eintrag der Antibiotika in den Boden) und Probennahmen der in Kapitel 5.1.4 untersuchten Bodenproben wurden vom Fachbereich Agrarwirtschaft der Fachhochschule Südwestfalen (Abtl. Soest) durchgeführt und im entsprechenden Projektbericht [476] sowie in Grote et al. [96] beschrieben.

A.1.4.2 Nullprobe

Für alle Versuche (Wiederfindung, Matrixextraktion, Sorption) wurde die Bodenprobe vom 12.03.2002 („Winterweizen“, Probenahme vor der ersten Gölledüngung am 12.03., Bodenhorizont: 0-25 cm) als Nullprobe eingesetzt. In dieser Bodenprobe konnten keine Antibiotikarückstände (SFD, N4-SFD, e-iso-CTC, iso-CTC, e-CTC, CTC, anhydro-CTC, TMP) nachgewiesen werden.

A.1.4.3 Proben der Säulenversuche

Die Probennahme und die Probenaufarbeitung von Gülle- und Bodenproben sowie der Säuleneluat (Kap. 5.2.2) wurden vom Institut für Wasserforschung durchgeführt und im entsprechenden Projektbericht [477] publiziert.

A.1.5 Durchführungen

A.1.5.1 HPLC-DAD-MS²-Methodenentwicklung

Zur Methodenentwicklung der massenspektrometrischen Detektion wurden die Fragmentierungsmuster der Antibiotika (Analyte) durch Direktinjektion von Kalibrierlösungen der einzelnen Antibiotika ($\beta=20$ mg/L) in das Massenspektrometer durch Aufnahme von Vorläufer- und Produkt-Ionen-Scans ermittelt. Zur weiteren Methodenentwicklung wurden Misch-Kalibrierlösungen (ohne und mit extrahierter Bodenmatrix) mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen ($\beta=0,005$ bis 10 mg/L) eingesetzt anhand derer die jeweiligen Massen- und UV-Spektren aus dem chromatographischen Lauf aufgenommen sowie die Retentionszeiten ermittelt wurden.

A.1.5.2 Probenaufarbeitung für Bodenproben

Die Probenaufarbeitung für Bodenproben beinhaltete eine fest/flüssig Extraktion mittels $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Puffer (pH 10) und eine anschließende Festphasenextraktion des Bodenextraktes.

A.1.5.2.1 Extraktionsmethode

Einwaagen von 5,00 g des feuchten Bodens wurden in einem 50 mL Zentrifugenglas eingewogen, mit 10 mL $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Extraktant (pH 10) versetzt und 30 min. auf einem Horizontalschüttler (275 U/min) äquilibriert und dann bei 4000 U/min für 10 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein weiteres 50 mL Zentrifugenglas überführt. Die Bodenprobe wurden erneut mit 10 mL $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Extraktant versetzt, mit einem Glasstab aufgeschlämmt und wieder für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur ersten Charge gegeben. Die vereinigte Extraktionslösung wurde mit Salzsäure (25% (w/w)) auf pH 4,0 eingestellt und ein weiteres Mal bei 4000 U/min 10 min lang zentrifugiert. Dieser Extrakt wurde zur SPE eingesetzt.

A.1.5.2.2 Festphasenextraktion (SPE)

Zur Anreicherung und Aufreinigung der Bodenextrakte wurden in der SPE-Extraktionseinheit Festphasenkartuschen (Waters Oasis® HLB 6cc (200 mg)) nach dem in Abbildung A2 dargestellten Schema eingesetzt. Das Einengen der Extrakte erfolgte mittels eines Metallblockthermostates (Sauerbrey Chromatographie (RSC)) bei 30°C im Druckluftstrom.

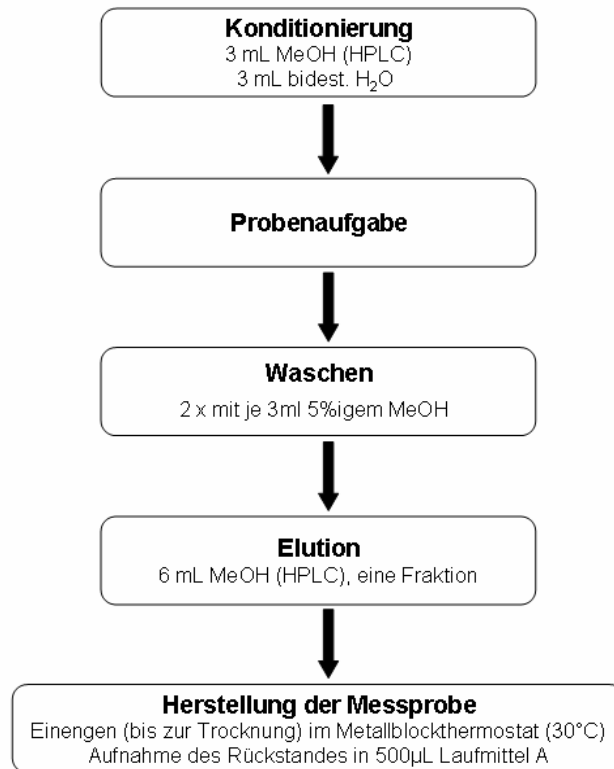


Abb. A2: SPE-Schema zur Bestimmung von CTC und SFD in Bodenproben

Die erhaltenen Messproben wurden bis zur Analyse mittels HPLC-DAD-MS² bei -30°C tiefgefroren. Der Umrechnungsfaktor von den in den Messproben ermittelten Antibiotika-Konzentrationen (µg/L) zum Gehalt in den Bodenproben (µg/kg) beträgt 0,1.

A.1.5.2.3 Wiederholbarkeit der Probenaufarbeitung

Um die Leistungsfähigkeit der entwickelten Probenvorbereitung zu ermitteln wurde eine Wiederfindungsstudie (für SFD, TMP, CTC) durchgeführt, welche gleichzeitig dazu dienen sollte, den Arbeitsschritt der zur Probenaufreinigung und –aufkonzentration eingesetzten SPE-Methode mittels dotiertem Extraktionsmittel zu überprüfen. Hierzu wurden 6mal je 5,00 g Boden (Nullprobe) in ein Zentrifugenglas eingewogen, mit 500 µL Mischstandardlösung I (CTC, SFD und TMP; β =10 mg/L; Lösungsmittel: Methanol) dotiert und suspensiert sowie 10mal je 10 mL NH₃/NH₄Cl/EDTA -EDTA-Extraktant. Nach 30 min. Einwirkzeit wurden die Proben nach der oben beschriebenen Probenaufarbeitung aufgearbeitet und mittels HPLC-

DAD-MS² analysiert. CTC wurde dabei als Summe der e-iso-CTC- und iso-CTC-Konzentration bestimmt.

A.1.5.3 Methodenvalidierung

A.1.5.3.1 Externe Kalibrierung

Zur Validierung der HPLC-MS/MS-Methode wurden Kalibrierlösungen aus SFD, e-iso-CTC und iso-CTC der Konzentrationen 50 µg/L; 100 µg/L; 200 µg/L; 500 µg/L; 750 µg/L; 1000 µg/L; 2000 µg/L; 5000 µg/L; 7500 µg/L und 10000 µg/L hergestellt und 10fach analysiert. Aufgrund der Epimerisierung e-iso-CTC/iso-CTC betrug die tatsächliche Konzentration von e-iso-CTC in den Kalibrierlösungen 50,055 µg/L; 100,11 µg/L; 200,22 µg/L; 500,55 µg/L; 750,825 µg/L; 1001,1 µg/L; 2002,2 µg/L; 5005,5 µg/L; 7508,25 µg/L; 10011 µg/L und die Konzentrationen von iso-CTC 78,05 µg/L; 156,1 µg/L; 312,2 µg/L; 780,5 µg/L; 1170,75 µg/L; 1561 µg/L; 3122 µg/L; 7805 µg/L; 11707,5 µg/L; 15610 µg/L.

A.1.5.3.2 Signalsuppression durch Matrixbestandteile

Zur Untersuchung von Suppressionseffekten durch koeluierte Matrixbestandteile auf die massenspektrometrische Detektion wurde aus 5,00 g unbelasteten Boden (Nullboden) nach der Probenaufarbeitungsvorschrift (Anhang A.1.5.2.1) je eine Matrixprobe (koeluierte Bodenmatrix) gewonnen. Anstelle mit 500 µL Laufmittel A wurden die extrahierten und nach der SPE bis zur Trockene eingeeengten Matrixbestandteile aber mit 500 µL Kalibrierlösungen aus SFD, e-iso-CTC und iso-CTC aufgenommen. Jeweils drei Matrixproben wurden mit Kalibrierlösungen (SFD, e-iso-CTC und iso-CTC) der Konzentrationen 100 µg/L; 200 µg/L; 500 µg/L; 750 µg/L; 1000 µg/L; 2000 µg/L und 5000 µg/L (exakte e-iso-CTC und iso-CTC Konzentration siehe Kap. 8.5.3.1) aufgenommen. Als Vergleichsproben dienten die jeweiligen Kalibrierungslösungen der jeweiligen Konzentrationen. Jede Probe (mit und ohne Matrix) wurde zweimal mittels HPLC-MS/MS analysiert und der Mittelwert der erhaltenen Messsignale (Peakflächen) pro Analyt und Konzentration gebildet.

A.1.5.3.3 Wiederfindung

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Wiederfindung wurden 12mal je 5,00 g Boden (Nullprobe) in ein Zentrifugenglas eingewogen. Je 4 Proben wurden 500 µL Mischstandardlösung II (CTC, SFD; Lösungsmittel: bidest. H₂O) der Konzentrationen 0,25 mg/L; 1 mg/L und 10 mg/L zugegeben und suspensiert (geschüttelt). Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurden die Proben nach der Probenaufarbeitungsvorschrift aufgearbeitet und mittels HPLC-DAD-MS² (3-fach Injektion) analysiert. CTC wurde dabei als Summe von e-iso-CTC und iso-CTC bestimmt. Bei dieser Vorgehensweise entsprechen die Konzentrationen in

den Messproben bei 100%iger Wiederfindung (und ohne Berücksichtigung von Suppressionseffekten) den Konzentrationen der zugegebenen Mischstandardlösung.

A.1.5.4 Rückstandsuntersuchung von Bodenproben

Zur Untersuchung der Bodenproben (Kapitel 5.1.4) wurden aus jeder Bodenmischprobe zwei Stichproben (Doppelbestimmung) von je 5,00 g feuchten Boden entnommen und separat nach der Aufarbeitungsvorschrift aufgearbeitet. Pro aufgearbeitete Bodenprobe (Messprobe) wurde der Gehalt von SFD, iso-CTC und e-iso-CTC mittels HPLC-MS/MS (3-fach Injektion jeder Messprobe) bestimmt. Anhand vorliegender Daten der nach DIN ISO 11465 bestimmten Trockenrückstände bzw. Wassergehalte (siehe Anhang A.3.1) wurden die Gehalte im Boden auf die Trockenmasse (TM), als aussagekräftigere (konstantere) Bezugsgröße, umgerechnet. Die Messproben wurden zudem auf Rückstände von N4-SFD, TMP und anhydro-CTC sowie durch die Probenaufarbeitung möglicherweise nicht-isomerisiertes e-CTC und CTC untersucht. Zusätzlich wurden bei jeder Doppelbestimmung zwei Blindproben (leere Zentrifugengläser) aufgearbeitet, um mögliche Kontaminationen bei der Probenaufarbeitung ausschließen zu können.

