

**Untersuchung zum Verhalten von Schwermetallen,
Antibiotika und Hormonen in landwirtschaftlich
genutztem Boden**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
vorgelegt von

Madeleine Stefanie Petri
staatl. geprüfte Lebensmittelchemikerin (M.Sc.)
geboren am 24.07.1988 in Hadamar

2018

Gutachter

1. Prof. Dr. Gerd Hamscher
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Prof. Dr. Jan Siemens
Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	I
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK.....	X
ABSTRACT.....	XIII
1 Problematik und Zielstellung.....	1
I. KUPFER & ZINK.....	3
2 Einleitung.....	3
2.1 Kupfer und Zink in Böden.....	3
2.2 Bodendauerbeobachtungsflächen (BDF).....	4
3 Methodenadaption.....	6
4 BDF Analyse.....	7
4.1 Retrospektive Untersuchung.....	7
4.2 Tiefenprofilanalyse.....	9
II. SULFONAMIDE & TETRACYCLINE.....	15
5 Einleitung.....	15
5.1 Zahlen und Fakten.....	15
5.2 Sulfonamide.....	17
5.3 Tetracycline.....	18
5.4 Antibiotikaverteilung in der Umwelt.....	20
5.5 Resistenzmechanismen und Resistenzen in der Umwelt.....	22
6 Methodenentwicklung für Sulfonamide und Tetracycline.....	24
6.1 Einleitung.....	24
6.2 Analyse mittels UHPLC/QTRAP.....	24
6.2.1 UHPLC-Parameter.....	24
6.2.2 QTRAP-Parameter.....	26
6.3 Analyse mittels UHPLC/QTOF.....	27
6.3.1 UHPLC-Parameter.....	27

6.3.2	QTOF-Parameter	28
6.4	Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).....	29
6.4.1	Extraktion mittels kontinuierlichem Durchfluss	30
6.4.2	Einfluss von Puffer und pH-Werten	30
6.4.3	Einfluss der Anzahl der Extraktionszyklen sowie –dauer.....	32
6.4.4	Einfluss der Lösungsmittel.....	33
6.4.5	Extraktion mittels saurer Hydrolyse.....	34
6.5	Festphasenextraktion	35
6.5.1	Sequentielle Elution	35
6.5.2	Einbau eines Waschschrattes.....	38
6.5.3	Variation Probenvolumen	39
6.6	Mikrowellenextraktion.....	40
6.6.1	Einfluss der Extraktionstemperatur	41
6.6.2	Einfluss des Lösungsmittels und Lösungsmittelverhältnis	42
6.6.3	Wiederfindung in gealterten Proben	43
6.7	Vergleich LLE mit der Ultraschallsondenextraktion.....	44
7	Methodenvalidierung	46
7.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion	46
7.2	Vergleich von Sand-, Ton- und Lößboden	54
7.3	Mikrowellenextraktion.....	56
8	Evaluierung der Matrixeffekte	58
8.1	Quantitative Matrixeffekte.....	58
8.2	Qualitative Matrixeffekte.....	62
8.2.1	Auswirkungen der organischen Eluenten	62
8.2.2	Auswirkungen der BDF-Proben und der Leermatrix.....	63
9	Analyse BDF.....	69
9.1	Verhalten von Sulfonamiden.....	69
9.1.1	SGU als Tierarzneimittel	70
9.1.2	Retrospektive Untersuchung	73

9.1.3	Tiefenprofilanalyse.....	76
9.1.4	Vergleich der Rückstandsgehalte im Frühjahr und Herbst.....	79
9.1.5	Identifizierung von Transformationsprodukten.....	80
9.1.6	Methodenvergleich.....	84
9.2	Verhalten von Tetracyclinen.....	87
9.2.1	Retrospektive Untersuchung.....	87
9.2.2	Tiefenprofilanalyse.....	89
9.2.3	Vergleich der Rückstandsgehalte im Frühjahr und Herbst.....	92
9.2.4	Bestimmung von Isochlortetracyclin.....	92
9.2.5	Weitere Transformationsprodukte.....	96
9.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der BDF-Analyse.....	98
III.	ALTRENOGEST.....	102
10	Einleitung.....	102
10.1	Hormone.....	102
10.2	Hormone als Tierarzneimittel.....	102
10.3	Steroidhormone in der Umwelt.....	103
10.4	Literaturstudie.....	104
10.5	Sorptionskoeffizient.....	105
10.6	Analytik von Altrenogest.....	106
11	Methodenentwicklung & -validierung.....	107
11.1	Methodenentwicklung.....	107
11.1.1	UHPLC/QTRAP Methode für Altrenogest.....	107
11.1.2	Flüssig-Flüssig Extraktion.....	107
11.1.3	Festphasenextraktion.....	109
11.1.4	Matrixeffekte.....	110
11.2	Methodenvalidierung.....	111
12	Sorptionsstudie.....	113
12.1	Aufbau.....	113
12.2	Sorptionskoeffizienten.....	113

IV. EXPERIMENTELLER TEIL	119
13 Material.....	119
13.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	119
13.2 Chemikalien	121
13.2.1 Herstellung der Stammlösungen und Mischstandards	124
13.3 Datenauswertung	124
13.4 Probenmaterial.....	124
13.4.1 Kontrollboden.....	124
13.4.2 Bodendauerbeobachtungsfläche „Weser-Ems“	125
13.5 Analysenmethoden	125
13.5.1 UHPLC/QTRAP-Methode für Sulfonamide (SA) und Tetracycline (TCs).....	125
13.5.2 UHPLC/QTOF-Methode für SA und TCs.....	127
13.5.3 UHPLC/QTRAP-Methode für Altrenogest.....	128
13.5.4 UHPLC/QTOF-Methode für <i>Seco</i> -cyclin	129
13.5.5 AAS Messungen der Kupferkonzentrationen in Bodenlösungen	129
13.5.6 DOC-Messungen.....	130
13.5.7 Messung der Kohlenstoffgehalte	130
13.6 Probenvorbereitung.....	130
13.6.1 Bestimmung der Trockenmasse	130
13.6.2 Bestimmung der pH-Werte.....	130
13.6.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion für SA und TCs	130
13.6.4 Mikrowellenextraktion für SA	131
13.6.5 Extraktionsmethoden für Altrenogest	132
13.6.6 Königswasseraufschluss für Kupfer und Zink.....	133
13.6.7 Extraktion mittels Ultraschallsonde.....	134
13.6.8 Kupfer Leachingexperiment im Labormaßstab mit Realproben	135
13.6.9 DOC-Extraktion.....	135
13.6.10 Bestimmung von Huminstoffen in Böden	135
13.6.11 <i>Seco</i> -cyclin-Extraktion.....	135

13.7	Sorptionsstudie Altrenogest	136
13.8	Matrixeffekte	138
13.8.1	Qualitativer Matrixeffekt.....	138
13.8.2	Quantitative Matrixeffekte	138
13.9	Methodenvalidierung.....	138
13.9.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion für SA und Tetracycline	138
13.9.2	Mikrowellenextraktion für SA	141
13.9.3	Extraktion von Altrenogest.....	142
	LITERATURVERZEICHNIS.....	143
	RECHTSGRUNDLAGEN	162
	ANHANG.....	164
	VERÖFFENTLICHUNGEN	209
	DANKSAGUNG	210
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	211

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1: (A) Bodendauerbeobachtungsflächen mit landwirtschaftlicher Nutzung in Niedersachsen. (B) Bodenschichten der untersuchten BDF der Region Weser-Ems © H. Höper, LBEG 2001.	5
Abb. 4.1: Zink- (A) und Kupfergehalte (B) in den Proben der BDF in den Jahren 2001, 2005, 2009 und 2015, im Oberboden (schwarz) und im Unterboden (grau). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung zwischen den Kernflächen dar.....	8
Abb. 4.2: Tiefenprofilanalyse der Zink- (A) und Kupfergehalte (B) in den Jahren 2001 (schwarz) und 2015 (grau). Die Fehlerbalken stellen für 0-30 cm und 30-40 cm die Standardabweichung zwischen den Kernflächen dar und für die tieferen Bodenschichten die Standardabweichungen der Dreifachbestimmung der Mischproben. Die y-Achsen variieren zwischen (A) und (B).	11
Abb. 5.1: Summe der Abgabemengen der antimikrobiellen Grundsubstanz (schwarzer Kreis) sowie Abgabemengen an Tetracyclinen (weißer Kreis) und Sulfonamiden (Dreieck) in den Jahren 2011 bis 2017.	15
Abb. 5.2: Abgabemengen an Fluorchinolonen in den Jahren 2011 bis 2017.	16
Abb. 5.3: Strukturformeln der untersuchten Sulfonamide (N ¹ = Amidstickstoff, N ⁴ = aromatische Aminogruppe).	18
Abb. 5.4: Allgemeine Struktur der Tetracycline (oben) und Isochlortetracyclin (IsoCTC, unten).	20
Abb. 6.1: Flächen von SDZ [%] in Abhängigkeit der variierten Parameter ((A) Zerstäubergas, (B) Temperatur [°C]) im Vergleich zur Ionisierung mittels ESI.	29
Abb. 6.2: Vergleich der Wiederfindungen zwischen wässriger (schwarz) und organischer (grau) (Hamscher <i>et al.</i> , 2002) Extraktion, für 10 Minuten und 10 Tage mit 100 µg/kg Analyten dotierte Proben. Die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.	32
Abb. 6.3: Wiederfindungen der Analyten (Dotierung: 100 µg/kg) ohne (schwarz) und mit (grau) Vorbehandlung mit HCl.	35
Abb. 6.4: Sequentielle Elution von Sulfadiazin für die SPE-Säulen Oasis® HLB (A), HyperSep C18™ (B), Strata™ XL (C), Isololute® ENV+ (D), Chromabond® HR-X (E), Dotierung der Proben mit 100 µg/kg Analyt.	36
Abb. 6.5: Sequentielle Elution von Tetracyclin für die SPE-Säulen HyperSep C18™ (A), Isololute® ENV+ (B), Chromabond® HR-X (C), Dotierung der Proben mit 100 µg/kg Analyt.	38

Abb. 6.6: Wiederfindungen der Analyten mit (schwarz) und ohne (graue) integriertem Waschritt (WS) in der SPE-Methode, bei Proben mit einer Dotierung von 100 µg/kg. Die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.	39
Abb. 6.7: Abhängigkeit der absoluten Wiederfindung aller untersuchten Sulfonamide von der Extraktionstemperatur.....	42
Abb. 6.8: Abhängigkeit der absoluten Wiederfindung der Sulfonamide von dem Verhältnis des Lösungsmittelgemisches (organisch/wässrig; 4:1, 1:1, 1:4, v/v).....	43
Abb. 6.9: Vergleich der absoluten Wiederfindungen der Sulfonamide mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten (schwarz) und 19 Tagen (grau). Die Fehlerbalken stellen die Spannweite dar..	44
Abb. 6.10: Vergleich der absoluten Wiederfindungen der Sulfonamide der hier entwickelten LLE (schwarz) mit einer Ultraschallsondenextraktion (grau). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.....	45
Abb. 8.1: Quantitative Matrixeffekte für Sulfonamide (A,C) und Tetracycline (B,D) mittels QTRAP (oben) und QTOF (unten).....	59
Abb. 8.2: Post-column-Infusion QTRAP-Profil (1 µg/mL) von SMZ (Fragment 108) für Methanol (schwarz) und Leermatrix (rot) mit MeOH und ACN als organischer Eluent. Die y-Achsen sind unterschiedlich.	62
Abb. 8.3: QTRAP Post-column-Infusionsprofile (1 µg/ml) von SDZ (Fragment 108), SMZ (Fragment 108), SDM (Fragment 108), TC (Fragment 154), IsoCTC (Fragment 462), CTC (Fragment 154), für Methanol (schwarz), Leermatrix (rot), BDF-Tiefe 0-10 cm (blau), BDF-Tiefe 30-40 cm (grün), BDF-Tiefe 80-90 cm (türkis), die gestrichelte Linie stellt die Retentionszeit der Analyten dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich.....	65
Abb. 8.4: QTRAP Post-column-Infusionsprofile (1 µg/mL) von SGU (Fragment 108), für Methanol (schwarz), Leermatrix (rot), BDF-Tiefe 0-10 cm (blau), BDF-Tiefe 30-40 cm (grün), BDF-Tiefe 80-90 cm (türkis).....	67
Abb. 8.5: QTOF Post-column-Infusionsprofile (1µg/mL) von SDZ (Fragment 108), SMZ (Fragment 108), SDM (Fragment 108), TC (Fragment 154), IsoCTC (Fragment 462), CTC (Fragment 154), für Methanol (schwarz), verdünnter Leermatrix (rot), BDF-Tiefe 0-10 cm (blau), BDF-Tiefe 30-40 cm (grün), BDF-Tiefe 80-90 cm (türkis), die gestrichelte Linie stellt die Retentionszeit der Analyten dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich.....	68
Abb. 9.1: Strukturformeln von Asulam (links) und Sulfanilamid (rechts).....	71
Abb. 9.2: Auszug einer möglichen Metabolisierung von Imidacloprid in Pflanzen nach Sur (2003), Strukturformeln von SDZ, SMZ und SGU.....	72

- Abb. 9.3: Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] von SDZ, SGU und SMZ im Oberboden (0-30 cm) im Verlauf der Jahre (von links nach rechts) 2001, 2005, 2009 und 2015, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Mittelwerte wurden aus den Kernflächen K1-K4 sowie von den einzelnen Bodenschichten 0-10 cm, 10-20 cm und 20-30 cm gebildet. Die Gehalte von SDZ sind $< \text{BG (7d)}$ aber $> \text{BG (10 min)}$ 75
- Abb. 9.4: Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] von SDZ (schwarz), SGU (hellgrau) und SMZ (dunkelgrau) in den verschiedenen Bodenschichten von 0-50 cm in den Proben aus 2017. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der vier Kernflächen da. Die mit * gekennzeichneten Gehalte sind $< \text{BG (7d)}$ aber $> \text{BG (10 min)}$, die mit # gekennzeichneten Gehalte sind $< \text{BG (10 min)}$ aber $> \text{NWG (10 min)}$ 77
- Abb. 9.5: Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] von SDZ, SGU, SMZ in Abhängigkeit der Jahreszeit (F = Frühling, H = Herbst, 08 = 2008, 09 = 2009) im Oberboden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Mittelwerte wurden aus den Kernflächen K1-K4 sowie von den einzelnen Bodenschichten 0-10 cm, 10-20 cm und 20-30 cm gebildet. Die Gehalte von SDZ sind $< \text{BG (7d)}$ aber $> \text{BG (10 min)}$ 80
- Abb. 9.6: Allgemeine Strukturformel von N^4 -acetylierten Sulfonamiden (für R siehe Abb. 5.3)... 81
- Abb. 9.7: Strukturformeln von 4-OH-SDZ, 4-(2-iminopyrimidin-1(2H)-yl)anilin und 2-aminopyrimidin (von links nach rechts). 81
- Abb. 9.8: SDZ- (schwarz) und 4-OH-SDZ -Gehalte (grau) im Oberboden der Jahre 2001,2005,2009,2015 und 2017. * 4-OH-SDZ Gehalt im Jahr 2001 $< \text{BG}$ aber $> \text{NWG}$ SDZ. SDZ Gehalte (Jahre 2001-2015) der LLE Fraktion sind $< \text{BG (7d)}$ aber $> \text{BG (10 min)}$ 83
- Abb. 9.9: Vergleich der mittels MWE (schwarz) und LLE (grau) ermittelten Gehalte im Oberboden für SGU, SDZ und SMZ für die Jahre 2001, 2005, 2009 und 2015, SDZ Gehalte der LLE Fraktion sind $< \text{BG (7d)}$ aber $> \text{BG (10 min)}$, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich..... 85
- Abb. 9.10: (A) Mittelwerte der Tetracyclinegehalte im Oberboden in den Jahren 2001, 2005, 2009, 2015; Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Bodenschichten und Kernflächen dar; (B) Vergleich der Tetracyclinegehalte in den einzelnen Schichten im Oberboden im Jahr 2001 (grau) mit den Gehalten 2001* nach Hamscher *et al.* (2005a) (schwarz); die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der vier Kernflächen dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich. 88
- Abb. 9.11: TC-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in den Proben aus 2017 in den einzelnen Bodenschichten von 0-60 cm. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der vier Kernflächen da, n.d.: nicht detektiert..... 91

Abb. 9.12: TC-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in Abhängigkeit der Jahreszeiten (Frühjahr 2008, Herbst 2008, Frühjahr 2009) im Oberboden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Schichten des Oberbodens und der Kernflächen dar.....	92
Abb. 9.13: Isomerisierung von CTC (links) in IsoCTC (rechts).	93
Abb. 9.14: Strukturformeln <i>Seco-cyclin</i> (links) und <i>Hemi-cyclin</i> (rechts) nach Shang <i>et al.</i> (2016).	97
Abb. 10.1: Strukturformel von Cholesterol, Testosteron und Altrenogest (von links nach rechts).	102
Abb. 11.1: Absolute Wiederfindung für die Extraktion von Altrenogest aus Boden mit ACN, ACN/MeOH, Aceton/MeOH und ACN/Citratpuffer mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.	108
Abb. 11.2: Absolute Wiederfindung für die Extraktion von Altrenogest aus Wasser mittels SPE mit ACN, ACN+ 5 % Ammoniakwasser, EAC und MeOH mit 0,1 % Ameisensäure (AS) für die Kondition und Elution.....	109
Abb. 11.3: Ergebnisse der Altrenogest Post-Column Infusion mit Methanol (gestrichelte Linie) und Leermatrix (durchgezogene Linie), (Massenübergang 311,2 \rightarrow 227,3, Konzentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).....	110
Abb. 12.1: Prozentualer Anteil von Altrenogest im Boden (Kreis), in der wässrigen Phase (Dreieck) und insgesamt (Viereck) über 28 Tage in Ansatz AB (links) und Ansatz B (rechts), die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.....	114
Abb. 12.2: K_D -Werte von Altrenogest im Ansatz AB (schwarzer Punkt) und im Ansatz B (weißer Punkt) über 28 Tage, die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.....	115
Abb. 12.3: Strukturformeln von 17 α -Trenbolon (links) und Altrenogest (rechts).	117
Abb. 13.1: Aufbau der Sorptionsstudie von Altrenogest für Ansatz AB und B.....	136

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3.1: Kupfer- und Zinkgehalte und Unsicherheiten des BAM-Referenzbodens sowie Mittelwerte und Variationskoeffizienten V_K der Bestimmung im LHL und in dieser Arbeit (JLU)..6	
Tab. 4.1: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Mittelwerte von Kupfer und Zink im Ober- und Unterboden in den Jahren 2001,2005, 2009 und 2015. Die Buchstaben beziehen sich jeweils auf eine Spalte.....9	9
Tab. 4.2: Vergleich der absoluten und wasserlöslichen Kupfergehalte, sowie der prozentuale Anteil der wasserlöslichen Kupfergehalte von der absoluten Menge, in den verschiedenen Bodentiefen. 13	13
Tab. 4.3: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Kupfer- und Zinkgehalte zwischen den Jahren 2001 und 2015, in den einzelnen Schichten des Unterbodens ab einer Bodentiefe von 40 cm. ... 13	13
Tab. 6.1: Für die Extraktion untersuchte Puffer und jeweiligen Salze mit Konzentrationen, EDTA-Zusatz und pH-Wert. 31	31
Tab. 6.2: Versuchsparameter der MWE-Methodenadaption. 41	41
Tab. 7.1: Nachweis -und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Analyten in den Lösungsmittelstandards und im Boden nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF..... 47	47
Tab. 7.2: Obere Linearitätsgrenzen der einzelnen Analyten der Lösungsmittelkalibrierung sowie der In-Matrix-Kalibrierung nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF..... 48	48
Tab. 7.3: Bestimmtheitsmaße der einzelnen Analyten der Lösungsmittelkalibrierung sowie der In-Matrix-Kalibrierung nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF. 49	49
Tab. 7.4: Präzision der Lösungsmittelstandards sowie Intra- und Interday-Präzision der einzelnen Analyten nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF..... 51	51
Tab. 7.5: Absolute Wiederfindung der einzelnen Analyten nach 10 Minuten, 7 Tagen sowie 14 Tagen (IST 7 Tage) für die Analyse mittels QTRAP und QTOF. 53	53
Tab. 7.6: V_K von Sulfonamiden und Tetracyclinen von Ton-, Sand- und Lößboden. 54	54
Tab. 7.7: Zusammenfassung der Parameter für die Methodvalidierung der MWE für Sulfonamide..... 57	57
Tab. 8.1: DOC-Gehalte sowie Huminstoff- und Huminsäuregehalte in der Leermatrix und in den Bodentiefen 0-10 cm, 30-40 cm und 80-90 cm der BDF. 63	63

Tab. 9.1: Gefundene SMZ-Gehalte in Böden.....	75
Tab. 9.2: Theoretische und experimentell bestimmte Massen von 4-OH-SDZ und drei spezifischen Fragmenten.....	82
Tab. 9.3: Vergleich der ermittelten SMZ-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] der Frühjahrproben aus dem Jahr 2002.	86
Tab. 9.4: Ermittelte IsoCTC-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in den einzelnen Kernflächen im Oberboden der BDF in den Jahren 2001, 2009, 2015 und 2017 und im Unterboden im Jahr 2017.....	94
Tab. 9.5: Theoretische und experimentell bestimmte Massen von <i>Seco-cylin</i> und drei spezifischen Fragmenten.....	98
Tab. 9.6: Nachweis der einzelnen Analyten (SGU, SDZ, 4-OH-SDZ, SMZ, TC und IsoCTC) in den untersuchten Jahren (2001, 2002, 2005, 2008 Frühjahr, 2009 Herbst, 2015, 2017) im Ober- und Unterboden.....	101
Tab. 10.1: Log- K_{OC} -Werte für verschiedene natürliche und synthetische Steroidhormone.....	106
Tab. 11.1: Untersuchte Lösungsmittel und -Gemische sowie Puffer für die Extraktion von Altrenogest.	108
Tab. 11.2: Ergebnisse der Methodvalidierung zur Extraktion von Altrenogest aus der wässrigen Phase und Bodenmatrix sowie die Ergebnisse der Lösungsmittelkalibrierung.....	111
Tab. 12.1: Auflistung der bestimmten K_{D} , K_{OC} , und log- K_{OC} -Werte zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten in Ansatz AB und B.	116
Tab. 13.1: Bezeichnung, Abkürzung, Molekülmasse, Struktur und Zuordnung der internen Standards der Sulfonamide.....	122
Tab. 13.2: Bezeichnung, Abkürzung, Molekülmasse, Struktur und Zuordnung der internen Standards der Tetracycline.....	123
Tab. 13.3: Bezeichnung, Abkürzung, Molekülmasse, Struktur der Hormone.....	123
Tab. 13.4: UHPLC-Gradient für die Analyse von SA und TCs mittels UHPLC/QTRAP.....	125
Tab. 13.5: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von SA mittels QTRAP.....	126
Tab. 13.6: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von Tetracyclinen mittels QTRAP.....	127
Tab. 13.7: UHPLC-Gradient für die Analyse von SA und TCs mittels UHPLC/QTOF.....	127
Tab. 13.8: UHPLC-Gradient für die Analyse von Altrenogest mittels UHPLC/QTRAP.	128

Tab. 13.9: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von Altrenogest (Alt) und Progesteron (Pro) mittels QTRAP.....	128
Tab. 13.10: UHPLC-Gradient für die Analyse von <i>Seco-cylin</i> mittels UHPLC/QTOF.....	129
Tab. 13.11: AAS-Temperaturprogramm für die Bestimmung von Kupfer.....	129
Tab. 13.12: ICP-OES und ICP-MS Parameter.....	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ALT	Altrenogest
amu	Atomare Masseneinheit (atomic mass unit)
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionization)
AS	Ameisensäure
BG	Bestimmungsgrenze
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CE	Kollisionsenergie (collision energy)
CEP	Eintrittspotential in Kollisionszelle (cell entrance potential)
cps	Zählungen pro Sekunde (counts per second)
CTC	Chlortetracyclin
CXP	Austrittspotential aus Kollisionszelle (collision exit potential)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DP	Declustering-Potential
DOXY	Doxycyclin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA/EMEA	European Medicines Agency
EP	Eintrittspotential (entrance potential)
Epi	Epimer
ESI	Elektrospray-Ionisation (electrospray ionization)
FDA	Food and Drug Administration
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
IST	Interner Standard
Iso CTC	Isomerisiertes Chlortetracyclin
LBEG	Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie
LHL	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction)
ME	Matrixeffekt
MeOH	Methanol
MRM	multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert

MWE	Mikrowellenextraktion
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungsverhältnis
NaOH	Natronlauge
NWG	Nachweisgrenze
OTC	Oxytetracyclin
PCI	Post-column-Infusion
Pro	Progesteron
QTRAP	Triple-Quadrupol mit linearer Ionenfalle
QTOF	Quadrupol mit nachgeschaltetem Flugzeitmassenspektrometer
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
SA	Sulfonamide
SCY	Sulfachloropyridazin
SDZ	Sulfadiazin
SDM	Sulfadimethoxin
SGU	Sulfaguanidin
SMPD	Sulfamethoxyypyridazin
SMR	Sulfamerazin
SMX	Sulfamethoxazol
SMZ	Sulfamethazin
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPY	Sulfapyridin
STZ	Sulfathiazol
S/N	Signal zu Rauschverhältnis
TC	Tetracyclin
TCs	Tetracycline
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigchromatographie
VO	Verordnung
WDF	Wiederfindung

ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

Die intensive Tierhaltung in Deutschland bedingt einen hohen Einsatz von Pharmazeutika wie Antibiotika und für Zuchtzwecke auch von Hormonen. Aber nicht nur Pharmazeutika, sondern auch Schwermetalle wie Kupfer und Zink, werden den Tieren über das Futtermittel in Mengen oberhalb des physiologischen Bedarfs verabreicht. Sowohl ein hoher Anteil unverändert ausgeschiedener Pharmazeutika, als auch eine unvollständige Aufnahme der Schwermetalle im Tier, führen zu einer erhöhten Konzentration dieser Substanzen in Wirtschaftsdüngern. Die unausweichliche Folge ist ein dauerhafter Eintrag in die Umwelt. Die Auswirkungen auf diese Flächen werden durch das Beprobieren von Bodendauerbeobachtungsflächen (BDF) untersucht und ermöglichen einen retrospektiven Einblick über Jahrzehnte. Eine BDF der Region Weser-Ems in Niedersachsen wurde hier im Detail untersucht, da hier seit vielen Jahren mit Schweinegülle gedüngt wird.

Für die Bestimmung von Kupfer und Zink in landwirtschaftlich genutztem Boden wurde ein mikrowellenunterstützter Königswasseraufschluss etabliert. Die Messung der Proben erfolgte mittels induktiv gekoppeltem Plasma gekoppelt mit Massenspektrometrie (ICP-MS). Anhand gezielter Probenauswahl der BDF wurden die Konzentrationen von Kupfer und Zink im Oberboden (0-30 cm) über einen Zeitraum von 14 Jahren bestimmt. Zusätzlich wurde das Verhalten der beiden Schwermetalle im Unterboden (ab 30 cm), in 10 cm Abständen bis zu einer Tiefe von 90 cm, untersucht. Insgesamt wurden im Oberboden Gehalte für Zink von maximal 21,2 mg/kg und für Kupfer 13,1 mg/kg bestimmt. Anhand der Tiefenprofile konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Schwermetalle ein unterschiedliches Verhalten im Boden zeigen: Zink weist im Vergleich zu Kupfer eine höhere Mobilität auf. Eine durchgängige Zunahme der Gehalte in den einzelnen Bodenschichten über 14 Jahre hinweg konnte nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen auf eine Sättigung der Bodenmatrix mit Kupfer und Zink hin. Eine Auswaschung in das Grundwasser kann nicht ausgeschlossen werden.

Vor allem die Antibiotikaklassen Sulfonamide und Tetracycline finden eine große Anwendung in der Veterinärmedizin. In dieser Arbeit wurde daher eine effektive Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) zur simultanen Bestimmung der Substanzen in gealtertem, landwirtschaftlich genutztem Boden entwickelt und validiert. Dabei wurden die unterschiedlichen physikalischen sowie analytischen Anforderungen der Substanzklassen erfolgreich in die Methode integriert. Da Sulfonamide für die Bildung nicht-extrahierbare Rückstände in Böden bekannt sind, wurde zusätzlich eine harsche Extraktionsmethode mittels Mikrowellenextraktion etabliert und validiert. Die Konzentrierung und Reinigung der Extrakte erfolgte mittels Festphasenextraktion.

Die Validierung des Analysenverfahrens erfolgte an zwei unterschiedlichen LC-MS Systemen (UHPLC-QTRAP, UHPLC-QTOF) mit einem nicht kontaminierten Kontrollboden. Da hauptsächlich gealterte Proben untersucht wurden, erfolgte die Validierung mit simulierten gealterten Proben. Hierzu wurden die Proben zunächst für 10 Minuten und 7 Tage mit den Referenzverbindungen dotiert. Dabei konnte aufgrund der Interaktion der Analyten mit der Bodenmatrix bei längerer Inkubationszeit eine Erhöhung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, eine verringerte Präzision, sowie eine Abnahme der Wiederfindungsrate beobachtet werden. Daher mussten für die Quantifizierung gealterte Proben simuliert und deren Wiederfindung bestimmt werden. Die Matrixeffekte wurden für die Proben der BDF, sowie für den Kontrollboden, an beiden MS Systemen evaluiert. Zur Kompensation der auftretenden Matrixeffekte wurden isotope markierte Sulfonamide als interne Standards eingesetzt. Da für Tetracycline keine isotope markierten Standards zur Verfügung standen, wurden für die untersuchten Verbindungen ebenfalls die isotope markierten Sulfonamide herangezogen. Die Anwendbarkeit des Extraktions- und Messverfahrens auf verschiedene Bodenarten (Sand, Löss und Ton) wurde getestet und ist gegeben.

Die retrospektive Untersuchung der BDF auf Sulfonamide und Tetracycline umfasst einen Zeitraum von 16 Jahren. Dabei wurden die Sulfonamide Sulfaguanidin (SGU), Sulfadiazin (SDZ) und Sulfamethazin (SMZ) mittels LLE und Mikrowellenextraktion (MWE) nachgewiesen. Insgesamt wurden mittels Mikrowellenextraktion durchweg höhere Gehalte bestimmt. Die Gehalte von SDZ und SMZ in gealterten Proben sind für beide Methoden im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ Bereich einzuordnen. Für SGU konnten im Oberboden Gehalte bis zu $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ mittels LLE und bis zu $170 \mu\text{g}/\text{kg}$ mittels MWE in frischen Proben bestimmt werden. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Über die 16 Jahre hinweg zeigte sich ein konstanter Gehalt für SDZ und eine Abnahme von SMZ. Für das Verhalten von SGU kann keine genaue Aussage getroffen werden, da die Werte über 16 Jahre hinweg einer größeren Schwankung unterliegen. Die Eintragsquelle für SGU ist, im Vergleich zu SDZ und SMZ, nicht bekannt, da in Deutschland kein Tierarzneimittel mit dem Wirkstoff SGU zugelassen ist. In weiterführenden Arbeiten sollte die Quelle eindeutig identifiziert werden, um einen möglicherweise unbewussten Eintrag antimikrobieller Substanzen zu vermeiden.

Anhand des Tiefenprofils konnte für SMZ und SGU eine Auswaschung in tiefere Bodenschichten festgestellt werden. SDZ zeigte hingegen keine Verlagerung. Der Metabolit 4-OH-SDZ konnte ebenfalls identifiziert und halbquantitativ bestimmt werden. Diese Verbindung zeigte ein ähnliches Umweltverhalten wie die Muttersubstanz SDZ.

Mittels LLE konnte weiterhin Tetracyclin in den Proben der BDF nachgewiesen werden. In frischen Proben konnte im Oberboden ein Tetracyclin-Gehalt bis zu $1 \text{ mg}/\text{kg}$ bestimmt werden.

Über die 16 Jahre hinweg wurde ein leicht steigender Gehalt im Oberboden beobachtet. Die Ergebnisse des Tiefenprofils verdeutlichen, dass Tetracyclin im Oberboden verbleibt. Ein Vergleich der Gehalte aus dem Jahr 2001 mit den damaligen bestimmten Gehalten zeigt, dass die Tetracyclin-Gehalte über 15 Jahre hinweg stabil geblieben sind, obwohl keine Konservierung der Proben erfolgte. In den Proben konnten weiterhin zwei Transformationsprodukte von Tetracyclinen nachgewiesen werden. Isochlortetracyclin, das Transformationsprodukt von Chlortetracyclin, sowie *Seco*-cyclin, entstanden aus Tetracyclin. Die Sulfonamid- und Tetracyclin-Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Antibiotika möglicherweise stabiler sind als bisher vermutet. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse die Komplexität der Vorgänge, welche im Boden stattfinden und dass keine allgemeingültigen Aussagen hinsichtlich des Umweltverhaltens einzelner Antibiotika oder Antibiotikaklassen getroffen werden können. Da selbst Substanzen einer Antibiotikaklasse ein unterschiedliches Verhalten aufweisen können, führt kein Weg an Einzelstoffuntersuchungen vorbei.

Eine Literaturstudie verdeutlichte, dass auch in der Veterinärmedizin verwendete Hormone möglicherweise Umweltrelevanz besitzen. In dieser Studie konnte für das synthetische Hormon Altrenogest, das zur Brunftsynchronisation bei Zuchtsauen eingesetzt wird, zumindest eine lokale Bedeutung erkannt werden. Als Konsequenz dieser Erkenntnis wurde eine 28-tägige Sorptionsstudie durchgeführt, da bisher nur wenige Informationen über das Verhalten von Altrenogest in der Umwelt bekannt sind. Dafür wurde sowohl eine Extraktionsmethode für wässrige Proben als auch für Bodenproben entwickelt und validiert. Im Labormaßstab wurde anschließend in einem Wasser/Boden-System das Verhalten von Altrenogest untersucht. Zur Abschätzung des Umweltverhaltens wurden der K_D -, sowie der K_{OC} - beziehungsweise der \log - K_{OC} -Wert bestimmt. Diese weisen auf eine hohe Affinität von Altrenogest zu der Bodenphase hin. Spuren von Altrenogest im Wasserpfad sind aber durchaus denkbar. Eine mögliche Akkumulation in Böden, die vor allem mit Wirtschaftsdünger von Zuchtsauen bewirtschaftet werden, kann demnach nicht ausgeschlossen werden.

ABSTRACT

Intensive animal husbandry in Germany requires a large quantity of pharmaceuticals such as antibiotics and to lesser extent hormones for breeding. Also huge amounts of copper and zinc are administered far above the physiological need. The excretion of non-metabolized pharmaceuticals as well as an incomplete uptake of heavy metals leads to high concentrations in manure. By spreading liquid manure on agricultural fields, a permanent entry of the compounds into the environment is performed. The effect on soils may be observed by the investigation of long-term soil monitoring areas. They ensure a retrospective examination of the behavior of the pharmaceuticals. Thus, one of these areas located in Lower Saxony was analysed in detail within this study because it has been fertilized with manure from pigs since decades.

For the determination of copper and zinc in agricultural soil, a microwave assisted aqua regia digestion was established. The measurement was carried out by ICP-MS. In specific samples of the long-term soil monitoring area, the concentrations of copper and zinc in topsoil (0-30 cm) were determined over a period of 14 years. In addition, the behavior of the two heavy metals in horizon B (start at 30 cm) to a depth of 90 cm was examined in layers of ten centimeter intervals. The maximum concentration of zinc found in topsoil was 21.1 mg/kg. The maximum concentration of copper was 13.1 mg/kg. Both metals show a different behavior in soil: Zinc was quite mobile, whereas copper was immobile. A durable increase of heavy metal concentrations in the individual soil layers was not observed over a period of 14 years. The results indicate a saturation of the soil matrix with copper and zinc. Consequently, leaching to groundwater is possible.

Sulfonamides and tetracyclines are still used in large amounts in veterinary medicine. In this study, an effective liquid-liquid extraction method was developed and validated for the simultaneous determination of the antibiotics in aged, agricultural soil. The different physical and analytical requirements of these analytes were considered in the new extraction method. Because sulfonamides tend to form non-extractable residues in soils, a harsh extraction method using microwave extraction was established and subsequently validated. Enrichment of the analytes and sample clean-up was carried out by solid phase extraction.

The validation of the analytical method was carried out with two different LC-MS systems (UHPLC-QTRAP, UHPLC-QTOF) employing a control soil. For this purpose, different aged soil samples were used. Therefore, analyte spiked samples were incubated for 10 minutes and 7 days. For longer aged soil samples (7 days), an increase of detection and quantification limits was observed, due to the strong interaction of the analytes with soil matrix. In addition, precision and recovery rates decreased. For quantification, aged samples were prepared in

order to determine the corresponding recoveries. Matrix effects were evaluated for both MS systems, using long-term soil monitoring area samples as well as for the control soil. Due to matrix effects, several isotope-labeled sulfonamides were used as internal standards. However, isotope-labeled tetracyclines were not affordable. Therefore, the measurements of the tetracyclines were also realised with isotope-labeled sulfonamides. Furthermore, the liquid-liquid extraction procedure was applied to different soil types (sand, loess and clay) and its general applicability was confirmed.

The retrospective study was performed over a period of 16 years to determine the behavior of sulfonamides and tetracyclines in soil. Sulfaguanidine, sulfadiazine and sulfamethazine were detected by liquid-liquid extraction and microwave extraction. Overall, higher amounts were determined by microwave extraction. The results of both methods showed for sulfadiazine and sulfamethazine concentrations in the lower $\mu\text{g}/\text{kg}$ range in aged soil. In fresh samples, sulfaguanidine concentrations in topsoil up to $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ were found by liquid-liquid extraction. The concentrations via microwave extraction reached concentrations up to $170 \mu\text{g}/\text{kg}$. The results of both methods showed comparable results. Stable concentrations of sulfadiazine and a decrease of sulfamethazine concentrations over the years were observed. No precise statement can be made about the behavior of sulfaguanidine. In Germany no veterinary drug with sulfaguanidine as active compound is approved. Thus, the source of sulfaguanidine, in contrast to sulfamethazine and sulfadiazine, is unknown. In future work, the source should be identified to avoid any unintended entry of antimicrobial substances.

Based on the depth profile, sulfamethazine and sulfaguanidine were found to leach into deeper soil layers, whereas sulfadiazine showed no leaching. In addition, the transformation product 4-OH-SDZ was identified and determined semi quantitatively. It shows a similar behavior in the environment as the parent substance sulfadiazine.

Beside sulfonamides also tetracycline was detected in the samples after liquid-liquid extraction. In fresh samples, tetracycline concentrations up to $1 \text{ mg}/\text{kg}$ were determined in topsoil. Slightly increased concentrations were observed over the 16 years. The results of the depth profile confirm, that tetracycline remains in topsoil. A comparison between recently determined concentrations, with that of samples analysed 2001, shows, that stable tetracycline concentrations, although no preservation of the samples was performed. Furthermore, isochlortetracycline, a transformation product of chlortetracycline, and *seco*-cycline, a transformation product of tetracycline, were found.

These results indicate that some antibiotics may be even more stable than suspected. Furthermore, the results illustrate the complexity of processes taking place in soil. No general statement can be made about antibiotics or classes of antibiotics, since even single substances of

an antibiotic class may show different behavior. To sum it up, individual studies are still necessary for each compound.

A literature review illustrates that in veterinary medicine hormones may also play an environmental role. The study identified a local importance for the synthetic hormone altrenogest, used for synchronization of the rut of sows. The study came to the conclusion that more information about the environmental behavior of altrenogest would be desirable. Therefore, an extraction method for aqueous samples and a method for the extraction of soil samples were developed and validated. The behavior of altrenogest was subsequently investigated in a water/soil system for 28 days in a laboratory scale. To predict the environmental behavior, K_D , K_{OC} and the corresponding $\log K_{OC}$ were determined. The results indicate a high affinity of altrenogest to the soil phase. A potential accumulation in soils, which are fertilized by liquid manure of breeding sows, cannot be excluded. Furthermore, trace concentrations of altrenogest in the water pathway may also occur.

1 Problematik und Zielstellung

In der intensiven Tierhaltung finden neben Antibiotika auch bestimmte Spurenelemente eine große Verwendung. In der Tierzucht ist auch die Verwendung natürlicher und synthetischer Hormone in bestimmten Fällen erlaubt. Das Umweltkompartiment Boden erfährt daher, vor allem bei landwirtschaftlicher Nutzung, eine dauerhafte Belastung mit diesen vielfältigen Stoffklassen über die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern

Insbesondere die Spurenelemente Kupfer und Zink werden Futtermitteln als Zusatzstoffe zugesetzt. Dabei steht nicht nur der ernährungsphysiologische Bedarf der Tiere im Vordergrund, sondern auch eine antimikrobielle Wirkung, die in leistungssteigernden Effekten resultieren kann. Die Mengen die eingesetzt werden überschreiten letztlich nicht die festgelegten Höchstmengen. Da diese jedoch über dem eigentlichen ernährungsphysiologischen Bedarf liegen können, führt der übermäßige Gebrauch zu erhöhten Konzentrationen in landwirtschaftlichem Dünger (Windisch, 2002). Dieses Problem wurde bereits erkannt und durch die Vorgaben der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung für die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern reglementiert. Eine Untersuchung der Spurenelementgehalte und ihr Verhalten im Boden ist dennoch geboten. Dafür sollten in dieser Arbeit Kupfer- und Zinkkonzentrationen im Verlauf von mehreren Jahren in Proben einer BDF bestimmt werden. Weiterhin sollte eine mögliche Akkumulation von Kupfer und Zink in den unterschiedlichen Bodentiefen untersucht werden.

Antibiotika dürfen in der EU, nach VO (EG) Nr. 1831/2003 Art. 11, Abs. 2, seit 2006 nicht mehr als Leistungsförderer eingesetzt werden. Auch die prophylaktische Therapie mit Antibiotika ist verboten. Der Einsatz von Antibiotika erfährt unter anderem wegen dieser regulatorischen Maßnahmen einen rückläufigen Trend in den letzten Jahren, jedoch gelangen durch die Ausbringung von landwirtschaftlichem Dünger immer noch hohe Mengen dieser Substanzen auf Böden. Dabei handelt es sich meist um Böden, die bereits seit vielen Jahren mit Antibiotika, wie den Sulfonamiden und Tetracyclinen, belastet sind. Der Einsatz sollte demnach weiterhin kritisch betrachtet werden, vor allem im Hinblick auf die Auswirkungen auf die Umwelt (BVL, 2018a; Sarmah *et al.*, 2006). Daher sollte eine geeignete Extraktionsmethode für die Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen in gealterten Bodenproben, sowie eine MWE für Sulfonamide, entwickelt und validiert werden. Dabei sollten Matrixeffekte evaluiert werden und die Anwendbarkeit der Methode auf Böden unterschiedlicher Zusammensetzung untersucht werden. Das Verhalten und die Gehalte der beiden Antibiotikaklassen in Boden sollte, anhand von Proben der BDF, mit der entwickelten Methode untersucht werden. Gegebenenfalls vorhandene Transformationsprodukte sollten identifiziert werden.

Hormone werden seit langem für verschiedene Zwecke wie Brunstsynchronisierung oder Embryotransfer bei Tieren, die nicht zur Mast dienen, eingesetzt (Kroker, 2010a). Im Unterschied zu Antibiotika sind Hormone aber nicht in den Blickpunkt der Öffentlichkeit geraten. Lediglich das synthetische Hormon Altrenogest, welches in der Schweinehaltung eingesetzt wird, rückte durch Medienberichte im Jahr 2014 kurzzeitig, aufgrund einer BUND-Studie (Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland) zum Einsatz von Hormonen in der intensiven Sauenhaltung, in den Mittelpunkt des Interesses (Hörning, 2013; Schulte von Drach, 2014). Eine Veröffentlichung von Abgabemengen, wie sie es bei den Antibiotika seit einigen Jahren gibt, existiert bei Hormonen nicht. Bekannt ist, dass die synthetischen Hormone im Vergleich zu endogenen Hormonen eine stärkere Wirksamkeit und eine längere Halbwertszeit aufweisen (Ebert *et al.*, 2010) und damit ein mögliches Umweltrisiko darstellen können.

Mit Durchführung einer Literaturstudie sollte das Umweltverhalten von Hormonen in der Tierhaltung untersucht werden und mengenmäßig relevante Hormone identifiziert werden. Für die Bestimmung der relevanten Hormone sollten die notwendigen Extraktionsmethoden für feste sowie flüssige Proben entwickelt und validiert werden. Mit Durchführung einer Sorptionsstudie sollte das Umweltverhalten im Boden näher untersucht werden.

Insofern sollten in dieser Arbeit für sehr unterschiedliche Stoffklassen umfassende Erkenntnisse gewonnen werden, die für eine Abschätzung einer möglicherweise ökotoxikologischen Gefährdung des Bodens von Relevanz sind. In diesem Zusammenhang sind u.a. die Akkumulation von Schadstoffen, die Induktion von Antibiotikaresistenzen aber auch die Kontamination des Grundwassers zu nennen.

I. KUPFER & ZINK

2 Einleitung

2.1 Kupfer und Zink in Böden

Boden ist ein komplexer Zusammenschluss aus anorganischen und organischen Komponenten. Zu den Hauptelementen in Boden zählen vor allem Sauerstoff, Silizium, Aluminium, Eisen, Kohlenstoff, Calcium, Kalium, Natrium sowie Magnesium (Sparks, 2003). Die Gehalte von Kupfer in Böden liegen im Mittel bei 25 mg/kg Boden. Zink kommt dagegen, mit einem Mittelwert von 60 mg/kg, in größeren Mengen in Böden vor (Sparks, 2003).

Die Bestimmung von Kupfer- und Zinkgehalten in Böden unterliegt einer besonderen Betrachtung. Denn sie gehören zu den essenziellen Spurenelementen und steigern u.a. das Wachstum vieler Organismen. Weiterhin besitzen sie prophylaktische Effekte bei Darmerkrankungen. Aufgrund dieser positiven Effekte werden sie den Nutztieren möglicherweise als Antibiotika-Alternative in erhöhten Mengen über das Futtermittel verabreicht. Nach Aufnahme werden sie wieder größtenteils ausgeschieden und gelangen so auf die landwirtschaftlichen Böden (Windisch, 2002; Zethner *et al.*, 2007). In VO (EG) Nr. 1334/2003 wurden Höchstgehalte für Futtermittel festgesetzt. Kupfer und Zink werden hauptsächlich in der Schweinezucht verwendet. Für Schweine sind demnach für Kupfer 25 mg/kg Futtermittel sowie für Zink 150 mg/kg Futtermittel zugelassen. Futtermittel für bis zu 12 Wochen alte Ferkel stellen eine Ausnahme dar. Hier gilt ein Gehalt bis zu 170 mg/kg Futtermittel. Empfohlene Gehalte zur Sicherstellung der Versorgung der Tiere mit den Spurenelementen liegen für Zink zwischen 50 und 100 mg/kg und für Kupfer zwischen 3 und 10 mg/kg (Windisch, 2002).

Diese Art der Verwendung bedingt erhöhte Gehalte in den Wirtschaftsdüngern. Mantovi *et al.* (2003) untersuchten die zur Düngung verwendete Schweinegülle und bestimmten dort Kupfergehalte von 250-800 mg/kg Trockenmasse sowie Zinkgehalte von 600-1000 mg/kg Trockenmasse. Hölzel *et al.* (2012) bestimmten in Schweinegülle ähnlich hohe Schwermetallkonzentrationen. Der Kupfergehalt schwankte dort in dem Bereich von 22-3388 mg/kg Trockenmasse und der Zinkgehalt im Bereich von 93-8239 mg/kg Trockenmasse.

Die Schwermetallgehalte in Böden schwanken je nach Bodenart und -zusammensetzung. Eintragsquellen sind, neben dem Wirtschaftsdünger, auch atmosphärische Depositionen, Düngemittel, Auto-Emissionen, Industrieabwässer, Kalk oder Pestizide, aber auch die geologische Erosion (Sparks, 2003). In Waldböden, mit keinem oder nur geringem

anthropogenen Einfluss, bestimmten Rékási und Filep (2015) einen durchschnittlichen Kupfergehalt von 10 ± 8 mg/kg sowie einen Zinkgehalt von 45 ± 24 mg/kg. Einflussfaktoren auf die Schwermetallgehalte gibt es viele, so dass die Gehalte natürlichen Schwankungen unterliegen. Ein Zusammenhang mit der Landwirtschaft ist dennoch erkennbar. De Conti *et al.* (2016) bestätigten mit ihrer Studie, dass das wiederholte Aufbringen von kontaminierter Schweinegülle zu einer Erhöhung der Kupfer- und Zinkgehalte in der Bodenoberfläche (5 cm) führen kann. Dabei beobachteten sie einen Anstieg des Kupfergehaltes von unter 10 mg/kg bis hin zu 80 mg/kg und einen Anstieg von unter 30 mg/kg auf über 100 mg/kg des Zinkgehaltes. Auch Mantovi *et al.* (2003) stellten einen Zusammenhang zwischen der Aufbringung von Wirtschaftsdünger und einer Erhöhung der Gehalte an Kupfer und Zink fest. Die Autoren bestimmten für landwirtschaftlich genutzte Bodenflächen einen Kupfergehalt von 50 bis 220 mg/kg sowie einen Zinkgehalt von 90 bis 150 mg/kg. Die Gehalte sind vergleichbar mit den Ergebnissen von De Conti *et al.* (2016).

2.2 Bodendauerbeobachtungsflächen (BDF)

Nach §8 Abs. 2 Nr. 1 Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG) sind Vorsorgewerte „Bodenwerte, bei deren Überschreiten unter Berücksichtigung von geogenen oder großflächig siedlungsbedingten Schadstoffgehalten in der Regel davon auszugehen ist, dass die Besorgnis einer schädlichen Bodenveränderung besteht“. Vorsorgewerte für Metalle in verschiedenen Bodenarten sind in Anhang 2, Nr. 4.1 in der Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV) gelistet. Zum Beispiel liegt der Vorsorgewert von Kupfer für die Bodenart „Ton“ bei 60 mg/kg, der Vorsorgewert für Zink bei 200 mg/kg. Neben den Vorsorgewerten werden in Anhang 2, Nr. 5 der BBodSchV auch zulässige zusätzliche jährliche Frachten an Schadstoffen über alle Wirkungspfade festgelegt. Neben der BBodSchV gibt es weitere Gesetze und Verordnungen wie das Bundes-Immissionsschutzgesetz (BImSchG), das Benzinbleigesetz (BzBIG) oder die Düngemittelverordnung (DüMV) und die Klärschlammverordnung (AbfKlärV), die die Schwermetalleinträge in die Umwelt regeln. Trotz der Fülle an rechtlichen Regelungen in Deutschland konnten Kamermann *et al.* (2015) für Böden in Niedersachsen eine Überschreitung der zulässigen zusätzlichen Frachten nach BBodSchV für Kupfer und Zink feststellen.

Um jährliche Frachten und Vorsorgewerte im Boden verfolgen zu können, wurden sogenannte Bodendauerbeobachtungsflächen eingerichtet. Eine Bodendauerbeobachtungsfläche (BDF) wird in regelmäßigen Abständen beprobt und kann auf Schwermetalle aber auch auf Tierarzneimittel untersucht werden. Sie können landwirtschaftliche Ackerflächen darstellen. Vor allem in Niedersachsen gibt es einige dieser BDFs (vgl. Abb. 2.1(A)). Die systematische Probennahme, der hier untersuchten BDF, erfolgte anhand vier quadratischer Kernflächen (K1-K4) durch das Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie (LBEG) in Hannover. Die untersuchte BDF liegt in der Region Weser-Ems. Auf die BDF wird jährlich 30-50 m³/ha Wirtschaftsdünger aufgebracht

(Hamscher *et al.*, 2002). Seit dem Jahr 2001 wurde diese regelmäßig beprobt, so dass eine Art „Bodenarchiv“ zur Untersuchung vorlag. Proben wurden im Frühjahr nach Ausbringung des Wirtschaftsdüngers genommen, sowie unregelmäßig auch im Herbst. Die Probennahme erfolgte dabei in 10 cm Abständen bis maximal 90 cm Bodentiefe. In manchen Jahren stellte eine Bodentiefe 30-40 cm die maximale Probennahmetiefe dar. In dieser Arbeit werden die Bodentiefen 0-30 cm als Oberboden bezeichnet und die Abschnitte ab 30 cm als Unterboden. Der Oberboden wird auch als Ackerkrume bezeichnet, weil dieser in etwa der Pflugtiefe entspricht (Hamscher *et al.*, 2002). Zwischen Ober- und Unterboden ist eine deutliche Abnahme von organischen Substanzen zu verzeichnen (Abb. 2.1 (B)). Zu den organischen Substanzen gehören Huminstoffe und Nicht-Huminstoffe die in der Summe als Humus bezeichnet werden (Sparks, 2003).

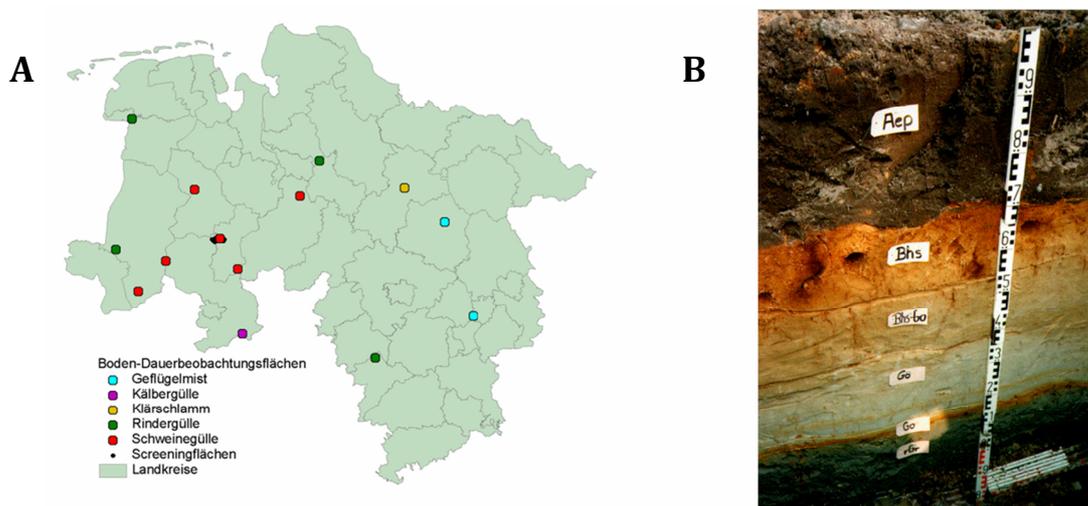


Abb. 2.1: (A) Bodendauerbeobachtungsflächen mit landwirtschaftlicher Nutzung in Niedersachsen. (B) Bodenschichten der untersuchten BDF der Region Weser-Ems © H. Höper, LBEG 2001.

3 Methodenadaption

Die Bestimmung von Schwermetallen in Umweltmatrices mittels Königswasseraufschluss kann mit thermischem Aufschluss unter Rückfluss oder mit einem mikrowellenbasierten Aufschluss erfolgen. Die Laborausstattung erlaubte eine Extraktion mittels Mikrowelle, so dass diese adaptiert und durchgeführt wurde.

Als Grundlage für das Temperaturprogramm diene das Verfahren nach DIN EN 16174 (2012-11). Dort ist eine Temperatur von 175 ± 5 °C für den Aufschluss festgelegt. Diese sollte für 10 ± 1 Minuten gehalten werden. Die Aufheizdauer sowie die Abkühlungsphase wurden an das vorhandene Mikrowellensystem angepasst. Als Basis für die Handhabung diene die Applikation E708 der MLS GmbH (D-Leutkirch) (Kopp, 2005). Die Probenvorbereitung und das Temperaturprogramm der MWE sind in Kap. 13.6.6 ausführlich dargestellt.

Die Messungen erfolgten mittels ICP-MS im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) in Kassel. Dort war eine etablierte Methode für einen drucklosen Königswasseraufschluss vorhanden. Zum Überprüfen der hier adaptierten Mikrowellenextraktion (JLU) wurde eine Vergleichsanalyse durchgeführt. Dazu wurde ein zertifizierter Referenzboden der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in den beiden Einrichtungen mehrfach aufgearbeitet und verglichen (vgl. Tab. 3.1). Nach Anforderungen der Food and Drug Administration (FDA) sollen die Intra- und Interday-Präzision für die Validierung von Analysemethoden biologischer Proben unter 15 % liegen (FDA, 2001). Diese Vorgabe wird von beiden Verfahren erfüllt und die ermittelten Variationskoeffizienten V_K sind für Umweltproben als präzise anzusehen. Im Vergleich ist die Präzision der JLU-Methode nur geringfügig größer als die des LHL. Die mittels drucklosen Königswasseraufschluss ermittelten Gehalte sind im Vergleich zu den Gehalten des mikrowellenbasierten Aufschluss höher. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten beträgt aber nur 7 % für Kupfer und 3 % für Zink. Die anhand der JLU-Methode ermittelten Gehalte von Kupfer und Zink liegen in dem von der BAM ausgegebenen Bereich. Das Ziel, die Anwendbarkeit der adaptierten Mikrowellenextraktion (MWE) zu bestätigen, konnte mit diesem Vergleich erfolgreich gezeigt werden.

Tab. 3.1: Kupfer- und Zinkgehalte und Unsicherheiten des BAM-Referenzbodens sowie Mittelwerte und Variationskoeffizienten V_K der Bestimmung im LHL und in dieser Arbeit (JLU).

Element	BAM*			LHL		JLU	
	Gehalt [mg/kg]	Unsicherheit [mg/kg]	Unsicherheit [%]	Gehalt [mg/kg]	V_K [%]	Gehalt [mg/kg]	V_K [%]
Cu	262	±9	3,4	275	1,2	257	3,6
Zn	990	±40	4,0	1017	1,5	985	3,6

*Extraktion nach DIN ISO 11466

4 BDF Analyse

Ausgewählte Proben der BDF wurden mittels mikrowellenunterstütztem Königswasseraufschluss aufgearbeitet (vgl. Kap. 4.1). Mittels ICP-MS wurden die Gehalte von Kupfer und Zink quantifiziert. Bei jedem Mikrowellendurchgang wurde ein Referenzboden mitgeführt, um den korrekten Aufschluss für jede Probe zu überprüfen. Zusätzlich wurden Blindwerte durchgeführt, um Verschleppungen zu identifizieren und lösungsmittelbedingte Gehalte an Kupfer und Zink einbeziehen zu können.

4.1 Retrospektive Untersuchung

Für die retrospektive Untersuchung der BDF wurden die Frühjahrsproben aus den Jahren 2001, 2005, 2009 und 2015 ausgewählt um den kompletten Zeitraum der Probennahme darstellen zu können. Aus den einzelnen 10 cm-Bodenschichten des Oberbodens (0-30 cm) wurden Mischproben erstellt. Den Unterboden repräsentiert in diesem Fall die Bodenschicht 30-40 cm. Die einzelnen Kernflächen (K1-K4) wurden separat als Dreifachbestimmung untersucht. Da die Kernflächen die komplette BDF repräsentieren sollen, wurden die Mittelwerte aus diesen bestimmt.

In Abb. 4.1 sind die Ergebnisse der retrospektiven Untersuchung der Kupfer- und Zinkgehalte im Oberboden und Unterboden dargestellt. Für das Jahr 2001 wurden im Oberboden 18,5 mg/kg und im Unterboden 9,6 mg/kg Zink bestimmt. Das entspricht einem Verhältnis von 2:1. Im Vergleich dazu wurde im Jahr 2001 im Oberboden 11,2 mg/kg und im Unterboden 1,4 mg/kg Kupfer bestimmt. Folglich beträgt das Verhältnis von Ober- zu Unterboden bei Kupfer 8:1. Die deutlich voneinander abweichenden Verhältnisse von Kupfer und Zink weisen auf ein unterschiedliches Verhalten der beiden Schwermetalle in Boden hin. Tack *et al.* (1999) zeigten, dass Zink eine höhere Mobilität in Boden besitzt als Kupfer. Auch Chen *et al.* (2006) kamen in ihren Studien zu diesen Ergebnissen. Kupfer verbleibt demnach eher im Oberboden, so dass die Diskrepanz zwischen Ober- und Unterboden bei Kupfer höher ist als bei Zink. Letzteres wandert anscheinend leichter in den Unterboden ab. Diese Vermutung wurde mittels Tiefenprofilanalyse weiter untersucht (vgl. Kap.4.2).

Die absoluten Gehalte im Oberboden von Kupfer (maximal 13 mg/kg) sind im Vergleich zu Zink (maximal 21 mg/kg) geringer. Insgesamt entsprechen die Zinkgehalte im Unterboden in etwa den Kupfergehalten im Oberboden. Sowohl De Conti *et al.* (2016) als auch Mantovi *et al.* (2003) ermittelten in Schweinegülle höhere Zink- als Kupfergehalte. Daraus lässt sich schließen, dass die Einsatzmenge von Zink größer ist als die von Kupfer. Dies hat zur Folge, dass höhere Mengen an Zink auf landwirtschaftliche Flächen aufgetragen werden. Dieser Unterschied zwischen Kupfer und Zink stimmt gut mit den hier ermittelten Gehalten überein. Vernachlässigt werden darf jedoch nicht die Tatsache, dass das durchschnittliche Vorkommen von Zink mit 60 mg/kg,

im Vergleich zu Kupfer mit 25 mg/kg, in der Erdkruste natürlicherweise höher ist (Sparks, 2003). Insgesamt liegen die hier ermittelten Werte für Kupfer, aber auch für Zink, unterhalb der durchschnittlichen Werte in der Erdkruste. Die Werte liegen auch deutlich unter den Werten von Mantovi *et al.* (2003). Die Autoren bestimmten für landwirtschaftlich genutzte Bodenflächen einen Kupfergehalt von 50 bis 220 mg/kg sowie einen Zinkgehalt von 90 bis 150 mg/kg. Diese sind deutlich höher als die durchschnittlichen Werte in der Erdkruste. Die hier ermittelten Gehalte liegen eher in dem Bereich der von Rékási und Filep (2015) ermittelten Gehalte für Waldboden (10 ± 8 mg/kg Kupfer, 45 ± 24 mg/kg Zink). Neben dem natürlichen Vorkommen führen unter anderem die Bodenzusammensetzung, sowie die Nutzungsart, zu stark variierenden Konzentrationen, so dass ein Vergleich nur begrenzt möglich ist. Kupfer- und Zinkgehalte dieser BDF wurden bereits 1999 untersucht. Im Oberboden wurde dort ein Gehalt an Kupfer von 9,9 mg/kg und ein Gehalt an Zink von 15,4 mg/kg bestimmt (Kamermann *et al.*, 2015). Das Verhältnis von Kupfer und Zink der hier ermittelten Werte stimmt gut mit den Werten aus 1999 überein.

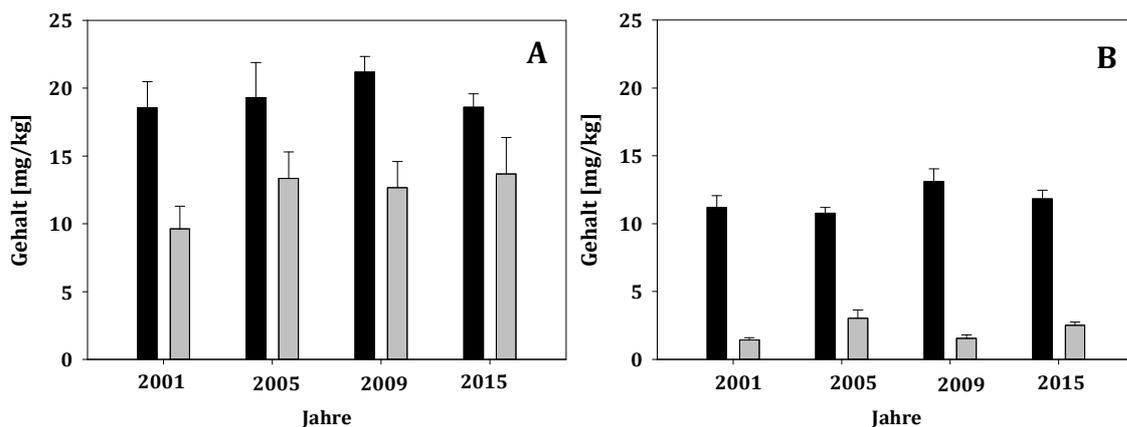


Abb. 4.1: Zink- (A) und Kupfergehalte (B) in den Proben der BDF in den Jahren 2001, 2005, 2009 und 2015, im Oberboden (schwarz) und im Unterboden (grau). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung zwischen den Kernflächen dar.

Weiterhin sollte auf eine mögliche Akkumulation der Schwermetalle im Boden geprüft werden. Auch De Conti *et al.* (2016) untersuchten die Auswirkungen einer exzessiven Auftragung von Schweinegülle auf Boden. Die Autoren konnten eine Zunahme der Konzentration von Kupfer und Zink in Boden feststellen. Im Gegensatz zu der Studie von De Conti *et al.* (2016) stellen die hier untersuchten Proben der BDF jedoch „Realproben“ dar, da diese ein bewirtschaftetes Feld repräsentieren und keine Säulenstudien. Um eine mögliche Zunahme der Gehalte im Verlauf der Jahre zu identifizieren, wurden die ermittelten Gehalte auf statistisch signifikante Unterschiede mittels ANOVA on Ranks mit anschließendem Tukey Test ($p < 0,05$) überprüft (vgl. Tab. 4.1).

Eine durchweg signifikante Zunahme innerhalb der 14 Jahre konnte weder für Kupfer noch für Zink festgestellt werden. Die Zinkgehalte im Oberboden unterliegen einer Schwankung. Eine Tendenz konnte nicht festgestellt werden. Im Unterboden konnte eine signifikante Zunahme von Zink von 2001 auf 2005 beobachtet werden. In den darauffolgenden Jahren blieben die Gehalte konstant. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für die Kupfergehalte. Diese schwanken im Oberboden und im Unterboden ohne erkennbare Tendenz. Dieses Verhalten könnte auf eine Sättigung der Bodenmatrix mit Kupfer und Zink zurückzuführen sein. Das würde bedeuten, dass mit dem Wirtschaftsdünger aufgetragenes Kupfer- und Zink keine Bindung mehr mit Bodenbestandteilen eingehen kann. Dies hat eine geringere Speicherung von Schwermetallen und dementsprechend ein erhöhtes Auswaschungspotential zur Folge. Limitierte Bindungsmöglichkeiten und eine erhöhte Mobilität liefern vor allem sandige, saure Böden im Vergleich zu lehmhaltigen Böden (Toribio und Romanyà, 2006). Der hier untersuchte Boden stellt einen Sandboden dar (vgl. Kap. 13.4.2). Die nicht signifikante Zunahme über die Jahre ist daher plausibel. Die Auswirkungen der Ernteauszüge durch Pflanzen wie zum Beispiel Getreide und Mais wurden für diese BDF von Kamermann *et al.* (2015) untersucht. Diese sind für beide Schwermetalle geringer als die Summe der Einträge. Ernteauszüge spielen daher eine untergeordnete Rolle. In dem Zusammenhang scheint die Bodenart der größere Einflussfaktor zu sein.

Tab. 4.1: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Mittelwerte von Kupfer und Zink im Ober- und Unterboden in den Jahren 2001, 2005, 2009 und 2015. Die Buchstaben beziehen sich jeweils auf eine Spalte.

Jahre	Zink [mg/kg]		Kupfer [mg/kg]	
	Oberboden	Unterboden	Oberboden	Unterboden
2001	18,5 ^a	9,6 ^a	11,2 ^a	1,4 ^a
2005	19,3 ^{ab}	13,4 ^b	10,7 ^a	3,0 ^b
2009	21,2 ^b	12,7 ^b	13,1 ^b	1,6 ^a
2015	18,6 ^{ab}	13,7 ^b	11,8 ^{ab}	2,5 ^b

ab: keine signifikanten Unterschiede zu a oder b, a/b: signifikanter Unterschiede zu b/a

4.2 Tiefenprofilanalyse

Für die Jahre 2001 und 2015 wurden BDF-Proben bis zu einer Bodentiefe von 90 cm, in regelmäßigem Abstand von 10 cm, entnommen. Zur Untersuchung wurden Proben der vier Kernflächen der jeweiligen Bodentiefen zu einer Mischprobe vereinigt. Diese Proben wurden dann in Dreifachbestimmung auf ihren Kupfer- und Zinkgehalt hin untersucht. Für die Darstellung des kompletten Tiefenprofils wurden in Abb. 4.2 die Gehalte des Oberbodens, sowie der ersten Schicht des Unterbodens (30-40 cm) der Jahre 2001 und 2015 aus Kap. 4.1 mit aufgetragen.

Die Kupfergehalte im Unterboden unterscheiden sich deutlich von den Werten im Oberboden. Das Verhältnis 8:1 verdeutlicht eine scharfe Trennung zwischen Ober- und Unterboden (Abb. 4.2 B). Im Falle von Zink ist diese weniger stark ausgeprägt und in die Bodenschicht mit der Tiefe 50-60 cm verschoben (Abb. 4.2 A). Ab einer Bodentiefe von 60-70 cm bleiben die Zinkgehalte dann annähernd konstant. Für die Bodentiefe 40-50 cm im Jahr 2001 wurde noch ein Zinkgehalt von 10,9 mg/kg bestimmt und die nachfolgenden tieferen Bodenschichten wiesen dann nur noch einen Zinkgehalt von 5,0 bis maximal 6,9 mg/kg auf. Die Abnahme der Kupfergehalte findet, wie bereits beschrieben, scharf zwischen Ober- und Unterboden statt. Anschließend sind die Kupfergehalte im Unterboden über das komplette Tiefenprofil annähernd gleich (Abb. 4.2 B). Sie schwanken von 0,9 mg bis maximal 1,4 mg/kg im Jahr 2001 und im Jahr 2015 von 1,0 mg/kg bis maximal 2,2 mg/kg.

Die Tiefenprofile bestätigen die Vermutung, dass Zink im Boden mobiler ist als Kupfer. Darauf weisen die höheren Zinkgehalte in den tieferen Bodenschichten eindeutig hin. Zink wird demnach schrittweise aus Böden ausgewaschen. Kupfer dagegen bindet stark im Oberboden und nur geringe Mengen wandern in tiefere Bodenschichten ab. Der Oberboden wird auch, wie bereits erwähnt, als Ackerkrume oder Pflugtiefe bezeichnet (Hamscher *et al.*, 2002). Hier findet ein ständiger Eintrag von organischem Material statt. Im Unterboden nimmt der Gehalt an Gesamt-Kohlenstoff drastisch ab. Dieses ist auch an den Gehalten der untersuchten BDF ersichtlich. Im Oberboden beträgt dieser 1,2 % und im Unterboden nur noch 0,4 % (siehe Kap. 13.5.7). Organische Bodenbestandteile bestehen aus Huminstoffen und aus Nicht-Huminstoffen. Erstere sind hochmolekulare, amorphe und heterogene organische Substanzen, mit vielen verschiedenen funktionellen Gruppen. Aufgrund der funktionellen Gruppen können sie Metallionen komplexieren und die Mobilität dieser beeinflussen (Sparks, 2003). Die Huminstoffe im Boden nehmen ebenfalls von 1,1 % im Oberboden auf 0,3 % im Unterboden drastisch ab (siehe Kap. 13.6.10). Dies ist auch visuell zu sehen (vgl. Abb. 2.1 B). Der organische Gehalt in Böden spielt daher eine wichtige Rolle, in welcher Form Metalle in Böden vorliegen und beeinflusst somit die Mobilität (Besser *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2011).

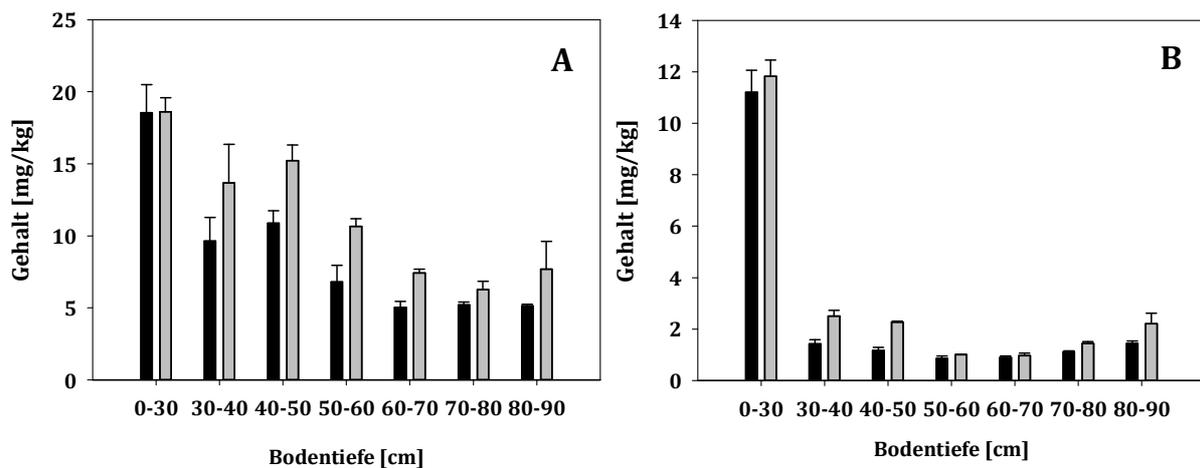


Abb. 4.2: Tiefenprofilanalyse der Zink- (A) und Kupfergehalte (B) in den Jahren 2001 (schwarz) und 2015 (grau). Die Fehlerbalken stellen für 0-30 cm und 30-40 cm die Standardabweichung zwischen den Kernflächen dar und für die tieferen Bodenschichten die Standardabweichungen der Dreifachbestimmung der Mischproben. Die y-Achsen variieren zwischen (A) und (B).

Schwermetalle werden in diesem Zusammenhang in fünf verschiedene Fraktionen eingeteilt. Fraktion 1 (F1) beinhaltet alle leicht löslichen und austauschbaren Metallformen. In der zweiten Fraktion (F2) werden die an Carbonate gebundenen Metalle zusammengefasst, Fraktion 3 (F3) enthält die an Eisen- und Manganoxide gebundenen Metalle. Diese drei Fraktionen zeichnen sich durch eine höhere Mobilität und Bioverfügbarkeit aus. Die vierte Fraktion (F4) umfasst den Teil der Metalle, die an organische Substanzen und Sulfide gebunden sind. In der letzten Fraktion (F5) werden alle als Rest zurückbleibenden Metalle zusammengefasst. Die letzten beiden Fraktionen zeichnen eine größere Stabilität aus und die Metallionen sind daher weniger mobil (Zhu *et al.*, 2011; Zufiaurre *et al.*, 1998). Folglich bedingt ein hoher Gehalt an organischer Substanz eine Verringerung der Mobilität von Metallionen.

Sowohl Arfania und Asadzadeh (2015) als auch Zhu *et al.* (2011) konnten anhand ihrer Untersuchung in Sedimenten und mit Boden versetztem Klärschlamm zeigen, dass Kupfer vor allem in den Fraktionen F4 und F5 vorliegt. Arfania und Asadzadeh (2015) konnten in F5 über 50 % der dotierten Kupfermenge wiederfinden. Dabei muss zunächst berücksichtigt werden, dass bei dieser Studie Sedimentproben untersucht wurden. Zhu *et al.* (2011) konnten Zink hauptsächlich in Fraktion F3 und F4 bestimmen. Die Bindung von Zink an Bodenkomponenten ist zusätzlich schwächer, so dass die Mobilität höher ist als die von Kupfer (Chen *et al.*, 2006). Auch Gove *et al.* (2001) konnten im Vergleich zu Kupfer eine höhere Mobilität von Zink in einem Sandboden feststellen. Insgesamt weisen sandige Böden, im Vergleich zu lehmhaltigen Böden, mit einem niedrigen Gehalt an organischer Substanz, eine geringere Speicherkapazität von Metallen auf (Toribio und Romanyà, 2006). Unterschieden werden muss außerdem zwischen

gebundenem und löslichem organischem Material. Im Gegensatz zu gebundenem organischen Material, kann lösliches organisches Material die Mobilität von Metallen erhöhen (Toribio und Romanyà, 2006).

Die Adsorption von Metallen hängt, neben dem Gehalt an organischer Substanz, von weiteren Faktoren, wie dem pH-Wert oder Partikelgröße der Matrix, ab (Arfania und Asadzadeh, 2015). Als weiteren Einflussfaktor auf die Mobilität konnten Huang *et al.* (2015) die Aufenthaltszeit der Metalle in Böden bestimmen, welche zu Alterungsprozessen und einer Reduzierung der Mobilität führen kann. Mit Erniedrigung des pH-Wertes steigt die Mobilität der Schwermetalle. Die Versauerung des Bodens kann unter anderem durch sauren Regen verursacht werden. Die hohen Konzentrationen an H⁺-Ionen verdrängen die Metallkationen von den Bindungsstellen, so dass eine Abwanderung stattfinden kann. Wie stark eine Auswaschung beziehungsweise Verlagerung erfolgt, hängt von der Affinität des jeweiligen Metallions zu den Bindungsstellen ab (Zheng *et al.*, 2012). Martínez und Motto (2000) bestimmten für Kupfer und Zink spezifische pH-Werte, unterhalb derer eine Mobilisierung beginnt. Für Zink liegt dieser nach ihren Studien bei 6,2 und bei Kupfer bei 5,5. Der pH-Wert der BDF-Proben liegt im Mittel bei 4,5 (siehe Kap. 13.4.2). Eine Auswaschung wäre im Hinblick auf die spezifischen pH-Werte möglich. Da die Ergebnisse für Kupfer aber nur geringfügige Auswaschungen implizierten, wurden Leachingexperimente mit den BDF-Proben durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 g BDF-Boden für eine Bodensäule verwendet und insgesamt mit 130 mL, in 10 mL Schritten, gewaschen. Dies wurde mit jeder einzelnen Bodenschicht separat durchgeführt. Anschließend wurden die Kupfergehalte der Eluate bestimmt (vgl. Kap.13.6.8). In Tab. 4.2 sind die absoluten und wasserlöslichen Kupferkonzentrationen der jeweiligen Bodentiefe dargestellt. Dabei stellen die absoluten Gehalte die Werte des Königswasseraufschluss und die wasserlöslichen Kupferkonzentrationen die Ergebnisse des Leachingexperiments dar. Im Oberboden konnte maximal 4 % des absoluten Kupfergehaltes aus dem Boden eluiert werden. Im Unterboden sind diese Werte mit maximal 20 % deutlich höher. Daher konnte verhältnismäßig mehr Kupfer aus dem Unterboden als aus dem Oberboden herausgelöst werden. Absolut betrachtet unterschieden sich die gelösten Kupfergehalte nur wenig.

Der wasserlösliche Anteil kann mit Fraktion 1, also der leicht löslichen Fraktion, gleichgesetzt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Fraktion im Unterboden, wahrscheinlich aufgrund des geringeren Anteils an organischem Material, stärker vertreten ist als im Oberboden. Dort sind überwiegend die stabileren Formen wie F4 vertreten, da dort ein höherer organischer Gehalt vorliegt. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Literaturdaten überein (Arfania und Asadzadeh, 2015; Zhu *et al.*, 2011).

Tab. 4.2: Vergleich der absoluten und wasserlöslichen Kupfergehalte, sowie der prozentuale Anteil der wasserlöslichen Kupfergehalte von der absoluten Menge, in den verschiedenen Bodentiefen.

Bodentiefe [cm]	absolut [mg/kg]	wasserlöslich [mg/kg]	wasserlöslich [%]
0-10	11,43*	0,32	2,8
10-20	11,43*	0,47	4,1
20-30	11,43*	0,41	3,6
30-40	2,68	0,33	12,4
40-50	2,27	0,32	14,2
50-60	1,00	0,20	20,1
60-70	0,97	0,14	14,3
70-80	1,44	0,12	8,6
80-90	2,21	0,20	8,9

*die absolute Mengen wurden in Mischproben des Oberbodens bestimmt

Die Kupfer- und Zinkgehalte aus den tieferen Bodenschichten der Jahre 2001 und 2015 wurden ebenfalls auf signifikante Unterschiede, mittels one Way ANOVA/ ANOVA on Ranks mit anschließendem Tukey Test ($p < 0,05$) überprüft (Tab. 4.3). Für die Bodentiefe 40-70 cm konnte eine signifikante Zunahme des Zinkgehaltes zwischen den Jahren 2001 und 2015 festgestellt werden. Im Vergleich zum Unterboden (30-40 cm s. a. Kap.4.1 und Tab. 4.1) erfolgte dort die signifikante Zunahme der Zinkgehalte zwischen den Jahren 2001 und 2005. Für die Jahre 2005 und 2009 erfolgte keine Probennahme der tieferen Bodenschichten, so dass nicht genauer differenziert werden kann, zu welchem Zeitpunkt die signifikante Zunahme dort stattfand. Eine stetige Zunahme der Gehalte über 14 Jahre ist aufgrund der Ergebnisse aus Kap. 4.1 jedoch unwahrscheinlich. In den Bodenschichten 70-90 cm konnte zudem keine signifikante Zunahme mehr festgestellt werden. Dort scheint der Boden, ebenfalls wie der Oberboden, mit Zink gesättigt zu sein. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für die Kupfergehalte ab. Nur in zwei vereinzelt Schichten ist eine signifikante Zunahme ersichtlich, so dass seit dem Jahr 2001 nicht von einer stetigen Zunahme der Kupfergehalte in den einzelnen Bodenschichten ausgegangen werden kann.

Tab. 4.3: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Kupfer- und Zinkgehalte zwischen den Jahren 2001 und 2015, in den einzelnen Schichten des Unterbodens ab einer Bodentiefe von 40 cm.

Bodentiefe [cm]	Zink [mg/kg]		Kupfer [mg/kg]	
	2001	2015	2001	2015
40-50	10,9	15,2*	1,2	2,3*
50-60	6,9	10,7*	0,9	1,0
60-70	5,0	7,4*	0,9	1,0
70-80	5,2	6,2	1,1	1,4*
80-90	5,1	7,7	1,4	2,2

*signifikanter Unterschied zu 2001

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Zink das Potential aufweist in tiefere Bodenschichten abzuwandern und somit die Möglichkeit besteht, ins Grundwasser ausgewaschen zu werden. Dagegen zeigt Kupfer eine geringere Mobilität in dem untersuchten Boden. Ein stetiges leichtes Auswaschen von Kupfer kann jedoch aufgrund der sandigen Bodenbeschaffenheit nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt konnte keine durchgängige Zunahme der Kupfer- und Zinkgehalte über 14 Jahre hinweg in dem Boden der BDF nachgewiesen werden. Ein Eintrag von Kupfer und Zink fand jedoch auch nach dem Jahr 2001 in den Boden der BDF statt. Die Möglichkeit besteht, dass die Bodenmatrix bereits mit Kupfer und Zink durch den jahrzehntelangen Eintrag gesättigt ist. Geringe Speicherkapazitäten von Sandböden sind bekannt (Toribio und Romanyà, 2006). Grenzwerte für Zink und Kupfer in Grundwasser gibt es bis zu diesem Zeitpunkt nicht. Sie werden jedoch in Anlage 8 der Grundwasserverordnung als Schadstoffe aufgelistet deren Eintrag nach §13 zu begrenzen ist. Lediglich für Kupfer existiert in Anlage 2 Teil II der Trinkwasserverordnung ein Grenzwert von 2,0 mg/L, welcher aber die Möglichkeit eines Kupferanstiegs im Verteilernetz berücksichtigt. Neben der Auswaschung ins Grundwasser mit dem Sickerwasser, muss auch ein Auszug von Kupfer und Zink durch Ernteauszüge beachtet werden (Kammermann *et al.*, 2015). Die Autoren stellten weiterhin insgesamt einen positiven Saldo, also einen höheren Eintrag als Austrag für Kupfer und Zink, unter Einbezug aller Einträge für die untersuchte BDF fest. Aufgrund dessen gehen die Autoren von einer langfristigen Akkumulation in der BDF aus. Diese Annahme konnte jedoch mit den hier dargestellten Ergebnissen nicht bestätigt werden.

II. SULFONAMIDE & TETRACYCLINE

5 Einleitung

5.1 Zahlen und Fakten

Antibiotika spielen eine wichtige Rolle in der Humanmedizin. Aber auch in der intensiven Tierhaltung werden zu therapeutischen Zwecken große Mengen an Antibiotika, wie Sulfonamide und Tetracycline, eingesetzt (Van Boeckel *et al.*, 2015). Das Bewusstsein, dass antimikrobielle Substanzen nach Medikation am Menschen oder am Tier in die Umwelt gelangen, ist in den letzten Jahren stark gewachsen (Sarmah *et al.*, 2006). Dies zeigen nicht nur weltweiten Studien, sondern spiegelt sich auch in den rechtlichen Umsetzungen wider.

Seit 2011 sind die pharmazeutischen Unternehmen sowie Großhändler verpflichtet, die jährlichen Abgabemengen an antimikrobieller Grundsubstanz an Tierärzte zu melden. Die systematische Erfassung der Daten erfolgt im sogenannten Tierarzneimittel-Abgabemengen-Register des Deutschen Instituts für Medizin und Dokumentation (DIMDI) nach DIMDI-AMV (DIMDI-Arzneimittelverordnung). Diese Daten wertet das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) aus und veröffentlicht sie. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen die Daten aus den Jahren 2011 bis 2017 vor (vgl. Abb. 5.1). Seit Beginn dieser Veröffentlichungen reduzierte sich die Summe der Abgabemengen von 1706 Tonnen um 57 % auf 733 Tonnen. Eine ähnliche Abnahmerate konnte für Sulfonamide (-67 %) und Tetracycline (-67 %) über die Jahre erfasst werden (BVL, 2018a).

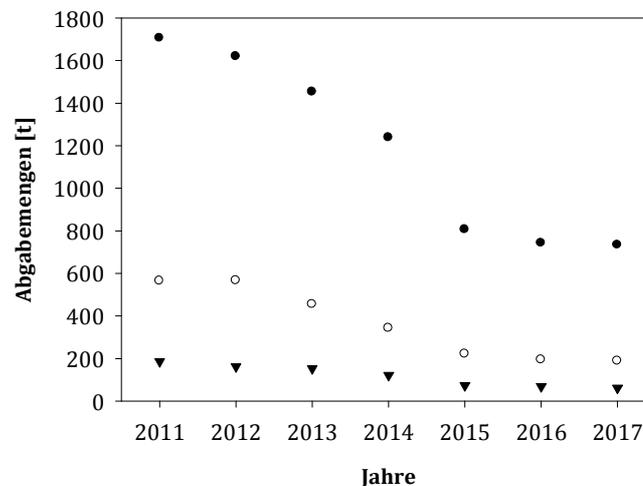


Abb. 5.1: Summe der Abgabemengen der antimikrobiellen Grundsubstanz (schwarzer Kreis) sowie Abgabemengen an Tetracyclinen (weißer Kreis) und Sulfonamiden (Dreieck) in den Jahren 2011 bis 2017.

Was auf den ersten Blick als Erfolg erscheint, ist mit einem Blick auf die Abgabemengen von Fluorchinolonen kritisch zu hinterfragen (vgl. Abb. 5.2). Fluorchinolone besitzen ein breites Wirkungsspektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und werden in der Human- und Tiermedizin eingesetzt (Martinez *et al.*, 2006). Sie werden zwar deutlich niedriger dosiert als Tetracycline und Sulfonamide (Kroker, 2010b), aber seit Aufzeichnungsbeginn stieg die Abgabe dieser Antibiotikaklasse an. Dies ist bedenklich, da Fluorchinolone in die „Watch Group“ der WHO eingeteilt sind. Diese bedeutet, dass diese Antibiotika ein höheres Resistenzpotential besitzen und als 1. oder 2. Wahl nur für spezifische Indikationen verwendet werden sollen (WHO, 2017). Seit dem Jahr 2015 nimmt der Trend, auf diese Substanzen zurückzugreifen ab. Im Jahr 2017 war jedoch wieder eine leichte Zunahme zu verzeichnen. So wird für die Abgabe von Fluorchinolonen insgesamt seit 2011 eine Zunahme um 1,7 Tonnen registriert (BVL, 2018a).

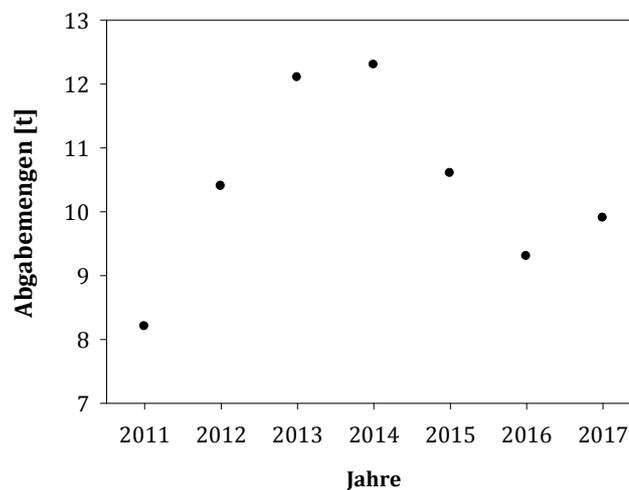


Abb. 5.2: Abgabemengen an Fluorchinolonen in den Jahren 2011 bis 2017.

Auch wenn seit 2011 eine Abnahme der Abgabemengen zu verzeichnen ist, wurden jahrzehntelang, und werden immer noch, große Mengen Antibiotika in der intensiven Tierhaltung eingesetzt. Nach Erhebung des statistischen Bundesamts gab es in Deutschland im Jahr 2017 12,3 Millionen Rinder, 27,6 Millionen Schweine und 40,6 Millionen Legehennen (Destatis, 2018a). Weiterhin gab es in Deutschland im März 2016 insgesamt 40.000 Betriebe mit Schweinehaltung. Darunter fielen 514 Betriebe mit über 5000 Schweinen (Destatis, 2018b). Viele der zur Therapie eingesetzten Antibiotika werden zu circa 75 % unverändert oder noch in biologisch aktiver Form ausgeschieden (Kümmerer und Henninger, 2003; Lamshöft *et al.*, 2007). Im Wirtschaftsdünger gelangen sie dann auf die landwirtschaftlichen Nutzflächen. Die insgesamt mit Schweine-Betrieben assoziierte landwirtschaftlich genutzte Fläche betrug dabei knapp

3 Millionen Hektar (Destatis, 2018b). Das heißt, dass circa 8 % der gesamten Bodenfläche von Deutschland (357 580 km²) in Zusammenhang mit der Schweinehaltung steht. Im Jahr 2016 wurde insgesamt die Hälfte (51 %) der Fläche Deutschlands für die Landwirtschaft genutzt (Destatis, 2018c; Destatis, 2018b). Eine Kontamination der Bodenflächen ist somit unumgänglich.

5.2 Sulfonamide

In der intensiven Tierhaltung werden vor allem Sulfadimethoxin (SDM), SDZ und SMZ eingesetzt, wobei SDZ und SMZ in Deutschland den Hauptteil ausmachen. Im Jahr 2015 wurden 36 Tonnen SDZ und 22 Tonnen SMZ an Tierärzte abgegeben (Wallmann 2016).

Das erste bekannte Sulfonamid (Prontosil) und seine antimikrobielle Wirkung wurde 1935 von Gerhard Domagk entdeckt (Domagk, 1935). Die Wirkungsweise war zu dieser Zeit jedoch noch nicht bekannt. Die Aufklärung des Wirkmechanismus erfolgte über die Erkenntnis, dass eine Substanz im Hefeextrakt die Wirksamkeit der Sulfonamide herabsetzte. Weitere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass diese Substanz strukturelle Ähnlichkeiten zu den Sulfonamiden aufweisen musste (Woods, 1940). Nachfolgende Studien konnten zeigen, dass die Substanz *p*-Aminobenzoesäure für die Wirkungsabschwächung der Sulfonamide verantwortlich war. Daraus und aus weiteren Studien konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Wirkung von Sulfonamiden auf eine kompetitive Hemmung des Zielenzym der *p*-Aminobenzoesäure zurückzuführen ist (Wood, 1942; Wood und Austrian, 1942). Heute ist bekannt, dass diese Schlussfolgerungen korrekt waren und Sulfonamide als Antagonisten der *p*-Aminobenzoesäure wirken. Sie hemmen die bakterielle Folsäuresynthese durch Verdrängung der *p*-Aminobenzoesäure von der Dihydropteroinsäure-Synthase (Freissmuth *et al.*, 2012).

Die Grundstruktur der Sulfonamide bildet das Sulfanilamid (García-Galán *et al.*, 2008). Durch Substitution des Amidstickstoffes ergeben sich die einzelnen Wirkstoffe (vgl. Abb. 5.3). Sulfonamide können in kationischer, ungeladener oder anionischer Form vorliegen (Lin *et al.*, 1997). Im Sauren pH-Wert liegen die meisten Sulfonamide positiv geladen vor, da die Aminogruppe (N⁴, Abb. 5.3) bei einem pH-Wert unterhalb von 2,5 protoniert wird. Die Deprotonierung und die sich daraus ergebende neutrale Natur der Sulfonamide erfolgt zwischen einem pH-Wert von 2,5 und 6. Die Deprotonierung des Amidstickstoffes N¹ erfolgt bei einem pH-Wert über 6 (Haller *et al.*, 2002).

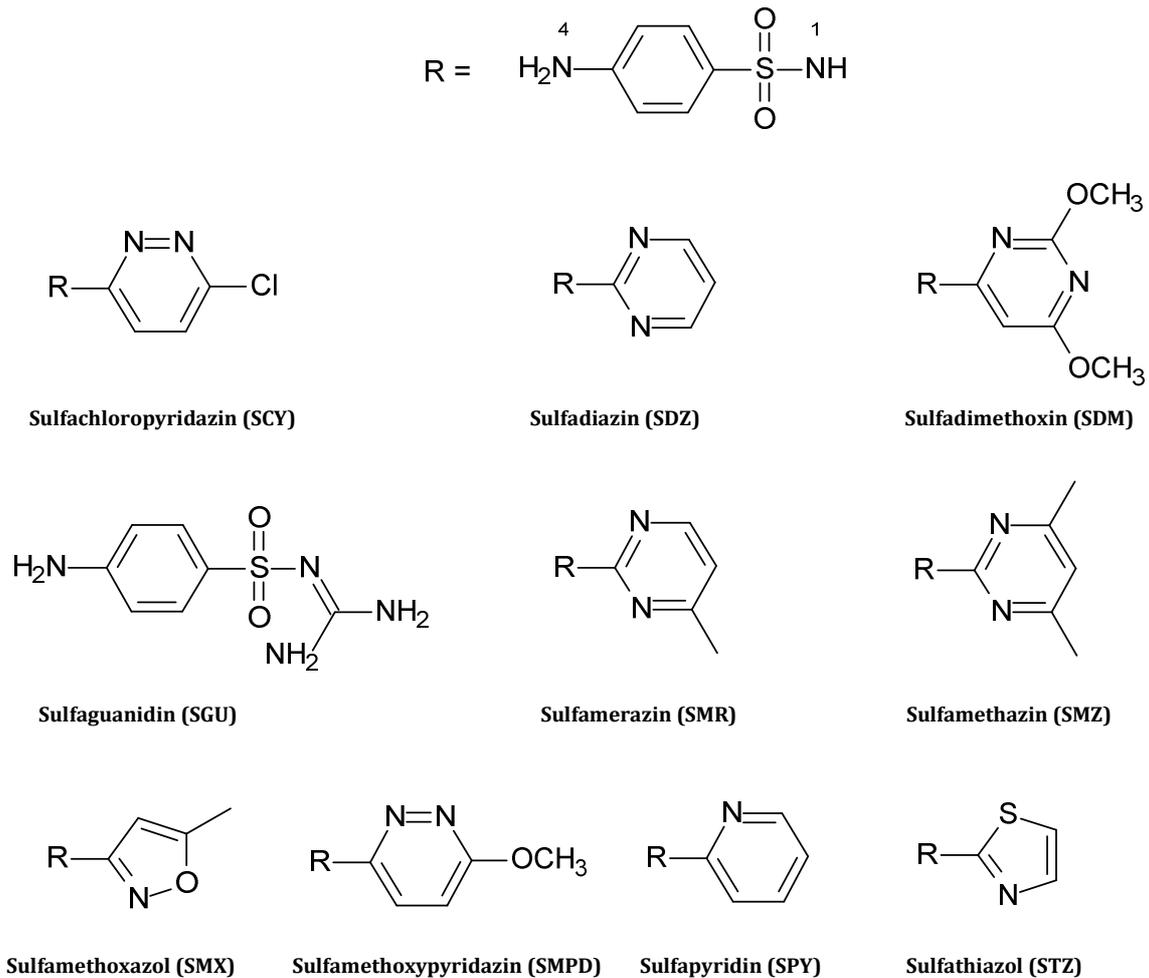


Abb. 5.3: Strukturformeln der untersuchten Sulfonamide (N^1 = Amidstickstoff, N^4 = aromatische Aminogruppe).

5.3 Tetracycline

Tetracycline werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. Sie wirken gegen eine Vielzahl Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. In der Tiermedizin werden hauptsächlich Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin (CTC), Oxytetracyclin (OTC) und Doxycyclin (Doxy) zur Behandlung von Infektionen bei Schweinen, Rindern, Schafen und Geflügel verwendet (Chopra und Roberts, 2001; Frey und Löscher, 2010). Im Jahr 2015 wurden 61 Tonnen TC, 7 Tonnen OTC, 100 Tonnen Doxy und 52 Tonnen CTC an Tierärzte abgegeben (Wallmann, 2016).

Das erste Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline, das Aureomycin oder CTC, wurde 1948 in der Kultur von *Streptomyces aureofaciens* entdeckt (Duggar, 1948). In den fünfziger und sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden viele weitere Tetracycline wie OTC, TC und die halbsynthetischen Tetracycline wie Doxy und Minocyclin entdeckt bzw. synthetisiert (Dürckheimer, 1975).

Die ersten Schritte für die Aufklärung des Wirkmechanismus von Tetracyclinen lieferte eine Studie von Loomis (1950) durch die Feststellung, dass Tetracycline die Elektronentransportkette und die oxidative Phosphorylierung von Hefezellen inhibieren können. Weitere Studien folgten und legten dar, dass Tetracycline in vielfältiger Weise in den Metabolismus der Bakterienzelle eingreifen können (Eagle und Saz, 1955). Hash *et al.* (1964) konnten allerdings zeigen, dass die primäre Wirkung der Tetracycline in *Staphylococcus aureus* auf eine Blockierung der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist. Sie erklärten, dass die weiteren beobachteten Effekte eine Folge der Blockierung seien.

Mittlerweile ist der Mechanismus durch eine große Zahl an Studien bekannt. Tatsächlich geht die Wirkung auf die Inhibierung der Proteinbiosynthese zurück, indem die Tetracycline an die 30 S Untereinheit des Ribosoms binden. Dadurch wird die Ribosom-tRNA-Interaktion geschwächt. Die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Rezeptorstelle des Ribosoms wird folglich gehemmt. Dabei können die Tetracycline an mehreren Stellen am Ribosom binden. In Abhängigkeit von der Bindungsstelle werden die Affinitäten einer Bindung der t-RNA unterschiedlich stark herabgesetzt. Tetracycline wirken folglich bakteriostatisch (Chopra *et al.*, 1992; Chopra und Roberts, 2001; Epe *et al.*, 1987; Schnappinger und Hillen, 1996).

Die Grundstruktur der Tetracycline besteht aus vier linearen, annelierten, sechsatomigen Ringen mit charakteristisch angeordneten Doppelbindungen. Strukturell unterscheiden sich die Tetracycline anhand unterschiedlicher Substituenten (vgl. Abb. 5.4). Die lineare Anordnung der Ringe sowie der beiden Keto-Enol-Systeme in Ring A und kombiniert in Ring B C D sind wichtig für die Wirksamkeit als Antibiotika.

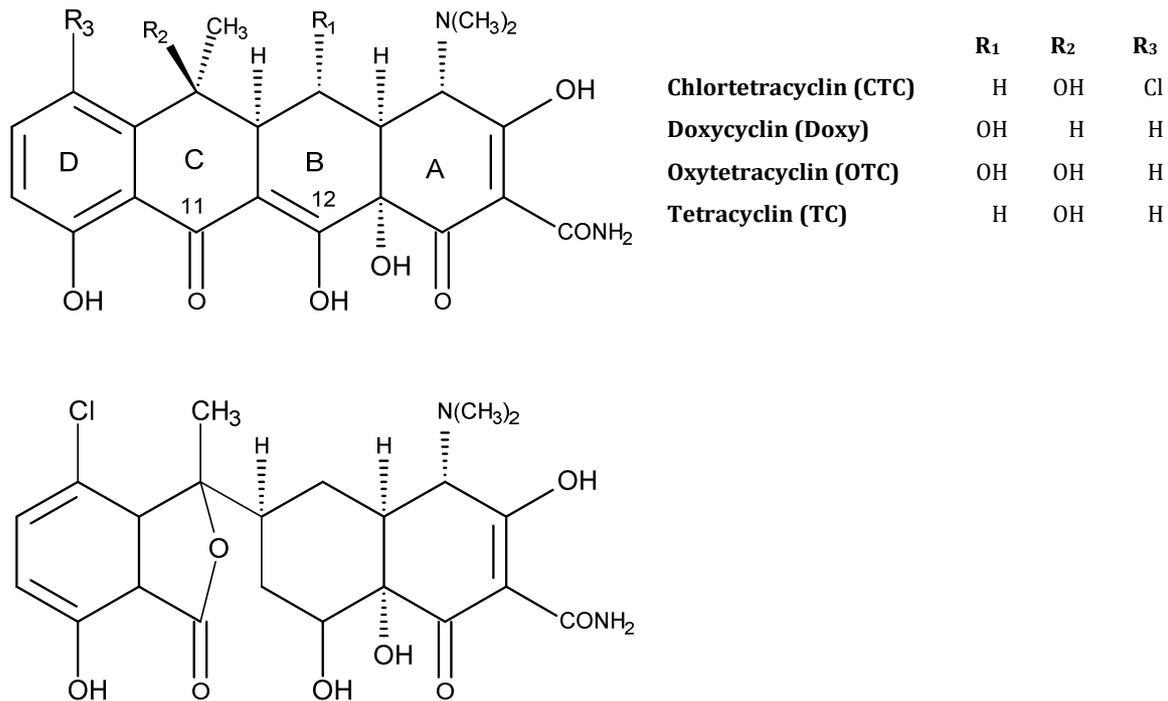


Abb. 5.4: Allgemeine Struktur der Tetracycline (oben) und Isochlortetracyclin (IsoCTC, unten).

Bei schwach sauren pH-Werten unterliegen die Tetracycline wie CTC, OTC und TC einer Konformationsänderung am C-4-Atom. Diese Änderung stellt eine Epimerisierung dar und ist reversibel (Doerschuk *et al.*, 1955; Halling-Sørensen *et al.*, 2002). Im alkalischen Milieu isomerisieren Tetracycline. Dabei sind Tetracycline ohne Methyl-Gruppe am C-6 Atom weniger anfällig für diese Reaktion. CTC ist besonders empfindlich für die Umwandlung in die iso-CTC Form. Weiterhin sind Tetracycline in der Lage, mit zwei- und dreiwertigen Metallionen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Fe^{3+} Chelate am C-11- und C-12-Atom zu bilden (Dürckheimer, 1975; Halling-Sørensen *et al.*, 2002; Waller *et al.*, 1952).

5.4 Antibiotikaverteilung in der Umwelt

Schon seit Jahren werden weltweit Studien durchgeführt, um das Verhalten von Antibiotika in der Umwelt zu untersuchen. Endgültige quantitative Aussagen können derzeit nicht getroffen werden, da die Eintragswege diffus sind und viele verschiedene Substanzen und Kombinationen von Substanzen verwendet werden. Auch langfristige Studien sind selten. Dennoch zeigen die Untersuchungen, dass Antibiotika in vielen Kompartimenten der Umwelt angekommen sind und dort auch persistieren. Die Verwendung von Wirtschaftsdünger kann für Veterinärantibiotika als zentraler Eintrittspfad in die verschiedenen Umweltkompartimente gewertet werden (Kümmerer, 2010; Sarmah *et al.*, 2006). Neben dem Wirtschaftsdünger wird auch der Fermentationsrückstand aus Biogasanlagen auf die Felder ausgebracht. Dabei sind die Eliminierungsraten der Antibiotika im Fermentationsprozess sehr unterschiedlich, so dass ein

Aufbringen von Antibiotika in beiden Fällen eine Rolle spielt (Mohring *et al.*, 2009; Spielmeyer *et al.*, 2017b). Das Vorhandensein von Antibiotika in Böden konnte bereits mehrfach bestätigt werden (Aga *et al.*, 2005; Awad *et al.*, 2014; Hamscher *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2013; Thiele-Bruhn, 2003; Vazquez-Roig *et al.*, 2010). Das Verhalten im Boden hängt dann einerseits von den Eigenschaften der einzelnen Antibiotikaklassen und andererseits von den Bodeneigenschaften ab (Pan und Chu, 2017).

Neben den Nachweisen im Boden, wurde auch die Anwesenheit von Antibiotika in Oberflächengewässern vielfach bestätigt (Christian *et al.*, 2003; Ferrey *et al.*, 2015; Lindsey *et al.*, 2001; Osorio *et al.*, 2016). Dabei können aber auch Humanarzneimittel aufgrund unzureichender Entfernung in der Kläranlage in Oberflächengewässern gelangen (Kümmerer, 2010). Die Versickerung aus Böden ins Grundwasser ist für einige Antibiotika ebenfalls beschrieben worden. Die bestimmten Gehalte sind aber generell niedriger als im Oberflächenwasser. Lindsey *et al.* (2001) konnten in Grundwasser 0,22 µg/L, in Oberflächengewässer dagegen 1,02 µg/L Sulfamethoxazol (SMX) nachweisen. Hirsch *et al.* (1999) konnten SMX, aber auch SMZ, in Grundwasser detektieren. Eine mögliche Verlagerung von SMZ ins Grundwasser zeigten auch Hamscher *et al.* (2005a). Tetracycline wurden in den beschriebenen Studien ebenfalls untersucht aber nicht im Grundwasser nachgewiesen. Aufgrund von starken Sorptionen verbleiben sie im Boden (Kwon, 2011). Ein Nachweis von TC in Grundwasser von Javid *et al.* (2016) ist auf die Nähe der Brunnen, die zur Probenahme dienten, zu Einrichtungen der intensiven Tierhaltung zu begründen. In den Matrices Böden, Oberflächengewässer und Wirtschaftsdünger können Antibiotika demnach regelmäßig nachgewiesen werden.

Einen weiteren Verteilungsweg können Antibiotika anhand des Ackerbaus beschreiten. Die Aufnahme von Antibiotika, durch Pflanzenwurzeln, wurde bereits anhand von Gewächshausstudien, mit Boden oder mit Wirtschaftsdünger gemischten Böden, untersucht. Dolliver *et al.* (2007) konnten in Mais, Salat und Kartoffeln SMZ nachweisen. Die Autoren berechneten dass weniger als 0,1 % der dotierten Menge an SMZ von den Pflanzen aufgenommen wurde. TC, OTC und CTC konnten unter anderem in Radieschen, Raps, Sellerie oder Zwiebeln bestimmt werden (Hu *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2005). In der Studie von Hu *et al.* (2010) betrug die aufgenommene TC-, OTC-, und CTC-Menge in den Gemüsesorten im Vergleich zu der verbliebenen Menge im Boden 1-5 %. Auswirkungen von Antibiotikaaufnahmen durch Pflanzen auf den Menschen sind bisher nicht bekannt. Genaue Aussagen darüber können durch Gewächshausstudien alleine nicht gemacht werden. Sie zeigen aber, dass grundsätzlich eine Aufnahme von Antibiotika-Rückständen in Böden durch Pflanzen möglich ist.

5.5 Resistenzmechanismen und Resistenzen in der Umwelt

Der vermehrte Nachweis von Antibiotika in Gewässern, Böden und Wirtschaftsdüngern führte zu der Frage, welche Auswirkungen diese auf das Ökosystem haben können. Dabei wird unter anderem eine zunehmende Resistenzenbildung diskutiert (Cytryn, 2013). Diese ist als globales Problem der heutigen Zeit anzusehen. Natürliche Resistenzen können von Natur aus in einer Art vorkommen. Zum Beispiel sind alle Gram-negativen Bakterien resistent gegen Makrolide (Dermott *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2001). Erworbene Resistenzen kommen dagegen in einzelnen Stämmen einer Art vor. Der erworbenen Resistenz liegen vier bekannte Mechanismen zu Grunde (Dermott *et al.*, 2003).

1. Veränderung des Antibiotikums durch enzymatische Aktivität des Mikroorganismus (MO), so dass das Antibiotikum die Zelle nicht mehr schädigen kann.
2. Spontane Mutation der Zielstrukturen im MO, welche in einer reduzierten Affinität zwischen Zielstrukturen und Antibiotikum resultiert.
3. Verringerte Antibiotikum-Akkumulation durch eine verringerte Aufnahme und/oder eine erhöhte Aktivität von Efflux-Pumpen.
4. Entwicklung alternativer Metabolismuswege, die ein Wachstum des MO in Anwesenheit des Antibiotikums erlauben.

Die antimikrobielle Wirkung der Sulfonamide beruht auf einer Hemmung der Folsäuresynthese welche u.a. zu einer Inhibierung der Bildung von Nukleinsäuren führt. Sulfonamid-Resistenzen basieren normalerweise auf der Bildung von neuen Enzymen, deren Aktivität unbeeinflusst von Sulfonamiden bleibt. Aufgrund dessen wird häufig Trimethoprim, welches ebenfalls in die Folsäuresynthese eingreift und synergistisch wirksam ist, als Kombination mit Sulfonamiden eingesetzt (Dermott *et al.*, 2003; Sköld, 2000). Für die Bildung von Tetracyclin-Resistenzen gibt es zwei Möglichkeiten, zum einen das Ausschleusen der Tetracycline mittels Efflux-Pumpen aus der Zelle und zum anderen durch eine Modifizierung des Ribosoms. Tetracycline können dann nicht mehr an das Ribosom binden und die Proteinbiosynthese hemmen (Chopra und Roberts, 2001; Dermott *et al.*, 2003).

Mit dem Aufbringen von Wirtschaftsdünger gelangen Antibiotika-resistente Bakterien sowie resistente Gene auf Böden (Heuer *et al.*, 2011). Die möglichen Auswirkungen sind noch nicht gänzlich verstanden. Die Vermutung besteht, dass sich die Bakterien des Wirtschaftsdüngers nur schwer an Bodenbedingungen adaptieren können, so dass die Anzahl an resistenten Bakterien aus dem Wirtschaftsdünger nach einer gewissen Zeit wieder zurückgeht (Heuer *et al.*, 2008; Jechalke *et al.*, 2014). Auch Sengeløv *et al.* (2003) zeigten, dass eine Beeinflussung der Resistenz

im Boden durch Aufbringen von, mit Tetracyclin kontaminierter, Schweinegülle lediglich temporär sein kann. Bekannt ist außerdem, dass in Boden natürlicherweise Antibiotika-resistente Bakterien vorkommen (Cytryn, 2013). Das dort vorherrschende Gleichgewicht der Bakterien kann dann durch Aufbringen von Antibiotika zu einer Verschiebung führen. Dies konnten Ding *et al.* (2014) in ihrer Studie mit SDZ-kontaminiertem Wirtschaftsdünger zeigen. Kyselková *et al.* (2013) demonstrierten mit ihrer Studie, dass Exkremate von sowohl unbehandelten Kühen als auch Exkremate von mit OTC-behandelten Kühen Tetracyclin-resistente Gene aufweisen. In den Exkrementen der behandelten Kühe wurden zwar höhere Mengen nachgewiesen, aber dennoch waren natürlicherweise Tetracyclin-resistente Gene vorhanden. Hund-Rinke *et al.* (2004) konnten keine Auswirkungen von Tetracyclinen auf die Bodenflora zeigen und schätzten daher die Resistenzenbildung gering ein.

Dennoch sprechen viele Studien für eine Verbindung zwischen der Auftragung von kontaminierter Gülle und der Resistenzen-Bildung im Boden (Halling-Sørensen *et al.*, 2005; Heuer *et al.*, 2011; Jechalke *et al.*, 2014; Wellington *et al.*, 2013). Auch die Langzeit-Untersuchung von Cleary *et al.* (2016) deutet auf eine Zunahme von genetischen Elementen hin, die eine große Anzahl an Antibiotika-resistenten Genen beinhalten. Anzumerken ist hier jedoch, dass Konzentrationen über dem realistischen Gehalt verwendet wurden. In den Niederlanden wurde eine Studie mit realen Bodenproben von Knapp *et al.* (2010) durchgeführt. Auch sie zeigten, dass Antibiotika-resistente Gene im Boden in den letzten 60 Jahren deutlich zugenommen haben. Vor allem die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers zwischen verschiedenen Bakterien muss in der Umwelt in Betracht gezogen werden (Davison, 1999). Insgesamt verdeutlichen die vielen Studien einerseits die Bedeutsamkeit dieses Themas aber andererseits auch, dass die genauen Auswirkungen noch nicht vollständig bekannt sind.

6 Methodenentwicklung für Sulfonamide und Tetracycline

6.1 Einleitung

Für die Quantifizierung von Sulfonamiden und Tetracyclinen in der Matrix Boden wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit dem Ziel entwickelt, beide Antibiotikaklassen simultan bestimmen zu können. Aufgrund unterschiedlicher physikalischer und chemischer Eigenschaften wurden moderate Extraktionsbedingungen getestet, da Tetracycline bei hohen Temperaturen und langen Extraktionszeiten Transformationsreaktionen unterliegen können (Doi und Stoskopf, 2000; Hassani *et al.*, 2008; Loftin *et al.*, 2008). Die LLE sollte einen Kompromiss darstellen, der für beide Antibiotikaklassen zusammengenommen die optimalen Extraktionsbedingungen vereinigt (vgl. Kap. 6.4). In gealterten Bodenproben sind für Sulfonamide lediglich mit extremen Extraktionsbedingungen zufriedenstellende Wiederfindungsraten möglich (Raich-Montiu *et al.*, 2010), sodass zusätzlich für diese eine Mikrowellenextraktionsmethode aus der Literatur adaptiert wurde (vgl. Kap. 6.6). Weiterhin sollte eine Festphasenextraktion (SPE) in beide Methoden integriert werden (vgl. Kap. 6.5). Für die Analyse der Proben wurden eine UHPLC/QTRAP-Methode sowie eine UHPLC/QTOF-Methode entwickelt (vgl. Kap. 6.2 und Kap. 6.3). Für die Auswertung der Methodenentwicklung wurden die direkten absoluten Wiederfindungen ohne internen Standard verwendet. Als Probenmenge wurde ein Gramm Boden festgelegt, da die zu untersuchenden Proben nur in limitierter Menge vorlagen. Für die Methodenentwicklung wurde der Kontrollboden (vgl. Kapitel 13.4.1) verwendet.

6.2 Analyse mittels UHPLC/QTRAP

Zunächst wurde die Messmethode, für zehn Sulfonamide und fünf Tetracycline, für das Messsystem UHPLC/QTRAP etabliert. Dabei sollte die Quantifizierung mittels „multiple reaction monitoring“ (MRM) erfolgen. Das Massenspektrometer „QTRAP“ bietet die Möglichkeit, den letzten Quadrupol als lineare Ionenfalle zu schalten, so dass das ganze System als Triplequadrupol verwendet werden kann.

6.2.1 UHPLC-Parameter

Die Messung mittels MRM bietet die Möglichkeit auch co-eluierende Substanzen getrennt voneinander quantifizieren zu können, wenn die Substanzen im ersten oder im dritten Quadrupol (Q1 und Q3) unterschiedliche m/z -Verhältnisse aufweisen. Die Trennung der 15 Analyten anhand einer geeigneten UHPLC-Methode spielt dennoch eine entscheidende Rolle. Je öfter das Massenspektrometer (MS) schaltet, desto weniger Datenpunkte werden pro Peak

generiert. Dadurch wird die Messpräzision verschlechtert. Außerdem ist die Trennung von Matrix und Analyt notwendig um Matrixeffekte zu reduzieren.

Der erste Schritt der Etablierung stellte die Auswahl einer geeigneten HPLC-Säule dar. Dazu wurden HPLC-Säulen getestet, die sich hinsichtlich des Säulenmaterials, der Länge und des Durchmessers unterschieden (vgl. Kap. 13.1). Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Peakintensität sowie Peakform der Tetracycline. Der verhältnismäßig große Durchmesser der Kinetex PFP (2,6 μm , 50 x 4,6 mm) von Phenomenex erwies sich als vorteilhaft auf das Elutionsverhalten der Tetracycline. Dieser erlaubte die Verwendung eines höheren Flusses, der zu einer Erhöhung der Intensität führte. Der positive Effekt konnte bis zu einem Fluss von 0,5 mL/min beobachtet werden. Die Analytik von Tetracyclinen ist u. a. durch ihre komplexierenden Eigenschaften stark beeinträchtigt. Aufgrund dessen können die Peaks der Tetracycline ein ausgeprägtes Tailing zeigen. Durch Erhöhung des Flusses konnte dieses Phänomen bereits reduziert werden. Ein anderer Ansatz der Reduzierung stellt die Verringerung der Säulentemperatur dar. Eigene Untersuchungen zeigten, dass eine höhere Säulentemperatur zu einer größeren Peakbreite und damit niedrigeren Peakintensität führte. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen von Bruno *et al.* (2002). Sie konnten ebenfalls zeigen, dass bei 15 °C das Tailing der Tetracyclinpeaks am geringsten war. Infolgedessen wurde mit einer Säulentemperatur von 15 °C weiter gearbeitet.

Das Eluentensystem wurde zu Beginn nach Spielmeier *et al.* (2014) gewählt. Verwendet wurde dort ein wässriger Eluent aus Wasser mit 2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure und ein organischer Eluent aus Acetonitril (ACN)/Methanol (1:1, v/v). Im Laufe der Methodenentwicklung wurde der Anteil an Acetonitril aus dem organischen Eluent entfernt und stattdessen reines Methanol verwendet. Zusätzlich wurde der Zusatz an Salzen auf Ammoniumbasis und der erhöhte Zusatz von Ameisensäure getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Zusatz von Ameisensäure im Vergleich zu reinem Methanol und salzhaltigem Methanol höhere Intensitäten lieferte.

Da keine positiven Auswirkungen von Salz auf Ammoniumbasis im organischen Eluent auf die Intensitäten zu verzeichnen waren, wurden dem wässrigen Eluent Salze in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt. Dabei wurden Ammoniumacetat, aufgrund der Ergebnisse von Mohring *et al.* (2009), sowie Ammoniumformiat aufgrund der Ergebnisse von Kuracina und André (2010), in Konzentrationen von 1 mM und 3 mM untersucht. Die höheren Peakintensitäten wurden bei der Verwendung von 3 mM Ammoniumformiat erhalten, so dass dieser Eluent als geeignet angesehen und weiter verwendet wurde. Eine höhere Salzkonzentration wurde nicht getestet, da durch höhere Pufferkonzentrationen vermehrt Ablagerungen stattfinden, welche bei größeren Messserien zu einem Intensitätsverlust führen.

Neben den Salzen wurde der Anteil von Ameisensäure von 0,1 % auf 0,5 % erhöht, um die Ionisierung in der Elektrospray-Ionisation (ESI) zu verbessern.

Nach Auswahl des Eluentensystems konnte die Gradientenelution angepasst werden. Der Gradient wurde soweit optimiert, dass alle Sulfonamide, bis auf Sulfapyridin (SPY) und Sulfathiazol (STZ), basisliniengetrennt wurden. Dabei musste mit einem organischen Lösungsmittelanteil von 22 % begonnen werden, da sonst das polare Sulfaguanidin (SGU) in der Totzeit der Säule eluierte. Auch die Tetracycline konnten soweit getrennt werden, dass maximal vier der 15 Analyten in einer festgelegten Periode eluierten. Ein Spülschritt mit einem Fluss von 0,9 mL/min war notwendig, um möglichst viele Matrixbestandteile von der Säule zu entfernen und reproduzierbare Bedingungen für jede Messung zu generieren. Dies war wichtig, da vor allem die Peakform der Tetracycline von Restmatrix auf der Säule negativ beeinflusst wird. Weiterhin wurde untersucht, ob die Peakform oder die Peakintensität von dem verwendeten Lösemittel, in dem die Standards angesetzt wurden, abhängig war. Ein Unterschied zwischen dem Eluentengemisch oder Wasser/ Methanol (1:1, v/v) konnte nicht festgestellt werden.

Anschließend konnte die Evaluierung des geeigneten Injektionsvolumens vorgenommen werden. Mit Erhöhen des Injektionsvolumens wird mehr Analyt auf die Säule gegeben, so dass die Intensitäten steigen. Der Nachteil des erhöhten Volumens ist, dass vermehrt Matrix auf die Säule und auch in das gekoppelte MS gelangt. Die Folge sind höhere Rauschsignale und ein Kontaminieren der Säule. Zusätzlich wird auf Dauer die Leistung des MS, beziehungsweise des Detektors, aufgrund von Matrix beeinträchtigt. Ein Injektionsvolumen bis 6 μ L wäre möglich gewesen, ohne den positiven Effekt des erhöhten Analytsignals von einem hohen Rauschen zu überlagern. Aus den oben genannten Gründen wurde das Injektionsvolumen auf 4 μ L festgesetzt, da die Probenextrakte eine deutliche, dunkelbraune Färbung aufwiesen.

6.2.2 QTRAP-Parameter

Die QTRAP-Ionisierungseinheit stellt eine ESI dar. Die Temperatur der ESI spielt eine entscheidende Rolle für eine möglichst vollständige Ionisierung sowie für die effektive Entfernung der Lösungsmittelreste. Die Erhöhung der Temperatur von 150 °C über den Zwischenschritt 300 °C bis zu 500 °C zeigte insgesamt nur geringfügige Änderungen für die Intensitäten der Sulfonamide. Eine Ausnahme bildete SGU, für welches bei höherer Temperatur bessere Intensitäten verzeichnet werden konnten. Die Temperatur von 500 °C zeigte aber vor allem positive Effekte auf die Intensitäten der Tetracycline.

Da Tetracycline, trotz angepasster Temperatur, im Vergleich zu den Sulfonamiden deutlich geringere Intensitäten aufwiesen, wurden die gerätespezifischen Gase für Tetracycline näher untersucht und optimiert. Dabei wurde die Kapillarspannung der ESI nicht verändert. Das Variieren des Curtain Gas zeigte keine Auswirkungen auf die Intensitäten. Das Kollisionsgas mit der Einstellung Medium war für die Tetracycline am effektivsten. Zerstäubergas und Heizgas

wurden anhand der Tests auf 35 und 45 psi eingestellt. Neben der Anpassung der allgemeinen ESI-Parameter wurden für jeden einzelnen Analyten die spezifischen Parameter wie das Declustering Potential, das Eintrittspotential in den Q1 sowie in die Kollisionszelle, die Kollisionsenergie und das Kollisionsaustrittspotential ermittelt. Jedoch konnten auch mit diesen Optimierungen für Tetracycline nicht die gleichen Intensitäten erreicht werden, die für die Sulfonamide erzielt wurden.

Aufgrund ihrer Strukturen können sowohl Sulfonamide als auch Tetracycline leicht protoniert und daher mittels ESI im positiven Modus ionisiert werden. Im Hinblick auf die insgesamt geringere Ionisierung der Tetracycline wurde zusätzlich die negative Ionisierung mittels ESI getestet. Die Intensität der Tetracycline nahm dabei jedoch um einen Faktor von circa 10 ab, so dass weiterhin im positiven ESI Modus gearbeitet wurde.

Da vor allem CTC eine geringe Ionisierung aufwies, wurde untersucht, ob sich Chlortetracyclinaddukte durch den verwendeten Eluenten gebildet haben. Diese könnten für eine Verringerung der Intensität des $[M+H]^+$ -Ions verantwortlich sein. Dabei wurde bei stetiger Injektion von CTC mittels Fullscan Aufnahme die Anwesenheit von Ammonium- und Natriumaddukten überprüft. Entsprechende m/z -Verhältnisse wurden nicht gefunden. Weiterhin wurde eine frühzeitige Wasserabspaltung untersucht. Auch dieses m/z -Verhältnis wurde nicht detektiert.

Die Analytik der Tetracycline unterliegt wie bereits beschrieben starken Matrixeffekten. Auch die Ionisierung ist im Vergleich zu den Sulfonamiden geringer. Diese Problematik konnte anhand der Optimierung der UHPLC- und QTRAP-Parameter zwar verringert, aber nicht komplett eliminiert werden.

6.3 Analyse mittels UHPLC/QTOF

Für das Messsystem UHPLC/QTOF wurde ebenfalls eine Methode für alle 15 Analyten entwickelt. Da im QTOF prinzipiell alle Ionen zum Detektor gelangen, ist die Nachweisstärke im Fullscan im Vergleich zur QTRAP stark erhöht.

6.3.1 UHPLC-Parameter

Da sich die Säule Kinetex PFP (2.6 μ , 50 x 4,6 mm) von Phenomenex als geeignet herausgestellt hatte, wurde diese auch für die Messung mittels UHPLC/QTOF verwendet. Das Eluentensystem konnte jedoch nicht von der UHPLC/QTRAP-Methode übernommen werden. Voruntersuchungen zeigten, dass mit Methanol ein zu hohes Hintergrundrauschen aufgezeichnet wird, so dass die eigentlichen Analyt-Signale überlagert wurden. Eine Verwendung von Acetonitril war dagegen möglich. Als wässriger Eluent wurde Wasser mit 2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure verwendet. Da Acetonitril eine höhere Elutionskraft besitzt als Methanol, musste der UHPLC/QTRAP-Gradient entsprechend modifiziert werden. Dazu

mussten die Startbedingungen auf einen organischen Lösungsmittelanteil von 9 % herabgesetzt werden. Da Acetonitril als organischer Eluent diente, war ein Spülschritt mit einem Fluss von 0,6 mL/min ausreichend. Das Injektionsvolumen wurde auf 2 μ L festgelegt, um die Kontamination des hochauflösenden Messsystems zu verhindern. Für die späteren Messungen der Probenextrakte wurde zusätzlich das Verdünnen der Proben um den Faktor fünf festgelegt.

6.3.2 QTOF-Parameter

Durch die Trennung mittels HPLC können Messperioden festgelegt werden. In diesen Perioden wurden die entsprechenden Produktionenscans sowie ein Fullscan durchgeführt. Im Unterschied zur QTRAP musste für die einzelnen Analyten keine Optimierung der analytspezifischen Potentiale durchgeführt werden, so dass die QTRAP-ESI-Parameter und Potentiale übernommen werden konnten. Das QTOF kann ohne spezifische Kollisionsenergien arbeiten. Dafür wird ein Kollisionenergie-Bereich ausgewählt und dessen Spannweite eingestellt. Dies ist notwendig, da nicht wie mittels QTRAP einzelne Produktionen fokussiert werden, sondern alle Produktionen gescannt und detektiert werden. Im Unterschied zum bei der QTRAP angewendeten MRM entfallen bei dem Produktionenscan die Einstellungen für einzelne Produktionen.

Da die Ionisierungseinheit des QTOF die Möglichkeit bietet, zwischen den zwei Ionisierungsarten ESI und „atmospheric pressure chemical ionization“ (APCI) zu wählen, wurde getestet, ob die Verwendung der APCI-Ionisierungseinheit zu einer höheren Signalintensität führt. Dafür wurden die typischen Werte für die Parameter Heizer Gas (30 psi), Curtain Gas (25 psi), Declustering Potential (60 V) sowie eine Kapillarspannung von 5000 V verwendet. Variiert wurden das Zerstäubergas sowie die Quelltemperatur. Für die Vergleichbarkeit der Ionisierung von ESI und APCI wurden die Flächen von SDZ, als Beispiel für die Sulfonamide, ausgewertet (Abb. 6.1). Nur ~20-30 % der mittels ESI erhaltenen Fläche von SDZ konnten mit APCI auch nach Variation des Zerstäubergases und der Quelltemperatur erreicht werden. Die Tetracycline zeigten ebenfalls nur eine minimale bis keine Ionisierung mittels APCI. Als Ionisierungsmethode wurde daher die ESI verwendet.

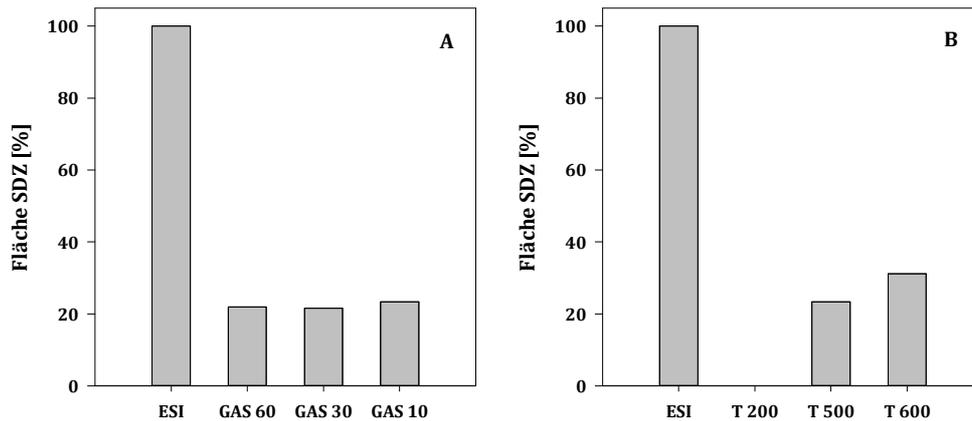


Abb. 6.1: Flächen von SDZ [%] in Abhängigkeit der variierten Parameter ((A) Zerstäubergas, (B) Temperatur [°C]) im Vergleich zur Ionisierung mittels ESI.

6.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die zu entwickelnde LLE sollte für beide Antibiotikaklassen die optimalen Extraktionsbedingungen vereinen und eine simultane Bestimmung mit niedrigen Nachweisgrenzen für gealterte Böden ermöglichen.

Speziell für die Bestimmung von Sulfonamiden wurden bereits viele unterschiedliche Extraktionsverfahren veröffentlicht. Diese unterscheiden sich vor allem durch Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden (Ultraschall, Pressurized Liquid Extraction (PLE), Flüssig-Flüssig Extraktion, Accelerated Solvent Extraction (ASE)) sowie durch unterschiedliche Extraktionsmittel (Methanol, McIlvaine Puffer, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Ethylacetat, ACN/Wasser) (Blackwell *et al.*, 2004; García-Galán *et al.*, 2013; Hamscher *et al.*, 2005a; Stoob *et al.*, 2006). Als effektivste Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden in gealterten Bodenproben stellte sich die mikrowellenunterstützte Extraktion heraus. Da für eine verbesserte Extraktion von Sulfonamiden hohe Temperaturen verwendet werden müssen (Förster *et al.*, 2008; Raich-Montiu *et al.*, 2010), ist diese Methode im Hinblick auf die notwendige simultane Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen nicht das Mittel der Wahl. Denn die Wiederfindungen der Tetracycline nehmen ab einer Temperatur von 40 °C ab und sie unterliegen Transformationsreaktionen (Doi und Stoskopf, 2000; Hassani *et al.*, 2008). Ein bekanntes Transformationsprodukt von Tetracyclin stellt zum Beispiel das Anhydro-Tetracyclin dar (Halling-Sørensen *et al.*, 2002). Für die Extraktion von Tetracyclinen konnte daher kein Nutzen aus der mikrowellenunterstützten Extraktion gezogen werden.

Für die Extraktion von Tetracyclinen wurden ebenfalls bereits Studien veröffentlicht. Diese wurden unter anderem mittels Schüttelextraktion mit Citratpuffer/Ethylacetat durchgeführt (Hamscher *et al.*, 2002). Aber auch Methanol, EDTA, McIlvaine-Puffer, Aceton/Ameisensäure

wurden als Extraktionsmittel mit PLE, Ultraschall oder Schüttelextraktion verwendet (Aga *et al.*, 2005; Blackwell *et al.*, 2004; Jacobsen *et al.*, 2004; O'Connor und Aga, 2007).

Vor diesem Hintergrund wurde bei der Methodenentwicklung mit einer hauptsächlich wässrigen Extraktion und einer schonenden Methode mit vielen Extraktionsschritten, um ein eventuelles „Aufbrechen“ der Bodenmatrix zu initiieren, begonnen.

6.4.1 Extraktion mittels kontinuierlichem Durchfluss

Dass eine hohe Niederschlagsmenge einen Einfluss auf bestimmte Sulfonamide und ihren Weg durch die verschiedenen Bodenschichten haben kann, zeigten Spielmeyer *et al.* (2017a) anhand ihrer Lysimeterstudien. Sie konnten nach starken Regenfällen die höchste Konzentration an SMZ und SMX in dem aufgefangenen Sickerwasser nachweisen. Daher wurde durch Simulation eines dauerhaften Niederschlages getestet, ob eine verstärkte Analytauswaschung aus dem Boden zu erreichen war. Hierfür wurde ein kontinuierlicher Durchfluss durch den Boden geleitet. Anstatt Regenwasser wurde jedoch ein Puffer verwendet, der zu einer schnelleren und höheren Extraktion der Analyten aufgrund eines effizienteren Aufbrechens der Bodenmatrix führen sollte. Die Bodenproben wurden zur Auflockerung mit ausgeheizten Glasperlen vermischt und in leere SPE-Kartuschen gegeben. Durch Anlegen eines Unterdruckes sollte kontinuierlich Flüssigkeit durch den Boden geleitet werden. Die Veränderung der Bodenmatrix aufgrund des Puffers führte jedoch zu einer starken Verdichtung des Bodens, so dass kein stetiger Durchlauf gegeben war. Trotz Glasperlen unterschiedlicher Größe und Menge reichte der erzeugbare Unterdruck nicht für einen konstanten Fluss aus. Aus Vorarbeiten von Cantaro (2014) war bekannt, dass die Zugabe von Lösungsmitteln eine noch stärkere Verdichtung der Bodenmatrix bewirkt. Ein Durchfluss mit Zusatz eines organischen Lösungsmittels wurde deswegen hier nicht weiter untersucht. Auch eine Extraktion mittels kontinuierlichem Wasserdurchfluss wurde nicht getestet, da die Extraktionswirkung von Wasser für eine vollständige Extraktion in kurzer Zeit als zu gering eingeschätzt wurde (vgl. Lysimeterstudie von Spielmeyer *et al.* (2017a)).

6.4.2 Einfluss von Puffer und pH-Werten

Da ein „Aufbrechen“ der Matrix nicht mit einer kontinuierlichen Extraktion erreicht wurde, wurde zunächst der Einfluss verschiedener Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen und pH-Werten untersucht (vgl. Tab. 6.1). Neben der Verwendung eines einzelnen Puffers wurden diese auch in Kombination eingesetzt.

Tab. 6.1: Für die Extraktion untersuchte Puffer und jeweiligen Salze mit Konzentrationen, EDTA-Zusatz und pH-Wert.

Salz	Konzentration	EDTA-Zusatz (0,05 M)	pH-Wert
Citrat	1 M	Ja	4,7
Natriumacetat	1 M	Nein	6,0
Natriumacetat	1 M	Ja	5,5
Natriumacetat	2 M	Ja	5,5
Natriumacetat	1 M	ja	4,7

Der Zusatz von EDTA zu den jeweiligen wässrigen Lösungen erfolgte, um die Chelatkomplexbildung von Tetracyclinen mit Metallionen zu verhindern (Lee und Everett, 1981; Oka *et al.*, 2000). Mit dem Natriumacetatpuffer ohne EDTA-Zusatz konnten dementsprechend nur sehr geringe Mengen an Tetracyclin extrahiert werden, so dass dieser nicht weiter verwendet wurde. Ein Unterschied in der Extraktionseffizienz zwischen dem 1 M und 2 M Natriumacetatpuffer konnte für beide Antibiotikaklassen nicht festgestellt werden. Da Tetracycline im leicht sauren Bereich keiner Isomerisierung unterliegen, wurde für weitere Versuche der Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert 4,7 verwendet (Halling-Sørensen *et al.*, 2002). Mit Citratpuffer und Natriumacetatpuffer, jeweils pH 4,7, konnten sehr ähnliche Wiederfindungen erzielt werden. Um den Effekt zu verstärken, wurden diese Puffer in Kombination mit insgesamt zehn Extraktionsschritten à fünf Minuten weiter untersucht. Die zehnfache Extraktion wurde ausgewählt, um durch wiederholte Zugabe von frischem Puffer ein „Aufbrechen“ der Matrix zu erreichen. Dabei wurde eine Extraktionszeit von fünf Minuten verwendet, um die Handhabung im Labor zu vereinfachen. Darüber hinaus wurde eine einstündige Extraktion mit Methanol hinzugefügt, um auch die unpolareren Sulfonamide zu extrahieren.

Um die Extraktionseffizienz der bis zu diesem Zeitpunkt entwickelten Methode einordnen zu können, wurde ein Vergleich mit der Literaturmethode nach Hamscher *et al.* (2002) durchgeführt (vgl. Abb. 6.2). Die Methode nach Hamscher *et al.* (2002) besteht aus zwei Extraktionsschritten mittels Horizontalschüttler. Die Proben werden dabei mit Citratpuffer vorbehandelt und anschließend erfolgt die eigentliche Extraktion mit Ethylacetat. Der Vergleich erfolgte mit dotierten Proben mit einer Inkubationszeit von zehn Minuten und zehn Tagen. Die ermittelten Wiederfindungsraten, sowohl für die zehn Minuten als auch für die zehn Tage inkubierten Proben, waren mit der entwickelten wässrigen Methode höher als im Vergleich zu den ermittelten Wiederfindungsraten mit der Methode nach Hamscher *et al.* (2002). Einzige Ausnahme bildete CTC bei den Wiederfindungen nach zehn Minuten. Der Ansatz der wässrigen

Extraktion war demnach aber erfolgreich. Bei beiden Methoden konnte jedoch ein Absinken der Wiederfindungen nach zehn Tagen Inkubation, außer bei CTC, festgestellt werden. Die weitere Methodenentwicklung zielte folglich darauf ab, auch bei gealterten Proben eine höhere Wiederfindungen zu erzielen.

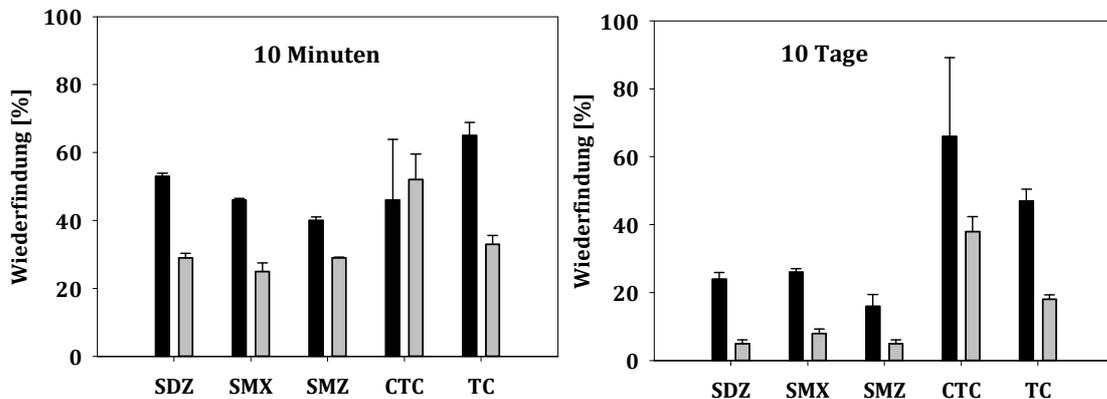


Abb. 6.2: Vergleich der Wiederfindungen zwischen wässriger (schwarz) und organischer (grau) (Hamscher *et al.*, 2002) Extraktion, für 10 Minuten und 10 Tage mit 100 µg/kg Analyten dotierte Proben. Die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.

6.4.3 Einfluss der Anzahl der Extraktionszyklen sowie -dauer

Da eine zehnfache Extraktion sehr zeitaufwendig ist wurde untersucht, ob eine Verringerung der Extraktionsschritte eine Auswirkung auf die Wiederfindung der Analyten hat. Mit einer Reduktion auf 2, 4, 6 oder 8 Schritte konnte keine Verbesserung oder Verschlechterung in den Wiederfindungen der Analyten festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete hier das polare Sulfonamid SGU, dessen Wiederfindungen bei einer geringeren Anzahl der Extraktionsschritte höher war. Aufgrund dessen wurde die Anzahl der Extraktionsschritte für die folgende Entwicklung auf zwei Schritte reduziert.

Neben der Anzahl der Extraktionsschritte spielt auch die Länge der Extraktion eine Rolle, um eine „Aufbrechen“ der Matrix zu generieren. Dazu wurden kurze (5 Minuten), mittellange (3 Stunden) und lange Extraktionen (24 Stunden) in unterschiedlicher Kombination und Häufigkeit getestet. Die Testreihen zeigten, dass lange Extraktionen keine negativen Auswirkungen auf die Wiederfindungen hatten. Mehrmalige lange Extraktionen zeigten hingegen auch keine Verbesserung der Extraktionseffizienz. Die Vermutung, dass die Wiederfindungen vor allem für Sulfonamide so verbessert werden könnten, bestätigte sich nicht. Bei den zu untersuchenden Realproben handelte es sich aber um Boden, welcher über Jahre hinweg gealtert ist. Für die Methodenentwicklung standen hingegen Proben zur Verfügung, die im Vergleich dazu nur „kurz“ gealtert waren. Daher wurde nicht ausgeschlossen, dass eine lange Extraktion für die Aufarbeitung der über Jahre hinweg gealterten Proben, vor allem für

Sulfonamide, zu einer höheren Ausbeute führt. Eine Kombination mit zwei Extraktionsschritten, einer kurzen Extraktion von zehn Minuten und einer langen Extraktion von 24 Stunden, wurde für beide Antibiotikaklassen als eine optimale Lösung angesehen.

6.4.4 Einfluss der Lösungsmittel

Da festgestellt wurde, dass mit Citratpuffer sowie Natriumacetatpuffer ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde für die weitere Optimierung der Methode Citratpuffer verwendet. Die Handhabung des Natriumacetats bei pH 4,7 ist erschwert, da das Salz bei längerer Standzeit der Pufferlösung ausfällt und vor Verwendung erneut durch Erwärmen gelöst werden muss. Das alleinige Arbeiten mit Citratpuffer stellte daher eine Vereinfachung dar. Das Volumen an Citratpuffer der ersten kurzen Extraktion wurde auf 3 mL festgelegt, um ein vollständiges Befeuchten des Bodens, mit zusätzlichem Überstand, sicherstellen zu können.

Für die Methodenentwicklung wurde, neben Citratpuffer, Methanol als Lösungsmittel verwendet, um auch die unpolaren Verbindungen zu extrahieren. Für Methanol ist bekannt, dass es die Desorptionsrate von organischen Molekülen, durch „Aufquellen“ der organischen Substanz im Boden, erhöht (Brusseau *et al.*, 1991; Pignatello und Xing, 1996). Methanol wurde deshalb als geeignet für die Extraktion angesehen. Zum Vergleich wurden auch Tests mit einem unpolaren Lösungsmittelgemisch durchgeführt. Dazu wurde ein Gemisch aus Methanol, Acetonitril und Dichlormethan verwendet. Dies zeigte bei früheren Untersuchungen von Cantaro (2014) gute Ergebnisse. Andere Lösungsmittel wurden nicht untersucht, da die Vorarbeiten gezeigt hatten, dass der Boden bei langer Behandlung zu einer festen Masse wird. Dies ist für eine annähernd vollständige Extraktion und Aufbrechen der Matrix ungeeignet.

Der Vergleich zwischen dem Gemisch und Methanol ergab ähnliche Wiederfindungen. Dabei wurden unter anderem Tests mit und ohne Dichlormethan durchgeführt, die Reihenfolge variiert und die wässrige Phase mitverwendet oder nur die organische Phase weiter verwendet. Dabei variierten die Wiederfindungen der Tetracycline stark. Die zusätzlich mitgeführten Extraktionen mit Methanol zeigten dagegen konstantere Wiederfindungen. Optisch war die Bodenmatrix mit den Methanol-Extraktionen ebenfalls gleichmäßiger aufgeschlossen. Dies ist auf die aufschwemmende Wirkung von Methanol zurückzuführen (Brusseau *et al.*, 1991; Pignatello und Xing, 1996). Als geeignetes Lösungsmittel konnte demnach Methanol identifiziert werden. Angelehnt an die Methode nach Spielmeyer *et al.* (2014), wurde für die zweite Extraktion ein Volumen von 2 mL Citratpuffer und 4 mL Methanol festgelegt. Dabei wurde, im Vergleich zu der Methode nach Spielmeyer *et al.* (2014), der wässrige Anteil aufgrund der Ergebnisse der Methodenentwicklung erhöht und der organische Anteil, im Hinblick auf die anschließende Festphasenextraktion (vgl. Kap. 6.5), verringert.

6.4.5 Extraktion mittels saurer Hydrolyse

Durch den Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure wurde eine mögliche Oxidation von Bodenbestandteilen getestet. Hiermit sollte die Bindung der Analyten an die Bodenmatrix verringert und ein Übergang in die Extraktionslösung erleichtert werden. Auch eine saure Hydrolyse mit rauchender Salzsäure wurde untersucht. Dafür wurden die Säuren vor der eigentlichen Extraktion auf dotierten Boden gegeben und über Nacht bei 55 °C im Trockenschrank inkubiert. Unterschiedliche Mengen an Schwefelsäure (10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL) sowie 50 µL Salzsäure (HCl) wurden verwendet. Der Effekt der sogenannten Matrixaufschließung konnte mit der Säure-Vorbehandlung zwar erzielt werden, führte aber nicht zu dem gewünschten Effekt der Verbesserung der Wiederfindung. Stattdessen kam es anscheinend zu einem Abbau der Analyten. Die Wiederfindungen mit Vorbehandlung waren im Vergleich zu denen ohne Vorbehandlung für alle Analyten niedriger. Die Menge an Schwefelsäure bewirkte keinen Unterschied. Schon bei 10 µL konzentrierter Schwefelsäure nahm die Wiederfindung ab. Auch die Vorbehandlung mit Salzsäure bewirkte diesen Effekt (vgl. Abb. 6.3). Bei diesem Versuch war das Augenmerk auf die Verbesserung der Wiederfindung der Sulfonamide gelegt, da bei den Tetracyclinen die Wahrscheinlichkeit der Dehydratisierung bei stark sauren Bedingungen steigt (Halling-Sørensen *et al.*, 2002). Die Abnahme der Extraktionseffizienz von hohen zu niedrigen pH-Werten beobachteten auch Stoob *et al.* (2006). Sie konnten bei einem pH-Wert von 2,2 keine quantitative Bestimmung der untersuchten Sulfonamide durchführen. Sie erklärten dies mit einer höheren Matrixextraktion, welche zu einer Signalsuppression geführt hat, sowie mit einer insgesamt schlechteren Extraktionseffizienz bei niedrigen pH-Werten. Sie konnten dies mittels aufgearbeitetem Kontrollboden nachweisen. Der Einbau einer sauren Hydrolyse in die Methode wurde aus diesen Gründen nicht weiter verfolgt.

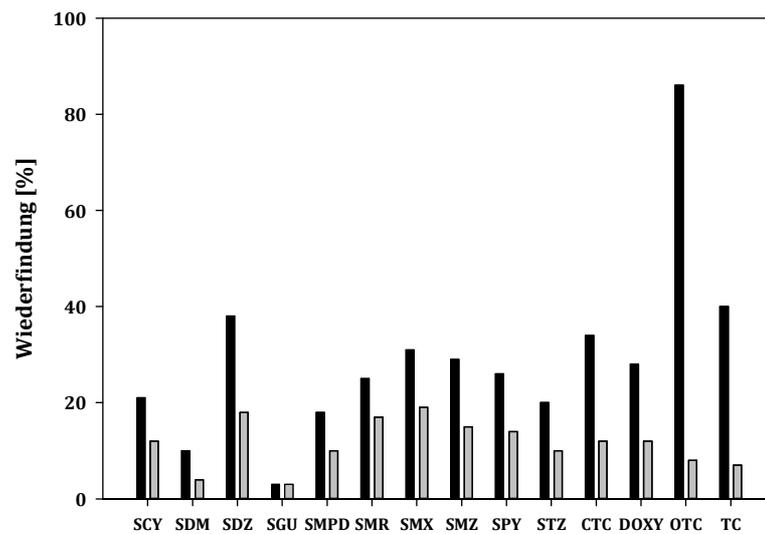


Abb. 6.3: Wiederfindungen der Analyten (Dotierung: 100 µg/kg) ohne (schwarz) und mit (grau) Vorbehandlung mit HCl.

6.5 Festphasenextraktion

Für die Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen wird in der Literatur häufig, neben der eigentlichen Extraktion, eine Festphasenextraktion verwendet. Dieser zusätzliche Schritt der Aufarbeitung dient der Entfernung von störenden Matrixbestandteilen sowie der Aufkonzentrierung der Analyten. Dabei finden verschiedene SPE-Säulen und Methoden für die Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Boden Verwendung (Aga *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2016; Tso *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Die sich im Institut bereits bewährte SPE-Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen in wässrigen Proben nach Bailey *et al.* (2016) wurde auf ihre Verwendbarkeit bei Bodenproben untersucht. Da die Probenmatrices grundlegend verschiedene Eigenschaften aufweisen, wurde die Methode an die Matrix Boden angepasst und optimiert.

6.5.1 Sequentielle Elution

Der verwendete Säulentyp spielt für eine erfolgreiche Aufkonzentrierung bei einer gleichzeitigen Entfernung von Matrixbestandteilen eine wichtige Rolle. Aufgrund dessen wurden fünf SPE-Kartuschen verschiedener Hersteller untersucht. Die Basis der Materialien bildet ein hydrophobes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer (Oasis® HLB, Strata™ XL, Isolute® ENV+, Chromabond® HR-X) sowie eine Umkehrphase auf Kieselgelbasis (HyperSep C18™). Für die Auswahl der geeignetsten SPE-Säule wurde eine sequentielle Elution durchgeführt. Dafür erfolgte die Elution mit 0 bis 100 % Methanol, wobei der methanolische Anteil bei jedem Elutionsschritt um 10 % erhöht wurde. Das Elutionsvolumen betrug bei jedem Schritt 4 mL. Die Wiederfindungen für jede Fraktion wurden bestimmt und die Summe der Wiederfindungen für

die einzelnen Fraktionen berechnet. Anhand des Versuches wurde die SPE-Säule identifiziert, die für beide Antibiotikaklassen zur höchsten Wiederfindung führt und die die Möglichkeit eröffnet, einen Waschschrift mit einem methanolischem Anteil einzubauen, um Matrixbestandteile zu entfernen.

SDZ, SMZ sowie SMX wurden als Stellvertreter für die Sulfonamide untersucht. In Abb. 6.4 am Beispiel von SDZ sind die Ergebnisse der sequentiellen Elution für die Klasse der Sulfonamide dargestellt. Die Wiederfindung mittels Chromabond® HR-X lag bei 90 %, wohingegen die anderen SPE-Säulen Werte von ≤ 50 % erreichten. Die Wiederfindungen mit der SPE-Säule Isolute® ENV+ zeigten bei einem ersten Versuch ähnliche Ergebnisse wie für die Chromabond® HR-X Säule. Diese konnten bei einer zweiten Durchführung jedoch nicht reproduziert werden, so dass auch diese Säule nicht als geeignet angesehen wurde. Auch die ermittelten Wiederfindungen von SMZ und SMX als weitere Vertreter der Sulfonamide spiegeln diese Ergebnisse wider (Daten nicht gezeigt). Die niedrigen Elutionsraten bei den getesteten SPE-Säulen, ausgenommen die Chromabond® HR-X Säule, könnten auf eine unvollständige Elution der Substanzen zurückzuführen sein. Von einer Extraktion mit ACN wurde abgesehen, da mit der Chromabond® HR-X Säule zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden. Die Elution von SDZ beginnt bei der Chromabond® HR-X bei 30 % Methanol. Bei den SPE-Säulen Oasis® HLB und Isolute® ENV+ ist der Methanolanteil, der die Elution der Analyten einleitet, ähnlich. Ein Waschschrift wäre also möglich. Die SPE-Säulen HyperSep C18™ und Strata™ XL sind jedoch ungeeignet für einen Waschschrift, da SDZ schon bei einem Methanolgehalt von 10-20 % eluiert.

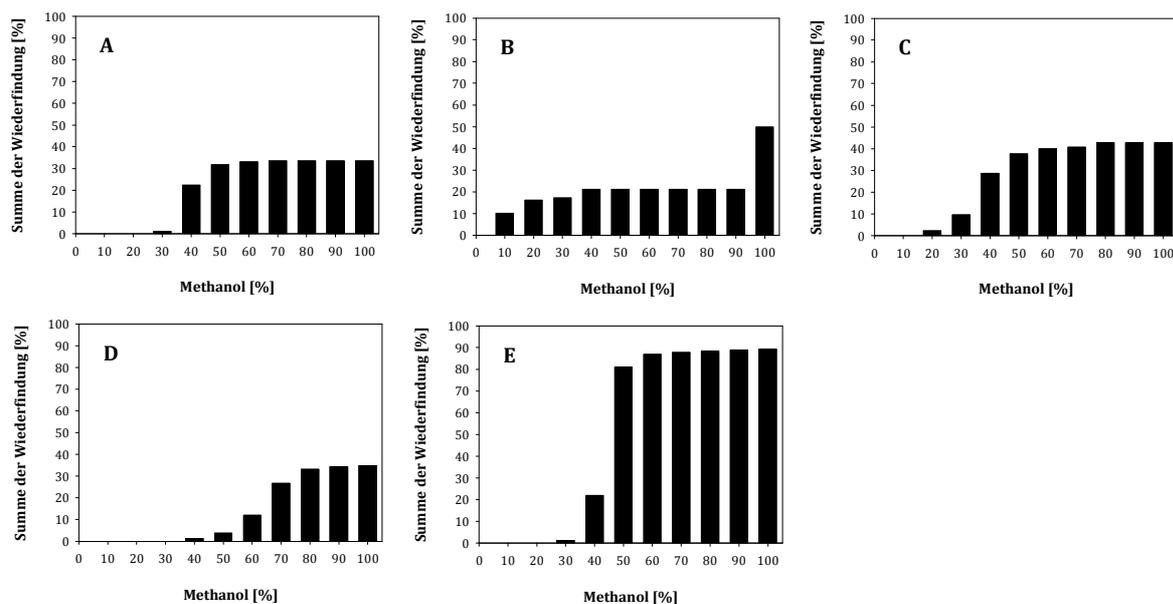


Abb. 6.4: Sequentielle Elution von Sulfadiazin für die SPE-Säulen Oasis® HLB (A), HyperSep C18™ (B), Strata™ XL (C), Isolute® ENV+ (D), Chromabond® HR-X (E), Dotierung der Proben mit 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Analyt.