A.1.5.5 Sorptionsversuche

Als Modellpartikel (Adsorbentien) wurden eingesetzt:

- *Kieselgel 60* 0,063-0,200 mm (Merck), säuregewaschen nach Orth
- *Aluminiumoxid 90* basisch (Aktivitätsstufe I), 0,063-0,200 mm (Merck)
- *Aluminiumoxid 90* sauer (Aktivitätsstufe I), 0,063-0,200 mm (Merck)
- *Quarz* feinkörnig, gewaschen und gegläht (Merck)
- *Oberboden Hamm (Tiefe 10-37 cm)* Kennwerte siehe Tab. A17 Anhang A.3.2
- *Rheinsand* 0-2mm
- *Bentonit* mit 75% *Montmorillonit* (Süd-Chemie)
- *Ton 1550* mit ca. 30% Kaolinit (Georg&Schneider GmbH, Siershan)
- *Trisopor micro (poröses Glas)* Korngrößenverteilung (d_{10} :2,88 μm , d_{50} :5,92 μm , d_{97} :11,82 μm), Porengröße: 100 nm, Porenvolumen: 841,39 mm^3/g , spezifische Oberfläche: 40,12 m^2/g (VitraBio GmbH)
- *Trisoperl (poröses Glas)* Partikeldurchmesser: 80 μm , Porengröße: 100,6 nm, Porenvolumen: 1053,09 mm^3/g , spezifische Oberfläche: 42,04 m^2/g (VitraBio GmbH)

Folgende Antibiotika (Wirkstoffe und Umwandlungsprodukte) wurden eingesetzt:

Tetracycline: Chlortetracyclin (CTC), Iso-Chlortetracyclin (iso-CTC), 4-Epi-Chlortetracyclin (e-CTC), Anhydro-Chlortetracyclin (anhydro-CTC), Tetracyclin (TC), Oxytetracyclin (OTC), Doxycyclin (DoxyC), Demeclocyclin (DemecloC)

Sulfonamid: Sulfadiazin (SFD)

Die Adsorbierbarkeit der Verbindungen CTC, iso-CTC und SFD wurde mit allen Modellpartikeln getestet, die anderen Tetracycline zu Vergleichszwecken nur mit Kieselgel.

A.1.5.5.1 Sorptionsbedingungen

Jeweils 1 g Sorbens wurden in 100 mL einer Antibiotikallösung (β =100 mg/L; Lösungsmittel: bidest. Wasser) unter Rühren (\sim 400 U/min) bei Raumtemperatur suspensiert. Nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min wurden 500 μ L Aliquot entnommen und in ein 1,5 mL Eppendorff-Hütchen überführt. Die Feststoffe wurden durch einen Membranfilter (Phenomenex Filter Membranes: Nylon66 0,2 μ ; 47 mm) filtriert. Beim Bentonit und Ton1550 war eine vorhergehende Zentrifugation (10 min bei 4000 U/min = 2325 g) erforderlich, da sie die Durchflussrate des Filters stark einschränkten. Von dem Filtrat wurde ebenfalls eine 500 μ L-Probe entnommen und der pH-Wert bestimmt. Der Filtrerrückstand wurde mit 10 mL bidest. Wasser gewaschen, das Waschwasser separat aufgefangen und eine 500 μ L Probe entnommen. Die sorbierten CTC-Mengen wurden indirekt durch Analyse der wässrigen Phasen mit HPLC-UV bestimmt.

Die restfeuchten Antibiotika-beladenen Partikel wurden in ein braunes 10 mL Rollrandgläschen überführt, mit einer Filtermembran versehen und verschlossen. Die Lyophilisation der Partikel erfolgte in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ Alpha 1-4) über einen Zeitraum von 8 Stunden (0,220 mbar). Die Antibiotika-beladenen Partikel wurden bis zur qualitativen Fluoreszenzanalyse (Kap. 5.2.4.1) bei -30°C gelagert.

A.1.5.5.2 Herstellung von CTC- und iso-CTC-beladenen Aluminiumoxidpartikeln

Zur Vorbereitung einer quantitativen fluoreszenzspektrometrischen Bestimmung von partikelgebundenem CTC bzw. iso-CTC wurden 5,00 g Aluminiumoxidpartikel (sauer) bei pH 7 mit verschiedenen Mengen an CTC bzw. iso-CTC (500 mL Antibiotikallösung (CTC bzw. iso-CTC): β = 1 μ g/L; 10 μ g/L; 100 μ g/L; 1000 μ g/L; 5000 μ g/L; 10000 μ g/L; 20000 μ g/L; Lösungsmittel: bidest. Wasser) nach der allgemeinen Sorptionsvorschrift (Anhang A.1.5.5.1) belegt und lyophilisiert. Die sorbierten CTC-Mengen wurden indirekt durch Analyse der wässrigen Phasen mit HPLC-DAD-MS² bestimmt.

Die Beladungen mit CTC bzw. iso-CTC betrugen etwa 0,1, 1, 10, 100, 500, 1000 und 2000 μ g/g (99-100% der CTC's wurden sorbiert). Die Partikelproben wurden bis zur quantitativen Fluoreszenzanalyse (Kap. 5.2.4.2) bei -30°C gelagert.

A.1.5.6 Photometrische Untersuchung von Metall-CTC bzw. –iso-CTC-Komplexen

Zur photometrischen Untersuchung von Metall-CTC bzw. –iso-CTC-Komplexen wurden je eine CTC und iso-CTC-Lösung der Konzentration $1,25 \times 10^{-4}$ mol/L durch Lösen der Feststoffe in bidest. Wasser hergestellt. Dazu wurde 64,4 mg ($1,25 \times 10^{-4}$ mol) des jeweiligen Hydrochlorids eingewogen und in je einen 1000 mL Messkolben gegeben. Nach Auffüllen des Messkolbens mit bidest. Wasser auf 1000 mL wurde die Lösung gut durchmischt. Die Messlösungen (CTC bzw. iso-CTC; $\beta = 0,1$ mmol/L) mit definierten CTC-Metallverhältnissen wurden aus den CTC-Lösungen, den jeweiligen Me^+ -Standardlösungen ($\beta = 0,01$ mol/L) und bidest. Wasser mit den in Tab. A1 dargestellten Volumenanteilen der Lösungen hergestellt. Die benötigten Blindlösungen wurden ohne Zugabe von CTC-Lösungen hergestellt.

Tab. A1 Volumenanteile zur Herstellung von Mess- und Blindlösungen

Molares Verhältnis CTC/iso-CTC- Me^+ (CTC/iso-CTC; $\beta = 0,1$ mmol/L)	Blindlösung		Messlösung		
	H ₂ O [ml]	Metall- Standardlösung [μ l] ($\beta = 0,01$ mol/L)	CTC/iso-CTC [ml] ($\beta = 0,125$ mmol/L)	H ₂ O [ml]	Metall- Standardlösung [μ l] ($\beta = 0,01$ mol/L)
CTC/iso-CTC ($\beta = 0,1$ mmol/L)	20,0		16,0	4,0	
1:3	19,4	600	16,0	3,4	600
1:2	19,6	400	16,0	3,6	400
1:1	19,8	200	16,0	3,8	200
2:1	19,9	100	16,0	3,9	100
3:1	29,9	100	24,0	5,9	100

Die pH-Wert Einstellung auf 3, 5,5 und 8,7 erfolgte im Vorfeld der Messung mit Salzsäure oder Ammoniak-Puffer und wurde mittels einer pH-Elektrode vorgenommen. Der pH-Wert wurde sowohl für die Blind- als auch für die Messlösung eingestellt.

Die Mess- und Blindlösungen wurden dunkel gelagert (Probengefäße (50 mL Messkolben) in Aluminiumfolie eingewickelt). Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde täglich ein Aliquot aus den Lösungen entnommen, in eine UV-Küvette gefüllt und photometrisch vermessen.

Um den Einfluss von Tageslicht auf die Alterung von CTC- und iso-CTC-Lösungen ($\beta = 0,1$ mmol/L; ohne Me^+ -Standardzugabe) zu untersuchen, wurde diese Lösungen zweifach hergestellt und einmal dunkel und einmal bei Tageslicht (ohne Aluminiumfolie) gelagert.

Die Mess- und Blindlösungen wurden grundsätzlich jeweils vor der Aliquotentnahme und der Photometrie geschüttelt, um auch im Fall einer Niederschlagsbildung (Hydroxidfällung) homogenisiert zu sein.

Proben, die als zentrifugiert gekennzeichnet wurden, sind vor ihrer Messung zusammen mit ihrer Blindlösung für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert worden. Als Mess- und Blindlösung diente bei diesen Proben die überstehende Lösung (Zentrifugat).

Die Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums mittels der Software UV-WinLab (Perkin – Elmer Corporation / USA, Version: Nov. 1996) erforderte zwei Schritte.

Zunächst wurde eine Küvette mit einer Vergleichslösung „Blindlösung“ – in diesem Fall bidest. Wasser und die entsprechende Metallsalzlösung in definierter Konzentration (gleiche Metallkonzentration und pH-Wert wie die CTC enthaltene Probelösung) spektroskopisch analysiert. Die Intensität des monochromatischen Lichts wurde in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Absorptionsmodus gemessen und vom Messcomputer gespeichert.

Anschließend wurde eine Messung bei gleichen Geräteeinstellungen mit der Probelösung („Messlösung“) durchgeführt. Dabei erfolgte durch die Gerätesoftware automatisch die Differenzbildung mit dem Spektrum der Blindlösung. Dieser Prozess lieferte die Information über die Lichtabsorption der Probelösung und damit das Absorptionsspektrum des Analyten bzw. seiner Metallkomplexe.

A.1.5.7 Rückstandsuntersuchung aufgearbeiteter Boden-, Gülle- und Sickerwasserproben der Säulenversuche

In den vom Institut für Wasserforschung nach der Ammoniak-EDTA-Methode aufgearbeiteten Boden-, Gülle- und Sickerwasserproben (Aufarbeitungen siehe [477]) wurden die Gehalte von e-iso-CTC, iso-CTC und SFD jeweils 3mal mittels HPLC-DAD-MS² bestimmt. Die Messproben wurden zudem auf Rückstände von N4-SFD, e-CTC und CTC untersucht.