Als Stellvertreter für die Tetracycline wurden TC und CTC untersucht. Die SPE-Säule Chromabond® HR-X zeigt ebenfalls für die Antibiotikaklasse der Tetracycline, beispielhaft an TC dargestellt (Abb. 6.4), die höchste Wiederfindung. Bei den Säulen Oasis® HLB und Strata™ XL konnte kein Tetracyclin gemessen werden. Eine Elution des Tetracyclins auf der Säule Chromabond® HR-X beginnt bei einem Methanolgehalt von 50 %. Mit den SPE-Säulen HyperSep C18™ und Isolute® ENV+ erst bei Methanolanteilen von 100 % und 70 %. Da SDZ bei einem geringeren Methanol-Anteil eluiert und eine gleichzeitige Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen erfolgen sollte, ist der Methanolgehalt zu Beginn für die Elution der Tetracycline in dem Fall vernachlässigbar. Anhand der Wiederfindung wurde gezeigt, dass die SPE Säule Chromabond® HR-X, welche auch Bailey *et al.* (2016) verwenden, am geeignetsten ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Einbau eines Waschschrattes möglich ist, so dass mit dieser SPE-Säule weitergearbeitet wurde.

In der Literatur stellt die SPE-Säule Oasis® HLB eine gängige Säule für die Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen in Boden dar (García-Galán *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Raich-Montiu *et al.*, 2007). In diesem Fall konnte jedoch gezeigt werden, dass die SPE-Säule Chromabond® HR-X bessere Eigenschaften für die Bestimmung der beiden Antibiotikaklassen im Hinblick auf die Wiederfindungen aufweist, zumal kein Tetracyclin in den Proben mit der Aufarbeitung über die SPE-Säule Oasis® HLB detektiert werden konnte. Dass die sequentielle Elution nicht funktioniert hat, kann ausgeschlossen werden, da in den gleichen Proben die Sulfonamide messbar waren. Eine zu starke Retardierung des Tetracyclins, zum Beispiel aufgrund vorhandener Matrixbestandteile, könnte eine Elution verhindert haben. Eine Elution mit einem unpolaren Lösungsmittel, wie Acetonitril, wäre möglich gewesen. Da der Nebeneffekt eines unpolaren Lösungsmittels aber die vermehrte Coelution von abgetrennten Matrixbestandteilen zur Folge haben könnte, wurde davon abgesehen. Außerdem erfolgt nach Literaturangaben die Elution auch häufig mit Methanol (Jacobsen *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2007). Neben der Verwendung einer einzelnen SPE-Säule ist in der Literatur die Kombination aus zwei SPE-Säulen mit verschiedenen Materialien bekannt. Dabei wird die Probe erst über einen starken Anionenaustauscher (SAX) gereinigt und anschließend über eine zweite Säule mit einer hydrophoben Umkehrphase angereichert (Andreu *et al.*, 2009; Jacobsen *et al.*, 2004; Shelver *et al.*, 2010; Vazquez-Roig *et al.*, 2010). Da die SPE-Säule Chromabond® HR-X für die untersuchten Bodenmatrix und simultane Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, wurde von einer Kombination aus zwei Säulen abgesehen. Denn im zunehmenden Maße spielt, neben einer einfachen Handhabung und der Durchführung, auch der Blick auf die Umwelt für die Entwicklung einer zeitgemäßen Methode eine wichtige Rolle. Um insgesamt die Wiederfindung der Tetracycline zu erhöhen, wurde bei weiteren Versuchen, wie bei der Methode nach Bailey *et al.* (2016) neben Methanol, auch angesäuertes Methanol zur Elution verwendet.

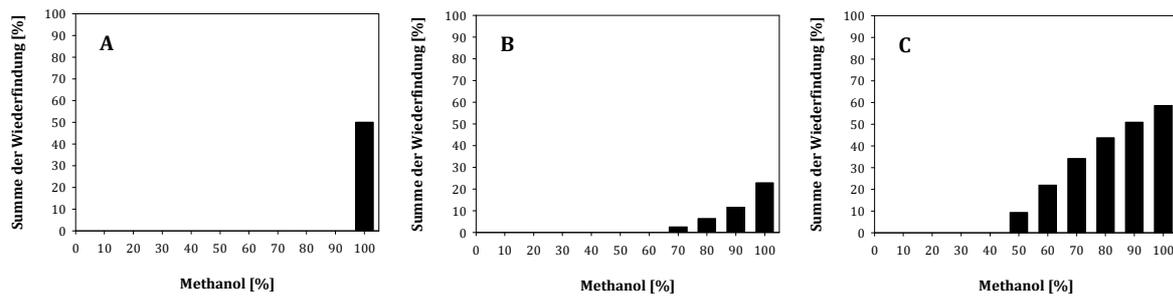


Abb. 6.5: Sequentielle Elution von Tetracyclin für die SPE-Säulen HyperSep C18™ (A), Isolute® ENV+ (B), Chromabond® HR-X (C), Dotierung der Proben mit 100 µg/kg Analyt.

6.5.2 Einbau eines Waschschrives

Basierend auf den Ergebnissen für SDZ, wäre im Rahmen der SPE ein Waschschrive mit 20 %-iger Methanollösung möglich (Kap. 6.5.1). Da SGU jedoch polarer ist als das zuvor untersuchte SDZ, wurde der untersuchte Waschschrive mit 10 %-iger Methanollösung durchgeführt. Um den Effekt des Waschschrives auf die anschließende Analyse zu überprüfen, wurden Proben mit allen untersuchten Sulfonamiden und Tetracyclinen dotiert und mit und ohne Waschschrive aufgearbeitet. Das Ziel, die Wiederfindungsraten durch Verringerung von Matrixbestandteilen deutlich zu erhöhen, konnte mit einem Methanolgehalt von 10 % nicht erreicht werden (vgl. Abb. 6.6). Die Extrakte der mit Waschschrive behandelten Proben zeigten eine ähnlich starke bräunliche Färbung wie die Extrakte ohne Waschschrive. Auch die Wiederfindungen mit und ohne Waschschrive zeigten eine hohe Ähnlichkeit. Einen tendenziellen Rückgang zeigte die Wiederfindung von SGU mit 52 % auf 38 %. Ein Verlust an SGU aufgrund des Methanolgehaltes im Waschschrive konnte somit nicht ausgeschlossen werden. Da mit einem Waschschrive die Wiederfindung nicht verbessert werden konnte, wurde kein Waschschrive in die SPE-Methode integriert. In der Literatur werden Waschschrive mit Wasser durchgeführt (Raich-Montiu *et al.*, 2007; Vazquez-Roig *et al.*, 2010). Von diesem wurde aber abgesehen, da auch mit organischem Anteil nur geringfügig bessere Wiederfindungen erzielt werden konnten und dementsprechend von einem rein wässrigen Waschschrive keine positiven Effekte zu erwarten waren. Zusätzlich ist die Zeitersparnis aufgrund eines nicht vorhandenen Waschschrives bei einem hohen Probendurchsatz von Vorteil.

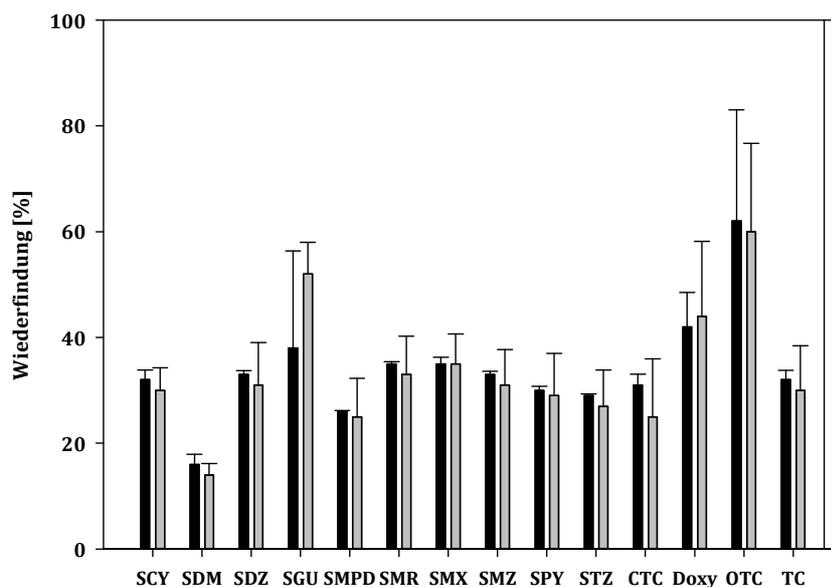


Abb. 6.6: Wiederfindungen der Analyten mit (schwarz) und ohne (graue) integriertem Waschschritt (WS) in der SPE-Methode, bei Proben mit einer Dotierung von 100 µg/kg. Die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.

6.5.3 Variation Probenvolumen

Aufgrund der verwendeten organischen Lösungsmittel für die Extraktion (Kap. 6.4), musste vor der Durchführung der SPE eine Verdünnung mit Wasser erfolgen. Die Ergebnisse aus Kapitel 6.5.2 haben gezeigt, dass SGU schon bei einem Anteil von 10 % Methanol eluiert. Der organische Anteil der Probe musste demnach unter 10 % liegen. Auch Raich-Montiu *et al.* (2007) und Huang *et al.* (2013) gaben an, ihre Proben auf einen Gehalt an organischen Lösungsmitteln von 5 % zu verdünnen, obwohl beide Arbeiten nicht das polare Sulfonamid SGU umfassen. Daher wurden die hergestellten Bodenextrakte auf einen Anteil von 2,5 % und 5 % Methanol verdünnt, was einem Aufgabevolumen auf die SPE-Säule von 49 mL bzw. 39 mL entsprach. Im Vergleich dazu verwendeten O'Connor *et al.* (2007) ein Probenvolumen von 500 mL. Dieser Unterschied geht vor allem auf den höheren organischen Lösungsmittelanteil der Probe nach der Extraktion zurück. Die Verwendung eines geringeren Probenvolumens bei der Durchführung einer SPE bietet erhebliche Vorteile hinsichtlich der Dauer und Handhabung.

Die Wiederfindungen bei einem Methanolgehalt von 2,5 %, also einem höheren Probenvolumen, waren für alle Analyten geringfügig besser als mit einem Methanolanteil von 5 %. Dies könnte an dem geringeren organischen Lösungsmittelanteil oder an der höheren Verdünnung der Probenmatrix liegen. Eine niedrigere Konzentration der Matrixbestandteile in der Aufgabelösung kann eine bessere Anlagerung der Analyten auf dem Säulenmaterial begünstigen. Um zwischen den zwei Möglichkeiten differenzieren zu können, wurde ein weiterer Arbeitsschritt vor der SPE eingefügt. Dabei wurden die Extrakte für 30 Minuten im

Stickstoff-Strom inkubiert um den organischen Lösungsmittelanteil zu verringern. Anschließend wurden die Proben auf einen methanolischen Anteil von unter 5 % verdünnt, bevor eine SPE durchgeführt wurde. Der Vergleich von direkt verdünnter Probe und zuerst eingengter Probe zeigte nur vernachlässigbare Unterschiede in der Wiederfindung, wobei die Wiederfindungen der Analyten bei der eingengten Probe geringfügig höher waren. Die eingengte Probe musste weniger verdünnt werden, um einen Methanolgehalt von unter 5 % zu erreichen. Sie wies dadurch eine höhere Konzentration der Matrixbestandteile in der Aufgabelösung auf. Die Verdünnung der Matrixbestandteile konnte somit nicht für die zuvor erhaltenen besseren Wiederfindungen bei unterschiedlichen Probenvolumina verantwortlich sein. Da kein Unterschied bei den Wiederfindungen der beiden Methoden feststellbar war, konnte durch das Einführen des zusätzlichen Arbeitsschrittes das einsetzbare Probenvolumen für die SPE letztlich halbiert (25 mL) werden. Da die Probenaufgabe einen entscheidenden Zeitfaktor bei der SPE und einem automatischen SPE-System darstellt, konnte die SPE-Methode auf diese Art entscheidend verkürzt werden.

6.6 Mikrowellenextraktion

Bekannt ist, dass bei steigender Kontaktzeit von Sulfonamiden und Matrix die Extrahierbarkeit aus Boden sinken kann (Hamscher *et al.*, 2005a; Stoob *et al.*, 2006). Sulfonamide sind temperaturstabil und werden aufgrund dessen in der Literatur häufig mit harschen Methoden, wie PLE, ASE oder MWE aus Boden extrahiert (Chen *et al.*, 2009; Christian *et al.*, 2003; Jacobsen *et al.*, 2004). Die Unterschiede zu einer LLE stellen hier die härteren Extraktionsbedingungen, wie erhöhter Druck und Temperatur, dar. Aber auch bei harschen Methoden ist eine Abnahme der Extrahierbarkeit über die Zeit festzustellen. Chen *et al.* (2009) demonstrierten mittels MWE einen Rückgang der Sulfonamid-Wiederfindungen von 86-102 % auf 38-48 % innerhalb von vier Wochen. Ein Vergleich der Extraktionsmethoden LLE, PLE, Ultraschallsonde und MWE zeigte, vor allem für gealterte Sulfonamidrückstände im Boden, dass die MWE die effizienteste Methode darstellt (Raich-Montiu *et al.*, 2010). Mittels MWE konnten die Autoren in drei Monate gealterten Bodenproben noch Wiederfindungen von 15-64 % erreichen. Auch Förster *et al.* (2008) stellten in einem Vergleich zwischen LLE, ASE und MWE fest, dass die MWE die effizienteste Methode zur Extraktion von gealterten SDZ-Rückständen darstellt.

Angelehnt an die Ergebnisse von Förster *et al.* (2008) und Raich-Montiu *et al.* (2010) wurde die MWE adaptiert und an die Eigenschaften aller zehn Sulfonamide angepasst und optimiert. Für die Methodenadaption wurde 1 g Boden verwendet, dotiert mit einem Sulfonamid-Mischstandard mit einer Konzentration von 100 µg/kg. Die absoluten Wiederfindungen wurden mit einem Lösungsmittelstandard bestimmt. Die Einwaage wurde wie bei der entwickelten LLE-Methode auf 1 g beschränkt, da nur gewisse Mengen der zu untersuchenden Proben zur Verfügung standen. Weiterhin wurde die Extraktionszeit auf 15 Minuten festgelegt, da Förster *et*

al. (2008) keine Verbesserung der Wiederfindungsraten bei längerer Extraktionszeit beobachten konnten. Auch das Volumen des Extraktionsmittels wurde an die vorhandenen Bedingungen (Größe der Aufschlussgefäße (Kap.13.6.4)) angepasst. Nach Durchführung der MWE wurden alle Proben mittels SPE-Methode nach Kap. 13.6.3 aufgereinigt. Ohne diesen Reinigungsschritt war eine Messung mittels UHPLC/QTRAP, aufgrund einer zu hohen Viskosität, nicht möglich. In Tab. 6.2 sind die untersuchten Versuchsparameter der MWE dargestellt. Zum effizienteren Arbeiten wurden für die Methodenentwicklung Proben mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten verwendet.

Tab. 6.2: Versuchsparameter der MWE-Methodenadaption.

organische Phase	wässrige Phase	Verhältnis (organisch/wässrig)	Extraktionstemperatur [°C]
ACN, MeOH, ACN/MeOH (1:1)	Citratpuffer	1:4, 1:1, 4:1	80, 90, 100, 115, 150

Citratpuffer: 1 M Na-Citrat-Puffer mit 0,05 M EDTA, pH 4,7

6.6.1 Einfluss der Extraktionstemperatur

Der Faktor Temperatur spielt bei der MWE im Hinblick auf eine vollständige Extraktion eine wichtige Rolle. Um diesen Faktor für diese Methode festlegen zu können, wurden Temperaturen im Bereich von 80 – 150 °C getestet. Förster *et al.* (2008) erzielten mit einer Temperatur von 150 °C die besten Ergebnisse und erklärten, dass die hohe Temperatur notwendig für eine vollständige Extraktion von SDZ-Rückständen in gealtertem Boden sei. Dabei ist zu beachten, dass Förster *et al.* (2008) nur SDZ und seine beiden Metabolite 4-OH-SDZ und *N*-Acetyl-SDZ untersuchte und nicht zehn Sulfonamide mit jeweils unterschiedlich substituierten Resten und physikalischen/chemischen Eigenschaften. So konnte festgestellt werden, dass bei einer Extraktionstemperatur über 100 °C vor allem bei SGU eine Abnahme der absoluten Wiederfindung stattfindet. Zwischen 80 °C – 100 °C konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abb. 6.7). Da bei einer erhöhten Temperatur vermehrt Matrixbestandteile gelöst werden und die absoluten Wiederfindungen dadurch beeinflusst werden können, wurde undotierter Boden bei den unterschiedlichen Temperaturen aufgearbeitet und der Extrakt der SPE anschließend dotiert. Bei den so ermittelten „Matrix-Wiederfindungen“ war die Abnahme des Analytsignals bei steigender Temperatur weniger ausgeprägt. Ein Analytverlust bei hohen Temperaturen war aber möglich. Aufgrund der vereinfachten Handhabung bei 100 °C und keiner deutlichen Steigerung sondern einer tendenziellen Abnahme der absoluten Wiederfindung bei 150 °C, wurde die Extraktionstemperatur auf 100 °C festgelegt.

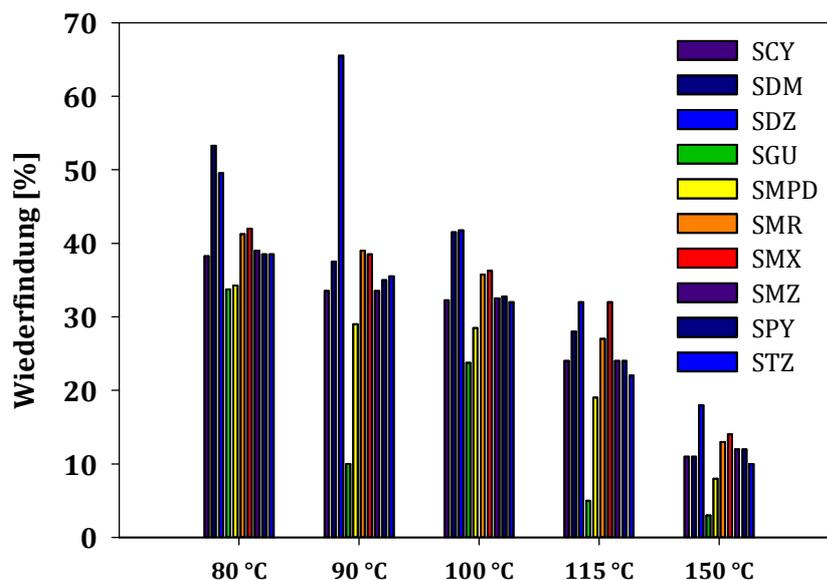


Abb. 6.7: Abhängigkeit der absoluten Wiederfindung aller untersuchten Sulfonamide von der Extraktionstemperatur.

6.6.2 Einfluss des Lösungsmittels und Lösungsmittelverhältnis

Sowohl Förster *et al.* (2008) als auch Raich-Montiu *et al.* (2010) verwendeten als Extraktionsmittel ACN/Wasser oder ACN/Puffer im Verhältnis von 1:4. Als wässrige Phase wurde in dieser Arbeit ausschließlich Citratpuffer verwendet, da die Effektivität dieses Puffers für Sulfonamide durch viele laborinterne Extraktionsmethoden bestätigt war. Mit Methanol wurden gute Ergebnisse bei der entwickelten LLE erzielt. Aufgrund dessen wurde für die MWE neben Acetonitril auch Methanol als Lösungsmittel herangezogen sowie eine Mischung der beiden.

In der Literatur wurde bei der MWE hauptsächlich mit einem höheren wässrigen Anteil gearbeitet. Für die Methodenentwicklung wurden aber zusätzlich höhere organische Lösungsmittelanteile verwendet. Angenommen wurde, dass ein höherer organischer Anteil in Verbindung mit einer höheren Temperatur eine bessere Zersetzung der Matrix bedingt. So sollte die Extraktion der Sulfonamide erleichtert werden. Gezeigt werden konnte, dass bei Erhöhung des wässrigen Anteils die Wiederfindungen der Sulfonamide abnahmen. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Polarität durch die Zugabe von Citratpuffer oder durch den Einsatz des wässrigen Lösungsmittels Methanol erhöht wurde. Mit der Verwendung von Methanol als Extraktionsmittel, alleine oder in Kombination mit Acetonitril, wurden im Vergleich mit Acetonitril immer geringere Wiederfindung erzielt. Eine Ausnahme bildete SGU, welches mit einem höheren wässrigen Anteil besser extrahiert wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass

SGU das polarste der hier untersuchten Sulfonamide darstellt. Im Vergleich zu den anderen Sulfonamiden wurden für SGU deutlich niedrigere Wiederfindungen erreicht. Das beste Ergebnis wurde bei einem Extraktionsgemisch organisch/wässrig im Verhältnis 1:4 (v/v) erzielt (vgl. Abb. 6.8). Bei diesem Gemisch wurde aber für die anderen Sulfonamide jeweils die niedrigste Wiederfindung ermittelt. Aus diesem Grund wurde die bessere Wiederfindung von SGU zu Gunsten der restlichen Sulfonamide zurück gestellt. Durch das Mitführen von internen Standards (IST) und den Vergleich der IST-Peakflächen in den unterschiedlichen Extraktionsvarianten konnte mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die absoluten Wiederfindungen durch unterschiedliche Matrixeffekte beeinflusst wurden. Daher wurde für die MWE das Extraktionsmittelgemisch ACN/Citratpuffer im Verhältnis 4:1 (v/v) festgelegt. Um Matrixeffekte und Analytverluste bei der Quantifizierung zu berücksichtigen, wurde für die anschließende Methodvalidierung mit dem Verhältnis Peakfläche Analyt/ Peakfläche IST gearbeitet.

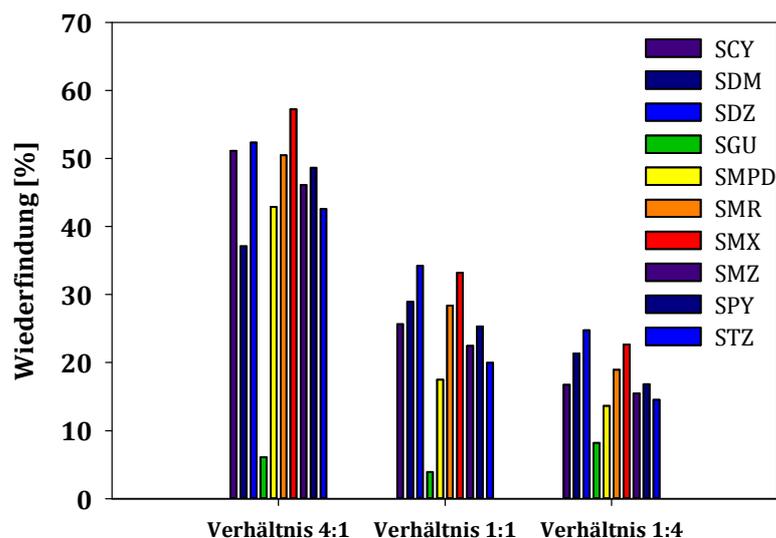


Abb. 6.8: Abhängigkeit der absoluten Wiederfindung der Sulfonamide von dem Verhältnis des Lösungsmittelgemisches (organisch/wässrig; 4:1, 1:1, 1:4, v/v).

6.6.3 Wiederfindung in gealterten Proben

Nach Optimierung der Methode wurden Proben aufgearbeitet, die 19 Tage mit einem Mischstandard inkubiert wurden. Wie am Anfang im Kap. 6.6 beschrieben, wird in der Literatur die MWE als effizienteste Methode für die Extraktion von Sulfonamiden aus Boden angesehen. Dennoch wurde in mehreren Studien trotz MWE die Abnahme der Wiederfindungen über die Zeit hinweg beschrieben. Eine derartige Abnahme konnte auch in diesem Fall beobachtet werden, wobei ein Rückgang der Wiederfindung um ca. 50 % erfasst wurde (Abb. 6.9). Chen *et*

al. (2009) konnten nach vier Wochen ebenfalls einen Rückgang der Wiederfindung um ca. 50 % feststellen. Auch die mittels PLE ermittelten Wiederfindungen für Sulfonamide nahmen bei einer Inkubationszeit von 17 Tagen um ca. 50 % ab (Stoob *et al.*, 2006). Diese schnelle Abnahme der Wiederfindung ist vor allem auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände zurückzuführen. Der Anteil schwankt je nach verwendeter Extraktionsmethode. Dennoch zeigen die verschiedenen Studien, dass schon nach wenigen Tagen die Bildung der nicht-extrahierbaren Rückstände in hohem Maße stattfindet, so dass die Analyten über Jahre im Boden verbleiben können (Chen *et al.*, 2009; Förster *et al.*, 2009; Hamscher *et al.*, 2005a; Kreuzig und Höltge, 2005; Stoob *et al.*, 2006). Der Hauptteil der Sulfonamide bindet dabei, meist kovalent über die Aminogruppe, an organische Bodenbestandteile wie Chinone oder wird in Huminstoffe eingelagert (Bialk und Pedersen, 2008; Bialk *et al.*, 2005; Gulkowska *et al.*, 2014).

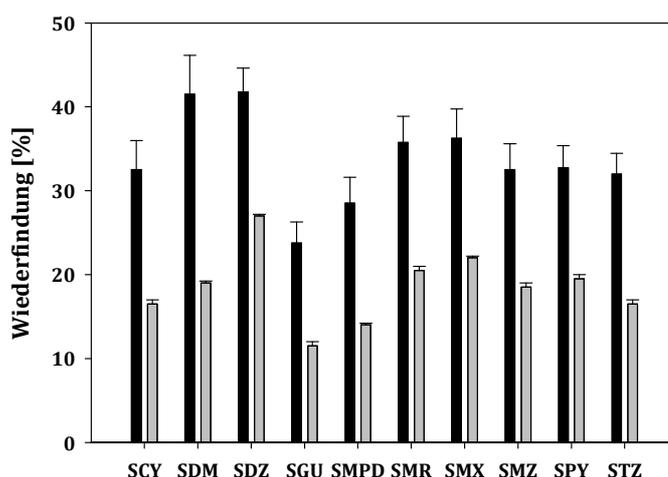


Abb. 6.9: Vergleich der absoluten Wiederfindungen der Sulfonamide mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten (schwarz) und 19 Tagen (grau). Die Fehlerbalken stellen die Spannweite dar.

Die Abnahme der Wiederfindung zeigt, dass mit zunehmender Kontaktzeit der Anteil an gebundenen Sulfonamiden ansteigt, der nicht mehr für die Analytik zur Verfügung steht. Die Literatur und die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigen, dass auch harsche Methoden diese gebundenen Rückstände nur unvollständig aus der Bodenmatrix lösen können.

6.7 Vergleich LLE mit der Ultraschallsondenextraktion

Die Stärke einer Extraktion mittels Ultraschallsonde ist ähnlich der Flüssig-Flüssig-Extraktion, tendenziell stärker, aber deutlich geringer als die Stärke der Mikrowellenextraktion (Raich-Montiu *et al.*, 2010). Um zu testen, ob die Effizienz der neu entwickelten Flüssig-Flüssig-Extraktion ähnlich der einer Ultraschallextraktionsmethode ist, wurden diese

beiden Verfahren direkt miteinander verglichen. Für die Extraktion mittels Ultraschallsonde wurde ebenfalls die Kombination aus Citratpuffer und Methanol verwendet. Dabei erfolgte eine Behandlung der Probe für zwei Mal 15 Sekunden. Im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion ist dies eine deutlich schnellere Extraktion. Die Handhabung der Ultraschallsonde ist dennoch aufwendiger und die Kontaminationsgefahr beziehungsweise Verschleppungsgefahr größer, da häufig nur eine Sonde zur Verfügung steht. Zudem waren die Wiederfindungen mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion im direkten Vergleich höher (Abb. 6.10). Dies zeigte, dass die entwickelte LLE gleichrangig mit aggressiveren Extraktionsmethoden für Sulfonamide ist.

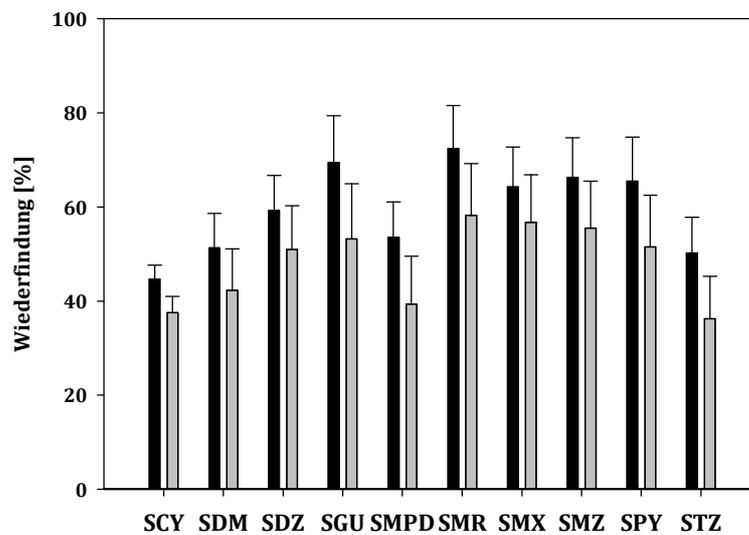


Abb. 6.10: Vergleich der absoluten Wiederfindungen der Sulfonamide der hier entwickelten LLE (schwarz) mit einer Ultraschallsondenextraktion (grau). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

7 Methodenvalidierung

7.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Für die Validierung der Methoden wurden die Parameter Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NWG und BG), Linearität, Inter- und Intraday-Präzision sowie Wiederfindung herangezogen. Die Auswertung erfolgte über das Verhältnis Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard (IST). Als IST wurden $^{13}\text{C}_6$ SDZ, $^{13}\text{C}_6$ SMZ und $^{13}\text{C}_6$ SMX verwendet (vgl. Kap. 13.2). Für die Methodenvalidierung wurde der Kontrollboden (vgl. Kap. 13.4.1) verwendet, der im Weiteren als analytfreier Boden bezeichnet wird, da dieser weder mit Sulfonamiden noch mit Tetracyclinen belastet ist. Die Messung des analytfreien Bodens lieferte keinen Peak, der zwei spezifische Übergänge der zu untersuchenden Substanzen zeigte, so dass dieser als Kontrollboden verwendet werden konnte.

Die entwickelte LLE wurde für gealterte Böden optimiert. Aus Voruntersuchungen von Cantaro (2014) war bekannt, dass ein Großteil der Sorptionsprozesse innerhalb der ersten 7 Tage nach Dotierung stattfindet. Der Autor verzeichnete einen Rückgang der Wiederfindung zum Beispiel bei SDZ von 82 % auf 33 % in 7 Tagen. Nach dieser Zeit nimmt die Wiederfindung nur noch geringfügig ab. Daher erfolgte die Validierung der LLE-Methode für Proben, die einmal 10 Minuten und einmal 7 Tage mit den Analyten dotiert und anschließend bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert wurden. Zusätzlich erfolgte die Validierung an zwei Messsystemen (UHPLC/QTRAP und UHPLC/QTOF).

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen spielen für die Vergleichbarkeit von analytischen Methoden eine große Rolle. Um den Einfluss der Matrix auf die NWG und BG abschätzen zu können, werden zwei Messsysteme und zwei Matrices verglichen. Die NWG und BG wurden daher in den Lösungsmittelstandards und in der Bodenmatrix anhand des Signal-/Rausch-Verhältnisses von zwei Massenübergängen bestimmt, um den Anforderungen der Entscheidung 2002/657 EG hinsichtlich der Substanzidentifizierung zu genügen. Dabei wurde der schwächere Massenübergang für die Festlegung von NWG und BG verwendet (vgl. Tab. 7.1). Eine Ausnahme bildet das IsoCTC, welches nur einen spezifischen Massenübergang lieferte. Die Proben mit einer Inkubationszeit von 7 Tagen unterscheiden sich mit höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen deutlich von den nur 10 Minuten inkubierten Proben. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Analyten länger mit der Bodenmatrix interagieren konnten. Der analytisch nachweisbare Gehalt nimmt aufgrund von Sorption und der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen ab (Förster *et al.*, 2009; Gao und Pedersen, 2005; Thiele-Bruhn *et al.*, 2004). Des Weiteren besteht ein großer Unterschied zwischen den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Sulfonamiden und Tetracyclinen. Hier spielt die schwächere

Ionisierbarkeit der Tetracycline eine große Rolle (vgl. Kap. 6.2.2). Der Unterschied zwischen QTRAP und QTOF ist unter anderem auf den verwendeten Eluenten Acetonitril zurückzuführen. Bei einem Einsatz von Acetonitril (QTOF) kann eine geringere Ionisierung erreicht werden als bei Verwendung von Methanol (QTRAP), da Methanol im Gegensatz zu Acetonitril zu den protischen Lösungsmitteln gehört (Lanina *et al.*, 2007). Entsprechende Untersuchungen wurden mittels Post-column-Infusion, mittels QTRAP, untersucht (vgl. Kap. 8.2.1). Zusätzlich wurden die Proben für die Messung mittels QTOFs verdünnt, welches ebenfalls zu niedrigeren NWGs und BGs führt.

Tab. 7.1: Nachweis -und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Analyten in den Lösungsmittelstandards und im Boden nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF.

NWG/BG	QTRAP						QTOF					
	Lösungen [µg/L]		10 Minuten [µg/kg]		7 Tage [µg/kg]		Lösungen [µg/L]		10 Minuten [µg/kg]		7 Tage [µg/kg]	
Substanz	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG	NWG	BG
Sulfonamide												
SCY	0,1	0,25	0,3	0,5	1	3	2	5	10	25	90	300
SDM	< 0,1	0,1	0,1	0,3	< 0,5	1	2	5	8	20	25	60
SDZ	0,25	0,5	0,5	1	0,5	3	0,25	0,5	0,3	1	5	25
SGU	0,5	2	1	3	3	8	0,1	0,25	1	3	8	20
SMPD	0,1	0,25	0,2	0,5	1	3	0,25	0,5	3	10	35	100
SMR	0,1	0,25	0,2	0,5	1	3	< 0,1	0,1	0,5	1	5	15
SMX	0,1	0,25	0,2	0,5	0,5	3	1	2	5	15	15	50
SMZ	0,1	0,25	0,3	0,5	1	3	< 0,1	0,1	0,5	1	3	10
SPY	0,1	0,5	0,3	1	1	3	0,1	0,25	0,5	1	3	10
STZ	0,25	0,5	0,3	0,5	1	3	0,1	0,25	1	3	5	15
Tetracycline												
CTC	5	10	25	70	30	100	25	30	30	80	50	90
Doxy	5	10	8	20	25	60	55	60	25	60	70	150
IsoCTC	1	2	1	3	3	10	5	10	3	8	10	35
OTC	10	15	3	8	10	30	5	10	15	30	60	90
TC	1	2	3	5	5	15	5	15	8	15	35	60

NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze, <: NWG niedriger als geringste untersuchte Konzentration, für weitere Abkürzungen siehe Abb. 5.3

Neben der Ermittlung von Nachweis -und Bestimmungsgrenzen erfolgte für jeden Analyt eine In-Matrix Kalibrierung sowie eine Lösungsmittelkalibrierung für beide Messsysteme. Die obere

Linearitätsgrenze und das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden wurden berechnet (vgl. Tab. 7.2 und Tab. 7.3). Als untere Linearitätsgrenze wurde die Bestimmungsgrenze festgesetzt. Verifiziert wurde die Linearität mit dem Test nach Mandel (DIN 38402-51, 2017-05).

Tab. 7.2: Obere Linearitätsgrenzen der einzelnen Analyten der Lösungsmittelkalibrierung sowie der In-Matrix-Kalibrierung nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF.

Linearität	QTRAP			QTOF		
	Lösungen [µg/L]	10 Minuten [µg/kg]	7 Tage [µg/kg]	Lösungen [µg/L]	10 Minuten [µg/kg]	7 Tage [µg/kg]
Substanz	Obere Linearitätsgrenze			Obere Linearitätsgrenze		
Sulfonamide						
SCY	5000	1000	900	2000	800	1000
SDM	100	1000	1000	750	1000	1000
SDZ	4000	1000	900	5000	300	1000
SGU	4000	1000	1000	4000	900	1000
SMPD	3000	1000	900	5000	1000	900
SMR	4000	1000	900	2000	300	900
SMX	4000	1000	800	3000	1000	1000
SMZ	5000	1000	900	1000	300	900
SPY	750	1000	900	2000	200	900
STZ	750	1000	1000	2000	300	1000
Tetracycline						
CTC	750	1000	1000	1000	1000	1000
Doxy	1000	1000	1000	2000	1000	1000
IsoCTC	2000	1000	1000	1000	1000	1000
OTC	1000	1000	1000	750	1000	1000
TC	1000	1000	1000	750	1000	1000

Obere Linearitätsgrenze: wurde bis 1000 µg/kg untersucht, für Abkürzungen siehe Abb. 5.3

Tab. 7.3: Bestimmtheitsmaße der einzelnen Analyten der Lösungsmittelkalibrierung sowie der In-Matrix-Kalibrierung nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF.

Linearität	QTRAP			QTOF		
	Lösungen [µg/L]	10 Minuten [µg/kg]	7 Tage [µg/kg]	Lösungen [µg/L]	10 Minuten [µg/kg]	7 Tage [µg/kg]
Substanz	Bestimmtheitsmaß R ²			Bestimmtheitsmaß R ²		
Sulfonamide						
SCY	0,999	0,999	0,975	0,999	0,998	0,925
SDM	0,999	0,999	0,988	0,999	0,994	0,976
SDZ	0,999	0,999	0,981	0,999	0,997	0,965
SGU	0,999	0,992	0,980	0,999	0,993	0,984
SMPD	0,999	0,999	0,978	0,999	0,999	0,960
SMR	0,999	0,999	0,981	0,999	0,999	0,987
SMX	0,999	0,999	0,997	0,999	0,999	0,991
SMZ	0,999	0,999	0,992	0,999	0,999	0,991
SPY	0,999	0,999	0,991	0,999	0,999	0,993
STZ	0,999	0,999	0,993	0,999	0,998	0,985
Tetracycline						
CTC	0,999	0,992	0,938	0,999	0,994	0,955
Doxy	0,999	0,985	0,982	0,999	0,992	0,971
IsoCTC	0,999	0,993	0,962	0,999	0,997	0,994
OTC	0,999	0,991	0,941	0,999	0,999	0,979
TC	0,999	0,995	0,956	0,999	0,998	0,992

für Abkürzungen siehe Abb. 5.3

Die Bestimmung der Präzision wurde ebenfalls vorgenommen (vgl. Tab. 7.4). Dabei wurde die Präzision der Messmethode (n=3, 250 µg/L und 2000 µg/L) bestimmt, sowie die Methodenpräzision aufgeteilt in Intra- und Interday-Präzision (n=6, 100 µg/kg und 500 µg/kg). Sowohl die Intraday- als auch die Interday-Präzision sind für beide Antibiotikaklassen auch in den Proben nach 7 Tagen gut. Vor allem die Präzisionen für die Messung mit dem QTRAP liegen alle unter 15 %. Nach Anforderungen der Food and Drug Administration (FDA) sollen die Intra- und Interday-Präzision für die Validierung von Analysemethoden von biologischen Proben unter 15 % liegen (FDA, 2001). Etwas höher liegen die Präzisionen für die Messungen mit dem QTOF. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass das QTOF nicht mit einzeln festgelegten Kollisionsenergien arbeitet, sondern mit einem Kollisionsenergiebereich für alle Analyten. Dazu werden eine Kollisionsenergie und ein dazugehöriger Bereich festgelegt. Je nach verwendeten Parametern werden mehrere Massenspektren bei unterschiedlichen

Kollisionsenergien aufgenommen. So werden bei den Messungen letztlich unterschiedliche Kollisionsenergien für ein und denselben Analyt verwendet und die jeweiligen Massenspektren über die Software kombiniert. Dies hat Auswirkungen auf die Präzisionen, so dass diese tendenziell schlechter sind, als bei Messungen mittels QTRAP. Die Festlegung eines Kollisionsenergiebereiches für die Messungen mittels QTOF ist dennoch notwendig. Dies ist vor allem relevant für die Messung der Tetracycline, da diese sehr unterschiedlich große Fragmente (z. Bsp. 444 m/z und 154 m/z) liefern. Dagegen treten bei Sulfonamiden mit 108 m/z und 156 m/z ähnlich große Fragmente auf, so dass hier eine Kollisionsenergie ausreichen würde. Neben den schlechteren Präzisionen sind auch die NWG und BG mittels QTOF höher. Ebenfalls wurde ein niedrigerer Linearitätsbereich bestimmt. Aufgrund dessen wurde für die Quantifizierung der zu untersuchenden Proben die QTRAP mit MRM verwendet. Bei nicht eindeutiger Substanzidentifizierung sollte das QTOF aufgrund der Hochauflösung herangezogen werden.

Tab. 7.4: Präzision der Lösungsmittelstandards sowie Intra- und Interday-Präzision der einzelnen Analyten nach 10 Minuten und 7 Tagen für die Analyse mittels QTRAP und QTOF.

Präzision	QTRAP					QTOF				
	Lösungen [%]	10 Minuten [%]	7 Tage [%]		Lösungen [%]	10 Minuten [%]	7 Tage [%]			
Substanz	Präzision	IAD	IRD	IAD	IRD	Präzision	IAD	IRD	IAD	IRD
Sulfonamide										
SCY	1,1	0,9	0,9	1,5	1,4	2,7	18,0	17,2	19,1	17,8
SDM	1,8	1,2	1,1	1,6	1,4	4,3	11,6	11,3	10,3	11,6
SDZ	1,0	0,8	0,8	1,2	1,3	3,6	4,9	4,7	4,2	4,3
SGU	1,3	2,1	2,0	2,6	2,4	3,5	7,3	6,9	4,2	4,6
SMPD	1,3	0,8	0,9	1,0	1,0	3,9	7,2	8,1	11,1	11,5
SMR	1,1	0,8	0,9	1,8	1,6	4,2	4,7	5,2	7,7	7,2
SMX	0,8	0,5	0,6	0,9	0,8	5,7	10,8	11,5	15,4	15,3
SMZ	0,6	0,8	0,8	1,2	1,1	3,6	5,5	5,6	5,4	5,0
SPY	0,8	0,8	0,9	1,6	1,4	4,3	6,1	6,0	5,4	5,7
STZ	1,2	1,0	1,0	1,8	1,9	3,0	5,8	5,9	6,8	6,7
Tetracycline										
CTC	4,0	5,7	5,3	8,5	9,3	11,5	8,0	7,5	14,6	14,1
Doxy	4,6	7,0	6,7	10,5	9,4	14,8	7,8	7,7	7,6	6,9
IsoCTC	4,5	2,6	2,5	2,4	2,5	5,8	8,0	7,3	7,6	7,7
OTC	2,2	2,5	2,3	3,8	3,3	4,3	9,7	10,0	7,5	7,8
TC	2,0	2,5	2,3	3,4	3,2	4,5	9,9	9,3	7,2	8,2

IAD: Intraday-Präzision, IRD: Interday-Präzision, für weitere Abkürzungen siehe Abb. 5.3

Anhand der Wiederfindungsfunktionen wurde die absolute Wiederfindung der einzelnen Analyten, bezogen auf die Lösungsmittelkalibrierung, bestimmt (vgl. Tab. 7.5). Der Vergleich der Wiederfindungen nach 10 Minuten und 7 Tage zeigt, dass die Wiederfindungen mit steigender Zeit sinken. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (vgl. Tab. 7.1). Auch hier ist der Rückgang der Wiederfindung auf die Interaktion der Analyten mit der Matrix Boden zurückzuführen. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Hamscher *et al.* (2005a). Anhand der Wiederfindungsfunktion konnte festgestellt werden, dass ein proportional-systematischer Fehler vorlag, jedoch kein konstant-systematischer Fehler. Ein konstant-systematischer Fehler ist unabhängig von der Konzentration der Analyten. Ein proportional-systematischer Fehler dagegen ist abhängig von der Konzentration der Analyten. Dies führt zu einer Änderung der Steigung der Matrixkalibriergeraden. Zum Ausgleich des proportional-systematischen Fehlers wurde bei der Quantifizierung die Wiederfindung

miteinberechnet (Kromidas, 2011). Dafür wurden gealterte Proben generiert, in denen nicht nur die Analyten selbst für eine gewisse Zeit mit dem Boden inkubiert wurden (14 Tage), sondern auch der interne Standard (7 Tage). Der interne Standard konnte so ebenfalls mit der Matrix interagieren. Das Verhalten der Analyten in den gealterten Proben wurde hierdurch bei der Quantifizierung berücksichtigt, so dass die Darstellung von realistischen Gehalten in gealterten Böden sichergestellt wurde. In der Literatur werden die Konsequenzen die sich für die Quantifizierung ergeben, oft vernachlässigt. Dabei werden Sorption und Matrixinteraktion oft mit einem Abbau gleichgesetzt. Die auf derartigen Studien basierenden Halbwertszeiten für die Eliminierung von Sulfonamiden sind daher als viel zu niedrig einzustufen (Förster *et al.*, 2009).

Unterschiede zwischen den Wiederfindungen der QTRAP- und QTOF-Methode sind vor allem bei den Tetracyclinen zu finden. Mittels QTOF konnten hauptsächlich bei den Tetracyclinen Wiederfindungen weit über 100 % ermittelt werden. Ein Grund dafür könnten die nicht geeigneten internen Standards sein (vgl. Kap. 7.2) Die Wiederfindungen der Sulfonamide sind ähnlich, bis auf die Wiederfindung von SDM. Die Unterschiede zwischen den beiden Geräten können, wie bei der Präzision, auch auf die nicht festgelegten Kollisionsenergien zurückzuführen sein. Ein weiterer Grund könnten die Matrixeffekte und die unterschiedlichen Eluenten sein (vgl. Kap. 8) Somit konnte nochmals bestätigt werden, dass die Quantifizierung mittels QTRAP eine geeignetere Methode zur Quantifizierung von Sulfonamiden und Tetracyclinen im Boden darstellt.

Tab. 7.5: Absolute Wiederfindung der einzelnen Analyten nach 10 Minuten, 7 Tagen sowie 14 Tagen (IST 7 Tage) für die Analyse mittels QTRAP und QTOF.

Wiederfindung [%]	QTRAP			QTOF		
	10 Minuten	7 Tage	14 Tage (IST 7 Tage)	10 Minuten	7 Tage	14 Tage (IST 7 Tage)
Sulfonamide						
SCY	46	30	27	52	16	24
SDM	43	21	43	90	56	102
SDZ	68	16	61	53	33	65
SGU	56	20	57	36	13	23
SMPD	56	9	34	64	21	37
SMR	77	14	56	70	23	48
SMX	72	32	66	66	36	59
SMZ	72	19	48	85	30	61
SPY	67	15	47	85	30	63
STZ	57	16	37	40	12	27
Tetracycline						
CTC	19	13	16	163	106	97
Doxy	23	20	35	267	195	109
IsoCTC	221	88	200	238	151	193
OTC	97	57	126	29	24	51
TC	67	42	89	228	164	128

für Abkürzungen siehe Abb. 5.3

Die Stabilität der Lösungsmittelstandards wurde bereits durch Spielmeier *et al.* (2014) untersucht. Die Stabilität der Bodenproben wurde nach 1, 2, 7 und 31 Tagen untersucht. Dabei wurde eine Stabilität der Proben bis Tag 2, mit einem maximalen Rückgang von 16 % bei Doxy, festgestellt. Nach 7 Tagen konnte bereits ein Rückgang der Analyten bis zu 46 % festgestellt werden, so dass eine Analyse der Probenextrakte innerhalb von 48 Stunden erfolgen musste.

7.2 Vergleich von Sand-, Ton- und Lößboden

Die Methodenentwicklung erfolgte mit einem analytfreien Tonboden. Sulfonamide und Tetracycline weisen im Tonboden höhere Sorptionskoeffizienten auf als im Sandboden (Bailey *et al.*, 2016), so dass anhand eines Tonbodens der „Worst-case-Fall“ simuliert wurde. Methoden für die Extraktion von Böden werden, abhängig von der Fragestellung, häufig auf eine Bodenart beschränkt (Hamscher *et al.*, 2002). Die Extraktionseffizienz kann jedoch durch verschiedene Bodenzusammensetzungen variieren. Sie kann aber auch bei ähnlich zusammengesetzten Böden unterschiedlich sein, da jeder Boden andere Eigenschaften aufgrund von pH-Wert oder der Zusammensetzung des organischen Materials aufweisen kann. Der Kontrollboden ist demnach immer etwas anders zusammengesetzt als die zu untersuchenden Proben. Die entwickelte Methode sollte daher universell für Boden einsetzbar sein. Dazu wurden in Dreifachbestimmung ein Sandboden (Sand: 72,9 %, Schluff: 19,1 %, Ton: 8 %), ein Lößboden (Sand 3,3 %, Schluff: 76,4 %, Ton: 20,3 %) und Tonboden (Sand: 3,1 %, Schluff: 32,5 %, Ton: 64,4 %) aufgearbeitet. Dafür wurden die Böden für fünf Tage mit 300 µg/kg mit Analyten und für zwei Tage mit IST dotiert um den Analyten, sowie dem IST Zeit zur Interaktion mit der Bodenmatrix zu geben. Anschließend wurden die Wiederfindungen bestimmt und anhand der Variationskoeffizienten V_k verglichen (vgl. Tab. 7.6). Für die Tetracycline wurde zusätzlich V_k^* und V_k^{**} berechnet. Dabei wurden die Wiederfindungen der Tetracycline nicht anhand von $^{13}C_6$ SMX, sondern über OTC bzw. Doxy als internen Standard berechnet. Dabei stellt OTC das erste und Doxy das letzte Tetracyclin der Elutionsreihenfolge dar.

Tab. 7.6: V_k von Sulfonamiden und Tetracyclinen von Ton-, Sand- und Lößboden.

Sulfonamide										
[%]	SCY	SDM	SDZ	SGU	SMPD	SMR	SMX	SMZ	SPY	STZ
V_k	9	7	6	26	9	1	5	7	9	7

Tetracycline					
[%]	CTC	Doxy	IsoCTC	OTC	TC
V_k	17	13	75	68	40
V_k^*	50	45	24	-	27
V_k^{**}	13	-	65	59	29

V_k^* : OTC als Standard, V_k^{**} : Doxy als Standard, für weitere Abkürzungen siehe Abb. 5.3

Die Variationskoeffizienten der Sulfonamide liegen unter 10 %, mit Ausnahme von SGU. Grundsätzlich sind die Variationskoeffizienten der Sulfonamide für die drei untersuchten Bodenarten sehr gering. Dies verdeutlicht die gute Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode, da für den „Worst-case-Fall“, den Tonboden, ähnliche Ergebnisse wie für Sandboden

bestimmt werden konnten. Die entwickelte Methode ist demnach universell für die Extraktion von Sulfonamiden aus Böden einsetzbar und nicht auf eine Bodenart beschränkt. Bei SGU liegt der Variationskoeffizient bei 26 %. SGU nimmt aufgrund seiner hohen Polarität generell eine Sonderstellung unter den Sulfonamiden ein. Dies wurde nicht nur bei der Methodenentwicklung (Kapitel 6) und Methodenvalidierung (Kapitel 7), sondern auch bei der Evaluierung der Matrixeffekte (Kapitel 8), deutlich. Eine Abweichung von 26 % wird aber im Hinblick auf die Komplexität der Matrix als akzeptabel für SGU erachtet, auch wenn nach Entscheidung 2002/657 EG in dem untersuchten Konzentrationsbereich Variationskoeffizienten von 15 % gefordert sind.

Für die Tetracycline ergibt sich ein anderes Bild. Die Variationskoeffizienten verdeutlichen hier die Komplexität der Tetracyclin-Analytik. Die Abweichungen für IsoCTC, OTC und TC für die drei Bodenarten reichen von 40 % bis 75 %. Dies ist vor allem auf die nicht verfügbaren isotopenmarkierten Standards zurückzuführen, so dass ein isotopenmarkiertes Sulfonamid zur Bestimmung verwendet werden muss. Bezieht man die Ergebnisse auf OTC (V_k^*) als internen Standard, reduzieren sich die Variationskoeffizienten für IsoCTC (Retentionszeit von 8,0 min) und TC (Retentionszeit von 8,1 min) drastisch. Das ist auf einen ähnlichen Elutionszeitpunkt zurückzuführen. Gleichzeitig verschlechtern sich die Variationskoeffizienten von CTC und Doxy, welche bei einem deutlich höheren Organikanteil (Retentionszeit von 8,9 min und 9,6 min) eluieren. Werden die Wiederfindungen auf Doxy (V_k^{**}) bezogen, steigen die Variationskoeffizienten von IsoCTC und OTC und reduzieren sich bei CTC. Einzig für TC konnten ähnliche Variationskoeffizienten für beide Berechnungsmethoden bestimmt werden. Dies liegt nahe, da TC in der Tetracyclin-Elutionsreihenfolge in der Mitte steht. Das Verhalten der Tetracycline untereinander ist demnach sehr unterschiedlich. Ein komplett gegensätzliches Extraktionsverhalten sowie ein grundverschiedenes Verhalten bei der anschließenden Analytik zeigen Tetracycline und Sulfonamide. Dieses Verhalten zueinander erklärt die größeren Variationskoeffizienten der Tetracycline. Isotopenmarkierte Standards sind demnach notwendig, da nur diese ein nahezu identisches Verhalten wie die Analyten selbst aufweisen. Als Alternative besteht die Möglichkeit ein weiteres Tetracyclin, welches nicht als Analyt dient, als internen Standard zu verwenden. Eine optimale Lösung für die Analytik der Tetracycline gibt es deshalb zurzeit nicht. Ein gewisser Fehler aufgrund der nicht allgemein verfügbaren isotopenmarkierten Standards besteht daher immer. Dies wird auch bei Betrachtung der Methodenpräzision (Kapitel 7.1) der Tetracycline nochmals verdeutlicht, da diese ebenfalls schlechter ist als die der Sulfonamide. Die große Schwankungsbreite der Tetracyclin-Variationskoeffizienten ist demnach nicht nur auf die verschiedenen Bodenarten zurückzuführen. Denn anhand der Variationskoeffizienten der Sulfonamide konnte gezeigt werden, dass mit der entwickelten Methode der Einfluss der Bodenarten gering bzw.

vernachlässigbar ist. Die Bestimmung der Tetracycline unterliegt generell größeren Schwankungen.

Bei der Analyse von Realproben haben mehrere Faktoren einen Einfluss auf das Analysenergebnis bzw. dessen Fehler. Einen zentralen Faktor stellt die Probennahme auf dem Feld (Feldprobe), deren Reduzierung für den Transport (Laborprobe) und die Aliquotennahme im Labor für die Probenvorbereitung dar. Im Vergleich zu der Gesamtmenge Boden eines Feldes, wird somit nur ein winziger Bruchteil aufgearbeitet und daran der Gehalt für ein komplettes Feld bestimmt. Dabei spielt bei jedem Schritt die starke Inhomogenität von Boden eine große Rolle. Fehler, die bei der Probennahme gemacht wurden, können im Rahmen der Probenvorbereitung und Messung nicht korrigiert werden. Der Einfluss der Komplexität der Boden-Probennahme und der Aliquotierung auf das Analysenergebnis können möglicherweise als größer erachtet werden als Fehler bzw. Variationen, die auf unterschiedliche Bodenarten oder das Messverfahren zurückgehen. Vor diesem Hintergrund wurden die größeren Variationskoeffizienten der Tetracycline, die v.a. unterschiedliche Wiederfindungen für Ton-, Sand- und Lößboden widerspiegeln, als tolerierbar angesehen.

7.3 Mikrowellenextraktion

Für die Analyse von Sulfonamiden wurde zusätzlich eine Methode mittels Mikrowellenextraktion (MWE) adaptiert und validiert. Die Extraktion in der Mikrowelle ermöglicht den Einsatz von härteren Bedingungen wie erhöhte Temperatur und Druck. Aufgrund der Erkenntnisse aus Kapitel 7.1 wurden die Parameter für Proben mit einer Inkubationszeit von 7 Tagen ermittelt. Als Ausnahme ist hier die Präzision zu nennen, die für Proben mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten ermittelt wurde, da für diese nur vernachlässigbare Unterschiede zwischen Proben mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten und 7 Tagen festgestellt wurden (vgl. Tab. 7.4). In Tab. 7.7 sind die Parameter Präzision, obere Linearitätsgrenze sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die MWE aufgelistet. Die ermittelten Bestimmtheitsmaße der Regressionsgeraden betragen $>0,99$. Die untere Linearitätsgrenze stellt die Bestimmungsgrenze dar. Die Wiederfindung wurde für Proben mit einer Inkubationszeit von 7 Tagen sowie für 14 Tage (IST: 7 Tage) bestimmt. Aufgeführt sind in der folgenden Tabelle nur die Wiederfindungen nach 14 Tage, da diese für die Quantifizierung verwendet wurden.

Mit der MWE konnten die Wiederfindungen der Sulfonamide im Vergleich zur LLE verbessert werden. Dies ist vor allem auf die höhere Temperatur und den erhöhten Druck, der in den Mikrowellenbechern aufgebaut wird, zurückzuführen. Mittels MWE erfolgt ein stärkerer Aufschluss der Matrix, so dass ein erhöhter Anteil der sorbierten Sulfonamide wieder analytisch zur Verfügung steht. Insgesamt spiegeln sich die verbesserten Wiederfindungen auch in den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wider. Diese sind im Vergleich zu der LLE niedriger. Eine

Ausnahme stellt hier die BG von SGU dar, die geringfügig höher liegt als die BG der LLE (vgl. Tab. 7.1 und Tab. 7.7). Zudem sinkt die Wiederfindung von SGU von 57 % bei der LLE auf 20 % bei der MWE. Einerseits könnte dieser Rückgang von SGU auf eine geringere Stabilität bei erhöhter Extraktionstemperatur hinweisen. Dazu gibt es jedoch keine näheren Studien. Andererseits stellt SGU in diesem Fall das polarste Sulfonamid dar. Eine verringerte Extraktion, aufgrund der hauptsächlich organischen Extraktion, könnte hier ebenfalls eine Rolle spielen. Die gute Extraktionseffizienz der MWE konnten auch Förster *et al.* (2008) und Raich-Montiu *et al.* (2010) für gealterte SDZ-Rückstände in Boden zeigen.

Tab. 7.7: Zusammenfassung der Parameter für die Methodenvalidierung der MWE für Sulfonamide.

	IAD [%]	IRD [%]	OL [µg/kg]	NWG [µg/kg]	BG [µg/kg]	WDF [%]
SCY	2,7	5,0	800	0,5	0,9	46
SDM	3,3	7,0	1000	0,1	0,5	33
SDZ	2,4	5,0	800	0,5	1	82
SGU	13,4	16,0	1000	1	10	20
SMPD	2,5	5,3	1000	0,5	0,9	45
SMR	3,2	6,5	1000	0,5	1	54
SMX	1,6	5,1	1000	0,5	0,9	70
SMZ	2,1	5,7	1000	0,5	1	66
SPY	2,5	6,1	1000	0,5	1	65
STZ	2,4	6,0	1000	0,5	1	55

IAD: Intraday-Präzision, IRD: Interday-Präzision, NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze, OL: obere Linearitätsgrenze, R²: Determinationskoeffizient, WDF: Wiederfindung (14 Tage, IST: 7 Tage), für weitere Abkürzungen siehe Abb. 5.3

8 Evaluierung der Matrixeffekte

Eine Beeinträchtigung des Messsignals durch coeluierende Matrixkomponenten wird als Matrixeffekt bezeichnet. Dabei resultieren Matrixeffekte prinzipiell in einer Signalunterdrückung sowie -verstärkung. Ausgelöst werden diese Effekte durch in der Probe vorhandene Matrixkomponenten oder durch Substanzen, die während der Aufarbeitung und Messung in die Probe gelangen können (Gosetti *et al.*, 2010). Zu letzteren zählen insbesondere Stoffe wie Polymerrückstände und Weichmacher aus HPLC-Säulen oder SPE-Kartuschen (Mei *et al.*, 2003). Matrixeffekte können quantitativ und qualitativ mittels Post-column-Infusion bestimmt werden (Annesley, 2003; Matuszewski *et al.*, 2003).

8.1 Quantitative Matrixeffekte

Matrixeffekte sind das Resultat vieler einzelner Einflüsse. Diese umfassen die unterschiedlichen Analyteigenschaften, die eingesetzten Chemikalien für die Aufarbeitung und die Messung sowie Matrixkomponenten, aber auch Reinigungsschritte und die chromatographischen Bedingungen sind von Relevanz. Dabei können die einzelnen Einflüsse auch synergistische Wirkung entfalten (Gosetti *et al.*, 2010). Zusammenfassend darstellen kann man alle einzelnen Einflüsse als quantitativen Matrixeffekt (ME). Dieser wird bestimmt durch das Peakflächen-Verhältnis der einzelnen Analyten in einer aufgearbeiteten und anschließend dotierten Leermatrix und einem entsprechend konzentrierten Lösungsmittelstandard. Matrixeffekte > 5 % deuten dabei auf eine Signalverstärkung hin und Matrixeffekte < 5 % auf eine Signalunterdrückung. Aufgrund der Messvariation werden Effekte unter 5 % nicht als signifikant angesehen (Hamscher *et al.*, 2005b). Bei Bestimmung der ME sollte darauf geachtet werden, dass realitätsnahe Konzentrationen untersucht werden, da das Verhältnis Matrix/Analytkonzentrationen Auswirkungen auf die ME haben kann (Annesley, 2003; Gosetti *et al.*, 2010).

Die quantitativen ME wurden für die Analyten mittels QTRAP- und QTOF-Messung bestimmt (vgl. Abb. 8.1). Dabei konnte sowohl ein unterschiedliches Verhalten der Antibiotikaklassen als auch unterschiedliche Größenordnungen der ME identifiziert werden.

Im Vergleich zwischen QTRAP und QTOF zeigt sich, dass mittels QTOF nur Matrixeffekte mit Signalverstärkung vorliegen (Abb. 8.1 C, D). Die Ergebnisse mittels QTRAP zeigen, mit Ausnahme von SGU, für die Sulfonamide fast durchgängig eine Signalunterdrückung im Gegensatz zur QTOF-Messung (Abb. 8.1. A, C). Doxy unterlag bei der QTRAP-Messung einer Signalunterdrückung (30 %), bei der Messung mittels QTOF einer Signalverstärkung (100 %) (Abb. 8.1. B, D) Neben diesen gravierenden qualitativen Unterschieden sind auch in quantitativer Hinsicht große Differenzen der ME zu erkennen. Bei der QTRAP-Messung wurde

eine Signalverstärkung der Tetracycline im Bereich von 5 bis 30 %, bei der QTOF-Messung im Bereich von 100 bis 250 % gemessen (Abb. 8.1. B,D).

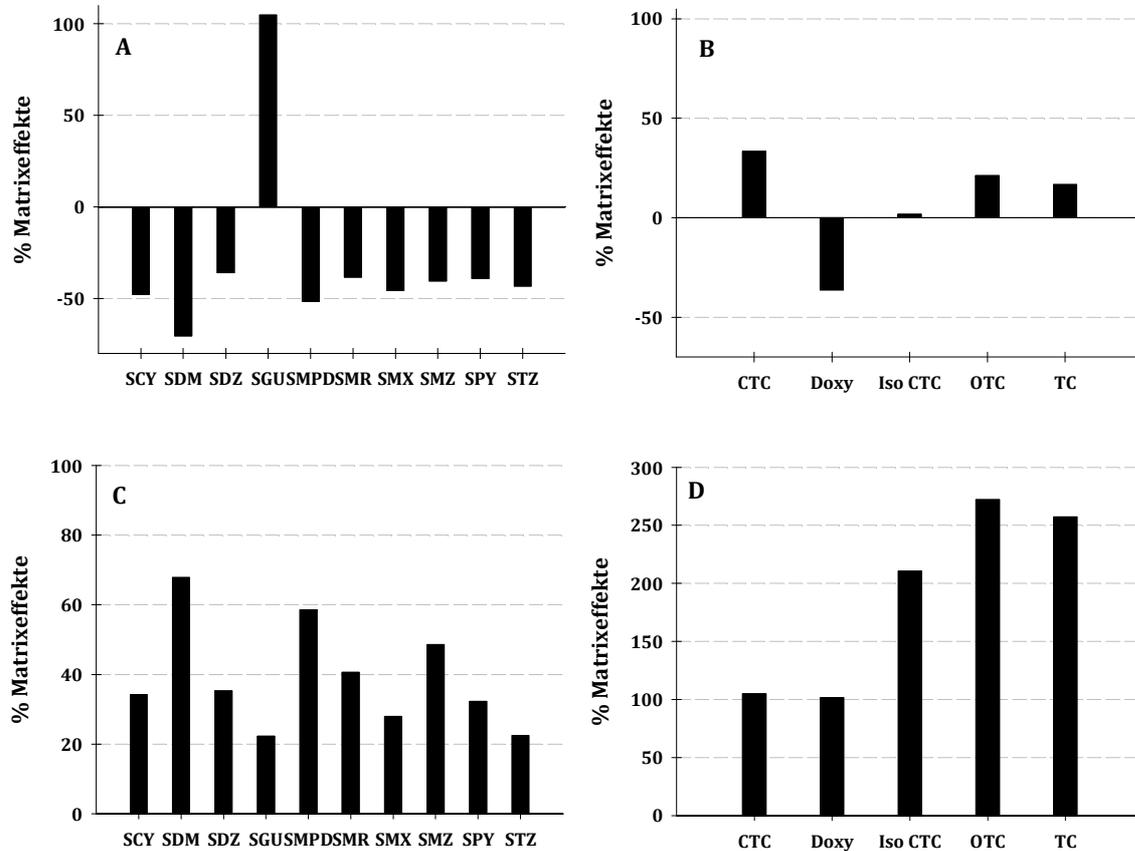


Abb. 8.1: Quantitative Matrixeffekte für Sulfonamide (A,C) und Tetracycline (B,D) mittels QTRAP (oben) und QTOF (unten).

Bekannt ist, dass die Größenordnung der ME abhängig von der Probenaufarbeitung ist und auch von Probe zu Probe variieren kann (Bonfiglio *et al.*, 1999; Le Bizec *et al.*, 2009). Die unterschiedlichen Arten der ME für ein und denselben Analyten in gleicher Matrix, aber unterschiedlichen Extraktions- und Messbedingungen, sind ebenfalls bekannt (Gianotti *et al.*, 2008; Gosetti *et al.*, 2007; Gosetti *et al.*, 2010). Für die hier untersuchten Analyten spielte auch das Messsystem offensichtlich eine entscheidende Rolle. Die Probenaufarbeitung war für beide Methoden identisch. Der einzige Unterschied war die Verdünnung der Probenextrakte um den Faktor 5 für die Messung mittels QTOF. Diese wird in der Literatur häufig als positiv für die Verringerung von Matrixeffekten beschrieben (Čizmić *et al.*, 2017; García-Galán *et al.*, 2013). Die Verdünnung der Matrix kann eine Reduzierung der Konkurrenz zwischen Analyt und Matrixkomponenten zur Folge haben (Kearle und Tang, 1993; Le Bizec *et al.*, 2009). Dies wurde jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt (Abb. 8.1).

In der Literatur sind unterschiedlich starke Matrixeffekte für ESI und APCI (atmospheric pressure chemical ionization) beschrieben (Matuszewski, 2006; Mei *et al.*, 2003). Die Messungen erfolgten hier jedoch bei beiden Methoden mittels ESI. Der Aufbau der zwei ESI-Quellen unterscheidet sich nur durch einen zweiten vorhandenen Heizer im Fall der QTRAP-ESI. Die Anwesenheit von nicht-flüchtigen Komponenten in der Probe wird als Verursacher von Signalsuppressionen diskutiert (King *et al.*, 2000). Eine größere Hitzeeinwirkung durch zwei Heizer könnte zu einer verbesserten Ionisierung der nichtflüchtigen Matrix geführt haben.

Die Verwendung der unterschiedlichen Eluentensysteme (Kap. 13.5.1 und Kap. 13.5.2) als Einflussfaktor darf ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Studien zeigten, dass verschiedene Zusätze wie Salze, organische Säuren oder Puffer Auswirkungen auf die ME haben (Benijts *et al.*, 2004; Mallet *et al.*, 2004). Einen unterschiedlichen Einfluss auf die Ionisation könnten auch die verwendeten Lösungsmittel ACN und MeOH haben. Dazu wurden nähere Untersuchungen durchgeführt (Kap. 8.2.1).

Für die Messungen wurde der gleiche Säulentyp, nicht aber die gleiche Säule verwendet. Auch dies könnte einen Einfluss auf die ME haben. Je nach Verwendungsdauer und Art der gemessenen Proben, kann sich das Säulenmaterial verändern. Die Problematik ist vor allem bei Tetracyclinen bekannt. Diese bilden mit Metallionen Chelatkomplexe aus (Oka *et al.*, 2000). Auch eine irreversible Bindung von Tetracyclinen an freie Silanolgruppen ist möglich (Seifrtová *et al.*, 2009).

Interessant ist vor allem das Verhalten von SGU im Vergleich zu den anderen Sulfonamiden. SGU stellt das einzige Sulfonamid dar, welches eine Signalverstärkung mittels QTRAP aufweist (Abb. 8.1 A). Prinzipiell sind unterschiedliche ME für strukturell-ähnliche Substanzen, auch bei gleicher Probenaufarbeitung und Messung, bekannt (Gosetti *et al.*, 2007). SGU ist das polarste der hier untersuchten Sulfonamide und weist als einzige Verbindung keinen aromatischen Rest auf. Bei den Messungen mittels QTOF tritt bei allen Sulfonamiden Signalverstärkung auf (Abb. 8.1 C). Daher ist es unwahrscheinlich, dass der fehlende aromatische Rest für den Unterschied im Fall der QTRAP-Messungen verantwortlich ist. SGU eluiert bei beiden Analysensystemen nahe der Totzeit der Säule, so dass ein hoher Anteil polarer Matrixbestandteile coeluiert, die zu einer Verstärkung des Messsignals führen können. Die Matrixeffekte sollten bei beiden Systemen ähnlich sein. Bei der QTOF-Messung wurde eine Signalverstärkung von 20 % gemessen. Die QTRAP-Messung zeigte eine Signalverstärkung von 100 % (Abb. 8.1 A, C). Dies ergibt einen Faktor von fünf, der mit der Verdünnung der QTOF-Extrakte um 1:5 korreliert. Bei allen anderen Verbindungen spielt die Eluentenzusammensetzung eine kleinere Rolle.

Bei den Tetracyclinen zeigt einzig Doxy bei der Messung mittels QTRAP eine Signalunterdrückung (Abb. 8.1 B). Doxy wird von allen Analyten am stärksten retardiert und eluiert somit mit dem höchsten Organikanteil im Eluenten. Allgemein wird davon ausgegangen, dass polare Analyten anfälliger für eine Signalunterdrückung sind und organische Lösungsmittel die Signale in der ESI erhöhen (Bonfiglio *et al.*, 1999; Gosetti *et al.*, 2010). Die vorliegenden Ergebnisse für SGU und Doxy bei der QTRAP Messung können dies nicht bestätigen. Sie unterstützen jedoch die Annahme von Bonfiglio *et al.* (1999), dass die chemischen Eigenschaften der Analyten entscheidender für eine Signalunterdrückung sein können als die Probenaufarbeitung.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass ein Einrechnen von Matrixeffekten für eine Ergebniskorrektur nicht möglich ist, da diese Effekte variieren können. Schon García-Galán *et al.* (2013) gaben zu bedenken, dass feste Matrices wie Boden nicht homogen sind und somit auch die Matrixeffekte in der ESI inhomogen sind. So können die Größenordnungen der Matrixeffekte von Probe zu Probe schwanken. Der Vergleich der ermittelten Matrixeffekte mit den Ergebnissen aus der Literatur ist nur bedingt möglich, da nicht nur die Matrix, sondern auch der Analyt selbst und das Messsystem eine große Rolle spielen. Einige Literaturergebnisse werden dennoch beispielhaft aufgeführt. In Abwasser konnten Čizmić *et al.* (2017) für TC, OTC (bis zu 30 %) und einige Sulfonamide wie SGU, SDZ oder SMZ (bis zu 30 %) durchweg eine Signalsuppression feststellen. Das mittels Kläranlage gereinigte Wasser zeigte dann für fast alle Substanzen immer noch eine Signalsuppression. Nur für OTC konnte anschließend eine Signalverstärkung (~ 15 %) gemessen werden. García-Galán *et al.* (2013) konnten ebenfalls für verschiedene Sulfonamide in Klärschlamm und Boden durchgängig eine Signalsuppression (50 % bis 95 %), ohne Korrektur mittels internem Standard, feststellen. In Bodenwasser, Jauche und Klärschlamm konnten Bourdat-Deschamps *et al.* (2014) für SMX und SMZ eine Signalsuppression von 14 % bis 93 % bestimmen. Für CTC und DOXY wurden zwar auch Signalsuppressionen (19 % bis 80 %), aber auch Signalverstärkungen (5 % bis 20 %) in den verschiedenen Matrices bestimmt. Für Sulfonamide überwiegt in der Literatur die Signalsuppression für verschiedene Matrices. Die Matrixeffekte der Tetracycline variieren dagegen von Signalverstärkung bis hin zur Signalsuppression. Tetracycline reagieren demnach empfindlicher auf die einzelnen Methoden- und Matrixeinflüsse als Sulfonamide. Diese Erkenntnisse stimmen gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.

Insgesamt werden durch den ME-Vergleich von QTRAP und QTOF die vielfältigen Einflüsse auf Proben, die sich allein durch das Messsystem ergeben, dargestellt. Diese Ergebnisse bestätigen die Komplexität der Matrixeffekt-Bildung und die damit verbundenen Schwierigkeiten, diese vollständig aufzuklären. Methodenparameter, insbesondere Nachweis- und Bestimmungsgrenze,

Linearität oder Präzision werden durch ME beeinflusst (Bonfiglio *et al.*, 1999). Die effektivste Methode, um diese zu kompensieren, stellt die Verwendung eines internen Standards dar (Le Bizec *et al.*, 2009; Matuszewski, 2006).

8.2 Qualitative Matrixeffekte

8.2.1 Auswirkungen der organischen Eluenten

Bei der Post-column-Infusion wurde mittels Spritzenpumpe ein konstanter Fluss des Analyten in das Massenspektrometer eingeleitet, während über die UHPLC eine aufbereitete Leerprobe (Matrix oder Methanol) injiziert und ebenfalls in das Massenspektrometer eingeleitet wurde (Bonfiglio *et al.*, 1999). Die Auswirkung des organischen Eluenten auf die Signalintensität wurde mittels Post-column-Infusion und QTRAP untersucht.

Dafür wurde die Post-column-Infusion mit dem identischen Gradienten einmal mittels Acetonitril (ACN) und einmal mit Methanol (MeOH) als Eluent durchgeführt. Als wässriger Eluent diente 3mM Ammoniumformiatpuffer mit 0,5 % Ameisensäure. Der direkte Vergleich zeigt, dass mit MeOH zwar eine Signalunterdrückung bei der Leermatrix erzeugt wird, aber die Intensitäten deutlich über den Intensitäten mit ACN liegen (vgl. Abb. 8.2). Dass die Signalintensitäten bei Verwendung von MeOH höher sein können als bei der Verwendung von ACN, zeigten auch Lanina *et al.* (2007) in ihren Untersuchungen. Auch wenn diese Autoren ESI im negativen Modus durchführten, zeigen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, dass dies auch der Fall im positiven ESI-Modus positiv sein kann. Diese Tatsache könnte, neben der Verdünnung der Probenextrakte, eine Erklärung für die zum Teil höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode mittels QTOF liefern, da dort ACN als organischer Eluent verwendet wurde.

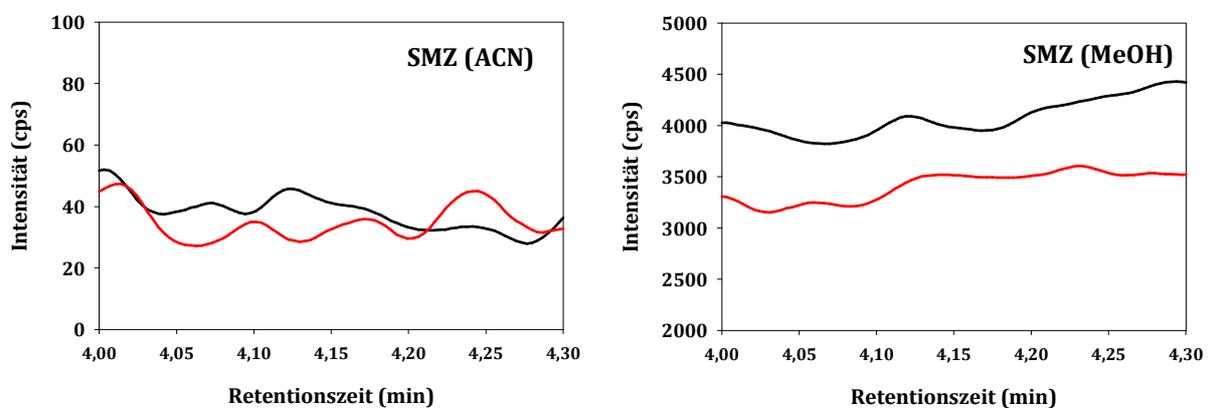


Abb. 8.2: Post-column-Infusion QTRAP-Profil (1 µg/mL) von SMZ (Fragment 108) für Methanol (schwarz) und Leermatrix (rot) mit MeOH und ACN als organischer Eluent. Die y-Achsen sind unterschiedlich.