A.1.5.8 Versuchsdurchführung zur Extrahierbarkeit von Eisenhydroxid-gebundenem CTC

Herstellung der 100 mL gepufferten Fe³⁺-Lösung (β =50 mg/L)

5 mL der Eisen(III)-Stammlösung (β =1000 mg/L) wurde in einen 200 mL-Messzylinder vorgelegt und 80 mL bidest. Wasser sowie 2 mL Ammoniakpuffer hinzugefügt. Der pH-Wert wurde anschließend mit Salzsäure auf pH=7 eingestellt. Im Anschluss wurde auf 100 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt.

Herstellung der CTC-Lösung (β =10 mg/L)

Die CTC-Lösung wurde durch Verdünnung einer CTC-Stammlösung (β =1000 mg/L; in Methanol) mit bidest. Wasser hergestellt.

„Gesamtkonzentration“

100 mL gepufferte Fe^{3+} -Lösung ($\beta=50$ mg/L) wurden mit 1000 μL CTC-Lösung ($\beta=10$ mg/L) versetzt. Die Lösung wurde anschließend 15 Minuten bei 275 U/min (Horizontalschüttler) geschüttelt. Danach wurde 20 mL Ammoniak-EDTA-Puffer zugegeben und wiederum 15 Minuten geschüttelt. Im Anschluss wurde 30 min. stehen gelassen damit sich ausgefallenes Eisenhydroxid absetzen konnte und die Probe bei 4000 U/min (≈ 2325 g) für 10 min. zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde dekantiert und mit 25%iger HCl auf pH=4 gebracht. Der Rückstand wurde mit etwas Ammoniak-Puffer versetzt und ebenfalls mit HCl auf pH=4 gebracht, dabei sollte sich der Rückstand wieder vollständig lösen. Beide Proben wurden getrennt mittels SPE (Anhang A.1.5.2.2) aufgearbeitet.

„gelöste Konzentration“

100 mL gepufferte Fe^{3+} -Lösung ($\beta=50$ mg/L) wurde mit 1000 μL CTC-Lösung ($\beta=10$ mg/L) versetzt. Die Lösung wurde anschließend 15 min. bei 275 U/min (Horizontalschüttler) geschüttelt und zentrifugiert. Danach wurde 20 mL Ammoniak-EDTA-Puffer zum Zentrifugat zugegeben und wiederum 15 min. geschüttelt. Im Anschluss wurde 30 min. stehen gelassen damit sich ausgefallenes Eisenhydroxid absetzen konnte. Die Probe wurde mit 25%iger HCl auf pH=4 gebracht, dabei sollte sich der Rückstand wieder vollständig lösen. Die Probe wurde anschließend mittels SPE (Anhang A.1.5.2.2) aufgearbeitet.

Tabelle A.2 zeigt den Versuchsablauf nochmals in komprimierter Form.

Tab. A.2: Kurzübersicht der Vorgehensweise zur Sorption von CTC an Eisenhydroxid

Ablaufreihenfolge	Probe B „Gesamtkonzentration“	Probe A „gelöste Konzentration“
Fe^{3+} -Lösung ($\beta=1000$ mg/L)	5 mL	5 mL
Ammoniakpuffer	2 mL	2 mL
HCl (25%)	auf pH=7, auf 100 mL mit bidest. Wasser	auf pH=7, auf 100 mL mit bidest. Wasser
CTC-Lösung ($\beta=10$ mg/L)	1000 μL	1000 μL
Zentrifugation/Trennung	nein	ja
Ammoniak-EDTA-Puffer	20 mL	20 mL
Zentrifugation/Trennung	ja	nein
HCl (25%)	auf pH=4	auf pH=4
SPE	ja	ja

Die zu erwartende Gesamtkonzentration für CTC als Summe von iso-CTC und e-iso-CTC betrug 100 $\mu\text{g/L}$ vor der SPE. Nach der SPE waren bis zu 10 mg/L (Wiederfindung = 100%) zu erwarten. Die Analyse der Proben erfolgte mittels HPLC-DAD-MS² (Anhang A.1.2.1). Für Probe C entsprach die Vorgehensweise der von Probe A und für Probe D der von Probe B mit dem Unterschied, dass in beiden Fällen erst die CTC-Lösung zugegeben wurde und danach die Einstellung auf pH 7 erfolgte.

A.1.5.9 Fluoreszenzuntersuchungen an partikelgebundenem CTC und iso-CTC

A.1.5.9.1 Qualitative Fluoreszenzuntersuchung

Ein Mikrolöffel der unbeladenen Modell-Partikel, beladenen Partikel (lyophilisiert) und „freien“ Tetracycline (Feststoffe) wurden in eine Mikrotiterplatte (Thermo Microtiter 96-well plate) gegeben. Die Fluoreszenz wurde im Reflexionsmodus (spitzer Winkel) gemessen (Varioskan, Spektrofluorometer und Spectrophotometer (Thermo Electron), siehe Anhang A.1.2.3). Die Aluminiumoxidpartikel wurden zusätzlich mit einer UV-Lampe bei Anregungswellenlängen von 254 nm und 366 nm qualitativ auf ihre Fluoreszenz untersucht.

A.1.5.9.2 Quantitative Fluoreszenzuntersuchung

Die Analyse der beladenen Aluminiumoxidpartikel erfolgte mittels des „Luminescence spectrometer Perkin-Elmer LS50B“ in Mikrotiterplatten. Hierzu wurden die Partikel in die Probenbehälter der Mikrotiterplatte gefüllt und die optimale Anregungswellenlänge ermittelt. Für CTC betrug diese 410 nm und für iso-CTC 342 nm. Für die quantitative Analyse war darauf zu achten, dass die Einfüllhöhe für alle Proben gleich war. Dies wurde dadurch erreicht, dass die Probenbehälter der Mikrotiterplatte jeweils bis zum Rand mit den Partikeln aufgefüllt und anschließend die Oberflächen der Füllung glatt gestrichen wurden. Jede Probe wurde dreimal vermessen.

A.2 Validierung

A.2.1 Ausreißertest nach Grubbs

Durch den Grubbs-Test können Ausreißer, die auf systematische Fehler zurückzuführen sind, identifiziert werden [7,511,526]. Man berechnet hierzu den Mittelwert \bar{x} und den Schätzwert der Standardabweichung s .

$$\text{Gleichung 1: } \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\text{Gleichung 2: } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Ein ausreißerverdächtiger Wert x_{ar} , also der Messwert mit der größten Differenz zum Mittelwert, wird durch die Berechnung des Prüfwertes PW getestet.

$$\text{Gleichung 3: } PW = \frac{|x_{ar} - \bar{x}|}{s}$$

Der Prüfwert PW wird mit tabellierten Werten r_M für den Grubbs-Test verglichen [7,511,526].
Das Testergebnis ist wie folgt zu bewerten:

$PW \leq r_M$ (f, P = 90 %): kein Ausreißer; Mittelung erlaubt

r_M (f, P = 90 %) < $PW \leq r_M$ (f, P = 95 %): wahrscheinlich Ausreißer; Mittelung noch möglich

$PW > r_M$ (f, P = 95 %): Ausreißer; keine Mittelung erlaubt

Sofern der Test einen Ausreißer entdeckt, werden die Daten dieses Messwertes entfernt und ein neuer Grubbs-Test mit n-1 Daten durchgeführt. Dies geschieht solange, bis mit Hilfe des Tests keine Ausreißer mehr entdeckt werden.

A.2.2 Kalibrierdaten

Zur Validierung der HPLC-MS/MS-Methode wurden 10 Kalibrierlösungen im Konzentrationsbereich von 50 µg/L – 10 mg/L für SFD, 55,055 µg/L -10,011 mg/L für e-iso-CTC und 78,05 µg/L – 15,61 mg/L für iso-CTC hergestellt. Aus diesen Lösungen wurde 10mal pro Konzentration und Analyt die Fläche des MS-Signals im TIC der einzelnen Fragmentationen mittels HPLC-MS/MS bestimmt. (Die ungeraden Konzentrationen der Kalibrierlösungen für e-iso-CTC und iso-CTC sind bedingt durch Konzentrationen der Epimere in der e-iso-CTC/iso-CTC Stammlösung (β (e-iso-CTC)=100,11 mg/L; β (iso-CTC)=156,10 mg/L) aus denen die Kalibrierlösungen hergestellt wurden.)

Die Mittelwerte \bar{y} der jeweiligen Peakflächen der einzelnen Kalibrierpunkte (Konzentration) wurden nach Gleichung 4 berechnet. Jeder Kalibrierpunkt wird dabei 10-fach bestimmt (n=10).

Gleichung 4:
$$\bar{y} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n y_i$$

Die Standardabweichung s und die relative Standardabweichung s_{rel} für den jeweiligen Kalibrierpunkt wurden durch die Gleichungen 5 und 6 ermittelt.

Gleichung 5:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

Gleichung 6:
$$s_{rel} = \frac{s}{\bar{y}} \cdot 100\%$$

Die relativen Standardabweichungen für die einzelnen Messpunkte sind für die einzelnen Analyte in Tabelle A3-A5 aufgeführt.

Tab. A3: Kalibrierdaten und relative Standardabweichungen s_{rel} für SFD

Konzentration von SFD [µg/L]	Mittelwert der Peakfläche \bar{y} (n=10)	s_{rel} [%]
50	222968	17,5
100	543715	14,2
200	1142795	9,3
500	2380479	6,3
750	3632598	5,2
1000	4705592	1,7
2000	8745652	1,4
5000	17810819	1,8
7500	26567909	0,7
10000	34521104	0,9

Tab. A4: Kalibrierdaten und relative Standardabweichungen s_{rel} für e-iso-CTC

Konzentration von e-iso-CTC [µg/L]	Mittelwert der Peakfläche \bar{y} (n=10)	s_{rel} [%]
50,055	512119	14,8
100,11	1235960	10,4
200,22	2766782	10,8
500,55	5960387	3,8
750,825	8840043	3,2
1001,1	11866293	3,4
2002,2	26354558	3,3
5005,5	66758161	2,4
7508,25	97715846	2,1
10011	128818025	1,2

Tab. A5: Kalibrierdaten und relative Standardabweichungen s_{rel} für iso-CTC

Konzentration von iso-CTC [µg/L]	Mittelwert der Peakfläche \bar{y} (n=10)	s_{rel} [%]
78,05	1429455	13,9
156,1	2862747	2,9
312,2	5808802	4,6
780,5	13239156	1,6
1170,75	19779745	4,1
1561	28098668	3,7
3122	62735307	2,1
7805	157800669	3,5
11707,5	242039353	2,0
15610	302460732	2,8

A.2.3 Kalibrierung und Regressionsanalyse

Für die Erstellung und Beurteilung einer Kalibration sind im Vorfeld einige Berechnungen nötig, deren Grundlagen [511,520,526] kurz dargestellt werden sollen. In der Regel wird diese Berechnung mittels geeigneter Auswerte- bzw. Statistiksoftware durchgeführt.

Ermittlung der Kalibrierfunktion ersten Grades

Für eine Funktion 1. Grades gilt:

Gleichung 7: $\bar{y} = a + b \cdot \bar{x}$

mit: Mittelwert der Konzentrationen $\bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i$

Mittelwert der Peakflächen (Detektorsignal) $\bar{y} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N y_i$

Die Steigung b der Kalibriergeraden ist ein Maß für die Empfindlichkeit:

$$\text{Gleichung 8: } b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Der Ordinatenabschnitt a stellt den errechneten Blindwert dar:

$$\text{Gleichung 9: } a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Die Präzision der linearen Regression wird durch die Reststandardabweichung s_{y_1} ausgedrückt. Darunter versteht man das Maß für die Streuung der Messwerte y_i in y -Richtung um die Regressionsgerade.

Die Reststandardabweichung für die lineare Regression wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 10: } s_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

mit $\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$ (ermittelte Peakfläche aus der Regressionsfunktion)

y_i = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

Ermittlung der Kalibrierfunktion zweiten Grades

Für eine Funktion 2. Grades gilt:

$$\text{Gleichung 11: } \bar{y} = a + b \cdot \bar{x} + c \cdot \bar{x}^2$$

Für die Berechnung der Funktionskoeffizienten a , b und c der quadratischen Bezugsfunktion werden zunächst einige Quadratsummen eingeführt:

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i\right)^2}{N}; \quad Q_{xy} = \sum_{i=1}^N (x_i \cdot y_i) - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i\right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N y_i\right)}{N}$$

$$Q_{x^3} = \sum_{i=1}^N x_i^3 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i\right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N x_i^2\right)}{N}; \quad Q_{x^4} = \sum_{i=1}^N x_i^4 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i^2\right)^2}{N}$$

$$Q_{x^2y} = \sum_{i=1}^N (x_i^2 \cdot y_i) - \frac{\left(\sum_{i=1}^N y_i\right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N x_i^2\right)}{N}$$

Unter Verwendung dieser Quadratsummen, die lediglich der Vereinfachung der Formeln für die Funktionskoeffizienten a , b und c dienen, lassen sich die jeweiligen Funktionskoeffizienten nun wie folgt berechnen [511]:

$$\text{Gleichung 12: } a = \frac{\left(\sum_{i=1}^N y_i - b \sum_{i=1}^N x_i - c \sum_{i=1}^N x_i^2 \right)}{N}$$

$$\text{Gleichung 13: } b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

$$\text{Gleichung 14: } c = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{Q_{x^3}^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}}$$

Für die Berechnung der Reststandardabweichung s_{y_2} für die quadratische Regression gilt:

$$\text{Gleichung 15: } s_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}}$$

mit $\hat{y}_i = a + b \cdot x_i + c \cdot x_i^2$ (ermittelte Peakfläche aus der Regressionsfunktion)

y_i = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

Tabelle A6 und A7 zeigen die aus den Kalibrierdaten ermittelten Regressionsfunktionen für die verschiedenen Kalibrationsbereiche (Arbeitsbereiche).

Tab. A6: Lineares Kalibrationsmodell

Lineare Kalibration $\bar{y} = a + b \cdot \bar{x}$						
Analyt	Konzentrations-Bereich [µg/L]	a	b	s_{y_1}	R	R^2
SFD	50-10000	772907	3415	592892	0,9989	0,9978
SFD	100-1000	142868	4585	73730	0,9993	0,9986
e-iso-CTC	50,055-10011	-176309	12996	927777	0,9998	0,9996
e-iso-CTC	100,11-1001,1	224387	11575	167486	0,9994	0,9988
e-iso-CTC	1001,1-10011	175032	12952	1400178	0,9997	0,9994
iso-CTC	78,05-15610	-749408	19945	4723354	0,9992	0,9984
iso-CTC	78,05-1170,75	306225	16651	208044	0,9997	0,9994
iso-CTC	1170,75-11707,5	-4368538	20984	1406152	0,9999	0,9998

Tab. A7: Quadratisches Kalibrationsmodell (Nur für Mandel-Test in A.2.5.2 von Bedeutung)

Quadratische Kalibration $\bar{y} = a + b \cdot \bar{x} + c \cdot \bar{x}^2$						
Analyt	Konzentrations-Bereich [µg/L]	a	b	c	s_{y_2}	R^2
SFD	50-10000	512750	3796	-0,0413	501316	0,9987
SFD	100-1000	121470	4715	-0,1206	88946	0,9987
e-iso-CTC	50,055-10011	-647271	13685	-0,0745	700559	0,9998
e-iso-CTC	100,11-1001,1	254606	11391	0,1699	203944	0,9989
e-iso-CTC	1001,1-10011	-2047108	14301	-0,1250	568197	0,9999
iso-CTC	78,05-15610	-2983549	22041	-0,1454	3795261	0,9991
iso-CTC	78,05-1170,75	175572	17478	-0,6694	226796	0,9996
iso-CTC	1170,75-11707,5	-3699898	20594	0,0310	1647136	0,9999

A.2.4 Korrelationskoeffizient

Um die Güte der Anpassung durch die Regressionsgerade zu beurteilen werden häufig der Korrelationskoeffizient R oder das Bestimmtheitsmaß R^2 herangezogen, da diese Indexzahlen als wichtige Kriterien für Linearität eine hohe Akzeptanz besitzen [526]. Der Korrelationskoeffizient vergleicht die Streuung der Punkte von der Regressionsgeraden mit der Gesamtstreuung des Verfahrens. Der Korrelationskoeffizient ist eine Indexzahl, die angibt, ob und wie ein Variablenpaar (x,y) miteinander verknüpft ist (korreliert). Die Werte des Korrelationskoeffizienten liegen zwischen -1 und $+1$ (negatives Vorzeichen für fallende Gerade, positives Vorzeichen für aufsteigende Gerade). Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgt gemäß:

$$\text{Gleichung 16: } R = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

Ist der Korrelationskoeffizient in der Nähe von Null, ist ein funktionaler Zusammenhang zwischen x und y nicht erkennbar. Nimmt der Korrelationskoeffizient Werte in der Nähe von Eins ein, ist ein linearer Zusammenhang zwischen den Konzentrationswerten x und den Messwerten y wahrscheinlich. Ein hoher Absolutbetrag für den Korrelationskoeffizienten ist ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Maß für die Linearität.

Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten nennt man Bestimmtheitsmaß R^2 . Der Vorteil des Bestimmtheitsmaßes als Indexzahl ist, dass durch eine Quadrierung von R Unterschiede stärker sichtbar werden, da der Indexwert „schärfer“ wird (z. B. ergibt sich für $R=0,99$ ein Wert von $R^2=0,9801$).

Der Korrelationskoeffizient bzw. das Bestimmtheitsmaß sind jedoch nur bedingt tauglich, um die Güte einer Anpassung zu beurteilen. Es kann aus diesen Indexzahlen z.B. nicht entnommen werden, ob eine lineare oder eine quadratische Anpassung günstiger wäre. Um zu entscheiden ob eine lineare oder quadratische Anpassung günstiger ist werden z.B. der Anpassungstest nach Mandel und die Residualanalyse angewendet.

A.2.5 Überprüfung der Linearität

Zur Überprüfung der Linearität eines Kalibrierfunktionstyps gibt es verschiedene Möglichkeiten [526]:

- Visueller Linearitätstest nach Funk (A.2.5.1)
- Mandel-Test (A.2.5.2)
- Residualanalyse (A.2.5.4)

A.2.5.1 Visueller Linearitätstest nach Funk

Eine Überprüfung des Kalibrierfunktionstyps (Abbildung A3-A5) erfolgt im einfachsten Fall durch eine subjektive Beurteilung der graphischen Darstellung der Kalibrierdaten (einschließlich der Regressionsgeraden).

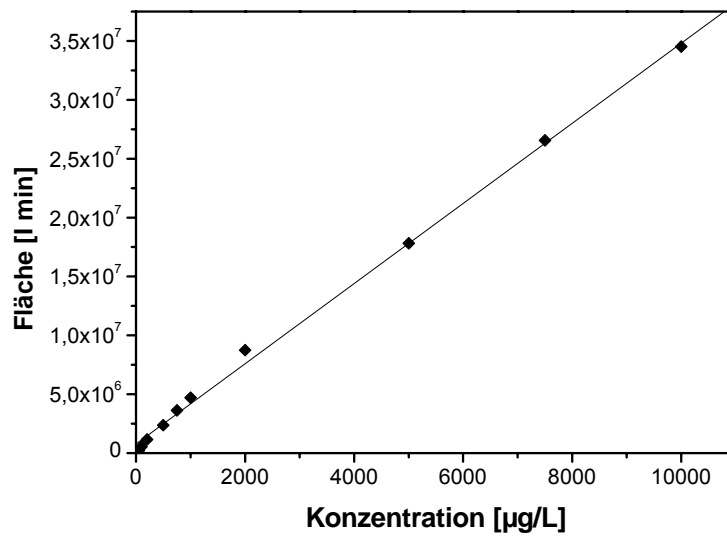


Abb. A3: Visueller Linearitätstest für SFD (Messbereich 50 $\mu\text{g/L}$ – 10 mg/L; N=10)

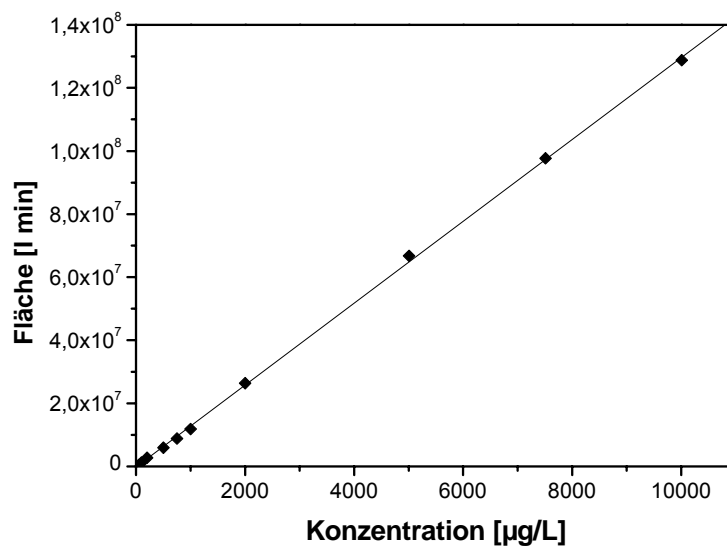


Abb. A4: Visueller Linearitätstest für e-iso-CTC (Messbereich 50,055 $\mu\text{g/L}$ – 10,011 mg/L; N=10)

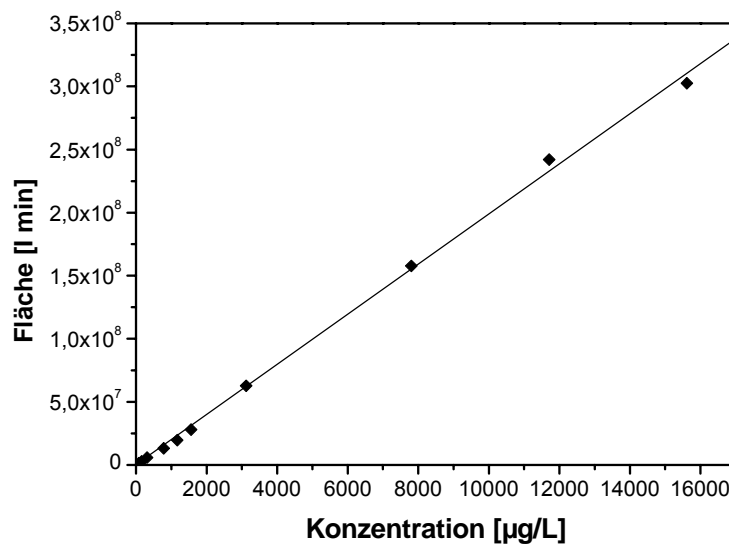


Abb. A5: Visueller Linearitätstest für iso-CTC (Messbereich 78,05 µg/L – 15,61 mg/L; N=10)

A.2.5.2 Anpassungstest nach Mandel

Der Anpassungstest nach Mandel (DIN 38402 Teil 51) wird zur Überprüfung der Linearität herangezogen [520,526]. Dies geschieht durch einen Vergleich der Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades (s. Tab. A6 und A7).