8.2.2 Auswirkungen der BDF-Proben und der Leermatrix

Neben der Aussage über Signalunterdrückung oder Signalverstärkung können anhand der Post-column-Infusion wertvolle Informationen über Auswirkungen von verschiedenen Matrices auf das Analytsignal gewonnen werden. Diese Informationen können für einen Vergleich verwendet werden, um die Anwendbarkeit einer Methode zu untersuchen und zu bestätigen. Dies spielt vor allem bei Bodenproben eine große Rolle, da es sich bei Boden um eine sehr komplexe Matrix handelt. Die Zusammensetzung von Boden variiert nicht nur bei jedem Bodentyp, sondern ist zusätzlich abhängig von der jeweiligen Region. Bekannt ist, dass Bodenbestandteile, wie zum Beispiel der Anteil an Huminsäuren oder der gelöste organische Kohlenstoff (DOC), Auswirkungen auf Matrixeffekte haben können (Bourdat-Deschamps *et al.*, 2014; O'Connor *et al.*, 2007). Auch die Anwesenheit von nicht-flüchtigen Komponenten in der Probe wird als Verursacher von Signalsuppressionen diskutiert (King *et al.*, 2000). Die Leermatrix (analytfreier Boden) sowie der Boden der BDF wurden hinsichtlich des DOC, Huminstoff- und Huminsäuregehalts untersucht (vgl. Tab. 8.1). Die Leermatrix und der Oberboden der BDF (0-10 cm) zeigen große Ähnlichkeit in den Gehalten der drei genannten Bodenbestandteile. Der DOC-Gehalt liegt auch in den tieferen Bodenschichten in einer vergleichbaren Größenordnung. Der Huminstoff- und Huminsäuregehalt nimmt jedoch ab der Bodentiefe 30-40 cm stark ab. Bei einer Probennahmetiefe von 80-90 cm sind die Gehalte um den Faktor 11 beziehungsweise 50 niedriger als im Oberboden (Tab. 8.1). Selbst Bodenproben des gleichen Bodentyps (Sand, Lehm, Ton) könnten unterschiedliche ME auf die jeweiligen Analyten ausüben. Bei den BDF-Proben handelte es sich zwar immer um den gleichen Bodentyp, allerdings unterscheidet sich die Zusammensetzung je nach Probennahmetiefe. Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieser verschiedenen Tiefenprofilen auf die ME mittels Post-column-Infusion untersucht.

Tab. 8.1: DOC-Gehalte sowie Huminstoff- und Huminsäuregehalte in der Leermatrix und in den Bodentiefen 0-10 cm, 30-40 cm und 80-90 cm der BDF.

		BDF	BDF	BDF
	Leermatrix	0-10 cm	30-40 cm	80-90 cm
DOC [mg/L]	30	19	45	22
Huminstoffe [%]	1,1	1,1	0,3	0,1
Huminsäure [%]	0,5	0,5	0,1	0,01

Bei der Post-column-Infusion wurde, wie bereits beschrieben, mittels Spritzenpumpe ein konstanter Fluss des Analyten in das Massenspektrometer eingeleitet, während über die UHPLC eine aufgearbeitete Probe (Leermatrix oder Methanol) injiziert und ebenfalls in das Massenspektrometer eingeleitet wurde (Bonfiglio *et al.*, 1999). Anschließend wurde ein

Vergleich der Signalintensitäten, zum jeweiligen Elutionszeitpunkt der Analyten, durchgeführt. Neben der Injektion von Methanol und einer Leermatrix wurden zusätzlich Probenextrakte der zu untersuchenden BDF verwendet. Dabei wurden drei Bodentiefen (0-10 cm, 30-40 cm, 80-90 cm) untersucht, um das komplette Bodentiefenprofil widerzuspiegeln. Die Leermatrix wurde aus dem Boden hergestellt, welcher für die Methodenentwicklung und Methodvalidierung verwendet wurde. Analytfreier Boden der Bodendauerbeobachtungsfläche stand nicht zur Verfügung. Das Vorhandensein einzelner Analyten in diesen Matrices ist aufgrund der Konzentrationen vor allem für die Messungen mittels QTRAP mit einem Split von 1:10 vernachlässigbar. Die Konzentrationen, die mittels Spritzenpumpe in das MS gelangen, betragen bei einer infundierten Standardlösung mit der Konzentration 1 µg/mL insgesamt 10 ng/min. Mit einem theoretischen Gehalt der Analyten von 100 µg/kg wird eine absolute Menge von 0,2 ng in das MS überführt. Gegebenenfalls bei der Messung mittels QTOF, bei dem der Split nur 1:2 beträgt, könnte bei sehr hohen Gehalten der Analyten in der Matrix eine Auswirkung zu sehen sein. Dargestellt sind in den Post-column-Profilen die einzelnen Analyten anhand eines spezifischen Massenübergangs.

In Abb. 8.3 und Abb. 8.4 sind die Post-column-Profile von SGU, SDZ, SMZ, SDM, TC, CTC und IsoCTC für die Messungen mittels QTRAP des jeweiligen Analyten zum Zeitpunkt der Elution dargestellt. Andere Arbeiten untersuchten die Auswirkungen für eine komplette Messung, um ganze Bereiche von Matrixeffekten im Chromatogramm identifizieren zu können (Bonfiglio *et al.*, 1999; Ismaiel *et al.*, 2008). Für diese Arbeit war jedoch nur der Elutionszeitpunkt für einen Vergleich interessant. Die Retentionszeit für die Messung der Analyten ohne Post-column-Infusion ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Diese kann minimal bei der Post-column-Infusion variieren, da die Verbindung zwischen HPLC und MS verändert ist. Daher wird der gezeigte Chromatogrammausschnitt als Elutionsbereich angesehen. Die dargestellten Analyten eluieren in der Reihenfolge SGU, SDZ, SMZ, SDM, IsoCTC, TC und CTC. SDZ eluiert somit bei einem relativ hohen Anteil an wässrigem Eluenten, SDM dagegen bei einem relativ hohen organischen Anteil. TC und IsoCTC eluieren zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie SDM. CTC eluiert von den untersuchten Analyten bei dem höchsten organischen Anteil im Eluenten.

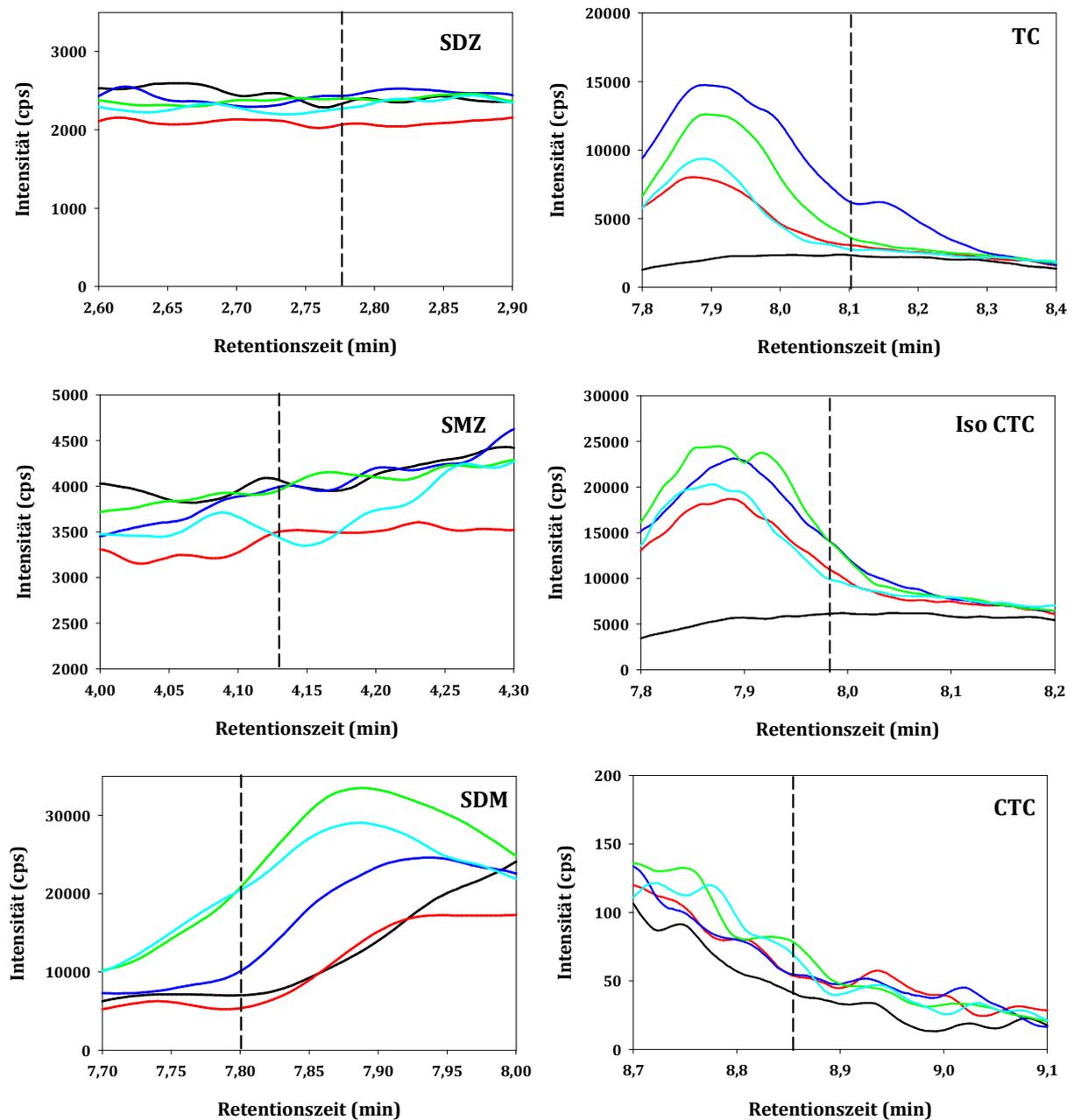


Abb. 8.3: QTRAP Post-column-Infusionsprofile (1 µg/ml) von SDZ (Fragment 108), SMZ (Fragment 108), SDM (Fragment 108), TC (Fragment 154), IsoCTC (Fragment 462), CTC (Fragment 154), für Methanol (schwarz), Leermatrix (rot), BDF-Tiefe 0-10 cm (blau), BDF-Tiefe 30-40 cm (grün), BDF-Tiefe 80-90 cm (türkis), die gestrichelte Linie stellt die Retentionszeit der Analyten dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich.

Für einen Vergleich wird die Methanolinjektion mit den Injektionen mit Matrix verglichen. Die mit QTRAP (vgl. Abb. 8.3) ermittelten Post-column-Infusionsprofile von SDZ, SMZ und CTC sind ähnlich. Eine eindeutige Signalunterdrückung oder -verstärkung kann nicht beobachtet werden. Eine Ausnahme stellt die Leermatrix bei SMZ dar. Diese weist auf eine leichte Signalunterdrückung hin.

Es wurde zunächst vermutet, dass die Matrix der Bodenschicht 80-90 cm geringere Auswirkungen auf die Signalintensität hat, da die Probenextrakte weitaus weniger Matrixbestandteile aufweisen als höhere Bodenschichten. Dies wurde wegen der Stärke der Extraktfärbung und auch wegen den geringeren Gehalten an Huminstoffen (siehe Tab. 8.1) angenommen. Das Post-column-Infusionsprofil von IsoCTC ist jedoch für alle untersuchten Matrices gleich. Das Infusionsprofil mit MeOH weicht als einziges ab. IsoCTC unterliegt demnach bei allen Matrices einer ähnlichen Signalverstärkung, die am Ende des Gradienten jedoch schwächer wird. Unterschiede zwischen den einzelnen Matrices gibt es nicht, so dass IsoCTC anfällig für eine Signalverstärkung zu sein scheint, sobald eine Bodenmatrix verwendet wird.

Im Gegensatz zu IsoCTC zeichnet das TC-Profil das Tiefenprofil des Bodens nach. Mit Zunahme der Bodentiefe der BDF-Proben nimmt die Signalintensität des Post-column-Profiles ab. TC kann demnach empfindlich auf die unterschiedlichen Matrixbestandteile, die in den tieferen Bodenschichten abnehmen, reagieren. Ein Vorhandensein von Analyt in den Proben der BDF scheint geringe bis keine Auswirkungen auf die Profile zu haben. Die infundierte Konzentration (1 µg/mL) überdeckt diese. Erkennbar ist dies anhand dem Profil der Leermatrix und der Bodenschicht 80-90 cm, in denen kein Analyt vorlag (vgl. Kap. 9.2.1) und dennoch ähnliche Post-column-Profilverläufe wie für die Bodenschicht 0-10 cm erzeugt wurden.

Das Post-column-Infusionsprofil von SDM dagegen kehrt das Tiefenprofil fast vollständig um. In der Bodenschicht 0-10 cm ist eine geringere Signalverstärkung als in der Bodenschicht 80-90 cm zu erkennen. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass die Matrixeffekte nicht unbedingt mit der Menge an Matrix in der Probe korrelieren, sondern möglicherweise mit den einzelnen Bestandteilen. Das SDM Infusionsprofil spiegelt nicht die Ergebnisse der ME (Kap. 8.1) wider. Dies könnte unter anderem auf eine inhomogene Probenmatrix zurückzuführen sein.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass eine Vorhersage der Matrixeffekte kaum möglich ist. Neben den Unterschieden innerhalb einer Antibiotikaklasse sind selbst Unterschiede zwischen den einzelnen Analyten in einem ähnlichen Elutionsbereich (SDM, TC, IsoCTC) zu sehen. Dies stimmt gut mit der These von Bonfiglio *et al.* (1999) überein, dass der Analyt selbst einen größeren Einfluss haben kann als die Probenaufarbeitung.

Für das Sulfonamid SGU wurde mittels der Untersuchungen auf quantitative Matrixeffekte eine Signalverstärkung beobachtet (vgl. Kap. 8.1). Die übrigen Sulfonamide zeigten eine Signalunterdrückung welches die Post-column-Infusionsprofile von SMZ und SDZ ebenfalls andeuten (Abb. 8.3). Der Theorie, dass polare Substanzen eher einer Signalunterdrückung unterliegen (Bonfiglio *et al.*, 1999; Gosetti *et al.*, 2010), widerspricht das Ergebnis der Post-colum-Infusion von SGU. Die Signalverstärkung von SGU konnte mittels Post-column-Infusion sowohl für die Leermatrix als auch für die BDF eindeutig bestätigt werden (vgl. Abb.8.4). Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass vor allem coeluiierende

wasserlösliche Matrixbestandteile für diese Signalverstärkung verantwortlich sind (vgl. Kap. 8.1).

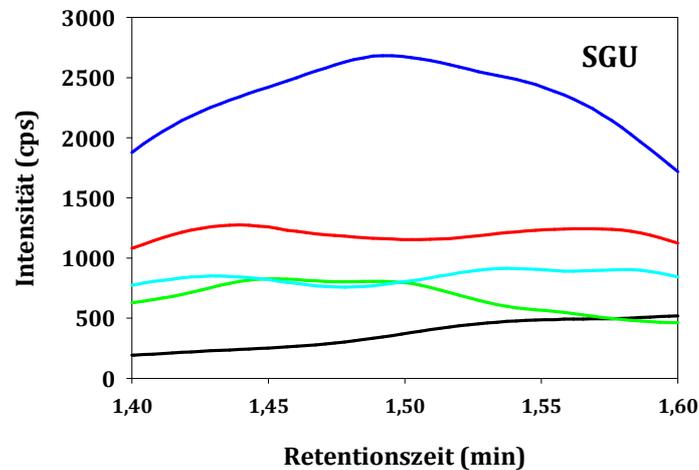


Abb. 8.4: QTRAP Post-column-Infusionsprofile (1 µg/mL) von SGU (Fragment 108), für Methanol (schwarz), Leermatrix (rot), BDF-Tiefe 0-10 cm (blau), BDF-Tiefe 30-40 cm (grün), BDF-Tiefe 80-90 cm (türkis).

Die Post-column-Infusionsprofile für die Messung mittels QTOF für SDZ, SMZ, SDM, TC, IsoCTC und TC sind in Abb. 8.5 dargestellt. Insgesamt sind die Signalintensitäten geringer als bei der Messung mittels QTRAP. Dies ist auf den organischen Eluenten ACN zurückzuführen (Kap. 8.2.1). Für SMZ, SDM und IsoCTC sind ähnliche Profile wie für die QTRAP gemessen worden. Die Infusionsprofile von SDZ, TC und CTC sind unterschiedlich zu den generierten QTRAP-Profilen (Abb. 8.3 und Abb. 8.5). Für das Infusionsprofil von SDZ konnte mittels QTOF eine eindeutige Signalunterdrückung festgestellt werden (Abb. 8.5). Dies stimmt jedoch nicht mit den für das QTOF ermittelten ME überein (vgl. Kap. 8.1), was auf eine inhomogene Probenmatrix zurückzuführen sein könnte. Weiterhin verdeutlicht dies wiederum die Komplexität der Bildung von Matrixeffekten.

Das Infusionsprofil von CTC zeigt für das QTOF (Abb. 8.5) eine eindeutige Signalverstärkung. Diese ist bei dem CTC QTRAP-Profil (Abb. 8.3) nur tendenziell zu erkennen. Auch die Infusionsprofile von TC unterscheiden sich zwischen QTRAP und QTOF. Das QTOF-Profil zeigt eine eindeutige Signalverstärkung (Abb. 8.5). Das Tiefenprofil wird, im Gegensatz zu dem QTRAP-Profil, nicht nachgezeichnet (Abb. 8.3). Die QTOF-Profile von TC und IsoCTC (Abb. 8.5) der Bodentiefe 0-10 cm, weisen im QTOF-Profil Spuren des vorhandenen Analyten in den Extrakten auf. Dies ist erkennbar an dem unterschiedlichen Profilverlauf der Bodenschicht 0-10 cm im Vergleich zu den anderen Schichten. Jedoch zeigen alle Bodenmatrices fast identische Profilhöhen, so dass eine eindeutige Signalverstärkung identifiziert werden konnte. Der Grund für den Nachweis der Analyten in dem Bodenextrakt 0-10 cm ist auf ein geringeres

Splitverhältnis bei der Messung mittels QTOF zurückzuführen. Die in Abb. 8.5 gekennzeichnete Retentionszeit von TC unterscheidet sich minimal von der Elutionszeit mittels Post-column-Infusion. Dies ist auf die veränderte Überführung des HPLC-Eluats in das QTOF für die Post-column-Infusion zurückzuführen.

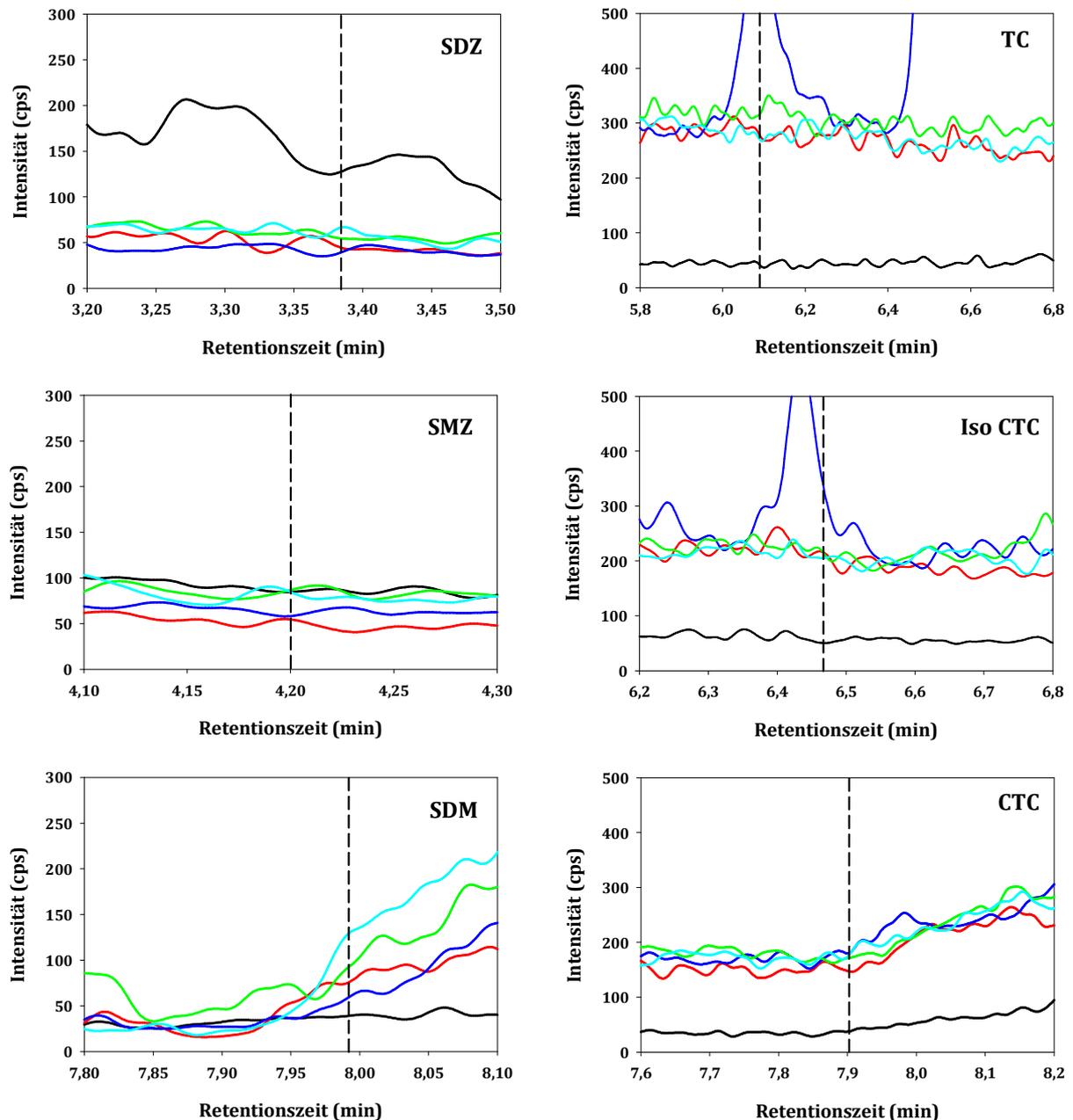


Abb. 8.5: QTOF Post-column-Infusionsprofile ($1\mu\text{g/mL}$) von SDZ (Fragment 108), SMZ (Fragment 108), SDM (Fragment 108), TC (Fragment 154), IsoCTC (Fragment 462), CTC (Fragment 154), für Methanol (schwarz), verdünnter Leermatrix (rot), BDF-Tiefe 0-10 cm (blau), BDF-Tiefe 30-40 cm (grün), BDF-Tiefe 80-90 cm (türkis), die gestrichelte Linie stellt die Retentionszeit der Analyten dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich.

9 Analyse BDF

Die ausgewählte BDF wurde seit ca. 20 Jahren regelmäßig mit Schweinegülle aus der intensiven Tierhaltung gedüngt. Das gesamte Probenmaterial wurde in Kunststoffbeuteln im Keller frostfrei gelagert. Die Analyse der BDF-Bodenproben auf Sulfonamide und Tetracycline sollte Informationen über das Verhalten der beiden Antibiotikaklassen in gealterten sowie in frischen Bodenproben liefern. Dazu wurden Frühjahrs-Proben der Jahre 2001, 2002, 2005, 2008, 2009, 2015 sowie Herbst-Proben des Jahres 2008 mit der entwickelten LLE aufgearbeitet. Die im Jahr 2017 entnommenen frischen Proben wurden ebenfalls auf die beiden Antibiotikaklassen untersucht. Neben den Muttersubstanzen sollten die Proben auf Transformationsprodukte hin untersucht werden, um das Verhalten und den Verbleib der Substanzen weiter aufzuklären. Dazu wurden auch einzelne Proben aus 2018 untersucht. Sowohl jede Bodenschicht von 10 cm (0-40 cm und 0-90 cm Bodentiefe) als auch jede Kernflächen (K1-K4) wurden einzeln aufgearbeitet und untersucht.

Die Quantifizierung erfolgte anhand eines Lösungsmittelstandards über die Peakflächen-Verhältnisse von Analyt zu internem Standard. Die Proben wurden sieben Tage vor Aufarbeitung mit internem Standard versetzt und bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Die ermittelten Gehalte wurden über die jeweiligen Wiederfindungen korrigiert. Die nachfolgend aufgeführten Gehalte beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse.

9.1 Verhalten von Sulfonamiden

In früheren Studien wurden bereits Proben der vorliegenden BDF untersucht. In den Untersuchungen von Hamscher *et al.* (2005a) konnte das Sulfonamid SMZ eindeutig in einzelnen Bodenproben nachgewiesen werden. SDZ konnte nur in der Schweinegülle, mit der die BDF bewirtschaftet wurde, identifiziert werden jedoch nicht in den Bodenproben. Untersuchungen der Schweinegülle liegen aus den Jahren 2000 bis 2002 vor. Bekannt war demnach, dass auf die BDF im Jahr 2000 Wirtschaftsdünger mit SDZ und SMZ aufgetragen wurde. In den anderen beiden Jahren konnte lediglich SDZ in der Schweinegülleprobe aus dem Jahr 2001 nachgewiesen werden. Andere der damals untersuchten Sulfonamide, wie zum Beispiel SMX oder SDM, wurden weder im Wirtschaftsdünger noch im Boden detektiert.

Mittels der neu entwickelten Flüssig-Flüssig Extraktion und Mikrowellenextraktion wurden in den Proben der BDF sowohl SMZ als auch SDZ eindeutig nachgewiesen. Zusätzlich wurde erstmals das Sulfonamid SGU quantitativ im Boden bestimmt. Auch ein Transformationsprodukt von SDZ, das 4-OH-SDZ, wurde identifiziert.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der LLE dargestellt. Im Kapitel Methodenvergleich werden die Ergebnisse der LLE mit den Ergebnissen der MWE verglichen.

Ansonsten wird explizit darauf hingewiesen, falls es sich bei dargestellten Gehalten um die Ergebnisse mittels MWE handelt.

9.1.1 SGU als Tierarzneimittel

Das Sulfonamid SGU wurde bei der Analyse der BDF-Proben eindeutig nachgewiesen. Vergleiche mit früheren Untersuchungen konnten nicht vorgenommen werden, da SGU in der Studie von Hamscher *et al.* (2005a) nicht mituntersucht wurde. In Deutschland besitzt SGU, nach Vetidata und PharmNet.Bund, weder als Human- noch als Tierarzneimittel eine Zulassung (PharmNet.Bund, 2018; Vetidata, 2018). In der Schweiz existieren noch Zulassungen für Tierarzneimittel, die SGU enthalten (Vetpharm, 2018). Anhand der BVL-Erhebungen über die Abgabemengen antimikrobiell wirksamer Stoffe kann ausgeschlossen werden, dass die Substanz SGU in den letzten Jahren in Deutschland an Tierärzte abgegeben wurde (Wallmann, 2014; Wallmann, 2015; Wallmann, 2016). Bei Untersuchungen von Böden und Wirtschaftsdüngern in Deutschland, den USA und in Spanien konnte kein SGU nachgewiesen werden (Biel-Maeso *et al.*, 2017; Haller *et al.*, 2002; Shelver *et al.*, 2010). Daher stellt sich die Frage, wie SGU in den Boden gelangen konnte.

Die Tatsache, dass SGU schon in den 17 Jahre alten Proben aus dem Jahr 2001 gefunden wurde, könnte bedeuten, dass SGU eine sehr hohe Persistenz im Boden aufweist. Durch einen möglicherweise lange zurückliegenden Einsatz in der Veterinärmedizin könnte die Substanz auf den landwirtschaftlich genutzten Boden gelangt sein. Eine Persistenz könnte erklären, warum auch noch in den späteren Jahren, in denen keine Zulassung mehr vorlag, SGU nachgewiesen werden konnte. Gegen diese Theorie spricht, dass SGU ein eher polares Sulfonamid ist und sich gut in Wasser löst. SGU konnte auch in den tieferen Bodenschichten nachgewiesen werden (vgl. Kap. 9.1.3). Dies deutet auf eine Auswaschung von SGU aus Boden hin. Interne, bislang nicht veröffentlichte Arbeiten zeigten, dass in Lysimeterwasser, welches durch eine dotierte Bodensäule sickert, SGU nachgewiesen werden konnte (Spielmeyer, 2018). Auch die von Białk-Bielińska *et al.* (2012a) ermittelten niedrigen Sorptionskoeffizienten für SGU in Boden, deuten auf eine Auswaschung aus Boden in Grundwasser oder Oberflächengewässer hin. Die über die Jahre hinweg detektierten, im Vergleich zu SDZ und SMZ, deutlich höheren SGU-Gehalte in Verbindung mit einer Auswaschung, weisen jedoch auf einen kontinuierlichen Eintrag auf die landwirtschaftliche Nutzfläche hin (vgl. Kap. 9.1.2).

Ein kontinuierlicher Eintrag könnte über verschiedene Wege stattfinden, zum Beispiel über die Bildung von SGU im Boden als Transformationsprodukt. Aber auch eine Verunreinigung von Tierarzneimitteln auf Sulfonamidbasis oder sonstigen Substanzen, die zur Bewirtschaftung der Felder verwendet werden, sollten in Betracht gezogen werden. Hierunter würden insbesondere Pflanzenschutzmittel zählen. Für den Maisanbau zum Beispiel sind in Deutschland unter

anderem Glyphosat, Mesotrione oder Thiram zugelassen (BVL, 2018b). In der Schweiz wurde in Honig nach dem Einsatz des Herbizids Asulam Sulfanilamid nachgewiesen (Bogdanov, 2005). Sulfanilamid gehört zu der Antibiotikaklasse der Sulfonamide (vgl. Abb. 9.1). Durch die Untersuchungen des Honigs konnte festgestellt werden, dass höhere Asulamwerte höhere Gehalte an Sulfanilamid bedingten. In der Schweiz wird Sulfanilamid nicht in der Landwirtschaft eingesetzt (Bogdanov, 2005; Kaufmann und Kaenzig, 2004). Die Untersuchungen von Kaufmann und Kaenzig (2004) legten nahe, dass es sich bei dem gefundenen Sulfanilamid um einen Metaboliten des verwendeten Asulams handelt.

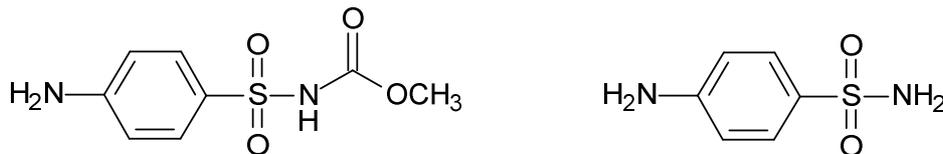


Abb. 9.1: Strukturformeln von Asulam (links) und Sulfanilamid (rechts).

Ein solches Szenario wäre auch für die Bildung von Sulfaguanidin im Boden theoretisch möglich. Für das Insektizid Imidacloprid (IMI) wurden in Pflanzen und Boden verschiedene Metabolite nachgewiesen, unter anderem Imidacloprid-Guanidin. Dieses weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu SGU auf (vgl. Abb. 9.2). Die Verbindung kann im Metabolismus der Pflanze einer Ringöffnung unterliegen (Cox *et al.*, 1997; Rouchaud *et al.*, 1996; Sur, 2003), so dass der stickstoffhaltige Rest dem des SGU entspricht. Imidacloprid-Urea wurde bereits als ein Hauptmetabolit in Boden identifiziert (Rouchaud *et al.*, 1996). Der dargestellte Metabolismus zum Imidacloprid-Urea verläuft über das Zwischenprodukt Imidacloprid-Guanidin und könnte gegebenenfalls auch im Boden ablaufen. Die Sulfonamide SDZ und SMZ wurden in den Bodenproben nachgewiesen (vgl. Kap. 9.1.2). Ein ähnlicher Metabolismus wie für IMI könnte auf diese beiden Sulfonamide übertragen werden. Anzumerken ist aber, dass es sich bei dem Rest von SDZ und SMZ um aromatische Ringe handelt. Ob die Reaktion von IMI auf dieses System übertragbar ist, ist fraglich.

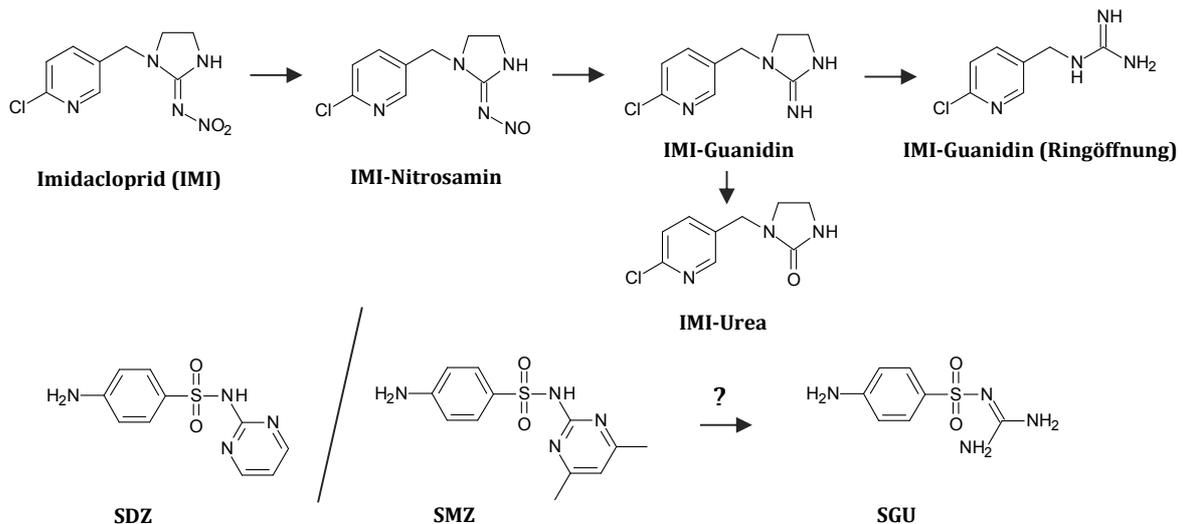


Abb. 9.2: Auszug einer möglichen Metabolisierung von Imidacloprid in Pflanzen nach Sur (2003), Strukturformeln von SDZ, SMZ und SGU.

In der Literatur werden verschiedene Synthesewege für SGU dargestellt, wie zum Beispiel die Reaktion von Sulfanilamid mit Guanidin unter Abspaltung von Ammoniak (Birtwell *et al.*, 1946). Sulfanilamid ist nicht nur als Metabolit von Asulam, sondern auch als Photolyseprodukt von Sulfonamiden in Gewässern bekannt (Boreen *et al.*, 2004). Im Boden konnte Sulfanilamid jedoch bisher nicht identifiziert werden. Auch in den aufgearbeiteten Bodenextrakten der BDF konnte keine entsprechende Masse nachgewiesen werden. Die Möglichkeit einer Hydrolyse von Sulfonamiden zu Sulfanilamid in sauren, wässrigen Lösungen wurde zwar von Biłk-Bielińska *et al.* (2012b) beschrieben. Die Autoren merken jedoch an, dass die Stabilität von Sulfonamiden unter typischen Umweltbedingungen hoch ist.

In der Landwirtschaft werden hohe Mengen an Harnstoff-Dünger eingesetzt (Glibert *et al.*, 2006). Dieser beinhaltet kurz- und langkettige Methylenharnstoff-Polymere. Diese werden von Bodenorganismen zu Harnstoff abgebaut (Hayatsu, 2014; Jahns *et al.*, 2003). Eine Bildung von Sulfaguanidin oder seinen Präkursoren aus den Abbau- und Transformationsprodukten des Harnstoff-Düngers oder aus Harnstoff selbst wäre ebenfalls eine mögliche Theorie. Biotisch bedingte Reaktionen können also nicht ausgeschlossen werden. Sie benötigen jedoch meist eine gewisse Zeit. SGU konnte in den frischen Proben aus dem Jahr 2017 in relativ hohen Mengen nachgewiesen werden. Generell scheint eine Bildung im Boden daher von untergeordneter Rolle zu sein.

Eine Verunreinigung der verwendeten Antibiotikapräparate SDZ und SMZ mit SGU ist unwahrscheinlich, da Nebenprodukte in (Tier)Arzneimitteln ab einer bestimmten Konzentration einer Anzeigepflicht unterliegen. Diese liegt nach „European Medicines Agency“ (EMA, heute EMA) für Wirkstoffe, die nur als Tierarzneimittel dienen, bei 0,2 %. Bei Wirkstoffen, die als Tier- und Humanarzneimittel verwendet werden liegt diese Anzeigepflicht nach EMA und der „International conference on harmonisation of technical requirements for registration of

pharmaceuticals for human use“ (ICH) bei einer Konzentration von 0,1 % bzw. 0,05 %, je nach Dosismenge (EMA, 2005; ICH, 2006). Solche Nebenprodukte könnten dann zu einem dauerhaften Eintrag in den Boden führen. Im Jahr 2015 wurden in Summe 58 Tonnen SDZ und SMZ abgegeben (Wallmann, 2016). Bei Annahme einer Verunreinigung mit SGU von 0,2 % ergibt dies eine Menge von 116 kg. Daher sollten im Vergleich zu SDZ und SMZ selbst nur Spuren von SGU nachweisbar sein. Die Herkunft von SGU kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht zufriedenstellend geklärt werden. Weitere Untersuchungen zum Ursprung der Verbindung sind daher notwendig.

9.1.2 Retrospektive Untersuchung

Die retrospektive Untersuchung umfasst die Jahre 2001, 2005, 2009 und 2015 und somit einen Zeitraum von 14 Jahren. Die Ergebnisse der Proben aus dem Jahr 2017 wurden für die Darstellung herausgenommen, da es sich um frische Proben handelte und durch die im Boden ablaufenden Alterungsprozesse keine Vergleichbarkeit mit den älteren Proben gegeben war. Die Proben der BDF wurden in Abständen von 10 cm entnommen. Die Ergebnisse der einzelnen Bodenschichten des Oberbodens (0-30 cm), welche der Pflugtiefe entsprechen, wurden gemittelt. Die Probennahme erfolgte auf vier Kernflächen (K1-K4). Jede Kernfläche wurde separat untersucht und aus den Ergebnissen ebenfalls der Mittelwert gebildet. Für die retrospektive Untersuchung wurden nur die Antibiotika-Gehalte im Oberboden untersucht. Die Tiefenprofilanalyse erfolgte anhand des Jahres 2017 (vgl. Kap. 9.1.3). Bei den Werten der jeweiligen Kernflächen traten zum Teil große Unterschiede auf, obwohl sie den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren. Erkennbar ist dies an den Fehlerbalken (vgl. Abb. 9.3). Dies bestätigt, dass Boden eine sehr komplexe und inhomogene Matrix darstellt und natürlichen Schwankungen unterliegt. Schon die Begüllung selbst stellt kein homogenes Ereignis dar. Dies darf bei allen Beurteilungen über die Antibiotika-Gehalte in Boden nicht außer Acht gelassen werden.

Die Sulfonamide SGU, SDZ und SMZ konnten in den Proben der BDF identifiziert sowie quantifiziert werden. In Abb. 9.3 sind die Gehalte als Mittelwerte im Oberboden der vier Kernflächen (K1-K4) für die Jahre 2001, 2005, 2009 und 2015 dargestellt. Für SDZ zeichnet sich über 14 Jahre hinweg ein gleichbleibender Gehalt im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich, nahe der BG, ab. Eine Akkumulation von SDZ im Boden, also ein permanenter Eintrag verbunden mit einer konstanten Anreicherung der Gehalte über die Jahre hinweg, scheint demnach nicht stattzufinden. Die Möglichkeit besteht, dass im Falle des SDZ eine sogenannte „Pseudo-Persistenz“ vorliegt (Daughton, 2002; Mackay *et al.*, 2014). Dies würde bedeuten, dass zunächst ein stetiger Eintrag von SDZ durch Wirtschaftsdünger stattfindet. Gleichzeitig findet auch ein gewisser „Abgang“ von SDZ statt. Dieser „Abgang“ könnte eine Transformation oder auch eine

Sequestrierung im Boden darstellen. Letzteres wurde bereits für SDZ im Boden nachgewiesen (Förster *et al.*, 2009).

Für SGU konnten im Vergleich zu SDZ höhere Gehalte im Oberboden gefunden werden. Dabei schwanken die Gehalte deutlich, sowohl über die Jahre hinweg als auch über die einzelnen Kernflächen. Dies ist insofern bemerkenswert, da nicht abschließend geklärt ist wie SGU in den Boden gelangt (vgl. Kap. 9.1.1). Insgesamt kann keine deutliche Abnahme oder Zunahme über die Jahre hinweg festgestellt werden. Möglicherweise liegt das an einem „unbewussten“ Eintrag, der zusätzlich von unbekanntem Faktoren beeinflusst wird. Da eine Applikation von SGU in der Nutztierhaltung seit vielen Jahren nicht erfolgt bzw. nicht erlaubt ist, sind die höheren Gehalte für SGU im Vergleich zu SDZ und SMZ umso erstaunlicher. Dies könnte vielleicht auch auf eine geringere Sequestrierung von SGU im Boden hinweisen.

Die Gehalte von SMZ weisen über die 14 Jahre hinweg auf eine Abnahme im Oberboden hin (vgl. Abb. 9.3). Im Jahr 2001 konnte ein Gehalt von 8 µg/kg nachgewiesen werden, im Jahr 2015 halbierte sich der Gehalt auf 4 µg/kg. Für die Gehalte der Jahre 2001 und 2015 ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (ANOVA on Ranks mit anschließendem Tukey Test $p < 0,05$). Die Abnahme könnte dabei einerseits auf einen Rückgang der Einsatzmenge und andererseits auch auf eine mögliche Verlagerung von SMZ in tiefere Bodenschichten hindeuten (vgl. Kapitel 9.1.3).

Das Vorhandensein von SMZ in verschiedenen Böden wurde durch mehrere Studien weltweit bestätigt. Dabei variieren die Gehalte stark. Dies liegt unter anderem an den verschiedenen Extraktionsmethoden, aber auch an den Eintragsmengen, die sich bei jeder landwirtschaftlich genutzten Fläche stark unterscheiden können (vgl. Tab. 9.1).

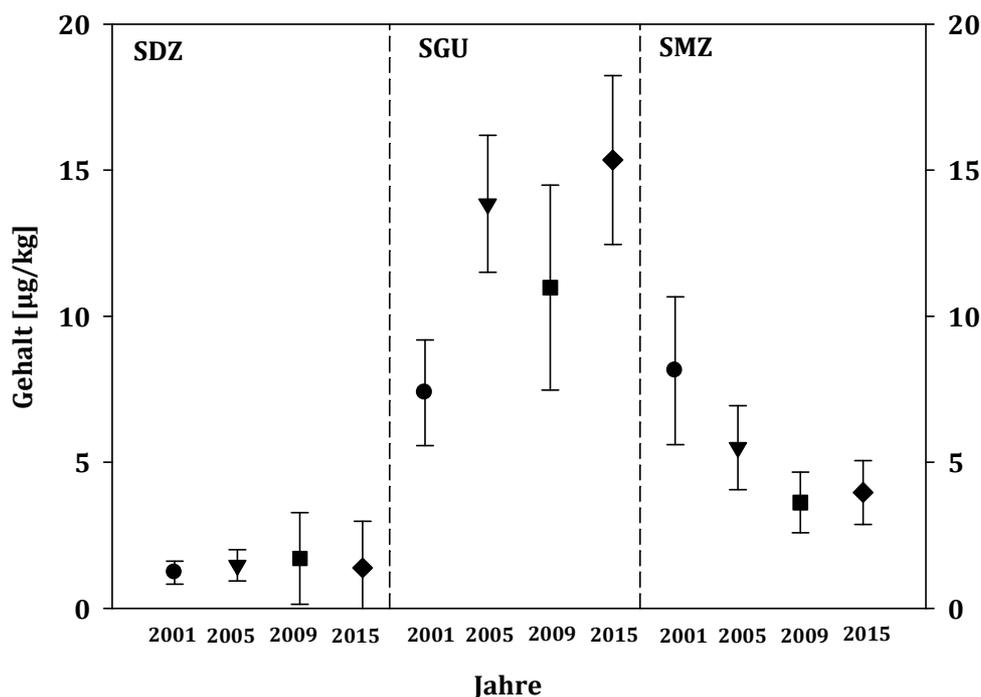


Abb. 9.3: Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] von SDZ, SGU und SMZ im Oberboden (0-30 cm) im Verlauf der Jahre (von links nach rechts) 2001, 2005, 2009 und 2015, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Mittelwerte wurden aus den Kernflächen K1-K4 sowie von den einzelnen Bodenschichten 0-10 cm, 10-20 cm und 20-30 cm gebildet. Die Gehalte von SDZ sind $< \text{BG}$ (7d) aber $> \text{BG}$ (10 min).

Tab. 9.1: Gefundene SMZ-Gehalte in Böden.

SMZ	Extraktionsmethode	Land	Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Awad <i>et al.</i> (2014)	LLE	Korea	0,23-1,11
Christian <i>et al.</i> (2003)	ASE	Deutschland	15*
García-Galán <i>et al.</i> (2013)	PLE	Spanien	8,53-20,42*
Shelver <i>et al.</i> (2010)	wässrige Extraktion	USA	0,03-0,66*

*Trockenmasse

Interessant ist auch der Vergleich der Ergebnisse der Bodenanalyse mit den veröffentlichten Abgabemengen von SDZ und SMZ. Die SDZ-Abgabemenge ist von 2013 bis 2015 von 104 Tonnen auf 36 Tonnen auf ca. ein Drittel gesunken. Bei SMZ sind die Abgabemengen, mit 24 Tonnen (2013) auf 22 Tonnen (2015), annähernd konstant geblieben (Wallmann, 2014; Wallmann, 2016). Der starke Rückgang von SDZ spiegelt sich in den Ergebnissen der BDF jedoch nicht wider. Natürlich ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass die Einsatzmengen von SDZ und SMZ stark abhängig von den verantwortlichen Tierärzten sind, so dass sich nationale Verbrauchsmengen nicht unmittelbar auf regionale Einsatzmengen auswirken müssen.

9.1.3 Tiefenprofilanalyse

Neben den Gehalten im Oberboden sind auch die Gehalte der Sulfonamide in tieferen Bodenschichten interessant, weil sie das Umweltverhalten in Böden widerspiegeln. In Abb. 9.4 sind die mittleren Gehalte der Kernflächen von SDZ, SGU und SMZ in 10 cm Abständen aus dem Jahr 2017 bis zu einer Bodentiefe von 50-60 cm dargestellt. Für die Darstellung der Tiefenprofilanalyse wurden die frischen Proben verwendet, um ein aktuelles Bild darzustellen und um langfristige Alterungsprozesse auszuschließen. Abb. 9.4 verdeutlicht, dass in den ersten 30 cm des Bodens eine Vermischung durch das Pflügen stattfindet, da ähnliche Werte für die drei separaten Bodenschichten bestimmt werden konnten. Insofern ist die gemeinsame Betrachtung als Oberboden gerechtfertigt.

Auffällig sind wiederum die im Vergleich zu SDZ und SMZ höheren Konzentrationen von SGU bis 50 µg/kg im Oberboden. Das Bild, welches sich im Oberboden der frischen Proben abzeichnet, ist vergleichbar mit dem Bild für gealterte Proben (vgl. Abb. 9.3). Insgesamt sind die Gehalte in den frischen Proben etwas höher. Dies wird deutlich anhand des SDZ-Gehaltes im Oberboden, welcher über die 14 Jahre hinweg bei 1,2 bis 1,7 µg/kg und in den Proben aus dem Jahr 2017 bei 6,7 µg/kg lag (vgl. Kap. 9.1.2). Aber auch bei SGU wurden höhere Gehalte für die Bodenproben aus dem Jahr 2017 mit 42,3 µg/kg bestimmt. Die SGU-Gehalte in den älteren Proben schwanken von 7,4 bis 15,4 µg/kg. Für die Gehalte von SMZ ist ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen dem Gehalt im Oberboden im Jahr 2015 (4,0 µg/kg) und im Jahr 2017 (9,7 µg/kg) zu erkennen. Dies korreliert auch gut mit Studien über das Absinken der Wiederfindungsraten von Sulfonamiden bei gealterten Proben (Chen *et al.*, 2009; Stoob *et al.*, 2006).

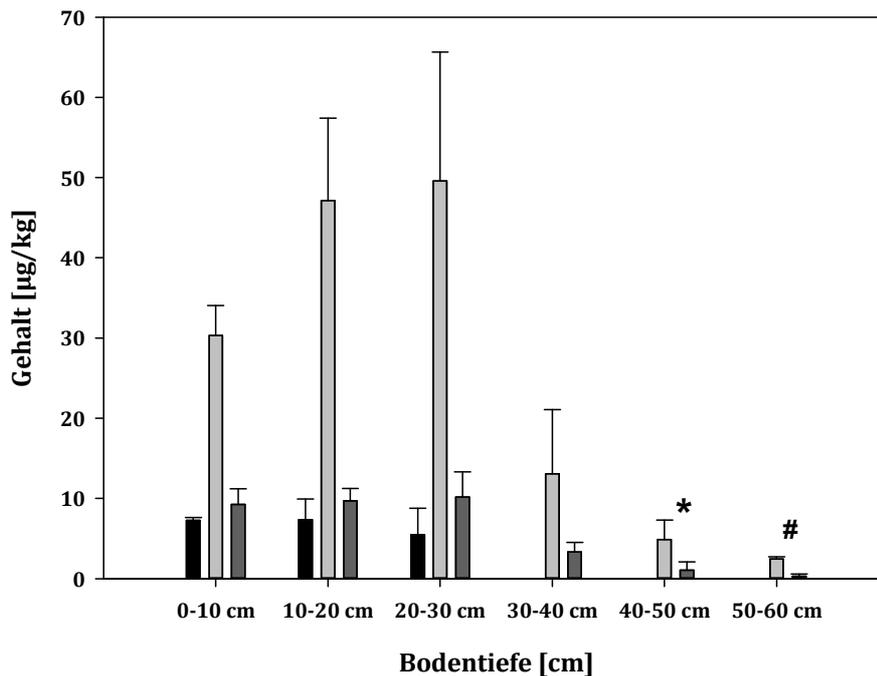


Abb. 9.4: Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] von SDZ (schwarz), SGU (hellgrau) und SMZ (dunkelgrau) in den verschiedenen Bodenschichten von 0-50 cm in den Proben aus 2017. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der vier Kernflächen da. Die mit * gekennzeichneten Gehalte sind $< \text{BG} (7\text{d})$ aber $> \text{BG} (10 \text{ min})$, die mit # gekennzeichneten Gehalte sind $< \text{BG} (10 \text{ min})$ aber $> \text{NWG} (10 \text{ min})$.

Wie auch die Gehalte von Kupfer und Zink gezeigt haben (vgl. Kap. 4.2), stellt eine Bodentiefe von über 30 cm eine scharfe Grenze dar, welche nicht nur optisch klar zu erkennen ist, sondern auch anhand der Gehalte der Sulfonamide. Die Gehalte sinken im Unterboden deutlich ab (vgl. Abb. 9.4). Dies ist bezüglich SGU besonders ausgeprägt, da dort der Gehalt von $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ (20-30 cm) auf $13 \mu\text{g}/\text{kg}$ (30-40 cm) abnimmt. Die Abnahme von SMZ erfolgt in einer ähnlichen Größenordnung ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ auf $3 \mu\text{g}/\text{kg}$). Insgesamt nehmen die Gehalte im Unterboden von Schicht zu Schicht ab, bis bei einer Tiefe von 50-60 cm nur noch Spuren nachweisbar sind (vgl. Abb. 9.4). SDZ ist dagegen schon ab einer Probennahmetiefe von 30 cm nicht mehr nachweisbar. SGU und SMZ unterliegen, im Gegensatz zu SDZ, somit einer Verlagerung in tiefere Bodenschichten. Eine Auswaschung in oberflächennahes Grundwasser ist demnach sehr wahrscheinlich. SDZ scheint dagegen im Oberboden stärker zurückgehalten zu werden und nur in geringerem Maße ausgewaschen zu werden. Betrachtet man die Strukturen von SDZ und SMZ, so sind diese Verbindungen bis auf die beiden Methylgruppen am aromatischen Rest identisch (vgl. Abb. 9.2). SMZ ist aufgrund dieser Methylgruppen jedoch unpolarer als SDZ. Insofern zeigt das unterschiedliche Verhalten von SDZ, SGU und SMZ, dass die Vorhersage der Mobilität einer Verbindung im Boden nur anhand seiner Polarität nicht möglich ist. Eine Beeinflussung des

Verhaltens könnte auch auf die Bildung von Transformationsprodukten zurückzuführen sein (vgl. Kap. 9.1.5).

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit den Studien von Spielmeier *et al.* (2017a) und Pan und Chu (2017) überein. Pan und Chu (2017) identifizierten SMZ im Vergleich zu anderen Antibiotikaklassen als ein Antibiotikum mit einem hohen Auswaschungspotential in Bodensäulen. In der Studie von Spielmeier *et al.* (2017a) wurde Wirtschaftsdünger mit Sulfonamiden dotiert, auf Boden gegeben und das Sickerwasser dieser Bodenflächen auf Sulfonamide hin untersucht. Dabei konnten von neun untersuchten Sulfonamiden SMX und SMZ als die Verbindungen mit der höchsten Mobilität identifiziert werden. SMX und SMZ unterscheiden sich ebenfalls aufgrund ihrer Polarität, da SMZ deutlich polarer ist als SMX. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Verlagerung ein langfristiger Prozess ist, da auch vier Jahre nach der letzten Dotierung immer noch Auswaschungen der Substanzen im ng/L-Bereich stattfinden. Da die hier untersuchte BDF mit hoher Wahrscheinlichkeit kontinuierlich mit Antibiotikahaltigem-Wirtschaftsdünger bearbeitet wurde, ist ein dauerhaftes Abwandern von SMZ in das Grundwasser sehr wahrscheinlich. Aber auch wenn kein belasteter Wirtschaftsdünger zusätzlich aufgetragen werden würde, könnte es zu einer Auswaschung der bereits vorhandenen Sulfonamide kommen. Das Sickerwasser der in dieser Arbeit untersuchten BDF arbeiteten Spielmeier *et al.* (2017a) ebenfalls auf und konnten durchgängig SMZ nachweisen, SDZ jedoch nur in vereinzelt Proben. Die SMZ-Gehalte variierten dabei in den Jahren 2014 bis 2016 von Spuren bis hin zu 105 ng/L. Bereits Hamscher *et al.* (2005a) konnten in dem Grundwasser der BDF nur SMZ, aber kein SDZ nachweisen. Die Gehalte in den Jahren 2002 und 2003 betragen dabei maximal 240 ng/L.

Die Ergebnisse der drei Studien korrelieren sehr gut mit den hier dargestellten Tiefenprofilen von SMZ und SDZ und vervollständigen die Kenntnisse über den Weg der beiden Substanzen, nachdem sie über den Wirtschaftsdünger auf den Boden gelangt sind. Zusätzlich erklären sie, warum SDZ selten bis gar nicht im Grundwasser nachzuweisen war. Diese Substanz ist anscheinend stärker im Boden oder an Bodenbestandteilen gebunden. Selbst mittels MWE konnten im Unterboden nur Spuren von SDZ unterhalb der BG nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf eine geringe Auswaschung hin, die im Grundwasser, unter anderem durch Verdünnungseffekte, nicht mehr nachzuweisen ist. Auch Kreuzig und Höltge (2005) schätzten das Auswaschungspotential von SDZ aus Boden eher gering ein, obwohl aufgrund eines niedrigen Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten (Bailey *et al.*, 2016) eine hohe Mobilität in Boden zu erwarten gewesen wäre. SMZ dagegen hat nach Bailey *et al.* (2016) einen höheren Boden/Wasser-Verteilungskoeffizient als SDZ, welcher theoretisch auf eine höhere Affinität zur Bodenphase hindeutet. In der vorliegenden Arbeit konnte aber eine Auswaschung für SMZ, nicht aber für SDZ ermittelt werden. Somit kann auch der Boden/Wasser-Verteilungskoeffizient nicht

alleine für eine Vorhersage des Auswaschverhaltens dieser Substanzen herangezogen werden. Für SGU können keine Vergleichsdaten herangezogen werden, da diese Substanz in den oben genannten Studien nicht mituntersucht wurde. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass SGU ein ähnliches Verhalten wie SMZ aufweist. Die Auswaschung von SGU könnte sogar stärker sein als es bei SMZ der Fall ist, da höhere Gehalte im Unterboden gefunden wurden.

9.1.4 Vergleich der Rückstandsgehalte im Frühjahr und Herbst

Mögliche Auswirkungen der verschiedenen Jahreszeiten auf die Sulfonamid-Gehalte im Boden sollten ebenfalls untersucht werden. Dazu wurden die Proben aus dem Jahr 2008 aufgearbeitet. Für dieses Jahr lagen Proben vor, die einmal im Frühjahr und einmal im Herbst entnommen wurden. Zum Vergleich wurden zusätzlich die Gehalte der Frühjahrsproben aus 2009 herangezogen (vgl. Abb. 9.5). Die Probennahme wurde im Frühjahr nach der Düngung vorgenommen. Der Vergleich Frühjahr, Herbst und Frühjahr des darauffolgenden Jahres bringt keinen deutlichen Unterschied zwischen den Jahreszeiten hervor. Die Gehalte von SDZ und SMZ sind über die Jahreszeiten hinweg sehr ähnlich. Die Studie von Burkhardt *et al.* (2005) zeigte, dass die drei Sulfonamide SDZ, SMZ und STZ vermehrt im Oberflächenabflusswasser zu finden sind, wenn sie mit Wirtschaftsdünger auf Grasland aufgetragen werden. Sie begründen dies mit einer Änderung des pH-Wertes durch den Wirtschaftsdünger sowie mit Interaktionen der Sulfonamide mit der Wirtschaftsdüngermatrix. Die Bindung der Sulfonamide im Boden ist dann demnach geringer.

Da die untersuchte BDF jährlich mit Wirtschaftsdünger behandelt wird, könnte also bei starken Regenfällen eine stärkere Auswaschung aus dem Boden stattfinden. Dies konnten Spielmeyer *et al.* (2017a) mit ihren Lysimeterstudien zeigen, da dort die höchsten Konzentrationen von SMX und SMZ im Sickerwasser in einer Winterperiode mit hohen Niederschlagsraten nachgewiesen werden konnten. Die Verringerung der Sorption von SMX in Boden durch langjähriges Bewässern mit Abwässern zeigten auch Dalkmann *et al.* (2014). Die Sommerniederschlagshöhe in Deutschland betrug im Jahr 2008 233 L pro m² (Statista, 2018). Diese Menge ist im Vergleich zwischen den Jahren 1960 bis 2013 weder als besonders hoch noch besonders niedrig einzustufen, so dass keine verbindliche Aussage anhand der Niederschlagswerte getroffen werden kann.

Awad *et al.* (2014) konnten in ihrer Studie im September höhere Sulfonamid-Gehalte als im Juni in Boden, Oberflächenwasser und Sediment nachweisen. Für die hier untersuchten Proben kann anhand von SDZ und SMZ keine Veränderung im Herbst festgestellt werden. Da nicht bekannt ist, wie hoch die Menge der aufgebrauchten Antibiotikamenge in den Jahren 2008 und 2009 war, ist eine Aussage bezüglich einer möglichen Auswaschung nicht möglich.

Im Frühjahr 2008 sind signifikant höhere SGU-Gehalte als im Herbst nachzuweisen (one Way ANOVA mit anschließendem Tukey Test $p < 0,05$). Da der Eintrag von SGU aber ungeklärt ist (vgl. Kap. 9.1.1), kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern die stark streuenden Gehalte mit der Jahreszeit korrelieren.

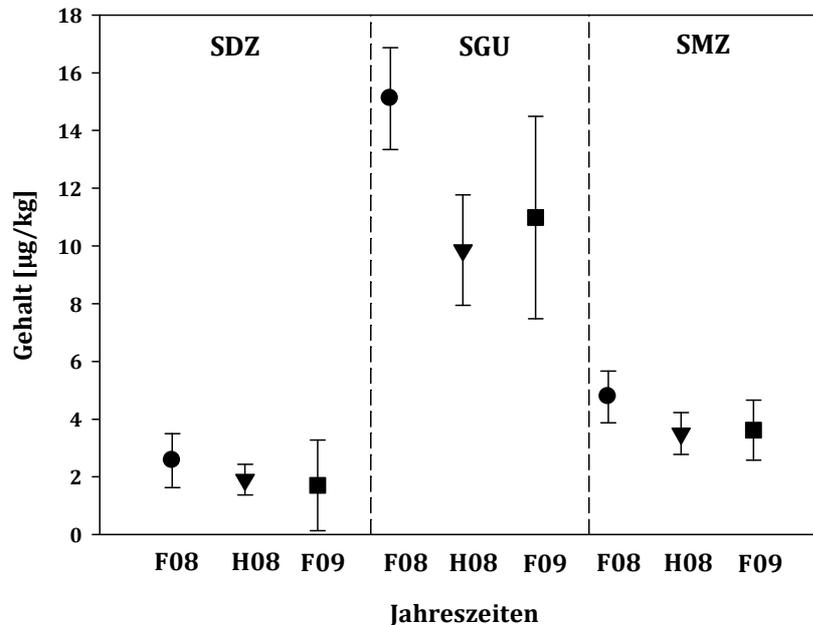


Abb. 9.5: Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] von SDZ, SGU, SMZ in Abhängigkeit der Jahreszeit (F = Frühling, H = Herbst, 08 = 2008, 09 = 2009) im Oberboden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Mittelwerte wurden aus den Kernflächen K1-K4 sowie von den einzelnen Bodenschichten 0-10 cm, 10-20 cm und 20-30 cm gebildet. Die Gehalte von SDZ sind $< \text{BG}$ (7d) aber $> \text{BG}$ (10 min).

9.1.5 Identifizierung von Transformationsprodukten

Transformationsprodukte der Sulfonamide werden über den Metabolismus im Tier und in den verschiedenen Umweltkompartimenten gebildet. Den Hauptmetabolismusweg stellt die N^4 -Acetylierung dar. Aber auch die N -Glucuronidierung und die Hydroxylierung sind als Metabolisierungswege in Tieren bekannt (García-Galán *et al.*, 2008). Da Sulfonamide nur unvollständig metabolisiert werden, gelangen neben den Transformationsprodukten auch die Muttersubstanzen in die Umwelt (Lamshöft *et al.*, 2007). In der Umwelt können dann verschiedene Prozesse ablaufen. Einerseits können die im Metabolismus gebildeten Transformationsprodukte zurück in die Muttersubstanz überführt werden und andererseits können Transformationsprozesse der Muttersubstanzen stattfinden. Ein Beispiel für die Wiederherstellung der Muttersubstanz stellen die N -acetylierten Sulfonamide dar (Abb. 9.6). Diese können im Boden und in Wirtschaftsdünger wieder deacetyliert werden, so dass die ursprüngliche wirksame Substanz erneut vorliegt (Förster *et al.*, 2009; Heuer *et al.*, 2008; Lamshöft *et al.*, 2010).

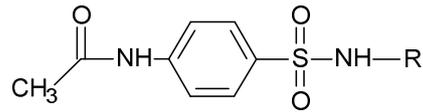


Abb. 9.6: Allgemeine Strukturformel von *N*⁴-acetylierten Sulfonamiden (für R siehe Abb. 5.3).

Transformationsprozesse der Muttersubstanz sind für die verschiedenen Umweltkompartimente in der Literatur beschrieben, vor allem für photolytische Prozesse in wässrigen Proben (Boreen *et al.*, 2005; Guerard *et al.*, 2009; Sukul *et al.*, 2008a). Aber auch die Bildung von Transformationsprodukten während der Wirtschaftsdünger-Fermentation ist bekannt. Dazu zählt unter anderem die Hydroxylierung von SDZ (Mohring *et al.*, 2009), aber auch strukturabhängige Transformationsprodukte von SDM, SMX und SMPD konnten nach anaerober Fermentation von Wirtschaftsdünger identifiziert werden (Spielmeyer *et al.*, 2017b).

In der Literatur gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass die Bildung von Transformationsprodukten in Boden stattfindet. Die Photolyse in Boden als ein möglicher Weg der Transformation wird aufgrund von einer geringen Eindringtiefe des Lichtes im unteren mm-Bereich als unwahrscheinlich angesehen (Ozaki *et al.*, 2011). Die Transformation im Boden durch andere Faktoren ist daher wahrscheinlicher. Dabei wurde bisher vor allem SDZ untersucht (Förster *et al.*, 2009; Unold *et al.*, 2009). Unklar bleibt aber, wo die eigentliche Transformation im Boden stattfindet, da meist ein Wasser/Boden-System zur Untersuchung herangezogen wird. Kasteel *et al.* (2010) zeigten in ihrer Studie, dass die Transformation von SDZ nur in der wässrigen Phase einer Bodensäule stattfand. Sie begründeten dies damit, dass im Boden sorbiertes SDZ vor Transformationsprozessen geschützt sei. Insgesamt zeigt sich in den zuvor genannten Studien, dass 4-OH-SDZ ein Haupttransformationsprodukt von SDZ darstellt. Andere Transformationsprodukte sind zum Beispiel 4-(2-iminopyrimidin-1(2H)-yl)anilin oder 2-aminopyrimidin (Abb. 9.7), (Kasteel *et al.*, 2010; Sittig *et al.*, 2014).

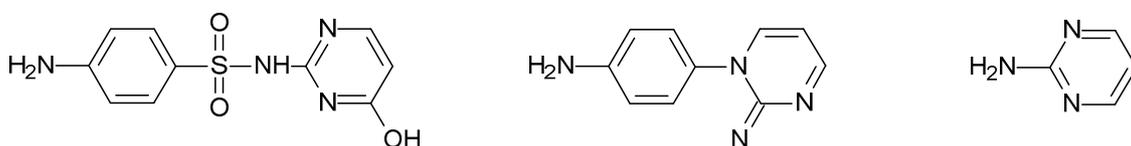


Abb. 9.7: Strukturformeln von 4-OH-SDZ, 4-(2-iminopyrimidin-1(2H)-yl)anilin und 2-aminopyrimidin (von links nach rechts).

Interessanterweise konnten Sittig *et al.* (2014) in fast allen Bodenproben Spuren von *N*-Acetyl-SDZ nachweisen. Alle in dieser Arbeit untersuchten Bodenproben wurden auf die *N*-acetylierten Produkte von SDZ und SMZ analysiert. In den Proben konnte weder *N*-Acetyl-SDZ

noch *N*-Acetyl-SMZ detektiert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Förster *et al.* (2009), dass kurze Zeit, nachdem Wirtschaftsdünger auf den Boden aufgebracht wird, die *N*-acetylierten Produkte in SDZ oder in 4-OH-SDZ rücktransformiert werden. Daher wurden die Bodenproben zusätzlich auf das Vorhandensein von 4-OH-SDZ untersucht und dieses Transformationsprodukt konnte nachgewiesen werden. Die Bestimmung erfolgte dabei halbquantitativ, da kein ausreichend reiner Standard zur Verfügung stand. Mit diesem konnte dennoch die Retentionszeit überprüft werden. Die halbquantitative Bestimmung erfolgte durch Berechnen der 4-OH-SDZ-Gehalte in Bezug auf den SDZ Standard. Die Identifizierung anhand der Retentionszeit und der zwei spezifischen Fragmentationen mittels UHPLC/QTRAP-Methode wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HPLC/QTOF-Methode) abgesichert (vgl. Tab. 9.2). Dazu wurden die experimentellen Massen mit den theoretischen Massen des Moleküls sowie der Produktionen verglichen.

Tab. 9.2: Theoretische und experimentell bestimmte Massen von 4-OH-SDZ und drei spezifischen Fragmenten.

	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)		
	theoretisch	experimentell	Abweichung [ppm]
C₁₀H₁₁N₄O₃S (4-OH-SDZ)	267,05464	267,05474	0,4
C₆H₆NO₂S	156,01138	156,01155	1,1
C₄H₆N₃O	112,05054	112,05003	-4,5
C₆H₆NO	108,04439	108,04469	2,8

In Abb. 9.8 sind die Gehalte von SDZ und 4-OH-SDZ im direkten Vergleich in den Jahren 2001, 2005, 2009, 2015 und 2017 dargestellt. Im Oberboden der BDF konnten durchgängig höhere Gehalte von SMZ als von SDZ nachgewiesen werden (vgl. 9.1.2). Die Abgabemengen nach Wallmann (2016) sind für SDZ jedoch höher als für SMZ. Die Summe von SDZ und seinem Transformationsprodukt 4-OH-SDZ entspricht ungefähr der nachgewiesenen Menge von SMZ. Geringere Gehalte für SDZ können folglich teilweise auf die Bildung des Transformationsproduktes zurückgeführt werden. Aufgrund dieser Transformationsprodukte besteht die Möglichkeit, dass die Gehalte von SDZ in Böden und somit die mikrobiologische Gesamtwirkung, unterschätzt werden, da 4-OH-SDZ immer noch eine schwache antimikrobielle Aktivität besitzt (Nouws *et al.*, 1985). Die Verbindung ist, wie bereits beschrieben, ein Hauptmetabolit des SDZ (Förster *et al.*, 2009; Sittig *et al.*, 2014; Unold *et al.*, 2009). Die Summe von SDZ mit 4-OH-SDZ spiegelt daher den Gesamtgehalt von SDZ im Boden gut wider. Die Bestimmung von 4-OH-SDZ sollte demnach bei der Bewertung von SDZ in Böden immer erfolgen.

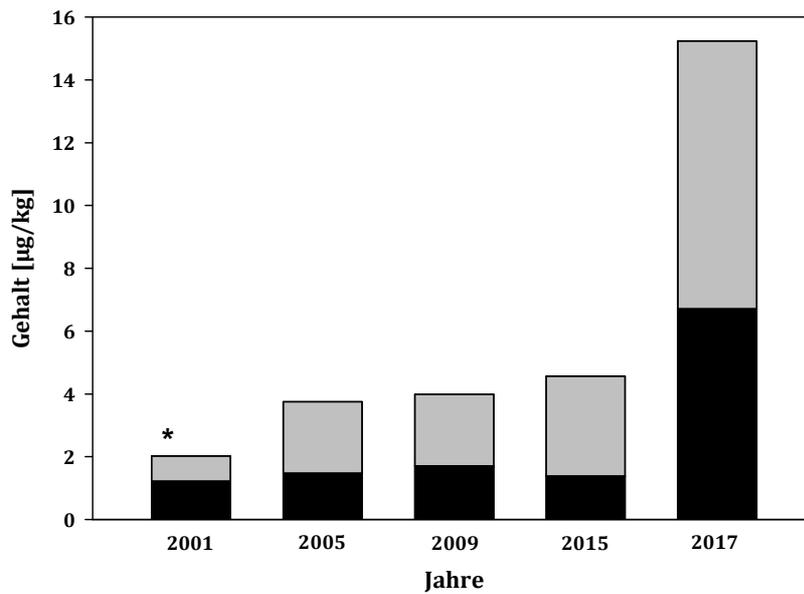


Abb. 9.8: SDZ- (schwarz) und 4-OH-SDZ -Gehalte (grau) im Oberboden der Jahre 2001,2005,2009,2015 und 2017. * 4-OH-SDZ Gehalt im Jahr 2001 < BG aber > NWG SDZ. SDZ Gehalte (Jahre 2001-2015) der LLE Fraktion sind < BG (7d) aber > BG (10 min).

In Abb. 9.8 sind neben den Ergebnissen der retrospektiven Studie bis zu dem Jahr 2015 auch die Ergebnisse der frischen Proben von 2017 dargestellt. Erkennbar sind deutlich höhere Gehalte in den frischen Proben im Vergleich zu den vorigen Jahren. Aufgrund der jährlichen Abgabemengen kann nicht von einer plötzlich erhöhten Anwendung ausgegangen werden, die zu einer Erhöhung der SDZ-Gehalte im Boden führen würde. Es sein denn, dass der verantwortliche Tierarzt das Präparat wechseln würde. Diese Gegenüberstellung verdeutlicht die Unterschiede zwischen gealterten und frischen Proben. Unter Alterungsprozess wird hier die Bildung von nicht extrahierbaren Rückständen verstanden, die im Verlaufe der Kontaktzeit zunehmen, wie auch Stoob *et al.* (2006) zeigten. Diese Prozesse finden demnach nicht nur im kompletten Boden/Wasser-System des Feldes statt, sondern auch bei Lagerung der Proben der einzelnen Bodenschichten. Ein direkter Vergleich zwischen den Gehalten der retrospektiven Studie und den frischen Proben aus 2017 ist somit nicht möglich.

Die hohen Gehalte von 4-OH-SDZ in den frischen Proben sind dagegen ein Hinweis darauf, dass SDZ schon vor der Ausbringung auf die landwirtschaftliche Nutzfläche einer Transformation unterlag. Dies ist wahrscheinlich, da die Transformation im Tiermetabolismus sowie die Transformation von SDZ zu 4-OH-SDZ in der Wirtschaftsdünger-Fermentation bekannt ist (García-Galán *et al.*, 2008; Mohring *et al.*, 2009).

Vergleicht man die Verhältnisse von SDZ zu 4-OH-SDZ in den Jahren 2001 bis 2017, variieren diese stark (Abb. 9.8). Im Jahr 2001 liegt das Verhältnis bei 2:1, in den Jahren 2005, 2009 und

2015 bei ungefähr 1:1 und im Jahr 2017 sogar bei 1:2. In den ältesten Proben überwiegt somit der Anteil an SDZ. Bei jüngeren Proben verändert sich das Verhältnis, so dass SDZ und sein Transformationsprodukt in gleichen Anteilen vorliegen. In den frischen Proben überwiegt der Gehalt von 4-OH-SDZ. In der Tiefenprofilanalyse zeigte 4-OH-SDZ das gleiche Verhalten wie die Muttersubstanz und konnte, analog zu SDZ, nicht im Unterboden nachgewiesen werden. Das Verschieben der Verhältnisse kann daher nicht auf eine Auswaschung des Transformationsproduktes zurückgeführt werden, sondern muss auf ein unterschiedliches Verhalten im Oberboden zurückgehen.

Ein unterschiedliches Verhalten im Oberboden könnte durch das Modell von Zarfl *et al.* (2009) für SDZ beschrieben werden. Sie teilen die Rückstände in Böden in drei Fraktionen ein: die leicht extrahierbare Fraktion (EAS), die schwer extrahierbare Fraktion (RES) und die nicht-extrahierbare Fraktion (NER). Ihr Modell besagt, dass nur in der EAS-Fraktion die Hydroxylierung und die Deacetylierung stattfinden können. Zusätzlich können nur die Muttersubstanz und 4-OH-SDZ in die NER-Fraktion übergehen. SDZ, 4-OH-SDZ und das acetylierte-SDZ können in die RES-Fraktion übergehen und aus dieser wieder freigesetzt werden. Die acetylierte Form kann aber nicht weiter in die NER-Fraktion übergehen. Weiterhin ermittelten Zarfl *et al.* (2009) für den Übergang von 4-OH-SDZ in die NER eine niedrigere Geschwindigkeitskonstante als für den Übergang von SDZ. Demnach wird SDZ schneller in der NER-Fraktion im Boden gespeichert als 4-OH-SDZ. Dies könnte die variierenden Verhältnisse erklären. Die kürzere Zeitspanne zwischen Probennahme und -aufarbeitung aus dem Jahr 2017 könnte verantwortlich für den größeren Gehalt an 4-OH-SDZ sein, weil schon mehr SDZ in die NER-Fraktion übergegangen ist. Eine Rücktransformation von 4-OH-SDZ in SDZ wird bei dem Modell von Zarfl *et al.* (2009) ausgeschlossen.

9.1.6 Methodenvergleich

Die Bestimmung der Sulfonamide in den Proben der BDF erfolgte sowohl mit der neu entwickelten LLE als auch mit der MWE. Der Vergleich von LLE und MWE zeigt, dass durchweg höhere Gehalte mit der MWE erzielt werden konnten (vgl. Abb. 9.9). Dies war aufgrund der harscheren Extraktionsbedingungen der MWE zu erwarten. Diese Ergebnisse bestätigen die Studien von Förster *et al.* (2009) und Raich-Montiu *et al.* (2010), dass die MWE eine effizientere Methode für die Extraktion von Sulfonamiden aus gealterten Böden darstellt. Mittels MWE konnte drei bis vier Mal so viel SDZ und SMZ als mit LLE extrahiert werden. Die Extraktion von SGU war mittels MWE sogar um den Faktor sechs erhöht. Das Verhalten der drei Sulfonamide über die Jahre hinweg ist für beide Extraktionsmethoden jedoch identisch. Für SGU und SDZ sind gleichbleibende Gehalte im Beobachtungszeitraum zu verzeichnen. Die Gehalte von SMZ unterliegen im Verlauf der 15 Jahre einer Abnahme.

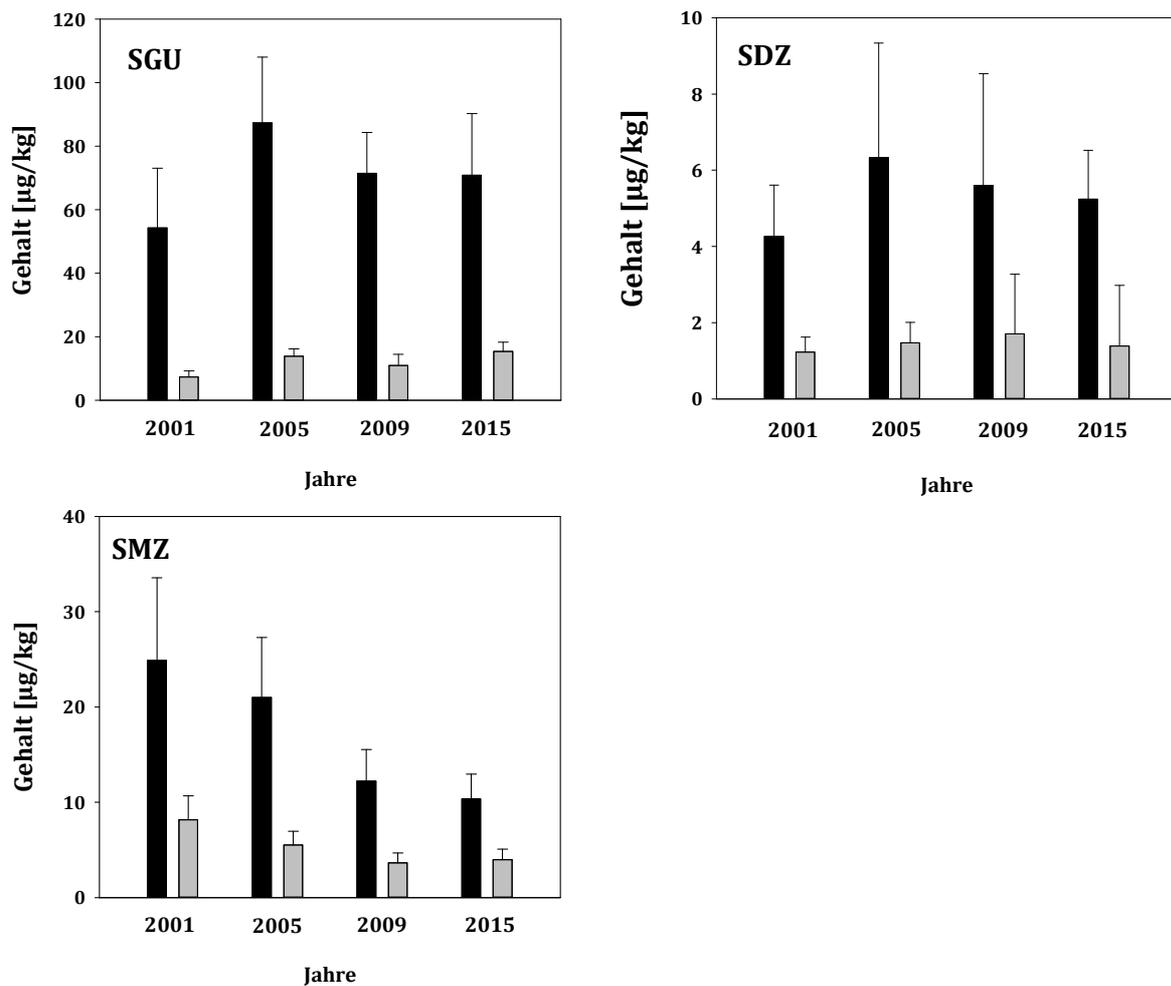


Abb. 9.9: Vergleich der mittels MWE (schwarz) und LLE (grau) ermittelten Gehalte im Oberboden für SGU, SDZ und SMZ für die Jahre 2001, 2005, 2009 und 2015, SDZ Gehalte der LLE Fraktion sind < BG (7d) aber > BG (10 min), die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich.

In Tab. 9.3 sind die SMZ-Gehalte für die Frühjahrsproben aus dem Jahr 2002 dargestellt, welche mit drei verschiedenen Methoden bestimmt wurden. Die Spalte LLE* zeigt die Gehalte, die mit der Methode nach Hamscher *et al.* (2005a) bestimmt wurden. Die Spalten LLE und MWE zeigen die Gehalte, die mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden ermittelt wurden. Auch bei diesem Vergleich wurde mittels MWE insgesamt eine höhere Menge an Analyt in den Proben nachgewiesen. Verglichen werden hier die SMZ-Gehalte, da Hamscher *et al.* (2005a) kein SDZ in den Proben nachweisen konnte. Mit der Methode konnten auch nur geringe Mengen SMZ in den Proben nachgewiesen werden. Dabei wurde in der Bodenprobe K3 mit einer Bodentiefe von 0-10 cm mit 2,4 µg/kg der höchste Gehalt bestimmt. Wobei anzumerken ist, dass die LLE*-Werte nahe der Bestimmungsgrenze liegen.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten LLE-Methode konnten höhere SMZ-Gehalte bestimmt werden. Interessant ist hierbei, dass mit den Methoden LLE und MWE ebenfalls der höchste

Gehalt an SMZ in der Bodenprobe K3 (Bodentiefe 0-10 cm) bestimmt wurde. Weiterhin ist wichtig zu bedenken, dass die Proben bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung 15 Jahre gelagert wurden. Eine Korrelation ist somit eindeutig vorhanden und verdeutlicht die Effizienz der hier entwickelten Methoden sowie die Persistenz der Analyten. Die Durchführung der LLE unterscheidet sich, wie in Kapitel 6.4.2 gezeigt, stark von der Durchführung der LLE* nach Hamscher *et al.* (2005a). Die Extraktionskraft der hier entwickelten LLE-Methode ist demnach höher. Auf die verschiedenen Fraktionen nach Zarfl *et al.* (2009) bezogen, könnte die kurze LLE* Extraktion die EAS darstellen. Die längere LLE dabei eine Mischung aus EAS und RES und die MWE die RES.

Zusätzlich wird deutlich, dass die einzelnen Kernflächen große Unterschiede aufweisen, obwohl diese den gleichen Witterungslagen ausgesetzt waren sowie die gleiche Aufgabe an Wirtschaftsdünger erfahren haben (vgl. Tab. 9.3). Dies bestätigt, dass Boden eine sehr komplexe und inhomogene Matrix ist, welche schon innerhalb eines Feldes zu unterschiedlichem Verhalten der aufgetragenen Antibiotika führen kann. Auch in Wirtschaftsdünger selbst kann schon eine inhomogene Verteilung der Sulfonamide vorliegen, zum Beispiel durch Sorption an organische Partikel.

Tab. 9.3: Vergleich der ermittelten SMZ-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] der Frühjahrproben aus dem Jahr 2002.

Bodentiefe [cm]	Teilfläche	Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		
		LLE *	LLE	MWE
0-10	K1	<1	4,4	15,2
0-10	K2	2,1	6,3	19,7
0-10	K3	2,4	11,3	34,3
0-10	K4	<1	3,4	10,4

10-20	K1	<1	4,9	12,9
10-20	K2	2,2	9,1	29,0
10-20	K3	1,7	8,5	25,0
10-20	K4	1,0	6,6	18,8

20-30	K1	<1	4,3	11,5
20-30	K2	2,1	9,3	28,2
20-30	K3	1,2	7,2	16,0
20-30	K4	1,0	7,2	19,4

30-40	K1	<1	2,1	5,7
30-40	K2	1,2	5,2	15,8
30-40	K3	<1	2,7	7,7
30-40	K4	<1	5,1	12,5

LLE*: Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Hamscher *et al.* (2005a), einzelne Gehalte als persönliche Mitteilung erhalten (Hamscher, 2018).

Abschließend ist hier zu verdeutlichen, dass sowohl mit den Ergebnissen der LLE, als auch mit den Ergebnissen der MWE, das Verhalten von SGU, SDZ und SMZ in den gealterten Proben der

BDF beschrieben werden konnte. Mittels MWE können dabei höhere Gehalte nachgewiesen werden. Diese spielen für die Betrachtung des Verhaltens aber eine geringere Rolle. Wichtig sind die Ergebnisse der MWE dennoch, um sich dem absoluten Gehalt der Sulfonamide im Boden anzunähern. Als definitiv absolute Gehalte kann man sie jedoch nicht bezeichnen, da auch mittels MWE die NER-Fraktion wahrscheinlich nicht oder nur unvollständig erfasst wird. Dies war daran erkennbar, dass sich auch die MWE-Gehalte in frischeren Proben von denen in gealterten Proben deutlich unterschieden. Die Extraktionseffizienz der hier entwickelten LLE ist aber mehr als ausreichend für aussagekräftige Ergebnisse über das Verhalten der Sulfonamide in gealterten Bodenproben. Zusätzlich ist mittels LLE nicht nur die Bestimmung von Sulfonamiden möglich, sondern auch die Bestimmung von Tetracyclinen. Dieses stellt den entscheidenden Vorteil der LLE dar (vgl. Kap. 6.4 und Kap. 6.6.).

9.2 Verhalten von Tetracyclinen

Die BDF wurde in den Studien von Hamscher *et al.* (2002) und Hamscher *et al.* (2005a) bereits auf die Tetracycline OTC, CTC und auf das TC selbst hin untersucht. OTC konnte weder im Boden noch in der, von 2000 bis 2002, verwendeten Schweinegülle detektiert werden. TC und CTC dagegen wurden in der Schweinegülle und in den Proben der BDF von 2000 bis 2003 nachgewiesen. Mit der hier entwickelten LLE wurden die Proben der BDF von 2001 bis 2017 auf die zuvor genannten drei Tetracycline, sowie zusätzlich auf das Doxy und das Transformationsprodukt von CTC, das IsoCTC, hin untersucht.

In den Proben konnte, wie in den Studien von Hamscher *et al.* (2002) und Hamscher *et al.* (2005a) TC nachgewiesen werden. CTC konnte aufgrund der höheren NWG mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, jedoch IsoCTC. Zusätzlich wurde ein weiteres Transformationsprodukt, das *Seco-cyclin* detektiert. In den nachfolgenden Kapiteln wird auf die Ergebnisse der Tetracyclinbestimmungen in der untersuchten BDF genauer eingegangen.

9.2.1 Retrospektive Untersuchung

Wie auch bei den Sulfonamiden erfolgte die retrospektive Untersuchung anhand der Proben aus den Jahren 2001, 2005, 2009 und 2015 und umfasst somit 14 Jahre. Insgesamt ist das Vorgehen der Auswertung der Tetracycline identisch mit denen der Sulfonamide. Die gemittelten Werte der Kernflächen K1-K4 werden verwendet, um ein Gesamtbild des Feldes widerzuspiegeln. Auch hier wird der Gehalt im Oberboden als Mittelwert aus den drei entnommen 10 cm Schichten angegeben. Alle angegebenen Tetracyclingehalte beschreiben die Summe des jeweiligen Tetracyclins und seines 4-Epimers.

In allen untersuchten Jahren konnte TC im Oberboden der BDF nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9.10 A). Die Gehalte sind mit einem Bereich von 50 µg/kg bis 230 µg/kg im Vergleich zu den

Gehalten der Sulfonamide deutlich höher. Für SDZ und SMZ wurden Gehalte $<10 \mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt. Die Einsatzmenge von TC ist demnach in dieser Gegend bzw. bei dem Landwirt, der die Gülle liefert, höher. Dies zeigen auch die Gehalte von TC in der Schweinegülle, die zur Bewirtschaftung in den Jahren 2000 bis 2002 verwendet wurde (Hamscher *et al.*, 2005a). Diese sind ungefähr 3-4 mal höher als die Gehalte der Sulfonamide. Höhere TC-Gehalte in Böden sind demnach realistisch.

Die Gehalte weisen ab dem Jahr 2005 auf einen leichten Anstieg hin. Daraus könnte geschlossen werden, dass für TC eine gesteigerte Anwendung erfolgt. Dies ist aufgrund der sinkenden Einsatzmengen aber eher unwahrscheinlich. Von 2011 bis 2017 sanken deutschlandweit die Abgabemengen von Tetracyclinen um 67 % (BVL, 2018a). Bereits bekannt ist, dass Tetracycline im Oberboden verbleiben (Hamscher *et al.*, 2005a), so dass eine Auswaschung wenig wahrscheinlich ist.

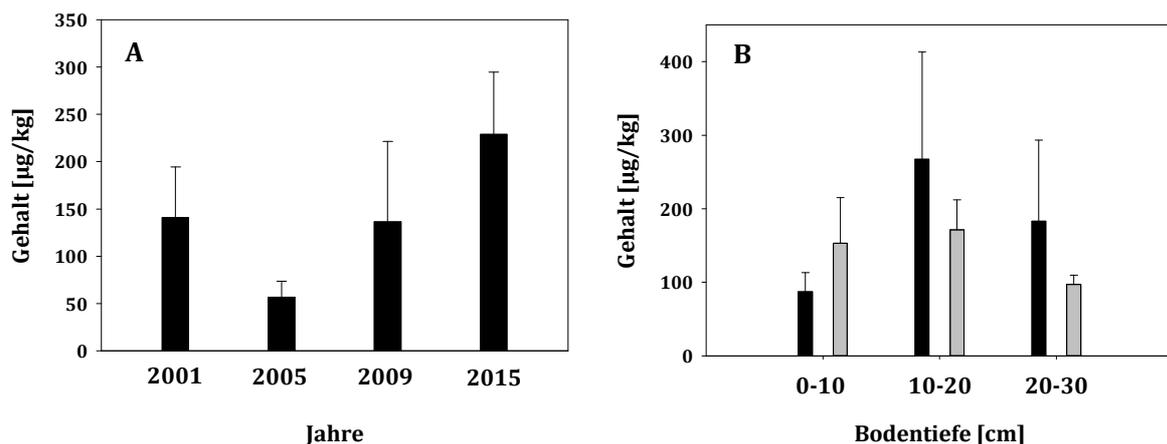


Abb. 9.10: (A) Mittelwerte der Tetracyclinegehalte im Oberboden in den Jahren 2001, 2005, 2009, 2015; Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Bodenschichten und Kernflächen dar; (B) Vergleich der Tetracyclinegehalte in den einzelnen Schichten im Oberboden im Jahr 2001 (grau) mit den Gehalten 2001* nach Hamscher *et al.* (2005a) (schwarz); die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der vier Kernflächen dar. Die y-Achsen sind unterschiedlich.

Figueroa *et al.* (2004) zeigten, dass der Sorptionsmechanismus von TC in Tonböden hauptsächlich auf Kationenaustausch-Reaktionen zurückzuführen ist. Je höher der pH-Wert des Bodens ist, umso niedriger ist demnach die Adsorption von TC an Bodenbestandteile und eine höhere Mobilität ist die Folge (Figueroa *et al.*, 2004). Der pH-Wert der BDF-Proben liegt in den verschiedenen Schichten in einem Bereich von 4,1-4,7. TC liegt bei diesen Werten zum Teil in kationischer Form vor (Tavares und McGuffin, 1994). Der pH-Wert der hier untersuchten Proben deutet daher auch auf eine geringe Mobilität von TC hin. Die zusätzlich leicht steigenden

Gehalte über die Jahre hinweg könnten auf die geringe Mobilität zurückzuführen sein. Figueroa-Diva *et al.* (2010) erklärten zusätzlich, dass die Substituenten der verschiedenen Tetracycline nur geringe Effekte auf eine Sorption in Böden haben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch andere Analyten der Antibiotikaklasse der Tetracycline ein ähnliches Verhalten im Boden aufweisen. Die pH-Wert-abhängige Mobilität stimmt gut mit den Ergebnissen von Pan und Chu (2017) überein. Die Autoren konnten feststellen, dass die untersuchten Antibiotika in Boden mit Bewässerung von saurem Regen eine geringe Mobilität aufwiesen. Teixidó *et al.* (2012) implizierten, dass der Einfluss des pH-Wertes auf die Sorptionseigenschaften der Tetracycline größer ist als Kationenaustauschreaktionen und der Tongehalt des Bodens. Da es sich bei dem Boden der BDF um einen Sandboden handelt und eine hohe Sorption der Tetracycline vorliegt, scheint der pH-Wert auch hier eine große Rolle zu spielen.

Für eine schwache Akkumulation von TC im Oberboden sprechen die Ergebnisse der Oberbodenproben aus dem Jahr 2001 im Vergleich zu den Ergebnissen von Hamscher *et al.* (2005a) (vgl. Abb. 9.10 B). Dabei handelt es sich um das gleiche Probenmaterial. Dieses wurde nach Probenahme im Jahr 2001 frostfrei bei unter 20 °C im Dunkeln gelagert, eine weitere Konservierung erfolgte nicht. Der Vergleich zeigt, dass die ermittelten Gehalte für beide Extraktionsvarianten in der gleichen Größenordnung liegen. Dabei wurden unterschiedliche Methoden zur Probenaufarbeitungen, sowie unterschiedliche Messsysteme verwendet. Zusätzlich liegen zwischen den Aufarbeitungen 16 Jahre. Damit wird die generelle Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode mit realen Proben bestätigt, vor allem auch im Hinblick auf die Inhomogenität der Matrix Boden.

In 16 Jahre gelagerten und somit gealterten Proben erfolgte demnach keine oder nur eine geringe Abnahme der TC-Konzentration. Dies weist auf eine sehr hohe Persistenz von TC im Oberboden hin. Da wie bereits beschrieben keine Konservierung der Proben erfolgte, könnte dieses Szenario das Verhalten von TC in den landwirtschaftlichen Nutzflächen in realistischer Form darstellen. Von einer dauerhaften Belastung der Böden mit TC ist daher auszugehen. Bemerkenswert ist, dass die meisten Tetracycline im Unterschied zu den vollsynthetischen Sulfonamiden natürliche Stoffe darstellen (vgl. Kap. 5.2 und Kap. 5.3). Dies zeigt, dass nicht nur vollsynthetische Substanzen, sondern auch Naturstoffe eine hohe Persistenz aufweisen können.

9.2.2 Tiefenprofilanalyse

Für die Tiefenprofilanalyse wurden die TC-Gehalte in den einzelnen Bodentiefen in den Proben des Jahres 2017 bis zu einer Tiefe von 60 cm bestimmt (vgl. Abb. 9.11). Dabei handelte es sich also um frisches Probenmaterial. Wie in Kap. 9.1.5 anhand der Ergebnisse für SDZ und 4-OH-SDZ gezeigt, unterliegen die Proben Alterungsprozessen. Auch für TC konnten im Vergleich zu den Ergebnissen der retrospektiven Studien in den Proben aus 2017 deutlich höhere Gehalte im

Oberboden ermittelt werden (vgl. Kap. 9.2.1). In der Bodentiefe 0-10 cm konnten sogar 1 mg/kg TC quantifiziert werden. Bei Betrachtung der TC-Gehalte in den darunter liegenden Schichten des Oberbodens fällt eine starke Abnahme der Gehalte auf. In den Proben der vorigen Jahre sind die Gehalte in den einzelnen Schichten des Oberbodens ähnlich (vgl. Abb. 9.10 B). Diese deutlichen Unterschiede weisen auf eine geringere Vermischung des Oberbodens nach Aufbringung des Wirtschaftsdüngers hin. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Proben kurz vor dem Pflügen des Feldes entnommen wurden, so dass die Verteilung von TC im Oberboden noch nicht abgeschlossen war. Abb. 9.11 könnte daher als Momentaufnahme angesehen werden, welche ein Worst-Case-Szenario nach Aufbringung des Wirtschaftsdüngers zeigt.

Für eine Einordnung der ermittelten TC-Gehalte können die Auflagen bei einer Neuzulassung von veterinärmedizinischen Produkten herangezogen werden. Im Rahmen des Zulassungsverfahrens müssen von dem Inverkehrbringer Schätzungen vorgenommen werden, welche Gehalte in der Umwelt zu erwarten sind unter der Annahme eines Worst-Case-Szenarios (vollständige Ausscheidung, kein Abbau). Entscheidend sind dabei sogenannte „Triggerwerte“. Für das Kompartiment Boden liegt dieser Wert bei 100 µg/kg, unabhängig von der jeweiligen Substanz (EMA, 2009). Bezogen auf den TC-Gehalt in der Bodentiefe 0-10 cm, wurde der Triggerwert um ein zehnfaches überschritten. Folglich müssten für TC weitere Umweltverträglichkeitsprüfungen durchgeführt werden, wenn es sich dabei um einen neuzuzulassenden Wirkstoff handeln würde. TC wurde vor dieser Neuregelung zugelassen, so dass keine Umweltverträglichkeitsprüfung durchgeführt wurde. Dies musste auch nachträglich nicht mehr geleistet werden (Winckler und Grafe, 2000; Winckler, 2004). Die sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen in den Proben 2017 könnten, wie bereits erwähnt, auf unzureichendes Pflügen zurückzuführen sein. Betrachtet man aber erneut die Ergebnisse der retrospektiven Studie (Abb. 9.10 A), so überschreiten auch die Gehalte in den zurückliegenden Jahren, bis auf das Jahr 2005, eindeutig den Triggerwert. Im Hinblick auf die hohe Stabilität und die mögliche schwache Akkumulation von TC können langfristige Auswirkungen auf Böden nicht ausgeschlossen werden. Darunter fällt zum Beispiel die Unterstützung der Bildung von Resistenzen oder der Einfluss auf die Bodenfauna (Jechalke *et al.*, 2014). Auch die Aufnahme in Pflanzen ist prinzipiell möglich (Kumar *et al.*, 2005).

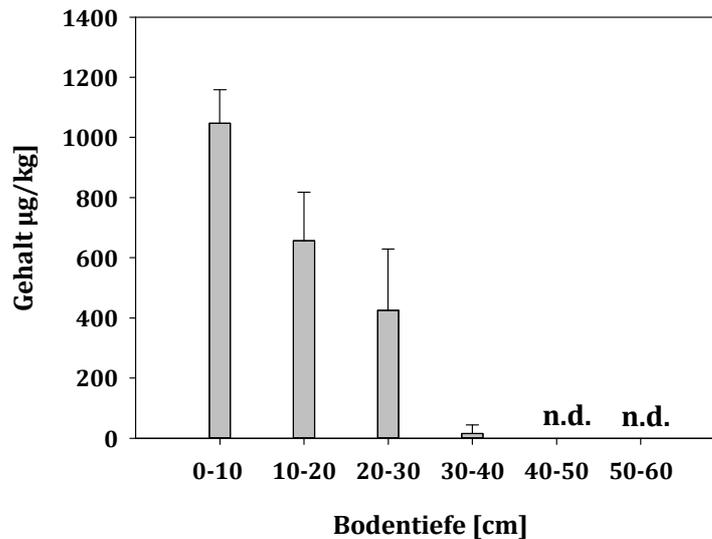


Abb. 9.11: TC-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in den Proben aus 2017 in den einzelnen Bodenschichten von 0-60 cm. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der vier Kernflächen da, n.d.: nicht detektiert.

TC verbleibt wie in Kap. 9.2.1 bereits erläutert im Oberboden. Die Grenze zum Unterboden liegt bei 30 cm. Ab dieser Tiefe nimmt der organische Anteil im Boden stark ab (vgl. Abb. 2.1). Wie zuvor dargestellt, ist die Mobilität von TC in den Proben der BDF vermindert. Neben den erwähnten Kationenaustausch-Reaktionen sind Tetracycline starke Komplexbildner. Diese Komplexbildung in Böden stellt, neben den Kationenaustausch-Reaktionen, ebenfalls einen Sorptionsmechanismus von Tetracyclinen dar (Figueroa-Diva *et al.*, 2010). Die verschiedenen Einflüsse auf die Sorptionseigenschaften von Tetracyclinen werden in der Literatur umfassend diskutiert. Dazu zählen divalente Kationen, Metalloxide, Huminsäuren sowie Huminstoffe, der Tonanteil, aber auch der Anteil an organischem Material sowie der pH-Wert (Jones *et al.*, 2005; Pils und Laird, 2007; Sassman und Lee, 2005; Tanis *et al.*, 2008; Teixidó *et al.*, 2012; ter Laak *et al.*, 2006). Im Oberboden sind im Vergleich zum Unterboden deutlich stärkere Einflüsse und vielfältigen Reaktionspartner vorhanden. Tetracycline überschreiten daher in dem Boden der BDF die Grenze von 30 cm nicht, das zeigten auch schon Hamscher *et al.* (2005a). In den Proben aus dem Jahr 2017 wurde dennoch TC in der Bodentiefe von 30 cm bestimmt (Abb. 9.11). Das bedeutet jedoch nicht, dass TC in diese Bodentiefe verlagert worden ist. Die Probennahme stellt einen komplexen Vorgang dar. Das Abtragen der einzelnen 10 cm-Schichten kann aufgrund von natürlichen Gegebenheiten und vor allem auch durch das Pflügen nicht immer gewährleisten, dass eine scharfe Trennung zwischen Ober- und Unterboden stattfindet. Eine leichte Vermischung von Bodenschichten während der Probennahme ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund für die Detektion von TC im Unterboden. Erkennbar ist dies auch an dem sehr geringen Gehalt. Bei einer Auswaschung wären höhere Gehalte zu erwarten (vgl. Abb. 9.4).

9.2.3 Vergleich der Rückstandsgehalte im Frühjahr und Herbst

Für Sulfonamide konnte keine Abhängigkeit der Gehalte von der Jahreszeit festgestellt werden. In Abb. 9.12 sind die TC-Gehalte Frühjahr-Herbst-Frühjahr von 2008 bis 2009 im Oberboden dargestellt. Insgesamt spiegelt die Darstellung die Ergebnisse der retrospektiven Untersuchung (Kap 9.2.1.), für einen kleinen Ausschnitt, wider. Auch hier wird eine tendenzielle Zunahme der Gehalte beobachtet. Die TC-Gehalte scheinen demnach sehr stabil zu sein und keiner Beeinflussung durch Temperatur und Niederschlagsmenge zu unterliegen. Diese Ergebnisse deuten folglich auch auf eine schwache Akkumulation und eine Persistenz von TC in Boden hin. Dies widerspricht den Ergebnissen der Studie von Awad *et al.* (2014). Sie konnten zum Teil höhere Gehalte im Herbst als im Frühjahr nachweisen. Anzumerken ist hier jedoch, dass es sich in der Studie um Bodenproben aus der Nähe einer Schweinegülle-Kompostieranlage handelte und nicht um eine landwirtschaftliche Nutzfläche. Dort ist ein kontinuierlicher Eintrag durch die dauerhafte Lagerung von Gülle möglich. Auf die BDF wird zwar regelmäßig Wirtschaftsdünger aufgetragen; es liegt jedoch kein dauerhafter Kontakt mit frischem Material vor. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit der TC-Gehalte im Boden der BDF liegt somit nicht vor. Wie für die Sulfonamide (vgl. Kap. 9.1.4) zeigen die Ergebnisse der retrospektiven Studie und der Vergleich der Jahreszeiten ähnliche Bilder. Dies ist insofern bemerkenswert, da sogar schon innerhalb eines Jahres eine Zunahme von TC beobachtet wird, welches durch die retrospektive Studie über 14 Jahre bestätigt wurde (vgl. Kap. 9.2.1).

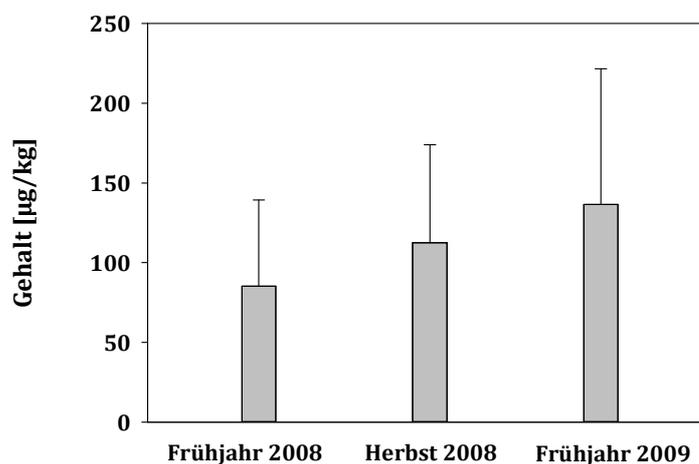


Abb. 9.12: TC-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in Abhängigkeit der Jahreszeiten (Frühjahr 2008, Herbst 2008, Frühjahr 2009) im Oberboden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Schichten des Oberbodens und der Kernflächen dar.

9.2.4 Bestimmung von Isochlortetracyclin

In die neue entwickelte LLE mit anschließender UHPLC/QTRAP-Methode, wurden fünf Tetracycline integriert. Die Ergebnisse für TC wurden in den vorigen Kapiteln erläutert. OTC und

Doxy wurden in keiner der Proben identifiziert. CTC wurde indirekt als IsoCTC bestimmt. Als Antibiotikum in der Tiermedizin wird nur CTC eingesetzt, nicht aber IsoCTC. Dies wird anhand der Veröffentlichungen der Abgabemengen an antimikrobieller Grundsubstanz des BVL deutlich (Wallmann, 2014; Wallmann, 2015; Wallmann, 2016). Folglich wurde durch die Detektion von IsoCTC der Einsatz von CTC nachgewiesen. IsoCTC ist zudem kein zugelassener Wirkstoff (PharmNet.Bund, 2018).

IsoCTC stellt das Isomerisierungsprodukt von CTC dar (Abb. 9.13). Die Isomerisierung ist eine irreversible Reaktion und findet ab einem pH-Wert > 7 statt. Auch OTC und TC können einer Isomerisierungsreaktion unterliegen. Diese finden aber erst bei höheren pH-Werten statt. CTC ist demnach empfindlicher für diese Reaktion (Dürckheimer, 1975; Halling-Sørensen *et al.*, 2002; Waller *et al.*, 1952). Die untersuchten Proben der BDF weisen einen pH-Wert von 4,1-4,7 auf. Die Bedingungen für eine Isomerisierung im Boden sind daher eher ungünstig. Günstigere Bedingungen liegen jedoch in Wirtschaftsdünger vor. Diese haben meist einen neutralen bis schwach basischen pH-Wert (Dolliver *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009). Eine mögliche Bildung von IsoCTC aus CTC zeigten Spielmeyer *et al.* (2017b) während der Fermentation von Wirtschaftsdünger. Der pH-Wert des verwendeten Fermenterinhalt lag dort ebenfalls im basischen Bereich. Die Autoren zeigten, dass IsoCTC auch in autoklavierter Wirtschaftsdüngermatrix während der Fermentation entsteht. Die Wahrscheinlichkeit einer biotischen Bildung von IsoCTC wird deshalb als gering eingeschätzt. Weiterhin zeigten die Autoren, dass auch für IsoCTC, wie auch für CTC, über die Dauer der Studie hinweg reduzierte Wiederfindungen bestimmt werden konnten, die nicht auf eine Bildung von Transformationsprodukten zurückzuführen waren. IsoCTC scheint demnach ein ähnlich starkes Sorptionsverhalten wie Tetracycline aufzuweisen. Die Isomerisierung von CTC in der Matrix Wirtschaftsdünger ist demnach möglich. Die Bestimmung von IsoCTC wurde aufgrund dessen in die Methode integriert.

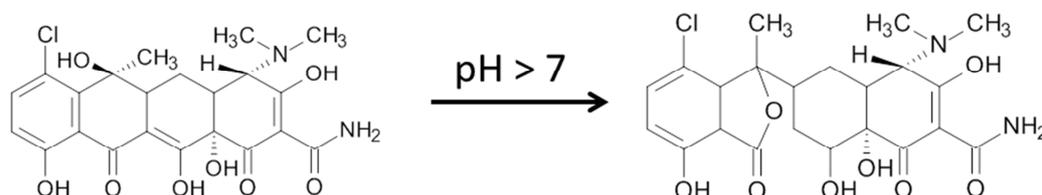


Abb. 9.13: Isomerisierung von CTC (links) in IsoCTC (rechts).

In den früheren Untersuchung von Hamscher *et al.* (2002) und Hamscher *et al.* (2005a) konnten CTC-Gehalte in den Proben der BDF zwischen 1 und 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ausnahme Frühjahr 2003 39 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bestimmt werden. Auch in der verwendeten Schweinegülle der Jahre 2000 und 2001

war CTC vorhanden, so dass definitiv in diesen Jahren CTC auf den Boden ausgebracht wurde. Im Jahr 2002 konnte kein CTC in der Schweinegülle nachgewiesen werden. Eine Untersuchung von IsoCTC nahmen die Autoren jedoch nicht vor, so dass hierfür keine Vergleichsdaten vorliegen. In dieser Arbeit konnte, wie zuvor schon beschrieben, IsoCTC, jedoch kein CTC, im Boden quantifiziert werden. Lediglich in den frischen Proben aus dem Jahr 2017 konnten mittels der QTOF-Methode Spuren von CTC nachgewiesen werden, die aber unterhalb der BG lagen. Anders als für TC, wurde IsoCTC nicht durchgängig im Verlauf der Jahre im Oberboden detektiert (vgl. Tab. 9.4). Die dargestellten Gehalte beziehen sich auf die Summe aus IsoCTC und seinem 4-Epimer. Dabei wurden in den gealterten Proben der Jahre 2001, 2009 und 2015 im Oberboden IsoCTC-Gehalte von 4,2-21,8 µg/kg ermittelt. In den Proben des Jahres 2005 konnte keine IsoCTC nachgewiesen werden. In den frischen Proben des Jahres 2017 wurden im Oberboden Gehalte im Bereich von 7,6-38,8 µg/kg bestimmt. Wie schon im Kap. 9.1.5 erläutert, können Rückstandsgehalte in frischen Proben aufgrund der Alterungsprozesse nicht direkt mit gealterten Proben verglichen werden. In der Bodenschicht 30-40 cm aus dem Jahr 2017 konnte ebenfalls IsoCTC bestimmt werden. Dies ist ebenso wie in Kap. 9.2.2 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Vermischung der Bodenschichten bei der Probennahme zurückzuführen.

Tab. 9.4: Ermittelte IsoCTC-Gehalte [µg/kg] in den einzelnen Kernflächen im Oberboden der BDF in den Jahren 2001, 2009, 2015 und 2017 und im Unterboden im Jahr 2017.

IsoCTC-Gehalte [µg/kg]				
2001	K1	K2	K3	K4
0-10 cm	14,7	9,3	21,8	6,8
10-20 cm	13,0	8,1	9,0	6,0
20-30 cm	7,7	4,7	6,5	6,4
2009	K1	K2	K3	K4
0-10 cm	-	-	-	-
10-20 cm	-	6,04	-	4,2
20-30 cm	<BG	-	-	-
2015	K1	K2	K3	K4
0-10 cm	-	-	-	-
10-20 cm	-	7,2	7,3	-
20-30 cm	-	-	-	-
2017	K1	K2	K3	K4
0-10 cm	36,9	38,8	27,9	38,6
10-20 cm	24,8	7,6	-	9,7
20-30 cm	11,7	8,6	-	-
30-40 cm	6,3	-	-	-

(-): nicht detektiert

Der Nachweis von IsoCTC in den Proben aus 2001 korreliert also gut mit den Ergebnissen von Hamscher *et al.* (2002), die CTC-Gehalte in diesem Jahr bestimmen konnten. Denn die Größenordnung der IsoCTC-Gehalte stimmt gut mit den damaligen CTC-Gehalten überein. Nach den Veröffentlichungen des BVL über die Abgabemengen der antimikrobiellen Grundsubstanz reduzierte sich die CTC-Abgabe von 2013 bis 2015 von 110 t auf 51 t (Wallmann, 2014; Wallmann, 2015; Wallmann, 2016). Da nur vereinzelt Gehalte detektiert wurden, kann das Verhalten von CTC bzw. IsoCTC über die Jahre nicht nachverfolgt werden. Die Tatsache, dass in den untersuchten Probenjahren 2002, 2009, 2015 nur vereinzelt IsoCTC bestimmt werden konnten, weist gegebenenfalls auf einen geringen oder gar keinen CTC-Einsatz in diesen Jahren hin. Der kontinuierliche Nachweis in den Proben seit 2001 spricht dann für höhere Gehalte in der damaligen verwendeten Schweinegülle und somit einer höheren Einsatzmenge. Die nicht quantifizierbare Menge von CTC in den frischen Proben könnte auf einen geringen frischen Eintrag von CTC deuten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, zu welchem Zeitpunkt die Isomerisierung von CTC stattfindet. Der Nachweis von IsoCTC in den frischen Proben deutet entweder auf eine Bildung in der Schweinegülle oder auf eine sehr schnelle Bildung im Boden hin.

Um eine mögliche Isomerisierung während der Probenaufarbeitung zu verhindern, erfolgte die Extraktion mit Citratpuffer mit einem pH-Wert 4,7 (vgl. Kap. 13.6.3). Die Validierung der Methode ergab für CTC eine Wiederfindung von 16 % und für IsoCTC von 200 % (Kap. 7.1). Diese großen Unterschiede sind zum Teil auf die bessere Ionisierung von IsoCTC mittels ESI zurückzuführen. Wie in Kap. 6.2.2 beschrieben, wurden für die Messung von CTC die Geräteparameter optimiert und mögliche Probleme der geringen Ionisierung untersucht. Jedoch konnte keine deutliche Steigerung der Ionisation erzielt werden. Zum Überprüfen, ob IsoCTC während der Lagerung von mit CTC dotierten Proben stattfindet, wurde Kontrollboden mit CTC dotiert und für sieben Tage bei Raumtemperatur gelagert. Spuren von IsoCTC konnten in diesen Proben nachgewiesen werden. Da aufgrund des verwendeten Puffers eine Isomerisierung während der Probenaufarbeitung ausgeschlossen wurde, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass nur eine geringfügige Isomerisierung während der Lagerung der dotierten Proben stattfinden kann. Die Bildung von IsoCTC in der Bodenmatrix kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Nach den Ergebnissen von Fokuhl (2018) findet die Isomerisierung auch bei pH-Werten < 7 statt, aber deutlich langsamer. Die Reaktion scheint auch durch andere Faktoren als den pH-Wert initiiert zu werden, da nur in den frischen Proben Spuren von CTC mittels QTOF zu finden waren. Diese Faktoren konnten in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter untersucht werden.

Dass in den gealterten Proben nur IsoCTC nachgewiesen wurde, könnte also daraus resultieren, dass CTC im Boden über die Jahre hinweg isomerisiert. Aufgrund der hohen Gehalte in den

frischen Proben spielt die Bildung von IsoCTC im Wirtschaftsdünger die größere Rolle. In beiden Kompartimenten scheint aber eine Bildung möglich zu sein.

Auch wenn IsoCTC eine hundertfach schwächere antimikrobielle Aktivität als CTC aufweist (Halling-Sørensen *et al.*, 2002), werden durch die alleinige Bestimmung von CTC im Boden die Gehalte dieser Verbindung unterschätzt. Ob IsoCTC trotz seiner sehr schwachen mikrobiellen Aktivität noch einen Einfluss auf das Resistenzgeschehen haben kann, ist noch nicht untersucht worden. Veröffentlichte Gehalte sollten demnach immer die Summe beider Substanzen darstellen, da die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass CTC eine geringere Stabilität aufweist als andere Tetracycline. Da die Ionisierung sowie die NWG von IsoCTC generell besser sind als die für CTC, sollte in Betracht gezogen werden, eine gewollte Isomerisierung in Bodenproben vor der Probenaufarbeitung zu induzieren, um eine möglichst vollständige Bestimmung von CTC zu erhalten. Grote *et al.* (2007) gaben in ihrer Studie an, dass mit einem ammoniakalischen Puffer als Extraktionsmittel CTC in Boden vollständig isomerisiert wird. Dies müsste jedoch weiter geprüft werden, da die Autoren keine weiteren Angaben oder Studien diesbezüglich veröffentlichten.

9.2.5 Weitere Transformationsprodukte

Das vorige Kapitel zeigte, dass CTC empfindlich für Transformationsreaktionen in Umweltproben ist. Da nicht in allen Jahren IsoCTC und damit CTC nachgewiesen wurde, weist dies möglicherweise auf weitere Eliminierungsreaktionen im Boden hin. Spielmeyer *et al.* (2017b) nannten als wichtige Eliminierungsreaktion von CTC und IsoCTC die Sorption. Diese spielt allgemein für Tetracycline eine große Rolle (vgl. Kap. 9.2.2). Zusätzlich sollte eine weitere Transformation von CTC und/oder IsoCTC, aber auch TC, in Betracht gezogen werden.

Transformationsreaktionen von Tetracyclinen in wässrigen Lösungen sind bereits bekannt. Dazu zählt der Photoabbau durch UV-Strahlung, aber auch ein Abbau durch Photokatalyse (Maroga Mboula *et al.*, 2012; Oka *et al.*, 1989). Die Chlorierung von Trinkwasser kann ebenfalls zu einer Bildung von Transformationsprodukten führen (Wan *et al.*, 2013). Halling-Sørensen *et al.* (2002) demonstrierten Abbauprodukte für einzelne Tetracycline, ebenfalls in wässriger Lösung, unter natürlichen Bedingungen.

Thiele-Bruhn und Peters (2007) zeigten, dass auch in Schweinegülle und Bodenoberflächen eine Photolyse von Tetracyclinen möglich ist. Eine Untersuchung von Abbauprodukten wurde jedoch nicht vorgenommen. Hamscher *et al.* (2002) begründeten die niedrigeren Gehalte von TC in der Bodenoberfläche (0-10 cm), im Vergleich zu den übrigen Schichten im Oberboden, zumindest teilweise mit einem Photoabbau in den ersten Millimetern der Bodenschicht (siehe auch Balmer *et al.* (2000)). Die Ergebnisse für TC (Abb. 9.11) in frischen Proben zeigen, dass der Einfluss des Photoabbaus in den Proben der BDF als gering einzuschätzen ist. Weiterhin zeigten Andreozzi *et*

al. (2003), dass der Photoabbau durch die Anwesenheit von Huminsäuren sowohl im positiven als auch negativen Sinne beeinflusst werden kann. Für Diclofenac und Carbamazepin wirkte Huminsäure als Schutz vor einem Photoabbau, für SMX dagegen aber als Sensibilisator.

Neben der Photolyse und anderen physikalischen Prozessen sind enzymatische Transformationen von Tetracyclinen bekannt. Im Hinblick auf eine Reduzierung der antimikrobiellen Aktivität in der Abwasserbehandlung konnten Llorca *et al.* (2015) Transformationsprodukte von TC mit Enzymen generieren. Die Möglichkeit der Biotransformation von Tetracyclinen wurde von Shang *et al.* (2016) bestätigt. Die Autoren führten mit dem Pilz *Paecilomyces sp.* eine Biotransformation mit Tetracyclinen durch. Diese resultierten am Ende in zwei Gruppen an Transformationsprodukten, zum einen die *Seco*-cycline, gebildet aus TC, CTC und Minocyclin, und zum anderen die *Hemi*-cycline aus OTC und Doxy (vgl. Abb. 9.14).

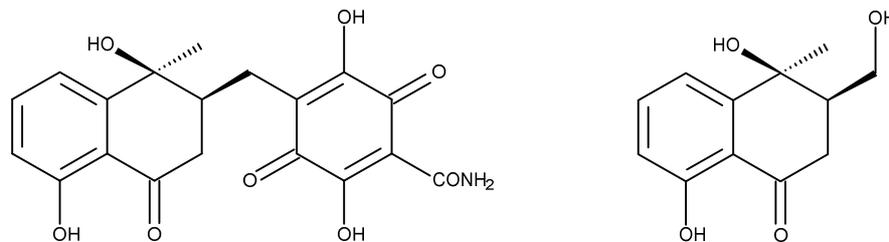


Abb. 9.14: Strukturformeln *Seco*-cyclin (links) und *Hemi*-cyclin (rechts) nach Shang *et al.* (2016).

In der Arbeit von Fokuhl (2018) konnte die Struktur des *Seco*-cyclins bereits isoliert und beschrieben werden. Aufgrund dessen wurden frische BDF-Bodenproben aus den Jahren 2016 bis 2018 auf die Anwesenheit dieser Verbindung untersucht. Dazu wurden die Bodenproben zweimal wässrig aufgeschlossen und mittels SPE gereinigt (vgl. Kap. 13.6.11 und Kap. 13.6.3). Die anschließende Messung der Extrakte erfolgte mittels QTOF (vgl. Kap. 13.5.4). Die Masse [M-H]⁻ von *Seco*-cyclin mittels Fullscan, sowie drei spezifische Fragmente mittels Produktionenscan, konnten in den Extrakten nachgewiesen werden. Die Abweichungen liegen unter 5 ppm, welche allgemein als Identifizierungsgrenze anerkannt wird (ACS-Publications, 2018). *Seco*-cyclin wurde somit eindeutig in den BDF-Bodenproben identifiziert (vgl. Tab. 9.5). Die Messung der Extrakte erfolgte dabei mit einem Puffer als Eluent. Die hier validierte UHPLC-QTOF-Methode beinhaltet keinen Puffer, so dass das *Seco*-cyclin in diesen Messungen nicht erfasst wurde. Die Identifizierung von *Seco*-cyclin ist im Vergleich zu den Ergebnissen von Shang *et al.* (2016) plausibel, da dieses sich aus TC oder CTC bilden kann. TC wurde, wie in den vorigen Kapiteln dargelegt, in hohen Mengen nachgewiesen. Insgesamt konnten jedoch nur Spuren von *Seco*-cyclin detektiert werden. Dies könnte auf eine weitere Transformation oder auf eine nur geringe Bildung von *Seco*-cyclin deuten. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden,

dass die Bildung von *Seco*-cyclin schon im Wirtschaftsdünger stattfindet und nicht erst im Boden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Tetracycline in Böden sehr stabil sind. Dass nur in Spuren nachweisbare *Seco*-cyclin legt nahe, dass die Wahrscheinlichkeit der Bildung von weiteren Transformationsprodukten im Boden sehr gering ist.

Tab. 9.5: Theoretische und experimentell bestimmte Massen von *Seco*-cyclin und drei spezifischen Fragmenten.

	[M-H] ⁻ (m/z)		Abweichung [ppm]
	theoretisch	experimentell	
C₁₉H₁₆NO₈ (<i>Seco</i>-cyclin)	386,08814	386,08966	3,9
C₁₉H₁₃O₈	369,06159	369,06323	4,4
C₈H₃O₅	178,99860	178,99816	-2,4
C₇H₃O₄	151,00302	151,00368	-4,4

9.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der BDF-Analyse

Die Untersuchung von landwirtschaftlich genutzten Böden liefert viele Informationen über die Anwesenheit von Antibiotika in der Umwelt. Ein Eintrag von Antibiotika in Böden erfolgte aber meist schon lange bevor das Bewusstsein über die Verbreitung der Antibiotika in der Umwelt aufkam und entsprechende Analysen durchgeführt wurden. Nur langfristige Studien von praxisnah bewirtschafteten Ackerflächen können daher umfassende Informationen über Veränderungen liefern und das Verhalten der Wirkstoffe über die Jahre hinweg widerspiegeln. Da die Analytik in jüngster Zeit immer sensitiver geworden ist, bietet ein sogenanntes Bodenarchiv zusätzlich den Vorteil, auch erst später in den Fokus gerückte Substanzen, wie Transformationsprodukte, in gealterten Proben nachzuweisen. So kann auch für weit zurückliegende Jahre ein Gesamtbild der Bodenbelastung geschaffen werden.

Bodenproben der in dieser Arbeit untersuchten BDF lagen von den Jahren 2001 bis 2017 vor, so dass die Möglichkeit gegeben war, das Verhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden retrospektiv zu untersuchen. In den Proben konnten die Sulfonamide SGU, SDZ und SMZ sowie TC nachgewiesen werden. Die Sulfonamid-Gehalte im Oberboden liegen im Bereich von 0,5-50 µg/kg-Bereich. Die Gehalte von TC sind im Vergleich dazu deutlich höher und liegen zwischen 50 µg/kg bis 250 µg/kg im Oberboden. In den frischen Proben aus dem Jahr 2017 konnten generell für alle Substanzen höhere Gehalte ermittelt werden. Für TC konnte den ersten 10 cm des Oberbodens ein Gehalt von bis zu 1 mg/kg bestimmt werden. Da die Bodenproben bei der Lagerung Alterungsprozessen ausgesetzt sind, waren diese höheren Gehalte in den frischen Proben zu erwarten. Die Gehalte von TC im Oberboden überschreiten dabei den Triggerwert für eine Umweltverträglichkeitsprüfung von 100 µg/kg um ein 10-faches. Aber nicht nur in den

frischen Proben, bei denen unter Umständen ein unzureichendes Einpflügen stattfand, sondern auch in gealterten Oberbodenproben überschreitet der TC-Gehalt diesen Triggerwert sehr oft. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Gehalte konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Das Verhalten der einzelnen Analyten über die Jahre hinweg war unterschiedlich. SDZ zeigte einen nahezu gleichbleibenden Gehalt (1,2-1,7 µg/kg) über 16 Jahre, wohingegen SMZ einer tendenziellen Abnahme (8,1-3,6 µg/kg) unterlag. Im Gegensatz dazu konnte für den TC-Gehalt eine leichte Zunahme über die Jahre hinweg festgestellt werden. Die TC-Gehalte im Oberboden im Jahr 2001 wurden mit den Werten der damaligen Bestimmung verglichen und zeigten, dass nach 16 Jahren Lagerung die Größenordnung der Gehalte ähnlich war. Für SGU konnte keine genaue Aussage über das Verhalten getroffen werden, da offensichtlich ein nicht erklärbarer diffuser Eintrag erfolgt, welcher sich in dem Verhalten über die Jahre hinweg widerspiegelt. Die SGU-Gehalte schwankten im Untersuchungszeitraum deutlich, so dass sich im Gegensatz zu den anderen Analyten kein klares Bild ergab. In früheren Untersuchungen wurde SGU nicht mituntersucht, so dass keine Vergleichsdaten vorliegen. Interessanterweise wurden im Vergleich zu den über den Wirtschaftsdünger eingetragenen Sulfonamiden, SDZ und SMZ, höhere SGU-Gehalte bis hin zu 50 µg/kg bestimmt. Durch die Untersuchungen konnte somit vor allem eine hohe Persistenz von Tetracyclin, aber auch für Sulfonamide in Boden nachgewiesen werden.

Neben dem unterschiedlichen Verhalten über die Jahre hinweg, zeigten die Analyten auch unterschiedliche Verhaltensweisen im Tiefenprofil. SDZ wurde nur im Oberboden nachgewiesen. Eine Auswaschung von SDZ in den Unterboden und in das Grundwasser ist demnach sehr unwahrscheinlich. Das gleiche Verhalten im Boden zeigte TC. Dieses konnte ebenfalls nur im Oberboden nachgewiesen werden, so dass eine Verlagerung in das Grundwasser unwahrscheinlich ist. SMZ und SGU dagegen zeigten einen Übergang in die tieferen Bodenschichten. Eine anschließende Auswaschung ist damit sehr wahrscheinlich. Pauschale Aussagen über das Verhalten ganzer Antibiotikaklassen können allerdings nicht getroffen werden. Dazu unterscheidet sich das Verhalten der hier bestimmten Sulfonamide SGU, SDZ und SMZ zu sehr voneinander. Daher muss jeder Wirkstoff separat untersucht und bewertet werden.

Die Bestimmung der Sulfonamide erfolgte zusätzlich noch mit einer zweiten Extraktionsmethode. Die MWE wird als härtere Methode angesehen, da sie unter Druck und mit höherer Temperatur arbeitet. Diese Bedingungen sind für Sulfonamide von Vorteil, da sie im Boden unter anderem sequestriert werden. Mit MWE wurden wie erwartet höhere Mengen an Sulfonamiden (SGU bis zu 87 µg/kg, SDZ bis zu 6 µg/kg, SMZ bis zu 25 µg/kg) in den Proben bestimmt. In den frischen Proben aus dem Jahr 2017 konnte im Oberboden ein SGU-Gehalt von 158 µg/kg, ein SDZ-Gehalt von 9 µg/kg und ein SMZ-Gehalt von 15 µg/kg nachgewiesen werden.

Eine gute Korrelation zwischen den Gehalten der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der MWE war gegeben. Mittels MWE konnten demnach fester gebundene Rückstände aus der Bodenmatrix extrahiert werden.

Transformationsprodukte wurden ebenfalls identifiziert. Dazu zählen hydroxyliertes SDZ (4-OH-SDZ) und IsoCTC, das Isomerisierungsprodukt von CTC. Auf die acetylierten Produkte von SDZ und SMZ wurden die Bodenproben ebenfalls untersucht. Diese konnten jedoch nicht nachgewiesen werden, was die Vermutung bestätigt, dass diese Produkte im Boden rasch wieder deacetyliert werden können.

Das Umweltverhalten der Transformationsprodukte war ähnlich zu dem ihrer Muttersubstanzen. 4-OH-SDZ sowie IsoCTC wurden nur im Oberboden nachgewiesen, so dass auch für diese Produkte ein geringes Auswaschungsrisiko besteht. 4-OH-SDZ wurde durchgängig im Oberboden nachgewiesen (bis zu 3 µg/kg in der retrospektiven Untersuchung), wobei IsoCTC (bis zu 22 µg/kg in der retrospektiven Untersuchung) nur vereinzelt in den Jahren und Bodenschichten des Oberbodens quantifiziert wurde. In frischen Proben konnten bis zu 9 µg/kg 4-OH-SDZ bestimmt werden. Auch wenn 4-OH-SDZ nur halbquantitativ bestimmt werden konnte, konnte über die Jahre hinweg ein sich veränderndes Verhältnis zwischen Muttersubstanz und Transformationsprodukt dargestellt werden. Dies liefert möglicherweise einen ersten Hinweis darauf, dass beide Substanzen im Boden unterschiedlich schnellen Sorptions-/Sequestrierungsprozessen unterliegen.

Die Bedingungen für die Bildung von IsoCTC sprechen dafür, dass die Verbindung vor allem im Wirtschaftsdünger und nur in einem sehr geringen Ausmaß im Boden entsteht. Die Tatsache, dass nur IsoCTC in den Proben bestimmt werden konnte aber nicht CTC, zeigt, dass eine alleinige Bestimmung von CTC im Boden nicht ausreicht, da sie zu geringeren Befunden führen kann. Bis zu 39 µg/kg IsoCTC wurde in einzelnen Bodenschichten der frischen Proben aus dem Jahr 2017 bestimmt. Die Bestimmung von IsoCTC ist für das Gesamtbild der CTC-Belastung des Bodens wichtig, auch wenn IsoCTC eine geringere antibiotische Wirksamkeit aufweist. Ein weiteres Transformationsprodukt von TC oder CTC das *Seco-cyclin* wurde identifiziert. Für eine sichere Quantifizierung waren die Konzentrationen im Boden jedoch zu gering.

Abschließend sind in Tab. 9.6 die Nachweise der Analyten für alle untersuchten Jahre zusammengefasst. Dabei wird zwischen Ober- und Unterboden differenziert. Deutlich zu erkennen ist das ähnliche Verhalten von SDZ und 4-OH-SDZ sowie zwischen TC und IsoCTC aufgrund der verwendeten Farbmuster. Auch die deutlich höheren Gehalte an TC im Vergleich zu den restlichen Analyten sind auffällig. Weiterhin ist in der gewählten Darstellungsart auch das ähnliche Verhalten von SGU und SMZ gut zu erkennen.

Tab. 9.6: Nachweis der einzelnen Analyten (SGU, SDZ, 4-OH-SDZ, SMZ, TC und IsoCTC) in den untersuchten Jahren (2001, 2002, 2005, 2008 Frühjahr, 2009 Herbst, 2015, 2017) im Ober- und Unterboden.

Jahre	Bodentiefe	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
2001	Oberboden	gelb	gelb	gelb	gelb	rot	gelb
	Unterboden	grün	grau	grau	grün	grau	grau
2002	Oberboden	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	grün
	Unterboden	gelb	gelb	grün	gelb	grün	grau
2005	Oberboden	gelb	gelb	gelb	gelb	rot	grau
	Unterboden	gelb	grau	grau	gelb	grau	grau
2008 (Frühjahr)	Oberboden	gelb	gelb	gelb	gelb	rot	gelb
	Unterboden	gelb	grau	grau	gelb	grau	grau
2008 (Herbst)	Oberboden	gelb	gelb	gelb	gelb	rot	gelb
	Unterboden	gelb	grau	grau	gelb	grau	grau
2009	Oberboden	gelb	grün	gelb	gelb	rot	grün
	Unterboden	grau	grau	grau	gelb	grau	grau
2015	Oberboden	gelb	grün	gelb	gelb	rot	grün
	Unterboden	grün	grau	grau	grün	grau	grau
2017	Oberboden	gelb	gelb	gelb	gelb	rot	grün
	Unterboden	gelb	grau	grau	grün	grün	grün

grau: nicht detektiert (<NWG 10 min), grün: nicht in allen Kernflächen detektiert, gelb: Nachweis in allen Kernflächen, rot: Konzentration > 50µg/kg

III. ALTRENOGEST

10 Einleitung

10.1 Hormone

Natürliche Hormone sind körpereigene Stoffe, die für die Informationsübertragung innerhalb des gesamten Organismus von enormer Bedeutung sind. Sie stellen unter anderem die lebenswichtige Entwicklung von Fertilität und Stoffwechsel sicher. Ihre Wirkung entfalten sie über spezifische Rezeptoren. Zu den wichtigen Hormonen gehören die Sexualsteroiden. Gebildet werden diese in Hoden und Ovarien sowie in der Nebenniere und Placenta. Zu dieser wichtigen Gruppe gehören Gestagene, Estrogene und Androgene. Das Ausgangsmolekül der Biosynthese stellt Cholesterin dar (Abb. 10.1). Estrogene stellen die weiblichen Sexualhormone dar und sind unter anderem wichtig für das Wachstum der weiblichen Geschlechtsorgane. Androgene, wie zum Beispiel Testosteron, stimulieren die Ausbildung der männlichen Geschlechtsmerkmale. Gestagene, wie Progesteron, werden auch Schwangerschaftshormone genannt und sind eine weitere wichtige Klasse der weiblichen Hormone. Aufgrund der geringen Kosten und einer erhöhten Wirksamkeit werden synthetische Steroidhormonderivate in der Tier- und Humanmedizin eingesetzt. Zu den synthetischen Steroidhormonen mit Einsatz in der Tiermedizin gehört Altrenogest (Ebert *et al.*, 2010; Kroker, 2010a).

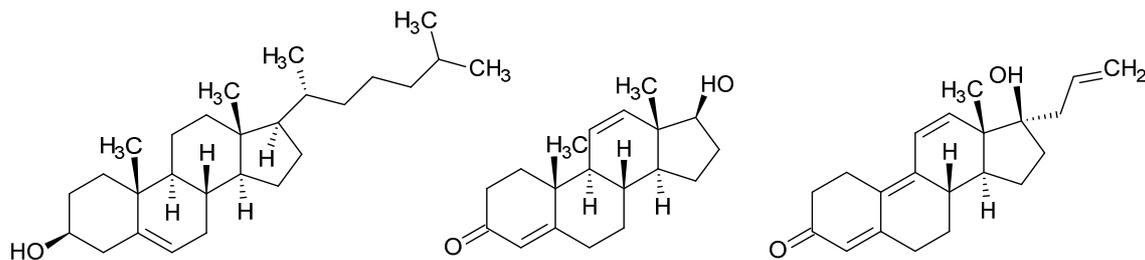


Abb. 10.1: Strukturformel von Cholesterin, Testosteron und Altrenogest (von links nach rechts).

10.2 Hormone als Tierarzneimittel

Nach der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung ist die Behandlung von Masttieren mit estrogen, androgen oder gestagen wirksamen Tierarzneimitteln in Europa grundsätzlich verboten. Vor allem die Verwendung von Hormonen zur Leistungssteigerung wurde damit unterbunden. Ausnahmen für dieses Anwendungsverbot gelten für lebensmittelliefernde Tiere, die nicht der Mast dienen. Bei diesen Tieren dürfen die natürlichen

Hormone Testosteron und Progesteron zur Therapie von Fruchtbarkeitsstörungen verabreicht werden. Die Applikation erfolgt als Injektion (Progesteron-Vaginalspritze) und darf nur vom Tierarzt durchgeführt werden. Für das natürliche Estrogen 17 β -Estradiol gilt ein generelles Anwendungsverbot. Synthetische Wirkstoffe dürfen unter Aufsicht des Tierarztes zur Brunstsynchronisation, zum Abbruch einer unerwünschten Trächtigkeit, zur Vorbereitung von Tieren für den Embryotransfer oder zur Induzierung der Laichreife bei Fischen eingesetzt werden (Kroker, 2010a). Die eingesetzten Verbindungen müssen in Tabelle 1 der VO (EU) Nr. 37/2010 gelistet sein und deren Anwendung in Einklang mit den Bedingungen für den Einsatz in der Tabelle sein. Mit §2 der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung wird ebenfalls festgelegt, dass ein Fertigarzneimittel für die Tierart und das jeweilige Anwendungsgebiet zugelassen sein muss.

10.3 Steroidhormone in der Umwelt

Die natürliche Bildung von Hormonen im Körper bedingt schon seit Urzeiten eine Ausscheidung von Hormonen von Mensch und Tier. Aufgrund der intensiven Tierhaltung und der Entwicklung von synthetischen Hormonen, sind die verwendeten Mengen in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegen. Die Folgen sind unter anderem erhöhte Einträge dieser Substanzen in die Umwelt. Mengenmäßig stellen Gestagene den größten Anteil dar. Insgesamt wurde für das Jahr 2000 die jährliche Steroidhormon-Ausscheidung von Nutztieren in Europa auf 360 Tonnen geschätzt (Lange *et al.*, 2002). Genaue und aktuellere Datenerhebungen, wie sie bei den Antibiotika existieren, gibt es nicht oder wurden bisher nicht veröffentlicht. Natürliche sowie synthetische Hormone können prinzipiell die gleichen Umweltpfade beschreiten wie Antibiotika. So sind sie durch die Verwendung in der Tiermedizin in Wirtschaftsdünger, im Boden und in Oberflächengewässern zu finden. Im Falle von Präparaten aus der Humanmedizin sind die Verbindungen ebenfalls in Abflüssen der Kläranlage, in Oberflächengewässern und auch in seltenen Fällen im Trinkwasser zu finden (Fent, 2015).

Vor allem von der Anwesenheit von natürlichen Estrogenen, aber auch dem synthetischen 17 α -Ethinylestradiol in Oberflächengewässern durch die Ausscheidungen von Mensch und Tier wurde schon häufiger berichtet (Aris *et al.*, 2014; Matthiessen *et al.*, 2006; Tremblay *et al.*, 2018; Vulliet *et al.*, 2007). Vulliet *et al.* (2008) konnten auch die Androgene, Testosteron und Androstendion in Oberflächen- sowie Grundwässern nachweisen. Ebenso quantifizierten sie das natürliche Gestagen Progesteron und synthetische Gestagene in den untersuchten Oberflächen- und Grundwässern. Dabei lagen die Konzentrationen im Bereich von 1,6-11,0 ng/L. Fent (2015) demonstrierte mit seinem Review, dass das als Human- und Tierpräparat verwendete Progesteron und einige synthetische Derivate in Zu- und Abflüssen von Kläranlagen, im Oberflächenwasser, im Trinkwasser und in sogenannten „Gülle-Lagunen“ nachzuweisen sind. Auch in Gärrückständen von Biogasanlagen, welche unter anderem Wirtschaftsdünger enthalten,

konnten Steroidhormone in einem Bereich von 1247 µg/kg bis 3444 µg/kg (Trockenmasse) bestimmt werden (Rodriguez-Navas *et al.*, 2013). Hansen *et al.* (2011) konnten in Gülle bis zu 3526 µg/kg sowie in Boden bis zu 11,7 µg/kg Steroidhormone nachweisen. Studien über Altrenogest in der Umwelt wurden bisher nicht vorgenommen, so dass keine Daten vorliegen.

10.4 Literaturstudie

Altrenogest stellt ein für lebensmittelliefernde Tiere, nicht jedoch für Masttiere, zugelassenes synthetisches Hormon dar. Dieses darf unter bestimmten Bedingungen für die Brunstsynchronisation von Sauen eingesetzt werden. Altrenogest gehört zu den synthetischen Steroidhormonen. Natürliche Steroidhormone werden für die Aufrechterhaltung von lebenswichtigen Funktionen wie Fortpflanzung und Entwicklung des Organismus benötigt (Kroker, 2010a).

Im Januar 2014 gelangte Altrenogest durch Medienberichte kurzzeitig, aufgrund einer BUND-Studie (Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland) zum Einsatz von Hormonen in der intensiven Sauenhaltung, in den Fokus der Öffentlichkeit (Hörning, 2013; Schulte von Drach, 2014). Bis zu diesem Zeitpunkt lagen keine Zahlen hinsichtlich des Einsatzes von Hormon-Präparaten vor. Aufgrund dessen wurde eine Literaturstudie durchgeführt, in der als Tierarzneimittel zugelassene Hormone identifiziert wurden, die ein mögliches Umweltrisiko darstellen können (vgl. Anhang 8). Anhand zuvor festgelegter Kriterien wie zum Beispiel Zulassung eines Hormon-Präparates, mengenmäßige Bedeutung auf Grund von Verwendung bei der Schwein- und Rinderhaltung sowie die Festlegung einer Rückstandshöchstmenge kristallisierten sich die beiden Hormone Chlormadinon (Rinderhaltung) und Altrenogest (Schweinehaltung) heraus. Durch eine Aufforderung der Autoren wurde eine erstmalige Erhebung von Abgabemengen in Niedersachsen aus dem Jahr 2014 vorgenommen und es zeigte sich, dass Chlormadinon mengenmäßig eine untergeordnete Rolle spielt, da sich nur eine Wirkstoffmenge von 57,8 g ergab. Im Vergleich dazu wurde für Altrenogest eine Wirkstoffmenge von 65,5 kg ermittelt. Hochgerechnet auf Deutschland ergab sich, dass im Jahresdurchschnitt jede 3. von insgesamt 2 Millionen Zuchtsauen in Deutschland mit Altrenogest behandelt wird (Hamscher und Petri, 2017).

Daraufhin wurden theoretische Szenarien entwickelt, die eine mögliche Belastung von Gülle und Boden mit Altrenogest vorhersagen können. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Triggerwert für Boden von 100 µg/kg (EMEA, 2009) bei Einpflügen der Gülle in den Oberboden (0-30 cm) nicht überschritten wird. Dieser wurde aber pauschal für alle Tierarzneimittel festgelegt. Hormone sind jedoch dafür bekannt insbesondere auf aquatische Organismen hochwirksam zu sein (Sumpter und Johnson, 2005). Dies wird bei dem Triggerwert nicht berücksichtigt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass bei einem punktuellen Eintrag von mit Altrenogest belasteter Gülle in bestimmten Gebieten, der Triggerwert überschritten werden

kann. Die Literaturstudie legt daher nahe, dass das Verhalten von Altrenogest in Gülle und Boden analytisch näher untersucht werden muss, um genauere Aussagen über das Umweltverhalten des Wirkstoffes treffen zu können.

10.5 Sorptionskoeffizient

Bisher ist nur wenig über das Umweltverhalten von synthetischen Steroidhormonen bekannt. Als erste grobe Abschätzung für das Verhalten kann der $\log\text{-}P_{\text{OW}}$ -Wert, ein physikalisch-chemischer Parameter, herangezogen werden. Dies ist der logarithmierte n-Octanol/Wasser-Koeffizient, welcher das Verhältnis der Konzentrationen einer Substanz in den beiden Phasen angibt (Briggs, 1981). Für Altrenogest wurde ein allgemeiner $\log\text{-}P_{\text{OW}}$ -Wert von 3,56 berechnet (EPA, 2018). Für lipophile Substanzen mit einem $\log\text{-}P_{\text{OW}}$ -Wert > 3 besteht prinzipiell die Möglichkeit einer Bioakkumulation (Anliker *et al.*, 1981; Anliker und Moser, 1987). Übertragen auf die Umwelt und die Kompartimente Boden und Gülle ist daher die Wahrscheinlichkeit einer Sorption von Altrenogest an die organische Bodenmatrix hoch. Neben dem $\log\text{-}P_{\text{OW}}$ -Wert, der auch in der Umweltchemie als $\log\text{-}K_{\text{OW}}$ bezeichnet wird, kann der $\log\text{-}K_{\text{OC}}$ berechnet werden, sofern die organische Phase eine feste Phase bzw. Boden darstellt. Dafür wird der $\log\text{-}K_{\text{OW}}$ auf den organischen Gehalt im Boden bezogen. Der nicht logarithmierte Sorptionskoeffizient, der sich auf eine feste und flüssige Phase bezieht, wird mit K_{D} abgekürzt oder K_{OC} , wenn die organische Phase wiederum auf den organischen Gehalt im Boden bezogen wird (Gawlik *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2017; Tolls, 2001).

Im Gegensatz zu Altrenogest wurden für natürliche Steroidhormone wie Testosteron, 17β -Estradiol oder das Estrogen bereits $\log\text{-}K_{\text{OC}}$ - und K_{D} -Werte bestimmt (vgl. Tab. 10.1) (Caron *et al.*, 2010; Casey *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Für das synthetische Steroidhormon 17α -Ethinylestradiol, einer der Wirkstoffe der Anti-Babypille, wurde ebenfalls der $\log\text{-}K_{\text{OC}}$ -Wert bestimmt (Lee *et al.*, 2003). Dabei ist anzumerken, dass die Estrogene in der Tiermedizin eine untergeordnete Rolle spielen, da sie keine Zulassung besitzen, aber natürlicherweise von den Tieren ausgeschieden werden. Für das in den USA wichtige synthetische Hormon Trenbolon und seine Transformationsprodukte, konnten bereits $\log\text{-}K_{\text{OC}}$ -Werte definiert werden (Khan *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2017). Sorptionsstudien von Altrenogest im Boden wurden bisher nicht durchgeführt.

Tab. 10.1: Log-K_{OC}-Werte für verschiedene natürliche und synthetische Steroidhormone.

Substanz	log-K _{OC}	Quelle
17β-Estradiol	3,34	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
17α-Ethinylestradiol	2,99	
Testosteron	3,34	
17α-Trenbolon	2,77	(Khan <i>et al.</i> , 2009)
17β-Trenbolon	3,08	
Trendione	3,38	

10.6 Analytik von Altrenogest

Für die Extraktion von Altrenogest und möglichen Transformationsprodukten gibt es erste Studien, die sich jedoch mit der Extraktion aus tierischen Produkten wie Urin (Ho *et al.*, 2006; Lampinen-Salomonsen *et al.*, 2006; Machnik *et al.*, 2007) und Nierenfett beschäftigen (Rejtharová und Rejthar, 2013). Die quantitative Analytik erfolgt hauptsächlich mit LC-MS/MS. Auch die Phase II Konjugate der Metabolisierung von Altrenogest in Nutztieren konnten mittels LC-MS/MS identifiziert werden. Dabei stellt die Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat den Hauptmetabolisierungsweg dar (EMA, 2012; Lampinen-Salomonsen *et al.*, 2006).

Bei der Extraktion von Steroidhormonen aus Boden wurde die PLE erfolgreich etabliert. Vor Quantifizierung mittels LC-MS/MS kann zusätzlich der Schritt der Aufreinigung mittels SPE erfolgen (Gineys *et al.*, 2010). Nach erfolgter Derivatisierung kann eine Quantifizierung ebenfalls mittels GC-MS/MS durchgeführt werden (Hansen *et al.*, 2011). Methoden für die Bestimmung von Altrenogest in Boden und Wasser gibt es bisher noch nicht.

11 Methodenentwicklung & -validierung

11.1 Methodenentwicklung

Da für die Bestimmung der Sorptionskoeffizienten eine quantitative Bestimmung von Altrenogest in der Matrix Boden sowie in der wässrigen Phase notwendig war, wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Extraktion benötigt. Für die Aufreinigung der wässrigen Phase wurde daher eine SPE-Methode etabliert. Für die Extraktion von Altrenogest aus Boden wurde eine LLE mittels Horizontalschüttler erarbeitet. Als interner Standard wurde Progesteron verwendet.

11.1.1 UHPLC/QTRAP Methode für Altrenogest

Die sich bereits für die Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen als geeignet erwiesene Säule Kinetex PFP (2.6 μm , 50 x 4,6 mm) eignete sich ebenfalls für die Analytik von Altrenogest. Getestet wurde zu Beginn das Eluentensystem nach Kap. 13.5.1. Die Umstellung des Eluenten A auf 1mM Ammoniumacetat mit 0,5 % AS sowie Eluent B auf ACN/MeOH (1:1, v/v) bewirkte keinen Rückgang der Intensitäten. Der Gradient wurde so angepasst, dass Altrenogest und Progesteron Basislinien getrennt wurden. So konnten pro Periode maximal 2 Massenübergänge vermessen werden. Die Auswirkung der Säulentemperatur auf die Intensität wurde in 5 °C Schritten von 15 °C bis 30 °C getestet. Die Intensitäten zeigten keine Abnahme, aber die Trennung der beiden Substanzen wurde mit zunehmender Temperatur schlechter, so dass die Einstellung von 15 °C übernommen wurde.

11.1.2 Flüssig-Flüssig Extraktion

Für die Extraktion von Steroidhormonen und Glucocorticoiden aus Boden konnten bereits Gineys *et al.* (2010) eine Methode entwickeln. Diese testeten verschiedene Lösungsmittel, Dauer der Extraktion mittels PLE sowie den Temperatureinfluss. Sie konnten keine verbesserte Extraktion der Hormone bei erhöhter Temperatur feststellen. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und stattdessen bei Raumtemperatur gearbeitet. Weiterhin konnten Gineys *et al.* (2010) feststellen, dass eine zweimalige Extraktion mittels PLE für 5 Minuten am effektivsten war. Daher wurde auch bei der hier zu erarbeitenden Methode eine zweimalige Extraktion, jedoch mittels Horizontalschüttler, durchgeführt. Um den Unterschied des nicht vorhandenen Drucks, wie er bei der PLE herrscht, auszugleichen, wurde anstatt einer Extraktion von 5 Minuten eine Extraktion von 20 Minuten gewählt. Gineys *et al.* (2010) testeten unterschiedliche Lösungsmittel und Gemische hiervon. Das Gemisch Aceton/MeOH (50:50) zeigte dort die besten Ergebnisse. Die in dieser Arbeit untersuchten Lösungsmittel bzw. Gemische sowie Puffer sind in Tab. 11.1 aufgelistet. Zur Auswahl eines geeigneten Gemisches wurde die absolute Wiederfindung bestimmt.

Tab. 11.1: Untersuchte Lösungsmittel und -Gemische sowie Puffer für die Extraktion von Altrenogest.

Lösungsmittel	Lösungsmittelgemisch	Lösungsmittel/Puffer (5:2; v/v)
ACN	ACN/ MeOH (50:50)	ACN/Citratpuffer
EAC	Aceton/MeOH (50:50)	ACN/Phosphatpuffer

EAC: Ethylacetat, Phosphatpuffer: 0,1 M, pH 7,0, Citratpuffer: 1 M mit 0,05 M EDTA, pH 4,7

Die höchste absolute Wiederfindung für die Extraktion von Altrenogest aus Boden, bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten, wurde mit ACN erreicht (vgl. Abb. 11.1). Durch Zugabe einer polareren Komponente wie MeOH und Citratpuffer nahm die absolute Wiederfindung ab. Dies könnte auf eine erhöhte Extraktion von Matrixbestandteilen aus Boden oder auf eine zu starke Erhöhung der Polarität zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob ein neutraler pH-Wert die Extraktion verbessern würde, wurde ein Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) in Verbindung mit ACN getestet. Mit dieser Kombination wurde auch bei einer Inkubationszeit von einer Stunde, im Vergleich zu einer reinen ACN-Extraktion, eine geringere Wiederfindung erzielt. Mit Verlängerung der Inkubationszeit auf sieben Tage nahm die absolute Wiederfindung ab. Auch mit einem unpolaren Lösungsmittel wie Ethylacetat (EAC) konnte diese nicht verbessert werden, so dass ACN als geeignetes Lösungsmittel für die Extraktion von Altrenogest aus Boden ermittelt wurde.

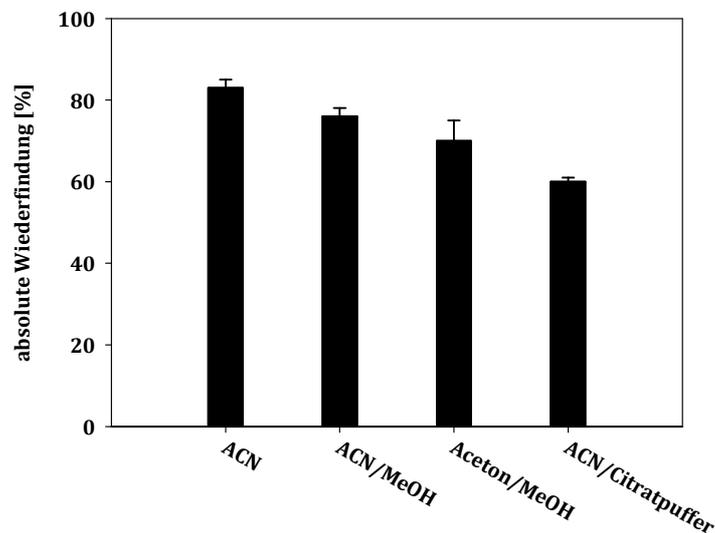


Abb. 11.1: Absolute Wiederfindung für die Extraktion von Altrenogest aus Boden mit ACN, ACN/MeOH, Aceton/MeOH und ACN/Citratpuffer mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten (100 µg/kg), die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.