Zunächst wird aus den zwei Reststandardabweichungen die Differenz der Abweichungsvarianzen DS^2 berechnet:

$$\text{Gleichung 17: } DS^2 = (N-2) \cdot s_{y_1}^2 - (N-3)s_{y_2}^2$$

Für die Berechnung des Prüfwertes PW gilt:

$$\text{Gleichung 18: } PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2}$$

Der ermittelte Prüfwert wird dann mit dem Tabellenwert aus der F-Tabelle ($f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$) verglichen [520,526]. Hierbei gilt:

$PW \leq F$: Die Kalibrierfunktion ist linear, da durch eine Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht wird.

$PW > F$: Die Kalibrierfunktion ist in diesem Arbeitsbereich nicht linear.

Für den Fall $PW > F$ kann durch wiederholte Durchführung dieses Testverfahrens mit immer weiter eingeschränktem Arbeitsbereich die obere Arbeitsbereichsgrenze festgestellt werden. Diese Vorgehensweise ist durch die DIN 38402 Teil 51 vorgeschrieben. Nach DIN 38402 Teil 51 ist es aber auch möglich die Kalibrierfunktion nach einem Regressionsmodell höherer

Ordnung zu berechnen. Zur Festlegung der oberen Arbeitsgrenze für die quadratische Regression gibt es allerdings noch keine einheitlichen Grundsätze.

Die Ergebnisse des Linearitätstests nach Mandel in Tabelle A8 zeigen, dass die Kalibrierfunktion im gesamten Arbeitsbereich linear ist. Um die in A.2.5.3 festgestellte Varianzhomogenität im gesamten Arbeitsbereich zu vermindern wurden die Arbeitsbereiche allerdings verkleinert bzw. aufgeteilt.

Tab. A8: Prüfung auf Linearität mittels Mandel-Test

Analyt	Konzentrations-Bereich [µg/L]	N	PW	F-Wert ($f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$)
SFD	50-10000	10	4,19	12,25
SFD	100-1000	5	0,06	98,50
e-iso-CTC	50,055-10011	10	7,03	12,25
e-iso-CTC	100,11-1001,1	5	0,02	98,50
e-iso-CTC	1001,1-10011	5	16,22	98,50
iso-CTC	78,05-15610	10	5,39	12,25
iso-CTC	78,05-1170,75	5	0,52	98,50
iso-CTC	1170,75-11707,5	5	0,19	98,50

A.2.5.3 Varianzhomogenität

Ein Analysenverfahren muss für den ganzen gewählten Arbeitsbereich gleich präzise sein, da die lineare Regressionsrechnung von einer konstanten (homogenen) Varianz der Messwerte (Unpräzision) ausgeht [7,520,526].

Eine Inhomogenität der Varianzen führt über eine höhere Unpräzision hinaus zu einer möglichen Veränderung der Geradensteigung und damit zu einer höheren Ungenauigkeit.

Es wird dabei zur Absicherung des gewählten Arbeitsbereiches mittels eines F-Testes geprüft, ob sich die Varianz s_1 der Messreihe (Mehrfachbestimmung) mit der niedrigsten Analyt-Konzentration ($i=1$) signifikant von der Varianz s_N der Messreihe mit der höchsten Analyt-Konzentration ($i=N$) unterscheidet.

Für die Berechnung der Varianzen gilt:

$$\text{Gleichung 19: } s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n-1}$$

$$\text{mit: } \bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^n y_{i,j}}{n}$$

\bar{y}_i = Mittelwert der Peakflächen (Detektorsignal) der i-ten Messreihe (i=1 bis N)

$y_{i,j}$ = ermittelte Peakfläche (Detektorsignal) des j-ten Einzelmesswertes (j=1 bis n) der i-ten Messreihe

i = Laufzahl der Messreihen

j = Laufzahl der Einzelmesswerte innerhalb der Messreihen

N = Anzahl der Konzentrationsstufen (Kalibrierpunkte)

n = Anzahl der Messungen je Konzentrationsstufe

Aus den Varianzen des niedrigsten und des höchsten Kalibrierpunktes wird als Prüfwert PW ein Quotient gebildet, der größer als eins ist. Der Prüfwert PW wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 20: } PW = \frac{s_1^2}{s_N^2} \quad \text{für } s_1^2 > s_n^2$$

$$PW = \frac{s_N^2}{s_1^2} \quad \text{für } s_1^2 < s_n^2$$

Der ermittelte Prüfwert wird mit dem tabellierten F-Wert ($f_1=n-1$, $f_2=n-1$, $P=99\%$) verglichen. Varianzenhomogenität liegt vor, wenn $PW < F$. Ist der Prüfwert kleiner als der tabellierte F-Wert für $P=99\%$ besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen s_1 und S_N . Ein signifikanter Unterschied der Varianzen und somit eine Inhomogenität der Varianzen liegt bei $PW > F$ vor. In diesem Fall ist der Arbeitsbereich soweit einzuschränken bis Varianzenhomogenität hergestellt ist oder es können gewichtete Regressionsmodelle angewendet werden.

Für e-iso-CTC und iso-CTC wurde trotz Einschränkung des Arbeitsbereichs eine Varianzinhomogenität festgestellt (Tab. A9). Durch eine weitere Einschränkung der gewählten Arbeitsbereiche oder eine Anwendung gewichteter Regressionsmodelle kann auch hier möglicherweise eine Varianzhomogenität erreicht werden. Diese Möglichkeiten würden im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter verfolgt, da die Residualanalyse (siehe A.2.5.4) das Vorliegen einer Normalverteilung in den eingeschränkten Arbeitsbereichen

zeigte. Auch in der Routineanalytik wird nach Vockel [7] oft eine Inhomogenität der Varianzen bei linearem Regressionsansatz in Kauf genommen.

Tab. A9: Test auf Homogenität der Varianzen

Analyt	Konzentrations-Bereich [µg/L]	n	PW	F-Wert ($f_1=n-1$, $f_2=n-1$, $P=99\%$)
SFD	50-10000	10	66,81	5,35
SFD	100-1000	10	1,07	5,35
e-iso-CTC	50,055-10011	10	381,46	5,35
e-iso-CTC	100,11-1001,1	10	9,91	5,35
e-iso-CTC	1001,1-10011	10	13,47	5,35
iso-CTC	78,05-15610	10	1874,09	5,35
iso-CTC	78,05-1170,75	10	16,84	5,35
iso-CTC	1170,75-11707,5	10	36,19	5,35

A.2.5.4 Residualanalyse

Die Residualanalyse ist eine weitere Möglichkeit, die Qualität des linearen Ansatzes zu bewerten [7,526].

Unter den Residuen (Restfehler) versteht man die Differenz in vertikaler Richtung zwischen Messpunkt und zugehörigen Punkt auf der Regressionskurve.

Um normierte Residuen u_i zu erhalten dividiert man die Residuen aller Messpunkte durch die Standardabweichung aller Residuen, also durch s_y . Man erhält die normierten Residuen u_i nach:

$$\text{Gleichung 21: } u_i = \frac{y_i - \hat{y}_i}{s_y} \quad \text{für } i = 1 \text{ bis } N$$

mit y_i = Messwert

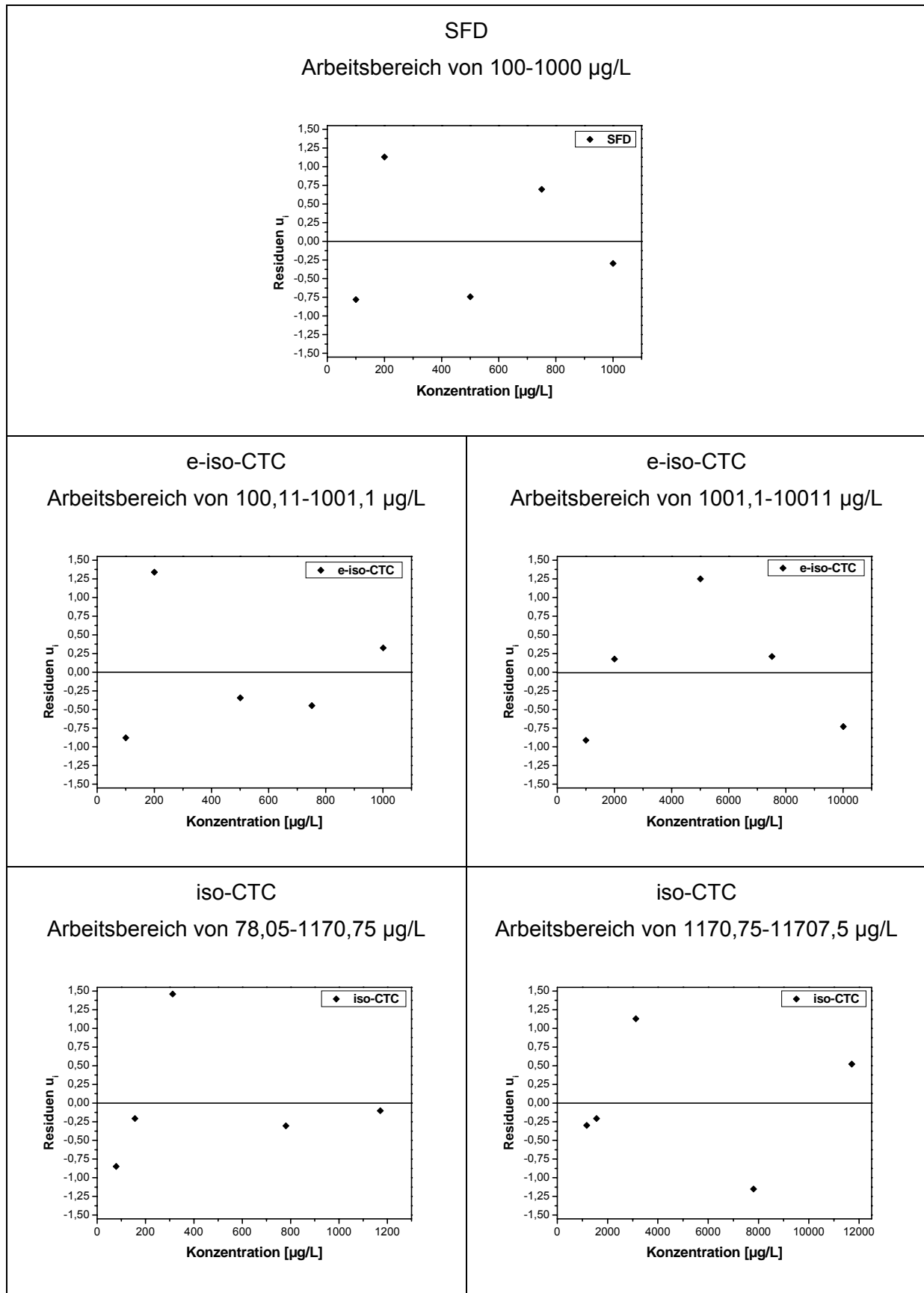
\hat{y}_i = zu y_i gehöriger Schätzwert aus der Regressfunktion

($\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$ für lineares Modell)

Ist der gewählte Modellansatz richtig, dann müssen die normierten Größen u_i normalverteilt sein und es ergibt sich eine Gleichverteilung unter- und oberhalb der Nulllinie.

Ist jedoch ein Trend festzustellen, so ist der zugrunde gelegte Regressionsansatz zu überprüfen und gegebenenfalls der Arbeitsbereich einzuschränken, ein anderes Regressionsmodell zu verwenden oder beim bestehenden Regressionsmodell eine Gewichtung vorzunehmen [526].

Wie in Abbildung A6 zu sehen ist, zeigen die Residualanalysen der eingeschränkten Arbeitsbereiche eine Normalverteilung. Daher werden die Arbeitsbereiche für e-iso-CTC und iso-CTC trotz ermittelter Varianzinhomogenität (A.2.5.3) nicht weiter eingeschränkt.

**Abb. A6:** Residualanalysen der eingeschränkten Arbeitsbereiche

A.2.6 Verfahrenskenndaten

Ein Maß für die Empfindlichkeit der linearen Kalibrierfunktion ist die Steigung b der Regressionsgeraden und die Reststandardabweichung s_{y_1} stellt ein Präzisionsmaß für die Messung dar (siehe Anhang A.2.3) [7,511,520,526].

Durch Division der Reststandardabweichung mit der Geradensteigung b wird diese auf die Mitte des Arbeitsbereichs normiert und man erhält die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} , welche ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Methode ist.

$$\text{Gleichung 22: } s_{x0} = \frac{s_{y_1}}{b}$$

Durch Division der Verfahrensstandardabweichung durch die Konzentration in der Mitte des Konzentrationsbereichs (\bar{x}_c) und anschließender Multiplikation mit 100 erhält man als weitere Normierungsgröße die relative Verfahrenstandardabweichung V_{x0} .

$$\text{Gleichung 23: } V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}_c} \cdot 100\%$$

Mit Hilfe der relativen Verfahrensstandardabweichung können unterschiedliche Verfahren unter der Voraussetzung, dass die Messwerte sich auf gleiche Konzentrationen beziehen, miteinander verglichen werden. Tabelle A10 zeigt die Verfahrenskenndaten der in dieser Arbeit zur Bestimmung von SFD, e-iso-CTC und iso-CTC eingesetzten HPLC-MS/MS-Methode.

Tab. A10: Übersicht der Verfahrenskenndaten der einzelnen Arbeitsbereiche

Analyt	Arbeitsbereich [µg/L]	s_{x0} [µg/L]	V_{x0} [%]
SFD	100-1000	16,08	3,15
e-iso-CTC	100,11-1001,1	14,47	2,83
e-iso-CTC	1001,1-10011	108,11	2,12
iso-CTC	78,05-1170,75	12,49	2,50
iso-CTC	1170,75-11707,5	67,01	1,32

A.2.7 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

A.2.7.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze x_{NG} ist nach DIN 32645 eine Entscheidungsgrenze. Sie gibt diejenige Analytkonzentration an, bei welcher der Analyt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 50% vorhanden ist [521,526].

$$\text{Gleichung 24: } x_{\text{NG}} = s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$t_{f;\alpha}$ = Quantil der t-Verteilung (einseitiges Prognoseintervall)

$f = n - 2$ (mit f = Anzahl der Freiheitsgrade)

m = Anzahl der Messungen an der Analysenprobe

n = Anzahl der Proben

α = Signifikanzniveau (Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art)

A.2.7.2 Erfassungsgrenze

Die Erfassungsgrenze x_{EG} ist der kleinste Gehalt eines Analyten in einer Probe, bei dem mit einer Wahrscheinlichkeit $1 - \beta$ ein Nachweis möglich ist [521,526].

$$\text{Gleichung 25: } x_{\text{EG}} = x_{\text{NG}} + s_{x0} \cdot t_{f;\beta} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$t_{f;\beta}$ = Quantil der t-Verteilung (einseitiges Prognoseintervall)

β = Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art

Der Wert für die Nachweisgrenze wird im Falle $\alpha = \beta$ mit dem Faktor 2 multipliziert.

$$\text{Gleichung 26: } x_{\text{EG}} = 2 \cdot x_{\text{NG}}$$

A.2.7.3 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze x_{BG} ist eine quantitative Grenze. Sie ist jene Analytmenge die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantifiziert werden kann [521,526]. Da ein Analyt nur bestimmt werden kann, wenn er auch nachweisbar ist (Analytkonzentration $x_A \geq x_{\text{EG}}$), muss die Bestimmungsgrenze größer als die Erfassungsgrenze sein. Die Parameter $(\alpha, 1/k)$ zur Berechnung der Bestimmungsgrenze sind deshalb so zu wählen, dass $x_{\text{BG}} > x_{\text{EG}}$ gilt.

Das Prognoseintervall wird bestimmt nach:

Gleichung 27: $\Delta x_{BG} = s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$

$t_{f;\alpha}$ = Quantil der t-Verteilung (zweiseitiges Prognoseintervall)

Aus der Definition für die Bestimmungsgrenze ergibt sich:

Gleichung 28: $x_{BG} = k \cdot \Delta x_{BG}$

Man erhält eine gute Näherung für die Bestimmungsgrenze durch $x_{BG} \approx k \cdot x_{NG}$. Mit $x = x_{BG}$ kann die die Bestimmungsgrenze nun wie folgt berechnet werden:

Gleichung 29: $x_{BG} = k \cdot s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k \cdot x_{NG} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$

Bei der Bestimmung eines Analyten (Analytkonzentration x_A) in einer Probe mit sehr geringem Gehalt, gibt es nach DIN 32645 ($\beta=0,05$) sechs Grenzfälle:

- $x_A < x_{NG}$ ► Nachweis in weniger als 50% der Fälle erfolgreich*).
- $x_A \approx x_{NG}$ ► Nachweis in 50% der Fälle erfolgreich*).
- $x_{NG} < x_A < x_{EG}$ ► Nachweis in 50% bis 95% der Fälle erfolgreich*).
- $x_A \approx x_{EG}$ ► Nachweis in 95% der Fälle erfolgreich*).
- $x_{EG} < x_A < x_{BG}$ ► Nachweis erfolgreich*), Quantifizierung mit der notwendigen statistischen Sicherheit P ist unsicher.
- $x_A \approx x_{BG}$ ► Nachweis erfolgreich*), Quantifizierung mit der notwendigen statistischen Sicherheit P ist möglich. Die Ergebnisunsicherheit wurde hier mit $k = 3$ festgelegt.

*)erfolgreicher Nachweis: Die getroffenen Aussage z.B. Analyt vorhanden, ist wahr

Tabelle A11 zeigt die ermittelten Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-MS/MS-Methode.

Tab. A11: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der unteren Arbeitsbereiche

der HPLC-MS/MS-Methode (externe Kalibrierung)

Analyt	Arbeitsbereich [µg/L]	x _{NG} [µg/L]	x _{EG} [µg/L]	x _{BG} [µg/L]
SFD	100-1000	48,81	97,62	184,00
e-iso-CTC	100,11-1001,1	43,92	87,84	166,68
iso-CTC	78,05-1170,75	35,90	71,79	140,10

A.2.8 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate (WFR) ist ein Beurteilungskriterium von Analysenverfahren. Beträgt die Wiederfindungsrate 100% ist die Selektivität, Richtigkeit und Robustheit eines Verfahrens bewiesen [526].

Die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe und lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Gleichung 30: } WFR = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100\%$$

mit \bar{x} = gemessener Mittelwert

x_R = richtiger Wert, entspricht der zugesetzten Konzentration/Menge

A.3 Kenngrößen der untersuchten Böden

A.3.1 Boden „Soest“

Zu den Versuchspartzellen, die im „Antiinfektiva-Projekt“ für Feldversuche eingesetzt wurden (Versuchsgut des Fachbereichs 9 - Landbau – Abt. Soest, FH Südwestfalen, in Welper-Merklingsen), liegen folgende Bodendaten vor [476]:

Standort: Naturraum: Soester Börde (Niederbörde)

Höhenlage: ca. 80 m über NN

Klima: ca. 750 mm Niederschlag, durchschnittliche Jahrestemperatur: 9,0 °C

Bonität: überwiegend 70-75 BP, Zustandstufe: L4 LÖ

Bodentyp: Bodenentwicklung durch stark schwankenden Grundwasserstand beeinflusst, (Pseudogley-Parabraunerde), Humusgehalte meist unter 2%

Bodenart: uL / sL, Schluffanteil ca. 70%

Eigenschaften: druckempfindlich, verschlammungsgefährdet

Wasserspeicherkapazität hoch

Erosionsgefährdung gering bis mittel, bei schwacher Hangneigung mittel bis stark, in windoffenen Lagen gefährdet durch Winderosion

Tab. A12: Profilaufbau [476]

	Bodenzone [cm]	Beschreibung
A _p	0-30	braungrauer, mittel toniger Schluff, schwach humos, Subpolyedergefüge
A _{ls}	30-42	ockerbrauner, mittel toniger Schluff, schwach humos, Subpolyedergefüge, mit leichten Staunässeerscheinungen
B _{tS_w}	42-78	rötlich brauner, stark toniger Schluff, Polyedergefüge, Rostflecken, einige Bleichflecken
B _{tS_d}	78-135	rötlich brauner, stark toniger Schluff, Prismen- und Polyedergefüge, dicht und wasserstauend, Lößverwitterung

Tab. A13: Allgemeine bodenchemische und –physikalische Bodeneigenschaften [476]

C/N-Verhältnis Gesamt-N (0-30)	13/1 – 15/1 0,98 – 1,61	%
Luft- und Wasserdurchlässigkeit	mittel – gering	
Gesamtporenvolumen	43 – 46	Vol. %
„Luftporen“ (Grobporen)	9 – 12	Vol. %
Rohdichte	1,4 – 1,6	g/cm ³
nutzbare Feldkapazität (0-100cm)	220	mm
Totwasser, pf>4,2 (0-100cm)	95	mm
Feldkapazität (0-100cm)	315	mm

Tab. A14: Nährstoffe nach VDLUFA [476]

Nährstoff	Gehalt [mg/100g Boden]	Bestimmung nach VDLUFA Methodenbuch I
P ₂ O ₅	12,1	A 6.2.1.1
K ₂ O	24,4	A 6.2.1.1
Mg	11,2	A 6.2.4.1

Tab. A15: Schwermetalle (DIN 38406) und adsorbierbare organisch gebundene Halogene (AOX, DIN 38414-18) aus Königswasseraufschluss (DIN 38414-7) [476]

	Gehalt [mg/kg Boden]
<i>Blei</i>	33,4
<i>Cadmium</i>	0,42
<i>Chrom</i>	33,9
<i>Kupfer</i>	6,96
<i>Nickel</i>	11,7
<i>Quecksilber</i>	0,09
<i>Zink</i>	57,0
AOX	31,8

Tab. A16: Trockenrückstand und des Wassergehalt auf Grundlage der Masse (DIN ISO 11465) der Bodenproben (Probenbezeichnung siehe Anhang A.3.2)

Probenbezeichnung	Trockenrückstand (w_{dm}) [%]	Wassergehalt (w_{H_2O}) [%]
W1-1-25	81,2	23,2
W2-1-25	79,9	25,2
W3-1-25	83,3	20,2
W4-1-25	81,5	22,8
W5-1-25	81,2	23,2
W6-1-25	81,9	22,1
W7-1-25	82,4	21,4
W8-1-25	82,4	21,4
W1-4-25	80,8	23,8
W2-4-25	80,5	24,3
W3-4-25	83,0	20,5
W4-4-25	81,5	22,8
W5-4-25	81,5	22,8
W6-4-25	82,5	21,3
W7-4-25	83,1	20,4
W8-4-25	82,2	21,8

A.3.2 Boden „Hamm“

Der für die Säulenversuche (Kapitel 5.2.2) verwendete sandige Ackerboden wurde von einer landwirtschaftlichen Fläche aus der Nähe von Hamm bezogen [477]. Die seit mehr als zehn Jahren brachliegende Fläche wurde nur sporadisch als Kuhweide genutzt. In Abbildung A7 ist das Profil des Bodens bis zu einer Tiefe von 50 cm zu sehen. In den Versuchen wurde nur der Oberboden (10 bis 40 cm Tiefe) eingesetzt. Der Boden ist ein Feinsand mit hohem Schluffanteil und sehr stark humos. Im Bereich von 10-40 cm ist er teilweise durchwurzelt. Dieser Boden ist ein Podsol. Der pH-Wert des Bodens betrug 6,5. In den Versuchen wurde nur der Oberboden (10 bis 40 cm Tiefe) eingesetzt. Tabelle A17 und A18 zeigen die Charakteristika des Oberbodens. In diesem Boden konnten keine Antibiotikarückstände (SFD, N4-SFD, e-iso-CTC, iso-CTC, e-CTC, CTC, anhydro-CTC) nachgewiesen werden.

Der Boden wurde vor dem Einbau in die Säulen manuell zerkleinert und an der Luft getrocknet [477]. Um Wurzelreste im Boden hatten sich deutliche Eisenkonkretionen gebildet.

Nach dem Trocknen wurde der Boden homogenisiert und trocken in die Säule eingebaut. Eine Schichtung war nach dem Einbau nicht erkennbar. Neben sehr fein zerkleinerten Teilen waren zum Teil einige Millimeter große Konglomerate zu erkennen.



Abb. A7: Profil des verwendeten Ackerbodens [477]

Tab. A17: Kennwerte des Ackerbodens [477]

Kenngröße/ Charakterisierung	Abkürzung und Einheit	Wert
<i>Massenanteil Tonfraktion</i>	[%]	7
<i>Massenanteil Schlufffraktion</i>	[%]	12
<i>Massenanteil Sandfraktion</i>	[%]	81
<i>Massenanteil Kiesfraktion</i>	[%]	0
<i>Korngröße bei 10 % Siebdurchgang</i>	d_{10} [mm]	0,0075
<i>Korngröße bei 60 % Siebdurchgang</i>	d_{60} [mm]	0,18
<i>Ungleichförmigkeitsgrad</i>	U [-]	24
<i>Durchlässigkeitsbeiwert nach Beyer</i>	k_f [m/s]	3,4E-07
<i>Durchlässigkeitsbeiwert aus Permeabilitätstest</i>	k_f [m/s]	9,6E-06

Tab. A18: Schwermetallgehalte des Ackerbodens [477]

Element	Konzentration bei Elution nach DIN 38414-4 [µg/l]	Gehalte bei Elution nach DIN ISO 11466 [µg/kg TM]
<i>Aluminium</i>	196	4751
<i>Blei</i>	2	33,2
<i>Cadmium</i>	< 0,3	0,35
<i>Chrom</i>	< 2	17,6
<i>Kupfer</i>	14	12,4
<i>Eisen</i>	212	6664
<i>Mangan</i>	12	217
<i>Nickel</i>	3	5,6
<i>Zink</i>	34	53,8

A.4 Ergebnisse

A.4.1 Ergebnisse der Wiederfindung

Tab. A19: Daten zur Wiederfindung von SFD in Bodenproben (dotierter Nullboden;
Wiederfindung = 100% bei zudotierter Konzentration = wiedergefundener
Konzentration)

Analyt	zudotierte Konzentration [µg/L]	zugesetzte Menge [µg/5g]	wiedergefundene Konzentration [µg/L] (Mittelwerte aus 3 Messinjektionen)
SFD	250	0,125	69±14
SFD	250	0,125	74±9
SFD	250	0,125	77±6
SFD	250	0,125	59±15
SFD	1000	0,500	330±24
SFD	1000	0,500	233±9
SFD	1000	0,500	548±20
SFD	1000	0,500	455±33
SFD	10000	5,000	4472±192
SFD	10000	5,000	4192±133
SFD	10000	5,000	5880±313
SFD	10000	5,000	5656±111

Tab. A20: Daten zur Wiederfindung von CTC in Bodenproben (dotierter Nullboden; Wiederfindung = 100% bei zudotierter Konzentration = wiedergefundener Summenkonzentration)

Analyt	zudotierte Konzentration [µg/L]	zugesetzte Menge [µg/5g]	wiedergefundene Konzentration [µg/L] (Mittelwerte aus 3 Messinjektionen)				
			*e-iso-CTC	*iso-CTC	*e-CTC	*CTC	Summe CTC
CTC	250	0,125	66±14	123±10	~0	~0	189±24
CTC	250	0,125	69±12	118±15	~0	~0	187±27
CTC	250	0,125	75±16	121±19	~0	~0	196±35
CTC	250	0,125	70±2	117±4	~0	~0	187±6
CTC	1000	0,500	185±7	368±21	~0	~0	553±28
CTC	1000	0,500	177±1	340±9	~0	~0	517±10
CTC	1000	0,500	254±2	477±28	~0	~0	731±30
CTC	1000	0,500	267±6	431±22	~0	~0	698±28
CTC	10000	5,000	1495±36	3417±109	~0	~0	4912±145
CTC	10000	5,000	1580±56	3545±55	~0	~0	5425±111
CTC	10000	5,000	2138±24	4603±72	~0	~0	6741±96
CTC	10000	5,000	2151±12	4700±252	~0	~0	6851±264

(* bezogen auf dotiertes CTC)

A.4.2 Ergebnisse der Rückstandsuntersuchung der Bodenproben der Feldversuche

Bei allen genannten Gehalten handelt es sich um Mittelwerte (N=3; 3-fach Injektion einer Messprobe) der Gehaltsbestimmung mittels HPLC-MS/MS. Aus jeder Bodenmischprobe (Probennahme und Details siehe [476]) wurden 2 Stichproben separat aufgearbeitet (Doppelbestimmung).

Erklärung der Probenbezeichnung:

Wx-x-xx gibt an das Winterweizen auf dem Feld angepflanzt worden ist, ein „F“ steht für Feldsalat.

x1-x-xx gibt die laufende Probenahmenummer (zeitliche Probennahmenfolge) an.

xx-1-xx gibt an von welcher Parzelle die Probe stammt.

xx-x-25 gibt das Bodensegment an aus der die Probe entnommen worden ist:

10 = 0cm - 10cm; 20 = 10cm - 20cm; 25 = 0cm - 25cm; 30 = 20cm - 30cm; 50 = 25cm - 50cm; 60 = 30cm - 60cm

Tab. A21: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Winterweizen, Parzelle 1, Bodentiefe 0 cm – 25 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD TM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* TM [µg/kg]
12.03.	W1-1-25	n.n.	n.n.
12.03.	W1-1-25	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
19.03.	W2-1-25	30,6±2,5	59,6±3,1
19.03.	W2-1-25	43,6±3,3	138,8±4,4
15.04.	W3-1-25	13,6±0,4	68,8±3,3
15.04.	W3-1-25	14,4±4,2	93,9±5,9
2. Gülleaufbringung			
22.04.	W4-1-25	87,7±9,0	172,7±8,9
22.04.	W4-1-25	65,0±6,9	241,0±6,0
15.05.	W5-1-25	28,5±3,2	145,0±0,1
15.05.	W5-1-25	32,2±1,9	193,7±2,6
17.06.	W6-1-25	17,5±0,3	78,7±2,7
17.06.	W6-1-25	20,3±1,1	55,3±4,1
17.07.	W7-1-25	12,4±2,3	22,2±1,5
17.07.	W7-1-25	3,8±2,8	25,7±2,0
20.08.	W8-1-25	14,3±1,8	27,0±0,5
20.08.	W8-1-25	12,9±0,6	21,5±0,6

* Summe von iso-CTC und e-iso-CTC

n.n. = nicht nachweisbar

TM = bezogen auf Trockenmasse (Boden)

Tab. A22: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Winterweizen, Parzelle 1, Bodentiefe 25 cm – 50 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD TM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* TM [µg/kg]
12.03.	W1-1-50	n.n.	n.n.
12.03.	W1-1-50	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
19.03.	W2-1-50	n.n.	n.n.
19.03.	W2-1-50	n.n.	n.n.
15.04.	W3-1-50	n.n.	n.n.
15.04.	W3-1-50	n.n.	n.n.
2. Gülleaufbringung			
22.04.	W4-1-50	n.n.	n.n.
22.04.	W4-1-50	n.n.	n.n.
15.05.	W5-1-50	n.n.	n.n.
15.05.	W5-1-50	n.n.	n.n.
17.06.	W6-1-50	n.n.	n.n.
17.06.	W6-1-50	n.n.	n.n.
17.07.	W7-1-50	n.n.	n.n.
17.07.	W7-1-50	n.n.	n.n.
20.08.	W8-1-50	n.n.	n.n.
20.08.	W8-1-50	n.n.	n.n.

Tab. A23: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Winterweizen, Parzelle 4, Bodentiefe 0 cm – 25 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD TM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* TM [µg/kg]
12.03.	W1-4-25	n.n.	n.n.
12.03.	W1-4-25	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
19.03.	W2-4-25	14,4±5,9	171,4±5,5
19.03.	W2-4-25	32,4±3,0	161,9±4,6
15.04.	W3-4-25	17,6±1,2	106,8±3,7
15.04.	W3-4-25	17,5±1,9	66,3±5,1
2. Aufbringung von Mineraldünger			
22.04.	W4-4-25	39,8±2,4	141,6±0,9
22.04.	W4-4-25	15,7±6,4	87,5±2,6
15.05.	W5-4-25	10,9±4,3	45,8±1,1
15.05.	W5-4-25	4,2±1,8	48,5±3,5
17.06.	W6-4-25	0,9±1,6	44,4±2,3
17.06.	W6-4-25	20,2±2,8	36,1±0,8
17.07.	W7-4-25	2,9±2,6	32,4±1,9
17.07.	W7-4-25	8,8±3,9	42,6±2,0
20.08.	W8-4-25	6,0±0,9	31,3±0,6
20.08.	W8-4-25	10,6±3,1	28,0±1,4

Tab. A24: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Winterweizen, Parzelle 4, Bodentiefe 25 cm – 50 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD TM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* TM [µg/kg]
12.03.	W1-4-50	n.n.	n.n.
12.03.	W1-4-50	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
19.03.	W2-4-50	n.n.	n.n.
19.03.	W2-4-50	n.n.	n.n.
15.04.	W3-4-50	n.n.	n.n.
15.04.	W3-4-50	n.n.	n.n.
2. Aufbringung von Mineraldünger			
22.04.	W4-4-50	n.n.	n.n.
22.04.	W4-4-50	n.n.	n.n.
15.05.	W5-4-50	n.n.	n.n.
15.05.	W5-4-50	n.n.	n.n.
17.06.	W6-4-50	n.n.	n.n.
17.06.	W6-4-50	n.n.	n.n.
17.07.	W7-4-50	n.n.	n.n.
17.07.	W7-4-50	n.n.	n.n.
20.08.	W8-4-50	n.n.	n.n.
20.08.	W8-4-50	n.n.	n.n.

Tab. A25: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Feldsalat, Parzelle 1, Bodentiefe 0 cm – 10 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD FM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* FM [µg/kg]
05.10.	F1-1-10	n.n.	n.n.
05.10.	F1-1-10	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
09.10.	F2-1-10	35,3±3,8	230,3±3,5
09.10.	F2-1-10	1,1±0,7	41,8±1,9
20.11.	F3-1-10	17,6±1,9	95,2±2,4
20.11.	F3-1-10	9,2±2,8	69,4±5,7
2. Gülleaufbringung			
05.12.	F4-1-10	15,3±3,8	133,4±5,3
05.12.	F4-1-10	19,2±7,5	81,2±6,2

FM = bezogen auf Feuchtmasse (Boden)

Tab. A26: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Feldsalat, Parzelle 1, Bodentiefe 10 cm – 20 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD FM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* FM [µg/kg]
05.10.	F1-1-20	n.n.	n.n.
05.10.	F1-1-10	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
09.10.	F2-1-20	n.n.	n.n.
09.10.	F2-1-20	n.n.	n.n.
20.11.	F3-1-20	n.n.	n.n.
20.11.	F3-1-20	n.n.	n.n.
2. Gülleaufbringung			
05.12.	F4-1-20	n.n.	n.n.
05.12.	F4-1-20	n.n.	n.n.

Tab. A27: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Feldsalat, Parzelle 1, Bodentiefe 20 cm – 30 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD FM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* FM [µg/kg]
05.10.	F1-1-30	n.n.	n.n.
05.10.	F1-1-30	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
09.10.	F2-1-30	n.n.	n.n.
09.10.	F2-1-30	n.n.	n.n.
20.11.	F3-1-30	n.n.	n.n.
20.11.	F3-1-30	n.n.	n.n.
2. Gülleaufbringung			
05.12.	F4-1-30	n.n.	n.n.
05.12.	F4-1-30	n.n.	n.n.

Tab. A28: Gehalt an SFD und CTC in den Bodenproben
„Feldsalat, Parzelle 1, Bodentiefe 30 cm – 60 cm“

Datum der Probennahme	Probenbezeichnung	Gehalt SFD FM [µg/kg]	Summengehalt CTC's* FM [µg/kg]
05.10.	F1-1-60	n.n.	n.n.
05.10.	F1-1-60	n.n.	n.n.
1. Gülleaufbringung			
09.10.	F2-1-60	n.n.	n.n.
09.10.	F2-1-60	n.n.	n.n.
20.11.	F3-1-60	n.n.	n.n.
20.11.	F3-1-60	n.n.	n.n.
2. Gülleaufbringung			
05.12.	F4-1-60	n.n.	n.n.
05.12.	F4-1-60	n.n.	n.n.

Weitere Antibiotika und Metaboliten:

Sowohl TMP, als auch der SFD-Metabolit N4-SFD sowie Anhydro-CTC konnten in keiner Bodenprobe nachgewiesen werden.

A.4.3 Ergebnisse zu den Messproben der Säulenversuche

A.4.3.1 Gülle

In die oberen 2 cm des Bodens des Säulenversuchs im Labormaßstab und in die oberen 30 cm des Bodens des Säulenversuchs im halbtechnischen Maßstab wurde mit SFD, iso-CTC und CTC dotierte Gülle eingearbeitet (Tabelle A29).

Tab. A29: Gehalt an CTC, iso-CTC und SFD der in den Versuchen eingesetzten dotierten Gülle

Versuchsmaßstab	Labormaßstab	halbtechnischer Maßstab
Eingesetzte Güllemenge [mL]	65	650
zudotierte Menge an CTC [mg]	6,51	49,98
zudotierte Menge iso-CTC [mg]	6,50	48,25
zudotierte Menge an SFD [mg]	6,51	50,23

Tab. A30: Gehalt an CTC und SFD in gelagerter Gülle (Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS)

Versuchsmaßstab	Lagerungszeit nach Dotierung [Wochen]	e-iso-CTC [mg/L]	iso-CTC [mg/L]	Summe CTC [mg/L]	SFD [mg/L]
Labormaßstab	4	1,88±0,13	1,79±0,08	3,67±0,21	0,81±0,03
halbtechnischer Maßstab	12	12,02±0,31	16,13±0,53	28,15±0,84	0,02±0,002

A.4.3.2 Säulenelutate

Tab. A31: Konzentrationen von SFD und CTC im Eluat der Säule im Labormaßstab
(Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS)

Probenbezeichnung	Konzentration [ng/L]			
	SFD	e-iso-CTC	iso-CTC	Summe CTC
B1-nach	322±21	8±4	33±6	41±10
B1-vor	348±17	18±3	57±4	75±7
B2-nach	2104±48	290±7	371±10	661±17
B2-vor	n.n.	85±1	155±11	240±12
B3-nach	1614±35	110±16	152±1	262±17
B3-vor	n.n.	26±6	53±6	79±12
B4-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B4-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B5-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B5-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B6-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B6-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B7-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B7-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B8-nach	n.n.	267±9	168±13	435±22
B8-vor	n.n.	265±14	190±12	455±26
B9-nach	n.n.	120±5	134±11	254±16
B9-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B10-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B10-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B11-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B11-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B12-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B12-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B13-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B13-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

nach = Pufferzugabe nach der Zentrifugation

vor = Pufferzugabe vor der Zentrifugation

Tab. A32: Konzentrationen von SFD und CTC im Eluat der Säule im halbtechnischen Maßstab (Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS)

Probenbezeichnung	Konzentration [ng/L]			
	SFD	e-iso-CTC	iso-CTC	Summe CTC
Landregen1-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Landregen1-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen1-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen1-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen1-nach	n.n.	54±1	100±4	154±5
Platzregen1-vor	n.n.	170±20	246±12	416±32
Landregen2-nach	n.n.	62±13	93±1	155±14
Landregen2-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen2-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen2-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen2-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen2-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Landregen3-nach	n.n.	231±23	352±11	583±34
Landregen3-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen3-nach	n.n.	47±3	54±5	101±8
Starkregen3-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen3-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen3-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Landregen4-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Landregen4-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen4-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Starkregen4-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen4-nach	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Platzregen4-vor	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Tab. A33: Konzentration in den mit HCl aufgelösten Zentrifugenrückständen aus zentrifugierten "vor-Proben" nach Zugabe von EDTA-Ammoniak-Puffer / bezogen auf das zentrifugierte Probenvolumen (Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS)

Probe	e-iso-CTC [ng/L]	iso-CTC [ng/L]	Summe CTC [ng/L]	SFD [ng/L]
Rückstand Landregen 2	115±7	201±4	315±11	n.n.
Rückstand Platzregen 3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

A.4.3.3 Boden

Tab. A34: Gehalt von SFD und CTC im Boden des Versuchs im Labormaßstab (Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS)

Probe aus Bodentiefe		Gehalt [µg/kg TM]	
		Summe CTC	SFD
0-2 cm		78±3	n.n.
2-10 cm		24±2	n.n.
Dotierte Wirkstoffmenge = 100% (bezogen auf dotierte Gülle)		Summe CTC [%]	SFD [%]
Wiederfindung der dotierten Wirkstoffmengen	im Boden	0,70	0
	im Eluat	0,01	0,06
	im Boden + Eluat	0,71	0,06

Tab. A35: Gehalt von SFD und CTC im Boden des Versuchs im halbtechnischen Maßstab
(Mittelwerte aus 3-fach Injektion; HPLC-MS/MS)

Probe aus Bodentiefe		Gehalt [$\mu\text{g/kg TM}$]	
		Summe CTC	SFD
0-5 cm		127 \pm 3	n.n.
5-10 cm		396 \pm 22	10 \pm 1
10-20 cm		195 \pm 3	13 \pm 6
20-30 cm		824 \pm 4	48 \pm 5
30-40 cm		n.n.	n.n.
40-50 cm		n.n.	n.n.
50-60 cm		n.n.	n.n.
Filterkies		n.n.	n.n.
Dotierte Wirkstoffmenge = 100% (bezogen auf dotierte Gülle)		Summe CTC [%]	SFD [%]
Wiederfindung der dotierten Wirkstoffmengen	im Boden	28,0	2,9
	im Eluat	0,002	0
	im Boden + Eluat	28,0	2,9