11.1.3 Festphasenextraktion

Neben der Flüssig-Flüssig Extraktion mittels Horizontalschüttler für die Matrix Boden wurde zusätzlich für die wässrigen Proben eine SPE-Methode erarbeitet. Dazu wurden verschiedene Lösungsmittel und Lösungsmittelkombinationen für die Konditionierung sowie für die Elution getestet (vgl. Abb. 11.2). Die verwendete SPE-Methode für die Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen (siehe Kapitel 13.6.3) erwies sich als ungeeignet. Die Konditionierung sowie Elution mit ACN erhöhte die absolute Wiederfindung erheblich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Altrenogest eine unpolare Verbindung ist und eine Elution mit Methanol zu schwach war. Als zweite Komponente zur Konditionierung/Elution wurde EAC und ACN mit 5 % Ammoniakwasser nach Gineys *et al.* (2010) getestet. Gineys *et al.* (2010) verwendeten weiterhin eine Probenlösung mit 10 % ACN. Mit dieser Kombination konnte auch hier die höchste absolute Wiederfindung erzielt werden. Ein Waschschriff mit 10 % ACN, wie bei der Methode nach Gineys *et al.* (2010), konnte ebenfalls der etablierten SPE-Methode ohne Analytverlust hinzugefügt werden.

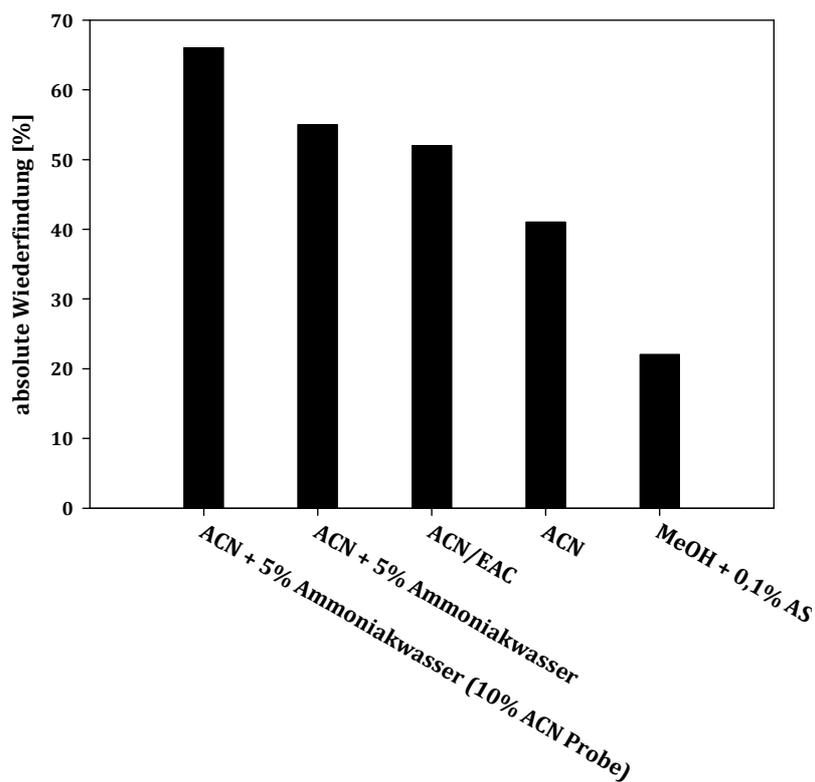


Abb. 11.2: Absolute Wiederfindung für die Extraktion von Altrenogest aus Wasser mittels SPE mit ACN, ACN+ 5 % Ammoniakwasser, EAC und MeOH mit 0,1 % Ameisensäure (AS) für die Kondition und Elution.

Neben der vielfältig einsetzbaren SPE-Säule Chromabond® HR-X (Macherey&Nagel) wurden die SPE-Säulen Strata™ XL (Phenomenex) und Chromabond® Easy (Macherey&Nagel) für die

Anreicherung von Altrenogest getestet. Dabei konnten mit allen drei Säulen ähnliche Wiederfindungen erzielt werden. Insofern wurde die SPE-Säule Chromabond® HR-X weiter verwendet.

Die Anwendbarkeit der beiden etablierten Methoden wurde mit Proben, die unter simulierten Versuchsbedingungen hergestellt wurden, getestet. Dazu wurde mit Wasser gesättigter Boden und eine wässrige Bodenphase hergestellt und verwendet. Eine effektive Extraktion aus diesen Matrices war ebenfalls gegeben.

11.1.4 Matrixeffekte

Um mögliche qualitative Matrixeffekte von Altrenogest abschätzen zu können, wurde eine Post-column-Infusion durchgeführt. Dafür wurde als Leermatrix ein wässriger Extrakt aus Boden verwendet (vgl. Kapitel 13.6.3). Die Konzentration des über die Spritzenpumpe kontinuierlich injizierten Standards betrug $1\mu\text{g/mL}$. Anhand der Post-column-Infusion konnte eine Zunahme der Intensität in Matrix im Vergleich zu Methanol beobachtet werden (Abb. 11.3). Die Intensität zum Zeitpunkt der Elution von Altrenogest beträgt bei Messung der Leermatrix das 2,5-fache der Intensität der Messung von Methanol. Damit liegt eine eindeutige Signalverstärkung durch Matrixeffekte vor. Um die Matrixeffekte für die nachfolgenden Versuche auszugleichen, wurde ein interner Standard verwendet. Da dieser ähnliche Eigenschaften wie der Analyt selbst haben sollte, wurde als interner Standard Progesteron ausgewählt. Progesteron gehört ebenfalls zu den Gestagenen und ist daher aufgrund seiner strukturell sehr ähnlichen Eigenschaften gut geeignet. Weiterhin kommt die Verbindung nicht natürlicherweise in den Proben vor.

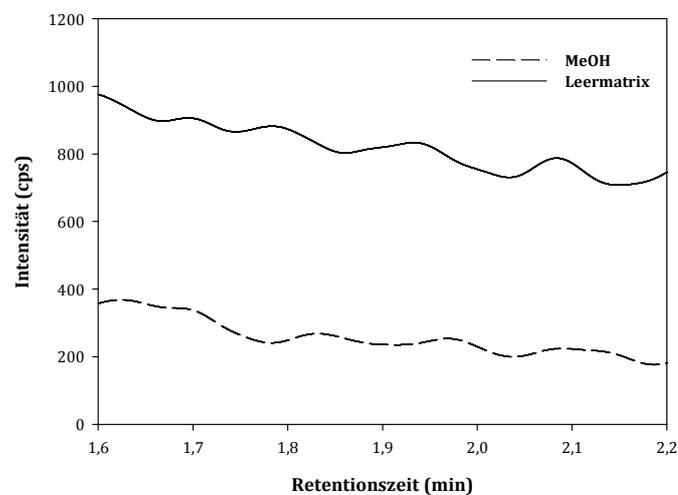


Abb. 11.3: Ergebnisse der Altrenogest Post-Column Infusion mit Methanol (gestrichelte Linie) und Leermatrix (durchgezogene Linie), (Massenübergang $311,2 \rightarrow 227,3$, Konzentration $1\mu\text{g/mL}$).

11.2 Methodenvalidierung

Die Linearität der Methode wurde für Lösungsmittelstandards sowie für die Matrices Boden und wässrige Bodenphase mit dem Test nach Mandel (DIN 38402-51, 2017-05) bestätigt. Dazu wurden mit Wasser gesättigte Bodenproben hergestellt, die mit Altrenogest dotiert wurden. Die Inkubationszeit betrug einen Tag. Die wässrige Phase wurde mit analytfreiem Boden hergestellt, in dem das Verhältnis 1:5 (fest:flüssig) simuliert wurde. Die Auftragung des Verhältnisses der Peakfläche von Standard zu Peakfläche interner Standard wurde zur Erstellung der Kalibrierfunktion verwendet. Neben der Linearität wurden die NWG/BG sowie die Präzision bestimmt. Die absolute Wiederfindung wurde sowohl für die wässrige Bodenphase (1 Stunde) als auch für den Boden (1 Stunde sowie 7 Tage Inkubation mit Altrenogest) bestimmt. Die Ergebnisse der Methodenvalidierung sind in Tab. 11.2 dargestellt.

Tab. 11.2: Ergebnisse der Methodenvalidierung zur Extraktion von Altrenogest aus der wässrigen Phase und Bodenmatrix sowie die Ergebnisse der Lösungsmittelkalibrierung.

	Lösungsmittel- standard	wässrige Phase	Bodenmatrix
	[µg/L]	[µg/L]	[µg/kg]
NWG	0,05	0,05	0,5
BG	0,5	0,1	1
Linearität	BG - 750	BG - 30	BG - 250
R²	> 0,99	> 0,99	0,99
Messpräzision (n=12)	2,8 %	1,6 %	1,7 %
Intraday-Präzision (n=12)	-	1,8 %	2,3 %
Interday-Präzision (n=16)	-	2,0 %	2,2 %
absolute WDF (1h/ 7d)	-	168 %	147 %/52 %
Matrix-WDF (1h/ 7d)	-	111 %	167 %/54 %

NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze

Die Sorptionsstudie sollte über eine Dauer von 28 Tagen durchgeführt werden. Die Alterungsprozesse im Vergleich zu den Proben der BDF (vgl. Kap. 7 und Kap.9.1) waren daher als gering einzustufen. Aufgrund dessen wurde die NWG und BG nach einer Inkubationszeit von einem Tag bestimmt. Die Bestimmung der WDF erfolgte nach 1 Stunde. Der Vergleich der absoluten WDF und der Matrix-WDF der wässrigen Phase bestätigt die Ergebnisse der Matrixeffekte. Altrenogest unterliegt in Matrix einer Signalverstärkung (vgl. Kap. 11.1.4). Eine

Quantifizierung mittels Matrixstandard ist demnach sinnvoll und im Falle der wässrigen Bodenphase ausreichend, um diesen Matrixeffekt auszugleichen. Dies ist nicht der Fall für die Bodenmatrix. Daher wurde die WDF für die Bodenmatrix zusätzlich nach 7 Tagen bestimmt. Erkennbar ist, dass nach dieser Zeit die absolute WDF, sowie die Matrix-WDF sinkt. Dies ist ähnlich zu den Ergebnissen für Sulfonamide und Tetracycline (vgl. Kap. 7.1). Ein Ausgleich der Matrixeffekte nach 7 Tagen ist nicht möglich. Der interne Standard Progesteron ist demnach nicht hinreichend geeignet, um die Matrixeffekte im Boden zu kompensieren. Ein isotopenmarkierter Standard wäre notwendig und daher in Folgeuntersuchungen zu verwenden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erfolgte die Quantifizierung daher über Matrixstandards.

Nach FDA sollen die Intra- und Interday-Präzision für die Validierung von Analysemethoden von biologischen Proben unter 15 % liegen (FDA, 2001). Die hier ermittelten Präzisionen liegen weit unterhalb dieser geforderten Grenze, so dass die Präzision für beide Extraktionsmethoden als sehr gut angesehen werden können.

Die Stabilität der reinen Lösungsmittelstandards sowie die Stabilität der Matrixextrakte, wurden bestimmt. Die Lösungsmittelstandards wurden bei -18 °C gelagert und an Tag 1, 2, 8 und 31 analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Altrenogest bis zum Tag 31 mit einer Abweichung < 5 % stabil war. Auch die Matrixextrakte aus der wässrigen Phase und Boden wurde untersucht. Diese wurden ebenfalls bei -18 °C gelagert und an den Tagen 1, 2, 8, 12, 19 und 33 analysiert. Nach den ersten zwei Tagen konnte kein Analytverlust nachgewiesen werden. Insgesamt konnte eine Abweichung von maximal 10 % innerhalb der untersuchten Zeit gemessen werden.

12 Sorptionsstudie

12.1 Aufbau

Die Sorptionsstudie sollte im Labormaßstab durchgeführt werden. Aufgrund dessen wurden für den Aufbau 50 mL Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff verwendet. Als Bodenmaterial diente der analytfreie Boden (Kap. 13.4.1). Das Verhältnis von Boden/Wasser wurde aufgrund der Ergebnisse von Robinson *et al.* (2017) auf 1:5 festgelegt. Das verwendete Verhältnis Wirtschaftsdünger/Boden von 50:1 resultierte aus der Annahme, dass eine Ackerfläche mit 45 m³ Wirtschaftsdünger pro Hektar bewirtschaftet wird (Hamscher *et al.*, 2002). Insgesamt wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht. Bei Ansatz AB wurde der Wirtschaftsdünger mit Altrenogest versetzt und auf Boden gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der Wasserphase. Bei Ansatz B wurde kein Wirtschaftsdünger auf den Boden gegeben, sondern lediglich ein Boden/Wasser-System hergestellt bei dem das Wasser mit Altrenogest versetzt wurde. In der Literaturstudie wurde eine Konzentration 5 mg/kg Altrenogest in Wirtschaftsdünger als Worst-Case-Konzentration identifiziert. Aufgrund dessen erfolgte eine Dotierung des Wirtschaftsdüngers mit Altrenogest mit dieser Menge. In Ansatz B wurde die entsprechende Menge, die in den Wirtschaftsdünger gegeben worden ist, direkt in das Wasser dotiert. Nach Durchmischung der Proben bis zur Homogenität wurden diese bei 22 °C im Dunkeln bis zur Probennahme gelagert.

12.2 Sorptionskoeffizienten

Die Probennahme erfolgte nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde sowie 1, 3, 7, 14 und 28 Tagen. Für die exakte Trennung der Bodenmatrix von der wässrigen Phase wurden die Ansätze zentrifugiert. Die Proben wurden am Tag der Probenahme mit den in Kapitel 13.6.5 beschriebenen Methoden aufgearbeitet. Zur Quantifizierung von Altrenogest in den Probenextrakten wurden jeweils Matrixstandards mit aufgearbeitet. Anhand der Gleichungen in Kapitel 13.7 wurde der prozentuale Anteil an Altrenogest in der wässrigen Phase sowie in der Bodenmatrix und die K_D -Werte, K_{OC} -Werte und die entsprechenden \log - K_{OC} -Werte berechnet.

Abb. 12.1 zeigt den prozentualen Anteil von Altrenogest im Boden, in der wässrigen Phase sowie die Summe aus beiden. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde konnten fast 100 % der dotierten Altrenogest-Konzentration wiedergefunden werden. Über die Zeit von 28 Tagen hinweg nimmt die Wiederfindung ab. Die Abnahme ist auf Sorptionen im Boden zurückzuführen, so dass Altrenogest nicht mehr für die Analytik zu Verfügung steht. Dieses Verhalten ist ähnlich dem Verhalten der Sulfonamide (vgl. Kap. 6.6). Diese sind bekannt dafür, dass bei längerer Kontaktzeit mit der Matrix die Extrahierbarkeit abnimmt (Stoob *et al.*, 2006). Die Studie von Fan *et al.* (2007) konnte zeigen, dass auch Hormone wie Testosteron und 17 β -Estradiol nicht

extrahierbare Rückstände, zum Beispiel durch die Bindung an Huminstoffe, im Boden bilden können. Sorptionsprozesse von Altrenogest sind aufgrund der Strukturähnlichkeit also sehr wahrscheinlich (vgl. Abb. 10.1). Die Bildung von Transformationsprodukten von Testosteron und 17β -Estradiol sind bekannt und kann ebenfalls zu einer Abnahme der Muttersubstanz in Boden führen (Casey *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2004). Untersuchungen zu Transformationsprodukten von Altrenogest in Boden sind bisher nicht vorgenommen worden.

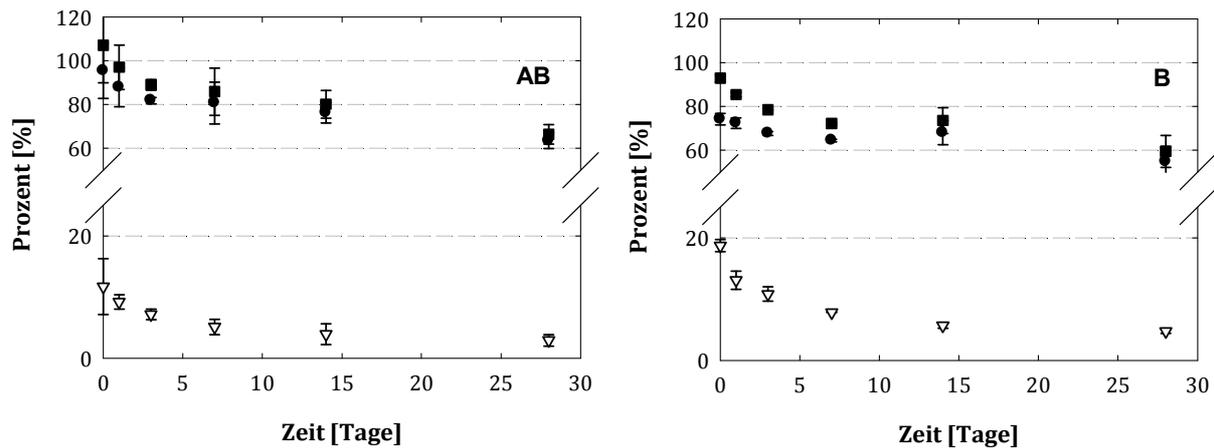


Abb. 12.1: Prozentualer Anteil von Altrenogest im Boden (Kreis), in der wässrigen Phase (Dreieck) und insgesamt (Viereck) über 28 Tage in Ansatz AB (links) und Ansatz B (rechts), die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.

Bei beiden Ansätzen wurde bereits zu Studienbeginn (1 Stunde) ca. 80 % des zugesetzten Altrenogests im Boden quantifiziert. Der Anteil in der wässrigen Phase liegt daher < 20 % und nimmt im Laufe der Studie weiter ab (Abb. 12.1). Im Boden von Ansatz AB ist jedoch deutlich mehr Altrenogest zu finden als im Boden von Ansatz B. In Ansatz B wurde die flüssige Phase unmittelbar mit Altrenogest dotiert, wohingegen bei AB zunächst der verwendete Schweinedung dotiert wurde. Trotz der verschiedenen Dotierungsweisen ist das Verhalten von Altrenogest tendenziell sehr ähnlich und weist auf eine hohe Affinität der Verbindung zu der Bodenmatrix hin. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass das Aufbringen von Wirtschaftsdünger die Interaktion der darin enthaltenen Substanzen mit Boden verringert (Burkhardt *et al.*, 2005), so eine geringere Sorptionsstärke an die Matrix stattfindet und folglich auch mehr Altrenogest analytisch verfügbar ist. Bei Betrachtung der Abb. 12.1 wird diese Annahme bestätigt, da die Wiederfindung von Altrenogest für Ansatz AB durchweg höher war als für Ansatz B.

Auch wenn die Gehalte an Altrenogest in der Bodenphase über die Zeit abnehmen, überwiegt die Verlagerung von der flüssigen in die feste Phase (Abb. 12.2). Die berechneten K_D -Werte steigen im Lauf der Studie an. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen von Bailey *et al.* (2016) überein. Die Autoren konnten auch eine Steigung von K_D -Werten über einen Verlauf von 28 Tagen für

Sulfonamide und Tetracycline zeigen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg weist der Ansatz AB höhere K_D -Werte als der Ansatz B auf. Dies macht deutlich, dass die Anwesenheit von Wirtschaftsdünger einen Einfluss auf die Verteilung von Altrenogest zwischen flüssiger und fester Phase haben muss. Bekannt ist dieses Verhalten bereits für SDZ. Sukul *et al.* (2008b) konnten erhöhte K_D -Werte von SDZ in Anwesenheit von Wirtschaftsdünger im Boden nachweisen.

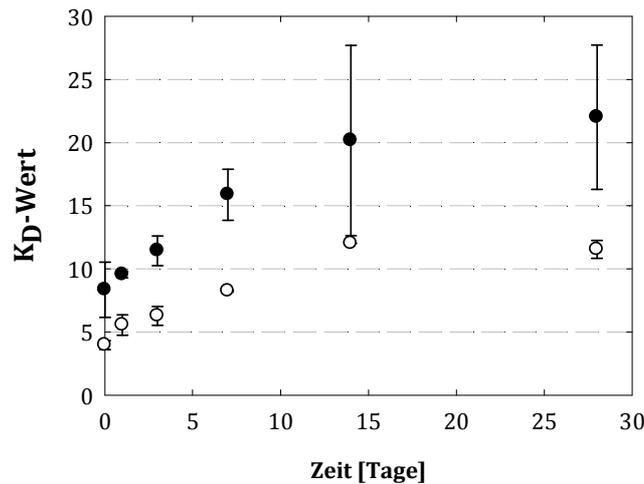


Abb. 12.2: K_D -Werte von Altrenogest im Ansatz AB (schwarzer Punkt) und im Ansatz B (weißer Punkt) über 28 Tage, die Fehlerbalken stellen die Spannweite der Doppelbestimmung dar.

Die Auswirkungen von Wirtschaftsdünger auf das Verhalten von Substanzen in Böden scheinen aber auch abhängig von der Art des Düngers zu sein. Schiffer *et al.* (2001) konnten das Transformationsprodukt eines synthetischen Hormons länger in Böden nach Ausbringung von festem Dung als nach Ausbringung von flüssigem Wirtschaftsdünger nachweisen. Die Autoren führten dies auf eine Stabilisierung der Substanz durch die Sorption an Stroh zurück.

Auch wenn in dieser Arbeit nur ein spezieller Wirtschaftsdünger getestet wurde, so stellt Ansatz AB einen deutlich praxisnäheren Ansatz als B dar. Robinson *et al.* (2017) bestimmten ebenfalls Sorptionskoeffizienten für ein Transformationsprodukt des synthetischen Hormons Trenbolon. Im Vergleich zu der hier durchgeführten Studie untersuchten die Autoren fünf unterschiedliche Böden sowie fünf unterschiedliche Konzentrationen. Ein möglicher Einfluss von Wirtschaftsdünger auf das Sorptionsverhalten der Wirkstoffe wurde in den Untersuchungen nicht berücksichtigt, jedoch von den Autoren auch nicht ausgeschlossen. Dies konnte mit dieser Studie zu Altrenogest nunmehr experimentell bestätigt werden. Eingesetzt wurde die mittels Literaturstudie identifizierte Worst-case-Gülle-Konzentration von 5 mg/kg (Hamscher und Petri, 2017), um das Verhalten von Altrenogest in Böden und der Umwelt abschätzen zu können.

Die realen Konzentrationen in Wirtschaftsdünger sind in der Regel deutlich geringer. Biswas *et al.* (2017) untersuchten gelagerte Gülle von mit Hormonen behandelten Tieren auf 17 Hormone und bestimmten einen Gesamtgehalt von 26,7 µg/kg (Trockenmasse). Weitere Studien mit realistischeren Gehalten sind daher notwendig, um auch einen möglichen Einfluss der Wirkstoff-Konzentration zu untersuchen.

Anhand des K_D -Wertes wurden der K_{OC} sowie daraus, unter Bildung des dekadischen Logarithmus, der $\log K_{OC}$ berechnet (Tab. 12.1). Für die Berechnung des K_{OC} wurde der K_D auf den organischen Kohlenstoffgehalt von 3,6 % bezogen (Kap.13.4.1). Sowohl der K_{OC} als auch der $\log K_{OC}$ zeigen eine Zunahme über die Zeit. Die Mittelwerte ergeben für den Ansatz AB einen K_{OC} von 405 und einen $\log K_{OC}$ von 2,58. Für den Ansatz B wurden so ein K_{OC} von 220 und ein $\log K_{OC}$ von 2,31 bestimmt.

Tab. 12.1: Auflistung der bestimmten K_D -, K_{OC} -, und $\log K_{OC}$ -Werte zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten in Ansatz AB und B.

	AB			B		
	K_D	K_{OC}	$\log K_{OC}$	K_D	K_{OC}	$\log K_{OC}$
1 Stunde	8,35	232	2,36	3,97	110	2,04
1 Tag	9,55	265	2,42	5,56	154	2,19
3 Tage	11,44	318	2,50	6,28	174	2,24
7 Tage	15,88	441	2,64	8,26	229	2,36
14 Tage	20,16	560	2,74	12,01	334	2,52
28 Tage	22,02	612	2,78	11,54	321	2,51
Mittelwert	14,56	405	2,58	7,94	220	2,31
Standardabweichung	5,20	144	0,16	3,00	83	0,17

Ein $\log P_{OW}$ für Altrenogest wurde von der FDA (2002) mit 3,79 veröffentlicht. Dort sind auch K_{OC} -Werte dargestellt, die im Bereich 746 – 1510 für lehmhaltige Böden schwanken. Der berechnete $\log P_{OW}$ nach der American Chemical Society (2018) liegt bei 4,18 und der geschätzte K_{OC} bei 4490, welches einem $\log K_{OC}$ von 3,65 entsprechen würde. Der $\log P_{OW}$ nach EPA (2018) beträgt 3,56. Die Literaturwerte schwanken also deutlich. Die berechneten Werte nach American Chemical Society (2018) sowie nach FDA (2002) liegen deutlich höher im Vergleich zu den Werten, die in dieser Studie bestimmt wurden. Dabei handelt es aber lediglich um berechnete Werte, sowie um Werte, bei denen die Versuchsbedingungen nicht bekannt sind.

Für ein Transformationsprodukt des synthetischen Hormons Trenbolon, welches auch zu der Gruppe der Steroide zählt, wurden bereits die K_D -, K_{OC} - und $\log K_{OC}$ -Werte mit einem ähnlichen Versuchsaufbau von Robinson *et al.* (2017) bestimmt. Das Transformationsprodukt weist eine hohe Ähnlichkeit zu Altrenogest auf (vgl. Abb. 12.3). Die Autoren unterschieden dabei zwischen Adsorptions- und Desorptionskoeffizienten. Zum Vergleich mit Altrenogest werden die Adsorptionswerte herangezogen. Je nach Bodenart schwanken die K_D -Werte der Studie von Robinson *et al.* (2017) in einem Bereich von 4,32 bis 19,78 (Mittelwert: 9,03). Die dazugehörigen K_{OC} -Werte schwanken von 277 bis 608 (Mittelwert: 460). Die Sorptionskoeffizienten für Altrenogest weisen eine hohe Ähnlichkeit zu diesen Daten auf (Tab. 12.1). Als Mittelwert des $\log K_{OC}$ gaben Robinson *et al.* (2017) den Wert 2,71 an, welcher vergleichbar mit den hier bestimmten Werten für Altrenogest (2,58 und 2,31) ist. Dies weist auf eine hohe Plausibilität der in dieser Sorptionsstudie ermittelten Werte hin.

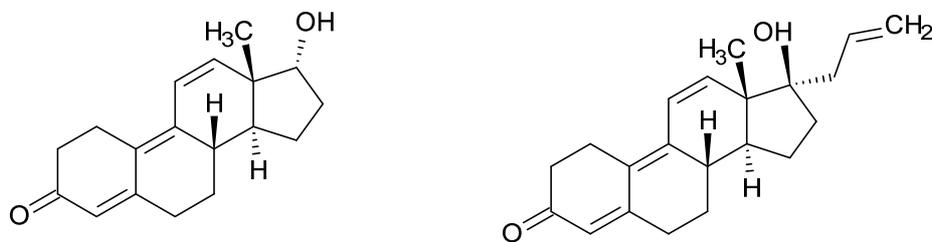


Abb. 12.3: Strukturformeln von 17 α -Trenbolon (links) und Altrenogest (rechts).

Die Ergebnisse für das Verhalten von Altrenogest weisen auf eine mögliche Akkumulation in Boden hin. Eine Akkumulation wird auf einzelne Gebiete in Deutschland beschränkt bleiben, da Altrenogest hauptsächlich Anwendung bei Zuchtsauen findet. Die Ackerflächen, die hauptsächlich mit Wirtschaftsdünger von Zuchtsauen bearbeitet werden, sind damit als gefährdet anzusehen. Andere Aspekte des Umweltverhaltens von Altrenogest, wie das Auswaschungspotential, sollten in weiteren Studien genauer untersucht werden. Da aber Hormone auch ohne den Einsatz von Tierarzneimitteln auf natürliche Weise von Tieren ausgeschieden werden, ist eine Abschätzung, welche ökotoxikologischen Auswirkungen speziell die synthetischen Hormone haben, schwierig. Im Jahr 2000 wurde in der EU die ausgeschiedene Menge an Steroidhormonen von Nutztieren auf 360 Tonnen geschätzt (Lange *et al.*, 2002). Mittels Literaturstudie nach Hamscher und Petri (2017) konnte für Altrenogest im Jahr 2014 eine Abgabemenge von 65 kg für Niedersachsen ermittelt werden. Folglich macht dieses synthetische Hormon zwar nur einen kleinen Anteil der Gesamtmenge aus. Aber die Tatsache, dass Hormone auch in geringsten Konzentrationen starke Wirkung auf aquatische Organismen entfalten können (Sumpter und Johnson, 2005), darf daher nicht außer Acht gelassen werden. Denn auch wenn nach 28 Tagen nur noch 2-5 % der ursprünglich eingesetzten

Altrenogestmenge in der wässrigen Phase zu finden war, war dies immer noch $\sim 1 \mu\text{g/L}$. LOEC-Werte („lowest observed effect concentration“) von Progesteron liegen zwischen 10 und 500 ng/L für verschiedene Effekte auf die Dickkopfelritze (Fent, 2015). Diese wurden in dem hier durchgeführten Worst-case-Fall weit überschritten.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

13 Material

13.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für die LC-MS-Messungen wurden zwei LC-MS/MS-Systeme bestehend aus der UHPLC UltiMate 3000RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) und einer QTRAP 3200 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) sowie ein System bestehend aus Nexera X2 UHPLC (D-Duisburg) und einem Triple TOF 5600+ (AB Sciex, Framingham, MA, USA) verwendet. Teile der Methodenentwicklung (nicht Validierung) wurden an einem API 3000 Triplequadrupol von AB Sciex gemessen. Für die Methodenentwicklung wurden folgende UHPLC/HPLC-Säulen untersucht: MN Nucleoshell RP 18 plus (2.7 µm, 100 x 2 mm, Macherey & Nagel, D-Düren), VDSpher® OptiAqua Pur (3 µm, 100 x 4,6 mm, VDS optilab, D-Berlin), Kinetex PFP (2.6 µm, 50 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) sowie die Säulen Hypersil Gold (1.9 µm, 50 x 2,1 mm), Hypersil Gold PFP (3 µm, 150 x 2,1 mm) sowie Accucore aQ (2.6 µm, 100 x 2,1 mm) von Thermo Scientific, Waltham, MA, USA.

Die Extraktionen mittels Mikrowelle wurden mit dem Mikrowellensystem MLS Ethos plus, Terminal 320 (MLS GmbH Mikrowellen Laborsysteme, D-Leutkirch) durchgeführt. Die Extraktionen mittels Schüttler wurden mit dem Modell 130 KS basic (IKA®, D-Staufen) durchgeführt. Für die Extraktion mittels Vortexer wurde ein Vortex-Genie 2 mit dem Aufsatz „Multi-Holder Tube“ von Thermo Scientific Waltham, MA, USA verwendet.

Die simultanen Analysen auf Kupfer und Zink wurden mittels ICP-MS am Landesbetrieb Hessisches Landeslabor in Kassel durchgeführt. Die Kupfergehalte der Bodensäule wurden mittels GF-AAS (iCE™ 3500 AAS, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

Die DOC-Gehalte der Bodenproben wurden mittels DIMATOC®2010K1 (Dimatec, D-Essen) bestimmt, die TC Gehalte wurden mittels Vario EL III der Firma Elementar Americas Inc (NY, USA) sowie die Bestimmung der Carbonate und Korngrößenanalyse wurden im Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung der Justus-Liebig-Universität durchgeführt.

Als Ultraschallsonde diente die Sonoplus MS 72 sowie der Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 (Bandelin, D-Berlin).

Die pH-Wert-Messungen wurden mit dem Modell inolab® WTW Serie pH 730 (inolab®, D-Weilheim) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Huminstoffe wurde das Photometer Uviline 9400 verwendet (Schott Instruments, D-Mainz).

Als Feuchtegehaltbestimmer wurde das Modell MA 35 der Sartorius AG verwendet (D-Göttingen)

Zentrifugationen erfolgten mit einer Heraeus Fresco 17 Centrifuge (Thermo Scientific Waltham, MA, USA) und mit dem Modell Universal 320 R (Hettisch Zentrifugen, D-Tuttlingen).

Zur Herstellung der Standards wurde das Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner und ein Vortexer von VWR International (D-Darmstadt) verwendet. Als Feinwaage diente das Modell XA105 DualRange (Mettler-Toledo GmbH, D-Gießen). Als Laborwaage wurde das Modell EW6200-2NM von Kern & Sohn (D-Balingen) verwendet.

Das Einengen und Eindampfen der Proben erfolgte an einem Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck mit dem Modell RV 10 digital von IKA® (D-Staufen) sowie mit dem Sampleconcentrator SBHCONC/1 von Stuart® und dem dazugehörigen Dri-Block® DB-3 von TECHNE (bibby-scientific, Staffordhire UK). Als Kühlsystem für den Rotationsverdampfer diente ein Minichiller (Huber Kältemaschinenbau GmbH, D-Offenburg).

Die automatische Festphasenextraktion wurde mittels SPE-System (GX-271 ASPEC™) der Firma Gilson (Middelton, WI, USA) durchgeführt. Für die Methodenentwicklung wurden folgende Festphasenextraktionskartuschen verwendet: Isolute® ENV+ (200 mg, 6 mL, Biotage, SWE-Uppsala), Oasis® HLB (200 mg, 6 mL, Waters, D-Eschborn), HyperSep C18™ (500 mg, 6 mL, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA), Strata™ XL (200 mg, 6 mL, Phenomenex, D-Aschaffenburg), Chromabond®-HRX Chromabond®-easy (3 mL, 200 mg, Macherey & Nagel, D-Düren).

Die gespülten Glasgefäße wurden mittels Ofen HBA 70B550 von Bosch (D-Gerlingen) bei ~ 500 °C ausgeheizt.

Das verwendete Reinstwasser (18,2 MΩ x cm) wurde aus der Anlage Arium 611VF der Sartorius AG (D-Göttingen) entnommen.

Verschiedene Kolbenhubpipetten der Firma Biohit (D-Rosbach) sowie Modelle der Firma Eppendorf (D-Hamburg) wurden verwendet.

13.2 Chemikalien

Die Reinheiten der verwendeten Lösungsmittel für die Extraktionen entsprach dem Reinheitsgrad von HPLC-Grade bis zu LC-MS-Grade. Für die Herstellung der Eluenten für die LC-MS/MS-Messungen wurden, neben Reinstwasser, Lösungsmitteln sowie Wasser mit der Reinheit Ultra LC-MS-Grade (Actu-All, JW OSS, Niederlande) verwendet. Die dem Eluenten zugesetzte Ameisensäure (AS) hatte die Konzentration von 98-100 %. Die für die Königswasserextraktion verwendeten Säuren wiesen maximal 0,005 ppm an Verunreinigungen auf. Als Puffer für die Extraktionen diente 1 M Citrat-Puffer mit 0,05 M EDTA mit einem pH-Wert von 4,7. Dieser wurde aus 69 % tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 31 % Citronensäure-Monohydrat und 0,05 M EDTA hergestellt. Im Nachfolgenden wird dieser Puffer als „Citrat-Puffer“ bezeichnet. Der pH-Wert wurde mit NaOH-Plätzchen eingestellt. Für die pH-Wert-Messungen von Boden wurde eine 0,01 M Calciumchloridlösung (CaCl₂-Lösung) verwendet. 25 % Ammoniak (NH₃) wurde unter anderem für die automatische Festphasenextraktion für die Altrenogest Extraktion verwendet. Der Reinheitsgrad des verwendeten Huminsäurestandards war „technical“.

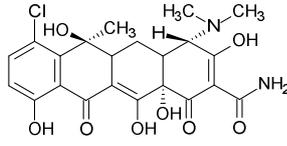
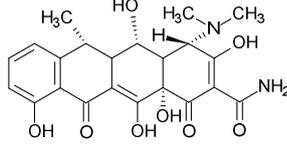
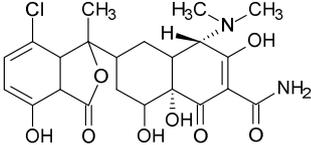
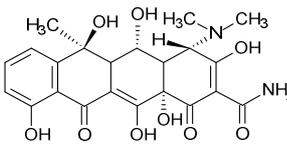
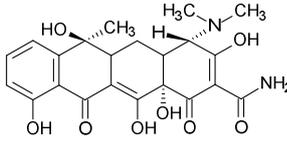
Die verwendeten Sulfonamide (Tab. 13.1) und Tetracycline (Tab. 13.2) sowie die Hormone (Tab. 13.3) entsprachen dem Reinheitsgrad „veteranal“. Die Tetracycline wurden als Hydrochloride bezogen. Als interne Standards (IST) wurden ¹³C₆ isotopenmarkiertes SDZ, SMX oder SMZ für die Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen verwendet. Für die Bestimmung von Altrenogest wurde Progesteron als interner Standard verwendet.

Tab. 13.1: Bezeichnung, Abkürzung, Molekülmasse, Struktur und Zuordnung der internen Standards der Sulfonamide.

IST	Bezeichnung	Abk.	Masse [g/mol]	Struktur
a	Sulfachloropyridazin	SCY	284,72	
b	Sulfadiazin	SDZ	250,28	
a	Sulfadimethoxin	SDM	310,33	
b	Sulfaguanidin	SGU	214,24	
c	Sulfamerazin	SMR	264,30	
c	Sulfamethazin	SMZ	278,33	
a	Sulfamethoxazol	SMX	253,28	
c	Sulfamethoxypyridazin	SMPD	280,30	
c	Sulfapyridin	SPY	249,29	
c	Sulfathiazol	STZ	255,32	

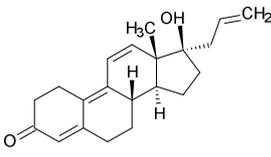
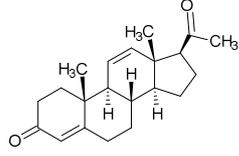
Abk.: Abkürzung; a: $^{13}\text{C}_6$ SMX; b: $^{13}\text{C}_6$ SDZ; c: $^{13}\text{C}_6$ SMZ

Tab. 13.2: Bezeichnung, Abkürzung, Molekülmasse, Struktur und Zuordnung der internen Standards der Tetracycline.

IST	Bezeichnung	Abk.	Masse [g/mol]	Struktur
a	Chlortetracyclin	CTC	478,88	
a	Doxycyclin	DOXY	444,43	
a	Isochlortetracyclin	IsoCTC	478,88	
a	Oxytetracyclin	OTC	460,43	
a	Tetracyclin	TC	444,43	

Abk.: Abkürzung; a: $^{13}\text{C}_6$ SMX; b: $^{13}\text{C}_6$ SDZ; c: $^{13}\text{C}_6$ SMZ

Tab. 13.3: Bezeichnung, Abkürzung, Molekülmasse, Struktur der Hormone.

Bezeichnung	Abk.	Masse [g/mol]	Struktur
Altrenogest	Alt	310,43	
Progesteron	Pro	314,46	

13.2.1 Herstellung der Stammlösungen und Mischstandards

Für jede Substanz, ausgenommen IsoCTC, wurde eine Stammlösung mit der Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Dazu wurden 1 mg ($\pm 0,01$ mg) der einzelnen Substanzen, sowie der internen Standards, in einem definierten Volumen an Methanol gelöst. Für IsoCTC wurde eine Stammlösung mit der Konzentration von 0,5 mg/mL hergestellt. Dieses wurde in Methanol (MeOH) und Salzsäure gelöst. Die Stammlösungen wurden im Gefrierschrank bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Durch Verdünnen der Stammlösungen mit MeOH/Wasser (1:1, v/v bzw. 2,5:1, v/v) wurden die verwendeten Mischstandards hergestellt.

13.3 Datenauswertung

Die Auswertung der QTRAP-Massenspektren und die Integration der Peaks erfolgte mit der Software Analyst® 1.6.2 (AB Sciex, Framingham, USA). Als weitere Geräte-Software diente Chromeleon® 6.80SR8 Build2633 und Dionex Chromatography MS Link™ 2.8.0.2633 von Dionex (Sunnyvale, CA, USA).

Die Auswertung der QTOF-Massenspektren und die Integration der Peaks erfolgte mit der Software Analyst® TF 1.7.1, MultiQuant™ 3.0.2, PeakView® 2.2 (AB Sciex, Framingham, USA).

Als Software für die AAS-Analysen diente Thermo Solaar, Version 11,02 mit der Spektrometersoftware Version 1,29 von Thermo Scientific

Als Software des TOC-Analysators wurde DIMAQS® 5.0 Dimatec verwendet.

Mittels Microsoft Excel® 2010 erfolgte die Auswertung der Daten. Die statistische Auswertung wurde mit der Software SigmaPlot® 12.5 durchgeführt. Die einzelnen durchgeführten statistischen Tests sind in den zugehörigen Kapiteln erläutert.

13.4 Probenmaterial

13.4.1 Kontrollboden

Für die Methodenentwicklungen und -Validierungen, sowie für die Sorptionsstudie, wurde ein analytfreier Tonboden verwendet. Dieser stammte aus einer Grünfläche aus D-Pohlheim in Hessen ($50^{\circ}32'33,312''\text{N}$, $8^{\circ}42'15,2''\text{E}$). Nach Probenahme erfolgte die Trocknung des Bodens im Trockenschrank. Der Boden wurde vor Verwendung gesiebt.

Der analytfreie Boden besteht aus 3,1 % Sand, 32,5 % Schluff und 64,4 % Ton mit einem Anteil an organischem Kohlenstoff von 3,6 % und einem pH-Wert von 5,2.

Für den Vergleich der Wiederfindungen mit unterschiedlichen Böden wurde ein analytfreier Sandboden „Volksmarer Sand“ verwendet. Dieser besteht aus 72,9 % Sand, 19,1 % Schluff und 8 % Ton mit einem organischen Kohlenstoffanteil von 0,55 % und einem pH-Wert von 6,8.

Zusätzlich wurde ein Lößboden „Baunataler Löß“ verwendet. Dieser besteht aus 3,3 % Sand, 76,4 % Schluff und 20,3 % Ton mit einem organischen Kohlenstoffanteil von 0,88 % und einem pH-Wert von 7,4 (LHL, 2014).

13.4.2 Bodendauerbeobachtungsfläche „Weser-Ems“

Die Bodendauerbeobachtungsfläche (BDF) „Weser-Ems“ liegt in Niedersachsen. Die Beprobung wird seit 1993 regelmäßig vom Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie (LBEG) in Hannover durchgeführt. Die Probennahme erfolgt in 10 cm Abständen bis zu einer maximalen Tiefe von 90 cm von insgesamt vier Kernflächen (K1 – K4) (Hamscher *et al.*, 2002). Nach Probennahme wurden die Proben gekühlt und im Dunklen transportiert und anschließend bei frostfrei, in der Regel < 20 °C im Dunkeln gelagert.

Bei dem Boden der BDF „Weser-Ems“ handelt es sich um einen sandigen Boden. Dieser besteht aus 91,6 % Sand, 6 % Schluff und 2,4 % Ton mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 4,5 (Hamscher *et al.*, 2002). Die pH-Werte der einzelnen Bodenschichten schwankten zwischen 4,1-4,7. Im Oberboden wurde ein durchschnittlicher Gesamt-Kohlenstoffgehalt von 1,2 % bestimmt, im Unterboden beträgt dieser 0,4 %.

13.5 Analysenmethoden

13.5.1 UHPLC/QTRAP-Methode für Sulfonamide (SA) und Tetracycline (TCs)

Für die chromatographische Trennung wurde die Säule Kinetex PFP (2.6 µm, 50 x 4,6 mm) verwendet. Das Eluentensystem setzte sich aus (A) 3 mM Ammoniumformiat mit 0,5 % AS und (B) MeOH mit 0,1 % AS zusammen (Tab. 13.4). Die Säulentemperatur wurde auf 15 °C eingestellt. Bis zur Messung wurden die Proben bei 10 °C im Autosampler aufbewahrt. Das Injektionsvolumen betrug 4 µL. Dem Injektionssystem diente ein Gemisch aus Isopropanol/Wasser (1:1, v/v) als Waschlösung. Der verwendete UHPLC-Gradient ist in Tab. 13.4 dargestellt. Das UHPLC-Eluat wurde vor Einleiten in die Ionenquelle mit einem Splitverhältnis von 1:10 geteilt.

Tab. 13.4: UHPLC-Gradient für die Analyse von SA und TCs mittels UHPLC/QTRAP.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	0,5	78	22
0,5	0,5	78	22
5,0	0,5	60	40
5,5	0,5	60	40
6,5	0,5	35	65
7,5	0,5	35	65
9,1	0,9	1	99
12,0	0,9	1	99
12,2	0,5	78	22

Die Detektion der Analyten erfolgte mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) sowie im ESI+-Modus. Die Ionisierung aller Analyten wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Kapillarspannung 5000 V, Curtain Gas 25 psi, Kollisionsgas Medium, Zerstäubergas 35 psi, Heizgas 45 psi, Quelltemperatur 500 °C. Diese Parameter sind gerätespezifisch. Die Aufnahmezeit pro Massenübergang betrug 100 ms. Für jeden Analyten wurden die optimalen Potentiale und Fragment-Ionen durch Direktinfusion der Standardlösungen ermittelt (vgl. Tab. 13.5 und Tab. 13.6). Die internen Standards wurden mit den Potentialen der nicht isotopenmarkierten Substanzen vermessen.

Tab. 13.5: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von SA mittels QTRAP.

Analyt	Vorläuferion [M+H]⁺ [m/z]	DP [V]	CEP [V]	EP [V]	Fragment- Ionen [m/z]	CE [V]	CXP [V]
SCY	285,1	37	10	4		34 21	2,5 4,8
SDM	311,1	40	13	5		41 30	2,5 3,0
SDZ	251,1	35	14	4		33 22	3,0 3,0
SGU	215,1	28	11	3		31 20	2,4 3,2
SMPD	281,1	40	12	4	108,1 156,1	36 24	2,8 3,0
SMR	265,1	40	14	4		34 23	2,7 4,9
SMX	254,1	27	12	4		32 22	2,3 3,0
SMZ	279,1	43	12	4		38 27	2,9 4,6
SPY	250,1	39	13	4		34 23	2,4 2,3
STZ	256,1	35	15	4		33 20	2,5 4,2

DP: Declustering Potential, CEP Eintrittspotential Kollisionszelle, EP: Eintrittspotential, CE: Kollisionsenergie, CXP: Kollisionsaustrittspotential

Tab. 13.6: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von Tetracyclinen mittels QTRAP.

Analyt	Vorläuferion [M+H] ⁺ [m/z]	DP [V]	CEP [V]	EP [V]	Fragment- Ionen [m/z]	CE [V]	CXP [V]
CTC	479,2	49	20	4	154,2	37	3,0
					444,3	27	6,7
Doxy	445,3	50	15	5	154,2	39	3,7
					428,4	24	6,5
OTC	461,2	41	16	4	426,2	24	6,6
					444,2	21	7,0
TC	445,2	48	14	5	154,2	38	4,7
					410,3	24	6,3
IsoCTC	479,2	47	18	5	462,4	27	7,3

DP: Declustering Potential, CEP Eintrittspotential Kollisionszelle, EP: Eintrittspotential, CE: Kollisionsenergie, CXP: Kollisionsaustrittspotential

13.5.2 UHPLC/QTOF-Methode für SA und TCs

Für die chromatographische Trennung wurde die Säule Kinetex PFP (2.6 µm, 50 x 4,6 mm) verwendet. Das Eluentensystem setzte sich aus (A) Reinstwasser mit 2 % ACN und 0,1 % AS und (B) ACN zusammen (Tab. 13.7). Die Säulentemperatur betrug Raumtemperatur. Bis zur Messung wurden die Proben bei 10 °C im Autosampler aufbewahrt. Das Injektionsvolumen betrug 2 µL. Dem Injektionssystem diente ein Gemisch aus Isopropanol/Wasser (1:1, v/v) als Waschlösung. Der verwendete UHPLC-Gradient ist in Tab. 13.7 dargestellt. Das UHPLC-Eluat wurde vor Einleiten in die Ionenquelle mit einem Splitverhältnis von 1:2 geteilt.

Tab. 13.7: UHPLC-Gradient für die Analyse von SA und TCs mittels UHPLC/QTOF.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	0,5	91	9
1,0	0,5	91	9
6,5	0,5	70	30
9,5	0,6	1	99
11,5	0,6	1	99
11,7	0,5	9	9
12,3	0,5	9	9

Die Detektion der Analyten erfolgte im ESI⁺-Modus im Fullscan sowie mittels Produktionenscan. Die Ionisierung der Analyten erfolgte mit folgenden Parametern: Kapillarspannung 5000 V, Curtain Gas 35 psi, Gas 1 55 psi, Gas 2 60 psi, Quelltemperatur 500 °C. Diese Parameter sind gerätespezifisch. Die Massenspektrometer-Parameter sind folgend gelistet und sind ebenfalls gerätespezifisch: Declustering Potential 100 V, Kollisionsenergie 35 V (Fullscan 5 V), Kollisionsenergiebereich 15 V, Ionen Release Delay 67 V, Ionen Release Width 25 V.

13.5.3 UHPLC/QTRAP-Methode für Altrenogest

Für die chromatographische Trennung wurde die Säule Kinetex PFP (2.6 μm , 50 x 4,6 mm) verwendet. Das Eluentensystem setzte sich aus (A) 1mM Ammoniumacetat mit 0,5 % AS und (B) ACN/MeOH (1:1, v/v) zusammen (Tab. 13.8). Die Säulentemperatur wurde auf 15 °C eingestellt. Bis zur Messung wurden die Proben bei 10 °C im Autosampler aufbewahrt. Das Injektionsvolumen betrug 2 μL . Dem Injektionssystem diente ein Gemisch aus Isopropanol/Wasser (1:1, v/v) als Waschlösung. Der verwendete UHPLC-Gradient ist in Tab. 13.8 dargestellt. Das UHPLC-Eluat wurde vor Einleiten in die Ionenquelle mit einem Splitverhältnis von 1:10 geteilt.

Tab. 13.8: UHPLC-Gradient für die Analyse von Altrenogest mittels UHPLC/QTRAP.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	0,7	50	50
1,0	0,7	50	50
1,2	0,7	30	70
2,2	0,7	30	70
2,3	0,9	1	99
3,3	0,9	1	99
4,4	0,7	50	50
5,0	0,7	50	50

Die Detektion der Analyten erfolgte mittels MRM sowie im ESI⁺-Modus. Die Ionisierung aller Analyten wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Kapillarspannung 5000 V, Curtain Gas 25 psi, Kollisionsgas Medium, Zerstäubergas 35 psi, Heizgas 45 psi, Quelltemperatur 500 °C. Diese Parameter sind gerätespezifisch. Die Aufnahmezeit pro Massenübergang betrug 100 ms. Für jeden Analyten wurden die optimalen Potentiale und Fragment-Ionen durch Direktinfusion der Standardlösungen ermittelt (vgl. Tab. 13.9).

Tab. 13.9: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von Altrenogest (Alt) und Progesteron (Pro) mittels QTRAP.

Analyt	Vorläuferion [M+H] ⁺ [m/z]	DP [V]	CEP [V]	EP [V]	Fragment- Ionen [m/z]	CE [V]	CXP [V]
Alt	311,2	32	10	4	227,2	33	5
					269,3	20	8
Pro	315,2	34	13	5	97,1	35	3
					109,1	39	3

DP: Declustering Potential, CEP Eintrittspotential Kollisionszelle., EP: Eintrittspotential, CE: Kollisionsenergie, CXP: Kollisionsexitpotential

13.5.4 UHPLC/QTOF-Methode für *Seco-cylin*

Für die chromatographische Trennung wurde die Säule Kinetex PFP (2.6 μm , 50 x 4,6 mm) verwendet. Das Eluentensystem setzte sich aus (A) 1mM Ammoniumacetat mit 0,5 % AS und (B) ACN zusammen (Tab. 13.10). Die Säulentemperatur betrug Raumtemperatur. Bis zur Messung wurden die Proben bei 10 °C im Autosampler aufbewahrt. Das Injektionsvolumen betrug 4 μL . Dem Injektionssystem diente ein Gemisch aus Isopropanol/Wasser (1:1, v/v) als Waschlösung. Der verwendete UHPLC-Gradient ist in Tab. 13.10 dargestellt. Das UHPLC-Eluat wurde vor Einleiten in die Ionenquelle mit einem Splitverhältnis von 1:2 geteilt.

Tab. 13.10: UHPLC-Gradient für die Analyse von *Seco-cylin* mittels UHPLC/QTOF.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0,35	92	8
9,5	0,35	35	65
9,6	0,35	1	99
11,0	0,35	1	99
11,1	0,35	92	8
13,0	0,35	92	8

Die Detektion der Analyten erfolgte im ESI-Modus im Fullscan sowie mittels Produktionenscan. Die Ionisierung der Analyten erfolgte mit folgenden Parametern: Kapillarspannung -4500 V, Curtain Gas 35 psi, Gas 1 55 psi, Gas 2 60 psi, Quelltemperatur 200 °C. Diese Parameter sind gerätespezifisch. Die Massenspektrometer-Parameter sind folgend gelistet und sind ebenfalls gerätespezifisch: Declustering Potential -70 V, Kollisionsenergie -33 V (Fullscan -5 V), Kollisionsenergiebereich 0 V, Ionen Release Delay 67 V, Ionen Release Width 25 V.

13.5.5 AAS Messungen der Kupferkonzentrationen in Bodenlösungen

Das Temperaturprogramm der Graphitrohr-AAS für die Bestimmung von Kupfer in den Bodensäulenlösungen ist in Tab. 13.11 dargestellt. Das Probenvolumen betrug 20 μL bei einer Injektionstemperatur von 70 °C. Als Inertgas diente Argon. Die Küvette stellte eine Omega-Küvette dar. Die Untergrundkorrektur erfolgte mittels Zeeman. Die untersuchte Wellenlänge betrug 324,8 nm mit einer Bandbreite von 0,5 nm und einem Lampenstrom von 80 %.

Tab. 13.11: AAS-Temperaturprogramm für die Bestimmung von Kupfer.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anstieg [°C/s]	Gasfluss [mL/min]
1	100	30	10	0,2
2	850	20	150	0,2
3	2100	3	0	-
4	2500	3	0	0,2

13.5.6 DOC-Messungen

Bei der Bestimmung des DOC-Gehaltes wurde der gesamte organische Kohlenstoff in den flüssigen Bodenextrakten mittels thermischer Oxidation bestimmt. Dazu wurden 100 µL der aufgearbeiteten Bodenlösung in den TOC-Analysator injiziert. Die Reaktortemperatur für die thermische Oxidation betrug 850 °C. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung mittels Kaliumhydrogenphthalat.

13.5.7 Messung der Kohlenstoffgehalte

Die Bestimmung des Gesamt-Kohlenstoffgehaltes des Bodens der Region „Weser-Ems“ sowie die Bestimmung des organischen Kohlenstoffgehaltes des analytfreien Bodens wurden im Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung der Justus-Liebig-Universität mittels Vario EL III der Firma Elementar Americas Inc (NY, USA) durchgeführt.

13.6 Probenvorbereitung

13.6.1 Bestimmung der Trockenmasse

Für die Bestimmung der Trockenmasse wurde die Probe auf 0,001 g genau in ein mit Seesand konstant gewogenes Porzellanschälchen überführt. Mit einem Glasstab erfolgten eine Vermischung der Probe mit dem Seesand sowie eine Verkleinerung von großen Partikeln. Die Probe wurde bis zur Massenkonstanz im Trockenschrank bei 105 °C (± 2 °C) getrocknet. Im Anschluss wurde der Massenverlust bestimmt und die Trockenmasse berechnet. Weiterhin erfolgte die Trockenmassenbestimmung mittels Feuchtegehaltbestimmer.

13.6.2 Bestimmung der pH-Werte

Zur Bestimmung der pH-Werte von Boden wurde eine modifizierte Methode der Norm „Bodenbeschaffenheit-Bestimmung des pH-Wertes“ DIN ISO 10390 (2005-12) verwendet. Aufgrund von geringer vorhandener Probenmenge wurde 1 g Boden mit 5 mL einer 0,01 M CaCl₂-Lösung für 5 Minuten geschüttelt und anschließend für mindestens zwei Stunden ruhen gelassen. Nach erneutem Aufschütteln der Proben wurden die pH-Werte gemessen.

13.6.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion für SA und TCs

Zur Bestimmung der Sulfonamid- und Tetracyclinkonzentrationen wurde 1 g Boden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Probe wurde mit dem internem Standard dotiert (70 µg/kg, ¹³C₆ isotopenmarkiertes SDZ, SMX und SMZ) und für 7 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert.

Die erste Extraktion erfolgte mit 3 mL Citrat-Puffer für 10 Minuten mittels Vortex-Genie 2 mit dem Aufsatz „Multi-Holder Tube“ im Dauerbetrieb, nachdem eine Mischung des Boden/Citrat-Puffer Gemischs mittels Vortexer durchgeführt wurde. Nach Zentrifugation (3 min,

3000 *g*, 10 °C) wurde der Überstand in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Für die zweite Extraktion wurden auf den Rückstand 2 mL Citrat-Puffer und 4 mL Methanol gegeben. Eine Mischung und Lockerung des Rückstandes erfolgte erneut mittels Vortexer. Die Zentrifugenröhrchen wurden auf dem Horizontalschüttler für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss bei 720 1/min geschüttelt. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand mit dem Überstand der ersten Extraktion vereinigt. Um den organischen Anteil zu senken, wurden die Proben anschließend bei 40 °C für 30 min im Stickstoffstrom behandelt. Nachdem die Proben mit Reinstwasser auf ein Volumen von 27,5 mL verdünnt wurden, um eine weitere Senkung der Konzentration des organischen Anteils zu erwirken, erfolgte die automatische Festphasenextraktion (ASPEC).

Die Durchführung erfolgte nach folgendem Schema:

Konditionierung	→	Probenaufgabe	→	Elution
3 mL MeOH+0,1 % AS 3 mL MeOH 3 mL Citrat-Puffer		25 mL Probe Chromabond®-HRX		2 x 1 mL MeOH + 0,1 % AS 2 x 1 mL MeOH

Die Eluate der SPE wurden in einen 10 mL Spitzkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte mit 2 x 100 µL MeOH/Wasser (1:1, v/v). Anschließend wurden die Proben bei -18 °C ausgefroren. Zum Entfernen von Schwebstoffen und Partikeln wurden die Proben, vor dem Abfüllen in HPLC-Vials, zentrifugiert (3 min, 13300 *g*, 10 °C). Für die Messung mittels UHPLC/QTRAP wurden die Proben unverdünnt eingesetzt. Für die Messung mittels UHPLC/QTOF erfolgte eine Verdünnung von 1:5 mit MeOH/Wasser (1:1, v/v). Zur Quantifizierung wurde ein Lösungsmittel-Mischstandard aus allen Analyten mit der Konzentration 100 µg/kg (IST: 70 µg/kg) hergestellt.

13.6.4 Mikrowellenextraktion für SA

Bevor die Proben mittels Mikrowellenextraktion aufgearbeitet wurden, wurde 1 g Boden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit internem Standard dotiert (50 µg/kg, ¹³C₆ isotopenmarkiertes SDZ, SMX und SMZ) und für 7 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Für die Extraktion wurden die Proben aus den Zentrifugenröhrchen quantitativ mit 6 mL ACN/Citrat-Puffer (4:1, v/v) in ein 100 mL PTFE-Extraktionsgefäß des Hochdruckrotors HPR-1000/10S überführt. Anschließend wurden die Gefäße geschwenkt. Nach Schließen der PTFE-Extraktionsgefäße erfolgte die Mikrowellenextraktion.

Das Temperaturprogramm der Mikrowelle umfasste folgende Heizschritte:

- a. Aufheizen auf 100 °C innerhalb von 6 min
- b. Halten von 100 °C für 15 min
- c. Ventilieren für 15 min (Abkühlphase)

Nach Ende des Mikrowellenprogramms wurden die PTFE-Extraktionsgefäße im Eisbad weiter abgekühlt und anschließend im Abzug geöffnet. Die Extrakte wurden in ein frisches 15 mL Zentrifugenröhrchen quantitativ überführt und zentrifugiert (3 min, 3000 *g*, 10 °C). Nach Zentrifugation wurden die Proben für 45 Minuten im Stickstoffstrom eingengt und mit Reinstwasser ad 27,5 mL verdünnt.

Die weitere Aufarbeitung der Extrakte mittels ASPEC und anschließender Aufnahme in MeOH/Wasser (1:1, v/v) entspricht dem Vorgehen aus Kapitel 13.6.3.

13.6.5 Extraktionsmethoden für Altrenogest

Die Extraktion von Altrenogest erfolgte einmal aus Boden und aus der wässrigen Phase. Mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde Altrenogest aus Boden extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit automatischer Festphasenextraktion aufgearbeitet.

Boden

Zur Extraktion wurden 1 g feuchter Boden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Der Boden wurde mit internem Standard (Progesteron, 50 µg/kg) dotiert und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 5 mL ACN auf die Probe gegeben und die Probe durchmischt. Die Extraktion erfolgte anschließend für 20 Minuten auf dem Horizontalschüttler mit 720 1/min unter Lichtausschluss. Nach Zentrifugation (3 min, 3000 *g*, 10 °C) wurde der Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführt. Auf den Boden wurden erneut 5 mL ACN gegeben, durchmischt und erneut 20 Minuten auf dem Horizontalschüttler extrahiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände im Spitzkolben vereinigt und bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt.

Wässrige Phase

Für die automatische Festphasenextraktion wurden 10 mL wässrige Phase eingesetzt. Dafür wurden die Proben in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit internem Standard (Progesteron 5 µg/L) versetzt. Zusätzlich wurden 3 mL Wasser und 1 mL ACN in die Proben gegeben. Die Durchführung der automatischen Festphasenextraktion erfolgte nach folgendem Schema:

Konditionierung →	Probenaufgabe →	Waschschritt →	Elution
3 mL ACN 3 mL ACN + 5 % NH ₃ 3 mL 10 % ACN	10 mL Probe Chromabond®-HRX	3 mL 10 % ACN	2 x 1 mL ACN 2 x 1 mL ACN + 5 % NH ₃

Die Eluate der SPE wurden in einen 10 mL Spitzkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Die weitere Vorgehensweise war für die wässrige Phase und für den Boden identisch. Die Aufnahme der Rückstände erfolgte mit 2 x 200 µL MeOH/Wasser/ACN (0,5:0,5:1, v/v/v). Anschließend wurden die Proben bei -18 °C ausgefroren. Zum Entfernen von Schwebstoffen und Partikeln wurden die Proben, vor dem Abfüllen in HPLC-Vials, zentrifugiert (3 min, 13300 g, 10 °C). Für die Messung mittels UHPLC/QTRAP wurden die Proben unverdünnt eingesetzt.

13.6.6 Königswasseraufschluss für Kupfer und Zink

Der mikrowellenunterstützte Königswasseraufschluss wurde für die Bestimmung von Kupfer und Zink in den Bodenproben herangezogen. Die Basis der verwendeten Methode stellte die Modifikation der Norm „Schlamm, behandelter Bioabfall und Boden-Aufschluss von mit Königswasser löslichen Anteilen von Elementen“ (DIN EN 16174) sowie die Applikation E708 der MLS GmbH (Mikrowellen Laborsysteme GmbH) dar.

Die Proben der Tiefe 0-10 cm, 10-20 cm und 20-30 cm der jeweiligen Teilfläche wurden für eine Mischprobe vereinigt. Dazu wurden die einzelnen Proben zunächst homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 5 g Probe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Homogenität der Mischprobe geschüttelt.

Für die Extraktion standen 10 PTFE-Extraktionsgefäße zur Verfügung. Diese wurden zu Beginn mit HNO₃ (verd.) ausgespült, um eine Kontamination zu verhindern. Für die Extraktion wurden jeweils 0,5 g Boden in ein PTFE-Extraktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 2 mL Reinstwasser, 6 mL HCl (konz.) und 2 mL HNO₃ (konz.) hinzugegeben. Die Gefäße wurden geschwenkt und 5 Minuten im Abzug stehen gelassen, so dass erste entstehende Gase entweichen konnten. Nach Schließen der PTFE-Extraktionsgefäße erfolgte die Mikrowellenextraktion.

Bei jedem Mikrowellendurchgang wurde ein Referenzboden in einem Referenzgefäß, zur Überprüfung einer erfolgreichen Extraktion, mitgeführt. Das Temperaturprogramm der Mikrowelle umfasste folgende Heizschritte:

- a. Aufheizen auf 120 °C innerhalb von 3:30 min
- b. Weiteres Aufheizen auf 175 °C innerhalb von 4 min
- c. Halten von 175 °C für 10 min
- d. Ventilieren für 15 min (Abkühlphase)

Nach Ende des Mikrowellenprogramms wurden die PTFE-Extraktionsgefäße im Eisbad weiter abgekühlt und anschließend im Abzug geöffnet. Die Lösung wurde mit 20 mL H₂O verdünnt und über einen säureresistenten Filter in einen 50 mL-Messkolben filtriert. Die PTFE-Extraktionsgefäße wurden mit HNO₃ (verd.) nachgespült und über den Rückstand im Filter gegeben. Des Weiteren wurde der Rückstand mit HNO₃ (verd.) gewaschen. Nach Abtropfen des Filters wurde ad Marke mit Reinstwasser aufgefüllt. Der fertige Extrakt wurde in ein 100 mL Schraubdeckelgefäß überführt und bis zur Messung dunkel und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Extrakte wurden mittels ICP-OES und ICP-MS (Tab. 13.12), beide Geräte von der Firma PerkinElmer Inc. in Waltham USA, im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (D-Kassel-Harleshausen) vermessen.

Tab. 13.12: ICP-OES und ICP-MS Parameter.

ICP-OES		ICP-MS	
OPTIMA 8300		Nexion 300D	
Plasma	12 L/min	Plasma	16 L/min
Auxillary	0,2 L/min	Nebulizer	0,94 L/min
Nebulizer	0,6 L/min	RF Power	1300 W
RF Power	1300 W	Isotope:	
Plasmatemperatur	ca. 9000 °C	Kupfer	63
Wellenlängen:		Zink	66
Kupfer	324,752 nm	Interner Standard	Rhodium
Zink	213,857 nm		

Die Ergebnisse der Bestimmung [mg/kg] beziehen sich auf die Trockenmasse. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software SigmaPlot® 12.5.

13.6.7 Extraktion mittels Ultraschallsonde

Für die Extraktion mittels Ultraschallsonde wurde 1 g Boden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Dotierung des Bodens mit Analyten und internem Standard erfolgte die Zugabe von 2 mL Citrat-Puffer und 4 mL Methanol. Nach Homogenisierung erfolgte die Extraktion für 2 x 15 Sekunden mit einer Amplitude von 50 % bei einer Pulsstufe von 9 (0,9 Sekunden Arbeitsschritt und 0,1 Sekunden Ruheschritt).

Die weitere Aufarbeitung der Extrakte mittels ASPEC und anschließender Aufnahme in MeOH/Wasser (1:1, v/v) entspricht dem Vorgehen aus Kapitel 13.6.3.

13.6.8 Kupfer Leachingexperiment im Labormaßstab mit Realproben

Als Bodensäulen wurden 50 mL Zentrifugenröhrchen verwendet, in dem sie am unteren Ende aufgeschnitten wurden. Aschefreies Filterpapier wurde zum Abdichten des Loches verwendet. Das Filterpapier wurde mit wenigen Tropfen Reinstwasser befeuchtet und angedrückt. Anschließend wurden 10 g der jeweiligen Bodenprobe „Weser Ems“ in das Zentrifugenröhrchen eingefüllt und mit einem weiteren Filterpapier bedeckt. Die Säulen wurden senkrecht angebracht und mit 10 mL Reinstwasser versetzt und das Sickerwasser aufgefangen. Das schrittweise Bewässern der Bodensäulen mit 10 mL Reinstwasser erfolgte tageweise. Die Eluate wurden zur Konzentrationsbestimmung von Kupfer eingesetzt, indem diese mit 50 mL verdünnter Salpetersäure aufgefüllt wurden. Vor Messung wurden die Eluate zentrifugiert (10 min, 13300 *g*, 20 °C). Die Lagerung der Eluate erfolgte bei 5 °C.

13.6.9 DOC-Extraktion

Für die DOC-Extraktion wurden 0,5 g Boden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 10 mL einer 0,5 molaren Kaliumsulfat-Lösung die auf einen pH-Wert < 2 eingestellt wurde, (43,57 g auf 0,5 L Reinstwasser) versetzt (Carrillo-Gonzalez *et al.*, 2013). Die Probe wurde homogenisiert und für 10 min auf dem Horizontalschüttler bei 720 1/min extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min, 3000 *g*, 10 °C) wurde der Überstand über einen Spritzenvorsatzfilter (0,45µm) in das Probengefäß des TOC-Analysators überführt.

13.6.10 Bestimmung von Huminstoffen in Böden

Für die Extraktion wurden 5 g Boden mit jeweils 25 mL Natronlauge (0,1 M) und Natriumpyrophosphat (0,1 M) versetzt und fünf Stunden auf dem Horizontalschüttler bei 720 1/min extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 *g*) wurde der Überstand filtriert und photometrisch bei 472 nm analysiert, um die Huminstoffe zu bestimmen. Für die Bestimmung der Fulvosäuren wurde die filtrierte Lösung mit Salzsäure auf einen pH-Wert < 1 angesäuert und erneut zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde photometrisch bei 472 nm analysiert. Der erhaltene Rückstand wurde durch mehrmaliges Waschen mit angesäuertem Wasser gewaschen und bei 105 °C für 2 Stunden getrocknet. Die Aufnahme erfolgte anschließend in 50 mL Natronlauge (0,1M). Diese Lösung wurde bei 472 nm sowie bei 664 nm vermessen. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer externen Kalibrierung mittels Huminsäurestandard (Rump, 1998).

13.6.11 Seco-cyclin-Extraktion

Für die Aufarbeitung wurden 2 g Boden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 6 mL Citrat-Puffer versetzt. Mittels Vortexer wurde das Boden/Citrat-Puffer-Gemisch intensiv gemischt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit dem Horizontalschüttler, bei 720 1/min für 20 Minuten. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 *g*) wurde der Überstand abdekantiert und der

Rückstand mit weiteren 6 mL Citratpuffer versetzt. Mittels Vortexer erfolgte die erneute Vermischung von Boden und Citrat-Puffer. Anschließend wurde eine zweite Extraktion mit dem Horizontalschüttler für 20 Minuten durchgeführt. Beide Überstände wurden vereinigt, mittels SPE aufgereinigt, die Eluate aufgenommen und bei -18 °C aufbewahrt (vgl. Kap. 13.6.3).

13.7 Sorptionsstudie Altrenogest

Die Sorptionsstudie erfolgte in 50 mL Zentrifugenröhrchen. Insgesamt wurden zwei unterschiedliche Ansätze, jeweils in Doppelbestimmung, durchgeführt. Bei Ansatz AB wurde der Wirtschaftsdünger mit Altrenogest versetzt und auf den Boden gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der Wasserphase. Bei Ansatz B wurde kein Wirtschaftsdünger auf den Boden gegeben, sondern lediglich ein Boden/Wasser-System hergestellt, bei dem das Wasser mit Altrenogest dotiert wurde (vgl. Abb. 13.1). Für die Ansätze wurden analytfreier Boden und analytfreie Schweinegülle sowie destilliertes Wasser verwendet.



Abb. 13.1: Aufbau der Sorptionsstudie von Altrenogest für Ansatz AB und B.

Für Ansatz AB wurden 4,9 g analytfreier Boden in die Zentrifugenröhrchen eingewogen. Anschließend wurden 0,1 g der mit Altrenogest dotierten Schweinegülle (5 mg/kg) auf den Boden gegeben und durch Schütteln homogenisiert. Nach Zugabe von 25 mL Wasser wurden die Zentrifugenröhrchen verschlossen und durch Schütteln die Vermischung der zwei Phasen sichergestellt. Für Ansatz B wurden 5 g Boden in die Zentrifugenröhrchen eingewogen. Danach wurden 25 mL Wasser hinzugefügt, welches zuvor mit der äquivalenten Menge Altrenogest (500 ng) wie Ansatz AB dotiert wurde. Durch Schütteln erfolgte die Vermischung der beiden Phasen.

Die Zentrifugenröhrchen wurden aufrecht stehend bei Raumtemperatur im Dunkeln bis zur Probenahme gelagert. Diese erfolgte nach 1 Stunde, 1 Tag, 3 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 28

Tagen. Für jeden Probennahmetag wurden Zentrifugenröhrchen mit den obigen Ansätzen in Doppelbestimmung angesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Matrixstandards (wässrige Phase: 2,5 ng/mL, Boden: 10 µg/kg) über das Verhältnis der Peakfläche Analyt/ Peakfläche IST, welche für jeden Probennahmetag frisch aufgearbeitet wurden. Für jeden Probennahmetag wurde ein Blindwert-Ansatz, nach Vorbild von Ansatz B, mitgeführt. Der Blindwert-Boden diente nach Dotierung mit Altrenogest und Inkubation von einer Stunde als Probenmatrix für den Bodenmatrixstandard. 10 mL Blindwert-Lösung dienten nach Dotierung mit Altrenogest als Probenmatrix für den Matrixstandard der wässrigen Phase.

Zur Auswertung der Sorptionsstudie wurde der prozentuale Anteil in der wässrigen Phase sowie im Boden nach folgenden Gleichungen bestimmt:

$$P_{\text{Boden}} [\%] = \frac{G_{\text{Boden}}}{G_{\text{Start}}} \times 100 [\%]$$

$$P_{\text{wässrig}} [\%] = \frac{G_{\text{wässrig}}}{G_{\text{Start}}} \times 100 [\%]$$

P_{Boden} : Anteil von Altrenogest im Boden [%]

$P_{\text{wässrig}}$: Anteil von Altrenogest in der wässrigen Phase [%]

G_{Boden} : Anteil von Altrenogest im Boden [ng]

$G_{\text{wässrig}}$: Anteil von Altrenogest in der wässrigen Phase [ng]

G_{Start} : Dotierungsmenge von Altrenogest [ng]

Die K_D -Werte wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$K_D = \frac{G_{\text{Boden}}}{G_{\text{wässrig}}}$$

G_{Boden} : Anteil von Altrenogest im Boden [ng]

$G_{\text{wässrig}}$: Anteil von Altrenogest in der wässrigen Phase [ng]

Die K_{OC} -Werte wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$K_{OC} = K_D \times \frac{100}{\% OC}$$

%OC: Gehalt an organischem Kohlenstoff (vgl. Kap. 13.4.1)

Der log- K_{OC} -Wert wurde durch Bildung des dekadischen Logarithmus von K_{OC} gebildet.

13.8 Matrixeffekte

13.8.1 Qualitativer Matrixeffekt

Der qualitative Matrixeffekt wurde mittels Post-column-Infusion bestimmt. Mit dieser Methode kann überprüft werden, ob das Signal der Analyten aufgrund von Matrix unterdrückt oder verstärkt wird. Dazu wird mittels Spritzenpumpe ein konstanter Fluss (10 µL/min) des Analyten (1 µg/mL) in das Massenspektrometer eingeleitet. Über die UHPLC wird eine Probe (Matrix oder Methanol) injiziert, mit dem jeweiligen Gradienten aufgetrennt und ebenfalls in das Massenspektrometer eingeleitet. Das Splitverhältnis bleibt bestehen, indem mit einem Kreuzstück gearbeitet wird. Mit dem Vergleich der Signalintensitäten von Methanol und Leermatrix, zum Zeitpunkt der jeweiligen Elution eines Analyten, werden Signalunterdrückung oder Signalverstärkung kontinuierlich erfasst.

13.8.2 Quantitative Matrixeffekte

Zur Bestimmung der quantitativen Matrixeffekte (ME) wurde eine aufgearbeitete Leermatrix mit den Analyten dotiert und in das Verhältnis mit einem entsprechend konzentrierten Lösungsmittelstandard gesetzt. Matrixeffekte > 5 % deuten dabei auf eine Signalverstärkung und Matrixeffekte < 5 % auf eine Signalunterdrückung. Effekte unter 5 % werden als nicht signifikant angesehen und auf die Messvariation zurückgeführt. Die Bestimmung der (ME) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$ME = \left(\frac{B}{A} - 1 \right) \times 100 \%$$

A: Peakfläche Lösungsmittelstandard

B: Peakfläche dotierte Leermatrix

13.9 Methodvalidierung

13.9.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion für SA und TCs

Für die entwickelte Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden und Tetracyclinen wurde eine Validierung mit folgenden Parametern durchgeführt: Linearität, Intraday-Präzision, Interday-Präzision, Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze und Stabilität. Die Parameter wurden für dotierten Boden mit zwei Inkubationszeiten (Analyten: 10 Minuten und 7 Tage, IST: 10 Minuten) bestimmt. Die Validierung erfolgte sowohl für die Analyse mittels UHPLC/QTRAP als auch für die Analyse mittels UHPLC/QTOF.

Die Intraday-Präzision wurde anhand dotierter Proben mit zwei Konzentrationen (100 und 500 µg/kg) und jeweils sechs Replikationen bestimmt. Für die Bestimmung der

Interday-Präzision wurden dotierte Proben mit obigen Konzentrationen an drei aufeinanderfolgenden Tagen aufgearbeitet.

Der Linearitätsbereich wurde anhand einer Matrixkalibrierung mit 28 Konzentrationen im Bereich von 0,1 µg/kg bis 1 mg/kg bestimmt. Die Überprüfung der Linearität der einzelnen Analyten erfolgte mit dem Test nach Mandel (DIN 38402-51, 2017-05).

Mit dem Mandeltest wird geprüft, ob die quadratische Regression die Daten signifikant besser widerspiegelt als die lineare Regression.

$$y = a + bx + cx^2$$

$$y = a + bx$$

Beide Kalibrierfunktionen werden erstellt und die zugehörigen Reststandardabweichungen berechnet. Als „Reste“ werden die vertikalen Abstände von den einzelnen Messwerten zur errechneten Kalibrierfunktion bezeichnet. Die Standardabweichung aller Abstände ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Gerade bzw. Kurve.

Der Vergleich der Reststandardabweichungen der linearen und der quadratischen Kalibrierfunktion erfolgt rechnerisch durch Bildung der Differenz der Abweichungsvarianzen DS und wird wie folgt berechnet:

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{yx1}^2 - (N-3) \cdot s_{yx2}^2$$

DS = Differenz der Abweichungsvarianzen

N = Anzahl der Messungen

s_{yx1} = Reststandardabweichung der linearen Funktion

s_{yx2} = Reststandardabweichung der quadratischen Funktion

Der Prüfwert PW wird mit folgender Gleichung berechnet und mit dem Tabellenwert des F-Tests ($f_1 = 1$, $f_2 = N-3$, $P = 99\%$) verglichen.

$$PW = \frac{DS^2}{s_{yx2}^2}$$

Die Kalibrierfunktion ist im untersuchten Arbeitsbereich linear, wenn der $PW \leq TW$ ist (Kromidas, 2011). Für jeden Analyten erfolgte eine Einteilung in Arbeitsbereiche, welche durch Überprüfung der Varianzenhomogenität ermittelt wurden. Hierfür wurden die Standardabweichungen der Standards am unteren und oberen Ende des Arbeitsbereiches mittels F-Test verglichen ($P = 99\%$).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze in Matrix wurde über das Signal zu Rauschverhältnis (NWG: $S/N > 3$ und BG: $S/N > 10$) bestimmt. Dabei wurde der schwächere der beiden detektierten Massenübergänge zur Festsetzung der NWG und BG der einzelnen Analyten verwendet (Kromidas, 2011).

Die Stabilität der extrahierten Bodenproben wurde nach 1, 2, 7 und 31 Tagen, unter Lagerung bei -18 °C , untersucht.

Für die Berechnung der Wiederfindung wurde Boden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dotiert (Inkubation der Analyten: 10 Minuten und 7 Tage, Inkubation des IST: 10 Minuten) und aufgearbeitet. Anhand der Wiederfindungsfunktion wurde überprüft, ob aufgrund der Matrix ein konstant-systematischer Fehler oder ein proportional-systematischer Fehler vorlag. Mittels Lösungsmittelkalibrierung wurde die absolute Wiederfindung bestimmt. Die Bestimmung der absoluten Wiederfindung zur Quantifizierung erfolgte anhand der Lösungsmittelkalibrierung mit dotierten Proben (Inkubation der Analyten: 14 Tage; Inkubation des IST: 7 Tage).

Zur Prüfung auf systematische Fehler wurden zunächst die jeweiligen Wiederfindungsfunktionen aufgestellt. Hierfür wurden die Gehalte der Bodenproben anhand der Lösungsmittelkalibrierung berechnet und diese gegen die Kalibrierkonzentrationen aufgetragen. Im Idealfall ergäbe sich demnach eine Gerade mit einem Achsenabschnitt a von Null und einer Steigung b von Eins. Da Messwerte immer einer Streuung unterliegen, werden Vertrauensbereiche (VB) ermittelt, die diese Idealwerte einschließen müssen. Der Vertrauensbereich des Achsenabschnitts $\text{VB}(a)$ und der der Steigung $\text{VB}(b)$ werden nach folgenden Gleichungen bestimmt:

$$\text{VB}(a) = a \pm t_{p,f} \cdot s_a = a \pm t_{p,f} \cdot s_{xy} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}_c^2}{Q_{xx}}}$$

$$\text{VB}(b) = b \pm t_{p,f} \cdot s_b = b \pm \frac{t_{p,f} \cdot s_{xy}}{\sqrt{Q_{xx}}}$$

a = Achsenabschnitt

b = Steigung,

$t_{p,f}$ = Student-t-Faktor ($P = 99\%$, $f = N-2$)

N = Anzahl der Konzentrationsniveaus

s_{xy} = Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion

\bar{x}_c = Mittelwert aller Konzentrationsniveaus

$$Q_{xx} = \text{Quadratsumme } (x_i - \bar{x})^2$$

s_a = Standardabweichung der Regressionsgeraden des Achsenabschnitts

s_b = Standardabweichung der Regressionsgeraden der Steigung

Wenn der VB des Achsenabschnitts den Wert $a = 0$ nicht einschließt, liegt eine konstant-systematische Abweichung vor. Eine proportional-systematische Abweichung liegt vor, wenn der VB der Steigung den Wert $b = 1$ nicht einschließt. Ein konstant-systematischer Fehler ist unabhängig von der Konzentration der Analyten. Ein proportional-systematischer Fehler dagegen ist abhängig von der Konzentration der Analyten. Dies führt zu einer Änderung der Steigung der Matrixkalibriergeraden. Zum Ausgleich des proportional-systematischen Fehlers muss bei der Quantifizierung die Wiederfindung miteinberechnet werden (Funk, 2005; Kromidas, 2011).

13.9.2 Mikrowellenextraktion für SA

Folgende Parameter wurden zur Methodvalidierung der Mikrowellenextraktion bestimmt: Linearität, Intraday-Präzision, Interday-Präzision, Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Hierbei wurden Proben verwendet, die 7 Tage mit den Analyten inkubiert wurden (Ausnahme Präzision: 10 Minuten Inkubation). In Kap. 13.9.1 und Kap. 7.1 wurde die Stabilität von Bodenextrakten bereits untersucht und auf die Ergebnisse der MWE-Extrakte übertragen, da nur eine 48-stündige Stabilität gegeben war. Somit wurden die Proben direkt nach Aufarbeitung vermessen. Die Validierung erfolgte für die Analyse mittels UHPLC/QTRAP.

Die Intraday-Präzision wurde anhand dotierter Proben mit zwei Konzentrationen (100 und 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und jeweils sechs Replikationen bestimmt. Für die Bestimmung der Interday-Präzision wurden dotierte Proben mit obigen Konzentrationen an drei aufeinanderfolgenden Tagen aufgearbeitet.

Der Linearitätsbereich wurde anhand einer Matrixkalibrierung mit 10 Konzentrationen im Bereich von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 1 mg/kg bestimmt. Die Überprüfung der Linearität der einzelnen Analyten erfolgte mit dem Test nach Mandel (vgl. 13.9.1).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze in Matrix wurde über das Signal zu Rauschverhältnis (NWG: $S/N > 3$ und BG: $S/N > 10$) bestimmt. Dabei wurde der schwächere der beiden detektierten Massenübergänge zur Festsetzung der NWG und BG der einzelnen Analyten verwendet.

Für die Berechnung der Wiederfindung wurde Boden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dotiert (Inkubation der Analyten: 7 Tage, Inkubation des IST: 10 Minuten) und aufgearbeitet. Anhand der Wiederfindungsfunktion wurde überprüft, ob ein konstant-systematischer Fehler oder ein proportional-systematischer Fehler

vorlag. Mittels Lösungsmittelkalibrierung wurde die absolute Wiederfindung bestimmt. Die Bestimmung der absoluten Wiederfindung zur Quantifizierung erfolgte anhand der Lösungsmittelkalibrierung mit dotierten Proben (Inkubation der Analyten: 14 Tage; Inkubation des IST: 7 Tage). Zur Prüfung auf systematische Fehler wurden die jeweiligen Wiederfindungsfunktionen aufgestellt und Vertrauensbereiche berechnet (vgl. 13.9.1).

13.9.3 Extraktion von Altrenogest

Folgende Parameter wurden für die Methodvalidierung für die Extraktion von Altrenogest bestimmt: Linearität, Intraday-Präzision, Interday-Präzision, Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze und Stabilität. Hier erfolgte die Validierung sowohl für die wässrige Phase als auch für feuchten Boden. Die Inkubationszeit der Analyten mit dem Boden betrug 1 Tag. Die wässrige Phase wurde mit dem Verhältnis Boden/Wasser (1:5, m/v) hergestellt.

Die Intraday-Präzision wurde anhand dotierter Proben mit zwei Konzentrationen (5 ng/mL und 20 ng/mL sowie 60 µg/kg und 100 µg/kg) und jeweils sechs Replikationen bestimmt. Für die Bestimmung der Interday-Präzision wurden dotierte Proben mit obigen Konzentrationen an drei aufeinanderfolgenden Tagen aufgearbeitet.

Der Linearitätsbereich wurde anhand einer Matrixkalibrierung mit 10 Konzentrationen im Bereich von 0,1 ng/mL bis 40 ng/mL sowie 1 µg/kg bis 500 µg/kg bestimmt. Die Überprüfung der Linearität der einzelnen Analyten erfolgte mit dem Test nach Mandel (vgl. 13.9.1).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze in Matrix wurde über das Signal zu Rauschverhältnis (NWG: $S/N > 3$ und BG: $S/N > 10$) bestimmt. Dabei wurde der schwächere der beiden detektierten Massenübergänge zur Festsetzung der NWG und BG verwendet.

Für die Berechnung der Wiederfindung wurden Boden sowie wässrige Phase mit unterschiedlichen Konzentrationen (20, 40, 60, 80, 100, 600 µg/kg und 1, 2,5, 5, 10 und 20 ng/mL) dotiert und aufgearbeitet. Für feuchten Boden wurde die Methodenwiederfindung mittels Matrixkalibrierung nach einer Inkubationszeit des Analyten von 1 Stunde und 7 Tagen bestimmt (IST: 10 Minuten). Die Methodenwiederfindung der wässrigen Phase wurde nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde mittels Matrixkalibrierung bestimmt. Mittels Lösungsmittelkalibrierung wurde die absolute Wiederfindung bestimmt. Zur Prüfung auf systematische Fehler wurden die jeweiligen Wiederfindungsfunktionen aufgestellt und Vertrauensbereiche berechnet (vgl. 13.9.1).

Die Stabilität der reinen Lösungsmittelstandards sowie die Stabilität der Matrixextrakte wurde bestimmt. Die Lösungsmittelstandards wurden bei -18 °C gelagert und an Tag 1, 2, 8 und 31 analysiert. Die Matrixextrakte aus der wässrigen Phase und dem Boden wurden bei -18 °C gelagert und an den Tagen 1, 2, 8, 12, 19 und 33 analysiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ACS-Publications. 2018. Preparation and submission of manuscripts (revised feb 2018). *Authorguide Journal of Natural Products*.
- Aga, D.S., O'Connor, S., Ensley, S., Payero, J.O., Snow, D., Tarkalson, D. 2005. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(18), 7165-7171.
- American Chemical Society. 2018. SciFinder, Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2018 ACD/Labs). (zuletzt abgerufen 22.10.2018), <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, **50**(10), 1319-1330.
- Andreu, V., Vazquez-Roig, P., Blasco, C., Picó, Y. 2009. Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **394**(5), 1329-1339.
- Anliker, R., Clarke, E.A., Moser, P. 1981. Use of the partition coefficient as an indicator of bioaccumulation tendency of dyestuffs in fish. *Chemosphere*, **10**(3), 263-274.
- Anliker, R., Moser, P. 1987. The limits of bioaccumulation of organic pigments in fish: their relation to the partition coefficient and the solubility in water and octanol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **13**(1), 43-52.
- Annesley, T.M. 2003. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, **49**(7), 1041-1044.
- Arfania, H., Asadzadeh, F. 2015. Mobility of heavy metals after spiking in relation to sediment and metal properties: leaching column study. *Journal of Soils and Sediments*, **15**(11), 2311-2322.
- Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M. 2014. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*, **69**, 104-119.
- Awad, Y., Kim, S.-C., Abd El-Azeem, S.M., Kim, K.-H., Kim, K.-R., Kim, K., Jeon, C., Lee, S., Ok, Y. 2014. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environmental Earth Sciences*, **71**(3), 1433-1440.
- Bailey, C., Spielmeier, A., Hamscher, G., Schüttrumpf, H., Frings, R.M. 2016. The veterinary antibiotic journey: comparing the behaviour of sulfadiazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole and tetracycline in cow excrement and two soils. *Journal of Soils and Sediments*, **16**(6), 1690-1704.
- Balmer, M.E., Goss, K.-U., Schwarzenbach, R.P. 2000. Photolytic transformation of organic pollutants on soil surfaces an experimental approach. *Environmental Science & Technology*, **34**(7), 1240-1245.

- Benijts, T., Dams, R., Lambert, W., De Leenheer, A. 2004. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *Journal of Chromatography A*, **1029**(1), 153-159.
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., May, T.W., Ingersoll, C.G. 2003. Effects of organic amendments on the toxicity and bioavailability of cadmium and copper in spiked formulated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(4), 805-815.
- Białk-Bielińska, A., Maszkowska, J., Mroziak, W., Bielawska, A., Kołodziejska, M., Palavinskas, R., Stepnowski, P., Kumirska, J. 2012a. Sulfadimethoxine and sulfaguanidine: their sorption potential on natural soils. *Chemosphere*, **86**(10), 1059-1065.
- Białk-Bielińska, A., Stolte, S., Matzke, M., Fabiańska, A., Maszkowska, J., Kołodziejska, M., Liberek, B., Stepnowski, P., Kumirska, J. 2012b. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, **221-222**, 264-274.
- Bialk, H.M., Pedersen, J.A. 2008. NMR Investigation of enzymatic coupling of sulfonamide antimicrobials with humic substances. *Environmental Science & Technology*, **42**(1), 106-112.
- Bialk, H.M., Simpson, A.J., Pedersen, J.A. 2005. Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Environmental Science & Technology*, **39**(12), 4463-4473.
- Biel-Maeso, M., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P.A. 2017. Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE). *Chemosphere*, **185**, 1001-1010.
- Birtwell, S., Haworth, E., Rose, F.L., Swain, G., Vasey, C.H. 1946. 96. Synthesis of sulphanilylguanidine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*(0), 491-494.
- Biswas, S., Kranz, W.L., Shapiro, C.A., Snow, D.D., Bartelt-Hunt, S.L., Mamo, M., Tarkalson, D.D., Zhang, T.C., Shelton, D.P., van Donk, S.J., Mader, T.L. 2017. Effect of rainfall timing and tillage on the transport of steroid hormones in runoff from manure amended row crop fields. *Journal of Hazardous Materials*, **324**(Part B), 436-447.
- Blackwell, P.A., Holten Lützhøft, H.-C., Ma, H.-P., Halling-Sørensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P. 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta*, **64**(4), 1058-1064.
- Bogdanov, S.E., P. 2005. Sulfonamid-Belastung von Honig infolge Herbizidanwendungen. *Agrarforschung Schweiz*, **12**(3), 110-113.
- Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., Merkle, K., Henion, J. 1999. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **13**(12), 1175-1185.
- Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K. 2004. Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. *Environmental Science & Technology*, **38**(14), 3933-3940.
- Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K. 2005. Triplet-sensitized photodegradation of sulfa drugs containing six-membered heterocyclic groups: identification of an SO₂ extrusion photoproduct. *Environmental Science & Technology*, **39**(10), 3630-3638.

- Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J.-J., Nélieu, S. 2014. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. *Journal of Chromatography A*, **1349**, 11-23.
- Briggs, G.G. 1981. Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**(5), 1050-1059.
- Bruno, F., Curini, R., Corcia, A.D., Nazzari, M., Pallagrosi, M. 2002. An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**(14), 1365-1376.
- Brusseau, M.L., Wood, A.L., Rao, P.S.C. 1991. Influence of organic cosolvents on the sorption kinetics of hydrophobic organic chemicals. *Environmental Science & Technology*, **25**(5), 903-910.
- Burkhardt, M., Stamm, C., Waul, C., Singer, H., Müller, S. 2005. Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality*, **34**(4), 1363-1371.
- BVL. 2018a. Tabelle Vergleich der Abgabemengen der Wirkstoffklassen 2011 bis 2017. *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*(zuletzt abgerufen 09.10.2018), https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Bilder/09_Presse/Download_Bildateien_Presse_Hintergrundinformationen/Tabelle_Antibiotika_Abgabemenge2017_Print.pdf.
- BVL. 2018b. Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel. *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*(zuletzt abgerufen 19.10.2018), <https://apps2.bvl.bund.de/psm/jsp/ListeMain.jsp?page=1>.
- Cantaro, F. 2014. Antibiotika-Rückstände im Boden. *Master-Thesis, Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität*.
- Caron, E., Farenhorst, A., McQueen, R., Sheedy, C., Goddard, T., Gaultier, J. 2010. Mineralization of 17 β -estradiol in 36 surface soils from Alberta, Canada. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **139**(4), 534-545.
- Carrillo-Gonzalez, R., Gonzalez-Chavez, M.C.A., Aitkenhead-Peterson, J.A., Hons, F.M., Loeppert, R.H. 2013. Extractable DOC and DON from a dry-land long-term rotation and cropping system in Texas, USA. *Geoderma*, **197-198**, 79-86.
- Casey, F.X.M., Hakk, H., Šimůnek, J., Larsen, G.L. 2004. Fate and transport of testosterone in agricultural soils. *Environmental Science & Technology*, **38**(3), 790-798.
- Chen, G.C., He, Z.L., Stoffella, P.J., Yang, X.E., Yu, S., Yang, J.Y., Calvert, D.V. 2006. Leaching potential of heavy metals (Cd, Ni, Pb, Cu and Zn) from acidic sandy soil amended with dolomite phosphate rock (DPR) fertilizers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **20**(2), 127-133.

- Chen, L., Zeng, Q., Wang, H., Su, R., Xu, Y., Zhang, X., Yu, A., Zhang, H., Ding, L. 2009. On-line coupling of dynamic microwave-assisted extraction to solid-phase extraction for the determination of sulfonamide antibiotics in soil. *Analytica Chimica Acta*, **648**(2), 200-206.
- Chopra, I., Hawkey, P.M., Hinton, M. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **29**(3), 245-277.
- Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, **65**(2), 232-260.
- Christian, T., Schneider, R.J., Farber, H.A., Skutlarek, D., Meyer, M.T., Goldbach, H.E. 2003. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **31**(1), 36-44.
- Čizmić, M., Babić, S., Kaštelan-Macan, M. 2017. Multi-class determination of pharmaceuticals in wastewaters by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry with matrix effect study. *Environmental Science and Pollution Research*, **24**(25), 20521-20539.
- Cleary, D.W., Bishop, A.H., Zhang, L., Topp, E., Wellington, E.M.H., Gaze, W.H. 2016. Long-term antibiotic exposure in soil is associated with changes in microbial community structure and prevalence of class 1 integrons. *FEMS Microbiology Ecology*, **92**(10), fiw159-fiw159.
- Cox, L., Koskinen, W.C., Yen, P.Y. 1997. Sorption-desorption of imidacloprid and its metabolites in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(4), 1468-1472.
- Cytryn, E. 2013. The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, **63**, 18-23.
- Dalkmann, P., Willaschek, E., Schiedung, H., Bornemann, L., Siebe, C., Siemens, J. 2014. Long-term wastewater irrigation reduces sulfamethoxazole sorption, but not ciprofloxacin binding, in mexican soils. *Journal of Environmental Quality*, **43**(3), 964-970.
- Das, B.S., Lee, L.S., Rao, P.S.C., Hultgren, R.P. 2004. Sorption and degradation of steroid hormones in soils during transport: column studies and model evaluation. *Environmental Science & Technology*, **38**(5), 1460-1470.
- Daughton, C.G. 2002. Environmental stewardship and drugs as pollutants. *The Lancet*, **360**(9339), 1035-1036.
- Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, **42**(2), 73-91.
- De Conti, L., Ceretta, C.A., Ferreira, P.A.A., Lourenzi, C.R., Giroto, E., Lorensini, F., Tiecher, T.L., Marchezan, C., Anchieta, M.G., Brunetto, G. 2016. Soil solution concentrations and chemical species of copper and zinc in a soil with a history of pig slurry application and plant cultivation. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **216**, 374-386.
- Dermott, P.F.M., Walker, R.D., White, D.G. 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*, **22**(2), 135-143.
- Destatis. 2018c. Bodenflächen nach Nutzungsarten. *Statistisches Bundesamt*(abgerufen 22.10.2018), https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForswirtschaftFischerei/Flaechennutzung/Tabellen/Tabellen_Bodenflaeche.html.

- Destatis. 2018b. Landwirtschaftliche Betriebe mit Haltung von Schweinen am 1. März 2016 nach Bestandsgrößenklassen und Bundesländern. *Statistisches Bundesamt*(abgerufen 22.10.2018), <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/TiereundtierischeErzeugung/Tabellen/StrukturSchweineBetriebe.html>.
- Destatis. 2018a. Tiere und tierische Erzeugung. *Statistisches Bundesamt*(abgerufen 22.10.2018), <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/TiereundtierischeErzeugung/TiereundtierischeErzeugung.html>.
- DIN 38402-51. 2017-05. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung-Allgemeine Angaben (Gruppe A)-Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren-Lineare Kalibrierfunktion (A51). *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
- DIN EN 16174. 2012-11. Schlamm, behandelter Bioabfall und Boden-Aufschluss von mit Königswasser löslichen Anteilen von Elementen; Deutsche Fassung EN 16174:2012. *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
- DIN ISO 10390. 2005-12. Bodenbeschaffenheit-Bestimmung des pH-Wertes. *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
- Ding, G.-C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., Schloter, M. 2014. Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLOS ONE*, **9**(3), e92958.
- Doerschuk, A.P., Bitler, B.A., McCormick, J.R.D. 1955. Reversible isomerizations in the tetracycline family. *Journal of the American Chemical Society*, **77**(17), 4687-4687.
- Doi, A.M., Stoskopf, M.K. 2000. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. *Journal of Aquatic Animal Health*, **12**(3), 246-253.
- Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S. 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *Journal of Environmental Quality*, **37**, 1245-1253.
- Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S. 2007. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, **36**(4), 1224-1230.
- Domagk, G. 1935. Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Angewandte Chemie*, **48**(42), 657-667.
- Duggar, B.M. 1948. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **51**(2), 177-181.
- Dürkheimer, W. 1975. Tetracyclines: chemistry, biochemistry, and structure-activity relations. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **14**(11), 721-734.
- Eagle, H., Saz, A.K. 1955. Antibiotics. *Annual Review of Microbiology*, **9**(1), 173-173.
- Ebert, U., Herling, A.W., Potschka, H. 2010. Endokrinpharmakologie. In: Frey H, Löscher, W (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Dritte, vollständig überarbeitete Auflage *Enke Verlag, Stuttgart*.

- EMA. 2012. Altrenogest (equidae and porcine species) - european public MRL assessment report (EPMAR), committee for medicinal products for veterinary use. *European Medicines Agency*(zuletzt abgerufen 09.10.2018), https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/altrenogest-equidae-porcine-species-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-epmar_en.pdf.
- EMA. 2005. Impurities in new veterinary drug substances, revision at step 9 for consultation at step 4, VICH topic GL10. *European Medicines Agency*(zuletzt abgerufen 09.10.2018), https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/vich-gl10-impurities-new-veterinary-drug-substances-revision-step-9-consultation-step-4_en.pdf.
- EMA. 2009. Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. *European Medicines Agency*(zuletzt abgerufen 09.10.2018), https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-environmental-impact-assessment-veterinary-medicinal-products-support-vich-guidelines-gl6_en.pdf.
- EPA. 2018. Altrenogest. *U.S. Environmental Protection Agency. Chemistry Dashboard*.(zuletzt abgerufen 31.01.2018), <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID3048863>
- Epe, B., Woolley, P., Hornig, H. 1987. Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **213**(2), 443-447.
- Fan, Z., Casey, F.X.M., Hakk, H., Larsen, G.L. 2007. Persistence and fate of 17beta-estradiol and testosterone in agricultural soils. *Chemosphere*, **67**(5), 886-895.
- FDA. 2002. Document R219/F/02, regumate for swine: environmental impact assessment. *Food and drug administration, U.S Department of Health and Human Services*(zuletzt abgerufen 05.04.2016), <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/141-222-fonsi01.pdf>.
- FDA. 2001. Guidance for industry-bioanalytical method validation. *Food and drug administration, U.S Department of Health and Human Services*(zuletzt abgerufen 22.10.2018), <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- Fent, K. 2015. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: concentrations, effects and risk assessment. *Environment International*, **84**, 115-130.
- Ferrey, M.L., Heiskary, S., Grace, R., Hamilton, M.C., Lueck, A. 2015. Pharmaceuticals and other anthropogenic tracers in surface water: a randomized survey of 50 Minnesota lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **34**(11), 2475-2488.
- Figueroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A. 2010. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere*, **79**(8), 786-793.
- Figueroa, R.A., Leonard, A., MacKay, A.A. 2004. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environmental Science & Technology*, **38**(2), 476-483.
- Fokuhl, V.K. 2018. Untersuchung der abiotischen Eliminationswege von ausgewählten Tetracyclinen und Sulfonamiden. *Master-Thesis, Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität*.
- Förster, M., Laabs, V., Lamshöft, M., Groeneweg, J., Zühlke, S., Spittler, M., Krauss, M., Kaupenjohann, M., Amelung, W. 2009. Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. *Environmental Science & Technology*, **43**(6), 1824-1830.

- Förster, M., Laabs, V., Lamshöft, M., Pütz, T., Amelung, W. 2008. Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**(3), 1029-1038.
- Freissmuth, M., Offermanns, S., Böhm, S. 2012. Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. *Springer Verlag, Berlin Heidelberg*.
- Frey, H.-H., Löscher, W. 2010. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Dritte, vollständig überarbeitete Auflage. *Enke Verlag, Stuttgart*.
- Funk, W.D., V.; Donnevert G. 2005. Qualitätssicherung in der analytischen Chemie, Anwendungen in der Umwelt-, Lebensmittel- und Werkstoffanalytik, Biotechnologie und Medizintechnik, zweite, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*.
- Gao, J., Pedersen, J.A. 2005. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environmental Science & Technology*, **39**(24), 9509-9516.
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, S., Barceló, D. 2013. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–electrospray–quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1275**, 32-40.
- García-Galán, M.J., Silvia Díaz-Cruz, M., Barceló, D. 2008. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**(11), 1008-1022.
- Gawlik, B.M., Sotiriou, N., Feicht, E.A., Schulte-Hostede, S., Kettrup, A. 1997. Alternatives for the determination of the soil adsorption coefficient, KOC, of non-ionic organic compounds — a review. *Chemosphere*, **34**(12), 2525-2551.
- Gianotti, V., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Gosetti, F., Bottaro, M., Frascarolo, P., Gennaro, M.C. 2008. A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, **1185**(2), 296-300.
- Gineys, N., Giroud, B., Vulliet, E. 2010. Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**(6), 2295-2302.
- Glibert, P.M., Harrison, J., Heil, C., Seitzinger, S. 2006. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry*, **77**(3), 441-463.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Gianotti, V., Polati, S., Gennaro, M.C. 2007. High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. *Journal of Chromatography A*, **1149**(2), 151-157.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C. 2010. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1217**(25), 3929-3937.
- Gove, L., Cooke, C.M., Nicholson, F.A., Beck, A.J. 2001. Movement of water and heavy metals (Zn, Cu, Pb and Ni) through sand and sandy loam amended with biosolids under steady-state hydrological conditions. *Bioresource Technology*, **78**(2), 171-179.

- Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Michel, R., Stevens, H., Heyser, W., Langenkämper, G., Betsche, T., Freitag, M. 2007. Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbauforschung Völkenrode* **57**(1), 25-32.
- Guerard, J.J., Chin, Y.-P., Mash, H., Hadad, C.M. 2009. Photochemical fate of sulfadimethoxine in aquaculture waters. *Environmental Science & Technology*, **43**(22), 8587-8592.
- Gulkowska, A., Thalmann, B., Hollender, J., Krauss, M. 2014. Nonextractable residue formation of sulfonamide antimicrobials: new insights from soil incubation experiments. *Chemosphere*, **107**(0), 366-372.
- Haller, M.Y., Müller, S.R., McArdeall, C.S., Alder, A.C., Suter, M.J.F. 2002. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **952**(1), 111-120.
- Halling-Sørensen, B., Jacobsen, A.-M., Jensen, J., SengeløV, G., Vaclavik, E., Ingerslev, F. 2005. Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: a field-scale study in southern Denmark. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**(4), 802-810.
- Halling-Sørensen, B., SengeløV, G., Tjørnelund, J. 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **42**(3), 263-271.
- Hamscher, G. 2018. persönliche Mitteilung (15.03.2018) der einzelnen SMZ-Gehalte der BDF im Jahr 2002. *Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität.*
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H. 2005a. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**(4), 861-868.
- Hamscher, G., Petri, M.S. 2017. Literaturstudie: Vorkommen und mögliche Wirkungen von Hormonen aus der Tierproduktion auf Wasser und Boden. *Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- Hamscher, G., Priess, B., Nau, H., Panariti, E. 2005b. Determination of colchicine residues in sheep serum and milk using high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **77**(8), 2421-2425.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höper, H., Nau, H. 2000. Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, **107**(8), 332-334.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **74**(7), 1509-1518.

- Hansen, M., Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Bjorklund, E. 2011. Determination of ten steroid hormones in animal waste manure and agricultural soil using inverse and integrated clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, **3**(5), 1087-1095.
- Hash, J.H., Wishnick, M., Miller, P.A. 1964. On the mode of action of the tetracycline antibiotics in staphylococcus aureus. *Journal of Biological Chemistry*, **239**(6), 2070-2078.
- Hassani, M., Lázaro, R., Pérez, C., Condón, S., Pagán, R. 2008. Thermostability of oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline at ultrahigh temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(8), 2676-2680.
- Hayatsu, M. 2014. A novel function of controlled-release nitrogen fertilizers. *Microbes and Environments*, **29**(2), 121-122.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M. 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**(7), 1892-1900.
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, **14**(3), 236-243.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, **225**(1), 109-118.
- Ho, E.N.M., Leung, D.K.K., Wan, T.S.M., Yu, N.H. 2006. Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1120**(1-2), 38-53.
- Hölzel, C.S., Müller, C., Harms, K.S., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Schwaiger, K., Bauer, J. 2012. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, **113**(0), 21-27.
- Hörning, B. 2013. Zum Einsatz von Hormonen in der intensiven Sauenhaltung - Kurzfassung. *Studie im Auftrag des Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland*(zuletzt abgerufen: 22.10.2018), http://www.bund-lemgo.de/download/2014_bund_landwirtschaft_hormoneinsatz_intensiv_sauenhaltung_studie_kurzfassung.pdf.
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y. 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, **158**(9), 2992-2998.
- Huang, B., Li, Z., Huang, J., Chen, G., Nie, X., Ma, W., Yao, H., Zhen, J., Zeng, G. 2015. Aging effect on the leaching behavior of heavy metals (Cu, Zn, and Cd) in red paddy soil. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(15), 11467-11477.
- Huang, Y., Cheng, M., Li, W., Wu, L., Chen, Y., Luo, Y., Christie, P., Zhang, H. 2013. Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method. *Analytical Methods*, **5**(15), 3721-3731.
- Hund-Rinke, K., Simon, M., Lukow, T. 2004. Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance. *Journal of Soils and Sediments*, **4**(1), 11.

- ICH. 2006. Impurities in new drug substances, current step 4 version, Q3B(R2). *ICH Harmonised Tripartite Guideline*(zuletzt abgerufen: 09.10.2018), https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf.
- Ismaiel, O.A., Halquist, M.S., Elmamly, M.Y., Shalaby, A., Thomas Karnes, H. 2008. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. *Journal of Chromatography B*, **875**(2), 333-343.
- Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Honoré Hansen, S. 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1038**(1–2), 157-170.
- Jahns, T., Ewen, H., Kaltwasser, H. 2003. Biodegradability of urea-aldehyde condensation products. *Journal of Polymers and the Environment*, **11**(4), 155-159.
- Javid, A., Mesdaghinia, A., Nasserli, S., Mahvi, A.H., Alimohammadi, M., Gharibi, H. 2016. Assessment of tetracycline contamination in surface and groundwater resources proximal to animal farming houses in Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, **14**, 4.
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., Smalla, K. 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, **22**(9), 536-545.
- Jones, A.D., Bruland, G.L., Agrawal, S.G., Vasudevan, D. 2005. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**(4), 761-770.
- Kamermann, D., Groh, H., Höper, H. 2015. Schwermetallein- und -austräge niedersächsischer Boden-Dauerbeobachtungsflächen. *Geoberichte, Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie*, **30**.
- Kasteel, R., Mboh, C.M., Unold, M., Groeneweg, J., Vanderborcht, J., Vereecken, H. 2010. Transformation and sorption of the veterinary antibiotic sulfadiazine in two soils: a short-term batch study. *Environmental Science & Technology*, **44**(12), 4651-4657.
- Kaufmann, A., Kaenzig, A. 2004. Contamination of honey by the herbicide asulam and its antibacterial active metabolite sulfanilamide. *Food Additives & Contaminants*, **21**(6), 564-571.
- Kebarle, P., Tang, L. 1993. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **65**(22), 972A-986A.
- Khan, B., Qiao, X., Lee, L.S. 2009. Stereoselective sorption by agricultural soils and liquid–liquid partitioning of trenbolone (17 α and 17 β) and trendione. *Environmental Science & Technology*, **43**(23), 8827-8833.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T. 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **11**(11), 942-950.
- Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, **44**(2), 580-587.

- Kobayashi, N., Nishino, K., Yamaguchi, A. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**(19), 5639-5644.
- Kopp, G. 2005. Aufschluss E708 nach DIN EN 13346. *MLS-Applikation*.
- Kreuzig, R., Hölting, S. 2005. Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**(4), 771-776.
- Kroker, R. 2010a. Hormone und hormonell wirksame Pharmaka. In: Löscher W., Ungemach F.R. und Kroker R. (Hrsg.): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, achte, überarbeitete Auflage. *Enke Verlag, Stuttgart*.
- Kroker, R. 2010b. Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In: Löscher W., Ungemach F.R. und Kroker R. (Hrsg.): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, achte, überarbeitete Auflage. *Enke Verlag, Stuttgart*.
- Kromidas, S. 2011. Validierung in der Analytik, zweite, überarbeitete Auflage. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*.
- Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S.K., Chander, Y., Rosen, C.J. 2005. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*, **34**(6), 2082-2085.
- Kümmerer, K. 2010. Pharmaceuticals in the environment. *Annual Review of Environment and Resources*, **35**, 57-75.
- Kümmerer, K., Henninger, A. 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, **9**(12), 1203-1214.
- Kuracina, M., André, S. 2010. Considerations when using LC-MS/MS systems with fast and high resolution liquid chromatography, publication number 1282110-01. *AB Sciex, Concord, Ontario (Canada)* (zuletzt abgerufen am 22.10.2018), <https://sciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-High-Resolution-Liquid%20Chromatography-1282110.pdf>.
- Kwon, J.-W. 2011. Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **87**(1), 40.
- Kyselková, M., Jirout, J., Chroňáková, A., Vrchotová, N., Bradley, R., Schmitt, H., Elhottová, D. 2013. Cow excrements enhance the occurrence of tetracycline resistance genes in soil regardless of their oxytetracycline content. *Chemosphere*, **93**(10), 2413-2418.
- Lampinen-Salomonsson, M., Beckman, E., Bondesson, U., Hedeland, M. 2006. Detection of altrenogest and its metabolites in post administration horse urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry—increased sensitivity by chemical derivatisation of the glucuronic acid conjugate. *Journal of Chromatography B*, **833**(2), 245-256.
- Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., Spitteller, M. 2010. Behaviour of ¹⁴C-sulfadiazine and ¹⁴C-difloxacin during manure storage. *Science of The Total Environment*, **408**(7), 1563-1568.
- Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., Spitteller, M. 2007. Metabolism of ¹⁴C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **388**(8), 1733-1745.

- Lange, I.G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., Meyer, H.H.D. 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta*, **473**(1-2), 27-37.
- Lanina, S.A., Toledo, P., Sampels, S., Kamal-Eldin, A., Jastrebova, J.A. 2007. Comparison of reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. *Journal of Chromatography A*, **1157**(1), 159-170.
- Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J.-P. 2009. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1216**(46), 8016-8034.
- Lee, J.Y., Everett, G.W. 1981. Binding of manganese(II) by tetracycline. Carbon-13 NMR spin-lattice relaxation study. *Journal of the American Chemical Society*, **103**(17), 5221-5225.
- Lee, L.S., Strock, T.J., Sarmah, A.K., Rao, P.S.C. 2003. Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental Science & Technology*, **37**(18), 4098-4105.
- LHL. 2014. Aktennotiz Aufwuchsversuche in Mitschlerlichgefäßen und Lysimeterstudien zum Verhalten von Antibiotika im Boden, deren carry-over in Pflanzen und die Vaerlagerung vom Boden ins Sickerwasser. *Landesbetrieb Hessisches Landeslabor*
- Lin, C.-E., Chang, C.-C., Lin, W.-C. 1997. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A*, **768**(1), 105-112.
- Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M. 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **73**(19), 4640-4646.
- Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Couillerot, O., Panigoni, K., de Gunzburg, J., Bayer, S., Czaja, R., Barceló, D. 2015. Identification of new transformation products during enzymatic treatment of tetracycline and erythromycin antibiotics at laboratory scale by an on-line turbulent flow liquid-chromatography coupled to a high resolution mass spectrometer LTQ-Orbitrap. *Chemosphere*, **119**, 90-98.
- Loftin, K.A., Adams, C.D., Meyer, M.T., Surampalli, R. 2008. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics *Journal of Environmental Quality*, **37**(2), 378-386.
- Loomis, W.F. 1950. On the mechanism of action of aureomycin. *Science*, **111**(2887), 474-474.
- Machnik, M., Hegger, I., Kietzmann, M., Thevis, M., Guddat, S., SchÄNzer, W. 2007. Pharmacokinetics of altrenogest in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**(1), 86-90.
- Mackay, D., Hughes, D.M., Romano, M.L., Bonnell, M. 2014. The role of persistence in chemical evaluations. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **10**(4), 588-594.
- Mallet, C.R., Lu, Z., Mazzeo, J.R. 2004. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**(1), 49-58.

- Mantovi, P., Bonazzi, G., Maestri, E., Marmiroli, N. 2003. Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. *Plant and Soil*, **250**(2), 249-257.
- Maroga Mboula, V., Héquet, V., Gru, Y., Colin, R., Andrès, Y. 2012. Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*, **209-210**, 355-364.
- Martínez, C.E., Motto, H.L. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, **107**(1), 153-158.
- Martinez, M., McDermott, P., Walker, R. 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, **172**(1), 10-28.
- Matthiessen, P., Arnold, D., Johnson, A.C., Pepper, T.J., Pottinger, T.G., Pulman, K.G.T. 2006. Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Science of The Total Environment*, **367**(2-3), 616-630.
- Matuszewski, B.K. 2006. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*, **830**(2), 293-300.
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, **75**(13), 3019-3030.
- Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., Wang, S., Ng, K., Korfmacher, W.A. 2003. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**(1), 97-103.
- Mohring, S.A.I., Strzysch, I., Fernandes, M.R., Kiffmeyer, T.K., Tuerk, J., Hamscher, G. 2009. Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: a promising step on the way to sustainable pharmacy? *Environmental Science & Technology*, **43**(7), 2569-2574.
- Nouws, J.F.M., Vree, T.B., Hekster, Y.A. 1985. In vitro antimicrobial activity of hydroxy and N4-acetyl sulphonamide metabolites. *Veterinary Quarterly*, **7**(1), 70-72.
- O'Connor, S., Locke, J., Aga, D.S. 2007. Addressing the challenges of tetracycline analysis in soil: extraction, clean-up, and matrix effects in LC-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, **9**(11), 1254-1262.
- O'Connor, S., Aga, D.S. 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: advances in extraction, clean-up, and quantification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **26**(6), 456-465.
- Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Yamada, M., Harada, K., Ito, S., Suzuki, M. 1989. Photodecomposition products of tetracycline in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**(1), 226-231.
- Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, **882**(1), 109-133.
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D. 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian rivers. *Science of The Total Environment*, **540**, 267-277.

- Ozaki, N., Bester, K., Moldrup, P., Henriksen, K., Komatsu, T. 2011. Photodegradation of the synthetic fragrance OTNE and the bactericide triclosan adsorbed on dried loamy sand – results from models and experiments. *Chemosphere*, **83**(11), 1475-1479.
- Pan, M., Chu, L.M. 2017. Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils. *Science of The Total Environment*, **579**, 466-473.
- PharmNet.Bund. 2018. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (zuletzt abgerufen 09.10.2018), <https://www.pharmnet-bund.de/dynamic/de/arzneimittel-informationssystem/index.html>.
- Pignatello, J.J., Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science & Technology*, **30**(1), 1-11.
- Pils, J.R.V., Laird, D.A. 2007. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay–humic complexes. *Environmental Science & Technology*, **41**(6), 1928-1933.
- Raich-Montiu, J., Beltrán, J.L., Prat, M.D., Granados, M. 2010. Studies on the extraction of sulfonamides from agricultural soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**(2), 807-814.
- Raich-Montiu, J., Folch, J., Compañó, R., Granados, M., Prat, M.D. 2007. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *Journal of Chromatography A*, **1172**(2), 186-193.
- Rejtharová, M., Rejthar, L. 2013. Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of six gestagens in kidney fats. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **30**(6), 995-999.
- Rékási, M., Filep, T. 2015. Factors determining Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Mn, Pb and Zn mobility in uncontaminated arable and forest surface soils in Hungary. *Environmental Earth Sciences*, **74**(9), 6805-6817.
- Robinson, J.A., Ma, Q., Staveley, J.P., Smolenski, W.J. 2017. Sorption and desorption of 17 α -trenbolone and trendione on five soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **36**(3), 613-620.
- Rodriguez-Navas, C., Björklund, E., Halling-Sørensen, B., Hansen, M. 2013. Biogas final digestive byproduct applied to croplands as fertilizer contains high levels of steroid hormones. *Environmental Pollution*, **180**, 368-371.
- Rouchaud, J., Gustin, F., Wauters, A. 1996. Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **56**(1), 29-36.
- Rump, H.H. 1998. Laborhandbuch für die Untersuchung von Wasser, Abwasser und Boden, dritte, völlig überarbeitete Auflage. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65**(5), 725-759.
- Sassman, S.A., Lee, L.S. 2005. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environmental Science & Technology*, **39**(19), 7452-7459.

- Schiffer, B., Daxenberger, A., Meyer, K., Meyer, H.H. 2001. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies. *Environmental Health Perspectives*, **109**(11), 1145-1151.
- Schnappinger, D., Hillen, W. 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, **165**(6), 359-369.
- Schulte von Drach, M.C. 2014. Sexualhormone in der Schweinehaltung. *Süddeutsche Zeitung Digitale medien GmbH/ Süddeutsche Zeitung GmbH*(zuletzt abgerufen: 22.10.2018), <https://www.sueddeutsche.de/gesundheit/landwirtschaft-sexualhormone-in-der-schweinehaltung-1.1857247>.
- Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., Solich, P. 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, **649**(2), 158-179.
- Sengeløv, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S.B., Andersen, J.S., Jensen, L.B. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, **28**(7), 587-595.
- Shang, Z., Salim, A.A., Khalil, Z., Bernhardt, P.V., Capon, R.J. 2016. Fungal biotransformation of tetracycline antibiotics. *The Journal of Organic Chemistry*, **81**(15), 6186-6194.
- Shelver, W.L., Hakk, H., Larsen, G.L., DeSutter, T.M., Casey, F.X.M. 2010. Development of an ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-residue sulfonamide method and its application to water, manure slurry, and soils from swine rearing facilities. *Journal of Chromatography A*, **1217**(8), 1273-1282.
- Sittig, S., Kasteel, R., Groeneweg, J., Hofmann, D., Thiele, B., Köppchen, S., Vereecken, H. 2014. Dynamics of transformation of the veterinary antibiotic sulfadiazine in two soils. *Chemosphere*, **95**(0), 470-477.
- Sköld, O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, **3**(3), 155-160.
- Sparks, D.L. 2003. Environmental Soil Chemistry, second edition. *Academic Press, Elsevier Inc., Amsterdam*.
- Spielmeier, A. 2018. persönliche Mitteilung (18.03.2018) der SGU Ergebnisse. *Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität*.
- Spielmeier, A., Ahlborn, J., Hamscher, G. 2014. Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid-liquid-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **406**(11), 2513-2524.
- Spielmeier, A., Höper, H., Hamscher, G. 2017a. Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere*, **177**, 232-238.
- Spielmeier, A., Stahl, F., Petri, M.S., Zerr, W., Brunn, H., Hamscher, G. 2017b. Transformation of sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation of liquid manure. *Journal of Environmental Quality*, **46**(1), 160-168.

- Statista. 2018. Dr. Thomas Rahlf: Sommerniederschlagshöhe in Deutschland in den Jahren von 1960 bis 2013 (in Liter pro m²) [Werte ab 1881 in Excel-Datei abrufbar*]. (zuletzt abgerufen am 28.08.2018), <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/587916/umfrage/sommerniederschlagshoehe-in-deutschland/>.
- Stone, J.J., Clay, S.A., Zhu, Z., Wong, K.L., Porath, L.R., Spellman, G.M. 2009. Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion. *Water Research*, **43**(18), 4740-4750.
- Stoob, K., Singer, H.P., Stettler, S., Hartmann, N., Mueller, S.R., Stamm, C.H. 2006. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, **1128**(1-2), 1-9.
- Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M. 2008a. Photolysis of 14C-sulfadiazine in water and manure. *Chemosphere*, **71**(4), 717-725.
- Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M. 2008b. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. *Chemosphere*, **73**(8), 1344-1350.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C. 2005. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, **39**(12), 4321-4332.
- Sur, R.S., Andreas. 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology*, **56**(1), 35-40.
- Tack, F.M.G., Singh, S.P., Verloo, M.G. 1999. Leaching behaviour of Cd, Cu, Pb and Zn in surface soils derived from dredged sediments. *Environmental Pollution*, **106**(1), 107-114.
- Tanis, E., Hanna, K., Emmanuel, E. 2008. Experimental and modeling studies of sorption of tetracycline onto iron oxides-coated quartz. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **327**(1), 57-63.
- Tavares, M.F.M., McGuffin, V.L. 1994. Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **686**(1), 129-142.
- Teixidó, M., Granados, M., Prat, M.D., Beltrán, J.L. 2012. Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction. *Environmental Science and Pollution Research*, **19**(8), 3087-3095.
- ter Laak, T.L., Gebbink, W.A., Tolls, J. 2006. Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**(4), 933-941.
- Thiele-Bruhn, S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **166**(2), 145-167.
- Thiele-Bruhn, S., Peters, D. 2007. Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforschung Völkenrode* **1**(57), 13-23.
- Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H.-R., Leinweber, P. 2004. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environmental Quality*, **33**(4), 1331-1342.

- Tolls, J. 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science & Technology*, **35**(17), 3397-3406.
- Toribio, M., Romanyà, J. 2006. Leaching of heavy metals (Cu, Ni and Zn) and organic matter after sewage sludge application to mediterranean forest soils. *Science of The Total Environment*, **363**(1), 11-21.
- Tremblay, L.A., Gadd, J.B., Northcott, G.L. 2018. Steroid estrogens and estrogenic activity are ubiquitous in dairy farm watersheds regardless of effluent management practices. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **253**, 48-54.
- Tso, J., Dutta, S., Inamdar, S., Aga, D.S. 2011. Simultaneous analysis of free and conjugated estrogens, sulfonamides, and tetracyclines in runoff water and soils using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(6), 2213-2222.
- Unold, M., Šimůnek, J., Kasteel, R., Groeneweg, J., Vereecken, H. 2009. Transport of manure-based applied sulfadiazine and its main transformation products in soil columns *Vadose Zone Journal*, **8**(3), 677-689.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(18), 5649-5654.
- Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., Picó, Y. 2010. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1217**(16), 2471-2483.
- Vetidata. 2018. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. (zuletzt abgerufen 09.10.2018), <https://www.vetidata.de/>.
- Vetpharm. 2018. Institut für Veterinärpharmakologie und-toxikologie. (zuletzt abgerufen 22.10.2018), http://www.vetpharm.uzh.ch/WIR/00000005/7670_P.htm.
- Vulliet, E., Baugros, J.-B., Flament-Waton, M.-M., Grenier-Loustalot, M.-F. 2007. Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387**(6), 2143-2151.
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M.-F. 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1210**(1), 84-91.
- Waller, C.W., Hutchings, B.L., Broschard, R.W., Goldman, A.A., Stein, W.J., Wolf, C.F., Williams, J.H. 1952. Degradation of aureomycin. VII.1. Aureomycin and anhydroaureomycin. *Journal of the American Chemical Society*, **74**(19), 4981-4982.
- Wallmann, J.B., Alice; Hauck, Rüdiger; Reimer, Inke; Heberer, Thomas. 2014. Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2013. *Deutsches Tierärzteblatt*, **9/2014**, 1234-1239.
- Wallmann, J.B., Alice; Reimer, Inke; Heberer, Thomas. 2015. Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2014. *Deutsches Tierärzteblatt*, **9/2015**, 1260-1265.

- Wallmann, J.R., Inke; Heberer Thomas. 2016. Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2015. *Deutsches Tierärzteblatt*, **11/2016**, 1650-1657.
- Wan, Y., Jia, A., Zhu, Z., Hu, J. 2013. Transformation of tetracycline during chloramination: kinetics, products and pathways. *Chemosphere*, **90**(4), 1427-1434.
- Wellington, E.M.H., Boxall, A.B.A., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., Williams, A.P. 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**(2), 155-165.
- WHO. 2017. Executive summary-the selection and use of essential medicines, report of the 21st WHO expert committee on the selection and use of essential medicines. *World Health Organization*(zuletzt abgerufen 22.10.2018), http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2017_ExecutiveSummary.pdf?ua=1.
- Winckler, C., Grafe, A. 2000. Forschungsbericht: Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. *UBA Text 44/00, Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit* **297 33 911**
- Winckler, C.E., H, Hund-Rindke, K; Luckow, T; Simon, M; Steffens, G. 2004. Forschungsbericht: Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden (Wirkung von Tetrazyklinen und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion). *UBA Text 44/04, Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit* **200 73 248**
- Windisch, W. 2002. Gebrauch und Missbrauch von Zink und Kupfer in der Schweinfütterung, in: 1. BOKU-Symposium Tierernährung. *Tagungsband, Institut für Nutztierwissenschaften der Universität für Bodenkultur, Wien*(zuletzt abgerufen 22.10.2018), https://www.ifa-tulln.boku.ac.at/fileadmin/data/H03000/H97000/H97600/Symptagungsbaende/BOKU_Symposium_2002.pdf.
- Wood, W.B. 1942. Studies on the antibacterial action of the sulfonamid drugs: I. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of bacteriostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, **75**(4), 369-381.
- Wood, W.B., Austrian, R. 1942. Studies on the antibacterial action of the sulfonamide drugs: II. The possible relation of drug activity to substances other than p-aminobenzoic acid. *The Journal of Experimental Medicine*, **75**(4), 383-394.
- Woods, D.D. 1940. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphaniilamide. *British Journal of Experimental Pathology*, **21**(2), 74-90.
- Yu, Z., Xiao, B., Huang, W., Peng, P.A. 2004. Sorption of steroid estrogens to soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(3), 531-539.
- Zarfl, C., Klasmeier, J., Matthies, M. 2009. A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. *Chemosphere*, **77**(6), 720-726.
- Zethner, G., Sattelberger, R., Hanus-Illnar, A. 2007. Kupfer und Zink im Wirtschaftsdünger von Schweine- und Geflügelmastbetrieben, Report 0073. *Umweltbundesamt GmbH, Wien*(zuletzt abgerufen 22.10.2018), <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REP0073.pdf>.

- Zhang, Y.-L., Lin, S.-S., Dai, C.-M., Shi, L., Zhou, X.-F. 2014. Sorption–desorption and transport of trimethoprim and sulfonamide antibiotics in agricultural soil: effect of soil type, dissolved organic matter, and pH. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**(9), 5827-5835.
- Zheng, S.-a., Zheng, X., Chen, C. 2012. Leaching behavior of heavy metals and transformation of their speciation in polluted soil receiving simulated acid rain. *PLOS ONE*, **7**(11), e49664.
- Zhu, R., Wu, M., Yang, J. 2011. Mobilities and leachabilities of heavy metals in sludge with humus soil. *Journal of Environmental Sciences*, **23**(2), 247-254.
- Zufiaurre, R., Olivar, A., Chamorro, P., Callizo, A. 1998. Speciation of metals in sewage sludge for agricultural uses. *Analyst*, **123**(2), 255-259.

RECHTSGRUNDLAGEN

VO (EU) Nr. 37/2010: „Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“

VO (EG) Nr. 1831/2003: „Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung“

VO (EG) Nr. 1334/2003: „Verordnung (EG) Nr. 1334/2003 der Kommission vom 25. Juli 2003 zur Änderung der Bedingungen für die Zulassung einer Reihe von zur Gruppe der Spurenelemente zählenden Futtermittelzusatzstoffen“

2002/657/EG: „Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen“

Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung: „Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung in der Fassung der Bekanntmachung vom 8. Juli 2009 (BGBl. I S. 1768)“

Verordnung zum Schutz des Grundwassers: „Grundwasserverordnung vom 9. November 2010 (BGBl. I S. 1513), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 4. Mai 2017 (BGBl. I S. 1044) geändert worden ist“

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch: "Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. Januar 2018 (BGBl. I S. 99) geändert worden ist"

Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung: "Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung vom 12. Juli 1999 (BGBl. I S. 1554), die zuletzt durch Artikel 3 Absatz 4 der Verordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465) geändert worden ist"

Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln: "Düngemittelverordnung vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2482), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 26. Mai 2017 (BGBl. I S. 1305) geändert worden ist"

Verordnung über die Verwertung von Klärschlamm, Klärschlammgemisch und Klärschlammkompost: "Klärschlammverordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465), die zuletzt durch Artikel 6 der Verordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465) geändert worden ist"

Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information: "DIMDI-Arzneimittelverordnung vom 24. Februar 2010 (BGBl. I S. 140), die zuletzt durch Artikel 4 der Verordnung vom 2. Juli 2018 (BGBl. I S. 1080) geändert worden ist"

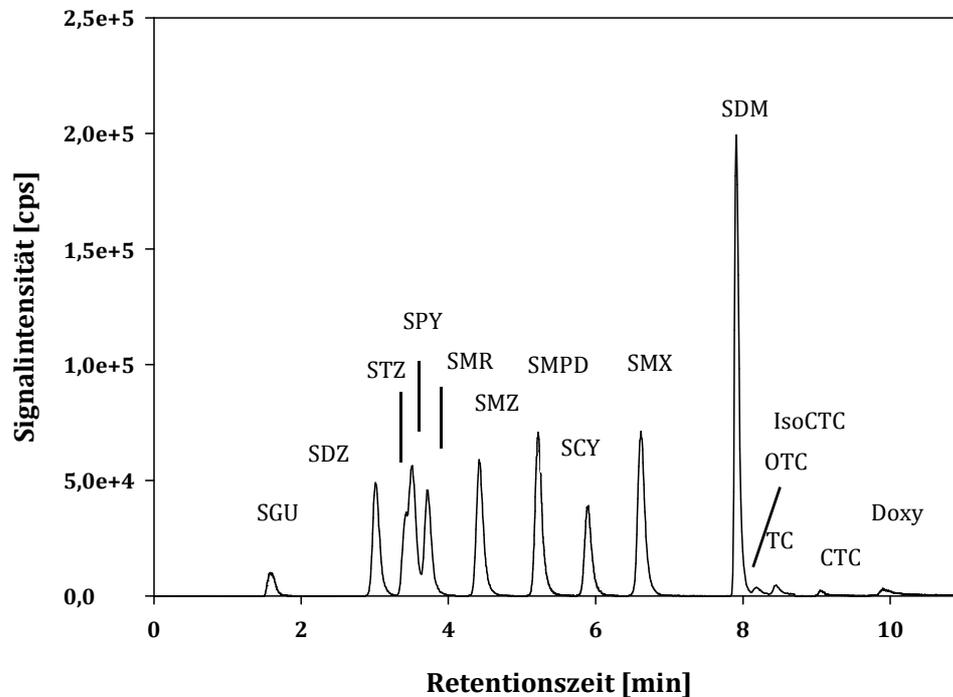
Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten: "Bundes-Bodenschutzgesetz vom 17. März 1998 (BGBl. I S. 502), das zuletzt durch Artikel 3 Absatz 3 der Verordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465) geändert worden ist"

Gesetz zum Schutz vor schädlichen Umwelteinwirkungen durch Luftverunreinigungen, Geräusche, Erschütterungen und ähnliche Vorgänge: Bundes-Immissionsschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Mai 2013 (BGBl. I S. 1274), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2771) geändert worden ist

Gesetz zur Verminderung von Luftverunreinigungen durch Bleiverbindungen in Ottokraftstoffen für Kraftfahrzeugmotore: "Benzinbleigesetz vom 5. August 1971 (BGBl. I S. 1234), das zuletzt durch Artikel 73 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist"

ANHANG

Anhang 1: TIC-Standardchromatogramm gemessen mittels QTRAP, mit einer Konzentration von 100 µg/L.



Anhang 2: Mittels LLE ermittelte Rückstandsgehalte, bezogen auf die Trockenmasse und mittels Wiederfindung korrigiert, von SGU, SDZ, 4-OH-SDZ, SMZ, TC und IsoCTC [µg/kg] in den Frühjahrsproben aus den Jahren 2001, 2002, 2005, 2008, 2009, 2015 und 2017 und in den Herbstproben des Jahres 2008. Als BG wurde die jeweilige BG von 10 Minuten herangezogen, n.d.: nicht detektiert/kleiner NWG.

Frühjahr 2001		Rückstandsgehalte [µg/kg]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	4,8	1,3	< BG	7,4	254,1	14,7
10-20	K1	6,5	1,6	< BG	8,4	186,5	13,0
20-30	K1	7,4	< BG	< BG	6,5	85,7	7,7
30-40	K1	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
40-50	K1	n.d.	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.
50-60	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60-70	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70-80	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80-90	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K2	11,0	2,1	< BG	9,7	91,5	9,3
10-20	K2	6,42	1,4	1,1	8,8	215,8	8,1
20-30	K2	10,2	1,3	1,3	10,6	114,3	4,7

30-40	K2	3,7	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
40-50	K2	< BG	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.
50-60	K2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60-70	K2	n.d.	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.
70-80	K2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80-90	K2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K3	8,2	1,5	< BG	11,6	151,3	21,8
10-20	K3	7,7	1,1	< BG	12,0	178,4	9,0
20-30	K3	8,8	1,1	< BG	8,9	104,3	6,5
30-40	K3	< BG	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
40-50	K3	< BG	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.
50-60	K3	n.d.	1,3	n.d.	< BG	n.d.	n.d.
60-70	K3	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70-80	K3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80-90	K3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K4	5,8	< BG	< BG	5,2	115,3	6,8
10-20	K4	6,2	< BG	< BG	4,6	105,7	5,9
20-30	K4	5,7	1,0	< BG	4,1	84,6	6,4
30-40	K4	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40-50	K4	n.d.	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.
50-60	K4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60-70	K4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70-80	K4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80-90	K4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Frühjahr 2002**Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]**

Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	6,4	1,7	n.d.	4,4	64,7	6,7
10-20	K1	7,6	n.d.	< BG	4,9	67,6	n.d.
20-30	K1	7,5	1,1	1,0	4,3	88,8	n.d.
30-40	K1	4,1	n.d.	n.d.	2,1	n.d.	n.d.
0-10	K2	7,7	1,9	1,6	6,3	143,9	9,1
10-20	K2	7,6	1,9	1,5	9,1	84,1	4,0
20-30	K2	9,7	1,7	1,3	9,3	98,6	7,7
30-40	K2	5,9	1,3	n.d.	5,2	44,4	n.d.
0-10	K3	11,5	1,6	2,0	11,2	96,2	6,6
10-20	K3	9,5	1,4	1,4	8,5	75,5	4,4

20-30	K3	10,8	1,4	< BG	7,2	55,7	n.d.
30-40	K3	6,0	1,0	n.d.	2,6	n.d.	n.d.
0-10	K4	7,0	1,0	< BG	3,4	59,4	n.d.
10-20	K4	9,1	1,4	< BG	6,6	94,9	n.d.
20-30	K4	7,8	1,6	1,3	7,2	136,6	4,7
30-40	K4	7,4	1,2	1,2	5,1	253,9	n.d.
Frühjahr 2005		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	13,0	n.d.	3,1	3,9	42,0	n.d.
10-20	K1	15,4	1,3	2,8	5,4	88,1	n.d.
20-30	K1	10,1	1,9	1,8	4,5	58,8	n.d.
30-40	K1	< BG	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.
0-10	K2	15,6	1,9	3,5	7,7	45,6	n.d.
10-20	K2	15,7	2,2	2,4	7,6	95,1	n.d.
20-30	K2	11,7	1,4	1,0	5,2	52,4	n.d.
30-40	K2	5,0	n.d.	n.d.	1,6	n.d.	n.d.
0-10	K3	19,3	1,8	3,3	6,9	50,9	n.d.
10-20	K3	14,2	1,7	2,1	6,5	61,1	n.d.
20-30	K3	14,1	1,7	1,1	6,5	49,1	n.d.
30-40	K3	< BG	n.d.	n.d.	0,7	n.d.	n.d.
0-10	K4	11,9	1,1	2,9	3,9	47,4	n.d.
10-20	K4	13,3	1,2	1,9	4,0	50,0	n.d.
20-30	K4	12,0	1,5	1,5	3,8	39,0	n.d.
30-40	K4	3,8	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.
Frühjahr 2008		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	16,5	3,9	7,3	4,6	250,7	5,5
10-20	K1	15,1	3,3	4,1	4,0	83,1	5,1
20-30	K1	13,1	3,0	3,2	5,0	57,9	4,2
30-40	K1	5,0	n.d.	n.d.	0,8	n.d.	n.d.
0-10	K2	16,2	1,9	3,3	5,3	78,2	5,1
10-20	K2	16,4	2,7	2,6	6,8	95,7	5,9
20-30	K2	12,1	1,4	1,4	5,6	53,3	< BG
30-40	K2	5,3	n.d.	n.d.	0,9	n.d.	n.d.
0-10	K3	16,6	2,1	3,3	5,3	86,4	5,2
10-20	K3	13,7	1,6	2,1	4,4	55,2	3,9

20-30	K3	13,3	1,1	1,4	5,0	31,4	< BG
30-40	K3	4,2	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.
0-10	K4	16,4	3,7	6,3	3,4	100,1	4,3
10-20	K4	14,2	3,9	4,2	3,8	88,2	< BG
20-30	K4	18,5	2,2	2,8	3,9	41,2	n.d.
30-40	K4	7,1	n.d.	n.d.	1,2	n.d.	n.d.
Herbst 2008		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	7,7	2,2	3,4	2,4	213,7	6,8
10-20	K1	11,1	2,4	3,7	3,0	132,9	9,2
20-30	K1	7,3	1,3	1,8	3,2	53,2	5,1
30-40	K1	3,0	n.d.	n.d.	0,9	n.d.	< BG
0-10	K2	11,9	2,4	3,4	4,1	193,6	8,3
10-20	K2	8,9	1,8	1,9	4,6	105,7	7,5
20-30	K2	6,8	1,1	< BG	3,5	55,7	5,3
30-40	K2	3,6	n.d.	n.d.	1,2	< BG	n.d.
0-10	K3	10,0	2,2	3,9	4,2	201,2	3,2
10-20	K3	12,8	1,9	2,4	4,4	72,5	5,0
20-30	K3	9,9	1,1	1,1	4,0	37,1	3,6
30-40	K3	4,2	n.d.	n.d.	1,4	n.d.	n.d.
0-10	K4	12,0	2,4	4,7	2,6	146,6	< BG
10-20	K4	11,2	2,6	4,6	3,4	91,2	5,4
20-30	K4	8,6	1,4	2,2	2,6	45,9	3,8
30-40	K4	3,9	n.d.	n.d.	1,1	n.d.	n.d.
Frühjahr 2009		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	15,3	2,9	4,4	3,2	80,9	n.d.
10-20	K1	19,7	5,7	8,0	4,7	279,1	n.d.
20-30	K1	5,5	n.d.	1,3	2,4	68,8	< BG
30-40	K1	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	n.d.	n.d.
0-10	K2	10,7	2,0	2,0	4,1	96,6	n.d.
10-20	K2	9,9	1,9	2,4	4,0	188,6	6,0
20-30	K2	8,8	n.d.	1,3	4,6	71,7	n.d.
30-40	K2	n.d.	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.
0-10	K3	13,2	2,1	3,4	4,3	112,3	n.d.
10-20	K3	11,0	2,1	4,8	5,1	232,9	n.d.

20-30	K3	9,0	n.d.	1,2	4,2	72,8	n.d.
30-40	K3	n.d.	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.
0-10	K4	8,7	1,8	1,9	1,9	63,5	n.d.
10-20	K4	9,6	2,0	3,7	2,4	299,8	4,2
20-30	K4	10,4	n.d.	1,5	2,4	70,0	n.d.
30-40	K4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Frühjahr 2015		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	15,2	2,0	4,2	3,3	277,0	n.d.
10-20	K1	15,3	n.d.	3,1	2,8	162,2	n.d.
20-30	K1	10,6	n.d.	2,2	3,3	139,0	n.d.
30-40	K1	3,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40-50	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50-60	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60-70	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70-80	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80-90	K1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K2	20,8	2,0	4,0	5,2	314,7	n.d.
10-20	K2	16,0	n.d.	4,0	4,9	295,0	7,2
20-30	K2	16,2	n.d.	2,7	5,4	136,2	n.d.
30-40	K2	6,2	n.d.	n.d.	1,2	n.d.	n.d.
40-50	K2	4,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50-60	K2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60-70	K2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70-80	K2	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	n.d.	n.d.
80-90	K2	n.d.	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.
0-10	K3	17,5	1,4	3,8	4,2	294,8	n.d.
10-20	K3	18,8	5,8	2,1	5,8	304,7	7,3
20-30	K3	15,8	1,3	n.d.	4,1	166,3	n.d.
30-40	K3	10,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40-50	K3	3,7	n.d.	n.d.	1,1	n.d.	n.d.
50-60	K3	2,4	n.d.	n.d.	0,8	n.d.	n.d.
60-70	K3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70-80	K3	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
80-90	K3	n.d.	n.d.	3,8	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K4	14,6	2,0	3,8	2,4	244,2	n.d.

10-20	K4	12,6	2,2	2,9	3,5	234,3	n.d.
20-30	K4	10,7	n.d.	1,9	2,7	177,5	n.d.
30-40	K4	16,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Frühjahr 2017		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ	TC	IsoCTC
0-10	K1	31,0	7,8	9,8	9,0	886,7	36,9
10-20	K1	59,7	10,1	10,5	8,7	902,8	24,8
20-30	K1	38,2	6,0	6,1	9,7	477,0	11,7
30-40	K1	9,9	n.d.	n.d.	3,5	65,0	6,3
40-50	K1	9,0	n.d.	n.d.	2,7	n.d.	n.d.
50-60	K1	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K2	28,4	6,9	8,7	12,3	1141,6	38,8
10-20	K2	52,4	8,9	11,2	12,4	575,6	7,6
20-30	K2	50,2	7,7	10,1	12,9	726,8	8,6
30-40	K2	25,9	n.d.	n.d.	5,2	n.d.	n.d.
40-50	K2	3,0	n.d.	n.d.	0,9	n.d.	n.d.
50-60	K2	< BG	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.
0-10	K3	25,8	7,0	9,5	8,8	997,9	27,9
10-20	K3	32,0	3,3	5,5	8,7	467,4	n.d.
20-30	K3	75,5	8,3	9,6	12,9	315,6	n.d.
30-40	K3	12,3	n.d.	n.d.	2,7	n.d.	n.d.
40-50	K3	3,2	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.
50-60	K3	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0-10	K4	36,0	7,4	7,3	6,9	1160,5	38,6
10-20	K4	44,5	7,1	9,0	9,0	681,7	9,7
20-30	K4	34,3	n.d.	5,2	5,2	179,6	n.d.
30-40	K4	4,2	n.d.	n.d.	2,0	n.d.	n.d.
40-50	K4	4,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50-60	K4	< BG	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	n.d.

Anhang 3: Mittels MWE ermittelte Rückstandsgehalte, bezogen auf die Trockenmasse und mittels Wiederfindung korrigiert, von SGU, SDZ, 4-OH-SDZ, SMZ [$\mu\text{g}/\text{kg}$] in den Frühjahrsproben aus den Jahren 2001, 2002, 2005, 2009, 2015 und 2017 und in den Herbstproben des Jahres 2001 und 2005. Als BG wurde die jeweilige BG von 10 Minuten herangezogen, n.d.: nicht detektiert/kleiner NWG.

Frühjahr 2001		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	33,0	2,9	1,6	18,9
10-20	K1	27,6	3,5	1,7	21,8
20-30	K1	33,4	3,0	1,8	20,3
30-40	K1	<BG	<BG	n.d.	2,5
40-50	K1	<BG	n.d.	n.d.	1,2
50-60	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
60-70	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
70-80	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
80-90	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
0-10	K2	46,6	5,8	1,9	28,0
10-20	K2	72,6	5,2	3,7	27,4
20-30	K2	48,9	5,7	3,7	32,6
30-40	K2	37,0	n.d.	n.d.	1,6
40-50	K2	11,6	<BG	n.d.	1,1
50-60	K2	<BG	<BG	n.d.	<BG
60-70	K2	<BG	n.d.	n.d.	1,1
70-80	K2	<BG	n.d.	n.d.	<BG
80-90	K2	<BG	<BG	n.d.	<BG
0-10	K3	74,1	6,6	2,6	36,5
10-20	K3	93,3	5,1	2,9	40,3
20-30	K3	69,5	4,7	2,5	30,7
30-40	K3	24,1	1,2	n.d.	2,0
40-50	K3	20,9	n.d.	n.d.	1,7
50-60	K3	15,5	n.d.	n.d.	1,5
60-70	K3	12,6	n.d.	n.d.	1,2
70-80	K3	10,1	n.d.	n.d.	1,2
80-90	K3	<BG	<BG	n.d.	<BG
0-10	K4	52,4	2,8	1,6	14,4
10-20	K4	54,2	2,6	1,4	13,7
20-30	K4	45,7	3,1	1,4	13,7
30-40	K4	23,3	n.d.	n.d.	<BG
40-50	K4	22,0	n.d.	n.d.	<BG

50-60	K4	<BG	n.d.	n.d.	<BG
60-70	K4	<BG	n.d.	n.d.	<BG
70-80	K4	<BG	n.d.	n.d.	<BG
80-90	K4	12,5	<BG	n.d.	<BG
Herbst 2001		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	46,5	2,7	1,3	21,0
10-20	K1	50,8	3,0	1,4	17,5
20-30	K1	43,0	3,4	1,4	24,5
30-40	K1	11,9	n.d.	n.d.	2,2
40-50	K1	10,4	n.d.	n.d.	1,3
50-60	K1	<BG	n.d.	n.d.	1,2
60-70	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
70-80	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
80-90	K1	<BG	<BG	n.d.	<BG
0-10	K2	107,4	7,0	3,9	45,3
10-20	K2	63,1	7,0	4,4	36,9
20-30	K2	79,5	5,9	3,2	32,3
30-40	K2	20,0	n.d.	n.d.	1,4
40-50	K2	19,2	n.d.	n.d.	1,0
50-60	K2	12,6	n.d.	n.d.	1,1
60-70	K2	12,3	n.d.	n.d.	1,2
70-80	K2	<BG	n.d.	n.d.	1,1
80-90	K2	<BG	n.d.	n.d.	<BG
0-10	K3	72,4	6,3	5,6	29,8
10-20	K3	62,0	5,8	3,4	36,6
20-30	K3	86,7	4,6	2,5	28,6
30-40	K3	21,6	n.d.	n.d.	2,0
40-50	K3	14,8	n.d.	n.d.	1,3
50-60	K3	<BG	2,0	n.d.	1,4
60-70	K3	<BG	n.d.	n.d.	1,2
70-80	K3	<BG	n.d.	n.d.	<BG
80-90	K3	<BG	n.d.	n.d.	<BG
0-10	K4	55,2	2,7	1,6	16,7
10-20	K4	69,4	2,6	1,6	19,1
20-30	K4	103,1	2,1	1,2	14,8

30-40	K4	37,4	n.d.	n.d.	1,0
40-50	K4	23,1	n.d.	n.d.	1,1
50-60	K4	11,6	n.d.	n.d.	1,2
60-70	K4	<BG	n.d.	n.d.	1,1
70-80	K4	<BG	n.d.	n.d.	1,1
80-90	K4	12,8	n.d.	n.d.	<BG
Frühjahr 2002		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	24,3	3,5	1,7	15,2
10-20	K1	36,7	2,8	2,2	12,9
20-30	K1	31,6	2,0	2,7	11,5
30-40	K1	19,4	1,4	n.d.	5,7
0-10	K2	68,7	6,3	4,4	19,7
10-20	K2	40,6	5,8	4,2	29,0
20-30	K2	57,1	4,2	2,3	28,2
30-40	K2	48,5	3,4	1,4	15,8
0-10	K3	105,0	4,8	5,4	34,3
10-20	K3	55,5	4,1	3,8	25,0
20-30	K3	53,5	2,9	1,7	16,0
30-40	K3	69,7	1,6	n.d.	7,7
0-10	K4	65,0	3,0	1,1	10,4
10-20	K4	33,8	2,9	2,1	18,8
20-30	K4	54,9	6,1	4,1	19,4
30-40	K4	51,6	1,7	2,2	12,5
Frühjahr 2005		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	102,8	6,7	9,6	21,4
10-20	K1	67,9	5,7	8,3	19,5
20-30	K1	56,7	3,2	4,0	15,0
30-40	K1	14,7	<BG	n.d.	2,8
0-10	K2	114,9	7,1	10,3	29,7
10-20	K2	85,1	6,4	7,6	28,0
20-30	K2	62,5	15,4	2,8	18,7
30-40	K2	25,9	3,3	n.d.	5,0
0-10	K3	131,4	6,4	10,6	30,0
10-20	K3	98,0	7,2	7,4	28,3

20-30	K3	77,8	5,2	2,9	20,0
30-40	K3	18,2	<BG	n.d.	2,8
0-10	K4	86,3	4,6	8,2	16,3
10-20	K4	86,8	4,1	6,2	13,6
20-30	K4	78,0	3,9	4,4	11,1
30-40	K4	20,7	<BG	n.d.	2,7
Herbst 2005		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	75,7	3,3	6,0	14,7
10-20	K1	74,0	3,9	6,0	14,9
20-30	K1	53,0	2,1	4,7	12,1
30-40	K1	27,0	<BG	n.d.	3,8
0-10	K2	71,4	5,0	6,5	19,6
10-20	K2	94,4	5,3	6,5	20,1
20-30	K2	93,0	4,3	5,9	17,5
30-40	K2	29,1	1,4	n.d.	5,3
0-10	K3	99,1	5,2	6,8	22,6
10-20	K3	57,9	4,1	4,8	18,5
20-30	K3	112,2	3,7	5,5	17,4
30-40	K3	79,9	5,0	3,2	11,3
0-10	K4	70,6	4,2	4,4	10,7
10-20	K4	77,0	2,6	5,1	10,3
20-30	K4	84,8	2,8	5,8	9,6
30-40	K4	50,0	1,3	n.d.	3,3
Frühjahr 2009		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	71,7	9,2	10,9	12,7
10-20	K1	84,3	12,8	17,0	12,9
20-30	K1	47,0	2,0	2,7	8,2
30-40	K1	13,8	n.d.	n.d.	1,2
0-10	K2	65,7	5,2	8,4	16,7
10-20	K2	61,8	6,1	9,0	17,1
20-30	K2	63,5	2,8	3,4	12,4
30-40	K2	18,2	n.d.	n.d.	1,5
0-10	K3	54,8	4,2	6,5	13,7
10-20	K3	84,6	7,5	10,8	15,9

20-30	K3	88,2	2,9	2,9	12,9
30-40	K3	23,3	<BG	n.d.	1,8
0-10	K4	78,4	5,0	7,5	7,8
10-20	K4	71,0	5,7	8,3	7,8
20-30	K4	86,6	3,6	3,9	8,5
30-40	K4	18,3	n.d.	n.d.	<BG
Frühjahr 2015		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	95,8	3,8	9,8	8,7
10-20	K1	62,5	4,2	8,3	9,6
20-30	K1	62,4	4,8	5,3	7,8
30-40	K1	13,3	n.d.	n.d.	1,1
40-50	K1	27,8	n.d.	n.d.	2,2
50-60	K1	12,6	n.d.	n.d.	1,2
60-70	K1	13,9	n.d.	n.d.	<BG
70-80	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
80-90	K1	<BG	n.d.	n.d.	<BG
0-10	K2	87,1	5,1	7,7	13,7
10-20	K2	70,5	8,1	8,3	14,6
20-30	K2	63,0	5,7	5,3	12,1
30-40	K2	23,4	n.d.	n.d.	2,2
40-50	K2	42,8	n.d.	1,2	2,8
50-60	K2	22,1	n.d.	n.d.	1,8
60-70	K2	33,7	n.d.	n.d.	1,6
70-80	K2	24,4	n.d.	n.d.	2,1
80-90	K2	15,0	n.d.	n.d.	1,5
0-10	K3	104,9	5,0	8,4	13,4
10-20	K3	69,4	6,4	7,0	12,1
20-30	K3	46,5	4,8	3,8	9,3
30-40	K3	46,4	n.d.	n.d.	2,7
40-50	K3	30,0	n.d.	n.d.	3,7
50-60	K3	35,6	n.d.	n.d.	4,2
60-70	K3	13,1	n.d.	n.d.	1,4
70-80	K3	17,8	n.d.	n.d.	1,2
80-90	K3	<BG	n.d.	n.d.	<BG
0-10	K4	70,1	4,0	8,5	6,6

10-20	K4	85,4	6,9	7,8	9,3
20-30	K4	32,7	4,1	3,7	6,8
30-40	K4	20,7	n.d.	n.d.	1,5
Frühjahr 2017		Rückstandsgehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
Tiefe [cm]	Teilfläche	SGU	SDZ	4-OH-SDZ	SMZ
0-10	K1	170,6	12,4	21,7	21,7
10-20	K1	123,1	9,3	16,3	15,6
20-30	K1	125,2	5,1	11,9	12,9
30-40	K1	75,7	n.d.	2,6	4,9
40-50	K1	35,4	n.d.	n.d.	2,4
50-60	K1	15,1	n.d.	n.d.	1,8
0-10	K2	159,4	11,6	21,9	28,1
10-20	K2	151,8	7,3	17,0	21,9
20-30	K2	144,2	7,9	15,4	20,7
30-40	K2	146,0	n.d.	3,2	6,6
40-50	K2	35,0	n.d.	n.d.	1,8
50-60	K2	15,9	n.d.	n.d.	1,5
0-10	K3	168,9	12,2	24,0	26,4
10-20	K3	106,8	6,9	13,6	19,1
20-30	K3	400,7	9,3	14,1	25,6
30-40	K3	83,7	n.d.	1,6	4,2
40-50	K3	46,4	n.d.	n.d.	1,6
50-60	K3	<BG	n.d.	n.d.	1,3
0-10	K4	115,6	10,1	16,2	14,4
10-20	K4	95,0	6,4	14,7	11,4
20-30	K4	140,6	4,1	8,4	10,9
30-40	K4	89,1	1,5	2,0	3,7
40-50	K4	42,3	n.d.	n.d.	1,3
50-60	K4	12,1	n.d.	n.d.	1,2

Anhang 4: Mittelwerte der Kupfer-Gehalte in den Bodenproben aus den Jahren 2001, 2005, 2009, 2015. Bestimmt in Mischproben von 0-30 cm, 30-40 cm und in Mischproben der Kernflächen in den Schichten 40-90 cm.

Kupfer [mg/kg]				
Frühjahr 2001	K1	K2	K3	K4
Bodentiefe [cm]				
0-30	11,9	10,1	12,2	10,6
30-40	1,3	1,7	1,3	1,3
40-50			1,2	
50-60			0,9	
60-70			0,9	
70-80			1,1	
80-90			1,4	
Frühjahr 2005	K1	K2	K3	K4
0-30	11,0	11,2	10,8	10,1
30-40	3,9	3,3	2,3	2,7
Frühjahr 2009	K1	K2	K3	K4
0-30	12,0	14,6	12,9	13,0
30-40	1,8	1,3	1,2	1,8
Frühjahr 2015	K1	K2	K3	K4
0-30	11,4	12,7	12,1	11,1
30-40	2,7	2,8	2,4	2,2
40-50			2,3	
50-60			1,0	
60-70			1,0	
70-80			1,4	
80-90			2,2	

Anhang 5: Mittelwerte der Zink-Gehalte in den Bodenproben aus den Jahren 2001, 2005, 2009, 2015. Bestimmt in Mischproben von 0-30 cm, 30-40 cm und in Mischproben der Kernflächen in den Schichten 40-90 cm.

Zink [mg/kg]				
Frühjahr 2001	K1	K2	K3	K4
Bodentiefe [cm]				
0-30	18,6	16,4	21,6	17,5
30-40	9,1	9,6	12,2	7,6
40-50			10,9	
50-60			6,8	
60-70			5,0	
70-80			5,2	
80-90			5,1	
Frühjahr 2005	K1	K2	K3	K4
0-30	17,7	17,9	23,7	17,4
30-40	10,8	13,7	16,2	12,7
Frühjahr 2009	K1	K2	K3	K4
0-30	20,5	20,9	23,1	20,1
30-40	11,7	12,6	15,8	10,5

Frühjahr 2015	K1	K2	K3	K4
0-30	18,5	18,2	20,2	17,5
30-40	11,7	13,1	18,2	11,7
40-50		15,2		
50-60		10,7		
60-70		7,4		
70-80		6,3		
80-90		7,7		

Anhang 6: pH-Werte der einzelnen Bodenschichten in den Jahren 2001 und 2015.

Bodentiefe [cm]	pH-Werte	
	2001	2015
0-10	4,2	4,4
10-20	4,3	4,1
20-30	4,3	4,2
30-40	4,6	4,7
40-50	4,7	4,9
50-60	4,6	5,0
60-70	4,6	5,0
70-80	4,5	4,9
80-90	4,5	4,6

Anhang 7: Verwendete Trockenmassen [%] der untersuchten Bodenproben.

Trockenmassen [%]				
Frühjahr 2001	K1	K2	K3	K4
Bodentiefe [cm]				
0-10	94,9	92,3	92,5	93,7
10-20	94,9	92,3	92,5	93,7
20-30	94,9	92,3	92,5	93,7
30-40	97,5	94,1	93,4	93,8
40-50	93,1	93,1	93,1	93,1
50-60	92,4	92,4	92,4	92,4
60-70	92,3	92,3	92,3	92,3
70-80	92,1	92,1	92,1	92,1
80-90	91,0	91,0	91,0	91,0
Herbst 2001	K1	K2	K3	K4
0-10	94,9	92,3	92,5	93,7
10-20	94,9	92,3	92,5	93,7
20-30	94,9	92,3	92,5	93,7
30-40	97,5	94,1	93,4	93,8
40-50	93,1	93,1	93,1	93,1

50-60	92,4	92,4	92,4	92,4
60-70	92,3	92,3	92,3	92,3
70-80	92,1	92,1	92,1	92,1
80-90	91,0	91,0	91,0	91,0
Frühjahr 2002	K1	K2	K3	K4
0-10	94,9	92,3	92,5	93,7
10-20	94,9	92,3	92,5	93,7
20-30	94,9	92,3	92,5	93,7
30-40	97,5	94,1	93,4	93,8
Frühjahr 2005	K1	K2	K3	K4
0-10	88,2	87,0	87,0	88,3
10-20	91,3	89,6	88,6	90,9
20-30	94,8	92,3	92,0	94,2
30-40	96,7	94,9	94,9	95,6
Herbst 2005	K1	K2	K3	K4
0-10	87,7	87,0	87,7	88,7
10-20	88,3	87,2	88,0	88,9
20-30	87,2	87,3	88,3	88,6
30-40	91,2	90,5	90,6	90,8
Frühjahr 2008	K1	K2	K3	K4
0-10	99,0	99,0	99,0	99,0
10-20	99,0	99,0	99,0	99,0
20-30	99,0	99,0	99,0	99,0
30-40	99,0	99,0	99,0	99,0
Herbst 2008	K1	K2	K3	K4
0-10	99,0	95,0	99,0	94,0
10-20	99,0	99,0	99,0	99,0
20-30	99,0	99,0	99,0	99,0
30-40	99,0	99,0	99,0	99,0
Frühjahr 2009	K1	K2	K3	K4
0-10	93,2	93,1	93,3	92,5
10-20	91,8	90,8	91,6	90,9
20-30	93,0	91,7	91,7	91,2
30-40	93,9	91,9	91,6	91,6
Frühjahr 2015	K1	K2	K3	K4
0-10	92,3	92,1	92,9	92,0
10-20	92,3	92,1	92,9	92,0
20-30	92,3	92,1	92,9	92,0
30-40	92,3	94,8	93,5	93,9
40-50	92,8	92,8	92,8	-

50-60	91,4	91,4	91,4	-
60-70	89,5	89,5	89,5	-
70-80	88,0	88,1	88,1	-
80-90	87,5	87,5	87,5	-
Frühjahr 2017	K1	K2	K3	K4
0-10	92,9	92,9	92,9	92,9
10-20	92,1	92,1	92,1	92,1
20-30	92,7	92,7	92,7	92,7
30-40	95,9	95,9	95,9	95,9
40-50	94,2	94,2	94,2	94,2
50-60	92,2	92,2	92,2	92,2

Anhang 8: Literaturstudie „Vorkommen und mögliche Wirkungen von Hormonen aus der Tierproduktion auf Wasser und Boden.“**Literaturstudie****„Vorkommen und mögliche Wirkungen von Hormonen aus der Tierproduktion auf Wasser und Boden“****Ausführende Stelle:**

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich 08 Biologie und Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Heinrich-Buff-Ring 17–19

35392 Gießen

Autoren:

Prof. Dr. Gerd Hamscher, M.Sc. Lebensmittelchemie Madeleine Petri

Inhalt

1 Einführung

- 1.1 Begriffsbestimmungen
 - 1.1.1 Arzneimittel
 - 1.1.2 Hormone
- 1.2 Arzneimittelrückstände in der Umwelt
- 1.3 Humanarzneimittelrückstände mit hormoneller Wirkung in der Umwelt
- 1.4 Einsatz von Hormonen in der Tierhaltung in Europa

2 Vorkommen von natürlichen und synthetischen Hormonen in verschiedenen Umweltkompartimenten

3 Umweltrisiken von Hormonpräparaten in der Tiermedizin

- 3.1 Identifizierung von Wirkstoffen mit möglicher Umweltrelevanz
- 3.2 Pharmakokinetik von Altrenogest und Chlormadinon
 - 3.2.1 Pharmakokinetik von Altrenogest
 - 3.2.2 Pharmakokinetik von Chlormadinon
- 3.3 Verhalten in der Umwelt
 - 3.3.1 Vorhersage von zu erwartenden Umweltkonzentrationen (PEC)
 - 3.3.2 Worst-Case-Szenario für die Wirkstoffe Altrenogest und Chlormadinon
- 3.4 Erstmalige Erhebung von Abgabemengen in Niedersachsen
 - 3.4.1 Abschätzung möglicher Behandlungen in Niedersachsen und Deutschland
 - 3.4.2 Präzisierung des Szenarios für eine Umweltbelastung durch Altrenogest

4 Wissenslücken und daraus abgeleitete Empfehlungen

- 4.1 Verbrauchszahlen
- 4.2 Abbau- und Umweltverhalten der identifizierten Substanzen
- 4.3 Monitoringstudien

5 Referenzen

1 Einführung

1.1 Begriffsbestimmungen

1.1.1 Arzneimittel

Das deutsche Arzneimittelgesetz (AMG) ist die Grundlage einer ordnungsgemäßen Arzneimittelversorgung von Mensch und Tier in Deutschland. Es stellt darüber hinaus sicher, dass nur wirksame, unbedenkliche und qualitativ hochwertige Arzneimittel eingesetzt werden. In §2 AMG werden Arzneimittel wie folgt definiert:

„(1) Arzneimittel sind Stoffe oder Zubereitungen aus Stoffen,

1. die zur Anwendung im oder am menschlichen oder tierischen Körper bestimmt sind und als Mittel mit Eigenschaften zur Heilung oder Linderung oder zur Verhütung menschlicher oder tierischer Krankheiten oder krankhafter Beschwerden bestimmt sind oder

2. die im oder am menschlichen oder tierischen Körper angewendet oder einem Menschen oder einem Tier verabreicht werden können, um entweder

a) die physiologischen Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung wiederherzustellen, zu korrigieren oder zu beeinflussen oder

b) eine medizinische Diagnose zu erstellen.“

1.1.2 Hormone

Hormone sind vom Körper hergestellte Substanzen, die essentiell zur Steuerung unterschiedlichster biochemischer Prozesse benötigt werden. Sie liegen häufig in sehr niedrigen Konzentrationen (10^{-11} – 10^{-12} molar) vor. Hormone binden an Rezeptoren und lösen so biologische Wirkungen aus. Man kann Hormone nach ihrem Bildungsort (z. B. Hypophyse, Nebennieren, Pankreas) oder ihrer molekularen Struktur (Steroide, Proteine/Polypeptide, Glycoproteine, Tyrosin-Derivate) unterscheiden.

Von besonderer Bedeutung sind die Steroidhormone, da in diese Gruppe bedeutende Substanzen aus dem Bereich der Sexualhormone fallen, die für zentrale lebenswichtige Funktionen wie Fortpflanzung und Entwicklung des Organismus benötigt werden. Daher muss zum richtigen Zeitpunkt die richtige Hormon-Konzentration am richtigen Ort vorliegen. Störungen dieses empfindlichen Gleichgewichtes können gravierende gesundheitliche Beeinträchtigungen bewirken.

In Tabelle 1 sind wichtige Begrifflichkeiten im Zusammenhang mit Steroidhormonen zusammengestellt.

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu Sexualsteroiden und Glucocorticoiden.

Bezeichnung	Bildungsort, Bedeutung
Sexualsteroide	Bildung in Hoden und Ovarien sowie in der Nebenniere und Placenta; wichtige Vertreter: Androgene, Estrogene und Gestagene; Ausgangsmolekül für die Biosynthese ist Cholesterol
a) Androgene	stimulieren Ausbildung der primären und sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale; fördern das Fortpflanzungsverhalten beim männlichen Tier; Regulation der Produktion und Entwicklung von Spermien (Spermatogenese)
b) Estrogene	bedeutend für das Wachstum der weiblichen Geschlechtsorgane und für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale
c) Gestagene	auch Gelbkörper- oder Schwangerschaftshormone genannt; beeinflussen die Konsistenz der Gebärmutterschleimhaut; zweite wichtige Klasse der weiblichen Geschlechtshormone
Glucocorticoide	weitere Klasse der Steroidhormone; Bildung in der Nebenniere; neben der katabolen Wirkung (v.a. Glucosestoffwechsel) und einer Wirkung auf den Elektrolythaushalt werden auch entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkungen erzielt

Neben den von Organismen gebildeten natürlichen Hormonen werden auch synthetisch hergestellte Derivate verwendet. Die synthetischen Derivate zeichnen sich in der Regel durch eine stärkere und längere Wirkung aus. Eine entsprechende Einteilung der Hormone in natürliche und synthetische Verbindungen ist in Tabelle 2 gegeben.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass auch die natürlichen Hormone in großen Mengen synthetisch als Arzneimittel hergestellt werden. Eine Unterscheidung zwischen biosynthetisch und chemisch-synthetisch hergestellten Verbindungen im Organismus ist nicht immer und wenn, nur mit extrem aufwändigem analytischem Aufwand zu leisten („Dopingproblematik“).

Tabelle 2: Einteilung der in dieser Literaturstudie berücksichtigten Hormone in natürliche und synthetische Substanzen.

Hormone	natürlich	Synthetisch
Androgene	Androstendion Dihydrotestosteron Testosteron	
Estrogene	Estrogen (E1) 17 β -Estradiol (E2) Estriol (E3)	17 α -Ethinylestradiol (EE2)
Gestagene	Progesteron	Altrenogest Chlormadinon Dienogest Dydrogesteron Levonorgestrel Medroxyprogesteron Melengestrol Norethisteron Norgestrel
Glucocorticoide	Hydrocortison	Dexamethason Prednisolon Prednison

1.2 Arzneimittelrückstände in der Umwelt

Seit Mitte der 1980er Jahre ist in zunehmenden Umfang bekannt, dass Arzneimittel selbst und/oder ihre Metaboliten, Transformations- und Abbauprodukte aufgrund ihrer Persistenz in die unterschiedlichsten Umweltkompartimente gelangen können [1-4].

Humanarzneimittel werden hauptsächlich über Kläranlagenabflüsse in Flüsse und Kanäle eingetragen. Besonders belastet sind daher Oberflächengewässer mit einem hohen Abwasseranteil. In Deutschland wird bei der Trinkwassergewinnung ca. 15-20 % Oberflächenwasser eingesetzt, das durch Uferfiltration und eine aufwändige Aufbereitung im Wasserwerk von vielen organischen Spurenstoffen größtenteils gereinigt wird. Nichtsdestotrotz gelangen Spuren von Humanarzneimitteln aus verschiedenen Substanzklassen (u.a. Lipidsenker, Schmerz- und Röntgenkontrastmittel) mit Konzentrationen oberhalb von 0,01 $\mu\text{g/L}$ in das Trinkwasser [5 und Abbildung 1].

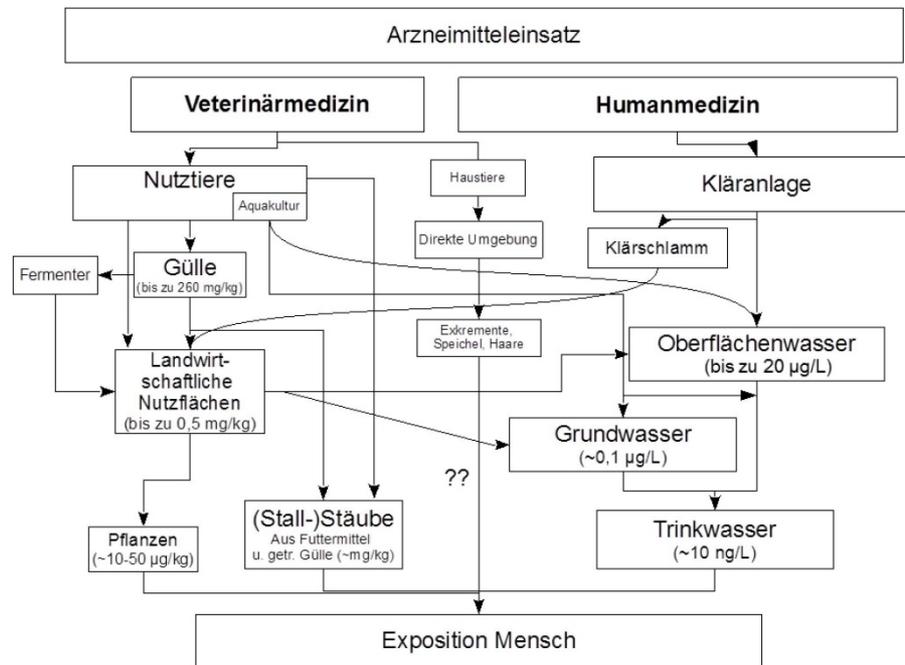


Abbildung 1: Wichtige Eintragspfade für Human- und Tierarzneimittel. Für Humanarzneimittel sind Umwelteinträge hauptsächlich über Kläranlagenabflüsse zu erwarten, Tierarzneimittel gelangen v.a. über Wirtschaftsdünger in die Böden und können weiter verlagert werden [Abbildung modifiziert nach 4].

Im Bereich der Tierarzneimittel lag der Fokus der Monitoringstudien vor allem auf den Antibiotika, die zu einem überwiegenden Anteil im Nutztierbereich eingesetzt werden. Tierarzneimittel, v.a. Tetracycline, Sulfonamide und Fluorchinolone, gelangen aufgrund ihrer geringen Metabolisierung und hohen Persistenz über die Wirtschaftsdünger (z.B. Schweine- und Rindergülle, Geflügelmist) in die Böden und können dann in das Sicker-/Grundwasser oder auch (Nutz)Pflanzen gelangen.

Eine Verlagerung von Tierarzneimittelrückständen in das Grundwasser ist für verschiedene Vertreter der Sulfonamide wiederholt nachgewiesen worden [3, 4, 6, 7]. Eine mögliche Belastung des Trinkwassers durch Tierarzneimittel ist nach derzeitigem Kenntnisstand als äußerst unwahrscheinlich anzusehen, da die weitere Bodenpassage sowie die Wasseraufbereitung im Zuge der Trinkwasserherstellung hohe Barrieren darstellen [4, 8].

Auch in Biogasanlagen, wo Wirtschaftsdünger meist zusammen mit Maissilage als Substrate eingesetzt werden, zeigen bestimmte Veterinär-Antibiotika eine hohe Persistenz. In Laborfermenterstudien, die vergleichbare anaerobe Betriebsbedingungen wie Biogasanlagen aufwiesen, konnte eine hohe Eliminationsrate für Chlortetracyclin jedoch eine deutlich schwächere Elimination für Tetracyclin und Sulfonamide festgestellt werden [9].

1.3 Humanarzneimittelrückstände mit hormoneller Wirkung in der Umwelt

Mengenmäßig bedeutende Humanarzneimittel mit Sexualhormonen (Verbrauchsmenge von über einer Tonne pro Jahr) sind Lutropin alfa, Medroxyprogesteron, Denogest und Norethisteron. Ethinylestradiol Betadex wurde 2009 bei leicht steigender Tendenz mit einer Gesamtmenge von 633 kg verwendet. Die aufgelisteten Substanzen stellen in Deutschland über 80 % der Gesamtmenge von 13,7 Tonnen an Hormonpräparaten dar [5].

Umfangreiche Studien zu natürlichen und synthetischen Estrogenen aus dem Bereich der Humanarzneimittel haben gezeigt, dass diese im unteren bis untersten ng/L-Bereich v.a. in den Vorflutern von Kläranlagen gefunden werden können. Diese niedrigen Konzentrationen lösen bereits gravierende physiologische Wirkungen auf Fische und andere aquatische Lebewesen aus. So kann es durch die Verweiblichung von Fischbeständen zur Gefährdung ganzer Bestände kommen [10]. Über den Eintrag von 17 α -Ethinylestradiol in das Grund- und Trinkwasser wurde wiederholt berichtet, die maximale Konzentration im Trinkwasser lag unterhalb von 5 ng/L [5].

Zur Verdeutlichung der Gefährdung aquatischer Lebewesen sind beispielhaft in Tabelle 3 Wirkschwellen und mittlere effektive Konzentrationen („EC₅₀-Werte“) für wichtige Estrogene dargestellt [11]. Im ökotoxikologischen Bereich gelten Konzentrationen < 0,1 mg/L (EC₅₀) als extrem toxisch [5].

Tabelle 3: Wirkschwellen und mittlere effektive Konzentrationen (EC₅₀) von Estrogenen auf die Induktion von Vitellogenin. Bei dieser Konzentration wird ein halbmaximaler Effekt beobachtet [5, 11].

Substanz	Wirkschwelle [ng/L]	EC ₅₀ [ng/L]	relative Potenz ^a
Estradiol (E2)	1	25	1
Estrogen (E1)	> 1	60	0,3
17 α -Ethinylestradiol (EE2)	0,1	1,2	20

^a Für E2, die am stärksten wirksame Substanz, wurde die Potenz auf 1 gesetzt

Jedoch können nicht nur Estrogene eine Gefährdung für die aquatische Umwelt darstellen. Auch für weitere natürliche und synthetische Sexualhormone wurde festgestellt, dass sie negative Auswirkungen auf Fische haben können. In Tabelle 4 sind beispielhaft LOEC-Werte („lowest observed effect concentration“) dargestellt, bei denen ein Rückgang der Fruchtbarkeit festgestellt werden kann [12].

Tabelle 4: LOEC-Werte von Sexualhormonen, die in der Humanmedizin verwendet werden.

Substanz	Fischspezies	LOEC [ng/L]
Levonorgestrel	Dickkopfelritze	0,8
Norethisteron	Dickkopfelritze	1
Medroxyprogesteron	Zebrafisch	342
Progesteron	Dickkopfelritze	100

Sexualhormone aus der humanmedizinischen Anwendung sind daher zu den Arzneimitteln mit den stärksten ökotoxikologischen Wirkungen in der aquatischen Umwelt zu rechnen und auch die Einträge in das Trinkwasser sind zumindest aus hygienischen Gründen als bedenklich zu erachten. Eine Minimierung der Umwelteinträge wird daher mit hoher Priorität empfohlen [5].

1.4 Einsatz von Hormonen in der Tierhaltung in Europa

Tierarzneimittel dürfen nur innerhalb enger gesetzlicher Regelungen eingesetzt werden und unterliegen einer Zulassungspflicht. Diese beinhaltet auch eine Bewertung der Umwelteigenschaften der Substanzen, allerdings nur im Rahmen der Zulassung neuer Präparate. Gemäß Tierschutzgesetz besteht allerdings auch die Verpflichtung, Tierarzneimittel zur Heilung erkrankter Tiere einzusetzen.

Gemäß §56 a AMG dürfen sowohl bei nicht Lebensmittel liefernden als auch bei Lebensmittel liefernden Tieren vom Grundsatz her nur Fertigarzneimittel eingesetzt werden, die für die betreffende Tierart und das betreffende Anwendungsgebiet zugelassen sind. Eine Ausnahme hiervon besteht nur im sogenannten „Therapienotstand“ unter Beachtung einer „Umwidnungskaskade“. Darüber hinaus dürfen bei Lebensmittel liefernden Tieren nur Arzneimittel verwendet werden, deren Wirkstoffe in der Tabelle 1 der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 aufgeführt. Diese sind größtenteils mit Höchstmengen verknüpft sind, um eine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers durch Rückstände dieser Wirkstoffe in Lebensmitteln tierischer Herkunft auszuschließen. Im Gegensatz zu den USA und Südame-

rika dürfen in Europa keine östrogen, gestagen oder androgen wirksamen Tierarzneimittel an Masttiere verabreicht werden.

Eine besondere Rechtslage liegt beim Einsatz von bestimmten hormonell wirksamen Substanzen bei Lebensmittel liefernden Tieren vor, die nicht der Mast dienen. Gemäß der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung dürfen bei diesen Tieren Hormone zur Therapie von Fruchtbarkeitsstörungen nur durch den Tierarzt selbst als Injektion oder – im Falle des Progesterons – auch als Vaginalspirale eingesetzt werden, jedoch nur natürliche Sexualhormone. Da aber für 17 β -Estradiol gemäß der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung ein vollständiges Anwendungsverbot besteht, werden in diesem Indikationsgebiet Gestagene verwendet.

Im Gegensatz dazu dürfen zur Brunstsynchronisation sowie zur Vorbereitung von Tieren für den Embryotransfer oder zur sexuellen Inversion bei Fischen innerhalb der ersten drei Lebensmonate auch synthetische Wirkstoffe (z. B. Altrenogest) unter Aufsicht des Tierarztes eingesetzt werden. Die eingesetzten Stoffe müssen wiederum in Tabelle 1 der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 aufgeführt (Vermerk: „nur für tierzüchterische Anwendungen und in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der Richtlinie 96/22/EG“) und entsprechende Fertigarzneimittel für die Tierart und jeweilige Indikation zugelassen sein [13–14].

Insbesondere der Anwendungsbereich Brunstsynchronisation stellt ein bislang nur wenig beachtetes Gebiet der Umweltforschung dar. Nach bundesweiten Medienberichten im Januar 2014 über den Hormoneinsatz in der Schweinehaltung rückte insbesondere der synthetische Wirkstoff Altrenogest in den Mittelpunkt des Interesses. Auch von Seiten des Umweltbundesamtes wurde festgestellt, dass es noch erheblichen Informationsbedarf zum Umfang des Hormoneinsatzes in der Tiermedizin und den damit möglicherweise verbundenen Umweltrisiken gibt.

Exakte Zahlen zum Einsatz von Hormonpräparaten in der Tiermedizin liegen derzeit nicht vor. Nach Angaben des Bundesverbandes für Tiergesundheit (BfT) aus dem Jahre 2004 liegt die gesamte verabreichte Hormonmenge in Deutschland bei 670 kg. Es handelt sich um eine sehr heterogene Wirkstoffgruppe. Den größten Anteil stellen Substanzen aus dem Bereich der Peptide und Prostaglandine dar, die im Körper der Tiere schnell metabolisiert werden und nach Ansicht des Autors somit keine Umweltrelevanz besitzen. Die Steroid- bzw. Sexualhormone werden mit 160 kg als von untergeordneter Bedeutung charakterisiert. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass in dem gleichen Beitrag die Abgabemenge für Antibiotika im Jahre 2003 auf 668 Tonnen geschätzt wurde [15]. Wiederholte Erfassungen aus den vergangenen Jahren haben aber gezeigt, dass die Menge im Bereich der Antibiotika um einen Faktor von 2–3 unterschätzt worden ist.

2 Vorkommen von natürlichen und synthetischen Hormonen in verschiedenen Umweltkompartimenten

Untersuchungen zu natürlichen Steroiden in verschiedenen Umweltkompartimenten wurden in den letzten Jahren vermehrt durchgeführt. Das Vorkommen in Oberflächengewässern von verschiedenen natürlichen Estrogenen, wie z.B. 17 β -Estradiol, wurde bereits in vielen Studien weltweit dokumentiert. Auch wenn im Bereich der Tierarzneimittel ein Anwendungsverbot besteht, wird es in der Humanmedizin eingesetzt. Da es sich um ein natürliches Hormon handelt, das vom menschlichen und tierischen Körper auch ohne Gabe als Arzneimittel produziert wird, kann 17 β -Estradiol auch über die Ausscheidungen von Mensch und Tier in Gewässer gelangen.

Im Falle der synthetischen Estrogene wurde 17 α -Ethinylestradiol, ein Wirkstoff der Antibaby-Pille, als schwer abbaubar identifiziert und auch schon in vielen Untersuchungen erfasst. Je nach Art des Gewässers und Herkunftsland unterscheiden sich die ermittelten Konzentrationen stark (Tabelle 5 und [16–17]).

Tabelle 5: Konzentrationen in ng/L von wichtigen natürlichen Estrogenen und 17 α -Ethinylestradiol in Oberflächengewässern und Grundwasser. Die Wirkschwellen für die Induktion von Vitellogenin in Regenbogenforellen betragen 0,1 ng/L für EE2 und 1 ng/L für E2 (s.a. Tabelle 3).

Gewässer	E1	E2	E3	EE2
Deutschland				
Würm	< 0,30–2,00	< 0,30–0,70	n.a.	< 0,30–0,70
Elbe und Nebenströme (Deutschland und Tschechische Republik)	< 0,20	< 0,20	n.a.	< 0,20
Europa				
Lambro (Italien)	0,05	n.d.	0,05	n.d.
Grundwasser, Rhône, Alpen (Frankreich)	n.d.–3,5	n.d.–1,3	n.a.	n.d.
Oberflächenwasser (Niederlande)	<0,30–7,20	<0,80–1,00	n.a.	<0,30–0,40
USA				
Südflorida	0,88–5,20	n.d.–1,80	n.a.	n.a.
Acushet Flussmündung	0,73–1,20	0,56–0,83	n.a.	3,01–4,67

Gewässer	E1	E2	E3	EE2
Asien				
Dan-Shui Fluss, Taipei (Taiwan)	22,40–66,20	1,40–33,90	12,40–73,60	7,53–27,40
Jiaozhou Bucht (China)	14,00–180,0	n.d.–134,0	4,00–94,00	7,00–24,00
Gelber Fluss (China)	n.d.–15,60	n.d.–2,30	n.a.	n.a.
Dianchi See (China)	n.d.	1,90	n.d.	n.d.

Abkürzungen: E1: Estrogen, E2: 17 β -Estradiol, E3: Estriol, EE2: 17 α -ethinylestradiol, n.a.: nicht analysiert, n.d.: nicht detektierbar.

Neben den Estrogenen wurden auch die natürlichen Androgene wie Testosteron und Androstendion in Oberflächengewässern und Grundwässern, in Konzentrationen von 0,6 bis 6,0 ng/L, nachgewiesen. Auch das natürliche Progesteron und die synthetischen Gestagene Levonorgestrel und Norethisteron wurden bereits in Grund- und Oberflächengewässern in Bereichen von 1,1 bis 11 ng/L detektiert [17]. Medroxyprogesteron wurde sogar in einem Bereich von 0,9 bis 34 ng/L in verschiedenen Gewässern nachgewiesen. Einzelne Studien liegen auch für Megestrol, Dydrogesteron, Norgestrel und Melengestrol in Gewässern vor, welche jedoch stark variierende Konzentrationen aufweisen [12]. Dabei ist zu beachten, dass sich bisher nur wenige Studien mit dem Vorkommen von synthetischen Gestagenen in diesem Umweltkompartiment befassen.

Neben der Untersuchung von Gewässern erfolgten Studien zu der Gesamtkonzentration an natürlichen Steroidhormonen in landwirtschaftlich genutzten Böden, Gärrückständen und Gülle (Tabelle 6 und [18, 19]). Beispielhaft sind Konzentrationen von einzelnen Substanzen sowie die Summe aller gemessenen Estrogene, Androgene und Gestagene in Tabelle 6 dargestellt.

In Gärrückständen, Gülle und landwirtschaftlich genutzten Böden werden deutlich höhere Konzentrationen von natürlichen Hormonen als in der aquatischen Umwelt gefunden. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe – insbesondere im Vergleich zu Wasser – durch starke Sorption an organische Bestandteile deutlich reduziert ist (s.a. Kapitel 3.3).

Tabelle 6: Gefundene Umweltkonzentrationen von natürlichen Steroidhormonen in Gärrückständen, Gülle und landwirtschaftlich genutzten Böden. Alle Angaben in µg/kg Trockenmasse.

Wirkstoff(-gruppe)	Gärrückstände	Gülle	Boden
Estrogen	593–1478	112–1680	n.d.–1,12
17β-Estradiol	28–50	126–310	0,02–0,90
Σ Estrogene	667–1570	112–2163	0,02–7,8
Dihydrotestosteron	n.d.–8,3	n.d.–33	n.d.–0,10
Testosteron	33–187	13–33	n.d.–2,40
Σ Androgene	258–538	31–89	0,12–5,8
Pregnenolon	n.d.–3,1	n.d.–27	0,10–4,41
Progesteron	321–1333	n.d.–1247	0,90–1,46
Σ Gestagene	321–1336	n.d.–1274	1,0–5,9
Σ Steroidhormone	1247–3444	143–3526	0,9–11,7

Für die synthetischen Gestagene sowie für die synthetischen Glucocorticoide liegen jedoch nur vereinzelte Nachweise in Oberflächengewässern (siehe oben), Abwässern und sogenannten „Gülle-Lagunen“, welche als Sammelbecken für Abwässer von Masttierbetrieben insbesondere in den USA dienen, vor. Beispielhaft sind in Tabelle 7 Konzentrationen von natürlichen und synthetischen Steroiden sowie Glucocorticoiden in „Lagunen“ dargestellt, da diese Matrix als ein verdünnter Wirtschaftsdünger angesehen werden kann.

Für Altrenogest und Chlormadinon erfolgten bislang keine Erhebungen für Wirtschaftsdünger und Böden, somit stehen für diese Wirkstoffe keine entsprechenden Daten zur Verfügung.

Tabelle 7: Konzentrationen in „Gülle-Lagunen“ für ausgewählte natürliche und synthetische Hormone [12, 20].

Substanz	Konzentration [ng/L]
Natürliche Hormone	
Estrogen	134–1450
17 β -Estradiol	< 0,06
Progesteron	9,9–300; < 7–5024
Androstendion	22,1–411
Testosteron	6,7–34,5
Synthetische Hormone	
Glucocorticoide	
Dexamethason	< 1,3–61,9
Prednisolon	< 1,6–31,7; 0,6–500
Prednison	< 1,66
Gestagene	
Dydrogesteron	2188
Medroxyprogesteron-acetat	9,9–42,6; 11,1–330
Melengestrol-acetat	0,6–6,5
Norethisteron	< 1,1
Norgestrel	1120–1440
Estrogene	
17 α -Ethinylestradiol	< 2,0–195

3 Umweltrisiken von Hormonpräparaten in der Tiermedizin

Da nur wenige Monitoringdaten zum Vorkommen von natürlichen und synthetischen Hormonen aus der Tierhaltung in der Umwelt vorliegen, wird im Folgenden ein systematischer Ansatz verfolgt, der zumindest eine Identifizierung von Wirkstoffen mit möglicher Umweltrelevanz erlaubt und anhand von stofflichen Eigenschaften das mögliche Umweltverhalten beschreiben lässt.

3.1 Identifizierung von Wirkstoffen mit möglicher Umweltrelevanz

In Tabelle 8 sind die in Verordnung EU Nr. 37/2010 gelisteten Substanzen mit hormoneller Wirkung zusammengestellt sowie Angaben zu Höchstmengen, ihre Verwendung bei Nutztieren und das Vorhandensein entsprechender Präparate für diese Anwendung in Deutschland dargelegt.

Tabelle 8: In Verordnung EU Nr. 37/2010 gelistete Substanzen mit hormoneller Wirkung [14].

Substanz	VO EU 37/2010 Höchstmenge	Einsatz Nutztier	Präparate für Nutztier- tiere
Steroide			
Altrenogest	ja	Schweine / Equiden	ja
Beclometasondipropionat	nein	Equiden	nein
Betamethason	ja	Rinder / Schweine	ja
Carbetocin	nein	alle Lbm. Tiere	ja
Chlormadinon	ja	Rinder (Pferde: VO EU Nr. 122/2013 - "Positivliste")	ja
Clenbuterol	ja	Rinder / Equiden	ja
Dexamethason	ja	Rinder / Ziegen / Schweine / Equiden	ja
Estradiol (17 β -Estradiol)	nein	alle Lbm. Tiere	nein
Flugestonacetat	ja	Schafe / Ziegen	nein
Hydrocortison	nein	alle lbm. Tiere	nein
Medroxyprogesteronacetat	nein	Schafe	nein
Methylprednisolon	ja	Rinder	nein
Oxytocin	nein	alle lbm. Tiere	ja
Prednisolon	ja	Rinder	ja
Progesteron	nein	Rinder/Schafe / Ziegen / Equiden (weiblich)	ja

Substanz	VO EU 37/2010 Höchstmenge	Einsatz Nutztier	Präparate für Nutztier- tiere
Prostaglandine			
Alfaprostol	nein	Rinder/Schweine/Equiden/ Kaninchen	nein
Cloprostenol	nein	Rinder/Schweine/Ziegen/E quiden	ja
Dinoprost/Dinoproston/Dino prosttromethamin	nein	alle lbm. Tiere	nein
Etiprostonthromethamin	nein	Rinder/Schweine	nein
Luprostiol	nein	alle lbm. Tiere	ja
Tiaprost	nein	Rinder/Schafe/Schweine/E quiden	nein
Gonadotropin-Releasing- Hormon und Analoga			
Azagly-Nafarelin	nein	Salmoniden	nein
Buserelin	nein	alle lbm. Tiere	ja
Corticotropin	nein	alle lbm. Tiere	nein
Deslorelinacetat	nein	Equiden	ja
D-Phe6-luteininizing-hor- mone-releasing hormone	nein	alle lbm. Tiere	nein
Fertirelinacetat	nein	Rinder	nein
Follikelstimulierendes Hor- mon (natürliche FSH sowie synthetische Analoga)	nein	alle lbm. Tiere	ja
Gonadotropin-Releasing- Hormon (GnRH)	nein	alle lbm. Tiere	ja
HCG (Humanes Chorion- gonadotropin, Urofollitropin) und synthetische Analoga	nein	alle lbm. Tiere	ja
Humanes Menopausengo- nadotropin (HMG)	nein	Rinder	nein
Lecirelin	nein	Rinder / Equiden / Kanin- chen	ja
Luteinisierungshormon (natürliches LH sowie syn- thetische Analoga)	nein	alle lbm. Tiere	ja
Peforelin	nein	Schweine	ja
PMSG syn. eCG (Pregnant Mare's Serum Gonadotro- pin)	nein	alle lbm. Tiere	ja
Thyronine			
Levothyroxin (L-Thyroxin)	nein	alle lbm. Tiere	nein
Sonstige			
Ergometrinmaleat	nein	alle lbm. Tiere	nein

Abkürzungen: lbm. Lebensmittel liefernd; VO: Verordnung.

Als mengenmäßig relevante Wirkstoffe werden solche Substanzen angesehen, die in der Schweine- und Rinderhaltung eingesetzt werden. Die Festlegung einer Rückstandshöchstmenge soll sicherstellen, dass durch Rückstände der Substanz unterhalb dieses Wertes keine gesundheitliche Beeinträchtigung des Verbrauchers durch den Verzehr eines solchermaßen belasteten Lebensmittels lebenslang auftritt. Bei Stoffen ohne Festlegung einer Rückstandshöchstmenge kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanzen keine gesundheitliche Beeinträchtigung für den Verbraucher darstellen sofern die Anwendungsbedingungen der Hersteller beachtet werden.

In einem zweiten Schritt erfolgt nunmehr ein Ausschluss von Substanzen für eine tiefergehende Betrachtung, die hinsichtlich einer möglichen Umweltrelevanz wegen folgender Kriterien von zu vernachlässigender Bedeutung sind:

1. es wurde keine Rückstandshöchstmenge festgelegt;
2. es ist kein Präparat zur Behandlung lebensmittelliefernder Tiere in Deutschland zugelassen.

Nach Berücksichtigung dieser Kriterien bleiben sechs Wirkstoffe übrig: Altrenogest, Chloradinon, Betamethason, Dexamethason, Prednisolon und Clenbuterol (Tabelle 9).

Tabelle 9: Identifizierte synthetische Tierarzneimittel mit hormoneller Wirkung und möglicher Umweltrelevanz.

Substanz	Einsatz Nutztier	Einsatzgebiete	zugelassene Präparate (D)
Altrenogest	Schweine / Equiden	Brunstsynchronisation zuchtreife Jungsauen, Oestruskontrolle Stuten	Altresin, Regumate, Suifertil, Virbagest (Schwein), Regumate Equine (Pferd)
Betamethason	Rinder / Schweine	lang wirksames halogeniertes Glucocorticoid: Therapie nicht infektiöser Entzündungen aller Art und Allergien/allergische Reaktionen	Pferde: Celestovet
Clenbuterol	Rinder / Equiden	Hemmung der Wehentätigkeit beim Rind, Weitstellung der Bronchien zur Therapie von Atemwegserkrankungen Pferd	Tokolyse Rind: Planipart, Clenovet pro inj.; Atemwegserkrankung Pferd: Clenovet Gel, Equi Plus, Equipulmin, Venti Plus, Ventipulmin

Substanz	Einsatz Nutztier	Einsatzgebiete	zugelassene Präparate (D)
Chlormadinon	Rinder (Pferde: VO EU Nr. 122/2013 - "Positivliste")	Brunst- / Rossesynchronisation, Ovulationssynchronisation und Brunstinduktion, Rosseinduktion und Ovulationsinduktion	Anifertil N (Rinder), Synchronsyn (Pferde, Rinder)
Dexamethason	Rinder / Ziegen / Schweine / Equiden	s. Betamethason	insgesamt 16 Präparate, davon nur 1 (Naquadem) ausschließlich für LM liefernde, 10 für LM und nicht-LM liefernde und 5 ausschließlich für nicht-LM liefernde Tiere
Prednisolon	Rinder	mittellang wirksames Glucocorticoid, Einsatzgebiete siehe Dexamethason	insgesamt 10 Präparate, davon 2 nur für LM liefernde (Kombipräparat Euterinjektoren) und jeweils 4 nur für Nicht-LM liefernde oder LM und nicht-LM liefernde Tiere

Abkürzungen: LM: Lebensmittel; VO: Verordnung.

Betamethason wird nur bei Schlachtequiden bei Einhaltung von Mindestwartezeiten eingesetzt und ist daher von untergeordneter Bedeutung.

Clenbuterol darf bei Lebensmittel liefernden Tieren nur nach strenger Indikation (Tokolyse des Rindes, Atemstörungen/Hufrollenerkrankung/Hufrehe bei Pferden) eingesetzt werden. Eine Abweichung von den Zulassungsbedingungen („Umwidmung“/“Off-label-Use“) ist gemäß der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung nicht erlaubt.

Bezugnehmend auf die Untersuchungen aus dem Bereich der Humanarzneimittel werden im Folgenden daher auch nicht die beiden anderen Vertreter Dexamethason und Prednisolon aus dem Bereich der Glucocorticoide sondern nur die Sexualhormone Altrenogest und Chlormadinon hinsichtlich eines möglichen Umweltrisikos weiter betrachtet.

3.2 Pharmakokinetik von Altrenogest und Chlormadinon

Hauptmetabolisierungsweg in Nutztieren ist bei beiden Substanzen – wie bei allen Steroiden – die Konjugation (Glucuronidierung und Sulfatierung). Diese Metaboliten sind gut wasserlöslich und können über die Niere ausgeschieden werden.

In der Gülle ist eine Spaltung der inaktiven Metaboliten in den aktiven Wirkstoff möglich. Im überwiegend anaeroben Milieu könnte allerdings auch eine schnelle Inaktivierung der Wirkstoffe durch Reduktion und/oder Metabolisierung durch Mikroorganismen erfolgen. Durch die Konjugatsspaltung erhöht sich die Lipophilie und es könnte auch eine Sorption an organische Bestandteile der Gülle erfolgen.

3.2.1 Pharmakokinetik von Altrenogest

Im abschließenden Bericht der Europäischen Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency EMA, bis 2008: EMEA) zur Festsetzung von Höchstgehalten für Altrenogest in tierischen Lebensmitteln wird explizit auf die Metabolisierung beim Schwein eingegangen [21 und Tabelle 10]. Studien mit radioaktivem Tracer haben gezeigt, dass die Substanz rasch aufgenommen wird und die höchsten Wirkspiegel nach 3–6 Stunden erreicht werden. Nach längerer Behandlung erfolgt eine Anreicherung im Plasma. Die Halbwertszeit beträgt ca. 10 Tage. Den Hauptanteil der Radioaktivität findet man in der Leber, geringere Anteile in den Nieren sowie im Muskel- und Fettgewebe. Die Daten zur Ausscheidung streuen innerhalb von zwei Studien sehr. Sowohl die Ausscheidung über die Galle in den Faeces als auch die renale Ausscheidung über den Urin kann den Hauptweg darstellen.

Nur wenige Metabolite in Plasma, Urin, Faeces und Geweben konnten extrahiert und identifiziert werden. Als Hauptmetabolisierungswege werden aber Oxydation und Konjugation – wie auch bei anderen Steroiden – angegeben. Eine Dealkylierung der Verbindung erfolgt nicht.

Als Markerrückstand für die Überwachung von Höchstmengen wurde Altrenogest identifiziert mit dem Hinweis, dass diese Substanz nur einen Bruchteil (< 10 %) der eingesetzten Wirksubstanz ausmacht.

3.2.2 Pharmakokinetik von Chlormadinon

Im abschließenden Bericht der EMA zur Festsetzung von Höchstgehalten für Chlormadinon in tierischen Lebensmitteln wird explizit auf die Metabolisierung bei Milchkühen eingegangen

[22]. Zwölf Tiere wurden oral mit 10 mg Chlormadinon-Acetat über einen Zeitraum von 20 Tagen behandelt. Jeweils drei Tiere wurden nach 1, 4, 7 und 8 Tagen nach der letzten Behandlung geschlachtet. Hier wurden nach 7 Tagen in allen Geweben und der Milch geringe Chlormadinon-Gehalte in unteren einstelligen µg/kg-Bereich gemessen.

Es wurden allerdings keine Studien mit radioaktivem Tracer eingereicht. Es wird auf ADME-Studien (absorption, distribution, metabolism, and excretion) in Kühen verwiesen, die zeigen, dass zwei Metabolite im Plasma in Konzentrationen von 2 bzw. 15 % der Chlormadinon-Konzentration vorkommen. In der Milch wurden die Metabolite mit weniger als 2 % der Chlormadinon-Konzentration gefunden. Es werden keine Angaben zu Metabolisierungswegen gemacht und auch eine chemische Identifizierung der Substanzen ist nicht erfolgt. Als relevanter Markerrückstand für die Überwachung von Höchstmengen in tierischen Lebensmitteln wurde daher Chlormadinon identifiziert.

Tabelle 10: Toxikologische und pharmakologische Eigenschaften von Altrenogest und Chlormadinon nach Angaben der Europäischen Arzneimittel-Agentur EMA [21, 22].

Substanz	Pharmakologischer ADI-Wert	Ausscheidung	Metabolite
Altrenogest	0,04 µg/kg KG, 2,4 µg pro Person	biliär über Faeces, renal nach Konjugation	Glucuronide, Sulfate, Gluthation-Addukt
Chlormadinon	0,07 µg/kg KG, 4,2 µg pro Person	keine Angaben	keine Angaben

3.3 Verhalten in der Umwelt

Da nur sehr wenig über das Umweltverhalten von synthetischen Hormonen aus der Tierhaltung bekannt ist und, wie in Kapitel 2 bereits dargestellt, auch nur sehr wenige Daten aus Monitoringstudien zum Vorkommen der Wirkstoffe in der Umwelt zur Verfügung stehen, sind für eine erste Abschätzung des Umweltverhaltens zunächst einmal die in Tabelle 11 dargestellten physikalisch-chemischen Parameter heranzuziehen.

Tabelle 11: Physikalisch-chemische Parameter von Altrenogest und Chlormadinon.

Substanz	Molekulargewicht	Wasserlöslichkeit	log P _{ow}
Altrenogest	310,43	16,5 mg/L ^a , [23]	3,79 ^a , [23]
Chlormadinon	404,93	7,3 mg/L ^b , [24]	3,27 ^b , [24]

^aexperimentell bestimmt; ^brechnerisch ermittelt (Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2016 ACD/Labs, [24])).

Der Log-p_{ow} -Wert kann zum Abschätzen des Verhaltens einer Substanz im Organismus hinsichtlich der Resorption und ggf. auch einer Akkumulation im Fettgewebe herangezogen werden. Die Log-p_{ow} -Werte der meisten Arzneimittel liegen in einem Bereich von 0,4 bis 5,4. Ab Werten > 3 besteht prinzipiell die Möglichkeit im Organismus zu akkumulieren.

Zur Einschätzung des Umweltverhaltens im Boden kann der Log-p_{ow} -Wert dahingehend herangezogen werden, wie stark Substanzen im Boden festgehalten (sorbiert) werden können. Insbesondere lipophilere Verbindungen zeigen eine tendenziell starke Sorption an die organische Matrix des Bodens. Eine weitere Verlagerung in das Sicker- oder Grundwasser ist dann unwahrscheinlich bzw. zeitlich deutlich verzögert. Insofern wäre sowohl für Altrenogest als auch für Chlormadinon v.a. eine starke Sorption an die organische Bodenmatrix zu erwarten. Die Wasserlöslichkeit ist zwar gering, jedoch kann ein Eintrag in die aquatische Umwelt, z.B. das Sickerwasser, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

3.3.1 Vorhersage von zu erwartenden Umweltkonzentrationen (PEC)

Da es bislang keine systematischen Untersuchungen zum Verhalten der ausgewählten Wirkstoffe in der Umwelt gibt, wurde ein „Worst-Case-Szenario“ entwickelt.

3.3.2 Worst-Case-Szenario für die Wirkstoffe Altrenogest und Chlormadinon

Dieses Szenario setzt zunächst einmal keine Metabolisierung der Substanz im Organismus voraus und geht daher von einem vollständigen Transfer des Wirkstoffes in die Umwelt aus. Die erforderlichen Dosierungen und Tiergewichte stammen aus Angaben in der veterinärmedizinischen Fachliteratur [13] bzw. wurden vom statistischen Bundesamt bezogen [25-26].

Für neuzuzulassende veterinärmedizinische Produkte existiert seit 1998 in der EU eine Leitlinie zur Überprüfung der Umweltverträglichkeit [27]. Ein zentrales Element dieses Bewertungskonzeptes ist in der sogenannten Phase 1 zunächst die Berechnung einer möglichen Umweltexposition. Für den Wirkstoffgehalt im Boden gilt – mit Ausnahme der Antiparasitika – ein sicherer Schwellenwert („Triggerwert“) von $100 \mu\text{g}/\text{kg}$. Hierdurch wird zunächst eine sehr allgemein gehaltene Stoff- und Expositionsbeurteilung (Phase 1) durchgeführt. Überschreitet diese berechnete Umweltkonzentration den Triggerwert im Boden, so erfolgt eine vertiefte Umweltbewertung in Phase 2. Diese Studien beinhalten dann auch ökotoxikologische Untersuchungen an der terrestrischen und ggf. auch aquatischen Fauna.

Aus den so durchgeführten Berechnungen ist zu erkennen (s. Tabelle 12), dass die PEC-Werte unter Annahme des oben geschilderten „Worst-Case-Szenarios“ für Altrenogest 5 mg/kg in Schweinegülle und für Chlormadinon 0,18 mg/kg in Rindergülle betragen können. Wird eine so belastete Gülle allerdings auf den Boden ausgebracht, so werden Wirkstoff-Gehalte in einer Bodentiefe von 5 bzw. 25 cm (Einpflügen) unterhalb des Triggerwertes von 100 µg/kg Boden für Chlormadinon erhalten. Für Altrenogest wird der Triggerwert nur nach Einpflügen in eine Bodentiefe von 25 cm unterschritten.

Tabelle 12: „Worst-Case-Szenario“ (keine Metabolisierung im Organismus, vollständiger Transfer des Wirkstoffes in die Exkremente) für Altrenogest und Chlormadinon.

Substanz	Altrenogest (Schwein)	Chlormadinon (Rind)
Dosis [mg]	20	10
Dauer der Therapie [Tage]	18	20
Gesamtmenge Wirkstoff [mg]	360	200
Ausscheidung pro Tier [kg/Tag]	4 ^[30]	55 ^[30]
Konzentration in Gülle [mg/kg]	5	0,18
Konzentration pro m ² Boden [mg]	23,8	0,86
Konzentration in 5 cm Boden [µg/kg]	317	11,5
Konzentration in 25 cm Boden [µg/kg]	63	2,30
Menge Substanz bei Einsatz Dauer einer Therapie, 2 Mio Sauen bzw. 1,8 Mio weibl. Zucht/Nutzrinder [kg]	720	360

Üblicherweise erfolgt ein Einpflügen der Gülle und somit müsste nach den derzeitigen rechtlichen Bestimmungen keine vertiefende Prüfung (Phase 2) bei einer Neuzulassung eines der Hormon-Präparate erfolgen, selbst wenn aufgrund der niedrigen Wirkungsschwelle für diese Substanzen Umweltwirkungen nicht auszuschließen wären. Dies würde auch einen möglichen Transfer der Wirkstoffe durch oberirdischen Abfluss, z.B. nach einem Starkregenereignis in Flüsse und Seen sowie eine Verlagerung in das Grundwasser einschließen.

Berechnungen eines maximalen Gesamtverbrauchs an Altrenogest ergeben, dass, wenn jede Zuchtsau im Jahr einen Behandlungszyklus über 18 Tage durchläuft, 720 kg des Wirkstoffs erforderlich wären. Unter den gleichen Annahmen läge der Gesamtverbrauch für Chlormadinon bei 360 kg pro Jahr. Eine Präzisierung dieser bundesweiten Berechnungen unter Berücksichtigung niedersächsischer Verbrauchszahlen erfolgt in Kapitel 3.4.1.

3.4 Erstmalige Erhebung von Abgabemengen in Niedersachsen

Die durchgeführten Berechnungen und Schätzungen beruhen auf Worst-Case-Annahmen, die insbesondere durch die tatsächlichen Abgabemengen präzisiert werden können. Auch lassen sich hierdurch Rückschlüsse auf die Einsatzfrequenzen eines Wirkstoffes ziehen und kann so u.a. die Zahl behandelter Tiere in Deutschland abgeschätzt werden.

Das Tierarzneimittel-Abgabemengen-Register wird im Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) gemäß DIMDI-Arzneimittelverordnung (DIMDI-AMV) geführt und verpflichtet pharmazeutische Unternehmer und Großhändler seit dem 1. Januar 2011 Art und Menge der von ihnen an Tierärzte abgegebenen Mengen bestimmter Arzneimittel jährlich mitzuteilen [28]. Es ist bekannt, dass diese Mitteilungspflicht für Arzneimittel, die Stoffe mit antimikrobieller Wirkung enthalten, besteht. Diese Daten werden dann zentral vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) ausgewertet und öffentlich zur Verfügung gestellt [29].

Allerdings müssen gemäß DIMDI-AMV auch solche Stoffe gemeldet werden, die in einer der Anlagen der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung aufgeführt sind. Folglich müssen Daten zur Abgabe von Präparaten mit hormonell wirksamen Substanzen an niedergelassene Tierärzte zur Verwendung im Rahmen des Betriebs einer tierärztlichen Hausapotheke seit 2011 gemeldet werden. Nach einer Auswertung der aktuellen Liste der zu erfassenden Hormonwirkstoffe werden derzeit nur drei Substanzen erfasst (Altrenogest, Chlormadinon und der natürliche Wirkstoff Progesteron).

Auf Bitte des Niedersächsischen Ministeriums für Umwelt, Energie und Klimaschutz hat daher das Niedersächsische Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz die Abgabemengen zu den Wirkstoffen Altrenogest (bei Schweinen) und Chlormadinon (für Rinder) für 2014 erfragt.

Für Altrenogest ergab sich eine Wirkstoffmenge von 65,48 kg in zur Anwendung beim Schwein zugelassenen Arzneimitteln; für Chlormadinon eine Wirkstoffmenge von 0,0578 kg (oder 57,8 g) in zur Anwendung beim Rind zugelassenen Arzneimitteln.

In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass es sich um nach Niedersachsen abgegebene Mengen handelt, die nicht zwingend komplett in Niedersachsen zur Anwendung kommen müssen, da Tierarztpraxen teilweise überregional arbeiten. In der vorliegenden Erfassung sind Daten der Postleitzahlen-Bereiche 19, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 37, 38, 48 und 49 enthalten. In einigen Postleitzahlen-Bereichen gibt es zudem Überschneidungen mit anderen Bundesländern.

3.4.1 Abschätzung möglicher Behandlungen in Niedersachsen und Deutschland

Zur Entwicklung eines präziseren Szenarios wurde nunmehr angenommen, dass die im Jahre 2014 in Niedersachsen an die Tierärzte abgegebene Menge von 65,48 kg Altrenogest der Verbrauchsmenge entspricht.

Die Anzahl der Zuchtsauen betrug 2014 in Deutschland 2.074.400 Tiere, auf Niedersachsen entfielen 523.100 Tiere ([25-26] und Tabelle 13). Da für eine 18-tägige Therapie mit dem Wirkstoff Altrenogest 360 mg Substanz benötigt werden, ließen sich mit der erfassten Menge 181.889 Tiere pro Jahr in Niedersachsen behandeln, was etwa jedem 3. Tier entsprechen würde. Hochgerechnet auf den bundesweiten Bestand ist somit von einer Verbrauchsmenge von ca. 250 kg Altrenogest auszugehen. Dies liegt alleine für diesen Wirkstoff um ca. 60 % über den Angaben des BfT und um ca. zwei Drittel unterhalb der Annahmen des Worst-Case-Szenarios.

Tabelle 13: Altrenogest-Verbrauch in Deutschland unter Berücksichtigung der tatsächlichen Abgabemengen aus Niedersachsen sowie der Annahme, dass 2014 auch bundesweit fast jedes 3. Tier behandelt wurde.

	Niedersachsen	Deutschland
Abgabemenge Altrenogest 2014 [kg]	65,48	-*
Zahl der Zuchtsauen (2014)	523.100 ^[25]	2.074.400 ^[26]
Anzahl Tiere, die eine Therapie (360 mg Altrenogest) im Jahr 2014 erhalten haben können	181.889	691.467
benötigte Menge an Altrenogest zur einmaligen jährlichen Behandlung jeden 3. Tieres [kg]		248,9

* Zahl liegt nicht vor.

Hinsichtlich des Verbrauchs an Chlormadinon wird mit 57,8 g tatsächlich nur ein äußerst geringer Bruchteil der im Worst-Case-Szenario angenommenen Menge von 360 kg eingesetzt. Hiermit ließen sich insgesamt 289 Rinder behandeln. Insofern ist durch den Einsatz dieses Wirkstoffes keine besondere Umweltrelevanz zu erwarten und die weiterführenden Berechnungen werden daher nur für den Wirkstoff Altrenogest durchgeführt.

3.4.2 Präzisierung des Szenarios für eine Umweltbelastung durch Altrenogest

Unter Berücksichtigung der konkreten Verbrauchszahlen in Verbindung mit der ermittelten Behandlungsfrequenz sowie unterschiedlichen Szenarien für die Ausbringung der Gülle, konnte nunmehr eine Präzisierung der zu erwartenden Umweltkonzentrationen in Gülle sowie in unterschiedlichen Bodentiefen vorgenommen werden. Die Daten sind vergleichend mit dem ursprünglich durchgeführten Worst-Case-Szenario (s. 3.3.2) in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Untersuchte Szenarien für eine mögliche Umweltbelastung durch Altrenogest. Praxisnahe Szenarien unter Berücksichtigung der tatsächlichen Abgabemengen führen zu einer geringen Belastung des Oberbodens.

Altrenogest	PunktueLLer Eintrag von Gülle	Jährlicher Eintrag von Gülle	Jährlicher Eintrag von Gülle (jedes 3. Tier behandelt)
Dosis einer einzelnen Anwendung [mg]	20		
Dauer der Therapie [Tage]	18		
Gesamtmenge Wirkstoff [mg/Tier]	360		
Ausscheidung pro Tier [kg/Tag]	4 ^[30]		
Gesamtmenge Gülle nach Therapie [kg]	72		
Konzentration Altrenogest in der Gülle [mg/kg]	5		
Durchschnittliche Altrenogest Konzentration in der Gülle [mg/kg/Jahr]	-	0,25	0,08
Konzentration Altrenogest pro m ² Boden [mg]	23,8	1,2	0,4
Konzentration Altrenogest in 5 cm Boden [µg/kg]*	317	15,6	5,2
Konzentration Altrenogest in 25 cm Boden [µg/kg]*	63	3,1	1,0

*Bodenmasse 5 cm: 75 kg/m², Bodenmasse 25 cm: 375 kg/m².

Aus den so durchgeführten Berechnungen ist zu erkennen, dass die PEC-Werte unter Annahme des oben geschilderten „Worst-Case-Szenarios“ für Altrenogest 5 mg/kg (Behandlung Einzeltier) und 0,25 mg/kg (einmalige Behandlung Einzeltier, Gülle 1 Jahr gesammelt) in Schweinegülle betragen würden.

Würde nunmehr die Gülle unmittelbar nach dem Ende der Behandlung ausgebracht, so ließen sich bei einer Grünlanddüngung (Einarbeitung in eine Bodentiefe von 5 cm) über 300 µg/kg Altrenogest wiederfinden, was eine über dreifache Überschreitung des Triggerwertes für Boden darstellen würde. Allerdings ist festzuhalten, dass die Gülle i.d.R. in eine Bodentiefe von 25 cm eingepflügt wird und hierdurch eine Altrenogest-Konzentration unterhalb des Triggerwertes gewährleistet ist.

Unter Berücksichtigung der üblichen landwirtschaftlichen Praxis in Verbindung mit den errechneten Behandlungszahlen werden deutlich niedrigere Belastungen der Gülle und des Bodens ermittelt. Aus den Abgabemengen von Niedersachsen wurde berechnet, dass fast jedes 3. Tier eine Behandlung erfährt, dies würde zu einer jährlichen Güllebelastung knapp unterhalb von 100 µg/kg führen. Wird diese Gülle dann auf den Boden ausgebracht, so werden Wirkstoff-Gehalte in einer Bodentiefe von 5 bzw. 25 cm (Einpflügen) deutlich unterhalb des Triggerwertes von 100 µg/kg Boden erhalten (5,2 bzw. 1,0 µg/kg Boden) und liegen im Bereich der Belastung mit natürlichen Gestagenen in diesem Umweltkompartiment (s. auch Tabelle 6).

Diese Werte sind auch in guter Übereinstimmung mit einer von der Food and Drug Administration der USA offen gelegten Zulassungsstudie für eine ölbasierte Altrenogest-Formulierung zur Gabe von 15 mg Wirkstoff pro Tier [23].

Wie bereits dargelegt, ist der Bezug auf einen Triggerwert von 100 µg/kg Boden zwar im Sinne der derzeitigen Zulassungspraxis für Tierarzneimittel gängige Praxis, allerdings wird hierbei nicht die starke Wirksamkeit hormonell aktiver Substanzen, insbesondere auf aquatische Organismen, berücksichtigt. Insofern müssen die Anwender dieser Substanzen darauf hingewiesen werden, dass eine Gülleausbringung unmittelbar nach der Medikation zu unterlassen ist, eine möglichst lange Lagerung der Gülle erfolgen sollte und dass Gebiete mit starkem Gefälle oder leichtem Zugang zu Fließgewässern nicht gedüngt werden dürfen.

4 Wissenslücken und daraus abgeleitete Empfehlungen

4.1 Verbrauchszahlen

Die durchgeführten Berechnungen und Schätzungen beruhten zunächst auf Worst-Case-Annahmen, die durch genaue Abgabemengen aus Niedersachsen deutlich verbessert werden konnten. Auch gelang es, über die abgegebene Wirkstoffmenge an Altrenogest die Zahl an behandelten Tieren abzuschätzen und in Verbindung mit statistischen Erhebungen über den Bestand an Zuchtsauen den Gesamtverbrauch auf Deutschland hochzurechnen.

Aus diesen Erhebungen wird daher vorgeschlagen, Verbrauchszahlen – wie bereits bei den Antibiotika seit mehreren Jahren erfolgreich etabliert – auch für die hormonell wirksamen Substanzen bundesweit zu erheben und somit auch für eine deutlich höhere Transparenz beim Einsatz dieser nicht unumstrittenen Wirkstoffe zu sorgen.

In diesem Zusammenhang sollte auch die Frage geklärt werden, warum zurzeit lediglich drei (Altrenogest, Chlormadinon und der natürliche Wirkstoff Progesteron) von fast 40 Substanzen mit hormoneller Wirkung erfasst werden. Gemäß DIMDI-AMV § 1 (1) 3.b) sollen „Daten nach § 47 Absatz 1c Satz 1 des Arzneimittelgesetzes über die Abgabe von Arzneimitteln, die Stoffe, die in einer der Anlagen der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung in der Fassung der Bekanntmachung vom 8. Juli 2009 (BGBl. I S. 1768) in der jeweils geltenden Fassung aufgeführt werden, als Wirkstoffe enthalten, an Tierärzte“ erhoben werden [28].

4.2 Abbau- und Umweltverhalten der identifizierten Substanzen

Die Steroidhormone könnten nach ihrer Anwendung, Metabolisierung und Ausscheidung zunächst in die Gülle gelangen und dort eine gewisse Zeit verweilen. Wie bereits dargestellt, ist in diesem Kompartiment die Spaltung der Konjugate zu erwarten aber auch eine biotische oder abiotische Elimination (z.B. durch Sorption) des Wirkstoffes könnte erfolgen. Im weiteren Verlauf wird die Gülle dann in den Boden eingebracht und auch hier könnten biotische und abiotische Prozesse ablaufen oder eine Verlagerung der Substanzen in tiefere Bodenbereiche erfolgen. Insofern könnten die durchgeführten PEC-Berechnungen zu einer Überschätzung der tatsächlichen Konzentrationen in Gülle und Boden führen.

Daher ist zu empfehlen, das mögliche Umweltverhalten zumindest von Altrenogest zunächst in weniger aufwändigen Tests im Labormaßstab zu untersuchen.

Zu einer ersten Abschätzung des Verhaltens in der Gülle und im Boden sollte das Sorptionsverhalten des Wirkstoffes in jeweils zwei unterschiedlichen Matrices (Schweine-/Rindergülle, Sand-/Lehmboden) untersucht werden. Studien in Kleinlysimetern könnten erste Hinweise auf eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten bzw. das Grundwasser geben.

Die Abbaubarkeit von Altrenogest unter anaeroben Bedingungen könnte in laborexperimentellen Testsystemen in Anlehnung an bestehende ISO- und OECD-Vorschriften (u.a. ISO 11734, ISO 13641 und OECD 311) durchgeführt werden. Hierdurch werden anaerobe Verhältnisse, wie sie z.B. in Gülle aber auch der Güllefermentation vorliegen, simuliert. Die quantitative Untersuchung des Abbauverhaltens und möglicher Abbauprodukte könnte mittels HPLC-MS-MS und ggf. anderer geeigneter Methoden erfolgen.

4.3 Monitoringstudien

Basierend auf den vorliegenden Verbrauchszahlen kann ein flächendeckendes Monitoringprogramm zur Untersuchung von Gülle, Boden und Sicker-/Grundwasser derzeit nicht empfohlen werden.

Sollten rückstandsanalytische Untersuchungen durchgeführt werden, so böten sich hierfür zunächst einmal Betriebe an, die die Wirkstoffe regelmäßig einsetzen, die Gülle sammeln und auch auf Nutzflächen ausbringen. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass hierfür ein beträchtlicher Aufwand für die Entwicklung entsprechend sensitiver Methoden in anspruchsvollen Matrices, wie z.B. dem Boden, zu leisten wäre.

5 Referenzen

1. Daughton CG, Ternes T (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Persp.* 107, 907–938.
2. Hamscher G, Sczesny S, Abu-Qare A, Höper H, Nau H (2000). Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Erster Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden. *Deut. Tierärztl. Woch.* 107, 332–334.
3. Hamscher G (2009). Veterinary drugs in the environment: current knowledge and challenges for the future. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 32 (Suppl. 1), 24–25.
4. Hamscher G, Mohring SAI (2012). Tierarzneimittel in Böden und in der aquatischen Umwelt. *Chem. Ing. Tech.* 84, 1052–1061.
5. Bergmann A, Fohrmann R, Weber FA (2011). Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Hrsg.: Umweltbundesamt, UBA-Texte 66/2011, 108 S.
6. Hannappel S, Borchert D, Groeneweg J, Zühlke S (2014). Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdicht. Hrsg.: Umweltbundesamt, UBA-Texte 27/2014, 156 S.
7. Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (2015). Newsletter 1: Ergänzende Untersuchungen zum UBA-Projekt „Ursachen der Funde von Tierarzneimitteln im Grundwasser (FKZ 3714 23 210)“.
8. Jekel M, Dott W, Bergmann A, Dünnbier U, Gnirß R, Haist-Gulde B, Hamscher G, Letzel M, Licha T, Lyko S, Mieke U, Sacher F, Scheurer M, Schmidt CK, Reemtsma T, Ruhl AS (2015). Selection of functional organic indicator substances for the anthropogenically influenced water cycle. *Chemosphere* 125, 155–167
9. Spielmeier A, Breier B, Großmeier K, Hamscher G (2015). Elimination patterns of worldwide used sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.* 193, 307–314.
10. Sumpter JP (1998). Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicol. Lett.* 102–103, 337–342.
11. Sumpter JP, Johnson AC (2005). Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4321–4332.
12. Fent K (2015). Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environ. Int.* 84, 115–130.
13. Kroker R (2010). Hormone und hormonell wirksame Pharmaka. In: Löscher W, Ungemach FR und Kroker R (Hrsg.): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, 8. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.
14. Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. *Amtsblatt der Europäischen Union* vom 20.01.2010, L15/1- L15/72.
15. Schneidereit M (2004). Verbrauchsmengen von Tierarzneimitteln. In: Tagungsband des Fachgespräches „Arzneimittel in der Umwelt – Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt“, Herausgeber: Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 29/05, ISSN 0722-186X, 61–63.
16. Aris, AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM, (2014). Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* 69, 104–119.
17. Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot MF (2008). Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A.* 1210, 84–91.

18. Rodríguez-Navas C, Björklund E, Halling-Sørensen B, Hansen M (2013). Biogas final digestive byproduct applied to croplands as fertilizer contains high levels of steroid hormones. *Environ. Pollut.* 180, 368–371.
19. Hansen M, Krogh KA, Halling-Sørensen B, Björklund E (2011). Determination of ten steroid hormones in animal waste manure and agricultural soil using inverse and integrated clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*. 3, 1087–1095.
20. Liu S, Ying GG, Zhou LJ, Zhang RQ, Chen ZF, Lai HJ (2012). Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *Water Res.* 46, 3754–3768.
21. EMEA (2005). Committee for medicinal products for veterinary use. Altrenogest – Summary report (3), 1–5.
22. EMEA (2000). Committee for medicinal products for veterinary use. Chlormadinone – Summary report, 1–5.
23. FDA, Dokument R219/F/02, Regu-Mate for Swine: Environmental Impact Assessment. Online unter: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/141-222-fonsi01.pdf> (Aufruf am 05.04.2016).
24. SciFinder, Copyright© 2016 American Chemical Society. Online unter: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (Aufruf am 03.03.2016).
25. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Allgemeine und repräsentative Erhebung über die Viehbestände, gehaltene Tiere: Bundesländer. (Aufruf am 03.03.2016).
26. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Allgemeine und repräsentative Erhebung über die Viehbestände, gehaltene Tiere: Deutschland (Aufruf am 03.03.2016).
27. EMEA (2008). Committee for medicinal products for veterinary use. Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL 38.
28. Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI-Arzneimittelverordnung - DIMDI-AMV, Ausfertigungsdatum 24.02.2010). Unter: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/dimdiamv/gesamt.pdf>
29. BVL (2015). Tabelle 4: Vergleich der Abgabemengen der Wirkstoffklassen 2011 bis 2014. https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Bilder/09_Presse/Download_Bilddateien_Presse_Hintergrundinformationen/20150728_Tabelle_Antibiotika_Abgabemenge2015_Print.png?__blob=publicationFile&v=3
30. Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D, Meyer HHD (2002). Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal. Chim. Acta* 473,27-37.

Danksagung:

Für die kritische Durchsicht dieser Literaturstudie und für die Unterstützung bei der Klärung vieler gesetzlicher und veterinärpharmakologischer Sachverhalte bedanken wir uns ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Melanie Hamann vom Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

VERÖFFENTLICHUNGEN

wissenschaftliche Beiträge:

Spielmeyer, A., Stahl, F., Petri, M.S., Zerr, W., Brunn, H., Hamscher, G. (2017) *“Transformation of sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation of liquid manure”*. Journal of Environmental Quality 46 (1) 160-168 **(Publikation)**

Hamscher, G., Petri, M.S. (2017) *„Vorkommen und mögliche Wirkungen von Hormonen aus der Tierproduktion auf Wasser und Boden“*. Im Auftrag des Niedersächsischen Ministeriums für Umwelt, Energie und Klimaschutz **(Literaturstudie)**

Tagungsbeiträge:

Petri, M.S., Höper, H., Hamscher, G. (2018) *“Sulfonamides and tetracyclines in aged, agricultural soil”*. Eighth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Ghent, 22.05-25.05 **(Vortrag)**

Petri, M.S., Höper, H., Hamscher, G. (2018) *„Analytik von Sulfonamiden und Tetracyclinen in gealtertem, landwirtschaftlich genutztem Boden“*. Arbeitstagung der LChG RV Südwest, Gießen, 06.03-07.03 **(Vortrag)**

Petri M.S., Hamscher, G. (2016) *„Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Sulfonamiden und Tetracyclinen in landwirtschaftlich genutzten Bodenflächen“* 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Freising, 12.09-14.09 **(Poster)**

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerd Hamscher für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen bedanken. Auch für die engagierte Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotion.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Jan Siemens für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie bei Prof. Dr. Bernhard Spengler und Frau Prof. Dr. Melanie Hamann für den Beitritt zur Prüfungskommission bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. habil. Astrid Spielmeyer. Danke, dass deine Tür jederzeit offen stand und du für jedes Problem eine Lösung mit einer großen Portion Motivation gefunden hast. Alles einzeln aufzuzählen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher, DANKE!

Für die Probennahme sowie über die gute Zusammenarbeit möchte ich Hubert Groh sowie Dr. Heinrich Höper vom Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie danken.

Danke an Dr. Harald Schaaf, Dr. Sebastian Georgii und ihren Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit und die Messungen mittels ICP-MS.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Rolf Düring und seinen Mitarbeitern für die Messung der Bodenparameter.

Mein großer Dank gilt auch der gesamten AG Hamscher und der AG Zorn. Danke Anja Platt für deine wertvolle Hilfe in allen Lebenslagen im Labor. Danke Friederike Hahne für die wundervolle Büropartnerschaft.

Vielen Dank an Lucia Werner für die praktischen Arbeiten zur Mikrowellenextraktion. Ebenfalls Danke an Christian Röhrig und Jana Thenert für diverse praktische Arbeiten.

Mein weiterer Dank gilt vor allem der MvB-Gruppe Nadja Kreuter, Dr. Maria Weiß, Dr. Nicole Mika und Dr. Martina Zajul. Danke für die vielen hilfreichen Gespräche und eure Freundschaft während und außerhalb der Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön an meine lieben Eltern und an meine Familie die mich immer unterstützt hat und mir diesen Weg ermöglicht hat. Danke Miriam für deine kontinuierlich aufbauenden Worte. Vielen Dank Marius für deinen liebevollen Rückhalt und die Geduld auch in schwierigen Zeiten.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift