

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Analysenmethoden für Antibiotika und perfluorierte Tenside
in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung

-

Methodenentwicklung,
Methodenvalidierung,
Datenerhebung

vorgelegt von
Lebensmittelchemiker Dirk Skutlarek
aus Osnabrück

Bonn 2008

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Lebensmittelchemiker Dirk Skutlarek
aus Osnabrück

Bonn 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 2008

Analysenmethoden für Antibiotika und perfluorierte Tenside
in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung

-

Methodenentwicklung,
Methodenvalidierung,
Datenerhebung

Gutachter: Prof. Dr. Heinz Friedrich Schöler
Institut für Umwelt-Geochemie
Universität Heidelberg

Prof. Dr. Thomas Braunbeck
Institut für Zoologie
Universität Heidelberg

Priv.-Doz. Dr. Thomas Heberer
Lebensmittelinstitut Oldenburg
Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz
und Lebensmittelsicherheit

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abstract	10
Zusammenfassung	11
1. Analysenmethoden für Antibiotika und perfluorierte Tenside in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung - Methodenentwicklung, Methodvalidierung, Datenerhebung	14
1.1. Grundlagen	14
1.1.1. Allgemeines	14
1.1.2. Arzneimittel – Antibiotika	15
1.1.2.1. Allgemeines zur Problematik von Arzneimitteln / Antibiotika in der Umwelt	15
1.1.2.2. Antibiotika-Verbrauchsmengen in Deutschland	16
1.1.2.3. Entwicklungsgeschichte der Antibiotika	19
1.1.2.4. Einteilung der Antibiotika anhand ihrer Wirkmechanismen und Wirkungstypen	20
1.1.2.5. Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber Antiinfektiva	22
1.1.2.6. Penicilline	22
1.1.2.7. Makrolide	23
1.1.2.8. Glykopeptide: Vancomycin	24
1.1.2.9. Fluorchinolone (Gyrasehemmer)	24
1.1.2.10. Sulfonamide	25
1.1.2.11. Tetracycline	26
1.1.3. Perfluorierte Tenside	27
1.1.3.1. Eigenschaften, Herstellung und Verwendung	27
1.1.3.2. Umweltverhalten und Toxikologie	29
1.1.3.3. Regulatorische Maßnahmen	29
1.1.4. Grundlagen der LC-MS-Methodik und der SPE	31
1.1.4.1. Chromatographie	31
1.1.4.2. LC-MS-Kopplung	31
1.1.4.3. Festphasenanreicherung	32
1.2. Motivation und Ziel der Arbeit	33
1.2.1. Antibiotika	33
1.2.2. Perfluorierte Tenside	36
1.3. Material und Methoden	37
1.3.1. Allgemeines	37

1.3.2.	Standardsubstanzen	37
1.3.3.	Entwicklung der massenspektrometrischen Detektion / Optimierung	38
1.3.4.	Entwicklung der chromatographischen Trennmethode / Optimierung der Trennung	42
1.3.5.	Entwicklung der Extraktions- und Anreicherungsverfahren	44
1.3.6.	Kenndaten der Methode	48
1.3.7.	Überprüfung der Methoden anhand von Laborvergleichsuntersuchungen	50
1.3.8.	Probenahmen	53
1.3.8.1.	Antibiotika	53
1.3.8.2.	Perfluorierte Tenside	54
1.4.	Ergebnisse	55
1.4.1.	Antibiotika	55
1.4.1.1.	Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn	55
1.4.1.2.	Zu- und Abläufe von verschiedenen Kläranlagen	56
1.4.1.3.	Oberflächengewässer in Nordrhein-Westfalen	59
1.4.1.4.	Staugewässer (Talsperre zur Trinkwassergewinnung)	61
1.4.1.5.	Rheinuferfiltrate, Wasser aus rheinnahen Brunnen und Pegeln	62
1.4.2.	Perfluorierte Tenside	63
1.4.2.1.	Der Rhein und seine wichtigsten Zuflüsse	63
1.4.2.2.	Die Ruhr und ihre wichtigsten Zuflüsse	65
1.4.2.3.	Oberlauf der Möhne bei Brilon-Scharfenberg	66
1.4.2.4.	Trinkwasser im Ruhrgebiet und im nördlichen Sauerland	67
1.4.2.5.	Weitere Trinkwässer	69
1.5.	Diskussion der Ergebnisse	70
1.5.1.	Antibiotika	70
1.5.2.	Perfluorierte Tenside	73
1.5.2.1.	Bewertung der Belastung des Trinkwassers durch PFOA	73
1.5.2.2.	Trinkwasser	74
1.5.2.3.	Kontaminationsquelle des Oberflächenwassers	74
1.5.2.4.	Human-Biomonitoring-Studie	75
1.5.2.5.	EU-Beschränkung für die Verwendung von PFOS	75
1.6.	Ausblick	76

2.	Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters	78
2.1.	Introduction	79
2.2.	Materials and methods	80
2.2.1.	Water samples	80
2.2.2.	Liquid manure and soil samples	80
2.2.3.	Solid-phase extraction (SPE) for water sample enrichment	80
2.2.4.	HPLC and MS/MS conditions	82
2.2.5.	Analysis of liquid manure and soil	83
2.2.5.1.	Extraction of liquid manure samples	83
2.2.5.2.	Extraction of soil samples	83
2.2.5.3.	ELISA	83
2.3.	Results and discussion	83
2.3.1.	Water samples	83
2.3.1.1.	Few detections: tetracyclines, β -lactams, fluoroquinolones	83
2.3.1.2.	Frequent detections: sulfonamides, macrolides, and lincosamides	84
2.3.1.3.	Component profiles	86
2.3.2.	Liquid manure	87
2.3.3.	Soil	87
2.4.	Conclusions	88
3.	Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen	90
3.1.	Einleitung	90
3.2.	Allgemeines	91
3.3.	Material und Methoden	93
3.3.1.	Probenahme	93
3.3.2.	Extraktion	94
3.3.3.	HPLC- und MS-Angaben	94
3.4.	Ergebnisse und Diskussion	95
3.4.1.	Sammelabwasser der Universitätsklinikums	95
3.4.2.	Zu- und Abläufe von verschiedenen Kläranlagen	97
3.5.	Zusammenfassung und Ausblick	101

4.	Perfluorierte Tenside (PFT) in der aquatischen Umwelt und im Trinkwasser	104
4.1.	Hintergrund	105
4.2.	Ziel	105
4.3.	Analytik	105
4.4.	Ergebnisse und Diskussion	105
4.5.	Schlussfolgerungen	108
5.	Perfluorinated Surfactants in Surface and Drinking Waters	110
5.1.	Introduction	111
5.2.	Material and Methods	112
5.2.1	Chemicals and standards	112
5.2.2	Water sampling	112
5.2.3	Solid-phase extraction	112
5.2.4	LC-MS conditions	112
5.2.5	Recoveries and quantitation limits	114
5.3	Results	115
5.3.1	Surface waters	115
5.3.2	Drinking waters	119
5.4	Discussion	121
5.5	Conclusions	122
5.6	Recommendations and Perspectives	122
6.	Literatur	124
Anhang A	Weiterentwicklung der PFT-Bestimmungsmethode mit optimierter Erfassung der kurzkettigen perfluorierten Alkylcarbonsäuren durch Anreicherung auf einem polymerbasierten schwachen Anionentauscher (ab 2007 / 2008)	138
Anhang B	Ergebnisse der Teilnahme an der bundesweiten Laborvergleichsuntersuchung S-01 vom April 2008 zur Bestimmung von PFT in Wässern und Schlämmen (ohne Methodenvorgabe) zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der eigenen Methode nach Anhang A	142

SUMMARY

The present work deals with the chemical analysis of two groups of anthropogenic compounds in the aquatic environment. The first group is a selection of antibiotic substances as residues of pharmaceuticals (environmental problem: bacterial resistances). The second group includes a number of perfluorinated surfactants as residues from industrial processing and refining processes (environmental problem: persistence and bioaccumulation).

The first focus of this study was on the development and optimisation of extraction and enrichment methods, primarily of aqueous matrices, as well as on the identification and quantification of these anthropogenic compounds by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS). The investigated group of antibiotics was a result of the data collection on the use of these antibiotics at the Bonn University Hospital and a result of the documented prescribing practices within the statutory health insurance in Germany.

The group of perfluorinated surfactants (perfluorinated carboxylic acids and perfluorinated sulphonic acids) was composed of a selection of substances based on their major compounds PFOA (perfluorooctanoic acid) and PFOS (perfluorooctanesulfonic acid) and their short- or long chain homologues.

Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) in single-digit to lower double-digit ng/L-range were achieved with the help of these new multi-component methods (29 antibiotics and 12 perfluorinated surfactants). The methods were successfully validated in several, partly nationwide, inter-laboratory tests.

The second focus of the study was on the application of these new methods in the investigation of real samples:

In the field of antibiotics, waste water of the Bonn University Hospital was analyzed from the place of origin, via the sewage treatment plant to the Rhine River. Additional data collection was made for further sewage treatment plants and surface waters in North Rhine-Westphalia. The water from a reservoir (for drinking water purposes) and some raw and drinking waters affected by surface water were also analysed. The great amount of antibiotics prescribed at the University Hospital was detected in the collected wastewater. The antibiotics concentrations were reduced in the Rhine River due to degradation, adsorption on sludge and dilution by several orders of magnitude. Analogue data could be determined for other sewage treatment plants and surface waters. No antibiotics were detected in drinking water, except of two antibiotics, erythromycin and sulfamethoxazole, which reached raw waters, but were removed by subsequent drinking water treatment technologies. The substance sulfamethoxazole can serve as a tracer to timely identify drinking water contamination with antibiotic residues.

In the field of perfluorinated surfactants, a consistently low contamination of water was identified in the Rhine River, as the perfluorobutanesulfonic acid (PFBS) formed the main component. The Ruhr River showed a strong upstream contamination with perfluorinated surfactants, whereas PFOA with about 80% formed the main component. Nearly the same high level of PFOA was also found in the local drinking water. The drinking water stems from the Ruhr River water, after it underwent bank filtration or artificial recharge. These findings called attention of authorities to an illegal industrial waste disposal on agricultural areas on the upper reaches of the Moehne River (tributary of the Ruhr River) which led to contamination of surface and drinking water. This has resulted in agreed upper limit values for both PFOA and PFOS concentrations, refitting of the relevant water works with additional treatment steps and started a nationwide investigation on perfluorinated surfactants. The detection of the PFOA contamination in drinking water in the Ruhr catchment area led to further optimisation of the enrichment method as well as standardisation procedures in Germany on the basis of this method.

With the help of this study, two powerful multi-component methods were developed for the determination of antibiotics and perfluorinated surfactants in aqueous matrices. It also helped to detect a burden for the population through drinking water contaminated by PFOA and has contributed to its elimination.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analytik zweier Stoffgruppen anthropogenen Ursprungs in der aquatischen Umwelt, einerseits mit einer Auswahl antibiotisch wirkender Substanzen als Rückstände aus Arzneimittelanwendungen (Umweltproblem: bakterielle Resistenzen), andererseits mit der Stoffgruppe der perfluorierten Tenside (PFT) als Rückstände industrieller Verarbeitungs- und Veredelungsprozesse (Umweltproblem: Persistenz und Bioakkumulation).

Der erste Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf der Entwicklung und Optimierung der Extraktions- und Anreicherungsverfahren in erster Linie aus wässrigen Matrices sowie der Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzen mittels Kopplung von hochleistungsflüssig-chromatographischen Trenn- und massenspektrometrischen Detektionsverfahren.

Das Untersuchungsspektrum ergab sich für die Antibiotika aus Datenerhebungen zum Antibiotikaeinsatz im Universitätsklinikum Bonn und aus der dokumentierten Verordnungspraxis innerhalb der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland, für die perfluorierten Tenside (perfluorierte Alkylcarbonsäuren und perfluorierte Sulfonsäuren) anhand ihrer Leitsubstanzen PFOA (Perfluorooctansäure) und PFOS (Perfluorooctansulfonsäure) und deren kürzer- bzw. länger-kettigen Homologen.

Mit den jeweiligen Multikomponenten-Methoden (29 Antibiotika und 12 Perfluortenside) konnten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im ein- bis niedrigen zweistelligen ng/L-Bereich erreicht werden. Die Methoden wurden im Rahmen mehrerer, zum Teil bundesweiter Laborvergleichsuntersuchungen erfolgreich validiert.

Den zweiten Schwerpunkt der Arbeit bildete die Anwendung der neuen Methoden bei der Untersuchung von Realproben:

Im Bereich der Antibiotika wurde das Abwasser des Universitätsklinikums Bonn vom Ort seiner Entstehung über die Kläranlage bis in den Rhein untersucht. Zusätzliche Datenerhebungen erfolgten für weitere Kläranlagen und Oberflächengewässer in Nordrhein-Westfalen, ebenso wurden ein Talsperrenwasser (zur Trinkwassergewinnung) und einige oberflächenwasser-beeinflusste Roh- und Trinkwässer untersucht. Im gesammelten Abwasser des Universitätsklinikums konnten große Mengen der dort verordneten Antibiotika bestimmt werden. Die Antibiotikagehalte reduzierten sich bis in den Rhein durch Abbau, Adsorption an Feststoffe und Verdünnung um mehrere Zehnerpotenzen. Analoge Daten konnten für andere Kläranlagen und Oberflächenwässer ermittelt werden. Im Trinkwasser konnten keine Antibiotika nachgewiesen werden, nur die beiden Antibiotika Erythromycin und Sulfamethoxazol gelangten bis ins Rohwasser, konnten aber durch anschließende Trinkwasseraufbereitungstechniken entfernt werden. Die Substanz Sulfamethoxazol kann hier als Tracer dienen, um rechtzeitig eine Trinkwasserbelastung mit Antibiotikarückständen zu erkennen.

Im Bereich der perfluorierten Tenside konnte im Rhein eine durchgehend niedrige Belastung des Wassers ermittelt werden, die Perfluorbutansulfonsäure (PFBS) bildete dabei die Hauptkomponente. Die Ruhr zeigte flussaufwärts stark ansteigende Belastungen mit perfluorierten Tensiden, wobei PFOA mit ca. 80% die Hauptkomponente bildete. Annähernd gleich hohe PFOA-Gehalte wurden auch im Trinkwasser gefunden, das durch künstliche Grundwasseranreicherung mit Ruhr-Wasser gewonnen wird. Durch diese Befunde wurden die Behörden auf eine illegale Industrieabfallentsorgung auf landwirtschaftlichen Flächen am Oberlauf der Möhne (Zufluss der Ruhr) aufmerksam, die zur Verunreinigung des Oberflächen- und des Trinkwassers führte, in deren Folge Konzentrationsobergrenzen für PFT beschlossen wurden, eine Nachrüstung der betroffenen Wasserwerke mit zusätzlichen Aufbereitungsschritten begonnen wurde und eine bundesweit Untersuchungstätigkeit auf perfluorierte Tenside ausgelöst wurde. Die Entdeckung der PFT-Belastung im Trinkwasser an der Ruhr führte zu einer weiteren Optimierung der Anreicherungsverfahren und einem beginnenden Normungsverfahren auf Basis dieser Methode.

Durch die vorliegende Arbeit konnten zwei leistungsfähige Multikomponenten-Methoden zur Bestimmung von Antibiotika und perfluorierten Tensiden in wässrigen Matrices entwickelt werden, mit deren Hilfe eine Belastung der Bevölkerung durch PFOA-kontaminiertes Trinkwasser erkannt und zur Behebung dieses Problems beigetragen werden konnte.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Die vorliegende Dissertation beinhaltet die folgenden Veröffentlichungen:

KAPITEL 2

Christian T, Schneider RJ, Färber HA, Skutlarek D, Meyer MT, Goldbach HE (2003): Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. Acta hydrochim hydrobiol 31 (2003) 36-44.

Alle experimentellen und auswertenden Arbeiten der Festphasenanreicherung und LC-MS/MS-Bestimmungen wurden von D. Skutlarek durchgeführt. Die entsprechenden Kapitel des Manuskripts wurden von D. Skutlarek und H. Färber gestaltet.

KAPITEL 3

Färber H, Skutlarek D, Alberti J, Reupert RR (2004): Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen. Gewässerschutz – Wasser – Abwasser GWA 193 (2004) 24/1-24/16.

Die Arbeiten zu diesem Artikel wurden gemeinschaftlich von D. Skutlarek, H. Färber, J. Alberti und R. R. Reupert konzipiert und geplant. Alle experimentellen und auswertenden Arbeiten wurden von D. Skutlarek durchgeführt. Das Manuskript wurde von D. Skutlarek und H. Färber geschrieben.

KAPITEL 4

Skutlarek D, Exner M, Färber H (2006): Perfluorierte Tenside (PFT) in der aquatischen Umwelt und im Trinkwasser. UWSF – Z Umweltchem Ökotox 18 (2006) 151-154.

Die Arbeiten zu diesem Artikel wurden von D. Skutlarek initiiert und gemeinschaftlich von D. Skutlarek und H. Färber geplant und durchgeführt (Probenahme). Alle experimentellen und auswertenden Arbeiten wurden von D. Skutlarek durchgeführt. Das Manuskript wurde von D. Skutlarek und H. Färber geschrieben.

KAPITEL 5

Skutlarek D, Exner M, Färber H (2006): Perfluorinated Surfactants on Surface and Drinking Water. Environ Sci Pollut Res 13 (2006) 299-307.

Die Arbeiten zu diesem Artikel wurden von D. Skutlarek initiiert und gemeinschaftlich von D. Skutlarek und H. Färber geplant und durchgeführt (Probenahme). Alle experimentellen und auswertenden Arbeiten wurden von D. Skutlarek durchgeführt. Das Manuskript wurde von D. Skutlarek und H. Färber geschrieben.

Kapitel 1

**Analysenmethoden für Antibiotika und
perfluorierte Tenside
in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS
nach SPE-Anreicherung**

-

**Methodenentwicklung,
Methodenvalidierung,
Datenerhebung**

1. Analysenmethoden für Antibiotika und perfluorierte Tenside in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung – Methodenentwicklung, Methodvalidierung, Datenerhebung

1.1. Grundlagen

1.1.1. Allgemeines

Die industrielle Entwicklung hat im Alltag zu vielen Verbesserungen im menschlichen Leben geführt, auf die man nicht mehr verzichten möchte oder kann. Damit ging auch die Entwicklung vieler Stoffe und Produkte einher, die für einen zeitlich begrenzten Zweck entstanden, wie Arzneimittel, Agrar- und Industriechemikalien. Spätestens nach Ablauf der Nutzungsdauer der mit derartigen Stoffen versetzten Produkte oder nach der bestimmungsgemäßen Verwendung der Arzneimittel und Pflanzenschutzmittel gelangen diese Stoffe - teils verändert - in die Umwelt. Auch vorher können sie schon bei der Produktion als Emissionen in die Umwelt gelangen. Im günstigsten Fall ist ihr Vorkommen in der Umwelt dann ohne Auswirkung, oftmals sind diese Stoffe aber schädlich für die verschiedensten Ökosysteme. Aufgrund ihrer Beschaffenheit und ihrer mehr oder weniger naturfremden und zum Teil persistenten Wirkungen entstand für sie der Begriff Problemstoff. Da sie im Vergleich zu den natürlichen Stoffkonzentrationen nur in Spuren auftreten, werden diese Kontaminanten auch als Spurenstoffe bezeichnet.

Vor dem Hintergrund umweltanalytischer Fortschritte gelangten die dabei gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Folgen langfristiger Einwirkungen von anthropogenen Spurenstoffen für die Umwelt und auch für kommende Generationen in das Problembewusstsein der Öffentlichkeit wie auch der Umweltpolitik. Die zunehmenden Erkenntnisse über ökologische Auswirkungen der Spurenstoffe sind Voraussetzungen für die Gestaltung der sich entwickelnden politisch-rechtlichen Regelungen im nationalen wie im internationalen Bereich. Grundlegend im Prozess dieser Risikoregulierung sind daher Vorverfahren wie das Screening einzelner Umweltmedien hinsichtlich der Palette vorkommender Spurenstoffe auf Basis vorhandener und neu zu entwickelnder sensitiver und selektiver Analyseverfahren.

Spurenstoffe finden sich in der aquatischen Umwelt und in Böden, wobei das Wasser wegen seiner Funktion als Lösungs-, Transport- sowie Lebensmittel außerordentliche Bedeutung besitzt. Die Wege der Spurenstoffe verlaufen zum größten Teil über das Abwasser oder den Abfall in die Oberflächengewässer oder über den Boden in das Grundwasser und damit möglicherweise in das Trinkwasser. Verschiedenste Untersuchungen haben den Nachweis einer Vielfalt von Human- und Veterinär-Pharmaka, Industriechemikalien sowie deren Metabolite in beiden Umweltmedien geliefert [Track & Kreysa 2003].

Im Folgenden soll erstens am Beispiel der Antibiotika (Pharmaka-Rückstände) und zweitens am Beispiel der perfluorierten Tenside (Rückstände persistenter Industriechemikalien) der Weg dieser polaren organischen Verunreinigungen in der aquatischen Umwelt bis hin zum Trinkwasser untersucht und beschrieben werden, einschließlich der Entwicklung der dazu notwendigen Analysemethoden.

1.1.2. Arzneimittel – Antibiotika

1.1.2.1. Allgemeines zur Problematik von Arzneimitteln / Antibiotika in der Umwelt

Arzneimittel sind Zubereitungen von Arzneistoffen, welche definitionsgemäß zur Vorbeugung, Linderung, Heilung und Erkennung von Erkrankungen bei Mensch und Tier dienen. In Deutschland sind derzeit annähernd 3000 Wirkstoffe als solche zugelassen [Rote Liste 2000, Rote Liste 2008].

Arzneimittel sind daher unverzichtbarer Bestandteil des modernen Gesundheitswesens. Am Beispiel der Antiinfektiva (nach einer früheren, heute obsoleten Einteilung: Antibiotika und Chemotherapeutika) lässt sich darstellen, dass ihr Einsatz für die moderne Medizin neben einer verbesserten Hygiene eine der wichtigsten Waffen gegen Infektionskrankheiten ist. Man geht davon aus, dass seit der Anwendung dieser Substanzen die allgemeine Lebenserwartung um durchschnittlich 10 Jahre zugenommen hat.

Durch ihren - wirkstoffspezifisch - teilweise weitverbreiteten Einsatz stellen Arzneimittel auch eine bedeutende Gruppe der sogenannten anthropogenen „Umweltchemikalien“ dar, worunter man solche Stoffe verstehen kann, deren qualitatives oder quantitatives Auftreten in der Natur stark vom Menschen beeinflusst ist.

Neben den selbstverständlich erwünschten, in der modernen Medizin unverzichtbaren therapeutischen Wirkungen sind - teils ausserhalb des eigentlichen Verwendungszwecks am Menschen oder am Tier - leider auch unerwünschte Effekte des Einsatzes von Arzneimitteln aus dem Human- und Veterinärbereich in der Umwelt aufgetreten.

Arzneimittel werden nach Verabreichung entweder unverändert oder metabolisiert ausgeschieden. Diese Ausscheidungsprodukte gelangen teils über den Abwasserpfad (Mensch), teils direkt über die Gülleausbringung (Tier) in die Umwelt. Weitere Eintragspfade sind die unsachgemässe Entsorgung (Toilette, Hausmüll) sowie der Spezialfall der Aquakultur (Direktapplikationen in Gewässer).

Aufgrund ihrer - aus therapeutischer Sicht - oftmals zwingend erforderlichen Eigenschaften wie zum Beispiel der metabolischen Stabilität (bedingt die Problematik Persistenz) und der Wasserlöslichkeit (bedingt die Problematik einer erhöhten Mobilität im aquatischen Milieu) sowie aufgrund ihrer teils hohen biologischen Aktivität (Beispiel Antiinfektiva, Zytostatika) können humantherapeutisch wirksame und ökotoxische Effekte dicht beieinanderliegen.

Nachdem in den siebziger und achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts der Schwerpunkt der analytischen Arbeiten vor allem auf der Bestimmung von Pestiziden, Dioxinen und polychlorierten Biphenylen (PCB) lag, wandte sich das Interesse seit Anfang der neunziger Jahre (in dieser Zeit gab es erste Publikationen über den Nachweis von Arzneistoffen in Gewässern, s.u.) deshalb zusätzlich stark dem Vorkommen, Verbleib und den Wirkungen von Arzneistoffen in der Umwelt zu.

Bereits in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnten Ethinylestradiol (Hormon der „Pille“) sowie Clofibrinsäure (Wirkstoff von Lipidsenkern) und andere Pharmaka in Oberflächen- und Abwässern [Garrison et al. 1976, Norpoth et al. 1973, Sonneborn et al. 1978] nachgewiesen werden.

Diese Untersuchungen gerieten jedoch mehr oder weniger in Vergessenheit und die eventuelle Problematik von Arzneistoffen in der Umwelt spielte lange Zeit keine Rolle mehr.

Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts konnte in Deutschland erstmals Clofibrinsäure in verschiedenen Wasserkompartimenten im Raum Berlin [Stan & Linkerhägner 1992, Stan et al. 1994, Heberer & Stan 1996] nachgewiesen werden; nachfolgend wurden bundesweit sowie international dieser und verschiedene andere Wirkstoffe weiterer Wirkstoffgruppen (Herz-Kreislauf-Mittel, Kontrazeptiva, Bronchospasmolytika, Analgetika,

Psychopharmaka, Antibiotika u.a.) in Abwässern, Oberflächen- und Rohwässern nachgewiesen [Adler et al. 2001, Ahel & Jelacic 2001, Ahrer et al. 2001, Alder et al. 2001, Baronti et al. 2000, Bau & Dulski 1996, Belfroid et al. 1999, Buser et al. 1998a, Buser et al. 1998b, Buser et al. 1999, Desbrow et al. 1998, Daughton & Ternes 1999, Daughton & Jones-Lepp 2001, Eckel et al. 1993, Golet et al. 2001, Golet et al. 2002, Halling-Sørensen et al. 1998, Halling-Sørensen et al. 2000, Hartig et al. 1999, Heberer & Stan 1997a, Heberer et al. 1997b, Heberer et al. 2001a, Heberer et al. 2001b, Heberer 2002a, Heberer et al. 2002b, Heberer et al. 2002c, Hignite & Azarnoff 1997, Hirsch et al. 1998, Hirsch et al. 1999, HLFU Hessen 1998, Holm et al. 1995, Huang & Sedlak 2001, Johnson et al. 2000, Kolpin et al. 2002, Kuch & Ballschmiter 2000, Kümmerer et al. 1997, Kümmerer & Helmers 2000, Kümmerer 2001a, Lindsey et al. 2001, Möhle et al. 1999, Ollers et al. 2001, Putschew et al. 2000, Putschew et al. 2001a, Putschew & Jekel 2001b, Sacher et al. 2001, Scheytt et al. 2001, Seiler et al. 1999, Spengler et al. 1999, Stan & Heberer 1997, Steger-Hartmann et al. 1996, Steger-Hartmann et al. 1997, Stuer-Lauridsen et al. 2000, Stumpf et al. 1996, Stumpf et al. 1998, Stumpf et al. 1999, Ternes 1998a, Ternes et al. 1998b, Ternes et al. 1999a, Ternes et al. 1999b, Ternes & Hirsch 2000a, Ternes 2000b, Ternes 2001a, Ternes et al. 2001b, Verstraeten et al. 2003, Werres et al. 2000, Xiao et al. 2001]. Ebenfalls ab Anfang der neunziger Jahre erschienen erste Berichte über Missbildungen von männlichen Geschlechtsorganen an Alligatoren in Florida, über feminisierende Effekte an Fischen und Amphibien, über Imposex bei bestimmten Schnecken sowie Rückgang der männlichen Fertilität beim Menschen [Birkhäuser 1999, Carlsen et al. 1992, Colburn et al. 1993, Safe 1994, Sumpter 1998a, Sumpter 1998b, Sumpter 1999, Purdom et al. 1994].

Die teils kontroverse Diskussion zur Bedeutung der sogenannten Xenööstrogene auf die tierische und menschliche Fertilität dauert noch an, und auch die Berichte der letzten Jahre um die zunehmenden Resistenzen von Mikroorganismen gegenüber verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen und deren Ursachen sind in diesem Zusammenhang von erheblicher gesundheitspolitischer Relevanz [Bundesgesundheitsblatt 1989-1999, Feuerpfeil et al. 1999, Harwood et al. 2001].

Die EU erkannte 2001, dass die zunehmende Resistenz verschiedener Krankheitserreger gegen Antibiotika eine Gefahr für die Öffentliche Gesundheit darstellt [Empfehlung des Rates der EU 2001].

Eine Risikoabschätzung über Humanpharmaka in der Umwelt (Dänemark) wurde von Stuer-Lauridsen publiziert [Stuer-Lauridsen et al. 2000].

1.1.2.2. Antibiotika-Verbrauchsmengen in Deutschland

In der EU und der Schweiz wurden 1999 nach einer Erhebung des europäischen Dachverbands FEDESA (Fédération Européenne de la Santé Animale, ab 2003 integriert in die Dachorganisation IFAH-Europe (International Federation for Animal Health Europe)) über 13.000 Tonnen Antibiotika (Reinsubstanz) verbraucht (Tabelle 1.1) [Schröder et al. 2003].

Tabelle 1.1: Verbrauchsmengen Antibiotika 1999 und 1997 (FEDESA), in Tonnen/Jahr

Antibiotika-Verbrauch	1999	1997	Veränderung 1997-1999	
Total	13.216	12.752	3,6 %	Zunahme
Veterinärtherapie	3.902 (29%)	3.494 (27,5%)	11,0 %	Zunahme
(Veterinär-)Leistungsförderer	786 (6%)	1.599 (12,5%)	50,0 %	Abnahme
Humantherapie	8.528 (65%)	7.659 (60,0%)	11,3 %	Zunahme

In Deutschland wurden für das Jahr 2005 auf Basis der Daten des Veterinärpanels der Gesellschaft für Konsumforschung (GfK, Nürnberg) für den Bereich der Veterinärtherapie Antibiotika-Gesamtverbrauchsmengen in Höhe von 784 Tonnen pro Jahr ermittelt [Schneiderei 2006] (Tabelle 1.2).

Der Bereich der Leistungsförderer wurde schrittweise bis zum umfassenden Verbot zum 01.01.2006 eingeschränkt, so dass dieser Bereich des Antibiotika-Einsatzes offiziell weggefallen ist [FLUGS-Fachinformationsdienst 2007].

Tabelle 1.2: Antibiotikaverbrauch im Veterinärbereich in Deutschland 2005

Antibiotika-Verbrauchsmengen in Deutschland 2005 in der Veterinärtherapie (jeweils in Tonnen/Jahr)		
1.	Tetracycline	350,0
2.	Beta-Lactame	199,2
3.	Sulfonamide	97,5
4.	Makrolide	52,6
5.	Aminoglycoside	36,3
6.	Polypeptide	21,8
7.	Lincosamide	12,1
8.	Weitere Antibiotika	14,9
	Summe	784,4

Im Bereich der Humanmedizin können genaue Verbrauchsmengen aufgrund mangelnder Transparenz kaum angegeben werden, es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten einer annähernden Abschätzung. Nach dem Arzneiverordnungsreport 2006 [Arzneiverordnungsreport 2006] kann für das Jahr 2005 eine Antibiotikaverordnungsmenge von 353,9 Millionen definierten Tagesdosen (DDD) für gesetzlich Versicherte angegeben werden. Die Umrechnung der Verordnungsmenge in Tonnen pro Jahr erfolgt über den ATC-DDD-Index, der genaue Mengenangaben für die Tagesdosen jedes einzelnen Wirkstoffs enthält [ATC-DDD-Index 2005]. Daraus ergeben sich folgende ungefähre Verbrauchsmengen für Deutschland (Tabelle 1.3):

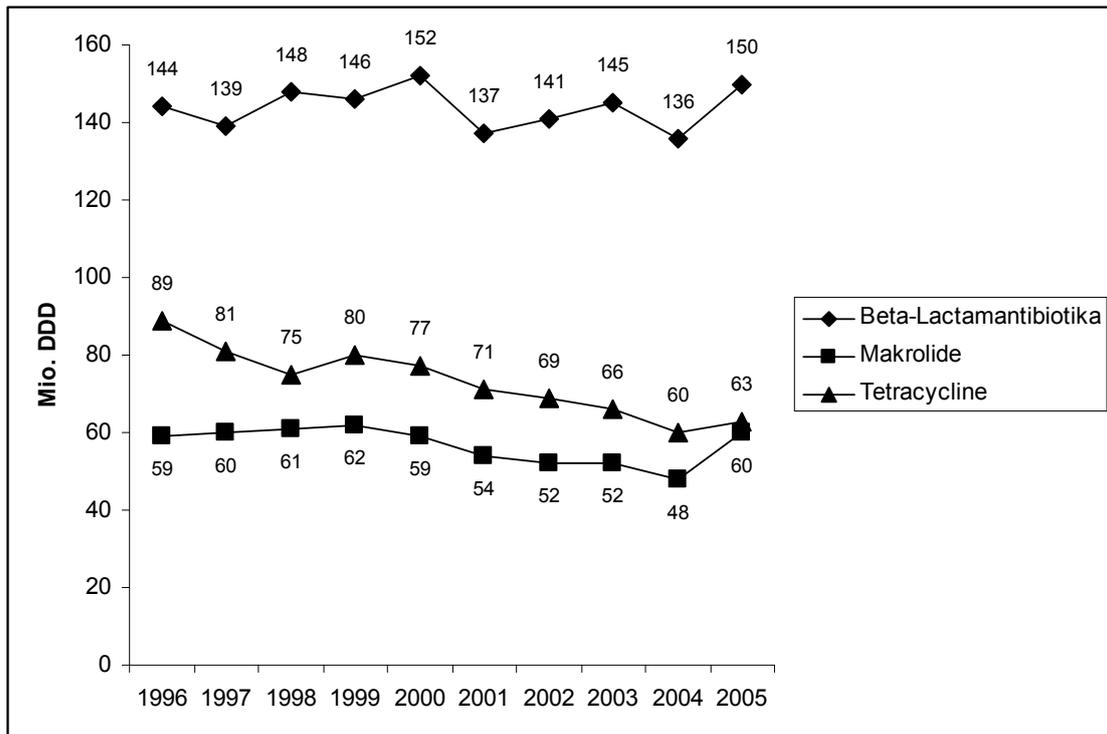
Tabelle 1.3: Antibiotika-Verbrauchsmengen in Deutschland im Jahr 2005, Abschätzung, jeweils in Tonnen/Jahr [Arzneiverordnungsreport 2006, ATC-DDD-Index 2005]

Antibiotika-Verbrauchsmengen in Deutschland 2005 in der Humantherapie (jeweils in Tonnen/Jahr)		
1.	Penicilline (Amoxicillin, Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin)	143,0
2.	Sulfonamide (Sulfamethoxazol, Trimethoprim)	43,5
3.	Makrolide (Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Roxithromycin)	42,9
4.	Cephalosporine (Cefaclor)	27,1
5.	Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Ofloxacin)	20,1
6.	Tetracycline (Doxycyclin, Ofloxacin)	7,1
	Summe	283,7

Das System der definierten Tagesdosen DDD (WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Oslo, <http://www.whocc.no/atcddd/>) dient dabei der Präsentation und Vergleichbarkeit von Medikamentenverbrauchs-Statistiken auf internationaler Ebene. Laut Roter Liste [Rote Liste 2008] können aber auch weitaus höhere Tagesdosen zum Einsatz kommen, so dass laut einer Abschätzung des Wissenschaftlichen Instituts der AOK aus dem Jahr 2006 im Jahr 2004 in Deutschland etwa 1600 Tonnen Antibiotika (Monopräparate) in der Humanmedizin eingesetzt wurden [FLUGS-Fachinformationsdienst 2007].

Anhand der Gesamtverordnungen nach definierten Tagesdosen über den Zeitraum der Jahre 1996 bis 2005 kann für die Antibiotika der Beta-Lactame (Penicilline und Cephalosporine) und der Makrolide eine etwa gleich bleibende Verordnungspraxis verzeichnet werden, für Antibiotika der Gruppe der Tetracycline ist eine Abnahme bei den Verordnungen zu beobachten [Arzneiverordnungsreport 2006] (Abbildung 1.1).

Abbildung 1.1: Verordnungen von Antibiotika 1996 bis 2005, Gesamtverordnungen nach definierten Tagesdosen [Arzneiverordnungsreport 2006]



Diese Zahlen erfassen nur die Verordnungen innerhalb der gesetzlichen Krankenversicherung. Zur Berücksichtigung von Privatverordnungen sind die Werte mit einem Faktor von annähernd 1,2 zu multiplizieren [Arzneiverordnungsreport 2006].

Im Folgenden wird zunächst eine kurze allgemeine Einführung in die Geschichte, die Einteilung von Antibiotika und Chemotherapeutika anhand ihrer Wirkmechanismen gegeben und einige Eigenschaften der jeweils untersuchten Stoffgruppen aufgelistet.

1.1.2.3. Entwicklungsgeschichte der Antibiotika

Die empirische Medizin früherer Jahrhunderte kannte nur wenige spezifisch antiinfektiv wirksame Mittel. In der Literatur werden die von dem Augustinermönch Antonio de la Calancha um 1600 verwendete Rinde der Chinchona (Chinarinde, „Chinin“) als Mittel zur Fieberbekämpfung bei Malaria genannt. Gegen Amöbenruhr wurde 1698 von Christoph F. Kneussel die Wurzel des brasilianischen Halbstrauches *Uragoga Ipeca-duanha* empfohlen. Zur lokalen Entzündungsbekämpfung werden die Quecksilbersalbe gegen Syphilis (Fracastoro, 1483 – 1553), Phenol gegen Wundinfektionen (Joseph Lister, 1867) und Silbernitratlösung gegen Gonoblenorrhoe der Neugeborenen (Carl Credé, 1884) erwähnt.

Der Begriff der antiinfektiven Therapie, der Chemotherapie von Infektionskrankheiten, wurde 1906 von **Paul Ehrlich** eingeführt. Er verstand darunter die selektive Abtötung von Parasiten ohne erhebliche Schädigung des Organismus (Ehrlich'sches Prinzip der selektiven Toxizität). Der oft verwendete Begriff Antibiotikum, der sich aus ihrer Entstehung in verschiedenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) ableitet, wird gegenwärtig unter dem Oberbegriff Chemotherapeutikum geführt, unter dem auch synthetisierte Substanzen eingeordnet werden. Häufig wird heute auch der Terminus Antiinfektiva verwendet.

Paul Ehrlich entdeckte, dass Infektionserreger im Gewebe des Wirtsorganismus spezifisch angefärbt werden konnten.

Daraus schloss er, dass Farbstoffe mit entsprechend hoher Toxizität Infektionserreger in vivo töten oder schädigen müssten, ohne den Wirt nennenswert zu beeinträchtigen (Frimmer 1986). Diese Konzeption verfolgend entwickelte er aus Atoxyl einem Arsenderivat des Anilins, - zusammen mit seinem japanischen Assistenten Hatta – das Neoarsphenamin (Neosalvarsan[®]), das erste Chemotherapeutikum gegen die Syphilis.

Zwischen 1932 und 1935 entdeckte Gerhard Domagk die Wirksamkeit des Azofarbstoffs „Prontosil rubrum“ gegen experimentelle Kokkeninfektionen und führte diesen Farbstoff in die Therapie gegen bakterielle Infektionen ein. Prontosil war nach unserer heutigen Definition ein „prodrug“, aus dem die aktive Komponente Sulfanilamid (p-Aminobenzensulfonsäureamid) im Organismus erst gebildet werden musste [Mutschler et al. 2001]. Seitdem ist Sulfanilamid die strukturelle Basis der antimikrobiell wirksamen Sulfonamide. Ausgehend von dem Grundmolekül Sulfanilamid wurde eine große Zahl von Modifikationen mit erweitertem Wirkungsspektrum und veränderten pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften, jedoch relativ gleichbleibendem Wirkungsspektrum synthetisiert, was zur Wirkstoffgruppe der Sulfonamide führte.

Das große Interesse an den Sulfonamiden überschattete zeitweise die Entdeckung der antibakteriellen Aktivität des aus *Penicillium notatum* gewonnenen Naturstoffes Penicillin durch Alexander Fleming 1929. Ein breiter Einsatz im zweiten Weltkrieg wurde, durch die von H.W. Florey und E. Chain (1940) entwickelten Methoden zur Gewinnung großer Penicillinmengen aus den Flemingschen *Penicillium*kulturen, ermöglicht. Die Antibiotikaforschung, die Suche nach weiteren therapeutisch anwendbaren antibakteriellen Naturstoffen und vorteilhaften chemischen Abwandlungen, wurde jetzt intensiviert. In der Human- und Tiermedizin werden über 50 Substanzen dieser Gruppe therapeutisch eingesetzt, das Phenoxymethylpenicillin hat den Ausgangswirkstoff Benzylpenicillin inzwischen bei vielen Indikationen abgelöst.

Streptomycin wurde 1944 von S.A. Waksman als erstes Aminoglycosid aus Kulturfiltraten von *Streptomyces griseus* isoliert. Wenig später stellte man durch katalytische Hydrierung des Streptomycins das Dihydrostreptomycin her. Seitdem spielen Aminoglycoside eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung insbesondere von Infektionen mit gramnegativen Erregern.

Allerdings ist ihre Bedeutung in der Humanmedizin in den letzten Jahren aufgrund der Entwicklung der besser verträglichen Breitspektrum-Lactame zurückgegangen, während in der Veterinärmedizin z.B. Gentamicin weiterhin breite Anwendung findet.

1943 wurde aus zerstörtem Gewebe und Straßenschmutz eines Knochenbruches bei einem jungen Mädchen namens Tracy der Tracy-I Stamm von *Bacillus subtilis* isoliert, was zur Entdeckung und zu dem Namen von Bacitracin führte.

Seit 1948 wurden basierend auf den Forschungsarbeiten von G. Brotzu die Cephalosporine entwickelt.

Chloramphenicol wurde ursprünglich (1947) aus *Streptomyces venezuelae* isoliert, ab 1950 aber rein synthetisch hergestellt.

Im Jahre 1957 wurde erstmals Trimethoprim hergestellt.

Ab Ende der 50er Jahre wurden aus der Gruppe der Makrolid-Antibiotika (etwa 40) einige wenige (z.B. Erythromycin, Tylosin, Spiramycin und Kitasamycin) in die Veterinärmedizin eingeführt. In der Humanmedizin werden zur Zeit darüber hinaus Roxithro-, Flurithro- und Clarithromycin mit verbesserten Eigenschaften als moderne Makrolide benutzt.

Die Bedeutung der DNA-Gyrase wurde durch Watson und Crick erst in den 50er Jahren erkannt. Als erstes Chinolon wurde Nalidixinsäure 1960 eingesetzt. Die Weiterentwicklung zu Norfloxacin, Enoxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin u.a. verbreiterte das antibakterielle Spektrum.

Flemings Entdeckung des Penicillins löste in aller Welt die systematische Suche nach anderen Antibiotika aus, die heute als weitgehend abgeschlossen gelten kann. Jedoch gibt es weltweite Bestrebungen zur chemischen Modifikation natürlicher Antibiotika und deren Optimierung für therapeutische Zwecke.

Nachdem vor etwa 30 Jahren die letzte neue Antibiotikaklasse, die Chinolone, für die Humanmedizin verfügbar wurde, kann in naher Zukunft mit der Einführung von zwei neuen Klassen – Oxazolidinone und Everninomycine gerechnet werden. Diese scheinen praktisch keine Kreuzresistenzen zu bisher in der Humanmedizin verwendeten Antibiotika zu haben und gegen einige der wichtigsten Problemkeime wirksam zu sein.

Neue antimikrobielle Wirkstoffgruppen für die Veterinärmedizin sind dahingegen nicht zu erwarten, was aus veterinärmedizinischer Sicht bedauert wird. Verbraucherschutz und wirtschaftliche Überlegungen der pharmazeutischen Industrie führten bereits 1997 zum Verlust von über 100 Präparaten in diesem Bereich [Mutschler et. al. 2001].

1.1.2.4. Einteilung der Antibiotika anhand ihrer Wirkmechanismen und Wirkungstypen

Heute sind vier hauptsächliche Mechanismen für die Wirkung von Antiinfektiva bekannt:

1. *Hemmung der Zellwandsynthese:*
Beta-Lactam-Antibiotika, Glykopeptide, Fosfomycin
2. *Störung der Permeabilität der Zytoplasmamembran:*
Polypeptid-Antibiotika, Polyen-Antimycotica
3. *Blockade der Proteinsynthese:*
Aminoglycoside, Tetracycline, Makrolide, Chloramphenicol, Lincosamide
4. *Unterdrückung der Nucleinsäuresynthese:*
Sulfonamide, Gyrasehemmer, antivirale Polymerasehemmer, Rifampicin, Flucytosin

Der *Wirkungsbereich* umfasst: bakterielle Infektionskrankheiten, Mykosen, Protozoenbefall, Viruserkrankungen (teilweise) sowie Krankheiten durch Wurmbefall.

Beim *Wirkungstyp* lassen sich zwei Typen unterscheiden:

Bakteriostase: Hemmung der Keimvermehrung, da die Proteinsynthese beeinflusst wird (Sulfonamide, Tetracycline, Trimethoprim, Chloramphenicol, einige ältere Makrolide) und

Bakterizidie: Keimzerstörung tritt häufig auf, da Bildung der Zellwand oder Membranpermeabilität beeinflusst wird (Gyrasehemmer, Beta-Lactam-Antibiotika, Aminoglycoside, Polypeptid- und Glykopeptidantibiotika u.a.). Die Bakterizidie ist jedoch nicht nur von Art und Konzentration des Wirkstoffs abhängig, sondern auch durch die Keimdichte und Wachstumsphase der Erreger sowie die Einwirkdauer bestimmt [Mutschler et al. 2001].

Weitere wichtige Begriffe stellen die *Wirkstärke*, der *postantibiotische Effekt* sowie das *Phänomen der ersten Dosis* eines Antiinfektivums dar:

Die *Wirkstärke* bestimmt, welche Konzentration für eine chemotherapeutische Wirkung notwendig ist: Man unterscheidet dabei die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK), welche höher als die MHK liegt.

Es handelt sich dabei um die geringste Konzentration eines Wirkstoffs, welche in vitro das Wachstum eines Erregers hemmt (MHK) oder diesen abtötet (MBK).

Das *Phänomen der ersten Dosis* beschreibt eine vorübergehende Abnahme der Erregerempfindlichkeit bei Einwirkung eines Aminoglycosids, der *postantibiotische Effekt* bezieht sich auf die Fortdauer einer antimikrobiellen Wirkung nach Absetzen des Medikaments und Absinken der Wirkstoffkonzentration auf nicht messbare Werte [Mutschler et al. 2001].

1.1.2.5. Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber Antiinfektiva

Keime sind dann resistent, wenn ihre minimale Hemmkonzentration (MHK) höher liegt als ein maximal erreichbarer (nicht toxischer) Serum- oder Gewebespiegel. Es wird unterschieden in *primäre und sekundäre Resistenzen*:

Primär resistent sind Erreger dann, wenn sie bereits vor Behandlungsbeginn unempfindlich gegenüber dem Wirkstoff sind (z.B. alle *Pseudomonas aeruginosa* Stämme gegenüber Benzylpenicillin, einzelne Stämme von *E. coli* gegenüber Tetracyclinen usw.). Bei Therapie erfolgt dann eine Selektion der entsprechenden resistenten Stämme.

Sekundäre (erworbene) *Resistenzen* liegen dann vor, wenn es während der Anwendung des Mittels zu Spontanmutationen kommt, in deren Nachfolge eine Selektion der resistenten Mutanten stattfindet. Aufgrund der Geschwindigkeit unterscheidet man zwischen Einschritt- (One-step) und Mehrschritt- (Multistep)-Resistenzen.

Die ersteren bilden sich relativ rasch nach ein- bis viermaliger Exposition des Erregers aus, man spricht vom Streptomycintyp, welcher z.B. bei den Makrolid-Wirkstoffen auftreten kann.

Der Penicillintyp entwickelt sich langsamer und in Stufen nach mehrmaligen Mutationsschritten (Beispiele: Beta-Lactame, Tetracycline, Gyrasehemmer, Sulfonamide).

Resistenzen können sowohl durch chromosomale (bakterienintern) als auch durch extrachromosomale (Plasmide) Information hervorgerufen werden.

Im Fall der Resistenz-Plasmide werden die Resistenzinformationen zwischen verschiedenen Bakterien (nicht speziesspezifisch!) durch Konjugation oder Transduktion übertragen und verbreitet. Eine weitere Möglichkeit der Resistenzverbreitung besteht in der Übermittlung von Transposons (springenden Genen).

Die transferierte Erbinformation kann allgemein die Bildung von Enzymen (Inaktivierung der Wirkstoffe durch chemische Modifikation), die Veränderung von Zellwandpermeabilitäten (verminderte Aufnahme von Wirkstoffen in die Zelle), die Bildung von wirkstoffausschleusenden Transportern oder eine Verringerung von Bindungsaffinitäten an die jeweiligen Zielstrukturen der Chemotherapeutika hervorrufen.

Kreuzresistenzen bestehen dann, wenn Keime nicht nur gegen ein, sondern gleichzeitig auch gegen ein oder mehrere weitere Therapeutika resistent sind (bei chemischer Verwandtschaft der Wirkstoffe oder gleichem Wirkungsmechanismus).

Daher ist es wichtig, zur Vermeidung von Resistenzbildungen die entsprechenden Mittel nur ganz gezielt (d.h. bei nachgewiesener Infektion) und dann in ausreichender Dosierung über eine ausreichende Zeit hinweg zu applizieren [Mutschler et al. 2001].

Im Folgenden werden die im Rahmen dieses Projekts untersuchten Wirkstoffgruppen mit ihren jeweiligen Gruppeneigenschaften vorgestellt.

1.1.2.6. Penicilline

Penicillin, durch den engl. Bakteriologen und Nobelpreisträger Sir Alexander Fleming 1928 erstmals aus Kulturen von *Penicillium notatum* (Schimmelpilz) gewonnen, kann als Ursprung aller Beta-Lactam-Antibiotika gelten. Ca. 12 Jahre später, also um 1940 wurden von den Arbeitsgruppen um Florey und Chain, applizierbare Medikamente entwickelt und ab 1941 erstmals therapeutisch eingesetzt.

Tabelle 1.4 gibt den Aufbau der in dieser Arbeit untersuchten Penicilline wieder.

Die Penicilline werden auf Grund ihrer Eigenschaften folgendermaßen unterteilt:

Beta-Lactamase-sensitive Penicilline:

Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Propicillin, Azidocillin

Die ersten therapeutisch eingesetzten Penicilline sind alle empfindlich gegen Beta-Lactamasen. Trotzdem haben sie, auf Grund ihrer guten Verträglichkeit und der lang reichenden und damit wertvollen Erfahrung, immer noch eine große Bedeutung in der Antibiotikatherapie.

Beta-Lactamase-resistente Penicilline:

Flucloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin

Um die Penicilline gegen die Beta-Lactamasen der Bakterien unempfindlich zu machen, wurden die Substanzen so weit chemisch verändert, dass die Bakterienenzyme nicht oder nur sehr schwer die Penicilline angreifen können. Die Penicillinpräparate wurden dafür in ihrer sterischen Struktur, also in ihrem räumlichen Aufbau verändert, um somit die Anbindung der Beta-Lactamasen zu verhindern. Die Beta-Lactamase-resistenten Penicilline sind alle säurefest, wodurch sie in Form von Tabletten appliziert werden können.

Breitbandpenicilline:

Amoxicillin, Ampicillin, Bacampicillin, Mezlocillin, Piperacillin

Breitbandpenicilline sind chemisch noch weiter entwickelt, um weitere Bereiche im Bakterienspektrum abzudecken. Sie wirken auch gegen gramnegative Stäbchen und vergrößern dadurch die Anwendungsgebiete der Penicilline [Mutschler et al. 2001].

Tabelle 1.4: Strukturformeln Penicilline

Penicillin-Grundstruktur		
Substanz	CAS-Nr.	R (Rest)
Amoxicillin	26787-78-0	
Ampicillin	69-53-4	
Benzylpenicillin	61-33-6	
Cloxacillin	61-72-3	
Dicloxacillin	3116-76-5	
Flucloxacillin	5250-39-5	
Methicillin	61-32-5	
Mezlocillin	53-86-1	
Nafcillin	147-52-4	
Oxacillin	66-79-5	
Phenoxymethylpenicillin	87-08-1	
Piperacillin	61477-96-1	

1.1.2.7. Makrolide

Die Makrolide stellen komplex aufgebaute Antibiotika mit einem 14-16-gliedrigen Lactonring und glykosidisch gebundenen Zuckern dar (Tabelle 1.5).

Sie wirken ebenfalls bakteriostatisch auf die Proteinsynthese der Mikroorganismen (aerobe und anaerobe Grampositive: Streptokokken, Bac. anthracis sowie anaerobe gramnegative Keime: Legionellen, Bordetella u.a.), indem sie reversibel an die Untereinheiten der 50S-Untereinheiten der Ribosomen gebunden werden und dadurch die Elongationsphase hemmen.

Tabelle 1.5: Strukturformeln Makrolide

Substanz	CAS-Nr.	Struktur
Azithromycin	83905-01-5	
Clarithromycin	81103-11-9	
Clindamycin	18323-44-9	
Erythromycin	114-07-8	
Roxithromycin	80214-83-1	
Spiramycin	8025-81-8	
Tylosin	1401-69-0	

Roxithromycin, Clarithromycin, Erythromycin und Azithromycin sind die humanmedizinisch relevanten Vertreter dieser Wirkstoffgruppe, Spiramycin ist auch im tiermedizinischen Bereich vertreten.

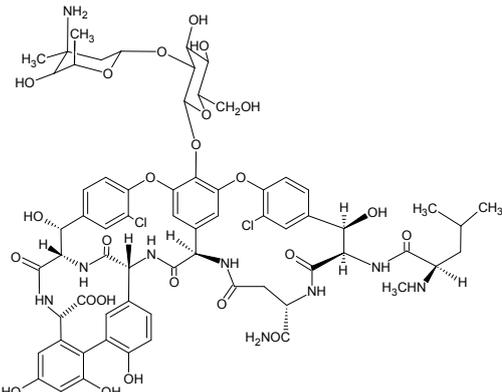
Sie werden hauptsächlich bei penicillinresistenten Keimen, Legionella-Pneumonien und sexuell übertragbaren Keimen eingesetzt und haben im Allgemeinen geringe Nebenwirkungen.

Das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin wird - bei den Makroliden vergleichbarem Wirkungsspektrum - gegen Staphylokokken und gramnegative anaerobe Stäbchen eingesetzt [Mutschler et al. 2001].

1.1.2.8. Glykopeptide: Vancomycin

Vancomycin stellt (Tabelle 1.6) ein bakterizides, parenteral zu applizierendes Antibiotikum gegen Staphylokokken, Enterokokken und Clostr. difficile dar. Es hat den Charakter eines Reserveantibiotikums, welches bei Vorhandensein von multiresistenten Keimen benutzt wird (MRSA etc.) Aufgrund des in der Vergangenheit häufigen Einsatzes von Avoparcin im veterinärmedizinischen Bereich kam es jedoch auch hier zu Resistenzbildungen (VRE = vancomycinresistente Enterokokken u.a.) [Harwood et al. 2001]. Es wird überwiegend unverändert ausgeschieden [Mutschler et.al. 2001].

Tabelle 1.6: Strukturformel Vancomycin

Substanz	CAS-Nr.	Struktur
Vancomycin	1404-93-9	

1.1.2.9. Fluorchinolone (Gyrasehemmer)

Chinolonsäuren und deren Aza-Analoga wirken hemmend auf die Untereinheit A der DNA-Gyrase und haben einen bakteriziden Effekt. Humantherapeutisch sind heute nur noch Gyrasehemmer der 2. Generation (fluorierte Chinolonsäuren - Fluorchinolone) relevant, welche sich gegenüber den Wirkstoffen der 1. Generation (Nalidixinsäure als Prototyp) durch verbesserte Eigenschaften (breiteres Wirkspektrum, größere Wirkstärke, günstigere Pharmakokinetik und geringere Resistenzentwicklung) hervorheben.

Strukturell sind sie als Derivate der Chinolin-4-on-3-carbonsäuren zu verstehen.

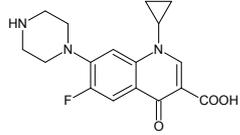
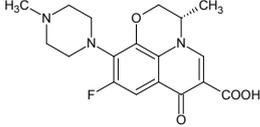
Sie sind humantherapeutisch von erheblichem Interesse bei Infekten der Atemwege, der Harnwege und anderer Organe.

Die Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber den Fluorchinolonen erfolgt über chromosomale Mutationen und stellt eine gewisse Problematik auch noch bei den neueren Wirkstoffen dar.

Sie sind wegen ihrer möglichen Nebenwirkungen in der Schwangerschaft und bei Kindern und Jugendlichen kontraindiziert (Störungen der Knorpelbildung) [Mutschler et al. 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ofloxacin und Ciprofloxacin untersucht (Tabelle 1.7).

Tabelle 1.7: Strukturformeln Fluorchinolone

Substanz	CAS-Nr.	Struktur
Ciprofloxacin	85721-33-1	
Ofloxacin	82419-36-1	

1.1.2.10. Sulfonamide

Die Sulfonamide (eigentlich Sulfanilamide) hemmen kompetitiv die Aufnahme von p-Aminobenzoesäure, welche die Bakterien zum Aufbau der Dihydrofolsäure benötigen (Wirkung als Antimetabolit, Folsäureantagonist).

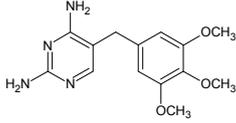
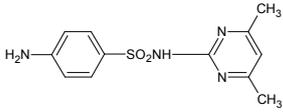
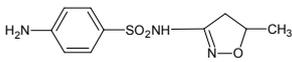
Sie müssen daher in hohen Dosen gegeben werden und wirken lediglich bakteriostatisch.

Die Kombination mit dem Diamino-benzylpyrimidin Trimethoprim ist als Cotrimoxazol bekannt und besitzt verstärkte Wirkung, hat ein verbessertes Wirkungsspektrum und weist verzögerte Resistenzentwicklungen auf. Cotrimoxazol wird u.a. zur Behandlung von Atemwegs- und Harnwegserkrankungen sowie zur Behandlung bestimmter Pneumonien genutzt.

Es besteht aufgrund des weitverbreiteten und häufigen Einsatzes bei vielen Bakterienstämmen eine erhebliche Resistenz [Mutschler et al. 2001].

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden Sulfamethoxazol, Sulfadimidin sowie Trimethoprim bestimmt (Tabelle 1.8).

Tabelle 1.8: Strukturformeln Sulfamethoxazol, Sulfadimidin und Trimethoprim

Substanz	CAS-Nr.	Struktur
Trimethoprim	738-70-5	
Sulfadimidin	57-68-1	
Sulfamethoxazol	723-46-6	

1.1.2.11. Tetracycline

Unter den Tetracyclinen, welche aus Streptomyces-Arten bzw. partialsynthetisch gewonnen werden, versteht man bakteriostatisch auf grampositive Keime wirkende Antibiotika mit der in Tabelle 1.9 gezeigten Grundstruktur (vier annelierte Sechsringe).

Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer Störung der Proteinsynthese (Störung der Anlagerung von Amino-acyl-t-RNA an den bakteriellen 70S-Ribosomen, dadurch Verhinderung der Peptidkettenverlängerung).

Sie wirken auf grampositive (Streptokokken, Pneumokokken u.a.) sowie gramnegative Bakterien (Neisseria, Bordetella pert., Campylobacter u.a.) und auch auf intrazelluläre Keime (Mykoplasmen, Rickettsien, Chlamydien) und Spirochäten.

In der Humantherapeutik sind wegen der Resistenz-Zunahmen bei vielen Bakterienstämmen heutzutage nur noch Doxycyclin und Minocyclin relevant, im veterinärmedizinischen Bereich sind Tetracycline allerdings weit verbreitet.

Ihre Resorption wird durch Erdalkalimetall-Kationen gestört.

Im Körper haben sie eine relativ lange Halbwertszeit und können zu zahlreichen z.T. irreversiblen Nebenwirkungen führen (Photosensibilisierungen, Gelbfärbung von Zähnen u.a.), weswegen Anwendungen für Schwangere und Kinder unter 8 Jahren kontraindiziert sind [Mutschler et al. 2001].

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin bestimmt (Tabelle 1.9).

Tabelle 1.9: Strukturformeln Tetracycline

Substanz	CAS-Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Struktur
Chlortetracyclin	57-62-5	H	H	OH	CH ₃	Cl	
Doxycyclin	564-25-0	H	OH	H	CH ₃	H	
Oxytetracyclin	79-57-2	H	OH	OH	CH ₃	H	
Tetracyclin	60-54-8	H	H	OH	CH ₃	H	

1.1.3. Perfluorierte Tenside

1.1.3.1. Eigenschaften, Herstellung und Verwendung

Perfluorierte organische Verbindungen sind Verbindungen, an deren Kohlenstoffgerüst ein vollständiger Austausch der Wasserstoffatome durch Fluoratome stattgefunden hat. Da es sich bei der polaren Kohlenstoff-Fluor-Bindung um eine der stabilsten Bindungen in der organischen Chemie handelt, weisen perfluorierte Verbindungen eine wesentlich höhere thermische und chemische Stabilität auf als analoge Kohlenwasserstoffverbindungen.

Perfluortenside sind oberflächenaktive Substanzen, die aus einer hydrophoben perfluorierten Kohlenstoffkette und einer hydrophilen Kopfgruppe (z.B. Sulfonat und Carboxylat bzw. deren Salze) bestehen. Dieser amphiphile Charakter bewirkt eine starke Reduzierung der Oberflächenspannung von Wasser, wobei ihre Oberflächenaktivität höher ist als die der analogen Kohlenwasserstofftenside. Die Gruppe der Perfluortenside kann unterteilt werden in die Stoffgruppe der perfluorierten Alkylsulfonate (Leitsubstanz: Perfluoroctansulfonsäure PFOS (Abb. 1.2)) und der perfluorierten Carbonsäuren (Leitsubstanz: Perfluoroctansäure PFOA (Abb. 1.3)).

Abbildung 1.2: Strukturformel PFOS

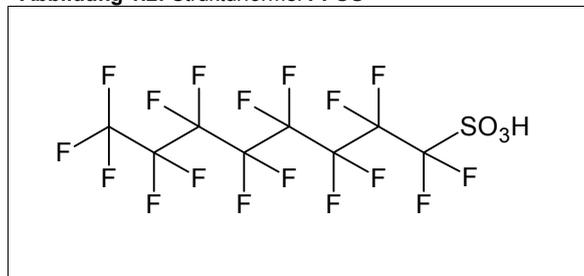
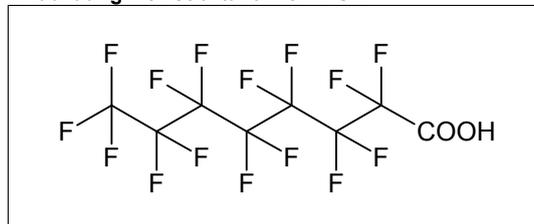


Abbildung 1.3: Strukturformel PFOA



Die *Herstellung* von Perfluorcarbonsäuren und Perfluorsulfonsäuren erfolgte bis 2002 überwiegend elektrochemisch (ECF-Elektrochemische Fluorierung). Beim kostengünstigen ECF-Verfahren entstehen bei einer Produktausbeute von 30-45% verschiedene kürzerkettige und verzweigt-kettige Nebenprodukte, aus deren Gemisch die gewünschte Verbindung über mehrere Verfahrensschritte angereichert wird. Sie enthält - je nach Aufwand - Rückstände anderer Fluorchemikalien. Das Unternehmen 3M stieg 2000 aus diesem Verfahren aus. Seither ist der italienische Konzern Miteni (Mitsubishi Konzern) nach eigenen Angaben der weltweit größte Produzent perfluorierter Verbindungen nach dieser Methode.

Ein weiteres Synthese-Verfahren ist die Fluortelomerisierung. Beginnend mit Tetrafluorethylen wird das Molekül von einem Ende her schrittweise verlängert. Die Produkte unterscheiden sich um jeweils zwei Kohlenstoffatome und sind linear aufgebaut. Die Reaktion kann so gesteuert werden, dass hauptsächlich Substanzen mit Alkylketten von 8 Kohlenstoffatomen gebildet werden.

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen *Eigenschaften* (thermische, chemische, biologische und UV-Stabilität; schmutz-, farb-, öl-, fett- und wasserabweisende Eigenschaften) finden perfluorierte Tenside *Verwendung* in vielfältigen Bereichen. Laut OECD [OECD 2005] können für PFOS-artige Substanzen folgende Einsatzbereiche genannt werden:

- Imprägnierung der Oberflächen von Textilien, Leder, Teppichen, Papier- und Kartonprodukten
- Anwendung in Farben und Lacken
- Einsatz in Feuerlöschschäumen
- Verwendung im Bereich der fotografischen Industrie
- Verwendung in Hydraulikölen
- Verwendung im Rahmen der Behandlung von Metalloberflächen (Verchromung)

Im Gegensatz zu PFOS werden PFOA-Verbindungen im Wesentlichen nur als Prozessierungshilfe (Emulgatoren) bei der Herstellung von Fluorpolymeren (z.B. Teflon®) eingesetzt. Eine Verunreinigung der Umwelt ist insbesondere durch Emissionen während des Herstellungsprozesses und als Verunreinigung in Polymeren zu befürchten [Danish-EPA 2005]. Desweiteren kann PFOA auch als Pyrolyseprodukt (Überhitzen von Teflon) entstehen. Ebenso stellt PFOA einen endständigen Metaboliten beim biologischen Abbau z.B. des 8:2-Fluortelomeralkohols dar (8:2-FTOH). Unter dem Akronym FTOH werden polyfluorierte Telomeralkohole zusammengefasst, die in der Regel linear sind und eine gerade Anzahl perfluorierter Kohlenstoffatome sowie zwei nichtfluorierte, wasserstoffgebundene Kohlenstoffatome neben der Hydroxygruppe enthalten. FTOHs sind wasserunlöslich, haben größere Dampfdrücke als PFOS und PFOA und gelten als flüchtig. Für Fluortelomere wird eine atmosphärische Lebensdauer von 20 Tagen diskutiert, die einen Transport über weite Distanzen ermöglicht und so für das Vorkommen perfluorierter Carbonsäuren in der Arktis verantwortlich sein könnte.

Perfluorierte Tenside finden Verwendung in vielen Gegenständen des alltäglichen Gebrauchs, z.B. in der Antihafbeschichtung von Papier und Kochgeschirr, in der schmutzabweisenden Ausrüstung von Teppichen, Möbeln und Tapeten, in der Imprägnierung von wasserdichter, atmungsaktiver Funktionsbekleidung. Diese Gegenstände können die perfluorierten Tenside auch beim bestimmungsgemäßen Gebrauch wieder in die Umwelt freisetzen, so dass Menschen in Industriegesellschaften einer dauerhaften Grundbelastung durch diese Substanzen ausgesetzt sind. [Fricke & Lahl 2005, LGL Bayern 2006, Umweltbundesamt 2007, Danish-EPA 2005].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Einzelsubstanzen sind in Tabelle 1.10 dargestellt.

Tabelle 1.10: Liste der untestierten perfluorierten Tenside

Analyt	Abkürzung	Summenformel	Rel. Molmasse	CAS-Nr.
Perfluorbutansäure	PFBA	C ₄ HO ₂ F ₇	214,04	375-22-4
Perfluorpentansäure	PFPeA	C ₅ HO ₂ F ₉	264,05	2706-90-3
Perfluorhexansäure	PFHxA	C ₆ HO ₂ F ₁₁	314,05	307-24-4
Perfluorheptansäure	PFHpA	C ₇ HO ₂ F ₁₃	364,06	375-85-9
Perfluoroctansäure	PFOA	C ₈ HO ₂ F ₁₅	414,07	335-67-1
Perfluorononansäure	PFNA	C ₉ HO ₂ F ₁₇	464,08	375-95-1
Perfluordecansäure	PFDA	C ₁₀ HO ₂ F ₁₉	514,08	335-76-2
Perfluorundecansäure	PFUnDA	C ₁₁ HO ₂ F ₂₁	564,09	2058-94-8
Perfluordodecansäure	PFDoDA	C ₁₂ HO ₂ F ₂₃	614,10	307-55-1
Perfluorbutansulfonsäure	PFBS	C ₄ HO ₃ F ₉ S	300,10	375-73-5
Perfluorhexansulfonsäure	PFHxS	C ₆ HO ₃ F ₁₃ S	400,11	355-46-4
Perfluoroctansulfonsäure	PFOS	C ₈ HO ₃ F ₁₇ S	500,13	1763-23-1

1.1.3.2. Umweltverhalten und Toxikologie

Perfluorierte Tenside kommen in der Natur nicht vor, sie sind immer anthropogenen Ursprungs. Biogene fluororganische Verbindungen sind zumeist einfach fluoriert und dadurch biologisch abbaubar; für die strukturell einfachste niedermolekulare perfluorierte Carbonsäure Trifluoressigsäure (TFA) wird neben der industriellen auch eine natürliche Herkunft vermutet [Fricke & Lahl 2005].

Das Auftauchen von perfluorierten Verbindungen in der Umwelt wurde in den 70er Jahren erstmals beobachtet und stieg seitdem kontinuierlich an. Mittlerweile können perfluorierte Tenside ubiquitär in Gewässern, in der Atmosphäre, sowie im Gewebe bzw. Blut von Menschen und Tieren nachgewiesen werden. PFOS und PFOA verhalten sich wie persistente organische Schadstoffe (POPs - persistent organic pollutants) und unterliegen keinerlei Abbau. Perfluortenside werden jedoch nicht wie die meisten POPs im Fettgewebe gefunden, sondern akkumulieren in Leber, Niere und Gallenblase und binden an Proteine im Blut. Dadurch reichern sie sich in der Nahrungskette an. Die höchsten Konzentrationen von PFOS und PFOA finden sich in marinen Säugetieren und fischfressenden Tieren in industrialisierten Gebieten.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass PFOS und PFOA oral und inhalativ aufgenommen werden können. Sie werden offensichtlich nicht metabolisiert. Die Ausscheidungs-Halbwertszeiten von PFOS variieren von 7,5 Tagen in Ratten über 200 Tage in Cynomolgus-Affen bis 8,7 Jahren (2,3 – 21,3 Jahren) beim Menschen (wenige ehemalige 3M-Mitarbeiter), für PFOA wird eine Ausscheidungs-Halbwertszeit von 4,4 Jahren (1,5 – 13,5 Jahren) angegeben. Studien bei hochbelasteten Arbeitern zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Exposition von PFOS und Blasenkrebs bzw. PFOA und Prostatakrebs. Es ist bekannt, dass PFOS und PFOA durch den Körper zirkulieren und in der Leber akkumulieren. Es wird vermutet, dass beide Stoffe vom Körper als Gallensäuren erkannt werden und über den enterohepatischen Kreislauf recycelt werden.

Laut OECD [OECD 2002] und US-EPA [US-EPA 2005] besitzen weder PFOS noch PFOA ein primäres genotoxisches Wirkungspotential, vermögen, die DNA weder mit noch ohne Metabolisierung unmittelbar selbst anzugreifen. Eine 2005 publizierte Studie [Yao & Zhong 2005] belegt ein relativ hohes sekundäres genotoxische Wirkungspotential von PFOA unterhalb cytotoxischer Konzentrationen (Peroxisomen-Proliferation unter vermehrter Freisetzung von Sauerstoffradikalen).

Andere sekundär genotoxische Wirkungen von PFOA bestehen in der Induktion und Suppression unterschiedlichster Gene des Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsels, der Zelladhäsion, der Zellkommunikation, der hormonellen Regulation [Guruge et al. 2006]. Auch auf der enzymatischen Ebene können PFOA und andere PFT den Fettstoffwechsel blockieren [Fricke & Lahl 2005, LGL Bayern 2006, Umweltbundesamt 2007].

PFOS konnte in Zellversuchen signifikant die genotoxische Wirkung von Cyclophosphamid erhöhen [Jernbro et al. 2007]. Durch die Anwesenheit von PFOS wird wahrscheinlich die Durchlässigkeit der Zellmembranen erhöht, so dass genotoxische Substanzen verstärkt an ihren Wirkungsort gelangen können.

1.1.3.3. Regulatorische Maßnahmen

Schweden hat PFOS wegen der weiträumigen Verbreitung als Kandidat für die Liste der Stockholm-Konvention zu "Persistent Organic Pollutants" (POPs) vorgeschlagen. Das zuständige wissenschaftliche Komitee der Stockholm-Konvention bestätigte die POP-Eigenschaften von PFOS. Parallel dazu wurde PFOS auch im Rahmen des POP-Protokolls der Genfer Luftreinhaltekonvention als POP bestätigt. Das sind erste Schritte für ein weltweites Verwendungsverbot. Für PFOA hat die amerikanische Umweltbehörde US-EPA mit acht wichtigen fluorchemischen Unternehmen ein „Product Stewardship Programme“ abgestimmt.

Ziel dieser freiwilligen Vereinbarung ist, die Emissionen von PFOA und möglichen Vorläufersubstanzen bis 2010 auf 5 Prozent des Standes von 2000 zu reduzieren. Die Vereinbarung gilt auch für längerkettige Perfluorcarbonsäuren und für Emissionen aus Produkten. 2015 soll das Arbeitsprogramm zur vollständigen Reduktion der Emissionen abgeschlossen sein [US-EPA 2006, Umweltbundesamt 2007].

Nach der Entdeckung hoher PFOA-Konzentrationen im Trinkwasser einiger Kommunen in Nordrhein-Westfalen im Jahr 2006 wurden in Deutschland maximale Trinkwassergehalte für PFOS und PFOA in Leit- und Zielwerten geregelt [Trinkwasserkommission 2006] (siehe Kapitel 1.5.2.1.).

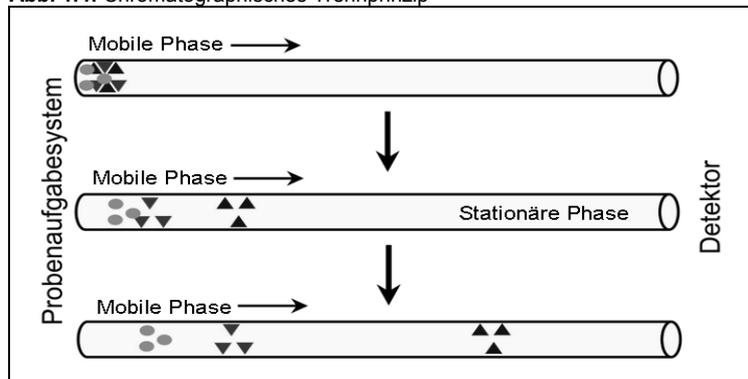
Ende 2006 wurden auf europäische Ebene restriktive Anwendungsbeschränkungen und Grenzwerte vorerst nur für PFOS (PFOA steht unter wissenschaftlicher Beobachtung) beschlossen, die Mitte des Jahres 2008 in Kraft traten [EU-Parlament und EU-Rat 2006] (siehe Kapitel 1.5.2.5.).

1.1.4. Grundlagen der LC-MS-Methodik und der SPE

1.1.4.1. Chromatographie

Chromatographische Verfahren sind Trennverfahren, die darauf basieren, dass die zu trennenden Substanzen über zwei nicht miteinander mischbare Phasen multiplikativ, d.h. wiederholt verteilt werden (erste Säulenchromatographie von Blattfarbstoffen 1903 durch den russischen Botaniker Michail Tswett). Eine dieser Phasen ist immobil, d.h. fixiert (*stationäre Phase*), die andere Phase ist beweglich (*mobile Phase*), im Fall der Flüssigchromatographie eine Flüssigkeit. Zur Trennung wird die Probe in der mobilen Phase gelöst und über die stationäre Phase bewegt (Elutionstechnik). Nach Aufgabe der Probe verteilen sich die Komponenten zwischen der mobilen und der stationären Phase. Wird jetzt mobile Phase in Form des Eluenten laufend nachgeliefert, verteilen sich die Stoffe entlang der Säule zwischen frischer mobiler und stationärer Phase. Stärker an der stationären Phase zurückgehaltene Verbindungen benötigen dafür mehr Zeit als weniger stark wechselwirkende Substanzen. Idealerweise werden nach einer gewissen Elutionszeit die Verbindungen getrennt (Abbildung 1.4) und können am Ausgang der Säule einzeln detektiert werden, wobei das Detektorsignal in Abhängigkeit von der Zeit als Chromatogramm aufgezeichnet wird.

Abb. 1.4: Chromatographisches Trennprinzip



Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) in Säulen ist ein Verfahren, welches hochauflösende Trennungen in einem weiten Bereich von Substanzklassen zulässt. Während bei der Gaschromatographie (GC) nur Stoffe getrennt werden können, die flüchtig sind oder sich bei höheren Temperaturen unzersetzt verdampfen lassen, oder von denen flüchtige Derivate reproduzierbar hergestellt werden können, bietet die HPLC die Möglichkeit, Stoffe und Stoffgruppen zu trennen, die schwerflüchtig oder thermisch instabil sind oder sich nur mit Schwierigkeiten in flüchtige Derivate umwandeln lassen. Voraussetzung ist allerdings die Löslichkeit der Probe in einem Lösemittel.

Die HPLC-Trennungen laufen automatisiert auf computergesteuerten Systemen ab, die grundsätzlich aus einem Probenaufgeber, einer Trennsäule (mit Säulenofen) und einem Detektor bestehen.

Als stationäre Phase kommen in den meisten Fällen hydrophobisierte Kieselgele zum Einsatz, die im einfachsten Fall Octadecylreste tragen. Die stationäre Phase ist also zu einem großen Teil apolar, so dass wässrige mobile Phasen verwendet werden können (Reversed-Phase-HPLC). Neuere stationäre Phasen tragen zusätzlich polarere Endgruppen, um eine Trennung auch polarer Analyten zu gewährleisten [Matissek et al. 1992, Galensa et al. 1995, Otto 1995].

1.1.4.2. LC-MS-Kopplung

Bei LC-MS-Kopplungen erfüllt ein Massenspektrometer die Funktion des Detektors. Übliche Interfaces zur Ionisierung und Überführung der Analyten in das Massenspektrometer und zum Entfernen eines Großteils der Lösemittel arbeiten heute unter Atmosphärendruck (ESI -

Electrospray Ionisation für ionische und polare Analyten; APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionisation für eher ungeladene und unpolare Analyten).

Bei der Electrospray Ionisation (ESI) wird aus dem Lösemittel ein Spray erzeugt. Das Eluat wird elektrisch aufgeladen. Für das Versprühen sind prinzipiell Coulomb-Kräfte verantwortlich. Das Eluat gelangt in eine Kapillare, an der eine hohe Spannung anliegt. Die Ionenerzeugung beruht darauf, dass ein Potential von 2000 – 5000 Volt auf die aus der Kapillare in die Gasphase übertretende Flüssigkeit einwirkt, wobei geladene Tropfen gebildet werden, aus denen bei der Verdampfung Ionen freigesetzt werden.

Bei sogenannten „Triple-stage“-Geräten („MS/MS“) werden diese gebildeten Ionen über eine focussierende Ionenoptik in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers überführt, in dem das erste und das dritte Quadrupol als Massenfilter dienen, das mittlere als Stoßkammer, um Fragmentierungen zu induzieren. Zur selektiven und empfindlichen Detektion der Analyten wird das Massenspektrometer im MRM-Modus betrieben (Multiple Reaction Mode), dabei lässt das erste Quadrupol selektiv nur das Quasimolekül des Analyten passieren, im zweiten Quadrupol wird ein Stoßgas zugegeben, das die Fragmentierung bewirkt; ein oder zwei intensive und charakteristische Fragmente werden dann im dritten Quadrupol selektiert und detektiert.

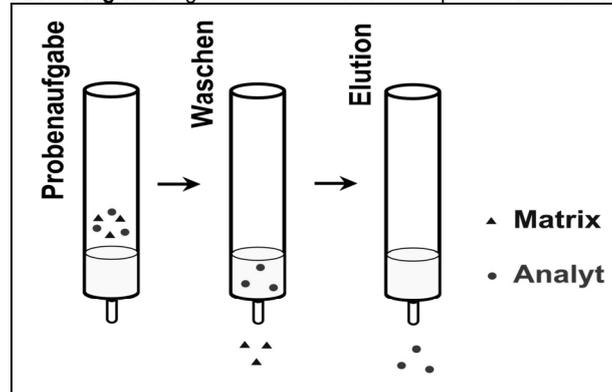
Durch diese Vorgehensweise werden gezielt die gesuchten Analyten detektiert, andere Substanzen und die Matrix werden weitestgehend als Signal in den Chromatogrammen ausgeblendet [Galensa et al. 1995].

1.1.4.3. Festphasenanreicherung

Bei der Festphasenanreicherung (SPE - solid phase extraction) handelt es sich prinzipiell auch um ein chromatographisches Verfahren (jedoch besteht die stationäre Phase aus einem Material größerer Partikel als bei der HPLC). Die SPE dient einerseits der Extraktion von Substanzen aus Flüssigkeiten, andererseits aber auch der Abtrennung störender Begleitsubstanzen. Als Extraktionsmaterialien kommen wieder modifizierte Kieselgele oder Polymermaterialien infrage, einige Materialien besitzen auch funktionelle Gruppen, die zusätzlich einen Ionenaustausch ermöglichen. Das Material wird in Glas- oder Polypropylenkartuschen angeboten.

Eine allgemeine Vorgehensweise (Idealfall) für die Festphasenextraktion wird in Abbildung 1.5 verdeutlicht.

Abbildung 1.5: Allgemeines Schema der Festphasenanreicherung



Dabei wird nach dem Vorbereiten der Extraktionskartusche (Konditionierung) die wässrige Probe mit den Analyten und Matrixbestandteilen durch die Kartusche gesaugt oder gedrückt. Die Bestandteile werden auf der stationären Phase vollständig adsorbiert. In einem anschließenden Schritt wird die Kartusche zur Entfernung von störenden Matrixbestandteilen mit Lösemittel-Wasser-Gemischen gewaschen, wobei die Zielanalyten auf der stationären Phase verbleiben. Abschließend werden die Analyten mit stark eluierenden Lösemitteln von der stationären Phase eluiert. Der gewonnene Extrakt kann weiterverarbeitet oder direkt für eine chromatographische Messmethode eingesetzt werden.

1.2. Motivation und Ziel der Arbeit

1.2.1. Antibiotika

Ein Ausgangspunkt für die Antibiotika-Untersuchungen lag zum einen in der seit längerer Zeit zu beobachtenden Steigerung der Anzahl von Resistenzen bei verschiedenen - teils fakultativ, teils obligatorisch - pathogenen Mikroorganismen gegenüber unterschiedlichen antibiotischen Wirkstoffen (Stichworte MRSA = methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*, VRE = vancomycinresistente Enterokokken u.a.) [Bundesgesundheitsblatt 1989-1999, Harwood et al. 2001, Feuerpfeil et al. 1999, Witte & Klare 1999].

Die unterschiedlichen Mikroorganismen, welche Resistenzen und Multiresistenzen gegen verschiedene Antibiotika entwickelt haben [Witte & Klare 1999, Feuerpfeil et al. 1999], gelangen zwar überwiegend über menschliche und tierische Ausscheidungen in die Umwelt, jedoch können subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen biologische Effekte (z. B. erhöhte Gentransferraten, auch von Resistenzgenen) hervorrufen, weshalb auch der Eintrag von Antibiotikarückständen bzw. deren aktiven Metaboliten ins Abwasser besondere Aufmerksamkeit verdient.

In diesem Gesamtzusammenhang ist auch die „Empfehlung des Rates vom 15.11.2001 zur umsichtigen Verwendung antimikrobieller Mittel in der Humanmedizin“ [Empfehlung des Rates der EU 2001], zu sehen, welche in einer ganzen Reihe von geforderten Punkten speziell auf eine - medizinisch begründbare und vertretbare - Reduzierung des Einsatzes und Gebrauchs antimikrobieller Mittel bei Mensch und Tier abhebt.

Es wird empfohlen, sowohl entsprechende therapeutische Erkenntnisse (gemäß Indikation) als auch Grundlagen aus dem medizinischen Fachbereich der Hygiene zu berücksichtigen, um die Problematik der zunehmenden Antibiotikaresistenzen, welche den Stellenwert einer „Bedrohung der Volksgesundheit“ hat, zu reduzieren oder zu beseitigen. Die Ursachen für diese Bedrohung können keinesfalls durch zeit- und kostenintensive Entwicklungen jeweils neuer Wirkstoffe unter Kontrolle gebracht werden, vielmehr muss der Ursachenbekämpfung verstärkte Aufmerksamkeit zuteil werden.

Zum anderen lagen bis Projektbeginn nur relativ wenig Daten und Untersuchungen zur Konzentration von Antibiotika in der Umwelt vor.

Beide Sachverhalte warfen die Frage auf, ob auch das Vorkommen von Antibiotika z.B. in Krankenhausabwässern, aber auch in anderen Wasserkompartimenten zur gesteigerten Resistenzbildung bei pathogenen und nichtpathogenen Mikroorganismen beitragen kann und wie man möglicherweise im Rahmen einer speziellen Abwasserbehandlung darauf reagieren kann, wie dies u.a. von Adams [Adams et al. 2002] sowie Brauch [Brauch et al. 2000] und Ternes [Ternes 2000b] diskutiert wird.

Zur Verbesserung der unbefriedigenden Datenlage zum Vorkommen und zu Konzentrationen von Antibiotika in der aquatischen Umwelt wurde am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn für eine Reihe von relevanten, antibiotisch wirksamen Originalwirkstoffen (ohne Berücksichtigung von Metaboliten oder Konjugaten) eine geeignete, d.h. leistungsfähige und damit empfindliche und robuste HPLC-MS/MS Multimethode ausgearbeitet.

Diese Analytik wurde nachfolgend zum Nachweis der Substanzen im Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn (im Folgenden kurz UKB), in Kläranlagenzu- und -abläufen, in Oberflächengewässern sowie in verschiedenen Rohwässern (Uferfiltrate, Wasser eines Staugewässers, Grundwasser) sowie Trinkwasser eingesetzt.

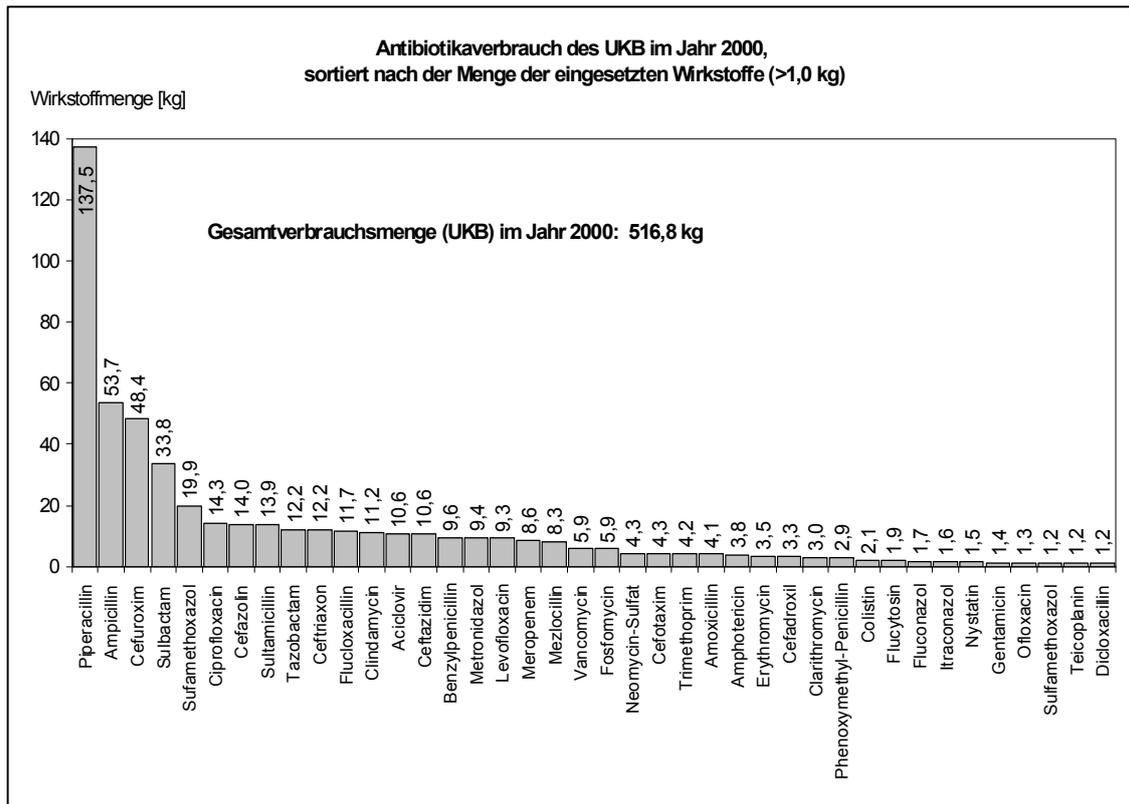
Grundlage für die Auswahl der Wirkstoffe waren sowohl die über die Krankenhausapotheke des UKB ermittelten Abgabemengen für das Jahr 2000 (Abbildung 1.6) von verschiedenen Wirkstoffen als auch die über den Arzneiverordnungsreport 2000 [Arzneiverordnungsreport 2000] errechneten Abgabemengen der niedergelassenen Ärzte (ohne Privatverordnungen, welche im Arzneiverordnungsreport nicht erfasst werden und welche man zuzüglich mit ca. 20% veranschlagen muss).

Ein weiteres Auswahlkriterium war die Wirkstoffliste des Bund/Länderaussschusses für Chemikaliensicherheit [BLAC 1999], deren antibiotische Wirkstoffe nachträglich und auf Wunsch

des Landesumweltamtes NRW - LUA NRW (heute Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz - LANUV NRW) teilweise zusätzlich in das Programm übernommen worden waren.

Abbildung 1.6 gibt die berechneten Mengen der abgegebenen bzw. verordneten Wirkstoffe für das UKB sowie für den kommunalen Bereich wieder.

Abbildung 1.6: Antibiotika-Abgabemengen des Universitätsklinikums Bonn 2000 jeweils in kg



Die errechneten Zahlen beruhen auf der Summe der Wirkstoffe der jeweils von der Krankenhausapotheke abgegebenen Mitteln und stellen jeweils die theoretisch maximale Menge dar, welche über die hauptsächlich ambulant versorgten Patienten pro Jahr ins Klinikabwasser gelangen konnte.

Diese Daten sowie die theoretischen Abgabe- und Verordnungsmengen sollten einer quantitativen Bilanzierung des Eintrags, des Abbaus sowie möglichen Verbleibs der Wirkstoffe im aquatischen Ökosystem dienen.

Ferner sollte aufgrund der im Verlauf des Projekts erhaltenen Daten ermittelt werden, ob und in welchem Umfang eine Minimierung der Belastung von Krankenhausabwässern und häuslichen Abwässern mit den untersuchten Substanzen notwendig und möglich ist, da es bei Stoßbelastungen möglicherweise auch zu einer Beeinträchtigung der Klärwerksleistung kommen kann.

Die Untersuchungen sollten darüber hinaus eventuelle Belastungen von Uferfiltratswasser, welches zur Trinkwassergewinnung verwendet wird, durch diese Pharmaka aufzeigen. Tabelle 1.11 zeigt die Reihenfolge der Verbrauchsmengen im Klinikum sowie im kommunalen Bereich.

Tabelle 1.11: Ranglisten der Antibiotikaverbrauchsmengen nach Mengen gelistet

Rangliste UKB-Antibiotika	Rangliste „kommunale“ Antibiotika (nach Arzneimittelverordnungsreport 2000)
1. Piperacillin	1. Phenoxymethylpenicillin (2.)
2. Ampicillin	2. Amoxicillin (1.)
3. Cefuroxim	3. Doxycyclin (11.)
4. Sulbactam	4. Sulfamethoxazol / Trimethoprim (3.)
5. Sulfamethoxazol	5. Erythromycin (8.)
6. Benzylpenicillin	6. Roxithromycin (9.)
7. Flucloxacillin	7. Clarithromycin (4.)
8. Tazobactam	8. Azithromycin (16.)
9. Ciprofloxacin	9. Clindamycin (6.)
10. Cefazolin	10. Cefaclor (5.)
11. Ceftriaxon	11. Ciprofloxacin (7.)
12. Sultamicillin	12. Ofloxacin (21.)
13. Clindamycin	

Kursivdruck – Substanzen NICHT im Untersuchungsprogramm
(Platzierung in Klammern) Rangliste gemäß Arzneiverordnungsreport 2006 [Arzneiverordnungsreport 2006]

Sulbactam und Tazobactam sind selbst keine Antibiotika, sondern wirken im Sinne einer Beta-Lactamase-Inhibierung und werden in Kombination mit nicht Beta-Lactamase-stabilen Beta-Lactamen (Amoxicillin, Piperacillin) verabreicht. Sultamicillin stellt ein Prodrug aus Ampicillin und Sulbactam dar, welches im Darm hydrolytisch gespalten wird.

Sulfamethoxazol und Trimethoprim werden fast ausschliesslich als Kombipräparat angewendet (Mengenverhältnis Sulfamethoxazol / Trimethoprim 5:1) [Arzneiverordnungsreport 2000].

Aus dieser Gegenüberstellung lässt sich erkennen, dass die ambulanten Verordnungen der niedergelassenen Ärzte ein anderes Spektrum an Wirkstoffen aufweisen. Dies lässt sich dadurch begründen, dass in einem Uniklinikum häufig solche Infektionen behandelt werden, welche bei niedergelassenen Ärzten eine nur untergeordnete Rolle spielen.

Aufgrund der o.a. ermittelten Verbrauchsmengen und aufgrund der Relevanz für das BLAC-Untersuchungsprogramm wurden folgende Substanzen ausgewählt (Tabelle 1.12):

Tabelle 1.12: Antibiotika-Substanzen im Untersuchungsspektrum

Wirkstoffklasse	Einzelsubstanz
Penicilline	Amoxicillin, Ampicillin, Benzylpenicillin (Penicillin G), Cloxacillin, Dicloxacillin, Flucloxacillin, Methicillin, Mezlocillin, Nafcillin, Oxacillin, Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V), Piperacillin
Makrolide	Azithromycin, Clarithromycin, Clindamycin (als Lincosamid-Antibiotikum), Erythromycin, Roxithromycin, Spiramycin, Tylosin,
Glykopeptid	Vancomycin,
Fluorchinolone	Ciprofloxacin, Ofloxacin,
Sulfonamide	(Trimethoprim), Sulfamethoxazol, Sulfadimidin,
Tetracycline	Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin,

Untersucht wurde jeweils der reine Wirkstoff ohne Berücksichtigung von Metaboliten.

1.2.2. Perfluorierte Tenside

Im April 2004 trat der WWF (World Wide Fund for Nature) mit der Schlagzeile „Politiker mit Giftcocktail im Blut“ an die Öffentlichkeit [WWF 2004]. In einer vom WWF durchgeführten Analyse konnten im Blut von EU-Abgeordneten Rückstände von 76 verschiedenen Chemikalien festgestellt werden. Es fanden sich Rückstände von bromierten Flammschutzmitteln, polychlorierten Biphenylen (PCB), Pestiziden, Phthalaten und Fluorchemikalien, einerseits Chemikalien, die bereits mit einem Verbot belegt sind, andererseits aber auch Chemikalien aus Alltagsprodukten. Mit der Aktion wollte der WWF auf die Notwendigkeit aufmerksam machen, den Gesetzentwurf zur europäischen Chemikalienpolitik „REACH“ (Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien) zu stärken.

In einem Diskussionsbeitrag zum REACH-Dossier der EU-Kommission zeigten Marc Fricke und Uwe Lahl [Fricke & Lahl 2005] am Beispiel der Risikobewertung perfluorierter Tenside als einer Stoffgruppe aus rund 30000 Altstoffen gewisse Defizite an den vorgegebenen Basistests zur Bewertung von Stoffen im niedrigtonnagigen Herstellungsbereich (1-10 Tonnen pro Jahr) auf, denen ein obligatorischer Test zur biologischen Abbaubarkeit fehlt. Für die perfluorierten Tenside konnte eine ubiquitäre Verteilung in Gewässern, in der Atmosphäre sowie im Gewebe bzw. im Blut von Menschen und Tieren nachgewiesen werden, wobei sie keinerlei Transformation unterliegen. Für Oberflächen-, Grund- und Trinkwässer in Nordamerika und Asien konnte über Kontaminationen mit perfluorierten Tensiden berichtet werden [Fricke & Lahl 2005]. Für Deutschland lagen Ende 2005 kaum publizierte Daten vor [Lange et al. 2004].

Ende 2005 sollte daher am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Uni Bonn eine Methode zur Erfassung verschiedener perfluorierter Tenside in Wasser entwickelt werden, um Daten über die Belastung aquatischer Umweltkompartimente in Deutschland mit Perfluortensiden zu erheben. Etwa gleichzeitig sollte als Auftragsanalytik eine Methode zur PFT-Bestimmung in methanolischen Extrakten aus Textilien bzw. Leder etabliert werden. Beide Methoden unterscheiden sich lediglich in den Extraktions- bzw. Anreicherungsverfahren (im Folgenden wird auf die Matrix Leder/Textil nicht weiter eingegangen).

Anfang 2006 konnten mit dieser Methode im Bonner Trinkwasser, das eigentlich als blindwertfreie Dotierungsgrundlage für weitergehende Validierungsmaßnahmen der Methode dienen sollte, einige perfluorierte Tenside (z.B. PFOA) im einstelligen ng/L-Bereich gefunden werden. Nachfolgend wurde eine Rheinlängsuntersuchung in Angriff genommen, bei der der Rhein von Neuhausen in der Schweiz bis zur holländischen Grenze einschließlich seiner wichtigsten Zuflüsse an den Mündungen untersucht wurde. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung einiger Trinkwässer.

Das Ziel des Projektes bestand neben der Entwicklung einer effizienten Anreicherungs- und Messmethode in der Verbesserung der Datenbasis für die deutschen Gewässer am Beispiel des Rheins und seiner Nebenflüsse. Gleichzeitig sollten die generierten Werte mit internationalen PFT-Grundbelastungen anderer Gewässer bzw. Trinkwässer verglichen werden.

1.3. Material und Methoden

1.3.1. Allgemeines

Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, leistungsfähige und nachweisempfindliche Multimethoden zur simultanen Bestimmung diverser ausgewählter umweltrelevanter Klassen von Spurenstoffen in unterschiedlichen Wassermatrizes zu entwickeln (Gruppe A: antibiotisch wirkende Pharmaka, Gruppe B: perfluorierte Tenside).

Aufgrund der zum Teil sehr komplexen molekularen Struktur der Zielanalyten, der relativ hohen Molekülmassen und der häufig auftretenden Thermolabilität der Analyten (Stoffgruppe A: Antibiotika) war es notwendig, flüssigchromatographische Verfahren (HPLC) zur Auftrennung der Analyten in ihrer Gesamtheit zu verwenden; einige Untergruppen der zu untersuchenden Substanzen lassen sich demgegenüber auch gaschromatographisch untersuchen (Tetracycline, Sulfonamide, Perfluorierte Carbonsäuren nach Derivatisierung).

Die massenspektrometrische Detektion mittels eines Triple-Quadrupol-Systems API 2000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) war Voraussetzung für den selektiven, spezifischen Nachweis der Substanzen aufgrund der beinahe durchgängig fehlenden Chromophore (Ausnahme: Tetracycline), die den eventuellen Einsatz eines UV-Detektors zumindest für möglich hätten erscheinen lassen.

Zum Erreichen der erforderlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, sowie zur Aufreinigung der Proben war eine Festphasenanreicherung (SPE) notwendig.

1.3.2. Standardsubstanzen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem gezielten Nachweis bekannter Substanzen. Zur Entwicklung der massenspektrometrischen Detektion im leistungsstarken MRM-Modus des Massenspektrometers mussten die zu untersuchenden Substanzen nach Möglichkeit als zertifizierte Reinstoffe im Fachhandel zu beziehen sein.

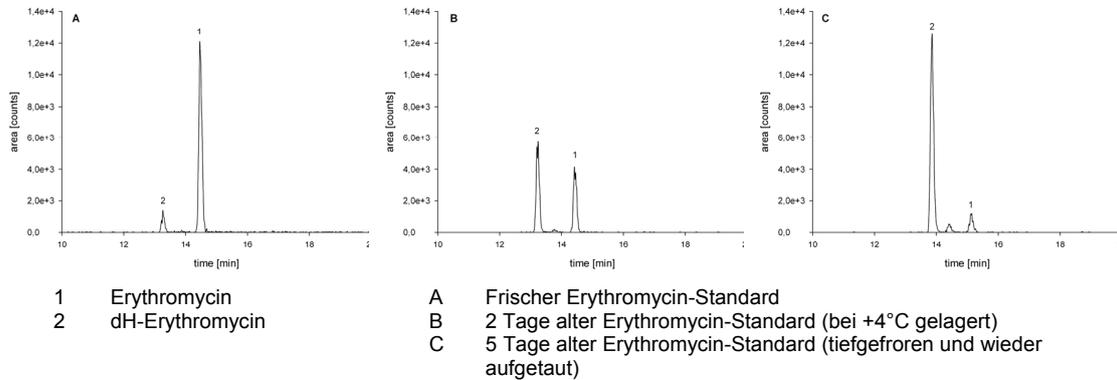
Aus diesen Substanzen wurden unter Berücksichtigung des Reinheitsgrades Standardlösungen mit einer Konzentration von 1000 mg/L angesetzt, aus denen nachfolgend Optimierungslösungen für das Massenspektrometer und Mischstandards verschiedener Konzentrationsniveaus angesetzt wurden. Der Ansatz der 1000 mg/L-Lösungen erfolgte für die Antibiotika in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (2+1), um sehr stabile Methanol-Substanz-Addukte der Penicilline zu verhindern, die bei der Ionisierung im Massenspektrometer stören [Straub & Voyksner 1993].

Die perfluorierten Verbindungen wurden in Methanol gelöst. Die Lagerung erfolgte für die Antibiotika bei -18°C und für die perfluorierten Verbindungen bei +4°C.

Als Besonderheit ist zu vermerken, dass die Lösung des Erythromycin einem künstlichen Alterungsprozess unterworfen wurde, indem die frische Lösung mit Ameisensäure versetzt, einige Zeit bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann zur Trockne in einem Stickstoffstrom eingengt und letztlich mit dem Acetonitril-Wasser-Gemisch neu aufgefüllt wurde. Diese Prozedur führte zur Bildung des dehydrato-Erythromycin (dH-Erythromycin), das auch bei Aufbereitungsschritten wie der verwendeten Festphasen-Extraktion entsteht (Abbildung 1.7). Somit konnte eine Identifizierung und Quantifizierung des Erythromycin in extrahierten Proben gewährleistet werden.

Abbildung 1.7: Bildung von dH-Erythromycin aus Erythromycin im Verlauf der Alterung der Standardlösung

Alterungsverhalten Erythromycin (Standard 10 µg/L)



Zur genauen Quantifizierung in der LC-MS sind isotoopenmarkierte Zielsubstanzen als interne Standards von großem Vorteil, da sie, schon am Anfang der Probenaufarbeitung zugesetzt, Fehler in der Probenextraktion und Effekte bei der Ionisierung (Matrixunterdrückung) für die quantitative Auswertung nivellieren können. Für die Antibiotika standen keine akzeptablen isotoopenmarkierten Standards käuflich zur Verfügung, aus finanziellen Gründen wurde auch auf eine Auftrags-synthese zumindest eines internen Standards verzichtet.

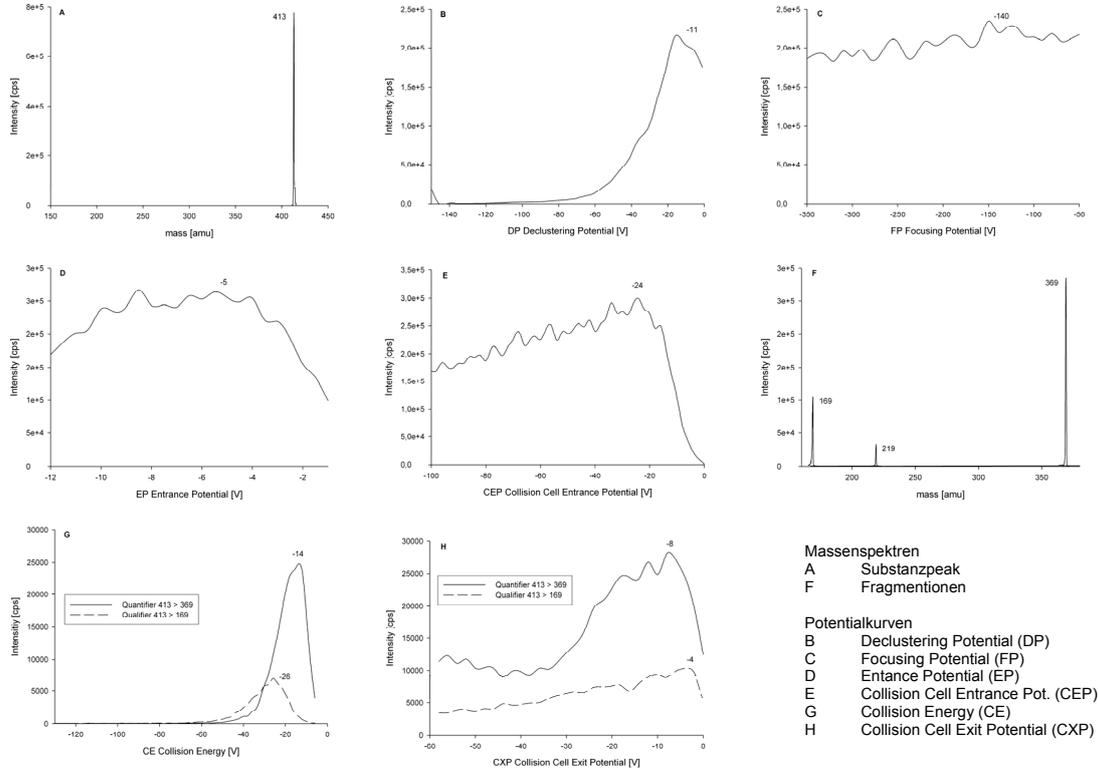
Im Bereich der perfluorierten Verbindungen standen zunächst ¹³C-markierte Formen für PFOA und PFOS zur Verfügung. Derzeit sind auch weitere perfluorierte Verbindungen als ¹³C-markierte und ¹⁸O-markierte Varianten auf dem Markt.

1.3.3. Entwicklung der massenspektrometrischen Detektion / Optimierung

Zur Ermittlung substanzspezifischer Massenübergänge und der Optimierung der zugehörigen substanzspezifischen Geräteparameter wurden aus den 1000 mg/L-Stammlösungen Optimierungslösungen mit einem Substanzgehalt von ca. 1 mg/L angesetzt. Für die Antibiotika erfolgte der Ansatz in einem Wasser-Acetonitril-Ameisensäure-Gemisch (50/50/1, v/v/v), um die Bildung positiv geladener (M+H)⁺-Ionen zu unterstützen. Die perfluorierten Tenside wurden in einem säurefreien Wasser-Methanol-Gemisch (50/50, v/v) angesetzt, um die Bildung negativ geladener (M-H)⁻-Ionen nicht zu unterdrücken. Diese Lösungen wurden mit Hilfe einer Spritzenpumpe (10 µL/min) kontinuierlich der ESI-Quelle zugeführt. Um eine maximale Intensität des Quasimolekülpeaks (M+H⁺ oder M-H⁻) in der Ionenoptik des Interface und im Quadrupol 1 zu erreichen, wurden die Maxima der Signalintensitäten für die variablen Potentiale (DP, FP, EP, CEP) über den jeweils gerätetechnisch möglichen Bereich ermittelt. Anschließend wurde in der Kollisionszelle Q2 durch den Zusammenstoß der Substanzen mit definierten Mengen an Stickstoffmolekülen das mögliche Spektrum an Fragmentationen bestimmt. Für jeden dieser Massenübergänge aus Substanz- und Fragmentation wurde abschließend durch Optimierung der Kollisionsenergie CE und des Potentials CXP anhand ihrer Potentialkurven die Ausbeute an Fragmentationen maximiert. Beispielhaft sind die Massenspektren (Substanzion und Fragmentationen) und die Potentialkurven für die Optimierung der Perfluorooctansäure dargestellt (Abbildung 1.8).

Abbildung 1.8: Optimierungsschritte der MS-Parameter für PFOA

Optimierungsschritte der substanzspezifischen MS-Parameter am Beispiel der Perfluoroctansäure (PFOA)



Diese Vorgehensweise wurde für jede Substanz durchgeführt. Für die Multimethode wurden die beiden jeweils intensivsten Massenübergänge gewählt, soweit mehr als ein Fragment ermittelt werden konnte. Der Massenübergang des ausbeutestärksten Fragments diente dabei der Quantifizierung (Quantifier), der zweite Massenübergang als zusätzliche Identifizierungshilfe (Qualifier). Aufgrund der großen Anzahl der zu bestimmenden antibiotisch wirkenden Substanzen wurde für die Multimethode auf einen zweiten Massenübergang verzichtet. Nachfolgend sind die optimierten Werte für die Antibiotika und perfluorierten Tenside tabellarisch dargestellt (Tabelle 1.13 und Tabelle 1.14).

Tabelle 1.13: Optimierte substanzspezifische MS-Parameter (Antibiotika)

Substanz	Q1 mass [amu]	Q3 mass [amu]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
Amoxicillin	365,9	114,1	10	380	10	18	30	4
Ampicillin	349,9	106,0	36	380	9	16	25	1
Benzylpenicillin	334,9	159,9	36	380	10	16	20	3
Cloxacillin	436,0	160,0	60	380	10	22	21	3
Dicloxacillin	469,9	159,9	55	380	10	23	21	2
Flucloxacillin	453,9	159,9	60	380	10	24	23	2
Methicillin	381,0	165,1	16	380	10	18	27	2
Mezlocillin	539,9	296,1	70	380	10	26	31	6

Tabelle 1.13: Optimierte substanzspezifische MS-Parameter (Antibiotika) (Fortsetzung)

Substanz	Q1 mass [amu]	Q3 mass [amu]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
Nafcillin	415,0	198,9	46	380	10	20	21	3
Oxacillin	402,0	159,9	55	380	10	18	17	2
Phenoxymethylpenicillin	518,1	143,1	65	380	10	26	33	2
Piperacillin	350,9	160,1	55	380	10	17	15	2
Azithromycin	375,3	83,2	14	380	10	20	37	2
Clarithromycin	748,4	158,2	60	380	10	36	41	2
Clindamycin	425,0	126,3	55	380	10	20	39	1
dh-Erythromycin	716,4	158,2	54	380	10	34	42	2
Roxithromycin	837,2	158,1	46	380	10	36	49	1
Spiramycin	422,4	174,2	14	380	10	20	29	2
Tylosin	916,2	174,2	110	380	10	45	53	2
Vancomycin	725,4	143,9	45	380	10	34	24	2
Trimethoprim	291,0	230,2	60	380	10	16	35	4
Sulfadimidin	279,0	186,1	26	380	10	14	25	3
Sulfamethoxazol	253,9	156,0	33	380	10	14	23	2
Ciprofloxacin	332,0	288,1	55	380	10	16	27	5
Ofloxacin	362,0	318,1	55	380	10	17	29	6
Chlortetracyclin	479,0	443,9	18	380	10	23	29	9
Doxycyclin	445,0	428,0	20	380	9	20	29	9
Oxytetracyclin	461,0	426,0	16	380	9	22	29	9
Tetracyclin	445,0	410,2	15	380	9	22	30	9

Tabelle 1.14: Optimierte substanzspezifische MS-Parameter (Perfluorierte Tenside)

Substanz	Q1 mass [amu]	Q3 mass [amu]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
PFBA	213,0	169,1 -	-11	-60	-6	-16	-12 -	-6 -
PFPeA	263,0	219,0 -	-11	-70	-6	-16	-12 -	-6 -
PFHxA	313,0	269,1 119,0	-11	-60	-5	-18	-12 -26	-6 -18
PFHpA	363,1	319,0 169,1	-11	-70	-4	-26	-14 -24	-8 -4
PFOA	413,0	369,1 169,1	-11	-140	-5	-24	-14 -26	-8 -4
PFNA	463,0	419,0 219,1	-11	-80	-6	-28	-16 -24	-10 -4
PFDA	513,1	469,1 219,0	-11	-50	-7	-32	-16 -26	-12 -6
PFUnDA	563,1	519,1 219,0	-11	-130	-6	-32	-18 -30	-12 -4

Tabelle 1.14: Optimierte substanzspezifische MS-Parameter (Perfluorierte Tenside) (Fortsetzung)

Substanz	Q1 mass [amu]	Q3 mass [amu]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
PFDODA	613,1	569,1 169,1	-11	-120	-7	-42	-22 -40	-10 -8
PFBS	299,0	80,0 99,0	-31	-180	-11	-16	-54 -44	-10 -12
PFHxS	399,0	80,1 99,0	-31	-230	-10	-22	-78 -54	-10 -10
PFOS	499,1	80,0 99,0	-31	-190	-11	-26	-92 -60	-8 -10
¹³ C ₄ -PFOA	416,9	372,1 168,9	-21	-280	-4	-26	-16 -26	-8 -4
¹³ C ₄ -PFOS	502,9	80,1 99,0	-76	-290	-9	-30	-82 -60	-1 -6

Nach der Optimierung der substanzspezifischen MS-Parameter wurde aus den ermittelten Werten eine Multidetektionsmethode mit allen Massenübergängen zusammengestellt, die nacheinander mit einer Zykluszeit von etwa 1 Sekunde gemessen werden konnten. Mit dieser vorläufigen Methode wurden durch Fließinjektion eines Mischstandards (jeweils 29 Antibiotika und 12 perfluorierte Tenside plus 2 interne Standards) in einen HPLC-Eluenten (keine Säule; Fließgeschwindigkeit 0,2 mL/min; Wasser-Acetonitril, 50/50, v/v) die nicht-substanzspezifischen MS-Parameter für eine maximale Ionenausbeute optimiert. Unter anderem ergaben sich für die Sprüh- und Trocknungsgase, sowie die Sprühkapillarspannung und Trocknungstemperatur folgende Werte (Tabelle 1.15 und Tabelle 1.16):

Tabelle 1.15: MS-Bedingungen Antibiotika

MS-Bedingungen Antibiotika	
Duration	50 mins
Cycle Time	1,050 secs
# Cycles	2858
Period Delay	10 mins
Scan Mode	None
Scan Type	Positive MRM
Resolution Q1	UNIT
Resolution Q2	UNIT
Intensity Thres.	0,00cps
Smart Settling	Off
Settling Time	0,00 ms
MR Pause	5,00 ms
MCA	None
Curtain Gas	25 Psi
Ion Spray Voltage	5500 V
Temperature	375 °C
Ion Source Gas 1	40 Psi
Ion Source Gas 2	80 Psi
Interface Heater	On
Collision Gas	2
Step Size	0,00 amu

Tabelle 1.16: MS-Bedingungen Perfluorierte Tenside

MS-Bedingungen PFT	
Duration	30 mins
Cycle Time	1,560 secs
# Cycles	1154
Period Delay	0 mins
Scan Mode	None
Scan Type	Negative MRM
Resolution Q1	UNIT
Resolution Q2	UNIT
Intensity Thres.	0,00cps
Smart Settling	Off
Settling Time	0,00 ms
MR Pause	5,00 ms
MCA	None
Curtain Gas	40 Psi
Ion Spray Voltage	-1500 V
Temperature	400 °C
Ion Source Gas 1	60 Psi
Ion Source Gas 2	70 Psi
Interface Heater	On
Collision Gas	12
Step Size	0,00 amu

1.3.4. Entwicklung der chromatographischen Trennmethode / Optimierung der Trennung

Die Trennung der Analyten erfolgte apparativ auf einem Komplettsystem der 1100er Serie (Agilent Technologies, Waldbronn). Die zum Teil hohe Polarität der Analyten machte es notwendig, dass für die Antibiotika die chromatographische Trennung unter 100% wässrigen Bedingungen gestartet werden musste. Daher konnten klassische C18-Säulen nicht eingesetzt werden. Die Entwicklung der Antibiotika-LC erfolgte daher auf einer C18-Phase mit einem speziellen polaren Endcapping (SYNERGI Hydro-RP, Phenomenex), die sich dadurch auszeichnet, dass sie eine starke Retention für hydrophobe und polare Verbindungen aufweist. Andererseits ist sie stabil in 100% wässriger Phase. Die Dimension der Säule, speziell der Innendurchmesser, wurde so gewählt, dass die Chromatographie mit einer Flussrate von 0,2 – 0,3 mL/min durchgeführt werden konnte, damit der von der Säule kommende Eluentenstrom möglichst komplett (ohne Split) für eine maximale Nachweisempfindlichkeit dem Massenspektrometer zugeführt werden konnte. Für eine optimale positive Ionisierung und zur Verbesserung der Peakformen wurde beiden Eluenten 0,1% Ameisensäure zugesetzt. Als mobile organische Phase wurde Acetonitril anstelle von Methanol gewählt, um die Bildung der sehr stabilen Methanol-Addukte der Penicilline bei der Ionisierung zu verhindern. Die Gradientenelution wurde auf eine weitestgehend vollständige Trennung aller Analyten bei akzeptablen Analysenzeiten optimiert. Inklusive Äquilibrationszeit dauerte ein chromatographischer Lauf 60 Minuten. Die LC-Bedingungen sind in Tabelle 1.17 zusammengefasst.

Tabelle 1.17: HPLC-Bedingungen Antibiotika

HPLC-Bedingungen Antibiotika	
Instrument	Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Säule	SYNERGI Hydro-RP 2,0 x 150 mm, 4 µm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Mobile Phase	A: 0,1% Ameisensäure (Wasser) B: 0,1% Ameisensäure (Acetonitril)
Gradient	0 min 0% B 2 min 0% B 30 min 95% B 35 min 95% B
Flussrate	0,2 mL/min
Säulenofen- Temperatur	30 °C
Injektions- Volumen	10 µL

Tabelle 1.18: HPLC-Bedingungen Perfluorierte Tenside

HPLC-Bedingungen PFT	
Instrument	Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Säule	NUCLEODUR SPHINX-RP 2,0 x 125 mm, 3 µm (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
Mobile Phase	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ (Wasser:Methanol, 75:25, v:v) B: 10 mM CH ₃ COONH ₄ (Acetonitril:Methanol, 75:25, v:v)
Gradient	0 min 10% B 3 min 30% B 11 min 55% B 15 min 70% B
Flussrate	0,3 mL/min
Säulenofen- Temperatur	50 °C
Injektions- Volumen	50 µL

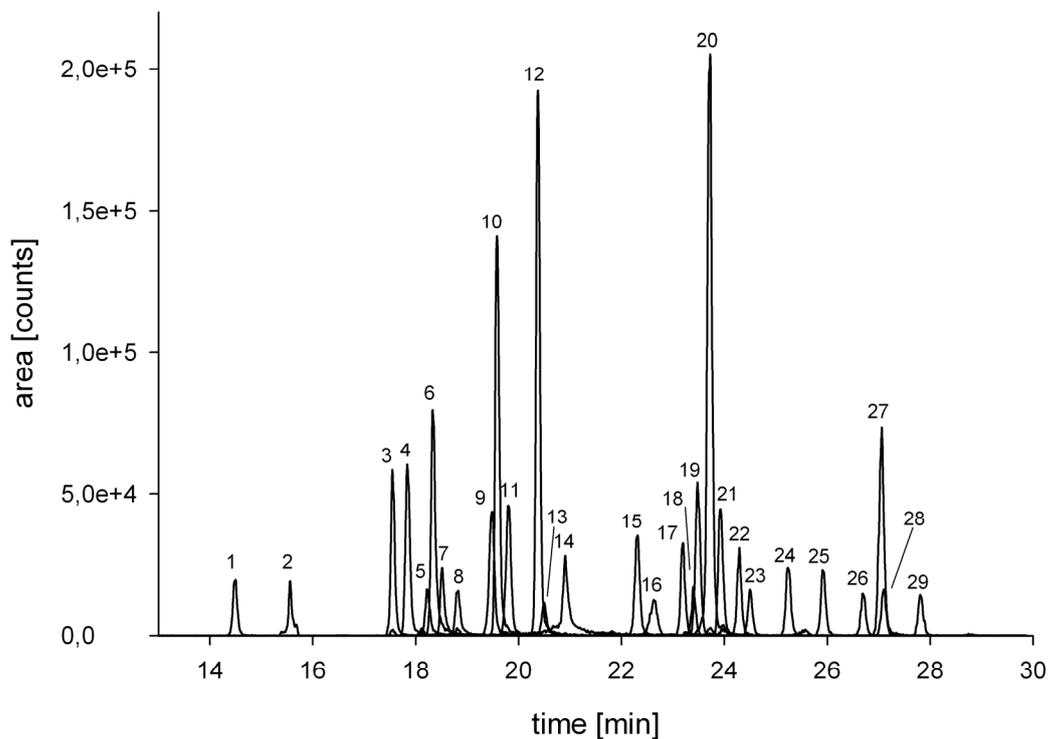
Für die perfluorierten Tenside gelten aufgrund ihrer Polarität ähnliche Vorbedingungen. Als Trennsäule zeigte sich eine C18-Säule als optimal, bei der Octadecylgruppen und kurzkettige Phenylreste in einem ausgewogenen Verhältnis stehen (NUCLEODUR Sphinx RP, Macherey-Nagel). Die Kombination aus klassischen hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen zeigte eine außergewöhnliche Selektivität gegenüber den perfluorierten Tensiden. Für eine optimale

Peakform und Trennung der Analyten wurde den Eluenten ein LC-MS-tauglicher flüchtiger Puffer zugesetzt (Ammoniumacetat), der seinerseits die erforderliche negative Ionisierung der Analyten im MS nicht negativ beeinflusste, wie es ein Säurezusatz in diesem Fall zur Folge hätte. Die Trennung der Analyten erfolgte bei 50°C, um die Viskosität des Eluenten und damit den Rückdruck der Säule zwecks mechanischer Entlastung des chromatographischen Systems (Pumpenkopfdichtungen) zu verringern. Die Gesamtanalysenzeit inklusive Äquilibration belief sich auf 35 Minuten (LC-Bedingungen in Tabelle 1.18).

Die nachfolgenden Abbildungen geben beispielhaft die Chromatogramme eines 100 µ/L Antibiotika-Mischstandards (Abb. 1.9) und eines 10 µg/L PFT-Mischstandards unter Angabe der Retentionszeiten (RT) der einzelnen Analyten wieder (Abb. 1.10).

Abbildung 1.9: Standard-Chromatogramm 29 Antibiotika 100 µg/L

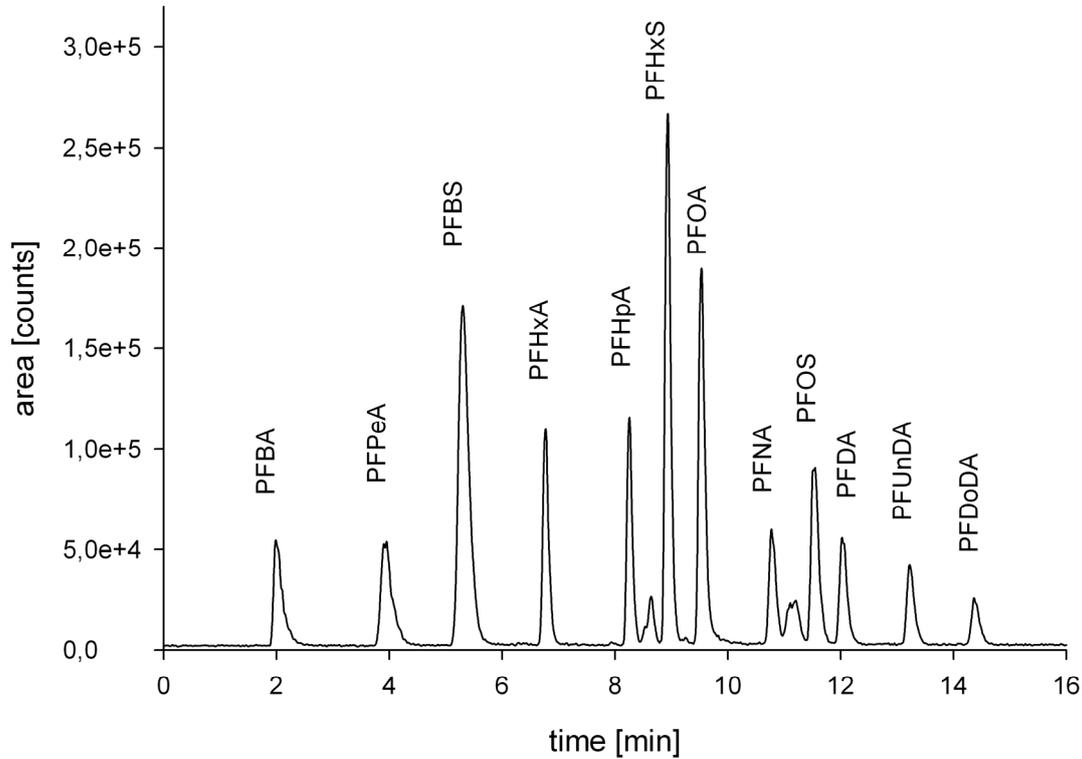
Chromatogramm 29 Antibiotika (Standard 100 µg/L)



Nr.	RT [min]	Substanz	Nr.	RT [min]	Substanz	Nr.	RT [min]	Substanz
1	14,5	Amoxicillin	11	19,8	Sulfadimidin	21	23,9	Roxithromycin
2	15,6	Vancomycin (x100)	12	20,4	Clindamycin	22	24,3	Benzyloxacillin
3	17,6	Ampicillin	13	20,5	Chlortetracyclin	23	24,5	Mezlocillin
4	17,8	Trimethoprim	14	20,9	Doxycyclin	24	25,4	Piperacillin
5	18,2	Oxytetracyclin	15	22,3	Sulfamethoxazol	25	25,9	Oxacillin
6	18,3	Ofloxacin	16	22,6	Tylosin	26	26,7	Cloxacillin
7	18,5	Ciprofloxacin	17	23,2	dH-Erythromycin	27	27,1	Nafcillin
8	18,8	Tetracyclin	18	23,4	Phenoxymethylpenicillin	28	27,1	Flucloxacillin
9	19,5	Spiramycin	19	23,5	Methicillin	29	27,8	Dicloxacillin
10	19,6	Azithromycin	20	23,7	Clarithromycin			

Abbildung 1.10: Standard-Chromatogramm 12 Perfluorierte Tenside 10 µg/L

Chromatogramm Perfluorierte Tenside (Standard 10 µg/L) NUCLEODUR SPHINX



Nr.	RT [min]	Substanz	Nr.	RT [min]	Substanz	Nr.	RT [min]	Substanz
1	2,0	PFBA	5	8,2	PFHpA	9	11,6	PFOS
2	4,0	PFPeA	6	8,9	PFHxS	10	12,1	PFDA
3	5,3	PFBS	7	9,5	PFOA	11	13,2	PFUnDA
4	6,8	PFHxA	8	10,8	PFNA	12	14,4	PFDoDA

1.3.5. Entwicklung der Extraktions- und Anreicherungsmethode

Die Anreicherung und Aufreinigung der Analyten erfolgte durch Festphasenextraktion (SPE). Dabei erwiesen sich modifizierte Polymerphasen aufgrund ihrer hohen Kapazität und besonderen Selektivität für ein breites Spektrum an polaren und unpolaren Analyten traditionellen, silikabasierten Materialien gegenüber im Vorteil. So ließ sich zum Beispiel für ganze Substanzgruppen (Makrolide, Fluorchinolone, Tetracycline) bei den Antibiotika auf einer Octadecylphase bei unterschiedlichen pH-Werten keine Anreicherung erzielen.

Ausgehend von der Nachweisempfindlichkeit im Massenspektrometer nach einer LC-Trennung der Analyten wurde für die Antibiotika ein Anreicherungsfaktor von 1000 und für die perfluorierten Tenside ein Faktor von 200 benötigt, um Bestimmungsgrenzen im unteren ng/L-Bereich zu ermöglichen. Aus Gründen der Zeitersparnis wurden jeweils 500 mL bzw. 100 mL Probevolumen eingesetzt, da die daraus erhaltene Messlösung von 500 µL ein ausreichendes Volumen auch für Mehrfachbestimmungen darstellte.

Für die Antibiotika erwies sich nachfolgend dargestellte Anreicherungsmethode als geeignete Kompromisslösung, um für alle untersuchten Antibiotika über den gesamten Bereich ihrer doch

sehr unterschiedlichen chemischen Struktur und Eigenschaften ein hinsichtlich der Wiederfindungsraten optimiertes Verfahren anbieten zu können (Tabelle 1.19).

Tabelle 1.19: Verfahrensschema SPE-Anreicherung Antibiotika

SPE-Anreicherung Antibiotika	
Probenvorbereitung	<ul style="list-style-type: none"> - 500 mL Probe werden (bei Bedarf) über einen Glasfaserfilter filtriert. (Abwasserproben müssen zuvor zusätzlich in einer Vakuum-Filtrationsapparatur von groben Verunreinigungen gereinigt werden) - Zugabe von 200 mg EDTA-Dikaliumsalz - pH-Wert-Einstellung mit H₂SO₄ (1N) oder NaOH (1N) auf pH 4,0 ± 0,1
SPE-Kartusche	<ul style="list-style-type: none"> - SDB-2, 6 mL, 200 mg (Baker, Deventer, Niederlande) - OASIS HLB, 6 mL, 200 mg (Waters, Eschborn, Deutschland)
Konditionierung	<ul style="list-style-type: none"> - Die Kartuschen werden getrennt konditioniert - 1 Säulenfüllung Methanol - 3 Säulenfüllungen MilliQ-Wasser pH 4,0 - Nach dem Konditionieren wird die SDB-2-Kartusche vollständig mit MilliQ-Wasser pH 4,0 gefüllt, mit einem Säulenadapter verschlossen, auf den die OASIS-HLB-Kartusche gesteckt wird.
Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> - Die Extraktion erfolgt mit Hilfe einer mehrkanäligen Schlauchpumpe durch Pumpen der Probenlösung durch die Doppelkartusche mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 400 mL/h (Extraktionszeit ca. 1¼ Stunden) - Bis auf den Pumpenschlauch in der Pumpe sollten alle weiteren Schläuche aus Teflon bestehen
Waschen	<ul style="list-style-type: none"> - 2 Säulenfüllungen MilliQ-Wasser pH 4,0 - Die Doppelkartusche wird anschließend getrennt
Trocknen	<ul style="list-style-type: none"> - Die OASIS-HLB-Kartusche wird 60 Minuten im intensiven Stickstoffstrom getrocknet - Die SDB-2-Kartusche wird mit Hilfe von Vakuum kurz leer gesaugt, aber keinesfalls getrocknet
Elution	<ul style="list-style-type: none"> - OASIS-HLB: 4 x 1 mL Methanol - SDB-2: 4 x 1 mL Methanol/Ameisensäure (100/1, v/v)
Umlösen	<ul style="list-style-type: none"> - Das SDB-2-Eluat wird im Wasserbad bei 35°C im schwachen Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. - Das OASIS-HLB-Eluat wird unter gleichen Bedingungen auf ca. 1 mL reduziert und quantitativ zum SDB-2-Rückstand überführt. - Der vereinigte Extrakt wird im Stickstoffstrom bis eben zur Trockne eingengt und in 0,5 mL Wasser/Acetonitril (95/5, v/v) aufgenommen. - Bei Bedarf wird der umgelöste Extrakt über einen Einmal-Glasfaserfilter gereinigt - Der Extrakt wird messfertig in ein HPLC-Vial abgefüllt.

Mit dem SPE-Material OASIS HLB (Waters, Eschborn) konnten alle untersuchten Antibiotika bis auf die beiden Aminopenicilline Amoxicillin und Ampicillin angereichert werden. Zur Aufnahme dieser beiden Substanzen in das Untersuchungsspektrum war es notwendig, das Eluat der OASIS-Kartusche während der Anreicherung aufzufangen und einer zusätzlichen Anreicherung auf einer SDB-2-Kartusche (Baker, Deventer, Niederlande) zuzuführen. Im einfachsten Fall wurden dazu beide Kartuschen über einen Adapter verbunden, wobei die Anreicherung aber immer zuerst auf der OASIS-Kartusche erfolgen musste.

Bei der Verwendung dieser Doppelkartusche war es notwendig und arbeitserleichternd, das Probenvolumen durch die Extraktionskartuschen zu pumpen, da der Einsatz von Vakuum beim Durchsaugen des Probenvolumens durch die Kartuschen dazu führte, dass die untere der beiden Kartuschen im Laufe der Anreicherung leer gesaugt wurde mit der Folge unreproduzierbarer

Wiederfindungsraten. Hier konnten auch Abdichtungsmaßnahmen im Kartuschensystem keine Abhilfe schaffen.

Als gut geeignet für den Pumpvorgang erwiesen sich mehrkanalige Schlauchpumpen, bei denen über Anpresshebel der Pumpdruck jedes einzelnen Kanals individuell geregelt werden konnte. Durch die Wahl eines möglichst inerten Pumpenschlauchmaterials hinsichtlich eventueller Adsorptionen von Analyten und durch die Verwendung von Teflonschläuchen außerhalb des Pumpenkörpers konnten Adsorptionsverluste am Silikonmaterial des Pumpenschlauchs substanzspezifisch minimiert bzw. verhindert werden.

Die Trocknung der OASIS-Kartusche verbesserte die Wiederfindung der hier angereicherten Antibiotika, während eine Trocknung der SDB-2-Kartusche sich negativ auf die Elution der Aminopenicilline auswirkte.

Zur Elution der beiden Aminopenicilline von der SDB-2-Kartusche musste die Elutionskraft des Methanols durch Zugabe von 1% (v/v) Ameisensäure erhöht werden. Da das Benzylpenicillin im OASIS-Eluat säureempfindlich reagiert, musste der SDB-2-Extrakt vor der Vereinigung beider Eluate vollständig zur Trockne eingedunstet werden.

Das abschließende Umlösen des Gesamtextraktes war erforderlich, da eine große Anzahl der hier untersuchten Penicilline sehr stabile Methanol-Addukte in der Gasphase bilden, die bei der massenspektrometrischen Detektion am API 2000 nicht zerstört werden konnten, so dass die Quantifizierung behindert wurde.

Durch eine zusätzliche Zugabe von EDTA zum Probenvolumen vor der Extraktion ergaben sich höhere Wiederfindungsraten für Tetracycline und Fluorchinolone, zum anderen verbesserte sich die Reproduzierbarkeit der Wiederfindungsraten über das gesamte Spektrum der untersuchten Antibiotika.

Zur Anreicherung der perfluorierten Carbon- und Sulfonsäuren erwies sich das SPE-Material strata-X (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) als geeignet, den großen Polaritätsbereich der Homologen von den jeweiligen polaren Butansäuren bis zu den unpolaren länger-kettigen Säuren abzudecken. Entscheidend für die Wiederfindungen war der pH-Wert der Probenlösungen: Bei einem in etwa neutralen pH-Wert ließen sich für alle untersuchten Substanzen bis auf die Perfluorbutansäure akzeptable Raten ermitteln, für eine spezifische Untersuchung auf PFBA sollte dagegen der pH-Wert auf ≤ 2 abgesenkt werden, wobei jedoch im Zuge dieser pH-Wert-Absenkung geringere Wiederfindungsraten für alle anderen Analyten, insbesondere die länger-kettigen Verbindungen in Kauf genommen werden mussten (Tabelle 1.20).

Tabelle 1.20: Ausgewählte Wiederfindungen in Abhängigkeit vom pH-Wert (jeweils 2-fach-Bestimmungen)

pH-Wert	PFBA	PFOA	PFOS
2	98 %	75 %	41 %
4	29 %	96 %	65 %
7	11 %	100 %	98 %

Da das Augenmerk jedoch auf die Leitsubstanzen PFOA und PFOS gerichtet war ergab sich nachfolgend dargestelltes Anreicherungsschema (Tabelle 1.21):

Tabelle 1.21: Verfahrensschema SPE-Anreicherung Perfluorierte Tenside

SPE-Anreicherung Perfluorierte Tenside	
Probenvorbereitung	<ul style="list-style-type: none">- 100 mL Probe werden unfiltriert in einen 100 mL-Messkolben überführt (zweimaliges vorhergehendes Spülen des Kolbens mit der Probenlösung).- Die Probe wird bei Bedarf mit H₂SO₄ (1N) oder NaOH (1N) auf pH 7-8 eingestellt.- Die Probe wird mit 20 µL einer 0,5 mg/L-Lösung der ¹³C-markierten internen Standards versetzt, so dass die Konzentration in der Probe 100 ng/L beträgt.
SPE-Kartusche	<ul style="list-style-type: none">- Strata-X, 6 mL, 200 mg (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Konditionierung	<ul style="list-style-type: none">- 1 Säulenfüllung Acetonitril/Aceton (50/50, v/v)- 1 Säulenfüllung MilliQ-Wasser pH 8,0- Nach dem Konditionieren wird die Strata-X-Kartusche vollständig mit MilliQ-Wasser pH 8,0 gefüllt und mit einem Säulenadapter verschlossen, auf den ein 70 mL-Reservoir gesteckt wird.
Extraktion	<ul style="list-style-type: none">- Die Extraktion erfolgt mit Hilfe einer mehrkanäligen Schlauchpumpe durch Saugen der Probenlösung durch die Kartusche mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 2,5 mL/min (Extraktionszeit ca. 40 Minuten)- Das Reservoir muss während der Extraktion einmal nachgefüllt werden.
Waschen	<ul style="list-style-type: none">- 1 Säulenfüllung MilliQ-Wasser pH 8,0
Trocknen	<ul style="list-style-type: none">- Die Strata-X-Kartusche wird 30 Minuten im intensiven Stickstoffstrom getrocknet
Elution	<ul style="list-style-type: none">- 5 x 2 mL Acetonitril/Aceton (50/50, v/v)
Umlösen	<ul style="list-style-type: none">- Das Eluat wird im Wasserbad bei 35°C im schwachen Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt und in 0,5 mL LC-Eluent A aufgenommen.- Der Extrakt wird messfertig in ein HPLC-Vial abgefüllt.

Im Laufe der Untersuchungen unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Methode ergab sich Ende des Jahres 2006 ein Interesse daran, ebenfalls die kurzkettigen perfluorierten Tenside, insbesondere die Perfluorbutansäure mit guten Extraktionsausbeuten zu erfassen. Daher wurde im Jahr 2007 im Auftrag des Landes Nordrhein-Westfalen in Zusammenarbeit mit dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV-NRW) eine Methodenumstellung und -optimierung bei der Festphasenextraktion vorgenommen (Anhang A).

1.3.6. Kenndaten der Methode

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde Trinkwasser (Antibiotika) bzw. VE-Wasser (perfluorierte Tenside) in Mehrfachansätzen mit den jeweiligen Mischstandardlösungen dotiert und den Festphasenextraktionsvorschriften entsprechend aufgearbeitet.

Für die Antibiotika wurden diese Dotierungsversuche auf verschiedenen Konzentrationsniveaus durchgeführt. Die Mehrfachbestimmungen ergaben folgende Ergebnisse (Tabelle 1.22):

Tabelle 1.22: Wiederfindungsraten Antibiotika

Substanz	200 ng/L		40 ng/L		10 ng/L		1 ng/L	
	6 fach- Bestimmung		6 fach- Bestimmung		6 fach- Bestimmung		4 fach- Bestimmung	
	WDF [%]	±						
Amoxicillin	71	4	44	5	37	8	< NG	-
Ampicillin	65	5	44	3	42	4	48	8
Benzylpenicillin	78	6	73	20	64	8	130	16
Cloxacillin	92	4	96	7	94	9	137	40
Dicloxacillin	106	7	92	4	90	10	123	22
Flucloxacillin	106	6	96	4	89	10	135	47
Methicillin	74	10	60	17	63	14	128	38
Mezlocillin	98	5	96	3	91	10	130	33
Nafcillin	86	4	73	9	70	8	103	6
Oxacillin	103	8	91	5	90	6	93	25
Phenoxymethylpenicillin	90	3	94	6	89	6	140	17
Piperacillin	90	3	97	4	83	4	126	32
Azithromycin	84	6	84	4	71	11	94	13
Clarithromycin	114	9	114	5	121	19	134	4
Clindamycin	87	8	73	9	83	28	103	11
dh-Erythromycin	112	7	75	3	108	15	109	22
Roxithromycin	132	14	105	6	117	6	121	10
Spiramycin	76	3	79	3	65	9	82	13
Tylosin	120	12	103	9	108	6	< NG	-
Vancomycin	91	5	109	17	65	13	< NG	-
Trimethoprim	117	8	112	4	120	10	177	32
Sulfadimidin	96	7	91	3	90	9	154	33
Sulfamethoxazol	99	5	90	4	104	6	203	34
Ciprofloxacin	70	4	63	8	61	14	< NG	-
Ofloxacin	71	3	61	4	56	8	67	27
Chlortetracyclin	101	4	95	6	75	7	< NG	-
Doxycyclin	98	2	85	6	63	12	< NG	-
Oxytetracyclin	109	5	89	4	77	4	< NG	-
Tetracyclin	94	5	90	8	78	20	< NG	-

Die Nachweisgrenzen (NG) der einzelnen Antibiotika wurden aus den entsprechenden Massenspuren anhand ihres Signal/Rauschverhältnisses abgeschätzt (NG: S/N = 3). Dabei wurde aus Gründen der Vereinfachung oft für einzelne Substanzgruppen eine einheitliche Nachweisgrenze definiert, die sich an dem S/N-Verhältnis des am unempfindlichsten nachweisbaren Analyten dieser Gruppe orientierte. Dieser Wert wurde mit einem Sicherheitsfaktor von 2 versehen sowie jeweils aufgerundet, um auch bei stark matrixbelasteten Proben verlässliche Aussagen treffen zu können. Die Bestimmungsgrenze (BG) ergab sich in der Regel aus dem aufgerundeten doppelten Wert der Nachweisgrenze (Tabelle 1.23).

Hintergrundbelastungen (Blindwerte) konnten nicht festgestellt werden.

Die Kalibrationskurven der einzelnen Antibiotika-Standards zeigten einen linearen Messbereich von 1 µg/L bis 500 µg/L (d.h. 1 ng/L bis 500 ng/L in wässrigen Proben bei einem Anreicherungsfaktor von 1000) [Färber et al. 2003].

Tabelle 1.23: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen Antibiotika

Substanz	BG	NG
	[ng/L]	[ng/L]
Amoxicillin	10	5
Ampicillin	10	5
Benzylpenicillin	10	5
Cloxacillin	10	5
Dicloxacillin	10	5
Flucloxacillin	10	5
Methicillin	10	5
Mezlocillin	10	5
Nafcillin	10	5
Oxacillin	10	5
Phenoxymethylpenicillin	10	5
Piperacillin	10	5
Azithromycin	5	2
Clarithromycin	2	1
Clindamycin	5	1
dh-Erythromycin	5	2
Roxithromycin	5	2
Spiramycin	5	2
Tylosin	5	2
Vancomycin	50	30
Trimethoprim	5	2
Sulfadimidin	5	2
Sulfamethoxazol	5	1
Ciprofloxacin	10	5
Ofloxacin	5	2
Chlortetracyclin	25	10
Doxycyclin	20	10
Oxytetracyclin	20	10
Tetracyclin	20	10

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten für die perfluorierten Tenside erfolgte auf einem Dotierungsniveau von 50 ng/L, das dem halben Grenzwert gemäß Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) für einzelne PBSM-Substanzen (PBSM: Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel) von 100 ng/L entspricht. Hinsichtlich der schlechten Rate für PFBA sei auf die Ausführungen zum pH-Wert im vorherigen Kapitel verwiesen. Eine Verbesserung der Extraktionsausbeute bei PFDoDA könnte durch eine Steigerung des Elutionsvolumens bewirkt werden, auf die jedoch aus Gründen des sparsamen Gebrauchs mit Lösemitteln verzichtet wurde (Tabelle 1.24).

Die Kalibrationskurven zeigten einen linearen Zusammenhang von 0,2 µg/L bis 40 µg/L (1 ng/L bis 200 ng/L in wässrigen Proben bei einem Anreicherungsfaktor von 200).

Hintergrundbelastungen beliefen sich über das gesamte Verfahren (Probenahme, Extraktion und LC-MS-Analyse) für einige Perfluorcarbonsäuren auf Werte von jeweils < 1 ng/L; Perfluor-sulfonsäuren konnten als Hintergrundbelastung nicht ausgemacht werden.

Die Bestimmungsgrenze wurde bei 2 ng/L definiert als zweitkleinster Wert der Kalibrationskurven aller Analyten.

Tabelle 1.24: Wiederfindungsraten perfluorierte Tenside

Substanz	50 ng/L	
	4 fach-Bestimmung	
	WDF [%]	±
PFBA	11	4
PFPeA	94	6
PFHxA	99	7
PFHpA	88	3
PFOA	100	4
PFNA	96	4
PFDA	86	5
PFUnDA	62	6
PFDoDA	33	3
PFBS	117	4
PFHxS	98	6
PFOS	98	8

1.3.7. Überprüfung der Methoden anhand von Laborvergleichsuntersuchungen

Im Rahmen der Qualitätssicherung wurden die entwickelten Methoden durch Teilnahme an Ringversuchen überprüft.

Die Beteiligung an zwei Ringversuchen des BLAC (Bund / Länderausschuss für Chemikaliensicherheit) 06/2000 und 07/2002 konnte erfolgreich bezüglich der darin untersuchten Antibiotika (Trimethoprim, Sulfamethoxazol, Erythromycin, Roxithromycin, Clarithromycin und Sulfadimidin) abgeschlossen werden. Insgesamt waren 4 bzw. 1 Probe(n) zu untersuchen (06/2000: Standardlösung, Oberflächenwasser dotiert, gereinigtes Abwasser, gereinigtes Abwasser dotiert; 07/2002: Oberflächenwasser aus Isarkanal dotiert).

Die Wahl des Analysenverfahrens war den Teilnehmern freigestellt, sofern eine untere Grenze des Arbeitsbereiches von 50 ng/L erreicht werden konnte, der praktische Arbeitsbereich lag zwischen 80 und 800 ng/L.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte im Anschluss auf der Basis robuster Methoden (Q-Methode, Huber-Schätzer), die Festlegung der Toleranzgrenzen über Z_u -Scores ($Z=2$). Die Berechnung der Z_u -Scores fand bei allen Parametern statt, auch wenn die Anzahl der Werte zur statistischen Auswertung zu gering war. Bei der Z_u -Score-Auswertung werden alle Labormittelwerte, auch die durch den Grubbs-Test als Ausreißer erkannten Werte, berücksichtigt. Die für die Berechnung notwendige Vergleichsstandardabweichung und der Gesamtmittelwert sind jedoch ausreißerbereinigt.

Der Z_u -Score-Auswertung liegt folgende Gleichung zu Grunde:

$$Z_u = \frac{(\text{Labormittelwert} - \text{Gesamtmittelwert})}{\text{Vergleichsstandardabweichung}}$$

Ein Ergebnis mit $|Z_u| \leq 2$ gilt als zufriedenstellend, d.h. der Ringversuch gilt als bestanden. Als zusätzliches Informationskriterium gilt ein Ergebnis mit $|Z_u| \leq 1$; solche besonders präzisen Werte werden als „Kernwerte“ bezeichnet und stellen ein gutes Ergebnis dar.

Die Ergebnisse der beiden Ringversuche sind nachfolgend dargestellt (Tabelle 1.25 bis 1.29). Der Referenzwert gibt dabei die Konzentration der Dotierung, der Sollwert den Mittelwert aller teilnehmenden Labore an.

Tabelle 1.25: Antibiotika-Ringversuch 06/2000 Probe 1 (Standardlösung)

Substanz	Einheit	Laborwert	Referenzwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore
Clarithromycin	µg/L	157,0	140,0	178,000	42,39%	- 0,337	5
Erythromycin	µg/L	104,0	150,0	198,666	44,41%	- 1,323	6
Roxithromycin	µg/L	275,0	300,0	340,000	36,55%	- 0,607	6
Sulfadimidin	µg/L	255,0	260,0	286,291	23,26%	- 0,517	4
Sulfamethoxazol	µg/L	207,0	190,0	238,308	64,49%	- 0,317	6
Trimethoprim	µg/L	121,0	90,0	86,014	85,15%	+ 0,353	7

Tabelle 1.26: Antibiotika-Ringversuch 06/2000 Probe 2 (dotiertes Oberflächenwasser)

Substanz	Einheit	Laborwert	Referenzwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore
Clarithromycin	ng/L	79,0	85,0	79,46	109,77%	- 0,013	5
Erythromycin	ng/L	59,0	110,0	100,100	108,42%	- 0,949	6
Roxithromycin	ng/L	190,0	225,0	168,926	40,40%	+ 0,242	6
Sulfadimidin	ng/L	130,0	100,0	119,500	18,57%	+ 0,426	4
Sulfamethoxazol	ng/L	123,0	130,0	133,167	55,00%	- 0,192	6
Trimethoprim	ng/L	73,0	60,0	59,135	36,97%	+ 0,506	7

Tabelle 1.27: Antibiotika-Ringversuch 06/2000 Probe 3 (gereinigtes Abwasser)

Substanz	Einheit	Laborwert	Referenzwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore
Clarithromycin	ng/L	95,0	-	65,880	50,53%	+ 0,664	5
Erythromycin	ng/L	246,0	-	199,800	95,53%	+ 0,178	5
Roxithromycin	ng/L	55,6	-	58,467	41,57%	- 0,142	6
Sulfadimidin	ng/L	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazol	ng/L	358,0	-	346,800	70,40%	+ 0,034	5
Trimethoprim	ng/L	198,0	-	174,882	12,48%	+ 0,989	6

Tabelle 1.28: Antibiotika-Ringversuch 06/2000 Probe 4 (dotiertes gereinigtes Abwasser)

Substanz	Einheit	Laborwert	Referenzwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore
Clarithromycin	ng/L	323,0	225,0	238,329	35,39%	+ 0,808	5
Erythromycin	ng/L	317,0	110,0	256,405	63,19%	+ 0,279	6
Roxithromycin	ng/L	439,0	495,0	508,167	113,66%	- 0,314	6
Sulfadimidin	ng/L	252,0	290,0	266,250	39,18%	- 0,161	4
Sulfamethoxazol	ng/L	414,0	240,0	463,200	50,79%	- 0,276	5
Trimethoprim	ng/L	334,0	110,0	211,857	61,15%	+ 0,701	7

Tabelle 1.29: Antibiotika-Ringversuch 07/2002 (dotiertes Oberflächenwasser - Isarkanal)

Substanz	Einheit	Laborwert	Referenzwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore
Clarithromycin	ng/L	338,0	510,0	469,674	34,02%	- 0,943	5
Erythromycin	ng/L	190,0	85,0	175,012	84,97%	+ 0,075	5
Roxithromycin	ng/L	224,0	260,0	317,016	44,81%	- 0,810	5
Sulfadimidin	ng/L	135,0	160,0	180,500	36,58%	- 0,799	6
Sulfamethoxazol	ng/L	272,0	375,0	300,714	50,56%	- 0,248	7
Trimethoprim	ng/L	86,4	80	92,546	23,50%	- 0,311	8

Alle abgegebenen Werte erfüllen das Ausschlusskriterium $|Z_{ij}| \leq 2$, damit sind die Laborvergleichsuntersuchungen für Antibiotika zu 100% bestanden. Bis auf einen Wert stellen alle Ergebnisse zusätzlich Kernwerte dar. Die hier vorgestellte Methode kann damit als leistungsfähiges Instrument zur präzisen Bestimmung von Antibiotika in unterschiedlichen wässrigen Matrices angesehen werden.

Aus aktuellem Anlass veranstaltete das Landesumweltamt NRW im August 2006 kurzfristig eine Laborvergleichsuntersuchung hinsichtlich der Bestimmung von PFOS und PFOA in einem Trink- und zwei Oberflächenwässern (4 teilnehmende Labore). Untersucht wurden undotierte Wasserproben, die Analysenmethode war freigestellt. Jede Probe wurde als Dreifachbestimmung aufgearbeitet. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl wurde keine weitergehende statistische Auswertung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt (Tabelle 1.30).

Tabelle 1.30: Laborvergleichsuntersuchung PFOA-PFOS 08/2006

Substanz	Einheit	Labormittelwert	Mittelwert aller abgegebenen Werte	Rel. Soll-Standardabweichung
PFOA (Probe 1)	ng/L	156,7	150,8	5,3%
PFOA (Probe 2)	ng/L	206,7	202,5	6,0%
PFOA (Probe 3)	ng/L	616,7	534,2	10,1%
PFOS (Probe 1)	ng/L	28,0	33,4	18,6%
PFOS (Probe 2)	ng/L	23,0	28,9	19,9%
PFOS (Probe 3)	ng/L	20,3	24,8	19,4%

Die Ergebnisse zeigten gute Übereinstimmungen der eigenen Messmethode mit den Methoden anderer Labore. Größer angelegte Ringversuche sind derzeit in Planung. Eine internationale Laborvergleichsuntersuchung zur Ermittlung von Validierungsdaten für einen ISO-Normen-Vorschlag (ISO/CD 25101: Water Quality – Determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) – Method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry vom 08.11.2006), an der ebenfalls teilgenommen wurde, ist derzeit noch nicht abschließend ausgewertet.

Nach der Methodenumstellung zugunsten kürzerkettiger perfluorierter Tenside (Anhang A) im Jahr 2007, wurde im April 2008 mit der neuen Methode erfolgreich am „Länderübergreifenden Ringversuch S 01 - PFT in Wasser und Schlamm“ teilgenommen (Anhang B), der vom LANUV-NRW bundesweit auf Beschluss des Expertenkreises „Analytische Qualitätssicherung“ der Bund-Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) ausgerichtet wurde.

1.3.8. Probenahmen

1.3.8.1. Antibiotika

1. Universitätsklinikum Bonn:

Das Sammelabwasser der UKB wurde am zentralen Abwasserübergabepunkt, der sogenannten „Kaskade“ mittels eines einstellbaren automatischen Probenahmegeräts der Fa. Bühler, Tübingen, Typ PPE 84, entnommen. Es wurden in der Regel 24-Std-Mischproben entnommen, einige wenige Proben stellen 2-Std-Mischproben sowie 5- oder 7-Tage-Mischproben dar.

An diesem Entnahmepunkt wurden in einem Zeitraum von 12/2000 bis 06/2001 insgesamt 28 Proben gezogen.

Einzelne Kliniken oder Institut wurden nicht separat beprobt.

Das Sammelabwasser ist dadurch charakterisiert, dass hier alle Abwasserteilströme der einzelnen Institute und Kliniken sowie auch das Niederschlagswasser von versiegelten Flächen des Klinikums gemischt ankommen und von dort über eine Prallwand den Venusberg hinunter zunächst in ein unterirdisches Rückhaltebecken und weiter zur städtischen Kläranlage (300.000 EW) geleitet werden.

Die jährliche Abwassermenge des UKB liegt bei durchschnittlich 280.000 m³/Jahr (Angaben UKB, Frischwasserverbrauch).

Hierzu sind Niederschlagsmengen von ca. 90.000 m³/Jahr hinzuzurechnen, welche sich aus der an den Abwasserkanal angeschlossenen versiegelten Fläche des UKB (ca. 139.000 m²) sowie aus der durchschnittlichen Niederschlagsmenge für den Bereich Bonn (ca. 650 mm, Angaben durch das Meteorologische Institut der Universität Bonn) berechnen lassen.

Es resultiert daraus eine Gesamtabwassermenge von ca. 370.000 m³/Jahr.

2. Städtische Kläranlage Bonn (300.000 EW) : Zu- und Abläufe

Die Probenahme erfolgte hier an zwei Stellen: dem sogenannten Zulauf Süd, welcher die Abwässer des UKB enthält, sowie dem Ablauf des geklärten Abwassers in den Rhein.

Die Entnahme wurde vom Betriebspersonal der Anlage bzw. von automatisierten Mischprobenziehern (Fa. Bühler) durchgeführt, wobei es sich an beiden Probenstellen jeweils um 24-Std. Mischproben desselben Tages handelte.

Im Zeitraum zwischen 11/2000 und 06/2001 wurden an jeder Probenstelle 28 Proben gezogen.

3. Weitere Kläranlagen

Es wurden jeweils nur die Ausläufe von drei zusätzlichen, kleineren Anlagen beprobt, welche auf 2000 bzw. 3000 und 6500 EW ausgelegt sind.

Die Anlagen entsprechen jeweils dem Stand der Technik (Grobrechen, Sandfang, Vorklärung, Belebung mittels Umlaufgraben oder Belebungsbecken, Nachklärung mittels Becken bzw. Dortmundbrunnen.

Die kleinste Anlage wurde nur zweimal (09 und 12/2000) beprobt, die beiden anderen wurden von November bis Dezember 2000 je viermal beprobt.

Im Rahmen weitere Untersuchungen für das Landesumweltamt NRW wurden im Zeitraum 04 – 09/2001 die Abläufe weiterer zehn Kläranlagen beprobt.

4. Oberflächenwässer

Die Beprobung erfolgte jeweils als Stichprobe an folgenden Flüssen und Gewässern: Rhein, Werre, Ems, Bach im Stadtgebiet Bad Münstereifel (Höhengebiet), Bach im Rhein-Sieg-Kreis, Staugewässer.

Der Zeitraum der Probenahmen erstreckte sich von 09/2000 bis Ende 2001.

5. Rhein-Uferfiltrate, Grundwasser, aufbereitete Wässer

Die Entnahme erfolgte an verschiedenen rheinnahen Brunnen, Pegeln und Wasserwerkszapfstellen jeweils als Stichprobe im Zeitraum 12/2000 bis 06/2001.

1.3.8.2. Perfluorierte Tenside

Die Probenahme der Oberflächenwässer des Rheins (von Schaffhausen (CH) bis Wesel am Niederrhein) und seiner wichtigsten Nebenflüsse (jeweils an der Mündung) erfolgte in zwei Kampagnen im März 2006. Die Wasserproben stellten jeweils Stichproben von 250 mL dar, die in Glasflaschen bzw. PP-Flaschen ohne zusätzliche Kühlung bis zur Probenaufarbeitung gelagert wurden. Die Planung der weiteren Probenahmen ergab sich aus den jeweils generierten Daten der zurückliegenden Probenahmekampagnen. Dabei wurden die Ruhr von der Mündung in Duisburg bis zur Quelle bei Winterberg und ihre Nebenflüsse, des Weiteren die Möhne auf ihrer gesamten Länge sowie die Trinkwässer in den angrenzenden Versorgungsgebieten ab Ende April bis Ende Mai 2006 in mehreren eintägigen Kampagnen beprobt.

1.4. Ergebnisse

1.4.1. Antibiotika

Das Vorkommen verschiedener Pharmazeutika in Grund-, Roh-, Trink- und Abwässern sowie in Oberflächengewässern war in den letzten Jahren Thema einer Reihe von Publikationen [Adler et al. 2001, Heberer & Stan 1997a, Heberer et al. 1997b, Heberer et al. 2001a, Heberer 2002a, Kümmerer 2001a, Sacher et al. 2001, Ternes 1998a, Ternes 2001a].

In diesen Arbeiten konnten Antibiotika-Wirkstoffe in Abwasser- und Oberflächenwasserproben in geringen Konzentrationen bis in den unteren µg/L-Bereich nachgewiesen werden. Bei den nachgewiesenen Wirkstoffen handelte es sich um die Makrolid-Antibiotika Clarithromycin, Erythromycin (in Form seines Metabolits Dehydrato-Erythromycin), Roxithromycin und Lincomycin, Sulfonamide (Sulfamethoxazol, Sulfadimethoxin, Sulfamethacin und Sulfathiazol), Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Norfloxacin und Enrofloxacin), sowie Chloramphenicol, Tylosin und Trimethoprim.

Rückstände von Wirkstoffen aus der Klasse der Penicilline und der Tetracycline konnten in verschiedenen Wassermatrizes nicht ermittelt werden, wie aus einer Untersuchung von Abwässern, Oberflächenwässern und Grundwasserproben in Deutschland [Hirsch et al. 1999] hervorgeht.

Dies kann zum einen mit der leichten Hydrolysierbarkeit der Penicilline – welche zu einer Vielzahl von Metaboliten führt - und zum anderen mit der Tendenz der Tetracycline zur Bildung von schwerlöslichen Erdalkali-Komplexen erklärt werden. Diese komplexierten Tetracycline binden vermutlich bevorzugt an Feststoffanteilen wie Klärschlamm oder Sediment und entziehen sich somit dem Nachweis in der wässrigen Phase [Daughton & Ternes 1999].

Die eigenen Untersuchungen ergaben folgendes Bild (aufgeführt sind in den Tabellen jeweils nur die detektierten Antibiotika):

1.4.1.1. Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn

Im Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn konnten in erster Linie die Antibiotika in Höchstkonzentrationen nachgewiesen werden, die nach ihrer Wirkstoffmenge am häufigsten verabreicht werden. Dazu zählten das Penicillin-Antibiotikum Piperacillin, das im Untersuchungszeitraum ein Viertel der Gesamtwirkstoffmenge aller im UKB verabreichten Antibiotika ausmachte, aber auch Ampicillin, die Makrolid-Antibiotika Clarithromycin, Clindamycin und Erythromycin, sowie die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Ofloxacin, Trimethoprim und Sulfamethoxazol (in der Regel als Kombinationspräparat verabreicht), die in Konzentrationen im ein- bis zweistelligen µg/L-Bereich detektiert wurden. In diesen Konzentrationen konnte ebenfalls das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin nachgewiesen werden, das eine wichtige therapeutische Reserve gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) und Enterokokken-Stämme darstellt und bei Patienten mit lebensbedrohlichen Infektionen mit vorgenannten Keimen eingesetzt wird (Tabelle 1.31).

Tabelle 1.31: Antibiotikakonzentrationen im Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn (jeweils Mischproben)

Konzentration [ng/L]	Probenahmezeitraum 06.12.2000 – 03.05.2001			
	Probenanzahl: 27			
	Mittelwert	Median	Minimalwert	Maximalwert
Amoxicillin	15	-	-	129
Ampicillin	532	190	12	6.180
Benzylpenicillin	11	-	-	131
Flucloxacillin	112	-	-	974
Methicillin	7	-	-	83
Mezlocillin	178	14	-	2.680
Nafcillin	5	-	-	23
Oxacillin	6	-	-	74
Phenoxymethylpenicillin	-	-	-	3
Piperacillin	2.445	87	9	25.800
Summe Penicilline	3.090	263	12	35.896
Azithromycin	68	29	2	299
Clarithromycin	529	488	64	1.650
Clindamycin	1.441	1.420	108	3.460
dh-Erythromycin	1.630	1.012	49	7.110
Roxithromycin	128	99	7	597
Summe Makrolide	3.712	3.213	864	9.763
Spiramycin	2	-	-	11
Tylosin	-	-	-	4
Vancomycin	812	654	104	1.710
Trimethoprim	3.196	2.670	1.080	7.980
Sulfadimidin	43	12	-	158
Sulfamethoxazol	8.461	8.000	1.308	16.800
Summe Sulfonamide	8.499	8.000	1.318	16.866
Ciprofloxacin	6.513	6.080	1.160	13.820
Ofloxacin	8.245	8.260	1.830	24.000
Summe Fluorchinolone	14.758	14.740	2.990	32.820
Doxycyclin	101	95	25	220
Oxytetracyclin	51	15	-	286
Tetracyclin	37	21	-	134
Summe Tetracycline	167	131	37	499
Gesamtsumme	33.966	34.581	13.690	61.798

1.4.1.2. Zu- und Abläufe von verschiedenen Kläranlagen

Im Zulauf der städtischen Kläranlage (300.000 Einwohner), in die auch das Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn gelangt, konnten in erster Linie die Antibiotikawirkstoffe detektiert werden, die auch im Abwasser des Klinikums enthalten sind und die Hauptmenge der Verordnungen ausmachen: Piperacillin und Ampicillin als Penicilline, Erythromycin, Trimethoprim, Sulfamethoxazol und Ciprofloxacin / Ofloxacin. Die hohe Konzentration von Piperacillin ist dabei eindeutig als Hinweis auf eine Belastung des Abwassers durch das Krankenhausabwasser zu werten, da Piperacillin im ambulanten Bereich keine Rolle spielt. Die Konzentrationen lagen im Schnitt eine Größenordnung unter denen des Klinikabwassers (Tabelle 1.32).

Tabelle 1.32: Kläranlage Bonn-Salierweg (Zulauf-Süd)

Konzentration [ng/L]	Probenahmezeitraum 08.12.2000 – 27.06.2001			
	Probenanzahl: 28			
	Mittelwert	Median	Minimalwert	Maximalwert
Amoxicillin	50	10	-	216
Ampicillin	80	25	-	398
Benzylpenicillin	5	-	-	43
Dicloxacillin	1	-	-	11
Flucloxacillin	11	1	-	45
Mezlocillin	50	19	-	190
Nafcillin	4	5	-	8
Oxacillin	1	-	-	10
Phenoxymethylpenicillin	9	-	-	86
Piperacillin	503	55	-	2.750
Summe Penicilline	649	55	5	3.662
Azithromycin	56	53	2	131
Clarithromycin	103	96	35	188
Clindamycin	70	65	25	194
dh-Erythromycin	497	483	120	1.020
Roxithromycin	56	44	9	173
Summe Makrolide	782	738	277	1.630
Spiramycin	2	-	-	21
Vancomycin	50	52	-	140
Trimethoprim	190	180	86	347
Sulfadimidin	7	-	-	48
Sulfamethoxazol	962	1.010	294	1.700
Summe Sulfonamide	969	1.010	298	1.700
Ciprofloxacin	329	183	6	1.430
Ofloxacin	162	140	11	540
Summe Fluorchinolone	491	329	17	1.970
Doxycyclin	26	21	-	80
Oxytetracyclin	21	13	-	64
Tetracyclin	20	18	-	81
Summe Tetracycline	50	32	-	176
Gesamtsumme	3.162	3.564	1.206	4.628

Im Ablauf dieser Kläranlage (in den Rhein) ergab sich folgendes Bild: Piperacillin, Erythromycin und Sulfamethoxazol sind die vorherrschenden Antibiotikawirkstoffe, die nach der Abwasserbehandlung (mechanisch-biologische Kläranlage mit Phosphatfällung, 66.000 m³ Abwasser / Tag) mit Konzentrationen um 0,5 µg/L im gereinigten Abwasser detektiert wurden. Bemerkenswert ist das Vorkommen des Piperacillins im gereinigten Abwasser, da in der Literatur nahezu keine quantitativen Angaben über das Vorkommen von Penicillin-Wirkstoffen in verschiedenen Wasserkompartimenten zu finden sind, ein Umstand, der mit der leichten Hydrolysierbarkeit dieser Substanzen erklärt wird [Heberer 2002a]. Andererseits ist der Nachweis des Reserveantibiotikums Vancomycin im Zu- wie im Ablauf der Kläranlage zu beachten, da auch hier keine vergleichbaren Daten vorliegen (Tabelle 1.33). Beide Nachweise im Kläranlagenablauf sind wiederum als Belastung durch das Klinikabwasser zu werten.

Tabelle 1.33: Kläranlage Bonn-Salierweg (Ablauf in den Rhein)

Konzentration [ng/L]	Probenahmezeitraum 08.12.2000 – 27.06.2001			
	Probenanzahl: 28			
	Mittelwert	Median	Minimalwert	Maximalwert
Amoxicillin	2	-	-	14
Ampicillin	2	-	-	10
Flucloxacillin	5	5	-	19
Methicillin	-	-	-	-
Mezlocillin	18	15	-	53
Piperacillin	131	90	12	491
Summe Penicilline	139	95	-	551
Azithromycin	7	1	-	38
Clarithromycin	25	12	4	86
Clindamycin	80	76	37	167
dh-Erythromycin	108	71	17	308
Roxithromycin	19	8	3	65
Summe Makrolide	233	171	76	554
Spiramycin	1	-	-	6
Tylosin	-	-	-	1
Vancomycin	34	-	-	164
Trimethoprim	27	14	3	103
Sulfadimidin	-	-	-	3
Sulfamethoxazol	244	238	90	464
Summe Sulfonamide	244	240	90	464
Ciprofloxacin	15	16	-	33
Ofloxacin	24	22	4	59
Summe Fluorchinolone	38	38	4	80
Doxycyclin	4	-	-	28
Tetracyclin	1	-	-	12
Summe Tetracycline	3	-	-	40
Gesamtsumme	715	663	351	1.111

Zu vergleichbaren Werten führte die Untersuchung anderer Kläranlagenabläufe in Nordrhein-Westfalen (Tabelle 1.34). Die mengenmäßig bedeutsamsten Antibiotikawirkstoffe sind Erythromycin und Sulfamethoxazol. Das Vorkommen von Piperacillin in der Bonner Kläranlage am Salierweg (Ablauf) ist eine Besonderheit, die der großen Verordnungsmenge im Universitätsklinikum geschuldet ist. Insgesamt kann aber gefolgert werden, dass derzeit ein durchschnittlicher Summenantibiotikagehalt in der Größenordnung $\leq 1 \mu\text{g/L}$ in den Abläufen von Kläranlagen in Deutschland zu finden ist, der sich hauptsächlich aus den Komponenten Erythromycin und Sulfamethoxazol zusammensetzt.

Tabelle 1.34: Kläranlagenausläufe (verschiedene Probenahmestellen in Nordrhein-Westfalen)

Konzentration [ng/L]	Probenanzahl											
	KA Altena	KA Düsseldorf-Hubbelrath	KA Bleiche-Drolshagen	KA Rheurdt	KA Kierspe	KA Rheine-Nord	KA Rhede-Vardingholt	KA Wesel	KA Nörvenich	KA Anröchte		
	5	6	5	6	5	6	6	6	2	2		
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert		
Amoxicillin	5	8	6	-	5	-	7	2	-	-		
Dicloxacillin	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-		
Flucloxacillin	-	-	-	-	-	7	4	-	-	-		
Mezlocillin	-	-	-	-	-	8	2	9	-	-		
Piperacillin	15	-	-	-	-	5	3	3	-	-		
Summe Penicilline	20	8	6	-	7	20	17	16	-	-		

Tabelle 1.34: Kläranlagenausläufe (verschiedene Probenahmestellen in Nordrhein-Westfalen) (Fortsetzung)

Konzentration [ng/L]	KA Altena	KA Düsseldorf- Hubbelrath	KA Bleiche- Drolshagen	KA Rheurdt	KA Kierspe	KA Rheine-Nord	KA Rhede- Vardingholt	KA Wesel	KA Nörvenich	KA Anröchte
	5	6	5	6	5	6	6	6	2	2
Probenanzahl	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
Azithromycin	20	3	1	41	13	29	4	10	7	30
Clarithromycin	31	39	1	27	47	22	26	22	1	41
Clindamycin	21	34	5	50	11	38	12	38	64	18
dh-Erythromycin	326	74	271	729	333	252	152	353	44	451
Roxithromycin	41	20	39	48	90	30	13	32	14	16
Summe Makrolide	439	171	317	896	494	372	206	455	130	557
Spiramycin	7	-	-	-	1	-	1	-	1	-
Tylosin	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5
Trimethoprim	85	27	9	157	118	79	22	20	3	88
Sulfadimidin	-	-	-	1	-	3	1	2	6	1
Sulfamethoxazol	167	99	11	585	84	581	75	325	237	392
Summe Sulfonamide	167	99	11	586	84	584	76	327	243	393
Ciprofloxacin	9	7	-	3	5	9	4	10	1	23
Ofloxacin	8	6	1	13	5	15	40	56	2	3
Summe Fluorchinolone	18	13	1	16	10	25	44	66	4	25
Chlortetracyclin	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Doxycyclin	5	2	-	-	7	-	2	6	21	7
Oxytetracyclin	-	2	-	-	5	-	3	2	-	-
Summe Tetracycline	5	5	-	-	12	-	5	9	21	7
Gesamtsumme	740	323	345	1.656	726	1.080	371	894	404	1.075

1.4.1.3. Oberflächengewässer in Nordrhein-Westfalen

In Analogie zu den untersuchten Kläranlagenabläufen stellt sich für den Rhein in Nordrhein-Westfalen die Belastungssituation mit Antibiotikarückständen wie folgt dar: Sulfamethoxazol und Erythromycin bilden zusammen mit einem Sulfonamid aus dem Veterinärbereich (Sulfadimidin), das augenscheinlich nicht über die Kläranlagenabläufe in die Oberflächengewässer gelangt, die Haupt-Belastungen mit Antibiotika (Tabelle 1.35).

Diese Befundlage zieht sich konsistent durch alle untersuchten Wasserproben des Rheins. Die Konzentrationen bewegen sich im Mittel im zweistelligen ng/L-Bereich.

Ähnliches gilt für andere Oberflächengewässer in Nordrhein-Westfalen. Sulfamethoxazol und Erythromycin sind durchgehend nachweisbar. Andere Wirkstoffsubstanzen lassen sich nicht mit gleicher Konsistenz nachweisen (Tabelle 1.36).

Anhand der Konzentrationen lassen sich Rückschlüsse auf den Abwasseranteil der Oberflächengewässer oder die Anwesenheit großer Verbraucher (z.B. Großkliniken) ziehen.

Tabelle 1.35: Rhein (verschiedene Probenahmestellen in Nordrhein-Westfalen)

Konzentration [ng/L]	Probenahmezeitraum 29.09.2000 – 10.12.2001			
	Probenanzahl: 11			
	Mittelwert	Median	Minimalwert	Maximalwert
Amoxicillin	2	-	-	10
Piperacillin	1	-	-	5
Summe Penicilline	3	-	-	11
Azithromycin	1	-	-	4
Clarithromycin	4	4	1	7
Clindamycin	4	3	1	17
dh-Erythromycin	24	18	5	76
Roxithromycin	4	3	2	12
Summe Makrolide	37	28	9	115
Trimethoprim	7	5	2	25
Sulfadimidin	17	2	-	145
Sulfamethoxazol	46	40	23	106
Summe Sulfonamide	56	40	-	186
Ciprofloxacin	1	-	-	6
Ofloxacin	3	1	-	8
Summe Fluorchinolone	2	-	-	15
Summe Tetracycline	-	-	-	-
Gesamtsumme	105	79	31	252

Tabelle 1.36: Oberflächenfließgewässer (diverse Probenahmestellen in Nordrhein-Westfalen)

Konzentration [ng/L]	Probenanzahl							
	Werre (bei Minden) 7	Ems (bei Greven) 6	Sieg (bei Hennef) 2	Wupper (bei Rheindorf) 2	Erft (bei Erftstadt) 2	Agger (bei Troisdorf) 2	Rotbach (bei Erftstadt) 2	
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	
Amoxicillin	1	-	3	3	-	-	-	-
Mezlocillin	2	-	-	3	-	-	-	-
Phenoxymethylpenicillin	3	1	-	-	-	-	-	-
Piperacillin	3	-	3	3	-	-	-	-
Summe Penicilline	9	1	6	8	-	-	-	-
Azithromycin	5	-	-	1	1	-	-	-
Clarithromycin	12	3	1	5	8	13	4	4
Clindamycin	17	7	2	6	4	2	5	5
dh-Erythromycin	93	23	14	60	54	20	71	71
Roxithromycin	20	6	1	7	7	2	3	3
Summe Makrolide	148	39	17	78	73	37	82	82
Trimethoprim	15	7	4	18	6	6	1	1
Sulfadimidin	2	5	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazol	203	75	21	61	56	30	35	35
Summe Sulfonamide	205	80	21	61	56	30	35	35
Ciprofloxacin	5	-	-	3	-	-	-	-
Ofloxacin	10	-	-	-	-	-	-	-
Summe Fluorchinolone	15	-	-	3	-	-	-	-
Doxycyclin	2	-	-	-	-	-	-	-
Oxytetracyclin	2	-	-	-	-	-	-	-
Tetracyclin	-	-	-	-	-	-	6	6
Summe Tetracycline	4	-	-	-	-	-	6	6
Gesamtsumme	399	126	47	167	135	72	210	210

1.4.1.4. Staugewässer (Talsperre zur Trinkwassergewinnung)

In einem größeren Staugewässer (Talsperre), das der Trinkwassergewinnung für die Stadt Bonn und den Rhein-Sieg-Kreis dient, konnten ebenfalls Antibiotikawirkstoffe nachgewiesen werden. In den Vorfluter, der das Staugewässer speist, leiten zwei Kläranlagen ihr gereinigtes Abwasser ein. Anhand der vorhandenen Konzentrationen von Amoxicillin und dem Fehlen von Ampicillin kann daraus geschlossen werden, dass in erster Linie ambulante Verordnungen und keine klinischen Verordnungen für die Abwasserbelastung verantwortlich sind.

Der Vorfluter wies am Einlaufpunkt (EP1) in das Staugewässer ähnliche Belastungen an Sulfamethoxazol und Erythromycin auf wie das Staugewässer in unmittelbarer Nähe (EP2). Mehrere Kilometer entfernt (EP3) waren andere Antibiotika nicht mehr nachweisbar, die beiden Hauptkomponenten nur noch in geringeren Konzentrationen.

Das Wasser des letzten Entnahmepunktes (EP4) stellt ein aufbereitetes Reinwasser dar, hier konnte Sulfamethoxazol in lediglich einem Fall in geringsten Konzentrationen nachgewiesen werden (Tabelle 1.37).

Tabelle 1.37: Talsperre (Kläranlagenabläufe in den die Talsperre speisenden Vorfluter, Entnahmepunkte)

Konzentration [ng/L]	KA 1 vor Staugewässer		KA 2 vor Staugewässer		EP 1		EP 2		EP 3		EP 4	
	Probenanzahl		Probenanzahl		Probenanzahl		Probenanzahl		Probenanzahl		Probenanzahl	
	4	4	4	4	6	6	6	6	6	6	4	4
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
Amoxicillin	15	270	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flucloxacillin	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacillin	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenoxymethylpenicillin	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe Penicilline	16	288	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	25	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clarithromycin	60	31	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Clindamycin	73	116	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
dh-Erythromycin	343	175	8	8	2	-	-	-	-	-	-	-
Roxithromycin	76	57	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe Makrolide	577	423	13	13	3	-	-	-	-	-	-	-
Tylosin	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimethoprim	239	131	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfadimidin	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazol	630	204	16	19	7	1	-	-	-	-	-	-
Summe Sulfonamide	630	207	16	20	7	1	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	46	13	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Ofloxacin	26	13	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe Fluorchinolone	72	26	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxycyclin	14	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxytetracyclin	33	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe Tetracycline	47	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtsumme	1.580	1.088	36	43	10	1	-	-	-	-	-	-

1.4.1.5. Rheinuferfiltrate, Wasser aus rheinnahen Brunnen und Pegeln

Es wurden insgesamt 8 Proben untersucht, wovon drei Proben tatsächliche Rheinuferfiltrate darstellten, vier weitere Proben waren aus rheinnahen Brunnen sowie einem Pegel gezogen worden, eine Probe stellt ein durch landseitiges Grundwasser beeinflusstes Rheinuferfiltrat dar. Penicilline, Fluorchinolone, Tetracycline, Vancomycin sowie Trimethoprim konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

Erythromycin konnte in lediglich einer Probe (rheinnaher Brunnen) nachgewiesen werden (Tabelle 1.38), dagegen war Sulfamethoxazol in allen untersuchten Wässern vorhanden und weist damit auf seine umwelthygienische Bedeutung hinsichtlich seiner Persistenz und Mobilität in verschiedenen Wasserkompartimenten hin.

Tabelle 1.38: Rohwasser mit Beeinflussung durch Oberflächenwasser (Rhein)

Konzentration [ng/L]	Probenanzahl			
	Brunnen 1 – Rheinnähe 3 Mittel- wert	Pegel - Rheinnähe 1	Brunnen 2 - Rheinuferfiltrat 3 Mittel- wert	Brunnen 3 – Rheinuferfiltrat + Grundwasser 1
Summe Penicilline	-	-	-	-
dh-Erythromycin	8	-	-	-
Summe Makrolide	8	-	-	-
Sulfamethoxazol	9	12	16	7
Summe Sulfonamide	9	12	16	7
Summe Fluorchinolone	-	-	-	-
Summe Tetracycline	-	-	-	-
Gesamtsumme	17	12	16	7

1.4.2. Perfluorierte Tenside

1.4.2.1. Der Rhein und seine wichtigsten Zuflüsse

Die Probenahme am Rhein und seinen wichtigsten Zuflüssen erfolgte in zwei Kampagnen, ausgehend vom Standort Bonn den Rhein aufwärts bis zum Rheinfall bei Neuhausen in der Schweiz und den Rhein abwärts bis nach Wesel zur Mündung der Lippe in den Rhein, dem letzten großen Zufluss auf deutscher Seite (Abbildung 1.11).

Abbildung 1.11: Flussgebietsschema des Rheins in Deutschland



Als Hauptkomponente im untersuchten Spektrum der perfluorierten Tenside konnte für den Rhein die Perfluorbutansulfonsäure ermittelt werden, mit einer Spitzenkonzentration von 46 ng/L bei Breisach (Tabelle 1.39). Die Gehalte an PFBS lagen in der Regel über den PFOS-Gehalten, die PFOA-Gehalte lagen im einstelligen ng/L-Bereich. Die Summe aller bestimmten perfluorierten Tenside lag für den Rhein an allen Probenahmestellen unter 75 ng/L. (PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA und PFHxS wurden nur sehr selten und mit sehr geringen Konzentrationen detektiert; eine Angabe der Zahlenwerte erfolgt daher in den nachfolgenden Tabellen nicht).

Ähnliche Konzentrationsverhältnisse zeigten sich auch bei den meisten Zuflüssen des Rheins mit Ausnahme der Zuflüsse im Ruhrgebiet: Ruhr, Emscher und Lippe (ebenso der Rhein-Herne-Kanal und der Wesel-Datteln-Kanal) zeigten deutlich erhöhte Konzentrationen an PFOA, PFHxA und PFPeA. Der PFOA-Wert an der Ruhr-Mündung in Duisburg konnte flussaufwärts durch einen fast identischen Wert am Baldeney-See in Essen (Staustufe der Ruhr) bestätigt werden.

Tabelle 1.39: PFT-Konzentrationen im Oberflächenwasser des Rheins und seiner wichtigsten Zuflüsse

Probenahmeverlauf rheinabwärts vom Rheinfall bei Neuhausen (CH) bis zur Mündung der Lippe bei Wesel		PFHxA	PFHpA	PFOA	PFBS	PFOS	Summe 12 Perfluorierte Tenside
Beprobtes Gewässer (Rhein und Mündungen ausgewählter Zuflüsse)	Probenahmeort	Konzentration [ng/L]					
Rhein	Neuhausen (CH)	-	-	-	-	2	2
Wutach	Oberlauchringen	-	-	-	-	-	-
Aare (CH)	Koblenz (CH)	3	-	2	13	8	26
Rhein	Stein (CH)	-	-	-	6	6	12
Rhein	Wyhlen	-	-	-	6	8	14
Rhein	Huningue (F)	2	-	2	9	12	25
Rhein	Breisach	-	-	2	46	26	74
Rhein	Kittersburg	-	-	2	15	8	25
Kinzig	Kehl	-	-	-	2	17	19
Rhein	Rheinau	-	-	-	19	19	38
Murg	Rastatt	13	11	6	-	4	36
Rhein	Leimersheim	2	-	2	22	9	35
Rhein	Ludwigshafen	-	-	2	30	5	37
Neckar	Mannheim	-	-	3	-	3	6
Rhein	Petersau	-	-	3	28	7	38
Main	Gustavsburg	-	-	3	-	12	15
Rhein	Mainz	2	-	3	24	12	43
Selz	Ingelheim	-	-	6	2	-	8
Nahe	Bingen	-	-	8	-	6	14
Rhein	Lahnstein	-	-	3	19	6	28
Lahn	Lahnstein	-	-	-	2	2	4
Mosel	Koblenz	-	-	-	-	5	5
Rhein	Koblenz	-	-	2	19	5	26
Ahr	Remagen	-	-	-	-	-	-
Rhein	Bonn	-	-	2	12	5	19
Sieg	Troisdorf	-	-	-	-	-	-
Rhein	Köln	-	-	-	2	5	7
Wupper	Leverkusen	-	-	2	-	7	9
Rhein	Neuss	-	-	-	7	5	12
Ertf	Neuss	-	-	2	34	3	39
Rhein	Krefeld	-	-	-	12	7	19
Ruhr	Duisburg	12	-	48	9	5	94
Ruhr	Essen	21	3	52	6	10	122
Rhein-Herne-Kanal	Duisburg	77	7	34	12	3	178
Rhein	Duisburg	3	-	9	15	9	41
Emscher	Dinslaken	7	2	22	5	18	57
Wesel-Datteln-Kanal	Vörde	61	4	36	15	3	152
Lippe	Wesel	20	-	21	3	6	59
Rhein	Wesel	3	-	8	13	9	37

1.4.2.2. Die Ruhr und ihre wichtigsten Zuflüsse

Aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Kapitels richtete sich das weitere Untersuchungsprogramm schwerpunktmäßig auf die Ruhr und ihre Zuflüsse. Dazu wurden in einer ersten Untersuchungskampagne Proben an verschiedenen Stellen der Ruhr von der Mündung in den Rhein in Duisburg bis zur Quelle bei Winterberg untersucht. Ebenso wurden die Mündungen einiger größerer Zuflüsse beprobt und einzelne Trinkwasserproben im Ruhrgebiet entnommen (Abbildung 1.12).

Abbildung 1.12: Probenahmestellen (Oberflächen- und Trinkwasser) im Ruhrgebiet und angrenzenden Gebieten des Sauerlandes

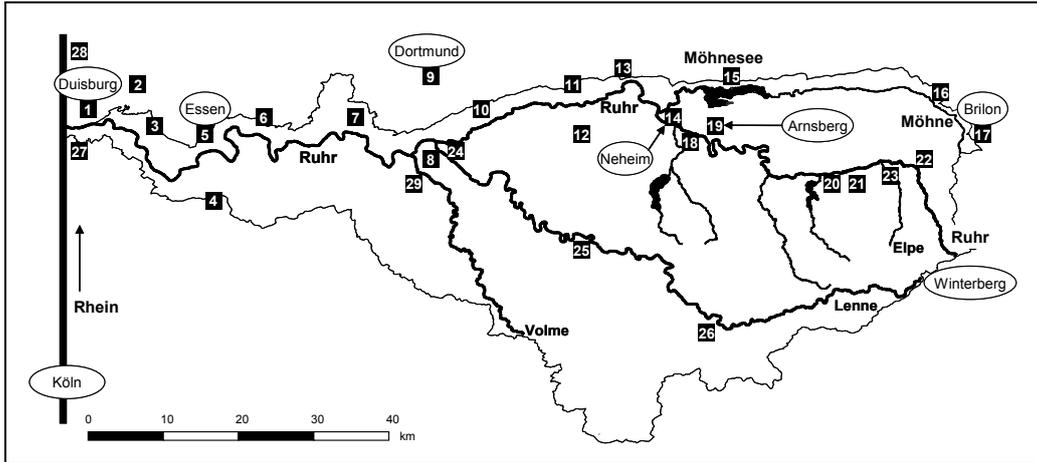


Tabelle 1.40: PFT-Konzentrationen im Oberflächenwasser im Ruhrinzugsgebiet

Nr.	Probenahmestelle (Fluss, Ort)	Konzentration [ng/L]						Summe 12 Perfluorierte Tenside	
		PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFBS		PFOS
1	Ruhr (Duisburg)	2	18	12	-	48	9	5	94
3	Ruhr (Mülheim)	-	8	3	-	46	14	6	77
5	Ruhr (Essen)	-	15	12	-	51	9	7	94
6	Ruhr (Bochum)	-	7	5	-	57	12	4	85
7	Ruhr (Witten)	-	8	6	-	69	17	22	132
8	Ruhr (Hagen)	-	12	10	-	90	17	13	142
10	Ruhr (Schwerte)	10	28	25	-	177	18	14	272
18	Ruhr (Hüsten)	11	50	38	-	63	8	-	170
20	Ruhr (Meschede-Wennemen)	5	31	16	-	24	4	-	80
21	Ruhr (Meschede-Wehrstapel)	14	167	120	-	139	6	-	446
22	Ruhr (Olsberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Möhne (Neheim)	18	13	33	25	647	18	14	767
15	Möhnesee (Westrich)	25	24	54	27	654	22	17	822
16	Möhne (Heidberg)	21	93	247	148	3640	44	193	4385
17	Möhne (Brilon)	-	-	-	-	11	6	-	17
23	Elpe (Bestwig)	143	1638	1248	-	1168	71	-	4268
24	Lenne (Hagen)	-	-	-	-	59	-	11	70
25	Lenne (Plettenberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Lenne (Lennestadt)	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Rhein (Neuss)	-	-	-	-	-	7	5	12
28	Rhein (Duisburg-Walsum)	2	3	3	-	9	15	9	41
29	Volme (Hagen)	-	-	-	-	-	3	-	3

Entgegen der Erwartung konnten ruhraufwärts (nach Verlassen der industriellen Gebiete an der unteren Ruhr) steigende PFT-Konzentrationen gefunden werden (Tabelle 1.40). Die höchsten Werte wurden an den Mündungen der Zuflüsse Möhne (767 ng/L) und der Elpe (4,4 µg/L) gefunden, wobei die Elpe nur einen geringen Wasserzufluss darstellt. Oberhalb des Zuflusses der Elpe konnten in der Ruhr bei Olsberg keine PFT-Gehalte festgestellt werden. Die Kontamination der Möhne mit perfluorierten Tensiden besteht dabei zu 80-85% aus PFOA, während die Elpe zu etwa gleichen Teilen PFPeA, PFHxA und PFOA aufweist. In mehreren weiteren Kampagnen wurde die Möhne bis zur Quelle in Brilon untersucht, wobei die Quelle einer Kontamination immer weiter am Oberlauf der Möhne zwischen Rüthen und Brilon eingekreist werden konnte.

Die anderen Zuflüsse der Ruhr wiesen keine besondere Belastung mit perfluorierten Tensiden auf. Daher kommt es z.B. beim Zufluss der Lenne in Hagen, die eine vergleichbare Wassermenge wie die Ruhr an gleicher Stelle führt, zu Verdünnungseffekten, deutlich zu erkennen am PFOA-Gehalt der Ruhr vor und nach der Lennemündung (177 ng/L in Schwerte, 90 ng/L in Hagen).

1.4.2.3. Oberlauf der Möhne bei Brilon-Scharfenberg

Aufgrund der vorherigen Messungen konnte der Eintrag der PFT-Verunreinigungen oberhalb der Ortschaft Heidberg an der oberen Möhne lokalisiert werden. Daher wurden feinabgestufte Probenahmen an kleinen Zuflüssen der Möhne im Bereich der Ortschaft Scharfenberg durchgeführt. Anhand der Untersuchung der Proben konnten zwei kleine Bäche, die Steinbecke und die Bermecke mit PFOA-Konzentrationen von 33,9 µg/L bzw. 6,5 µg/L an den Mündungen als Hauptkontaminationspfad ausgemacht werden (Tabelle 1.41). Beide Bäche entwässern eine landwirtschaftliche Fläche oberhalb des Ortes Scharfenberg (Abbildung 1.13).

Abbildung 1.13: Probenahmestellen (Oberflächenwasser) am Oberlauf der Möhne im Bereich Brilon-Scharfenberg

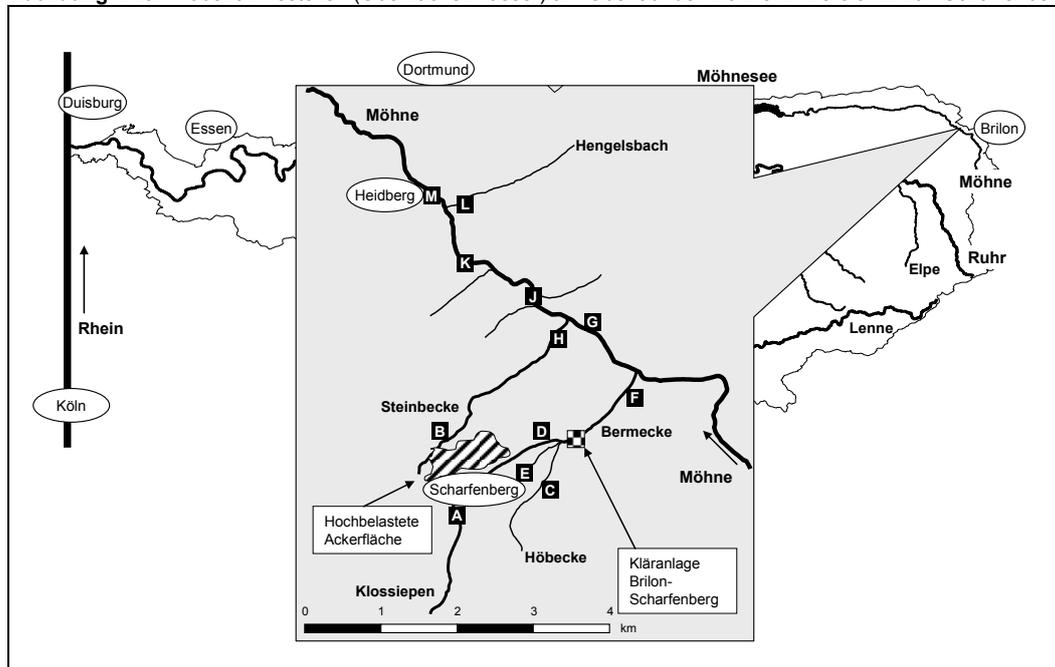


Tabelle 1.41: PFT-Konzentrationen am Oberlauf der Möhne im Bereich Brilon-Scharfenberg

Nr.	Probenahmestelle (Fluss, Ort)	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFBS	PFOS	Summe 12 Perfluorierte Tenside
A	Klossiepen	-	-	-	-	11	-	-	11
B	Steinbecke	500	2670	2630	621	16800	1450	5900	30571
C	Hoebecke	-	-	-	-	-	-	-	-
D	Klossiepen	9	25	73	46	1860	17	2	2032
E	Bermecke	-	-	-	-	-	-	-	-
F	Bermecke (Mündung)	53	234	621	210	6530	146	507	8301
G	Möhne	12	58	152	50	1930	38	135	2375
H	Steinbecke (Mündung)	200	1390	3040	989	33900	669	3160	43348
J	Möhne	33	150	393	180	7070	87	405	8318
K	Möhne	31	139	390	158	5990	79	370	7157
L	Hengelsbach	-	-	-	-	-	-	-	-
M	Möhne	25	118	358	146	5570	67	311	6595

1.4.2.4. Trinkwasser im Ruhrgebiet und im nördlichen Sauerland

Parallel zu den Untersuchungen des Oberflächenwassers wurden im Ruhrgebiet und im nördlichen Sauerland Trinkwasserproben untersucht (Abbildung 1.12, Tabelle 1.42).

Tabelle 1.42: PFT-Konzentrationen im Trinkwasser im Ruhrgebiet und angrenzenden Gebieten des Sauerlandes

Nr.	Probenahmestelle (Ort)	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFBS	PFOS	Summe 12 Perfluorierte Tenside
1	Duisburg-Alt Hamborn	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Oberhausen	-	6	3	-	43	16	9	77
3	Mülheim	-	3	-	-	30	18	3	54
4	Velbert	-	11	7	-	38	13	-	69
5	Essen	-	9	7	-	56	15	7	94
6	Bochum	-	8	5	-	53	14	10	90
7	Witten	-	4	4	-	49	14	12	83
8	Hagen	-	5	3	-	34	16	22	80
9	Dortmund	2	30	26	-	152	8	11	229
10	Schwerte	3	27	24	-	145	10	13	222
11	Fröndenberg	3	26	21	-	143	3	6	202
12	Menden	-	35	31	2	157	6	11	242
13	Wickede	5	46	38	-	208	4	-	301
14	Neheim	11	5	22	23	519	13	5	598
16	Rüthen	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Brilon	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Arnsberg	8	77	56	-	71	3	-	215
20	Meschede	6	46	22	-	22	-	-	96
25	Plettenberg	-	-	-	-	-	-	-	-
26	LenneStadt	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Duisburg-Wedau	-	-	-	-	-	26	-	26

Hinsichtlich der PFT-Konzentrationen wies der Ort Neheim am Zusammenfluss von Möhne und Ruhr die höchsten Werte auf, wobei PFOA mit 519 ng/L die Hauptkomponente darstellte. Das Trinkwasser in Neheim wird nach Uferfiltration bzw. künstlicher Grundwasseranreicherung aus dem Möhnewasser gewonnen. Dieses Verfahren der Trinkwassergewinnung wird ruhrabwärts bis Mülheim in ähnlicher Weise betrieben (ggf. mit zusätzlichen Aufbereitungsschritten wie Ozonung und Aktivkohlefiltration).

Vergleicht man die PFOA-Gehalte des Trinkwassers mit den zugehörigen Konzentrationen im Oberflächenwasser, aus dem das jeweilige Trinkwasser gewonnen wird, ergeben sich nur geringe Konzentrationsunterschiede (PFOA-Gehalt der Möhne bei Neheim: 647 ng/L). Daher konnten ruhrabwärts mit fallenden PFT-Konzentrationen im Oberflächenwasser der Ruhr auch entsprechend geringere PFT-Konzentrationen im vor Ort gewonnenen Trinkwasser gefunden werden (Tabelle 1.43).

Tabelle 1.43: Gegenüberstellung der PFOA-Konzentrationen im Oberflächenwasser und Trinkwasser an der Ruhr

		Oberflächen- wasser	Trink- wasser
Nr.	Probenahmestelle (Fluss, Ort)	PFOA-Konzentration [ng/L]	
3	Ruhr (Mülheim)	46	30
5	Ruhr (Essen)	51	56
6	Ruhr (Bochum)	57	53
7	Ruhr (Witten)	69	49
10	Ruhr (Schwerte)	177	145
14	Möhne (Neheim)	647	519

		Oberflächen- wasser	Trink- wasser
Nr.	Probenahmestelle (Fluss, Ort)	PFBS-Konzentration [ng/L]	
28	Rhein (Duisburg-Walsum)	15	26

		Oberflächen- wasser	Trink- wasser
Nr.	Probenahmestelle (Fluss, Ort)	PFPeA / PFHxA / PFOA -Konzentration [ng/L]	
21	Ruhr (Meschede-Wehrstapel)	167 / 120 / 139	
19	Arnsberg	77 / 56 / 71	

Entsprechend wiesen die Trinkwässer aus Duisburg-Wedau und Arnsberg auch das jeweilige Substanzspektrum auf, das die zur Trinkwassergewinnung genutzten Oberflächenwässer beinhalten: Duisburg-Wedau erfährt eine Beeinflussung durch den Rhein, daher ist PFBS die vorherrschende Substanz im Trinkwasser; Arnsberg liegt oberhalb der Möhнемündung, die Beeinflussung des Ruhrwasser stammt in diesem Teil der Ruhr zu großen Teilen aus der Belastung der Elbe, im Trinkwasser wurden daher PFPeA, PFHxA und PFOA zu annähernd gleichen Anteilen gefunden; von der Mündung der Elbe in die Ruhr bis zur Wassergewinnung bei Arnsberg treten durch weitere unbelastete Zuflüsse Verdünnungseffekte auf.

1.4.2.5. Weitere Trinkwässer

In weiteren Trinkwasserproben außerhalb des Untersuchungsgebiets aus Kapitel 1.4.2.4. konnten in einigen Trinkwasserversorgungsgebieten PFT-Gehalte festgestellt werden. Auffällige Werte wurden für den Ort Gendorf an der Alz in Bayern ermittelt. Hier leitet ein chemischer Betrieb oberhalb am Flusslauf PFT-haltige Abwässer mit behördlicher Genehmigung in die Alz ein, die das für Gendorf gewonnene Trinkwasser beeinflussen. Andere Versorgungsgebiete wiesen nur geringe oder keine nachweisbare PFT-Belastung auf (Tabelle 1.44).

Tabelle 1.44: PFT-Konzentrationen im Trinkwasser in Gegenden außerhalb des Ruhrgebiets

Probenahmestelle (Ort)	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFBS	PFOS	Summe 12 Perfluorierte Tenside
	Konzentration [ng/L]							
Bad Elster (D, Thüringen)	-	-	-	-	-	-	-	-
Bad Muenstereifel (D, NRW)	-	-	-	-	-	-	-	-
Belm (D, Niedersachsen)	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin (D, Berlin)	-	-	-	-	2	17	6	25
Bonn (D, NRW)	-	-	-	-	-	-	-	-
Dresden (D, Sachsen)	-	-	-	-	-	-	-	-
Freiburg (D, Baden-Württemberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gendorf (D, Bayern)	-	-	8	16	87	-	-	111
Jülich (D, NRW)	-	-	-	-	-	-	-	-
Koblenz (D, Rheinland-Pfalz)	-	-	-	-	2	20	5	27
Maikammer (D, Rheinland-Pfalz)	-	-	-	-	-	-	-	-
München (D, Bayern)	-	-	-	-	-	-	-	-
Münster (D, NRW)	-	4	9	-	4	3	-	20
Solingen (D, NRW)	-	-	-	-	-	-	-	-
Windeck (D, NRW)	-	-	-	-	-	-	-	-
Paris (F)	-	-	-	-	-	-	-	-
Hampshire (GB)	-	-	-	-	-	-	-	-

1.5. Diskussion der Ergebnisse

1.5.1. Antibiotika

In der Bilanzierung kann für den durchschnittlichen Eintrag an antibiotischen Wirkstoffen im Sammelabwasser durch das Universitätsklinikum Bonn eine mittlere Konzentration von 29,6 µg/L (Mediansummen) angenommen werden (Tabelle 1.45). Vergleicht man diesen Wert mit dem Durchschnittsgehalt des Zulaufs der städtischen Kläranlage (2,39 µg/L), ergibt sich eine Reduktion der durchschnittlichen Konzentration an antibiotischen Wirkstoffen um den Faktor 12,4 auf dem Weg vom Universitätsklinikum bis zur Kläranlage.

Tabelle 1.45: Durchschnittliche Antibiotikakonzentrationen in verschiedenen Wasserarten (Medianwerte, bzw. Mittelwerte, wenn keine Mediane wegen zu geringer Probenzahl zur Verfügung standen)

Durchschnittliche Antibiotikakonzentrationen [µg/L]						
Wirkstoffklasse	UKB SA	KA BN Zulauf	KA BN Ablauf	Rhein	Uferfiltrat Rhein	Staugewässer
Penicilline	0,26	0,06	0,095	0,003	< NG	< NG
Makrolide	3,2	0,74	0,17	0,028	(0,023) Erythromycin	0,003 – 0,03
Fluorchinolone	14,7	0,33	0,038	0,002	< NG	<NG – 0,004
Sulfonamide	8,0	1,0	0,24	0,040	0,011	0,001 – 0,02
Trimethoprim	2,7	0,18	0,014	0,005	< NG	< NG – 0,004
Tetracycline	0,13	0,032	< BG	< NG	< NG	< NG
Vancomycin	0,65	0,052	< BG	< NG	< NG	< NG
Summe	29,6	2,39	0,56	0,078	0,011	0,001 – 0,04

UKB SA: Sammelabwasser Universitätsklinikum Bonn; KA BN: Kläranlage Bonn-Salierweg (300000 EW)

Dieser Reduktionsfaktor fällt dabei je nach Wirkstoffgruppe unterschiedlich aus, besonders deutlich ist die Reduktion verglichen mit anderen Wirkstoffgruppen bei den Fluorchinolonen, deren durchschnittliche Konzentration von 14,7 µg/L im Sammelabwasser auf 0,33 µg/L im Kläranlagenzulauf absinkt (Faktor 44,5).

Die Konzentrationen anderer Gruppen wie die der Penicilline und Makrolid-Antibiotika verringern sich derweil „nur“ um ca. den Faktor 4.

Da das Sammelabwasser auf diesem Weg keiner weiteren Behandlung unterworfen wird, muss man davon ausgehen, dass diese Reduktionseffekte zu einem großen Teil durch Verdünnungseffekte zu erklären sind, die von antibiotika-unbelasteten häuslichen und industriellen Abwässern herrühren. Neben diesen Verdünnungseffekten müssen grundsätzlich aber auch natürliche Abbaucharakteristika chemischer und mikrobiologischer Art (Metabolisierung, Hydrolyse, Adsorptionseffekte u.a.) im Abwasser auf dem Weg zur Kläranlage erwogen werden.

Andererseits sollte aber auch bedacht werden, dass die als Glucuronid- oder Sulfat-Addukte ausgeschiedenen Wirkstoffe, die in dieser Form einer quantitativen Erfassung nicht zugänglich sind, auf dem Weg zur Kläranlage durch Adduktspaltung der Ausscheidungsform (Addukt) wieder in ihre detektierbare Ausgangsform (reiner Wirkstoff) umgewandelt werden. Hier könnte man einen vermeintlichen Anstieg der Konzentration verzeichnen, der einem Verdünnungseffekt entgegenstehen würde. Dadurch ließen sich möglicherweise auch geringere Reduktionsfaktoren bei einigen Wirkstoffgruppen erklären.

Betrachtet man die Konzentration an antibiotischen Wirkstoffen im Kläranlagenzulauf und im -ablauf ergibt sich für die hier untersuchte Kläranlage (Stadt 300.000 EW) eine durchschnittliche Reduktion um den Faktor 4, d.h. durch die Kläranlage wird die Wirkstofffracht des Zulaufs auf

10-25% im Auslauf reduziert. Fluorchinolone ihrerseits erfahren eine Verminderung um den Faktor 10.

Neben den Fluorchinolonen mit der höchsten Reduktionsrate in der Kläranlage werden Wirkstoffe aus den Gruppen der Makrolide (incl. Clindamycin als Lincosamid-Antibiotikum) und der Sulfonamide eher unterdurchschnittlich mit Reduktionsfaktoren von 5 bzw. 4 in ihren Konzentrationen durch die Abwasserbehandlung minimiert

So ist es nicht verwunderlich, dass lediglich Makrolide und Sulfonamide in Oberflächenwässern in Übereinstimmung mit der Literatur [Hirsch et al. 1999] nachgewiesen werden können. Die nachgewiesenen Konzentrationen in Oberflächenwässern liegen dabei im Mittel um den Faktor 15 niedriger als im Kläranlagenablauf, bezogen auf den Rhein als Oberflächenwasser mit entsprechend großem Wasservolumen. Die Konzentrationen der nachgewiesenen Wirkstoffe liegen hier im unteren ng/L-Bereich. In einem derartigen Oberflächenwasser (Rhein, Werre oder Ems) ließen sich dagegen Penicilline, Fluorchinolone, Tetracycline nur noch vereinzelt, Vancomycin in keinem Fall nachweisen.

Untersuchungen unterhalb von Kläranlagenabläufen in Oberflächenwässern mit geringerer Wasserführung und dadurch höheren Abwasseranteilen zeigen den Nachweis von Amoxicillin, Azithromycin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Roxithromycin, Trimethoprim und Sulfamethoxazol. Die höchsten Konzentrationen konnten in einem Vorfluter in einem ländlichen Gebiet unterhalb einer kommunalen Kläranlage bei Sulfamethoxazol (312 - 829 ng/L) und Erythromycin (98 - 657 ng/L) nachgewiesen werden.

Betrachtet man die Konzentrationen von unterschiedlichen antibiotischen Wirkstoffen im Uferfiltrat des Rheins, das zur Trinkwassergewinnung genutzt wird, so reduziert sich der nachweisbare Anteil der untersuchten Antibiotika nur noch auf Wirkstoffe aus der Klasse der Sulfonamide; für Sulfamethoxazol werden in einigen Proben Konzentrationen bis maximal 25 ng/L festgestellt. Dies entspricht einer Reduktion gegenüber den mittleren Konzentrationen in Oberflächenwasser um den Faktor 4 – 5.

Hirsch [Hirsch et al. 1999] konnte auch im Grundwasser Sulfamethoxazol in einer maximalen Konzentration von 0,47 µg/L nachweisen. In eigenen Untersuchungen außerhalb des Untersuchungsprojektes konnte ebenfalls Sulfamethoxazol im Grundwasser in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden. Dieser Befund weist wiederum auf die offensichtlich hohe Persistenz und Mobilität von Sulfamethoxazol hin.

Die quantitative Bilanzierung des Eintrags und Verbleibs im aquatischen Ökosystem zeigt, dass es zu einer qualitativen und quantitativen Reduktion des Eintrags unterschiedlicher antibiotischer Wirkstoffe kommt. Konsistent mit den Untersuchungen in der Literatur konnte in Grundwässern nur noch Sulfamethoxazol im unteren ng/L-Bereich nachgewiesen werden.

Im Trinkwasser des Universitätsklinikums Bonn (Mischung aus Talsperrenwasser und Grundwasser) sowie in Einzelproben anderer Trinkwässer konnten Antibiotika-Rückstände bislang nicht nachgewiesen werden.

Dies deutet darauf hin, dass die teils noch im Grundwasser und in Uferfiltraten nachweisbaren Substanzen, vor allem Sulfamethoxazol und vereinzelt Erythromycin, im Zuge von Aufbereitungsverfahren (Flockung, Filtration, Oxidation u.a.) entfernt werden.

Die vorstehend dargelegten Konzentrationen und Bilanzierungen zeigen, dass mit einer deutlichen Reduktion bis unter die Nachweisgrenze der meisten untersuchten Antibiotika auf dem Weg des Abwassers von seiner Entstehung (z.B. in einem Universitätsklinikum) über Kläranlagen und Oberflächenwässer bis letztendlich ins Uferfiltrat / Grundwasser zu rechnen ist. Lediglich Sulfamethoxazol und Erythromycin können gegebenenfalls das Grundwasser oder das Uferfiltrat noch erreichen.

Die Reduktionsleistung konventioneller Trinkwasseraufbereitungsprozesse wurde von Adams [Adams et al. 2002] für sieben unterschiedliche Antibiotika (Carbadox, Sulfachlorpyridazin, Sulfadimethoxin, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfathiazol und Trimethoprim) unter typischen

Bedingungen in Trinkwasseraufbereitungsanlagen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass durch feinstverteilte Aktivkohle eine effektive Reduktion von Antibiotikagehalten erzielt werden konnte. Man geht davon aus, dass aufgrund dieser Untersuchungen an feinpulveriger Aktivkohle auch granuliert Aktivkohle, wie sie oft in einer Nachfiltration eingesetzt wird, sehr effizient zur Entfernung von Antibiotika führt. Die Oxidation der untersuchten Antibiotika sowohl mit Ozon als auch mit Chlor führte bei typischen Konzentrationen ebenfalls effektiv zu einer Entfernung dieser Antibiotika im Trinkwasseraufbereitungsprozess [Zwiener & Frimmel 2000a, Zwiener et al. 2000b].

Durch Umkehrosmose war die Gruppe um Adams [Adams et al. 2002] in der Lage, die Konzentration der untersuchten Antibiotika um mehr als 90 % zu reduzieren. Dieses Verfahren ist jedoch unwirtschaftlich und wird gewöhnlich bei der Trinkwasseraufbereitung nicht eingesetzt.

Eine nur geringe Antibiotika-Entfernung konnte dagegen mittels Koagulation / Flockung / Sedimentation / Filtration mit Aluminium- und Eisensalzen, UV-Bestrahlung oder Ionenaustausch erzielt werden. Die Untersuchungsergebnisse dieser Laboruntersuchungen zeigen, dass die Kontrolle der in dieser Studie untersuchten Antibiotika im Rahmen einer Trinkwasseraufbereitung aus Rohwässern mit typischen Antibiotikagehalten von Oberflächen-, Uferfiltrats- und Grundwässern mit den üblichen Behandlungsverfahren, wie Aktivkohlesorption und Oxidation mit Ozon und Chlorverbindungen gut gelingt.

Auch die Uferfiltration kann zur Entfernung polarer organischer Spurenstoffe aus der Gruppe der Antibiotika wirksam eingesetzt werden [Brauch et al. 2000].

Nach den bisherigen Erkenntnissen, sowohl aus eigenen Untersuchungen wie auch aus der Literatur, konnte kein Hinweis gefunden werden, dass nach dem Einsatz klassischer Aufbereitungsverfahren von Rohwasser eine Kontamination des erzeugten Trinkwassers mit Antibiotikarückständen festgestellt worden ist. Daher können aus den humantoxikologischen Überlegungen keine Hinweise abgeleitet werden, dass zusätzliche Maßnahmen zur Minimierung der Belastung aquatischer Kompartimente durch Antibiotikarückstände aus Krankenhausabwässern und häuslichen Abwässern notwendig sind.

Aus umwelthygienischer Sicht kann mit dem derzeitigen Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden, dass permanente Gehalte von Antibiotika in abwasserbelasteten Vorflutern zur Ausbildung von Antibiotika-resistenten Mikroorganismen führen. In gleicher Weise kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei zu großer Nähe zwischen Kläranlagenabläufen und der Rohwasserentnahme für Trinkwasseraufbereitungsanlagen, eine Beeinflussung der im Wasser vorkommenden Mikroorganismen und Krankheitserreger durch Antibiotika-resistente Mikroorganismen aus dem Abwasserpfad hinsichtlich der Verbreitung dieser Resistenzen auftreten kann.

1.5.2. Perfluorierte Tenside

1.5.2.1. Bewertung der Belastung des Trinkwassers durch PFOA

Die Trinkwasserverordnung von 2001 enthält für PFOA, PFOS und andere perfluorierte Tenside keine spezifischen Grenzwerte. Daher konnte für PFOA nur ein pragmatischer gesundheitlicher Orientierungswert (GOW) für schwach bis nicht genotoxische Stoffe oder Stoffgruppen in Höhe von 0,1 µg/L gemäß einer Empfehlung des Umweltbundesamtes vom März 2003 [Umweltbundesamt 2003] als Maßstab herangezogen werden, der als allgemeiner Vorsorgewert für lebenslange Exposition - in diesem Fall - gegenüber PFOA gilt.

Die ermittelten Trinkwassergehalte im Ruhgebiet gehen in vielen Fällen über diesen allgemeinen Vorsorgewert hinaus. Daher wurde die zuständige Bezirksregierung in Arnsberg telefonisch am 29. Mai 2006 und persönlich am 31. Mai 2006 über die Untersuchungsergebnisse im Trinkwasser und im Oberflächenwasser in Kenntnis gesetzt, die ihrerseits die betroffenen Kreise und Städte sowie das zuständige Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MUNLV NRW) informierte.

Das Gesundheitsamt des Hochsauerlandkreises (zuständig für den Ort Neheim mit der höchsten PFOA-Belastung des Trinkwassers) hat im Folgenden die Trinkwasserkommission (TWK) des BMG beim Umweltbundesamt um eine Stellungnahme gebeten, welche hygienisch und gesundheitlich duldbaren Höchstkonzentrationen zur Bewertung von PFOA, PFOS und anderen PFT im Trinkwasser herangezogen werden sollten. Die TWK gab am 21. Juni 2006 in einer Stellungnahme eine „Vorläufige Bewertung von Perfluorierten Tensiden (PFT) im Trinkwasser am Beispiel ihrer Leitsubstanzen Perfluorooctansäure (PFOA) und Perfluorooctansulfonsäure (PFOS)“ ab (Überarbeitung am 13.07.2006) [Trinkwasserkommission 2006], die aus den wenigen vorhandenen toxikologischen Daten verschiedene Höchstwerte ableitete und empfahl (Tabelle 1.46).

Tabelle 1.46: Zusammenstellung der wichtigsten empfohlenen Höchstwerte aus der Stellungnahme der TWK für Summen aus PFOA und PFOS

Art des Höchstwertes	Abkürzung	Zahlenwert	Begründung
Zielwert (Langfristiges Mindestqualitätsziel bzw. allgemeiner Vorsorgewert für PFOA, PFOS und evtl. weitere PFT)	GOW (Gesundheitlicher Orientierungswert) des UBA	≤0,1 µg/L	Abschnitt 2.1: Lebenslange gesundheitliche Vorsorge, z.B. gegen die Anwesenheit weiterer PFT
Lebenslang gesundheitlich duldbarer Leitwert für alle Bevölkerungsgruppen	LW des UBA	≤0,3 µg/L	Abschnitt 3: Bis zu dieser Konzentration sind Summen aus PFOA und PFOS lebenslang gesundheitlich duldbar
Vorsorglicher Maßnahmewert für Säuglinge	VMW _s	0,5 µg/L	Abschnitt 2.4: Vorsorglicher Schutz von Säuglingen, z.B. gegen die Anwesenheit weiterer PFT
Maßnahmewert für Erwachsene	MW = VMW ₀	5,0 µg/L	Abschnitte 2.3 (VMW₀) und 3 (MW) in Verbindung mit der MW-Empfehlung: Trinkwasser für Lebensmittelzwecke nicht mehr verwendbar

Neben der Empfehlung von Höchstwerten schlug die Trinkwasserkommission ein Human-Biomonitoring (HBM) der durch das Trinkwasser exponierten Bevölkerungsgruppen vor. Da HBM-

Daten aus mehreren Industrieländern zeigen, dass PFOA und PFOS im Blutserum ubiquitär nachweisbar sind, wird von einer ubiquitären Exposition der Bevölkerung ausgegangen. Die vorgeschlagene HBM-Studie sollte Informationen darüber liefern, welchen Anteil das Trinkwasser zur Gesamtexposition beitragen kann.

1.5.2.2. Trinkwasser

Als erste Maßnahme aus der Empfehlung der TWK resultierte die kostenlose Abgabe von abgepacktem Wasser an Schwangere und Säuglinge im Ort Neheim, da hier der vorsorgliche Maßnahmewert für Säuglinge von 0,5 µg/L PFOA+PFOS im Trinkwasser überschritten war. Das zuständige Wasserwerk „Möhnebogen“ wurde kurzfristig mit einer Aktivkohlefilterung ausgestattet, mit der die Konzentration an PFOA im Trinkwasser unter den Leitwert von 0,3 µg/L reduziert werden und die Abgabe des abgepackten Trinkwassers wieder eingestellt werden konnte. Dies war erforderlich, da die Trinkwasserversorgung der Bevölkerung aufgrund fehlender Verbundleitungen nicht durch ein anderes Wasserwerk erfolgen konnte.

Die fast identischen PFOA-Gehalte im Trinkwasser und im jeweils zugehörigen Rohwasser der Ruhr zeigen, dass das an der Ruhr praktizierte Trinkwassergewinnungsverfahren der künstlichen Grundwasseranreicherung und ebenso die Uferfiltration als „naturnahe Aufbereitungsverfahren“ für eine Stoffgruppe wie die perfluorierten Tenside nicht in der Lage sind, diese Substanzen aus dem Rohwasser zu entfernen. Daher sollen die anderen Wasserwerke unterhalb der Möhнемündung, die geringere PFT-Gehalte im Trinkwasser als das Wasserwerk „Möhnebogen“ aufwiesen, in den nächsten Jahren auch mit zusätzlichen Aufbereitungsschritten wie Aktivkohlefilterstufen ausgestattet werden.

Durch das Talsperrenmanagement an der oberen Ruhr wurde übergangsweise versucht, durch gezielte Abgabe größerer Mengen unbelasteten Oberflächenwassers in die Ruhr, die PFT-Konzentrationen durch Verdünnen abzusenken, um den Wasserwerken an der Ruhr ein geringer belastetes Rohwasser für die künstliche Grundwasseranreicherung zur Verfügung zu stellen.

1.5.2.3. Kontaminationsquelle des Oberflächenwassers

Anhand der vorliegenden Daten der Oberflächenwasserbelastung der oberen Möhne und zusätzlicher Untersuchungen konnten die Behörden eine 10 Hektar große Fläche (ehemalige Weihnachtsbaumkultur) bei Brilon-Scharfenberg als eine starke Kontaminationsquelle identifizieren [MUNLV NRW 2006]. Diese Fläche sowie fast 800 weitere Flächen im Hochsauerlandkreis und im Kreis Soest waren in den Jahren 2000 bis 2006 mit 27.700 Tonnen eines als „Bodenverbesserer“ bezeichneten Abfallgemisches gemäß Bioabfallverordnung [Bioabfallverordnung 1998] eines Bodenmischwerkes aus Paderborn-Borchen beaufschlagt worden, dem teilweise in krimineller Absicht industrielle Abfälle beigemischt wurden. Insgesamt wurden 53.000 Tonnen Abfallgemisch auf mehr als 1.300 Flächen in Nordrhein-Westfalen ausgebracht [Delschen et al. 2007]. Untersuchungen an dieser Flächen ergaben für die meisten Fälle keine oder nur sehr geringe PFT-Belastungen, einige Flächen waren höher belastet. Die stärkste PFT-Belastung wurde bis jetzt auf besagter Fläche bei Brilon-Scharfenberg gefunden mit einem Summengehalt PFOA+PFOS von 6.300 µg/kg Trockenmasse [Bergmann et al. 2008]. Durch Auswaschungen gelangten die perfluorierten Tenside (vor allem PFOA) von dieser landwirtschaftlichen Fläche über die beiden kleinen Bäche Bermecke und Steinbecke in die Möhne und später in die Ruhr. Eine ähnliche durch das Abfallgemisch belastete Weihnachtsbaumkultur ist auch für die Kontamination der Elpe und der Ruhr hinter Bestwig verantwortlich. Gegen die Betreiber des Bodenmischwerkes laufen kriminalpolizeiliche Ermittlungen.

Da eine Sanierung der hochbelasteten Fläche in Scharfenberg durch Bodenabtrag, -austausch oder -dekontamination aufgrund der Größe der Fläche als unverhältnismäßig aufwändig und kostenträchtig erachtet wurde, ließ der Kreis mit finanzieller Hilfe des Landes Nordrhein-Westfalen eine Drainage mit anschließender Aktivkohlefilterungsanlage errichten, um die weitere Belastung der Möhne und der Ruhr zu verringern.

1.5.2.4. Human-Biomonitoring-Studie

Ende 2006 wurde die von der Trinkwasserkommission empfohlene Human-Biomonitoring-Studie bei Bewohnern der durch besonders hohe PFOA-Konzentrationen im Trinkwasser belasteten Stadtteile von Arnsberg (Neheim, Hüsten, Herdringen und Bruchhausen) durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden Personen aus Siegen und Brilon untersucht, deren Trinkwasser nachweislich nicht mit perfluorierten Tensiden belastet war. In den belasteten Gebieten Arnsbergs wurden Einschulungskinder und deren Mütter (Kontrollgruppe: Siegen) und männliche Einwohner (Kontrollgruppe: Brilon) auf ihren Gehalt an PFOA, PFOS, PFBS, PFHxS, PFHxA und PFPeA im Blutplasma untersucht. Detailliert wurde auch der individuelle Trinkwasserkonsum erfasst.

Die Untersuchungen [Hölzer et al. 2008] zeigten, dass die PFOA-Konzentrationen im Blutplasma bei den untersuchten Kindern, Frauen und Männern in den betroffenen Stadtteilen Arnsbergs deutlich höher lagen als in den jeweiligen Kontrollregionen. Die Unterschiede waren statistisch signifikant. Die Medianwerte der Arnsberger Kollektive sind 4,5-fach (Kinder), 4,7-fach (Männer) bzw. 8,4-fach (Mütter) höher als die der jeweiligen Kontrollgruppe.

PFOA war dabei die dominierende perfluorierte Verbindung im Blut der untersuchten Bevölkerungsgruppe aus Arnsberg. PFPeA und PFHxA wurden in keinem Fall nachgewiesen. PFBS war in der Mehrzahl der Fälle nicht nachweisbar, PFOS- und PFHxS-Gehalte im Blutplasma waren bei erhöhten PFOA-Gehalten ebenso, jedoch auf niedrigerem Niveau erhöht.

Des Weiteren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen konsumierter Trinkwassermenge und PFOA-Konzentration im Blutplasma der Probanden ermittelt werden. Bei Männern war der Einfluss des Trinkwasserkonsums auf den PFOA-Plasmaspiegel am stärksten ausgeprägt: Im Bereich der täglich konsumierten Trinkwassermenge von 0,25 Liter bis über 1,5 Liter stiegen die mittleren PFOA-Werte im Plasma von etwa 15 auf 40 µg/L an.

Im Trinkwasser der betroffenen Arnsberger Stadtteile war PFOA mit nahezu 90% Anteil im Spektrum der perfluorierten Verbindungen die vorherrschende Substanz. In den Arnsberger Kollektiven spiegelte sich dieses Verhältnis auch im Blutplasma wieder. Die PFOA-Gehalte im Plasma waren dort deutlich höher als die PFOS-Werte. In den erwachsenen Kontrollkollektiven war, wie auch in anderen Untersuchungen der erwachsenen Normalbevölkerung in Deutschland gezeigt wurde [Midasch et al. 2006, Fromme et al. 2007], ein Überwiegen der PFOS-Gehalte im Blutplasma festzustellen.

1.5.2.5. EU-Beschränkung für die Verwendung von PFOS

Im Eindruck der PFT-Kontamination an Ruhr und Möhne und im Trinkwasser der betroffenen Gebiete konnte Ende 2006 ein derzeit laufendes EU-Gesetzgebungsverfahren zur Verwendungsbeschränkung von PFOS beschleunigt abgeschlossen werden [EU-Parlament und EU-Rat 2006]. Die Richtlinie 2006/122/EG vom 12.12.2006 schränkt das Inverkehrbringen und Verwenden von PFOS stark ein. Desweiteren wurde zusätzlich ein Passus aufgenommen, der PFOA unter eine verstärkte Risikoüberwachung stellt, da man sich trotz eines vermuteten vergleichbaren Risikoprofils noch nicht auf eine ebensolche Beschränkung wie bei PFOS einigen konnte.

1.6. Ausblick

Aufgrund der Persistenz der längerkettigen perfluorierten Verbindungen und den jetzt beschlossenen Verwendungsbeschränkungen von PFOS (einschließlich der besonderen Beobachtung von PFOA) ist ein Umsteigen in der Industrie auf kürzerkettige Verbindungen zu beobachten. So ist PFBS die vorherrschende Substanz aus der Stoffgruppe der perfluorierten Verbindungen, die im Rhein gefunden wird. PFBA konnte zeitweise im Bereich von 100 ng/L im Trinkwasser der Stadt Düsseldorf gefunden werden (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV-NRW), persönliche Mitteilung); in Lippstadt-Eikeloh wurde das Wasserwerk aufgrund des Auftretens besonders der kurzkettigen Perfluorcarbonsäuren in Summenkonzentrationen bis 2 µg/L geschlossen.

Im Auftrag des Landes Nordrhein-Westfalen wurde daher in Zusammenarbeit mit dem LANUV-NRW die Anreicherungsmethode im Hinblick auf eine Optimierung bezüglich der kurzkettigen PFT (speziell PFBA) weiterentwickelt. 2007 und 2008 wurde eine Anreicherungs- und Aufreinigungsmethode auf einem schwachen Anionenaustauscher auf Polymerbasis entwickelt (Anhang A) und im Rahmen eines Arbeitskreises der Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke an der Ruhr (AWWR) für Trink-, Roh- und Oberflächenwasser validiert. Eine weitere Überprüfung der Methode erfolgte durch die erfolgreiche Teilnahme an einem bundesweiten Ringversuch im April 2008 (Anhang B). Am 1. April 2008 wurde im Normenausschuss Wasserwesen des DIN (Deutsches Institut für Normung) der Arbeitskreis 19 „PFC in Wasser“ gegründet (AK 19 im DIN NA 119-01-03-02), der auf Grundlage der für das Land NRW entwickelten Methode für die kurzkettigen PFT (Carbonsäuren C4 – C10, Sulfonsäuren C4, C6, C8) eine Vorlage für einen Normentwurf für die PFT-Analytik in Wasser einschließlich geklärtem Abwasser in den nächsten zwei Jahren erarbeiten soll.

Neben diesen Aktivitäten sollte überprüft werden, ob eine Methodenerweiterung oder -abänderung für die Erfassung weiterer teilfluorierter Substanzen wie Fluortelomeralkohole oder Fluortelomercarbonsäuren möglich ist, da die Alkohole mögliche Precursoren der perfluorierten Carbonsäuren darstellen. Die Fluortelomercarbonsäuren bieten aufgrund ihrer Teilfluorierung bessere biologische Abbaumöglichkeiten und sind daher als mögliche Ersatzstoffe für die perfluorierten Carbonsäuren zu sehen.

Kapitel 2

Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters

2. Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters*

Thorsten Christian^a, Rudolf J. Schneider^a, Harald A. Färber^b, Dirk Skutlarek^b, Michael T. Meyer^c, Heiner E. Goldbach^a

^a Institute of Plant Nutrition, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, 53115 Bonn, Germany

^b Institute for Hygiene and Public Health, University of Bonn, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany

^c United States Geological Survey, Ocala Water Quality and Research Laboratory, Ocala, Florida, 34474-5731, USA

Correspondence: T. Christian, E-mail: thorsten.christian@uni-bonn.de

* Paper presented in parts as a poster at the annual meeting of the Water Chemical Society – a division of the German Chemical Society (Wasserchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker), Eichstätt/Altmühltal, May 2002.

Acta hydrochim hydrobiol **31** (2003) 36–44

Abstract

In the last years more and more often detections of antimicrobially active compounds “antibiotics”) in surface waters have been reported. As a possible input pathway in most cases municipal sewage has been discussed. But as an input from the realm of agriculture is conceivable as well, in this study it should be investigated if an input can occur via the pathway application of liquid manure on fields with the subsequent mechanisms surface run-off/interflow, leaching, and drift. For this purpose a series of surface waters, soils, and liquid manures from North Rhine-Westphalia (Northwestern Germany) were sampled and analyzed for up to 29 compounds by HPLC-MS/MS.

In each of the surface waters antibiotics could be detected. The highest concentrations were found in samples from spring (300 ng/L of erythromycin). Some of the substances detected (e.g., tylosin), as well as characteristics in the landscape suggest an input from agriculture in some particular cases. In the investigation of different liquid manure samples by a fast immunoassay method sulfadimidine could be detected in the range of 1-2 mg/kg. Soil that had been fertilized with this liquid manure showed a content of sulfadimidine extractable by accelerated solvent extraction (ASE) of 15 µg/kg dry weight even 7 months after the application. This indicates the high stability of some antibiotics in manure and soil.

Keywords: ELISA, LC-MS, Solid-phase Extraction, Accelerated Solvent Extraction, ASE, Recovery, Pharmaceuticals

Zusammenfassung

Bestimmung von Antibiotikarückständen in Gülle, Boden und Oberflächengewässern

In den letzten Jahren wurde vermehrt von Befunden antimikrobiell wirksamer Substanzen („Antibiotika“) in Oberflächengewässern berichtet. Dabei wurde als Eintragspfad meist kommunales Abwasser diskutiert. Da aber auch ein Eintrag aus dem Bereich der Landwirtschaft möglich scheint, sollte hier untersucht werden, ob über den Weg der Gülleausbringung auf Felder mit den anschließenden Mechanismen Oberflächen-/Zwischenabfluss, Versickerung und Abtrift ebenfalls ein Eintrag erfolgt. Dazu wurden verschiedene Oberflächengewässer, Böden und Gülle

in Nordrhein-Westfalen zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt und auf bis zu 29 Wirkstoffe mit HPLC-MS/MS untersucht.

In jedem der untersuchten Gewässer konnten Antibiotika nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen wurden in Proben aus dem Frühjahr gefunden (Erythromycin mit 300 ng/L). Bestimmte gefundene Substanzen (z.B. Tylosin) sowie landschaftliche Gegebenheiten lassen in Einzelfällen auf einen Eintrag aus der Landwirtschaft schließen. Bei der Untersuchung verschiedener Gülleproben mittels einer Immunoassay-Schnellmethode konnte Sulfadimidin im Bereich von 1-2 mg/kg nachgewiesen werden. Boden, der mit dieser Gülle gedüngt worden war, wies auch 7 Monate nach der Ausbringung noch einen Gehalt an mit beschleunigter Lösungsmittlextraktion extrahierbarem Sulfadimidin von 15 µg/kg Trockenmasse auf. Dies weist auf die hohe Stabilität mancher Antibiotika in Gülle und Boden hin.

Schlagwörter: ELISA, LC-MS, Festphasenextraktion, Beschleunigte Lösungsmittlextraktion, ASE, Wiederfindungsrate, Pharmaka

2.1. Introduction

Antimicrobially active compounds (vulgo “antibiotics”) make up a large group of pharmaceuticals, which are widely used for the abatement of bacterial infections with humans and also with animals. Therefore, they are some of the most prescribed pharmaceuticals.

In the European Union (EU) (including Switzerland) in 1997 the total amount of antibiotics used was 12,752 t. 7,659 t were used in human therapy and 5,093 t were applied in the veterinary sector, which is subdivided in

- 1) antibiotics for therapeutic use with animals (in order to defeat or prevent an infection),
- 2) antibiotics, which are used as feed additives to accelerate growth (growth promoters).

For the first purpose in 1997 3,494 t were used, and for the second (i.e., as growth promoters), 1,599 t [FEDESA 2001]. In the last years a couple of substances has been prohibited by EU legislation for their use as growth promoters, due to the assumption that an increasing medication with antibiotics in subtherapeutic dosage can cause resistance in bacteria, which makes therapy more and more difficult, because less substances are able to combat an infection. At this moment within the EU there are only four antibiotics left as feed additives: salinomycin, monensin, avilamycin, and flavomycin, as since 1996 seven antibiotics were prohibited (avoparcin, zinc-bacitracin, tylosin, spiramycin, virginiamycin, carbadox, and olaquinox) [Bundestierärztekammer 2001]. It is intended to ban even the last four growth promoters until January 2006 [EU-Kommission 2002].

Perhaps due to this regulation, the amount of antibiotics used as feed additives has dropped to its half, to 786 t in 1999, while the amount for human and also for animal therapy increased by 12%, so that in 1999 an overall mass of 13,216 t of antibiotics has been used.

Considering a reported mean degradation rate of 50-60%, it becomes obvious that several thousand tons of antibiotics will enter the environment each year via excretion. Yet there are differences. Some of the substances are relatively inert in the body, e.g., amoxicillin or tetracycline with a degradation rate of only 10-20%, whereas some, e.g., sulfamethoxazole, are degraded to about 85% [Hirsch et al. 1999]. Another problem is that some of the active agents are metabolized to conjugates, e.g., to their acetylated metabolites, becoming inactive and analytically camouflaged, but in manure the acetyl group can be cleaved, releasing the original active ingredient.

After excretion, antibiotics and their metabolites can reach surface waters via different pathways. On passing sewage treatment plants (STP), anthropogenic wastewaters undergo some reduction in contaminant load, but not a complete elimination. Thus, with the effluents, the remainders of

the antibiotics can get into the receiving surface waters, like creeks, rivers, or streams. By deploying sewage sludge which may contain some of the more apolar compounds, as top soil dressing on fields, another input of antibiotics into the environment is possible.

The pathway we concentrated on is the fate of antibiotics used for animal husbandry. The excretions are usually collected in manure storage tanks, where sometimes only little degradation takes place [Langhammer 1989]. After top soil dressing with the contaminated manure there are several pathways possible leading into the aquatic cycle: input via drift during manuring, even an accidental direct input, surface run-off from treated fields, and eventually leaching of residues to deeper soil layers and finally into groundwater.

Our objective was to verify, if animal husbandry can be a source of antibiotic residues showing up in the aquatic environment and to assess conditions for the occurrence, loads, and variability of these residues. Unfortunately it is not straightforward to decide, if antibiotics residues detected in river water originate from human or veterinary use, because the pharmaceuticals are often, not always, permitted for both areas (e.g., benzylpenicillin). Fortunately some are allowed either for humans or for animals, (e.g., enrofloxacin just for veterinary use and ciprofloxacin for human use only). Only with feed additives a principle rule that only such agents can be used which are not allowed in human medicine [Teuber 2000].

To discriminate residues' origins, we sampled various surface waters and analyzed them by LC-MS/MS on more than 20 antibiotics, covering the main antibiotic classes, permitted for animal as well as human therapy. Additionally, liquid manure and (top-dressed) soil samples were analyzed by an ELISA for sulfadimidine (sulfamethazine), an antibiotic, which is only permitted in pharmaceuticals for animals.

2.2. Materials and methods

Unless otherwise stated, all solvents were of HPLC grade. Ultrapure water was obtained by running demineralized water through a Milli-Q water purification system (Millipore, Eschborn). Nitrogen for SPE cartridge drying and evaporation was of quality 5.0.

2.2.1. Water samples

2-liter surface water samples were taken at 16 river banks in Southern North Rhine-Westphalia (Greater Cologne-Bonn) in November 2001 and April 2002. All samples were filled into brown glass bottles and were placed in the refrigerator (4°C) as soon as possible until sample preparation (< 3 days). Eight additional surface water samples were taken in winter 2001/2002 (from Dec. 2001 to Feb. 2002) in Eastern Westphalia, region Lower-Rhine, and in the region Rhine-Sieg (close to Bonn).

2.2.2. Liquid manure and soil samples

Liquid manure samples were collected in October 2001 and January 2002 from different farms with animal husbandry (cattle resp. swine) in Eastern Westphalia and the Lower-Rhine region. The samples were filled into glass bottles and were stored in the refrigerator.

The soil sample (top-soil layer, 0-20 cm, frozen) was collected in January 2002 from a field in Eastern Westphalia, which had been fertilized with swine liquid manure seven months before, in May/June 2001. At the sampling date it was planted with wheat, before that with barley.

2.2.3. Solid-phase extraction (SPE) for water sample enrichment

The water samples were extracted by SPE at the Institute for Hygiene and Public Health, University of Bonn, by using 200 mg of SDB-2 (Baker, Phillipsburg, NJ, USA, Prod. No. 7523) and 200 mg of OASIS HLB (Waters, Milford, MC, USA, Part No. 186000683) as SPE adsorbents.

The two cartridges were each conditioned with one cartridge volume of methanol and with 3 cartridge volumes of Milli-Q-water, without letting the packing run dry; then the cartridges were plugged together (OASIS cartridge on top of the SDB cartridge) and filled with Milli-Q water of pH 4.0. 500 mL of the water samples were filtered through a glass-fibre filter and adjusted to pH 4.0 ± 0.1 with sulfuric acid (1 N). 200 mg of EDTA di-potassium salt was added (resulting in a ca. 1 mM sample). Then 500 mL of the sample were percolated through the cartridges by a peristaltic pump at a flow rate of 7.5-10 mL/min. Washing was performed by 2 cartridge volumes of Milli-Q water at pH 4.0. The cartridges were separated and only the OASIS HLB cartridge was dried in a stream of nitrogen until no moisture was visible (ca. 1 hour). The moist SDB-2 cartridge was eluted with 4 x 1 mL of a mixture of methanol:formic acid, 100:1, v/v. This eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The OASIS HLB cartridge was eluted with methanol 4 x 1 mL, the eluate reduced to about 1 mL and transferred to the SDB-2 residue, by rinsing the collection tube with methanol 3 x 0.5 mL. The combined extracts were brought to dryness in a water bath (35°C) under a gentle stream of nitrogen and the residue was redissolved in 0.5 mL of a mixture of water:acetonitrile (95:5, v/v) by treatment in an ultrasonic bath for 1 min and, if needed, another filtration through a 0.45 µm PTFE membrane filter. Recoveries have been determined with spiked drinking water samples at two different concentration levels.

Recoveries varied dependent on the nature of the substance and the concentration level. The recoveries of all studied compounds are given in Table 2.1. These values were calculated with a conservative approach and rounded down. This means that they represent minimum values of recovery expected in unknown surface water samples. For the calculation of results recoveries at the 100 ng/L level have been used.

Table 2.1: 29 antibiotics studied (recovery at 1 ng/L, recovery at 100 ng/L, limit of quantification (LOQ) ρ, ng/L)

β-lactam Antibiotics	Macrolides	Sulfonamides (incl. Trimethoprim)	Fluoro- quinolones	Tetracyclines
Amoxicillin (n.d., 89, 5)	Azithromycin (94, 100, 1)	Trimethoprim (177, 78, 2)	Ciprofloxacin (n.d., 95, 5)	Chlorotetracycline (n.d., 88, 10)
Ampicillin (48, 76, 5)	Clarithromycin (134, 84, 0.5)		Ofloxacin (68, 66, 2)	Doxycycline (n.d., 78, 10)
Benzylpenicillin (130, 75, 5)	Clindamycin (103, 62, 1)	Sulfadimidine (154, 95, 2)		Oxytetracycline (n.d., 92, 10)
Cloxacillin (123, 91, 5)	Erythromycin (109, 95, 2)	Sulfamethoxazole (203, 100, 2)		Tetracycline (n.d., 94, 10)
Dicloxacillin (123, 91, 5)	Roxithromycin (121, 97, 2)			
Flucloxacillin (135, 106, 5)	Spiramycin (82, 65, 2)			
Methicillin (128, 72, 5)	Tylosin (166, 105, 2)			
Mezlocillin (131, 99, 5)	Vancomycin (n.d., 106, 30)			
Nafcillin (103, 86, 5)				
Oxacillin (93, 98, 5)				
Phenoxymethyl- penicillin (126, 108, 5)				
Piperacillin (140, 85, 5)				

n.d.: not detectable

2.2.4. HPLC and MS/MS conditions

HPLC analysis of the water samples was performed at the Institute for Hygiene and Public Health. The HPLC system was an Agilent 1100 system. The mass spectra were obtained on a tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, API 2000) with electrospray ionization in the positive ion mode (ESI(+)). The stationary phase was a Phenomenex SYNERGI™ Hydro-RP C18, 4.0 µm column. Elution started with 100% aqueous eluent. The method, which allows the determination of 29 antibiotics, will be described in detail in a follow-up publication (Skutlarek and Färber, in preparation). Each substance was identified via its protonated molecular ion (M+H)⁺ (precursor mass) and one confirming corresponding ion as shown in Table 2.2. Recoveries for high and low concentration levels are given in Table 2.1 together with the over-all limits of quantitation reached.

Table 2.2: MS-MS parameters

Substance	Precursor mass mostly (M+H) ⁺	Corr. ion	Substance	Precursor mass mostly (M+H) ⁺	Corr. ion
Amoxicillin	365.9	114.1	Azithromycin	375.3	83.2
Ampicillin	349.9	106.0	Clarithromycin	748.4	158.2
Benzylpenicillin	334.9	159.9	Clindamycin	425.0	126.3
Cloxacillin	436.0	160.0	dH-Erythromycin	716.4	158.2
Dicloxacillin	469.9	159.9	Roxithromycin	837.2	158.1
Flucloxacillin	453.9	159.9	Spiramycin	422.4	174.2
Methicillin	381.0	165.1	Tylosin	916.2	174.2
Mezlocillin	539.9	296.1	Vancomycin	725.4	143.9
Nafcillin	415.0	198.9			
Oxacillin	402.0	159.9	Ciprofloxacin	332.0	288.1
Phenoxymethylpenicillin	350.9	160.1	Ofloxacin	362.0	318.1
Piperacillin	518.1	143.1			
			Chlorotetracycline	479.0	443.9
Trimethoprim	291.0	230.2	Doxycycline	445.0	428.0
			Oxytetracycline	461.0	426.0
Sulfadimidine	279.0	186.1	Tetracycline	445.0	410.2
Sulfamethoxazole	253.9	156.0			

dH: dehydrato

2.2.5. Analysis of liquid manure and soil

2.2.5.1. Extraction of liquid manure samples

Manure samples were diluted with ultrapure water (1:10) and extracted by ultrasonic treatment for 5 min at room temperature. After sedimentation an aliquot of the supernatant was taken, filtered through a 0.45 µm PTFE membrane filter and diluted (1:100) with ultrapure water without pH adjustment to fit the measurement range of the ELISA test.

2.2.5.2. Extraction of soil samples

Soil samples were extracted with an ASE[®] 200 system from Dionex (accelerated solvent extraction). About 10 g of the soil sample were filled into 11 mL cartridges between layers of "hydromatrix" (bulk Isolute[®] HM-N Sorbent, I.S.T., Mid Glam, UK, Part No. 9800-1000) and extracted with a methanol:water mixture (80:20, v/v). The extraction parameters that had been optimized with model soil samples were: temperature 100°C, pressure 140 bar, heat phase 5 min, static extraction for 10 min, 3 cycles, cell flushing with 50 % of the cell volume each, purge time 60 sec. After the extraction procedure, the methanol was evaporated on a rotary evaporator at 40°C and 120 mbar. The mainly aqueous residue was diluted appropriately with ultrapure water and filtered through a 0.45 µm filter (GHP Acrodisc[®] 13 mm Syringe Filter, Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA, Part No. 4554T).

Previous experiments with three German standard soil samples (sandy loam, loamy sand, sand), spiked, equilibrated in moist status for 16 h, and slowly dried at 40°C during 6 days ("aged residues"), gave extraction recoveries between 30-50% with this method.

2.2.5.3. ELISA

The ELISA test used had been developed for the determination of sulfadimidine (SDM, sulfamethazine) in milk, plasma, urine, and tissue [Fránek et al. 1999]. We optimized it for the analysis of SDM in environmental samples. The dilution of the antiserum was then 1:50,000 and the dilution of the tracer solution were 1:25,000. With an incubation time of 15 min, a limit of detection (LOD) of ca. 10 ng/L could be reached (blank – 2 SD, $n = 10$). Cross reactivities of structurally similar sulfonamides, sulfamethoxazole, and sulfadiazine, were determined to be below 0.1%.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Water samples

In all of the water samples at least one antibiotic was detectable. Even if the concentrations were often close to the limit of quantitation it is obvious that antibiotic compounds are widespread over the aquatic environment of the Land of North Rhine-Westphalia, i.e., Northwest Germany. Some of the substances have been found very often, whereas others have not been found at all.

2.3.1.1. Few detections: tetracyclines, β-lactams, fluoroquinolones

Tetracyclines (chlorotetracycline, doxycycline, oxytetracycline, and tetracycline) were not detected in a single sample. This is in agreement with the results of other studies which have shown that tetracyclines can sorb strongly to soil organic matter and mineral particles and are therefore rare to be found in the free form in surface waters [Hirsch et al. 1999, Hamscher et al. 2002, Tolls 2001, Samuelsen et al. 1992]. It is known that this binding is based on the ability of the tetracyclines to form complexes with double-charged cations, like calcium, which occur in high concentrations in soil [Samuelsen et al. 1992].

The situation was similar with the β -lactam antibiotics, which were detected just a few times. Five of the twelve investigated β -lactam antibiotics could be found at concentrations up to 48 ng/L, but on an average the level of the concentrations was less than 10 ng/L (see Fig. 2.1). Piperacillin was the most prevalent compound. It was found in five rivers resp. creeks.

Others were: amoxicillin, ampicillin, mezlocillin, and flucloxacillin. β -lactam antibiotics were merely found in autumn and winter (11 detected) instead of spring (2 detections). Benzylpenicillin, cloxacillin, dicloxacillin, methicillin, nafcillin, oxacillin, and phenoxymethylpenicillin were not detected. This is explicable by the poor stability of the β -lactam ring. It can be opened by β -lactamase, a widespread enzyme in bacteria, or by chemical hydrolysis. Due to these intact penicillins do not occur frequently in the environment [Myllyniemi et al. 2000].

Fluoroquinolones (ciprofloxacin (CFL) and ofloxacin (OFL)) occurred sporadically in samples at low concentrations (lower than 10 ng/L; one single sample with OFL at 20 ng/L).

2.3.1.2. Frequent detections: sulfonamides, macrolides, and lincosamides

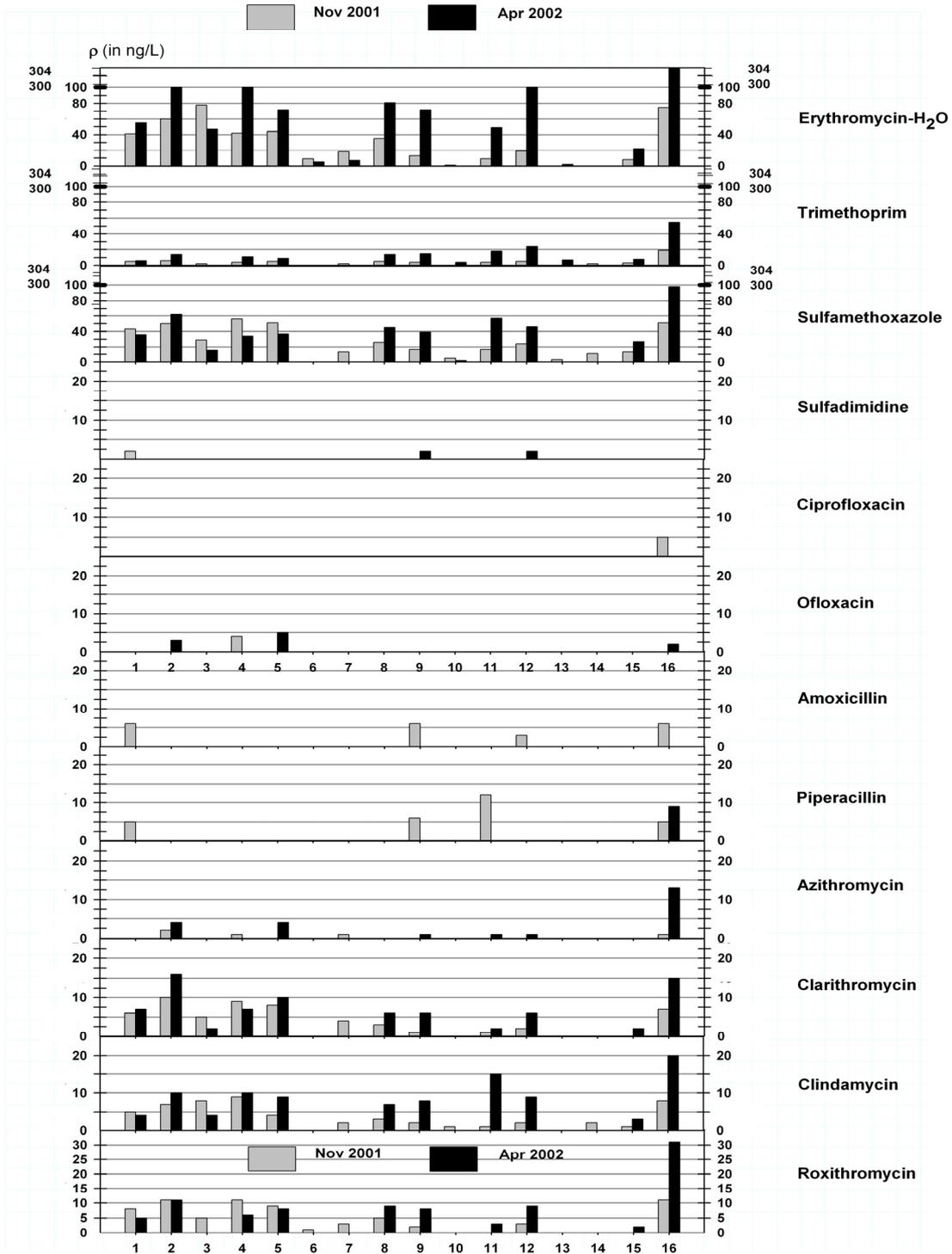
Antimicrobial sulfonamides and the sulfonamide synergist trimethoprim (TMP) were present in almost any sample. Sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim were detected in 34 respectively 30 out of 40 surface water samples. The TMP concentrations were mainly at the 10 ng/L level with peak concentrations up to 71 ng/L, and SMX concentrations varied greatly, often ranging between 40 and 50 ng/L but also up to 98 ng/L. SMX and TMP are substances which are used in Germany solely together in the same medicament, called Cotrimoxazol®. They are not available as single medical preparations. In Cotrimoxazol® there is a fixed mass ratio of SMX to TMP of 5:1 [BPI 2002]. Even after (1) metabolization (mainly acetylation) in the body to a different extent (SMX > 80%, TMP < 20%) [Hirsch et al. 1999], (2) probably different rates for the cleavage of the acetyl group in sewage treatment plants, and (3) different sorptivity to e.g., sewage sludge (TMP: $\log P_{ow} = 0.91$, SMX: $\log P_{ow} = 0.89$ [Hansch et al. 1995]), the dosage ratio of the two agents can still be seen in the aquatic environment in the fact that SMX occurs always in higher concentrations than does TMP.

Sulfadimidine has only been found in 6 of 40 samples from at the limit of quantitation (2 ng/L) up to 7 ng/L in a creek (Lemmer, region Lippe) in a landscape stamped by agriculture. Sulfadimidine is not used in human medicine in Germany, but for veterinary purposes. The low concentrations stand for a relatively small input from these agricultural sources.

The group of the macrolide antibiotics and the lincosamides was tested with eight substances (azithromycin, clarithromycin, clindamycin, erythromycin, roxithromycin, spiramycin, tylosin, and vancomycin). Only spiramycin and vancomycin have not been found in any sample. Azithromycin occurred in concentrations of a few ng/L to 13 ng/L. Residues of clarithromycin, clindamycin, and roxithromycin are rather uniformly distributed in the investigated rivers. Most samples showed concentrations around 10 ng/L, some up to 20 ng/L and 30 ng/L (see Fig. 2.1). In almost any of the surface waters examined these macrolides were present, concentrations increasing in spring, in contrast to the trend with β -lactam antibiotics.

The most prevalent antibiotic was erythromycin respectively dehydrato-erythromycin, which occurred in a wide concentration range, often above 50 ng/L with peak concentrations up to 130 ng/L and 300 ng/L. The compound is used in many drugs against acne and other skin diseases. We suppose that, due to a mainly cutaneous application form, metabolization in the body does not take place and the agent is possibly washed off the skin thus entering directly the wastewater without prior degradation. With this medication doses of about 100-400 mg per day are administered, often for periods of more than 3 months [BPI 2002]. Interestingly, sulfamethoxazole in its formulation together with trimethoprim (Cotrimoxazol®) is also an important anti-acne drug which in contrast to erythromycin is administered mostly orally. As mentioned above SMX has been found in most of the samples, too.

Figure 2.1: Concentrations of antibiotics in surface waters of North Rhine-Westphalia



- | | | | |
|---------------|--------------------------|---------------|-------------------|
| 1: Rhine | 5: Swistbach | 9: Sieg | 13: Strunder Bach |
| 2: Erft | 6: Jungbach | 10: Ahrenbach | 14: Bruchbach |
| 3: Rotbach | 7: Villicher Bach | 11: Bröl | 15: Dhünn |
| 4: Neffelbach | 8: Sieglahrer Mühlgraben | 12: Agger | 16: Wupper |

The antibiotic tylosin was only found in one single sample (Rotbach, region Erft) at 90 ng/L. Tylosin is not used in Germany for the therapy of infections for humans, but for animals and until 1999 as a growth promoter in feed additives. Therefore it is likely that this residue originates from animal husbandry if the input was not caused by a leakage at a manufacturer.

2.3.1.3. Component profiles

Although there were detections in every surface water studied, there were differences in their component profiles. In the river Wupper the highest concentrations were found. It is known that this river is highly influenced by sewage treatment plant (STP) effluents, with a percentage sometimes exceeding 50%. At one sampling time eleven antibiotics out of 29 analyzed for (11/29) could be detected in the Wupper, still 9/29 in the river Rhine that also crosses highly populated regions. But also in some remote small creeks, as the Rotterbach (cf. Table 2.3), a lot of substances could be found (11/29). In this case, a single STP effluent close to the sampling site can be held responsible for these amounts, because in this small creek an input of treated wastewater has a stronger impact than in a larger river. Thus, with regard to the regions where the samples were taken, there is no difference noticeable. Surface waters in Eastern Westphalia are similar to those in Southern North Rhine-Westphalia. The same effect could also be seen in surface water samples all over the USA [Kolpin et al. 2002, Lindsey et al. 2001].

The eight samples that were taken during winter 2001/2002 (six from Eastern Westphalia), showed nearly the same distribution of antibiotics as the other samples. So, with the exception of the Rotbach (ρ (tylosin) = 100 ng/L) there was no surface water in which an influence of antibiotics, used in animal husbandry, could be discovered. The samples in which sulfadimidine was detected (highest concentration 7 ng/L in the creek Emmer) indicate such an influence, but the concentrations were very low and the input has to be verified, by taking samples along transects of the water body. At this stage of the study, it cannot be stated that rivers in Eastern Westphalia, a region with intensive livestock farming and agriculture, are influenced in another way than the rivers in more urban Southern North Rhine-Westphalia.

Table 2.3: Antibiotics concentrations in different surface waters in East-Westphalia, region Lower Rhine and region Rhine-Sieg; ρ , ng/L; n.d.: not detectable

	Flucloxacillin	Piperacillin	Azithromycin	Clarithromycin	Clindamycin	Erythromycin	Roxithromycin	Trimethoprim	Sulfadimidine	Sulfamethoxazole	Ciprofloxacin	Ofloxacin
Nethe	n.d.	n.d.	n.d.	4	3	46	5	4	3	34	n.d.	n.d.
Weser	n.d.	n.d.	3	8	6	89	10	12	3	35	n.d.	5
Wörmkebach	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	135	12	3	n.d.	12	n.d.	n.d.
Emmer	n.d.	n.d.	1	2	5	49	6	n.d.	7	19	n.d.	n.d.
Niers	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pader	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.	4	n.d.	n.d.	n.d.	4	n.d.	n.d.
Boker-Heide-Kanal	n.d.	n.d.	n.d.	4	3	65	4	n.d.	n.d.	15	n.d.	n.d.
Rotterbach	7	48	2	37	24	190	14	8	n.d.	52	9	20

2.3.2. Liquid manure

In both of the investigated swine liquid manure samples, sulfadimidine (SDM) was found at levels around 1 mg/kg. In samples of cattle manure, SDM could not be detected (see Table 2.4). SDM is an agent which is often used in pig breeding for the treatment of diarrhoea and other intestinal infections. The drug Vetoprim® 24% e.g. contains SDM in a concentration of 100 mg/mL. For the treatment 1 mL is used per 10-15 kg body weight [Gebrauchsinformation Vetoprim 2002]. Thus 6-10 mg SDM are administered daily per kg live weight. Assuming a daily weight of pig slurry per kg live weight of 0.1-0.2 kg [Kühne et al. 2000] a content of SDM in the slurry of 30-100 mg/kg can be expected. If just one pig out of 100 is treated with this drug on each day, the amounts in the total slurry of this farm can easily reach the level found of 1 mg/kg assuming no degradation at all.

2.3.3. Soil

The content of SDM in the soil sample (dry weight) was 15 µg/kg. This is to be considered a minimum approach, as this result has not been corrected for recovery. Assuming a similar recovery as has been determined with model soil samples, this result could also be 30-50 µg/kg, assuming similar sorption. The corresponding field had been fertilized seven months before sampling with a swine liquid manure from the same origin as swine liquid manure 1 (Table 2.4), which contained 1.1 mg/kg of SDM. The common volumes of manure for fertilization are approximately 20,000-40,000 L/ha, i.e. 2-4 L/m². By doing so and considering just little variations in the content of SDM in a liquid manure of the same origin up to 5 mg SDM could have been deployed on 1 m² of the field. Other studies showed that tetracyclines could only be detected in the upper 30 cm of a fertilized soil [Hamscher et al. 2002]. So the supposed 5 mg of SDM could possibly penetrate 300 dm³ of the soil (density 1.74 g/cm³), which leads to a theoretical maximum residue of almost 10 µg/kg resp. up to 13 µg/kg based on dryweight. Remembering that the amount of 15 µg/kg was found seven months after fertilization, this finding suggests a high stability of the substance in soil.

Table 2.4: Contents of Sulfadimidine (SDM) in liquid manure and soil, measured by ELISA

Sample	Mode of extraction	Content of SDM*, referred to mass of liquid manure resp. to soil dry weight ± standard deviation of triplicate determinations
Swine liquid manure 1	ultrasound	1.1 ± 0.01 mg/kg
Swine liquid manure 2	ultrasound	1.0 ± 0.2 mg/kg
Cattle liquid manure 1	ultrasound	< 0.1 mg/kg
Cattle liquid manure 2	ultrasound	< 0.1 mg/kg
Soil (treated with swine manure 1)	ASE, 100°C 3 x 10 min	15 ± 0.4 µg/kg * not corrected for recovery

2.4. Conclusions

The investigation of the occurrence of antibiotics in surface waters of North Rhine-Westphalia showed that some representatives of this group of xenobiotics showed up in every sample. Even if the concentrations of most compounds were less than 30 ng/L, some occurred in higher concentrations up to 300 ng/L, as can be seen with erythromycin and sulfamethoxazole.

Most of the substances possibly originate from discharge of sewage into rivers. An influence of animal husbandry on the occurrence of antibiotics in surface water could only be assumed for a couple of samples. Even with the sampling sites widespread over North Rhine-Westphalia, no significant differences between urban and rural regions in the occurrence of antibiotics have been observed. Yet contaminations in rivers can safely be judged only by calculating loads but flow data was not available to us.

The results for sulfadimidine (SDM) in liquid manure and soil indicate that SDM is highly stable in these matrices and that therapeutics from animal husbandry may enter the environment via application of manure. An effect on the aquatic environment is possible, if some unlucky instances occur, like weather conditions leading to drift during manure spreading, leaching or surface run-off. This has to be further investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry for Environment, Nature Protection, Agriculture and Consumer Protection of the Federal State North Rhine-Westphalia. We thank Dr. Milan Fránek, Veterinary Research Institute at Brno, Czech Republic, for kindly providing the anti-sulfadimidine antibody and a suitable tracer.

Kapitel 3

Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen

3. Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen

Harald Färber^a, Dirk Skutlarek^a
Jörg Alberti^b, Rolf-Reiner Reupert^b

^a Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn

^b Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen
Essen

Korrespondenzanschrift:
Dr. rer. nat. Harald Färber
e-mail: harald.farber@ukb.uni-bonn.de

Gewässerschutz – Wasser – Abwasser GWA **193** (2004) 24/1-24/16

3.1. Einleitung

Arzneimittel sind Zubereitungen von Arzneistoffen, welche definitionsgemäss zur Vorbeugung, Linderung, Heilung und Erkennung von Erkrankungen bei Mensch und Tier dienen. Als Arzneimittel zugelassene Wirkstoffe werden in Deutschland in der jeweils aktualisierten Fassung gelistet [Rote Liste 2000]. Arzneimittel sind daher unverzichtbarer Bestandteil des modernen Gesundheitswesens. Durch ihren - wirkstoffspezifisch - teilweise weitverbreiteten Einsatz stellen Arzneimittel auch eine bedeutende Gruppe der sogenannten anthropogenen „Umweltchemikalien“ dar, worunter man solche Stoffe verstehen kann, deren qualitatives oder quantitatives Auftreten in der Natur stark vom Menschen beeinflusst ist. Arzneimittel können entweder unverändert oder metabolisiert ausgeschieden werden und dann über den Abwasserpfad (Mensch) oder direkt über die Gülleausbringung (Tier) in die Umwelt gelangen. Andere mögliche Eintragspfade sind in einer unsachgemäßen Entsorgung (Toilette, Hausmüll) oder im Spezialfall der Aquakultur (Direktapplikationen in Gewässer) vorhanden. Daher sind neben den selbstverständlich erwünschten, in der modernen Medizin unverzichtbaren therapeutischen Wirkungen auch - teils außerhalb des eigentlichen Verwendungszwecks am Menschen oder am Tier - leider auch unerwünschte Effekte des Einsatzes von Arzneimitteln aus dem Human- und Veterinärbereich in der Umwelt aufgetreten.

Aufgrund der - aus therapeutischer Sicht - oftmals zwingend erforderlichen Arzneimittel-Eigenschaften wie z.B. der metabolischen Stabilität (bedingt die Problematik Persistenz) und Wasserlöslichkeit (bedingt die Problematik einer erhöhten Mobilität im aquatischen Milieu) sowie aufgrund ihrer teils hohen biologischen Aktivität (Beispiel Antiinfektiva, Zytostatika) sind neben den unverzichtbaren therapeutischen „Nutz“-Eigenschaften auch unerwünschte Effekte in der Umwelt aufgetreten.

In den vergangenen Jahren kam es daher zu einer verstärkten Aufmerksamkeit hinsichtlich des Nachweises von verschiedenen Wirkstoffen aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen (endokrin wirksame Substanzen, Lipidsenker, Betablocker, Psychopharmaka, Broncholytika, Antiepileptika, Antibiotika u.v.a.) [Heberer et al. 2001a, Heberer 2002d, HLFU Hessen 1998, Kümmerer 2001b, Sacher et al. 2001, Ternes 1998a, Ternes 2000b, Ternes 2001a]

So wurde eine Risikoabschätzung über Humanpharmaka in der Umwelt (Dänemark) u.a. von Stuer-Lauridsen publiziert [Stuer-Lauridsen et al. 2000]. Auch die EU erkannte 2001, dass die zunehmende Resistenz verschiedener Krankheitserreger gegen Antibiotika eine Gefahr für die Öffentliche Gesundheit darstellt [Empfehlung des Rates der EU 2001].

Vor diesem Hintergrund und den Berichten der letzten Jahre über die zunehmenden Resistenzen von Mikroorganismen gegenüber verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen und deren Ursachen - welche von erheblicher gesundheitspolitischer Relevanz sind [Bundesgesundheitsblatt 1989 - 1999, Feuerpfeil et al. 1999, Haarwood et al. 2001], sowie der unzureichenden Datenlage und dem Fehlen einer geeigneten analytischen Multimethode gab es 1999 Anlass zu einer vom Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Bonn ausgehenden Initiative zur Durchführung eines vom Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen geförderten Forschungsprojekts.

Im Rahmen dieses Projekts „Untersuchung von Krankenhausabwässern des Universitätsklinikums Bonn (UKB), von kommunalem Abwasser sowie von Oberflächenwasser und Uferfiltraten auf Rückstände ausgewählter Antibiotika“ (1999 - 2001) konnte eine analytische Multimethode zur empfindlichen und selektiven quantitativen Bestimmung von 29 antibiotischen Wirkstoffen aus verschiedenen Wirkstoffklassen mittels HPLC-MS entwickelt werden. Mit Hilfe des Verfahrens wurde nachfolgend eine Vielzahl von Proben aus den Matrices Abwasser, Rohwasser, Uferfiltrat sowie Trinkwasser untersucht.

in dieser Arbeit werden neben einigen Angaben zur Analytik vor allem einige Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst.

3.2. Allgemeines

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren zunächst Überlegungen zur Abschätzung der Verwendung von antibiotischen Wirkstoffen im Bereich eines Universitätsklinikums. Zur Festlegung der zu untersuchenden Parameter wurden daher Aufstellungen der Krankenhausapotheke zu den entsprechenden Abgabemengen zugrunde gelegt. Für das Jahr 2000 ergab sich für das Klinikum die Aufstellung der Tabelle 3.1.

Eine weitere Datenquelle zur bundesweiten Abgabe von Antibiotika war in den entsprechenden Ausgaben des Arzneiverordnungsreports [Arzneiverordnungsreport 1999 - 2002] gegeben. Im Arzneiverordnungsreport 2002 können z.B. folgende ungefähre Verbrauchsmengen für Deutschland angegeben werden (Tabelle 3.2).

Diese Zahlen sind zur zusätzlichen, hier nicht erfassten Berücksichtigung von Privatverordnungen mit einem Faktor von annähernd 1,2 zu multiplizieren.

Aus Tabelle 3.1 ergibt sich allein für das Universitätsklinikum im Jahr 2000 eine Abgabe von über 500 kg an antibiotischen Wirkstoffen an die verschiedenen Kliniken. Relevant waren hierbei vor allem die Wirkstoffe Piperacillin, Ampicillin, Cefuroxim, Sulfamethoxazol, gefolgt von Ciprofloxacin und Clindamycin

Tabelle 3.1: Antibiotikaverbrauch Universitätsklinikum im Jahr 2000 (in kg)

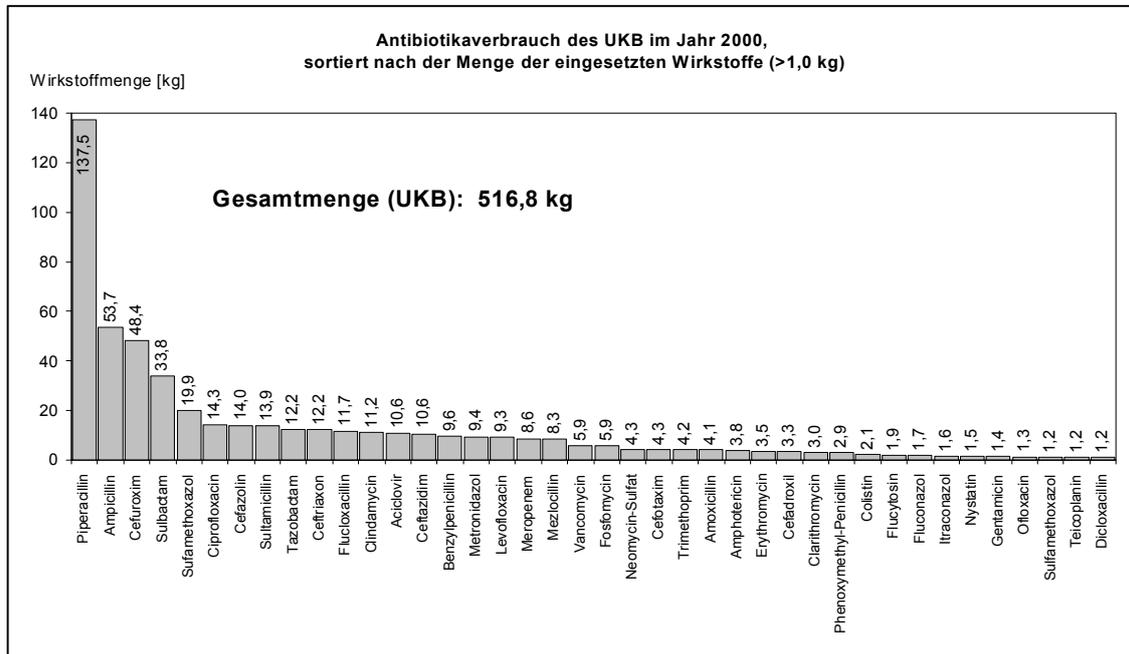


Tabelle 3.2: Jahresverbrauchsmengen von Antibiotika in Deutschland [Arzneiverordnungsreport 2002, Rote Liste 2000] (jeweils in t/a)

Wirkstoffklasse	Menge [t/a]
Penicilline (Amoxicillin, Ampicillin, Phenoxyethylpenicillin)	117,8 – 210,3
Cephalosporine	26,9 – 61,4
Makrolide (Erythromycin, Clarithromycin, Roxithromycin)	6,6 – 14,2
Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Ofloxacin)	3,2 – 5,4
Tetracycline (Doxycyclin, Minocyclin)	5,7 – 11,4
Sulfonamide (Sulfamethoxazol, Trimethoprim)	11,6 – 47,6
Summe:	171,8 – 450,3

Spitzenreiter bei den durch niedergelassene Ärzte (außerhalb der klinischen Bereichs) verordneten Mittel (nach Arzneiverordnungsreport 1999, Tabelle 3.2) waren: Phenoxyethylpenicillin, Amoxicillin, Doxycyclin, Sulfamethoxazol, gefolgt von den Makrolid-Wirkstoffen Erythromycin, Roxithromycin und Clarithromycin.

Weitere Wirkstoffe (Tylosin, Spiramycin) wurden aufgrund einer Liste des Bund-/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit [BLAC 2003] als untersuchungsrelevant angesehen. Im Einzelnen wurde daher eine Festlegung auf insgesamt 29 Antibiotika getroffen, darunter befanden sich 12 Penicilline, 8 Makrolide, 4 Tetracycline, 2 Fluorchinolone, 2 Sulfonamide und Trimethoprim. Bei der Auswahl der Substanzen wurden solche Wirkstoffe, welche ausschließlich im veterinärmedizinischen Bereich Anwendung finden, nicht berücksichtigt.

Untersuchte Wirkstoffe:

β -Lactam-Antibiotika: *Oralpenicilline und Aminopenicilline:* Piperacillin, Flucloxacillin, Mezlocillin, Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V), Benzylpenicillin (Penicillin G), Methicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nafcillin, Amoxicillin, Ampicillin, (Sultamicillin), (Cephalosporine: Cefuroxim, Ceftriaxon, Cefaclor),

Tetracycline: Doxycyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin,

Gyrasehemmer: Ciprofloxacin, Ofloxacin,

Sulfonamide: (Trimethoprim), Sulfamethoxazol, Sulfadimidin,

Makrolide: Erythromycin, Roxithromycin, Azithromycin, Clindamycin, Clarithromycin,

Glykopeptid: Vancomycin,

zusätzlich: Spiramycin, Tylosin,

jeweils als reiner Wirkstoff ohne Berücksichtigung von Metaboliten.

3.3. Material und Methoden

3.3.1. Probenahme

Die Probenahme erfolgte an verschiedenen Punkten:

1. Universitätsklinikum

Das Sammelabwasser des Klinikums wurde am zentralen Abwasserübergabepunkt, der sogenannten „Kaskade“ mittels eines einstellbaren automatischen Probenahmegeräts der Fa. Bühler, Tübingen, Typ PPE 84 entnommen. Es wurden in der Regel 24-Std-Mischproben entnommen, einige wenige Proben stellen 2-Std-Mischproben sowie 5- oder 7-Tage-Mischproben dar. An diesem Entnahmepunkt wurden in einem Zeitraum von 12/2000 bis 06/2001 insgesamt 28 Proben gezogen. Einzelne Teilströme von Kliniken oder Instituten wurden nicht separat beprobt. Das Sammelabwasser ist dadurch charakterisiert, dass hier alle Abwasserteilströme der einzelnen Institute und Kliniken sowie auch das Niederschlagswasser von versiegelten Flächen des Klinikums gemischt ankommen und von dort über eine Prallwand den Venusberg hinunter zunächst in ein unterirdisches Rückhaltebecken und weiter zur städtischen Kläranlage (300.000 EW) geleitet werden. Die jährliche Abwassermenge des Klinikums liegt bei durchschnittlich 280.000 m³/Jahr (Frischwasserverbrauch). Hierzu sind Niederschlagsmengen von ca. 90.000 m³/Jahr hinzuzurechnen, welche sich aus der an den Abwasserkanal angeschlossenen versiegelten Fläche des Klinikums (ca. 139.000 m²) sowie aus der durchschnittlichen Niederschlagsmenge für den Bereich Bonn (ca. 650 mm, Angaben durch Meteorologisches Institut Uni Bonn) berechnen lassen. Es resultiert daraus eine Gesamtabwassermenge von ca. 370.000 m³/Jahr.

2. Städtische Kläranlage (300.000 EW): Zu- und Abläufe

Die Probenahme erfolgte hier an zwei Stellen: Dem sogenannten Zulauf Süd, welcher die Abwässer des UKB enthält, sowie dem Ablauf des geklärten Abwassers in den Rhein. Die Entnahme wurde vom Betriebspersonal der Anlage bzw. von automatisierten Mischprobenziehern (Fa. Bühler) durchgeführt, wobei es sich an beiden Probenstellen jeweils um 24-Std-Mischproben desselben Tages handelte. Im Zeitraum zwischen 11/2000 und 06/2001 wurden an jeder Probenstelle 28 Proben gezogen.

3. Weitere Kläranlagen

Es wurden jeweils nur die Ausläufe von drei zusätzlichen, kleineren Anlagen beprobt, welche auf 2000 bzw. 3000 und 6500 EW ausgelegt sind.

4. Oberflächenwässer

Die Beprobung erfolgte jeweils als Stichprobe an folgenden Flüssen und Gewässern: Rhein, Werre, Ems, Bach im Stadtgebiet Bad Münstereifel (Höhengebiet), Bach im Rhein-Sieg-Kreis, Staugewässer. Der Zeitraum der Probenahmen erstreckte sich von 09/2000 bis Ende 2001.

5. Rhein-Uferfiltrate, Grundwasser, aufbereitete Wässer

Die Entnahme erfolgte an verschiedenen, aus Gründen des Datenschutzes nicht veröffentlichbaren, rheinnahen Brunnen, Pegeln und Wasserwerkszapfstellen jeweils als Stichprobe im Zeitraum 12/2000 bis 06/2001.

3.3.2. Extraktion

Die Anreicherung (Anreicherungsfaktor = 1000) der Substanzen aus den unterschiedlichen Wasserarten erfolgte mittels Festphasenextraktion an zwei verschiedenen Phasen (Baker SDB-2 und Waters Oasis HLB, genaue Angaben hierzu siehe Projekt-Abschlussbericht). Dieses Vorgehen war notwendig, um alle relevanten Substanzen mittels Multimethode mit entsprechend hohen (Sollvorgabe > 70%) Wiederfindungen aus dem Wasser extrahieren und nachweisen zu können. Dabei wurde bezüglich der bei einigen Substanzen teilweise etwas niedrigeren Wiederfindungen ein Kompromiss eingegangen: für diese können in der Regel unter speziellen Bedingungen - vor allem den pH-Wert und Trocknungsschritte, aber auch die Festphasenauswahl betreffend - noch höhere Werte erzielt werden, allerdings zu Lasten der dann teilweise drastisch zurückgehenden Wiederfindungen bei anderen Wirkstoffen. Die Wiederfindungen wurden mit unbelastetem Bonner Trinkwasser durchgeführt, Wiederfindungstests mit anderen Wasserarten (vor allem ungeklärte Abwässer) ergaben Signalunterdrückungen zwischen 30 und 50%.

3.3.3. HPLC- und MS-Angaben

Die Trennung der Analyten erfolgt apparativ auf einem Komplettsystem der 1100erSerie (Agilent Technologies, Waldbronn) nach folgendem Schema Tabelle 3.3):

Tabelle 3.3: HPLC-Parameter

HPLC-Bedingungen	
Trennaule	SYNERGI Hydro-RP 150 x 2,0 mm, 4 µm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), auch möglich SYNERGI Polar-RP in gleicher Dimension
Eluent	A: 0,1% Ameisensäure (Wasser) B: 0,1% Ameisensäure (Acetonitril)
Gradient	0 min 0% B 2 min 0% B 30 min 95% B 35 min 95% B
Flussrate	0,2 mL/min
Säulenofen-Temperatur	30 °C
Injektions-Volumen	10 µL

Nach der chromatographischen Trennung der Analyten erfolgte die Detektion der einzelnen Substanzen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie (API2000, Applied Biosystems, Darmstadt) im Multiple-Reaction-Mode (MRM) mit positiver Electrospray-Ionisierung (ESI+). Die Auswertung erfolgte über die Steuersoftware ANALYST 1.1, die Gesamtdauer einer Aufnahme betrug Incl. Äquilibrierung der HPLC insgesamt 60 min.

Weitere Einzelheiten (Geräteparameter und substanzspezifische Parameter) sind im Abschlussbericht des Projekts [Färber et al. 2003] angegeben.

3.4. Ergebnisse und Diskussion

3.4.1. Sammelabwasser der Universitätsklinikums

Die eigenen Untersuchungen für das Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn ergaben folgendes Bild (Tabelle 3.4):

Tabelle 3.4: Antibiotikakonzentrationen (Wirkstoff) im Sammelabwasser des Universitätsklinikums: (jeweils Mischproben, n = 28)

Wirkstoffklasse	Gehalt [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	Median [µg/L]	Hauptkomponenten
Penicilline	0,01 - 35,9	3,1	0,3	Piperacillin, Ampicillin, Mezlocillin, Flucloxacillin,
Makrolide	0,9 - 9,7	3,7	3,2	Clindamycin, Erythromycin, Clarithromycin,
Fluorchinolone (Gyrasehemmer)	3,0 - 32,8	14,7	14,7	Ofloxacin, Ciprofloxacin,
Sulfonamide	1,3 - 16,9	8,5	8,0	Sulfamethoxazol
Trimethoprim	1,1 - 8,0	3,2	2,7	
Tetracycline	0,04 - 0,5	0,17	0,13	Doxycyclin, Oxytetracyclin
Vancomycin	< 0,05 - 1,7	0,5	0,6	
Summe:	15,7 - 61,8	34,0	35,0	

In der Wirkstoffklasse der Penicilline konnten Ampicillin, Flucloxacillin, Mezlocillin und Piperacillin durchgängig nachgewiesen werden. Es ergaben sich mittlere Gesamtkonzentrationen von 3,1 µg/L, der Median lag bei 0,3 µg/L. Ampicillin und Piperacillin konnten als die beiden nach ihrer Wirkstoffmenge am häufigsten verabreichten Antibiotika im Universitätsklinikum Bonn jeweils mit Spitzenkonzentrationen von 6 bzw. 26 µg/L detektiert werden. Das Penicillin-Antibiotikum Piperacillin allein machte nach Angaben der Apotheke des Universitätsklinikums Bonn im Untersuchungszeitraum ein Viertel der Gesamtwirkstoffmenge aller im Universitätsklinikum verabreichten Antibiotika aus.

In der Gruppe der Makrolid-Antibiotika (Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin, Roxithromycin und Spiramycin) wurden die ersten vier genannten Vertreter und Clindamycin als Lincosamid-Antibiotikum konsistent in allen Proben nachgewiesen. Durchschnittliche Gesamtkonzentrationen von 3,7 µg/L mit Spannweiten von 0,9 bis 9,7 µg/L und einem zugehörigen Medianwert von 3,2 µg/L konnten für diese Wirkstoffe ermittelt werden. Erythromycin und Clindamycin nehmen dabei analog ihrer Verabreichungsmenge im Universitätsklinikum Bonn Spitzenpositionen ein. So konnten für Erythromycin (in Form des Dehydrato-Erythromycin) Konzentrationen von 0,05 bis über 7,1 µg/L gefunden werden. Neben Erythromycin war das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin mit Gehalten von 0,1 bis fast 3,5 µg/L nahezu durchweg nachweisbar.

Die ebenfalls zum Untersuchungsspektrum gehörenden Wirkstoffe aus der Klasse der Fluorchinolone (Ciprofloxacin und Ofloxacin) konnten im Sammelabwasser des Universitätsklinikums entsprechend ihrer häufigen Anwendung in der Klinikums-Therapie mit hohen mittleren Gesamtkonzentrationen und einem Median von je 14,7 µg/L bestimmt werden. Die Gesamtgehalte erreichten dabei maximale Werte von 32,8 µg/L (Ciprofloxacin: 13,8 µg/L; Ofloxacin: 24 µg/L). Hartmann et al. [Hartmann et al. 1998] wiesen in Krankenhausabwässern Ciprofloxacin-Konzentrationen von 3 bis 87 µg/L nach; die dort gemessenen Spitzenkonzentrationen lagen damit um den Faktor 6 höher als in den eigenen Untersuchungen.

An dieser Stelle sei bereits auf die toxikologischen und umweltökologischen Aspekte im Zusammenhang mit Ciprofloxacin hingewiesen, welchen eine hohe Relevanz beigemessen wird. Einzelheiten dazu werden in Kapitel 3.4.5. im Detail behandelt.

Das zur Gruppe der Sulfonamide gehörende Sulfamethoxazol konnte im Sammelabwasser des Universitätsklinikums Bonn im Mittel mit einem Gehalt von 8,5 µg/L (Spitzenwert: 17,0 µg/L, Median: 8,0 µg/L) bestimmt werden; Trimethoprim, das in der Regel als Kombinationspräparat in Verbindung mit Sulfamethoxazol (Verhältnis Sulfamethoxazol / Trimethoprim 5:1) verabreicht wird, war dementsprechend mit mittleren Konzentrationen von 3,2 µg/L (Median 2,7 µg/L) im Sammelabwasser nachweisbar, wobei Spitzen von bis zu 8,0 µg/L erreicht wurden. Innerhalb der Gruppe der Tetracycline (Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin) wurden die drei letztgenannten Vertreter im Sammelabwasser des Universitätsklinikums als Gesamtmenge mit Mittelwerten von 0,17 µg/L (Median: 0,13 µg/L) und Höchstwerten von 0,5 µg/L nachgewiesen.

Das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin, welches eine wichtige therapeutische Reserve gegen multiresistente Staphylococcus aureus- und Enterokokken-Stämme darstellt und bei Patienten mit lebensbedrohlichen MRSA-Infektionen eingesetzt wird, wurde im Universitätsklinikum Bonn im Jahre 2000 in einer Gesamtmenge von ca. 6 kg des reinen Wirkstoffs eingesetzt. Im Mittel konnte im Sammelablauf des Universitätsklinikums Vancomycin in einer Konzentration von 0,5 µg/L - mit Spitzenkonzentrationen bis zu 1,7 µg/L und einem Median von 0,6 µg/L - nachgewiesen werden.

3.4.2. Zu- und Abläufe von verschiedenen Kläranlagen

In den eigenen Untersuchungen am Zu- und Ablauf der kommunalen Kläranlage, in die auch das Sammelabwasser des Universitätsklinikums gelangt, ergab sich folgendes Bild (Tabelle 3.5):

Tabelle 3.5: Antibiotikakonzentrationen im Zulauf einer kommunalen Kläranlage (300.000 EW, jeweils 24-Std. Mischproben, n = 28)

Wirkstoffklasse	Gehalt [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	Median [µg/L]	Hauptkomponenten
Penicilline	<0,01 - 3,7	0,7	0,05	Piperacillin, Ampicillin, Amoxicillin, Mezlocillin, Flucloxacillin
Makrolide	0,2 - 1,3	0,8	0,7	Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin, Roxithromycin
Fluorchinolone (Gyrasehemmer)	0,02 - 1,4	0,5	0,3	Ciprofloxacin, Ofloxacin
Sulfonamide	0,2 - 1,7	1,0	1,0	Sulfamethoxazol
Trimethoprim	0,1 - 0,3	0,2	0,2	
Tetracycline	<0,02 - 0,17	(0,05)	(0,03)	Doxycyclin, Oxytetracyclin
Vancomycin	<0,05 - 0,1	(0,03)	(0,05)	
Summe:	1,4 - 4,6	3,0	4,0	

Wirkstoffe aus der Gruppe der Penicilline, vor allem Piperacillin und Ampicillin, zählen sowohl im Klinikbereich als auch im ambulanten Bereich (hier jedoch vor allem Phenoxymethylpenicillin und Amoxicillin (s. Tabelle 3.1) zu den am häufigsten verwendeten Antibiotika.

Erstaunlicherweise lassen sich zur Gruppe der Penicilline in der Literatur nahezu keine quantitativen Angaben für ihr Vorkommen in den verschiedenen Wasserkompartimenten finden. Heberer [Heberer 2002a] erklärt diesen Umstand mit der leichten Hydrolysierbarkeit dieser Substanzen.

Umso bemerkenswerter ist der Nachweis dieser Wirkstoffklasse mit den Hauptkomponenten Piperacillin, Ampicillin, Amoxicillin, Mezlocillin und Flucloxacillin auch im Zulauf der städtischen Kläranlage (EW 300.000) mit Summenkonzentrationen von 0,7 µg/L und medianen Werten von 0,05 µg/L, wobei Spitzenkonzentrationen von 3,7 µg/L gefunden werden konnten. Im Zulauf der Kläranlage führen die beiden verwendungsstärksten Penicilline im Universitätsklinikum - Piperacillin und Ampicillin - die Rangliste in dieser Wirkstoffklasse mit Spitzenwerten von 2,7 bzw. 0,4 µg/L an. Dies ist eindeutig als Hinweis auf eine Belastung des kommunalen Abwassers durch Krankenhausabwasser zu werten, da gerade diese beiden Substanzen für den ambulanten Bereich keine Rolle spielen.

Eine ähnliche Verteilung ergibt sich für den Ablauf (Tabelle 3.6) der städtischen Kläranlage. Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] konnten in den eigenen Untersuchungen Penicilline mit den Hauptkomponenten Piperacillin, Mezlocillin, Flucloxacillin mit einem Gesamtmittelwert von 0,1 µg/L (Median 0,09 µg/L) im Ablauf nachgewiesen werden. Einen Spitzenwert konnte auch hier das Piperacillin mit fast 0,5 µg/L erzielen. Im Ablauf einer ländlichen Kläranlage (2000 EW) wurde Amoxicillin im unteren ng/L-Bereich nachgewiesen.

Weitere Untersuchungen an Abläufen von zwei Kläranlagen kleinerer Kommunen (KA 1: 3000 EW, KA 2: 6500 EW, n = je 4) ergaben für Amoxicillin für den Ablauf der ersten Kläranlage Werte von 2 -24 ng/L (Mittelwert: 15 ng/L), die zweite Kläranlage wies im Ablauf relativ hohe Amoxicillingehalte von 0,1-0,5 µg/L (Mittelwert 0,3 µg/L) auf neben geringen Konzentrationen von

Ampicillin (2-26 ng/L). Der letztere Fund kann durch die Einleitung von Krankenhausabwässern in diese Kläranlage plausibel gemacht werden.

Wie bereits vorab dargestellt, wurden Cephalosporine, die wie die Penicilline zur Klasse der beta-Lactam-Antibiotika gehören, aufgrund methodischer Probleme nicht detektiert. Auch in der Fachliteratur lassen sich keine Angaben zum Vorkommen von Cephalosporinen in verschiedenen Wasserkompartimenten finden. Dies bedeutet nicht, dass Cephalosporine nicht grundsätzlich vorkommen können. Es bedeutet lediglich, dass sie bislang aufgrund allgemeiner methodischer Probleme nicht in Umweltsystemen nachgewiesen werden konnten.

Einige Makrolid-Antibiotika (Azithromycin, Clarithromycin, dehydrato-Erythromycin, Roxithromycin) und das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin konnten sehr konsistent im Zulauf der städtischen Kläranlage nachgewiesen werden. Ihre Gesamtkonzentration lag im Durchschnitt bei 1,0 µg/L, es wurden daneben aber auch Spitzenwerte von 1,4 µg/L erreicht. Erythromycin, Clarithromycin und Clindamycin machen dabei den größten Anteil aus, mit Maximalkonzentrationen von jeweils 1,0 für Erythromycin bzw. 0,2 µg/L.

Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] konnten im Kläranlagenablauf dh-Erythromycin in einer mittleren Konzentration von 2,5 µg/L nachweisen, die maximale Konzentration lag bei 6,0 µg/L. Die eigenen Untersuchungen am Ablauf der städtischen Kläranlage (300.000 EW) ergaben für dh-Erythromycin Konzentrationen zwischen 26-539 ng/L. Damit liegen die in den eigenen Untersuchungen festgestellten Konzentrationen zum Teil deutlich unter den Konzentrationen, die von Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] nachgewiesen wurden.

Tabelle 3.6: Antibiotikakonzentrationen im Ablauf einer kommunalen Kläranlage (300.000 EW, jeweils 24-Std. Mischproben, n = 28):

Wirkstoffklasse	Gehalt [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	Median [µg/L]	Hauptkomponenten
Penicilline	< BG - 0,5	0,1	0,09	Piperacilin, Mezlocillin, Flucloxacillin,
Makrolide	0,1 - 0,5	0,2	0,17	Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin, Roxithromycin,
Fluorchinolone (Gyrasehemmer)	0,01 - 0,08	0,04	0,04	Ciprofloxacin, Ofloxacin,
Sulfonamide	0,1 - 0,4	0,24	0,24	Sulfamethoxazol,
Trimethoprim	0,01 - 0,08	0,02	0,01	
Tetracycline	<BG - 0,04	-	-	Doxycyclin
Vancomycin	< BG - 0,16	(0,07)	< BG	
Summe:	0,4 - 1,1	1,0	1,0	

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die zwei weiteren Wirkstoffe der Makrolid-Antibiotika: Die von Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] ermittelten Medianwerte beliefen sich für Clarithromycin auf 0,24 µg/L (Einzelmessung) und für Roxithromycin auf 0,68 µg/L. Eigene Messungen konnten Maximalkonzentrationen für Clarithromycin von 95 ng/L und für Roxithromycin von 65 ng/L nachweisen; die Werte liegen damit auch hier wieder unter den Vergleichswerten.

Neben Erythromycin ist Clindamycin das Makrolid-Antibiotikum, welches hinsichtlich der nachgewiesenen Konzentrationen an zweiter Stelle steht. Im Abwasser der städtischen Kläranlage konnte Clindamycin in Konzentrationen zwischen 37-167 ng/L konsistent nachgewiesen werden. In den beiden weiteren kleineren Kläranlagen KA 1 und KA 2 konnte Clindamycin regelmäßig zwischen 13 und 282 ng/L nachgewiesen werden. Insgesamt ließen sich aber alle fünf Substanzen sehr konstant im Ablauf der städtischen Kläranlagen nachweisen, wobei sowohl das Spektrum der nachweisbaren Wirkstoffe nahezu identisch als auch deren Konzentrationen jeweils vergleichbar waren.

Die Untersuchungen von Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] in Kläranlagen-Abläufen und Oberflächenwässern ergaben nur bei 5 von 18 untersuchten Verbindungen (Dehydro-Erythromycin, Roxithromycin, Clarithromycin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim) einen durchgängigen Nachweis dieser Substanzen. Die höchsten Konzentrationen in Kläranlagen-Abwässern wurden bei dem Erythromycin-Degradationsprodukt mit einem Medianwert von 2,5 µg/L und maximaler Konzentration von 6 µg/L nachgewiesen, wohingegen Roxithromycin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Clarithromycin mediane Konzentrationen unterhalb von 1,0 µg/L aufwiesen.

Antibiotika der Klasse der Fluorchinolone wurden in der Schweiz von Golet et al. [Golet et al. 2001] in verschiedenen Kläranlagenabläufen analysiert. In diesen Untersuchungen konnten Ciprofloxacin und Norfloxacin in Konzentrationen zwischen 249 und 405 ng/L und 45-120 ng/L nachgewiesen werden. Eine weitere veröffentlichte Untersuchung derselben Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2002 [Golet et al. 2002] konnte diese Ergebnisse bestätigen: Ciprofloxacin wurde im unbehandelten Abwasser durchschnittlich mit 434 ng/L, Norfloxacin mit 388 ng/L bestimmt. Im Abfluss der Kläranlagen wurden Mittelwerte von 72 ng/L für Ciprofloxacin und 57 ng/L für Norfloxacin nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen, wobei im Zulauf der städtischen Kläranlage (300.000 EW) Fluorchinolone in mittleren Gesamtkonzentrationen von 0,9 µg/L und Maximalkonzentration von 1,9 µg/L nachgewiesen werden konnten, entsprechend 1,4 µg/L als Spitzenwert für die Hauptkomponenten Ciprofloxacin und 0,5 µg/L für Ofloxacin. Im Ablauf dieser Kläranlage wurde eine mittlere Gesamtkonzentration von 0,04 µg/L für die beiden untersuchten Fluorchinolone ermittelt, die maximale Gesamtkonzentration betrug 0,08 µg/L.

Das zu der Gruppe der Sulfonamide gehörenden Sulfamethoxazol wurden von Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] in deutschen Kläranlagenabwässern in Median-Konzentrationen von 0,4 µg/L und in einer maximalen Konzentration von 2 µg/L nachgewiesen. In den eigenen Untersuchungen konnte Sulfamethoxazol im Ablauf einer kommunalen Kläranlage (300.000 EW) in mittleren und medianen Konzentrationen von jeweils 0,24 µg/L und einer Maximalkonzentration von 0,4 µg/L nachgewiesen werden (Kläranlagenzulauf: 1,0 µg/L jeweils im Mittel und Median, Spitzenkonzentration 1,7 µg/L). Damit liegen diese Konzentrationen deutlich unter den Maximalkonzentrationen, die von Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] im Ablauf einer Kläranlage nachgewiesen wurden.

Trimethoprim, das in der Regel in der Kombination mit Sulfamethoxazol (Verhältnis: S/T 5: 1) eingesetzt wird, konnte im Zulauf der untersuchten städtischen Kläranlage (300.000 EW) in einer Konzentration von 0,2 µg/L im Mittel (Median: 0,18 µg/L) und mit Spitzenkonzentrationen von 0,3 µg/L nachgewiesen werden. KA 1 und KA 2 ergaben Mittelwerte von 0,24 und 0,13 µg/L im Ablauf.

Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] fanden für Kläranlagenabläufe Konzentrationen von 0,32 µg/L im Median und 0,66 µg/L als Maximalwert deutlich höhere Konzentrationen, als in den eigenen Untersuchungen für diesen Wirkstoff ermittelt werden konnten: Hier lag der Mittelwert bei 20 µg/L und der Spitzenwert bei 80 µg/L.

Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] fanden darüber hinaus auch keine Tetracycline in Kläranlagen-Abläufen. In den eigenen Untersuchungen wurden Tetracycline im Zulauf einer städtischen Kläranlage in einer mittleren Gesamtkonzentration von 0,04 µg/L mit den Hauptkomponenten Doxycyclin und Oxytetracyclin mit Spitzenkonzentrationen von 0,17 µg/L nachgewiesen. Im Ablauf dieser Kläranlage konnte Doxycyclin sporadisch nahe der Bestimmungsgrenze detektiert werden, womit sich die eigenen Untersuchungen in etwa mit den oben erwähnten decken.

Das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin, dem als Reserveantibiotikum eine herausragende therapeutische Bedeutung zukommt, konnte sowohl im Zulauf als auch im Ablauf der kommunalen städtischen Kläranlage mit Maximalkonzentrationen von 0,1 bis 0,2 µg/L nachgewiesen werden. In Abläufen von ländlichen Kläranlagen war ein Nachweis nicht möglich. Auch

hier liegen nach Kenntnis der Autoren bislang keine weiteren Daten von Vancomycin in kommunalen Kläranlagenabläufen sowie in der Umwelt wie z.B. in Oberflächenwässern und im Grundwasser vor.

Zusammenfassend (Tabelle 3.7) ist festzustellen, dass im Vergleich zu Hirsch et al. [Hirsch et al. 1999] übereinstimmend bei den Sulfonamiden und den Makrolid-Antibiotika (incl. Clindamycin) vergleichbare Konzentrationen nachgewiesen werden. Diese ließen sich zum Teil auch im Grundwasser nachweisen.

Abweichend von den Angaben der Literatur konnten zum Teil hohe Konzentrationen an Penicillinen, insbesondere an Piperacillin erstmalig in Abwässern sowohl des Universitätsklinikums Bonn als auch der städtischen und anderer kommunaler Kläranlagen festgestellt werden.

Tabelle 3.7: Durchschnittliche Antibiotikakonzentrationen in verschiedenen Wasserarten (Medianwerte, bzw. Mittelwerte, wenn keine Mediane wegen zu geringer Probenzahl zur Verfügung standen)

Durchschnittliche Antibiotikakonzentrationen [$\mu\text{g/L}$]						
Wirstoffklasse	UKB SA	KA Zulauf	KA Ablauf	Rhein	UF	StGw
Penicilline	0,26	0,06	0,095	0,003	< NG	< NG
Makrolide	3,2	0,74	0,17	0,028	(0,023) Erythromycin	0,003 – 0,03
Fluorchinolone	14,7	0,33	0,038	0,002	< NG	<NG – 0,004
Sulfonamide	8,0	1,0	0,24	0,040	0,011	0,001 – 0,02
Trimethoprim	2,7	0,18	0,014	0,005	< NG	< NG – 0,004
Tetracycline	0,13	0,032	< BG	< NG	< NG	< NG
Vancomycin	0,65	0,052	< BG	< NG	< NG	< NG
Summe	29,6	2,39	0,56	0,078	0,011	0,001 – 0,04

UKB SA: Sammelabwasser Universitätsklinikum; KA Zu und Ab: Kläranlagenzu- und -abläufe Stadt 300.000 EW); Rhein; UF: Rhein-Uferfiltrat; StGw: Staugewässer (EP 2 - 4)

Im Grundwasser waren weder Penicilline, Tetracycline noch Vancomycin feststellbar. Bemerkenswert ist, dass sich aufgrund methodischer Schwierigkeiten sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in den Angaben in der Literatur keine Angaben zu Cephalosporinen geben bzw. finden lassen. Dieser Befund ist ausschließlich auf methodische Probleme zurückzuführen.

Vancomycin als wichtiges Reserve-Antibiotikum bei Antibiotikaresistenten Krankheitserregern wie *Staphylococcus aureus* und Enterokokken ließ sich in gleicher Weise in Kläranlagenabwässern kommunaler Kläranlagen sowie im Sammelabwasser des Universitätsklinikums nachweisen; in Oberflächenwässern und im Grundwasser konnte Vancomycin hingegen bislang nicht nachgewiesen werden. Insgesamt finden sich in der Literatur ebenfalls keine Hinweise über Vancomycin-Konzentrationen in der Umwelt.

3.5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde eine empfindliche HPLC-MS/MS-Multimethode für die wichtigsten Antibiotikagruppen einschließlich von β -Lactamen (Penicilline) mit niedrigen Nachweisgrenzen entwickelt. Die Ergebnisse sind im Einzelnen im Abschlussbericht des Projekts niedergelegt.

- Nachweisverfahren für die ebenfalls zu den β -Lactamen zählenden Cephalosporine konnten aufgrund methodischer Schwierigkeiten ähnlich wie auch in der Literatur beschrieben bislang nicht entwickelt werden.
- Die quantitative und qualitative Analyse im Sammelablauf einer Universitätsklinik, im Zu- und Ablauf von kommunalen und ländlichen Kläranlagen, in Oberflächenwässern und Uferfiltrat sowie im Grundwasser ergaben den Nachweis von Antibiotikarückständen, wobei sich ein charakteristisches Konzentrationsprofil der unterschiedlichen Wirkstoffgruppen bzw. Wirkstoffe in den verschiedenen Wassermatrizes erkennen ließ.
- In Übereinstimmung mit den Literaturangaben hauptsächlich aus Deutschland und den USA konnten diverse Antibiotika-Wirkstoffe - einschließlich der Penicilline - im $\mu\text{g/L}$ -Bereich im Sammelabwasser des universitären Klinikums nachgewiesen werden. Es wurde eine sukzessive Abnahme der jeweiligen Konzentrationen durch Verdünnungseffekte und mikrobiellen sowie chemischen Abbau (Hydrolyse, Oxidation) über den Zulauf einer kommunalen Kläranlage und den jeweiligen Kläranlagenablauf festgestellt. Dabei kam es je nach Wirkstoffgruppe zu unterschiedlichen Reduktionsfaktoren (über die jeweiligen Medianwerte berechnet): Penicilline zeigten interessanterweise keine Abnahme der Konzentration von Kläranlagenzulauf zu Ablauf, jedoch lag die durchschnittliche Reduktion für die Makrolid-Wirkstoffe und das Sulfonamid Sulfamethoxazol bei ca. 75%; die Fluorchinolone und Trimethoprim wurden zu 90% reduziert, Tetracycline sowie Vancomycin war in den Kläranlagenabläufen jeweils nicht mehr detektierbar. Insgesamt lag der Reduktionsfaktor für die Summe aller untersuchten und detektierten Wirkstoffe bei ca. vier, was einer 75%igen Reduktion entspricht.
- Im Oberflächenwasser lassen sich im Wesentlichen nur noch Makrolid-Antibiotika (Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin) und Sulfamethoxazol nebst sporadischen Funden von Amoxicillin nachweisen. Im Grundwasser bzw. im Uferfiltrat konnte nur noch Sulfamethoxazol (sehr vereinzelt auch Trimethoprim) im unteren ng/L -Bereich nachgewiesen werden.
- In Übereinstimmung mit der Literatur konnte Sulfamethoxazol als mögliche Tracer-Substanz für allgemeine Antibiotikabelastungen von Wässern aufgrund seiner hohen offensichtlichen Persistenz und Mobilität identifiziert werden.
- Im Trinkwasser gelang bislang kein Nachweis von Antibiotika-Rückständen. Dies lässt sich wahrscheinlich auf entsprechende Aufbereitungsschritte, insbesondere oxidierende Verfahren wie Chlorung oder Ozonung zurückführen.
- Die festgestellten Konzentrationen von Antibiotika-Rückständen im Grundwasser weisen darauf hin, dass unter Berücksichtigung üblicher Aufbereitungsverfahren für die Trinkwasseraufbereitung mit einer guten Eliminierung von eventuell vorhandenen Antibiotika-Rückständen im Rohwasser zu rechnen ist. Dies bedeutet, dass derzeit über das Trinkwasser die Aufnahme von Antibiotika-Rückständen für den Menschen keinen relevanten Belastungspfad darstellen dürfte. Dies bedeutet auch, dass aufgrund der fehlenden Belastung des Trinkwassers nicht mit einer Selektion antibiotikaresistenter Mikroorganismen durch Antibiotika-Rückstände aus dem Trinkwasser beim Menschen zu rechnen sein dürfte.
- Die Konsequenzen für die Antibiotika-Resistenzbildung bei Mikroorganismen im Sammelablauf von Kliniken und den weiteren Eintrag in die Umwelt sind hingegen nicht geklärt. Aufgrund der z.T. hohen im Abwasser nachgewiesenen Konzentrationen einiger Wirkstoffe bedarf dieser Pfad weiterer Abklärung unter Einbeziehung mikrobiologischer Untersuchungstechniken.

Danksagung: Dieses Projekt wurde gefördert vom Landesumweltamt Düsseldorf und dem Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen; Nr. LUA NRW 112-1781/MZ 43/99.

Kapitel 4

Perfluorierte Tenside (PFT) in der aquatischen Umwelt und im Trinkwasser

4. Perfluorierte Tenside (PFT) in der aquatischen Umwelt und im Trinkwasser

Dirk Skutlarek, Martin Exner, Harald Färber*

Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Strasse 25, D-53105 Bonn (harald.farber@ukb.uni-bonn.de)

* Korrespondenzautor (harald.farber@ukb.uni-bonn.de)

UWSF – Z Umweltchem Ökotox **18** (2006) 151-154

Zusammenfassung

In einer wissenschaftlichen Forschungsarbeit wurde das Vorkommen von 12 perfluorierten Tensiden (PFT) in Oberflächenwässern und Trinkwässern untersucht [Skutlarek et al. 2006a]. PFT sind aufgrund ihrer hohen Persistenz seit einigen Jahren ubiquitär in der Umwelt nachweisbar, so auch in tierischen und menschlichen Matrices (z.B. Blut, Leber) [Houde et al. 2006]. Im Rhein und in den meisten seiner Nebenflüsse lagen die gemessenen Konzentrationen unter 100 ng/L (Summe), in der Ruhr sowie in der Möhne wurden wesentlich höhere Werte bestimmt (Ruhr: bis zu 446 ng/L, Möhne bis zu 4385 ng/L).

Die Konzentrationen in den untersuchten Trinkwässern im Ruhr- und Möhneinzugsgebiet betragen bis zu 598 ng/L (Summe), wobei die ermittelten Trinkwasserkonzentrationen parallel zu den in der Ruhr ermittelten Konzentrationen in Fließrichtung abnahmen. Hauptkomponente war hier jeweils Perfluorooctansäure (PFOA). Dies belegt die Trinkwasserrelevanz der Stoffe, welche zukünftig im Rahmen rechtlicher Bestimmungen berücksichtigt werden sollten.

Schlagwörter: PFT, PFOA, PFOS, perfluorierte Tenside, Oberflächenwasser, Trinkwasser, HPLC-MS/MS, Boden, Bioabfall

Abstract

Recent scientific research on perfluorinated tensides (PFT) revealed their occurrence in german surface and drinking waters [Skutlarek et al. 2006a]. Since several years PFT are found in the global environment and in animal and human tissues. PFT possess extreme persistence against microbiological and chemical degradation and are able to bioaccumulate in animals and humans [Houde et al. 2006]. PFT concentrations (sum of 12 components) in river Rhine and his main tributaries were determined below 100 ng/L, but the rivers Ruhr (tributary of the Rhine) and Möhne (tributary of the Ruhr) showed remarkable high concentrations (Ruhr: up to 446 ng/L, Möhne: up to 4385 ng/L). The maximum concentration in drinking water was 598 ng/L with the major component perfluorinated octanoic acid (PFOA). The PFT concentrations decreased similar with the PFT concentrations of the raw waters along the flow direction of the Ruhr river. Therefore it seems to be necessary to install legal regulations for these compounds.

Keywords: PFT, PFOA, PFOS, perfluorinated tensides, surface water, drinking water, organic waste, soil, HPLC-MS/MS

4.1. Hintergrund

Perfluorierte organische Verbindungen mit Tenseigenschaften (PFT) besitzen einerseits ausgezeichnete und spezifische technologische Eigenschaften, weswegen sie seit vielen Jahren in einer Vielzahl von industriellen Produkten und Prozessen (z. B. Textil- und Papierausrüstungen, Galvanik, Teflonherstellung, wasser- und schmutzabweisende Beschichtungen) Verwendung finden [Fricke & Lahl 2005]. Andererseits stellen Vertreter dieser Stoffklasse äußerst persistente und bioakkumulierbare Verbindungen mit toxischen Eigenschaften dar [US EPA 2005, Yao et al. 2005]. Sie sind mittlerweile global in verschiedensten Matrices nachweisbar [Fricke & Lahl 2005, OECD 2002].

4.2. Ziel

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von PFT-Bestimmungen in Oberflächenwässern des Rheins (von Schaffhausen (CH) bis Wesel am Niederrhein), dessen wichtigsten Nebenflüssen (jeweils an der Mündung) sowie der Ruhr und einigen ihrer Nebenflüsse vorgestellt. In die Beprobungen waren auch Trinkwässer aus dem Ruhreinzugsgebiet einbezogen. Die Untersuchungen wurden nach Festphasenanreicherung mittels HPLC-MS/MS durchgeführt, wobei das Untersuchungsprogramm alle perfluorierten Carbonsäuren von C₄ bis C₁₂ sowie die perfluorierten Sulfonsäuren mit den Kettenlängen C₄, C₆ und C₈ (insgesamt 12 Komponenten) beinhaltete. Die ermittelten Werte (dargestellt sind die 7 häufigsten PFT) geben einen guten Überblick über das Vorkommen sowie das Verteilungsmuster von PFT im aquatischen Milieu und im Trinkwasser.

4.3. Analytik

Die analytische Bestimmung erfolgte mittels Festphasenextraktion (Strata X, Phenomenex) von 100 mL Wasserprobe bei einem pH-Wert von 7-8. Nach Trocknung wurden die Analyten mit einem Aceton/Acetonitril-Gemisch eluiert und bis zur Trockne eingeeengt. Nach Wiederaufnahme im Eluenten A (Methanol/Wasser, 25/75, Ammoniumacetat) und chromatographischer Trennung (HPLC: Agilent 1100, Eluent B: Methanol/Acetonitril: 25/75, Ammoniumacetat, Gradient) erfolgte die massenspektrometrische Detektion (API 2000, ESI-MRM) in Anlehnung an beschriebene Methoden [Flaherty et al. 2005, Hansen et al. 2002, Inoue et al. 2006]. Folgende Stoffe wurden untersucht: PFBA: Perfluorbutansäure, PFPeA: Perfluorpentansäure, PFHxA: Perfluorhexansäure, PFHpA: Perfluorheptansäure, PFOA: Perfluoroctansäure, PFNA: Perfluorononansäure, PFDA: Perfluordecansäure, PFUnDA: Perfluorundecansäure, PFDoDA: Perfluordodecansäure, PFBS: Perfluorbutansulfonsäure, PFHxS: Perfluorhexansulfonsäure, PFOS: Perfluoroctansulfonsäure.

Die Bestimmungsgrenzen ergaben sich für jede Einzelsubstanz zu je 2 ng/L und für die Summe 5 ng/L. Die Wiederfindungen lagen bei pH 7-8 für die C₅- C₁₂-Komponenten bei 50% – 95%, für die C₄-Komponente wesentlich niedriger bei ca. 10 %, so dass für diese Substanzen ein niedrigerer Anreicherungs-pH-Wert gewählt werden muss.

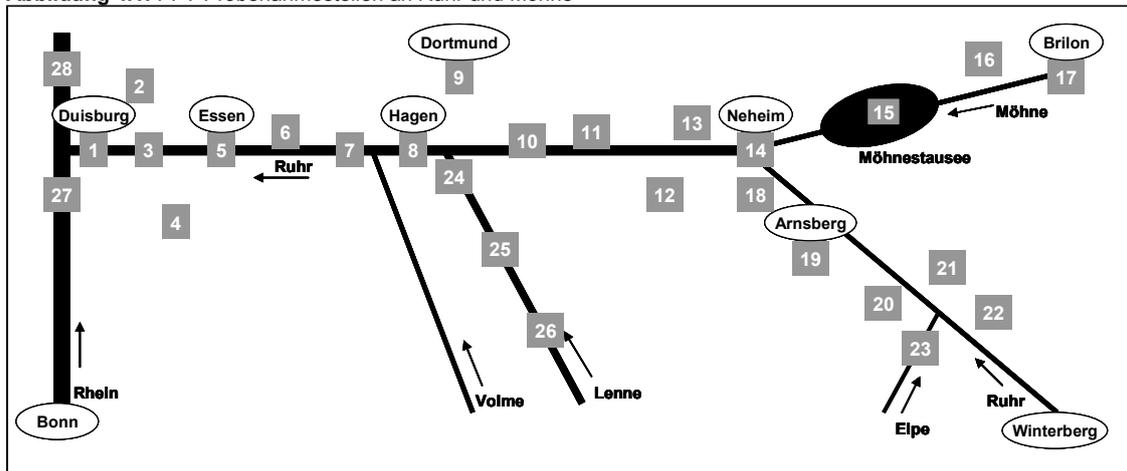
4.4. Ergebnisse und Diskussion

Im Oberflächenwasser des Rheins konnte im Rahmen der Beprobungskampagnen die Leitsubstanz Perfluoroctansäure (PFOA) in Konzentrationen zwischen < 2 ng/L (Bestimmungsgrenze = BG) und 8 ng/L bestimmt werden. Die Summe aller Analyten ergab Werte zwischen 2 ng/L und 74 ng/L. In den Mündungen der Nebenflüsse wurden PFOA-Gehalte zwischen < BG und 48 ng/L (Ruhr) gemessen, die Summe der Analyten lag zwischen < 5 ng/L (Summen-BG) und 94 ng/L (Ruhr). (Tab.4.1)

Tabelle 4.1: PFT-Gehalte im Rhein und ausgewählten Zuflüssen

Fluss	Probenahmeort	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	SUMME [ng/L]
Rhein	Neuhausen (CH)	-	-	-	-	-	-	2	2
Aare (CH)	Koblenz (CH)	-	-	3	-	2	13	8	26
Rhein	Stein (CH)	-	-	-	-	-	6	6	12
Rhein	Wyhlen	-	-	-	-	-	6	8	14
Rhein	Huningue (F)	-	-	2	-	2	9	12	25
Rhein	Breisach	-	-	-	-	2	46	26	74
Rhein	Ludwigshafen	-	-	-	-	2	30	5	37
Neckar	Mannheim	-	-	-	-	3	-	3	6
Main	Gustavsburg	-	-	-	-	3	-	12	15
Rhein	Mainz	2	-	2	-	3	24	12	43
Nahe	Bingen	-	-	-	-	8	-	6	14
Lahn	Lahnstein	-	-	-	-	-	2	2	4
Mosel	Koblenz	-	-	-	-	-	-	5	5
Rhein	Koblenz	-	-	-	-	2	19	5	26
Ahr	Remagen	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhein	Bonn	-	-	-	-	2	12	5	19
Sieg	Troisdorf	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhein	Köln	-	-	-	-	-	2	5	7
Wupper	Leverkusen	-	-	-	-	2	-	7	9
Erfurt	Neuss	-	-	-	-	2	34	3	39
Rhein	Krefeld	-	-	-	-	-	12	7	19
Emscher	Dinslaken	-	3	7	2	22	5	18	57
Lippe	Wesel	-	9	20	-	21	3	6	59
Rhein	Wesel	2	2	3	-	8	13	9	37

Abbildung 4.1: PFT-Probenahmestellen an Ruhr und Möhne



Bei weiteren Beprobungen der Ruhr (Abb.1) wurden im Oberlauf PFOA-Höchstwerte von 139 ng/L sowie ein Summenhöchstwert von 446 ng/L festgestellt (Meschede-Wehrstapel). Die höchsten Oberflächenwasserwerte wies die Möhne, welche bei Arnsberg-Neheim in die Ruhr mündet, im Oberlauf (Heidberg) mit Konzentrationen von 3640 ng/L (PFOA) sowie 4385 ng/L (Summe PFT) auf. (Tab.4.2)

Tabelle 4.2: PFT-Gehalte in Trinkwässern im Ruhr-Einzugsbereich

Nr.	Probenahmeort	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	SUMME [ng/L]
1	Duisburg-Alt Hamborn	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Oberhausen	-	6	3	-	43	16	9	77
3	Mülheim	-	3	-	-	30	18	3	54
4	Velbert	-	11	7	-	38	13	-	69
5	Essen	-	9	7	-	56	15	7	94
6	Bochum	-	8	5	-	53	14	10	90
7	Witten	-	4	4	-	49	14	12	83
8	Hagen	-	5	3	-	34	16	22	80
9	Dortmund	2	30	26	-	152	8	11	229
10	Schwerte	3	27	24	-	145	10	13	222
11	Fröndenberg	3	26	21	-	143	3	6	202
12	Menden	-	35	31	2	157	6	11	242
13	Wickede	5	46	38	-	208	4	-	301
14	Neheim	11	5	22	23	519	13	5	598
16	Rüthen	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Brilon	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Arnsberg	8	77	56	-	71	3	-	215
20	Meschede	6	46	22	-	22	-	-	96
25	Plettenberg	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Lennestadt	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Duisburg-Wedau	-	-	-	-	-	26	-	26

Als hauptsächliche Ursache hierfür kann nach derzeitigem Wissensstand eine landwirtschaftliche Nutzfläche bei Brilon-Scharfenberg verantwortlich gemacht werden, von deren Fläche die Stoffe offensichtlich über zwei kleine Bäche in die Möhne abgeschwemmt werden. Es wird vermutet, dass die Ursache für die Bodenkontamination in der Ausbringung eines PFT-belasteten Bioabfallgemischs zu suchen ist. Der Bioabfall wurde in der Vergangenheit auch auf eine Vielzahl von weiteren Flächen in der Region ausgebracht, so dass weitere Punktquellen existieren (z.B. Ruhrzufluss Elpe ([Nr. 23 in Abb. 4.1) in Bestwig).

Bereits im Jahr 2004 war die PFT-Belastung (Hauptkomponente PFOS) an der Ruhrmündung als erhöht anzusehen [Lange et al. 2004], so dass es möglich erscheint, dass die Belastung bereits zu diesem Zeitpunkt bestand.

Die ermittelten Gehalte im Trinkwasser betragen für PFOA zwischen < BG und 519 ng/L sowie für die Summe < BG und 598 ng/L. (Tab.4.3)

Aus diesen Werten wird deutlich, dass PFOA im Ruhr- und Möhneinzugsgebiet mit ca. 50 - 80% die Hauptkomponente der Summe aller nachgewiesenen PFT-Analyten darstellt. Im Rhein und einigen Nebenflüssen (Aare (CH), Erft) sind jedoch vor allem perfluorierte Sulfonsäuren (z.B. PFBS = Perfluorbutansulfonsäure; PFOS = Perfluoroctansulfonsäure) zu beobachten. Es ist auffällig, dass die PFT-Konzentrationen in Möhne und Ruhr von ihren jeweiligen Oberläufen zur Mündung hin abfallen; dieser Befund kann hauptsächlich durch die Verdünnung mit unbelasteten Zuflüssen erklärt werden. Folgerichtig kommt es im späteren Verlauf der Ruhr zu keinen nennenswerten Kontaminationen mit PFT.

Tabelle 4.3: PFT-Gehalte in Oberflächenwässern im Ruhr-Einzugsbereich

Nr.	Probenahmeort	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	SUMME
									[ng/L]
1	Ruhr (Duisburg)	2	18	12	-	48	9	5	94
3	Ruhr (Mülheim)	-	8	3	-	46	14	6	77
5	Ruhr (Essen)	-	15	12	-	51	9	7	94
6	Ruhr (Bochum)	-	7	5	-	57	12	4	85
7	Ruhr (Witten)	-	8	6	-	69	17	22	132
8	Ruhr (Hagen)	-	12	10	-	90	17	13	142
10	Ruhr (Schwerte)	10	28	25	-	177	18	14	272
18	Ruhr (Hüsten)	11	50	38	-	63	8	-	170
20	Ruhr (Meschede-Wennemen)	5	31	16	-	24	4	-	80
21	Ruhr (Meschede-Wehrstapel)	14	167	120	-	139	6	-	446
22	Ruhr (Olsberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Möhne (Neheim)	18	13	33	25	647	18	14	767
15	Möhnesee	25	24	54	27	654	22	17	822
16	Möhne (Heidberg)	21	93	247	148	3640	44	193	4385
17	Möhne (Brilon)	-	-	-	-	11	6	-	17
23	Elpe (Bestwig)	143	1638	1248	-	1168	71	-	4268
24	Lenne (Hagen)	-	-	-	-	59	-	11	70
25	Lenne (Plettenberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Lenne (Lennestadt)	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Rhein (Neuss)	-	-	-	-	-	7	5	12
28	Rhein (Duisburg-Walsum)	2	3	3	-	9	15	9	41

Die Trinkwasserkonzentrationen im Ruhreinzugsgebiet nehmen ebenfalls in Fließrichtung der Ruhr von Ost nach West analog zur Belastung der Oberflächengewässer ab; sie unterscheiden sich außerdem nicht wesentlich von den im Rohwasser der Ruhr festgestellten Konzentrationen. Die derzeit eingesetzten Trinkwasseraufbereitungsschritte bewirken offensichtlich keine wesentliche Eliminierung der PFT, obwohl ca. die Hälfte der Ruhrwasserwerke über eine Aktivkohlefiltration verfügt.

4.5. Schlussfolgerungen

Perfluorierte Tenside sind aufgrund ihrer Persistenz und Mobilität als wasserwerks- und trinkwasserrelevante Stoffe anzusehen, welche bisher weder in der Rohwasserüberwachung noch in der Trinkwasserverordnung 2001 geregelt sind. Ihr Vorkommen im Oberflächenwasser der Möhne und der Ruhr ist vermutlich auf Abschwemmungen dieser Stoffe von landwirtschaftlich oder forstwirtschaftlich genutzten Flächen zurückzuführen, welche mit PFT-belasteten Bioabfallstoffgemischen behandelt worden waren. Inwieweit bereits Grundwässer kontaminiert sind, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Es erscheint einerseits notwendig, sowohl die generelle Verwendung als auch die Freisetzung derartiger Stoffe bzw. ihrer Vorläuferverbindungen (z.B. Fluortelomere) in die Umwelt zu minimieren. Bekannte Kontaminationspunkte müssen weitgehend eliminiert werden. Hierzu müssen geeignete rechtlich Maßnahmen auf nationaler und internationaler Ebene durchgesetzt werden. Eine Aufnahme derartiger Parameter sowohl in die Bioabfallverordnung als auch in das Gesamtkonzept des Boden- /Gewässerschutzes und der Trinkwasserüberwachung ist zu prüfen.

Kapitel 5

Perfluorinated Surfactants in Surface and Drinking Waters

5. Perfluorinated Surfactants in Surface and Drinking Waters

Dirk Skutlarek, Martin Exner and Harald Färber*

University of Bonn, Institute for Hygiene and Public Health (IHÖG), Department of Water Chemistry, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany

* Corresponding author (harald.farber@ukb.uni-bonn.de)

Environ Sci Pollut Res **13** (2006) 299-307

Abstract

Goal, Scope and Background. In this paper recent results are provided of an investigation on the discovery of 12 perfluorinated surfactants (PS) in different surface and drinking waters [Skutlarek et al. 2006a, Skutlarek et al. 2006b]. In the last years, many studies have reported ubiquitous distribution of this group of perfluorinated chemicals, especially perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in the environment, particularly in wildlife animal and human samples [Giesy & Kannan 2001, Houde et al. 2006, Prevedouros et al. 2006]. Perfluorinated surfactants (e.g. PFOS and PFOA) have shown different potentials for reproductory interference and carcinogenity in animal experiments as well as partly long half-lives in humans [Guruge et al. 2006, FSA UK 2006a, FSA UK 2006b, 3M 2005, OECD 2002, Yao & Zhong 2005]. They possess compound-dependent extreme recalcitrance against microbiological and chemical degradation and, in addition, they show variable potentials for bioaccumulation in animals and humans [Houde et al. 2006].

Methods. Surface and drinking water samples were collected from different sampling sites: Surface waters: samples taken from the rivers Rhine, Ruhr, Moehne and some of their tributaries. Further samples were taken from the Rhine-Herne-Canal and the Wesel-Datteln-Canal. Drinking waters: samples taken in public buildings of the Rhine-Ruhr area. After sample clean-up and concentration by solid-phase extraction, the perfluorinated surfactants were determined using HPLC-MS/MS.

Results. All measured concentrations (sum of seven mainly detected components) in the Rhine river and its main tributaries (mouths) were determined below 100 ng/L. The Ruhr river (tributary of the Rhine) showed the highest concentration (94 ng/L), but with a completely different pattern of components (PFOA as major component), as compared with the other tributaries and the Rhine river. Further investigations along the Ruhr river showed remarkably high concentrations of PS in the upper reaches of the Ruhr river and the Moehne river (tributary of the Ruhr) (Ruhr: up to 446 ng/L, Moehne: up to 4385 ng/L). The maximum concentration of all drinking water samples taken in the Rhine-Ruhr area was determined at 598 ng/L with the major component PFOA (519 ng/L).

Discussion. The surface water contaminations most likely stem from contaminated inorganic and organic waste materials (so-called 'Abfallgemisch'). This waste material was legally applied to several agricultural areas on the upper reaches of the Moehne. Perfluorinated surfactants could be detected in some suchlike soil samples. They contaminated the river and the reservoir belonging to it, likely by superficial run-off over several months or probably years. Downstream, dilution effects are held responsible for decreasing concentrations of PS in surface waters of the Moehne and the Ruhr river. In analogy to the surface water samples, PS (major component PFOA) can be determined in many drinking water samples of the Rhine-Ruhr area where the water supplies are mainly based on bank filtration and artificial recharge.

Conclusions. The concentrations found in drinking waters decreased with the concentrations of the corresponding raw water samples along the flow direction of the Ruhr river (from east to west) and were not significantly different from surface water concentrations. This indicates that perfluorinated surfactants are at present not successfully removed by water treatment steps.

Recommendations and Perspectives. Because of their different problematic properties (persistence, mobility, toxicity, bioaccumulation), the concentrations of specific perfluorinated surfactants and their precursors in drinking waters and food have to be minimised. Therefore, it is of utmost importance to take the initiative to establish suitable legal regulations (limitations/ban) concerning the production and use of these surfactants and their precursors. Furthermore, it is indispensable to protect water resources from these compounds. A discussion on appropriate limit values in drinking water and foodstuffs is urgently needed. Concerning the assumed soil contamination, the corresponding regulation [Bioabfallverordnung 1998 – Regulation on Organic Waste 1998] should be extended to allow the control of relevant organic pollutants.

Keywords: Drinking water; HPLC-MS/MS; organic waste; perfluorinated chemicals; perfluorinated surfactants; PFOA; PFOS; soil; surface water

5.1. Introduction

Perfluorinated surfactants (PS), especially perfluorinated carboxylates and sulfonates, represent special chemicals with specific technological properties [Fricke & Lahl 2005]: They show high thermal and chemical stability, possess a high polarity and are not bio-degradable. They are used for coatings of textiles, papers and carpets to achieve oil, stain and water repelling properties. Furthermore, they are employed as performance chemicals in fire-fighting foams and ingredients in consumer products such as floor polishes and shampoos [Begley et al. 2005, Moody et al. 2003, Yamashita et al. 2004]. But, the same properties described above led to their ubiquitous distribution [Allsop et al. 2005, Daughton 2004, Brooke et al. 2004]. The transport pathways have not yet been completely revealed, but neutral and volatile perfluorinated compounds like perfluoroalkyl sulfonamides and fluorotelomer alcohols (FTOHs) – the latter ones being discussed as precursors – may have the potential for long range atmospheric transport (LRAT) [Martin et al. 2006, Wallington et al. 2006].

Major compounds like perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS), but also components with varying chain lengths from C₂–C₁₂, were found in different environmental samples, even in polar regions [Berger et al. 2004, Kannan et al. 2005, Taniyasu et al. 2003, Taniyasu et al. 2004]. The described concentrations of perfluorinated surfactants may not be acutely toxic, but these compounds can be enriched in humans (blood, liver), which raises the concern of long-term metabolic effects of these cellularly recognised xenobiotics [Flaherty et al. 2005, Harada et al. 2004, Inoue et al. 2004, Kudo & Kawashima 2003]. Because of the multiple toxicities of PS (coupled with bioaccumulation and biomagnification in the food web), different risk assessments on PFOS and PFOA have been undertaken in the last years [OECD 2002, US-EPA 2005, Swedish Chemical Inspectorate 2006, FSA UK 2006a, FSA UK 2006b]. In 2005, an international symposium on fluorinated alkyl organics in Toronto, Canada summarised the current research results about PS [FLUOROS 2005]. Recent research studies [Jernbro et al. 2007] indicate that PFOS increases the effect of genotoxic substances like cyclophosphamide in the micronucleus test, which adds a new dimension of concern to the toxicology of perfluorinated surfactants and other perfluorinated compounds.

It is assumed that the main sources of human intake concerning perfluorinated surfactants, especially PFOS and PFOA, are foods and beverages, which are either primarily contaminated or secondarily contaminated by food packaging materials [Begley et al. 2005]; however, drinking water can also contribute to the daily uptake. In the last years, several results on detected contaminations of ground, surface and drinking waters have been published. After an incident, the Tennessee River showed concentrations of PFOA up to 598 ng/L [Hansen et al. 2002]. In the Osaka Bay area, PFOA and PFOS were detected in surface waters with maximum

concentrations of 67,000 ng/L and 526 ng/L, respectively [Saito et al. 2004]. The occurrence of PFOA and PFOS in several German surface waters was described in 2004 [Lange et al. 2004].

In our study, the concentrations of 12 different perfluorinated surfactants in German rivers (Rhine river and its main tributaries, as well as Moehne river), canals and drinking waters of the Ruhr catchment area are presented. Furthermore, the main contamination source was identified as an agricultural area on the upper reaches of the Moehne river, which is an important tributary of the Ruhr river.

At present, 23 water works use raw water of the Ruhr river for the supply of about 5 million people with drinking water.

5.2. Material and Methods

5.2.1 Chemicals and standards

Standards of perfluorobutanoic acid (PFBA, chemical purity 98.7%), perfluoropentanoic acid (PFPeA, 97.1%), perfluorohexanoic acid (PFHxA, 98.9%), perfluoroheptanoic acid (PFHpA, 98.8%), perfluorooctanoic acid (PFOA, 98.9%), perfluorononanoic acid (PFNA, 99.8%), perfluorodecanoic acid (PFDA, 98.0%), perfluoroundecanoic acid (PFUnDA, 99.9%), perfluorododecanoic acid (PFDoDA, 97.2%), perfluorobutane sulfonate potassium salt (PFBS, 98.0%), perfluorohexane sulfonate potassium salt (PFHxS, 99.9%) and perfluorooctane sulfonate potassium salt (PFOS, 99.9%) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). ^{13}C -labelled PFOA and ^{13}C -labelled PFOS were obtained as internal standards from Campro scientific (Berlin, Germany). All solvents used were ultra-residual analysed or LC-MS grade (Sigma-Aldrich), ammonium acetate was LC-MS grade (Sigma-Aldrich).

5.2.2 Water sampling

Surface and drinking water samples were collected from rivers, canals and public buildings in several campaigns from March (Rhine) to May (Ruhr area and Moehne) 2006. Every 250 mL-sample was collected in a glass bottle with glass stopper. In order to minimise sample contamination, sampling bottles were prepared by rinsing with deionised water and acetone additionally after dishwasher cleaning. Samples were stored at ambient temperature.

5.2.3 Solid-phase extraction

100 mL of the sample (pH adjusted to 7.0 – 8.0) were spiked with the internal standards ($^{13}\text{C}_4$ -PFOA and $^{13}\text{C}_4$ -PFOS). A Strata-x column with 200 mg solid-phase material (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was consecutively conditioned with 1x2 mL (acetone/acetonitrile/formic acid, 50/50/1, v/v/v) and 3x2 mL water (pH 8.0). The sample was passed through the column at a flow rate of 2.5 mL/min. The cartridges were then dried for 30 min with nitrogen and eluted four times with 2 mL (acetone/acetonitrile/formic acid, 50/50/1, v/v/v). All extracts were reduced to dryness in a gentle nitrogen stream and then reconstituted with 0.5 mL LC-Solvent A (see LC-MS conditions).

5.2.4 LC-MS conditions

The analyses were carried out using an Agilent 1100 HPLC-System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) interfaced to an API 2000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The mass spectrometer was operated in turbo ion spray negative ion mode using multiple reaction monitoring (MRM).

The chromatographic column was a NUCLEODUR SPHINX-RP 2.0 x 150 mm, 3 μm particle size (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). The extracted compounds (injection volume: 50 μL) were separated by liquid chromatography at a flow rate of 0.3 mL/min (column temperature: 50°C). Eluents used for separation were (A) a 10 mM ammonium acetate solution in (water/methanol, 75/25, v/v) and (B) a 10 mM ammonium acetate solution in (acetonitrile/methanol, 75/25, v/v).

The gradient profile is programmed stepwise from 10% to 30% solvent B in 3 min, followed by an increase of solvent B to 55% in 8 min and finally an increase to 70% solvent B in 4 min (Table 5.1).

Table 5.1: LC/MS conditions

HPLC		MS/MS	
Instrument	Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)	Instrument	API 2000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)
Column	NUCLEODUR SPHINX-RP 2 x 125 mm, 3 µm (Macherey-Nagel, Dueren, Germany)	Ionisation	ESI
Mobile Phase	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ / (Water:Methanol, 75:25, v:v) B: 10 mM CH ₃ COONH ₄ / (Acetonitril:Methanol,75:25, v:v)	Polarity	negative
Gradient	0 min 10% B 3 min 30% B 11 min 55% B 15 min 70% B	Scan Type	MRM
Flow rate	0.3 mL/min	Spraying gas	N ₂ (60 psi)
Oven temp	50°C	Drying gas	N ₂ (70 psi, 400°C)
Injection volume	50 µL	Ion Spray	1500 V
		Voltage	
		CAD gas thickness	N ₂ , 1.03 x 10 ¹⁵ molecules/cm ²
		Mass filter potentials	Individually optimised by flow injection

MS instrument tuning was conducted for each analyte by direct-infusion of a ~ 1 µg/mL standard solution at a flow rate of 10 µL/min. Each analyte's MS parameters were initially tuned for the parent ion and then subsequently tuned for the fragment ions in separate procedures. Parent and fragment ion masses of a single compound are given in Table 2. Typically, the following tune parameters were used: drying gas temperature 400°C; ion spray voltage –1500 V; spraying gas pressure 60 psi; drying gas pressure 70 psi (see Table 5.1). The optimised settings for ion focussing and fragmentation were individual for each analyte.

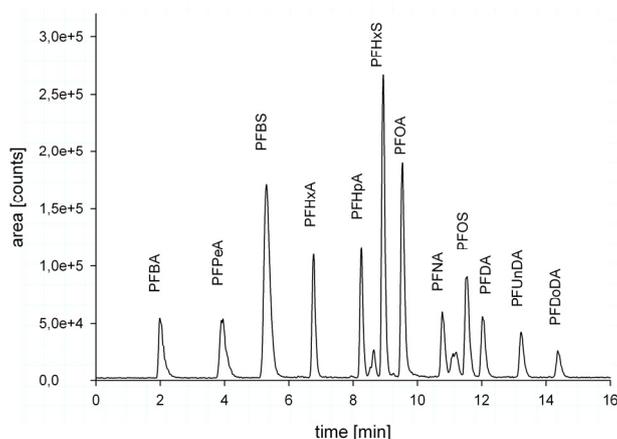
Table 5.2: Parent and fragment ion masses (MS-MS parameters)

Perfluorinated Surfactant	Parent Ion m/z	Fragment Ion (Quantifier) m/z	Fragment Ion (Qualifier) m/z
PFBA	213	169	-
PFPeA	263	219	-
PFHxA	313	269	119
PFHpA	363	319	169
PFOA	413	369	169
PFNA	469	419	219
PFDA	513	469	219
PFUnDA	563	519	269
PFDoDA	613	569	169
PFBS	299	80	99
PFHxS	399	80	99
PFOS	499	80	99
¹³ C ₄ -PFOA	417	372	169
¹³ C ₄ -PFOS	503	80	99

Quantitation using the transition (parent ion → fragment ion (quantifier)) was performed using the Analyst 1.4.1 software provided by Applied Biosystems (Darmstadt, Germany).

Fig. 5.1 shows a typical chromatogram of a standard solution (c = 50 ng/L).

Figure 5.1: Chromatogram, conc. = 50 ng/L



5.2.5 Recoveries and quantitation limits

The percentage extraction recovery of 12 PS analytes at 50 ng/L concentration was determined by standards dissolved in 100 mL deionised water. The recovery samples were prepared in the same way as other samples (concentration factor 200). They were calibrated against the standards dissolved in eluent A at 50 ng/L. Mean (n = 4) recoveries ranged from 11% (PFBA) to 117% for PFBS (Table 5.3), while PFBA shows an increased recovery at pH 2.0 (approximately 95%). The standard deviation values ranged between 2.9% (PFHpA) and 7.9% (PFOS). The poor recovery of PFDoDA can be increased by using higher elution volumes.

Table 5.3: Percentage mean recovery

Perfluorinated Surfactant	% Recovery	± SD (n = 4)
PFBA	10.9	± 3.5
PFPeA	93.6	± 5.6
PFHxA	99.4	± 6.7
PFHpA	88.4	± 2.9
PFOA	100.2	± 4.2
PFNA	95.9	± 4.4
PFDA	86.0	± 4.7
PFUnDA	61.6	± 5.5
PFDoDA	33.1	± 3.0
PFBS	116.7	± 4.0
PFHxS	98.3	± 6.1
PFOS	98.2	± 7.9

The calibration curves consisted of seven points (1 ng/L, 2 ng/L, 5 ng/L, 10 ng/L, 25 ng/L, 50 ng/L and 100 ng/L). They showed a linear fit (quadratic fit at higher concentrations). Background contamination was evaluated over the total procedure (sampling, extraction and LC-MS analysis). Some perfluorinated carboxylates were detected in concentrations < 1 ng/L; perfluorinated sulfonates were not found as background contamination. The limit of detection was defined as the second lowest point in the calibration curve.

5.3 Results

5.3.1 Surface waters

In the surface waters of the Rhine river the concentrations of PFOA ranged between < LOD (Limit of Determination = 2 ng/L) at Neuhausen (CH) in the upper reaches and 9 ng/L at Duisburg. PFOS was found between < LOD and 26 ng/L, the major component in the Rhine river was perfluorobutane sulfonate (PFBS) with concentrations ranging between < LOD and a maximum value of 46 ng/L at Breisach (Table 5.4). The sum of all determined components was below 100 ng/L at all sampling points. At all sampling sites PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA and PFHxS were detected only rarely and with very low concentrations. Therefore, they are not integrated in the following result tables.

The perfluorinated surfactants were found in similar concentrations in the main tributaries of the Rhine river with the exception of the Ruhr river and the rivers Emscher and Lippe. In the Ruhr river (mouth at Duisburg), PFOA was recognised as the major component with 48 ng/L, followed by PFPeA (18 ng/L), PFHxA (12 ng/L), PFBS (9 ng/L) and PFOS (5ng/L) with a sum of 94 ng/L. The Lippe river showed a sum concentration of 59 ng/L with the major component PFOA (21 ng/L), followed by PFHxA (20 ng/L), PFPeA, PFOS and PFBS. The Emscher river was contaminated with a sum value of 57 ng/L, the major component was also PFOA (22 ng/L), but followed by PFOS (18 ng/L) and PFHxA, PFBS, PFPeA and PFHpA (see Table 5.4).

Other exceptions were two canals (Rhine-Herne-Canal and Wesel-Datteln-Canal) with sum values of 178 ng/L and 152 ng/L, respectively. The major component was PFHxA in both cases, followed by PFOA, PFPeA (both in the same concentration range) and PFBS (see Table 5.4).

Table 5.4: Perfluorinated surfactants concentrations in the Rhine river and selected tributaries (mouth)

River	Sampling site	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	Σ [ng/L]
Rhine	Neuhausen (CH)	-	-	-	-	-	-	2	2
	Wutach	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aare (CH)	-	-	3	-	2	13	8	26
Rhine	Stein (CH)	-	-	-	-	-	6	6	12
Rhine	Wyhlen	-	-	-	-	-	6	8	14
Rhine	Huningue (F)	-	-	2	-	2	9	12	25
Rhine	Breisach	-	-	-	-	2	46	26	74
Rhine	Kittersburg	-	-	-	-	2	15	8	25
	Kinzig	-	-	-	-	-	2	17	19
Rhine	Rheinau	-	-	-	-	-	19	19	38
	Murg	-	2	13	11	6	-	4	36
Rhine	Leimersheim	-	-	2	-	2	22	9	35
Rhine	Ludwigshafen	-	-	-	-	2	30	5	37
	Neckar	-	-	-	-	3	-	3	6
Rhine	Petersau	-	-	-	-	3	28	7	38
	Main	-	-	-	-	3	-	12	15
Rhine	Mainz	2	-	2	-	3	24	12	43
	Selz	-	-	-	-	6	2	-	8
	Nahe	-	-	-	-	8	-	6	14
Rhine	Lahnstein	-	-	-	-	3	19	6	28
	Lahn	-	-	-	-	-	2	2	4
	Moselle	-	-	-	-	-	-	5	5
Rhine	Koblenz	-	-	-	-	2	19	5	26
	Ahr	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhine	Bonn	-	-	-	-	2	12	5	19

Table 5.4: Perfluorinated surfactants concentrations in the Rhine river and selected tributaries (mouth) (continued)

River	Sampling site	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	Σ [ng/L]
Sieg	Troisdorf	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhine	Cologne	-	-	-	-	-	2	5	7
Wupper	Leverkusen	-	-	-	-	2	-	7	9
Rhine	Neuss	-	-	-	-	-	7	5	12
Erft	Neuss	-	-	-	-	2	34	3	39
Rhine	Krefeld	-	-	-	-	-	12	7	19
Ruhr	Duisburg	2	18	12	-	48	9	5	94
Rhine-Herne-Canal	Duisburg	3	42	77	7	34	12	3	178
Rhine	Duisburg	2	3	3	-	9	15	9	41
Emscher	Dinslaken	-	3	7	2	22	5	18	57
Wesel-Datteln-Canal	Voerde	3	30	61	4	36	15	3	152
Lippe	Wesel	-	9	20	-	21	3	6	59
Rhine	Wesel	2	2	3	-	8	13	9	37

The highest concentrations in surface waters could be detected in the upper reaches of the Ruhr river and the Moehne river (see Table 5.5). The Ruhr river at Meschede-Wehrstapel (Fig. 5.2, Table 5.5, no. 21) was contaminated with a sum value of 446 ng/L with three major components: PFPeA (167 ng/L), followed by PFOA (139 ng/L) and PFHxA (120 ng/L). We found the highest sum concentrations in the Moehne river at Heidberg (see Fig. 5.2, Table 5.5, no.16). The sum concentration was 4385 ng/L with the major component PFOA (3640 ng/L), followed by PFHxA (247 ng/L), PFOS (193 ng/L), PFHpA (148 ng/L) and PFPeA (93 ng/L). PFBS and PFBA were also detectable.

Lake Moehne, which has a volume of approximately 134.5 million m³, (see Fig. 5.2, Table 5.5, no. 15) was also contaminated with perfluorinated surfactants (sum value: 822 ng/L, major component PFOA, followed by PFHxA, the other components ranged between 17 and 27 ng/L), and shows a similar pattern as the Moehne river.

Figure 5.2: Sampling sites (surface water and drinking water) in the Ruhr area

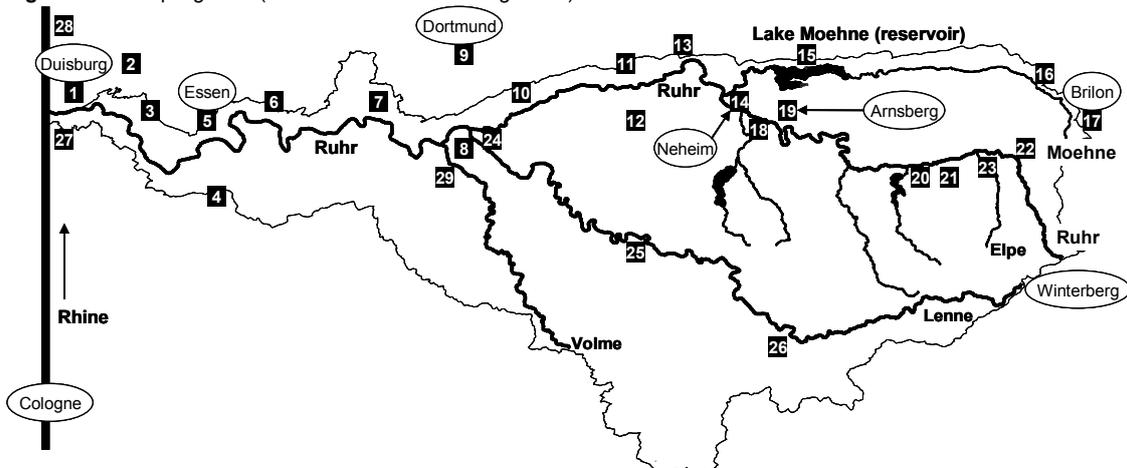


Table 5.5: Perfluorinated surfactants concentrations in surface water in the Ruhr area

No.	Sampling site (river, town)	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	Σ [ng/L]
1	Ruhr (Duisburg)	2	18	12	-	48	9	5	94
3	Ruhr (Muelheim)	-	8	3	-	46	14	6	77
5	Ruhr (Essen)	-	15	12	-	51	9	7	94
6	Ruhr (Bochum)	-	7	5	-	57	12	4	85
7	Ruhr (Witten)	-	8	6	-	69	17	22	132
8	Ruhr (Hagen)	-	12	10	-	90	17	13	142
10	Ruhr (Schwerte)	10	28	25	-	177	18	14	272
18	Ruhr (Huesten)	11	50	38	-	63	8	-	170
20	Ruhr (Meschede-Wennemen)	5	31	16	-	24	4	-	80
21	Ruhr (Meschede-Wehrstapel)	14	167	120	-	139	6	-	446
22	Ruhr (Olsberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Moehne (Neheim)	18	13	33	25	647	18	14	767
15	Lake Moehne (Westrich)	25	24	54	27	654	22	17	822
16	Moehne (Heidberg)	21	93	247	148	3640	44	193	4385
17	Moehne (Brilon)	-	-	-	-	11	6	-	17
23	Elpe (Bestwig)	143	1638	1248	-	1168	71	-	4268
24	Lenne (Hagen)	-	-	-	-	59	-	11	70
25	Lenne (Plettenberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Lenne (Lennestadt)	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Rhine (Neuss)	-	-	-	-	-	7	5	12
28	Rhine (Duisburg-Walsum)	2	3	3	-	9	15	9	41
29	Volme (Hagen)	-	-	-	-	-	3	-	3

By tracking the high concentrations in the upper reaches of the Moehne river, we localised the main source of contamination in an agricultural area near Brilon-Scharfenberg (Fig. 5.3, Table 5.6). From this area the perfluorinated compounds are washed into two little creeks, the Steinbecke (see Fig. 5.3, point B and H) and the Klossiepen (see Fig. 5.3, point D, point A was not contaminated).

The confluence of the Klossiepen with the Bermecke and the Hoebecke near the waste water treatment plant of Brilon-Scharfenberg causes the Bermecke contamination at point F in Fig. 5.3. It seems possible that perfluorinated precursors were degraded to the detected analytes, which is also indicated by the different analyte concentration patterns of the highly contaminated Steinbecke and the Bermecke, provided that the contamination source is identical. The authorities in charge at present assume that contaminated organic waste which was applied on this and other areas is responsible for the pollution.

In the upper soil layers of this area, PS were found at concentrations up to 0.676 mg/kg.

Figure 5.3: Sampling sites (surface water) near Brilon-Scharfenberg

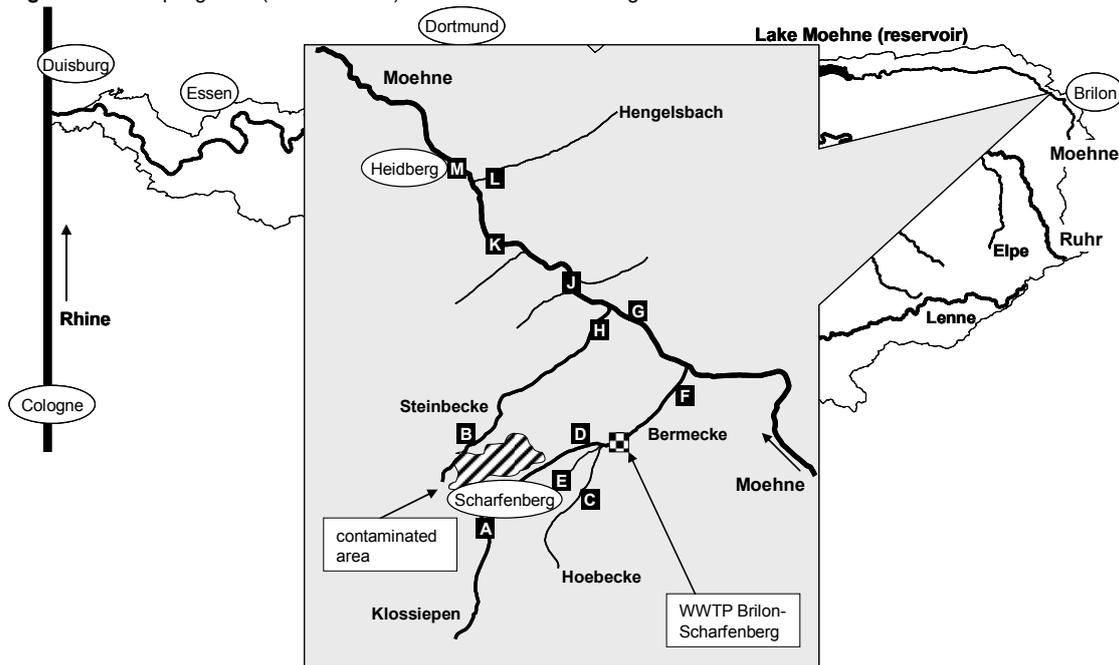


Table 5.6: Perfluorinated surfactants concentrations in the Moehne river and selected tributaries near Brilon-Scharfenberg

No.	Sampling site (river)	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	Σ [ng/L]
A	Klossiepen	-	-	-	-	11	-	-	11
B	Steinbecke	500	2670	2630	621	16800	1450	5900	30571
C	Hoebecke	-	-	-	-	-	-	-	-
D	Klossiepen	9	25	73	46	1860	17	2	2032
E	Bermecke	-	-	-	-	-	-	-	-
F	Bermecke (mouth)	53	234	621	210	6530	146	507	8301
G	Moehne	12	58	152	50	1930	38	135	2375
H	Steinbecke (mouth)	200	1390	3040	989	33900	669	3160	43348
J	Moehne	33	150	393	180	7070	87	405	8318
K	Moehne	31	139	390	158	5990	79	370	7157
L	Hengelsbach	-	-	-	-	-	-	-	-
M	Moehne	25	118	358	146	5570	67	311	6595

In summary, the contamination of the Moehne river commences at the confluence with the Bermecke creek, while the second and more severe pollution occurs after the confluence with the Steinbecke creek.

This leads to the consecutive pollution of Lake Moehne and the Ruhr river and of corresponding drinking waters.

The next surface water sampling site after confluence of the rivers Ruhr and Moehne at Arnsberg-Neheim was Schwerte (see Fig. 5.2, Table 5.5, no. 10) whose sum value amounted to 272 ng/L. The major component was also PFOA (177 ng/L), followed by PFPeA (28 ng/L) and

PFHxA (25 ng/L). PFOS, PFBA and PFBS were also found with 14 ng/L, 10 ng/L and 18 ng/L, respectively. PFHpA was not detectable.

Another high contaminated creek was the Elpe (see Fig. 5.2, Table 5.5, no. 23). This tributary of the Ruhr river seems to be responsible for the pollution of the upper Ruhr river and shows a different analyte pattern than the Moehne river pattern.

Other tributaries of the Ruhr river like the Lenne or Volme river do obviously not contribute to contamination in considerable amounts.

5.3.2 Drinking waters

Concerning the concentration of perfluorinated surfactants in drinking waters of the Ruhr and Moehne area, the highest values were found at Neheim (see Fig. 5.2, Table 5.7, no. 14). The major component is PFOA with 519 ng/L, followed by PFHpA (23 ng/L) and PFHxA (22 ng/L) (chromatogram in Fig. 5.4). The drinking water of Neheim stems from the Moehne river, presumably after it underwent bank filtration or artificial recharge. In comparison, the surface water of the Moehne river at Neheim (chromatogram in Fig. 5.5) and the corresponding drinking water of Neheim show only little differences in the concentrations of the determined analytes (sum value in Moehne river: 767 ng/L, sum value in drinking water: 598 ng/L) (see Fig. 5.2, Table 5.5 and Table 5.7, no. 14).

Figure 5.4: Chromatogram drinking water Neheim (sampling site no.14)

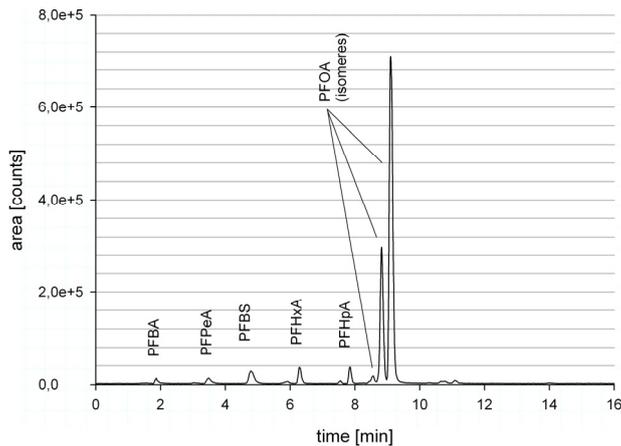
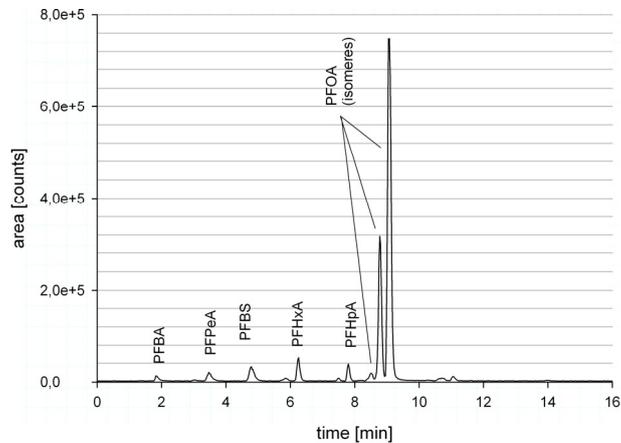


Figure 5.5: Chromatogram surface water Moehne river at Neheim (sampling site no. 14)



All other drinking water sample sites, with the exception of Duisburg-Alt Hamborn, Ruethen, Brilon, Plettenberg, Lennestadt and Duisburg-Wedau (see Fig. 5.2, Table 5.7, corresponding no: 1, 16, 17, 25, 26 and 28), are supplied by waters of the Ruhr river.

The drinking water collected at the two Duisburg sampling sites obviously stems from two different water supplies. At point number 1 (Duisburg-Alt Hamborn), which is located in the northern part of Duisburg, the drinking water supply uses non-contaminated water resources. For the other point at Duisburg-Wedau (no. 28 in Fig. 5.2), which is a southern district of Duisburg, the parameter pattern indicates the Rhine river as origin of the tap water, because only PFBS was found (26 ng/L). PFBS is the major component in the surface water of the Rhine, not only at Duisburg (see Table 4).

The concentrations of perfluorinated compounds at other selected drinking water sampling sites outside the Ruhr and Moehne area are listed in Table 5.8.

Table 5.7: Perfluorinated surfactants concentrations in drinking water in the Ruhr area

No.	Sampling site (town)	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	Σ [ng/L]
1	Duisburg-Alt Hamborn	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Oberhausen	-	6	3	-	43	16	9	77
3	Muelheim	-	3	-	-	30	18	3	54
4	Velbert	-	11	7	-	38	13	-	69
5	Essen	-	9	7	-	56	15	7	94
6	Bochum	-	8	5	-	53	14	10	90
7	Witten	-	4	4	-	49	14	12	83
8	Hagen	-	5	3	-	34	16	22	80
9	Dortmund	2	30	26	-	152	8	11	229
10	Schwerte	3	27	24	-	145	10	13	222
11	Froendenberg	3	26	21	-	143	3	6	202
12	Menden	-	35	31	2	157	6	11	242
13	Wickede	5	46	38	-	208	4	-	301
14	Neheim	11	5	22	23	519	13	5	598
16	Ruethen	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Brilon	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Arnsberg	8	77	56	-	71	3	-	215
20	Meschede	6	46	22	-	22	-	-	96
25	Plettenberg	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Lennestadt	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Duisburg-Wedau	-	-	-	-	-	26	-	26

Table 5.8: Perfluorinated surfactants concentrations in selected drinking waters outside the Ruhr area

Sampling site (town)	PFBA [ng/L]	PFPeA [ng/L]	PFHxA [ng/L]	PFHpA [ng/L]	PFOA [ng/L]	PFBS [ng/L]	PFOS [ng/L]	Σ [ng/L]
Bad Elster (D, Thuringia)	-	-	-	-	-	-	-	-
Bad Muenstereifel (D, Northrhine-Westph.)	-	-	-	-	-	-	-	-
Belm (D, Lower Saxony)	-	-	-	-	-	-	-	-
Berlin (D, Berlin)	-	-	-	-	2	17	6	25
Bonn (D, Northrhine-Westphalia)	-	-	-	-	-	-	-	-
Dresden (D, Saxony)	-	-	-	-	-	-	-	-
Freiburg (D, Baden-Wuerttemberg)	-	-	-	-	-	-	-	-
Juelich (D, Northrhine-Westphalia)	-	-	-	-	-	-	-	-
Koblenz (D, Rhineland-Palatinate)	-	-	-	-	2	20	5	27
Maikammer (D, Rhineland-Palatinate)	-	-	-	-	-	-	-	-
Muenster (D, Northrhine-Westphalia)	-	4	9	-	4	3	-	20
Munich (D, Bavaria)	-	-	-	-	-	-	-	-
Solingen (D, Northrhine-Westphalia)	-	-	-	-	-	-	-	-
Windeck (D, Northrhine-Westphalia)	-	-	-	-	-	-	-	-
Paris (F)	-	-	-	-	-	-	-	-
Hampshire (GB)	-	-	-	-	-	-	-	-

5.4 Discussion

Because of their persistence and mobility, and as indicated by the results, different perfluorinated surfactants are relevant potential contaminants of surface and drinking waters. At present, these compounds and their precursors are not included in regular quality controls neither of surface waters nor drinking waters or organic waste materials. The contaminations most probably stem from polluted waste materials, which were applied in high tonnages on several agricultural areas in that district. It has to be examined if the impurities stem from legal or illegal use of specific waste components and which components are responsible in the end. It has to be made known if there is a long-time contamination of the surface waters, as the high concentrations in Lake Moehne indicate, or if the problem occurred a few months ago. Due to official information, the contaminated material was probably produced since 2002.

Furthermore, the contaminated soils in that area have to be localised and decontaminated or removed if possible. Further investigations have to show to what extent ground waters are already concerned.

The occurrence of perfluorinated surfactants in surface and drinking waters of the Ruhr and Moehne areas causes considerable concern in view of the possible toxic effects on humans and the ecosphere. Because of the concerning high PS concentrations in different drinking waters, particularly in Neheim, German authorities have recommended guide values for PFOA and PFOS in drinking water in a preliminary statement [Trinkwasserkommission 2006 - Drinking water commission 2006].

In comparison with the results of the surface waters of the Ruhr river, the corresponding drinking waters in the Ruhr area have approximately similar values. The concentrations in both water types decrease in flow direction of the Ruhr river from east to west, which can be explained by dilution effects of the confluence of other non or less contaminated tributaries, like Lenne or Volme, and other smaller tributaries.

5.5 Conclusions

The observed parallelism of the PS concentrations in surface and drinking waters of the Ruhr area indicate that the water treatment steps used do not effectively eliminate perfluorinated compounds to a sufficient extent, although approximately 50% of the waterworks at the Ruhr river are equipped with activated carbon filters within their water treatment facilities.

Regarding the discussed precursor compounds of PFOS, PFOA and other PSs, the fluorotelomer alcohols (FTOHs) in the environment also have to be identified and determined, particularly in surface and drinking waters, foodstuffs, packaging material and, if necessary, in organic waste materials and organic fertilisers.

5.6 Recommendations and Perspectives

In order to protect customers and the ecosystem from these persistent and bioaccumulative toxic compounds and their precursors, their use has to be restricted or banned, as the EU plans at present for PFOS. Members of the EU parliament have also suggested restricting the use of PFOA. In January 2006, the US EPA asked different PS manufacturing and processing companies to join in the global effort to eliminate PFOA from emissions and products by 2015 [US EPA Stewardship Program 2006], as a first step.

Acknowledgement. We thank Heinz-Friedrich Schöler of the University of Heidelberg, Institute of Environmental Geochemistry, for help and discussion concerning our work. We also thank Ina Wienand of the Institute for Hygiene and Public Health (University of Bonn) for her help in creating the maps.

Kapitel 6

Literatur

6. Literatur

- 3M (2005): Comments of 3M Company to the EPA science advisory board PFOA review panel. February 10, 2005. Internet: http://www.epa.gov/sab/pdf/olsen-zobel_3m.pdf (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Adams C, Wang Y, Loftin K, Meyer M (2002): Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes. *J Environ Engineer* **128**, 253-260.
- Adler P, Steger-Hartmann T, Kalbfus W (2001): Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogenen Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes. [Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from southern and middle Germany]. *Acta Hydrochim Hydrobiol* **29**, 227-241.
- Ahel M, Jelcic I (2001): Phenazone analgesics in soil and groundwater below a municipal solid waste landfill. In: Daughton CG, Jones-Lepp T (eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington DC, pp. 100-115.
- Ahrer W, Scherwenk E, Buchberger W (2001): Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* **919**, 69-78.
- Alder AC, McArdell CS, Golet EM, Ibric S, Molnar E, Nipales NS, Giger W (2001): Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. In: Daughton CG, Jones-Lepp T (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington DC, pp. 56-69.
- Allsop M, Santillo D, Walters A, Johnston P (2005): Perfluorinated Chemicals: an emerging concern. Greenpeace Technical Note 04. Internet: <http://www.greenpeace.to/publications/uses-of-perfluorinated-chemicals.pdf> (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Arzneiverordnungsreport (1999): Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-66376-2.
- Arzneiverordnungsreport (2000): Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-67573-6.
- Arzneiverordnungsreport (2001): Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-42079-7.
- Arzneiverordnungsreport (2002): Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-43624-3.
- Arzneiverordnungsreport (2006): Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-34369-5.
- ATC-DDD-Index (2005): Amtliche Fassung des ATC (Anatomisch-chemische-Klassifikation)-Index mit DDD (Definierte Tagesdosen)-Angaben für Deutschland im Jahr 2005. GKV-Arzneimittelindex im Wissenschaftlichen Institut der AOK (WIdO), Bonn Internet: http://wido.de/fileadmin/wido/downloads/pdf_arzneimittel/wido_arz_atcddd_1204.pdf (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).

- Bau M, Dulski P (1996): Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth Planet Sci Lett* **143**, 245-255.
- Begley TH, White K, Honigfort P, Twaroski ML, Neches R, Walker RA (2005): Perfluorochemicals: Potential sources of and migration from food packaging. *Food Add Contam* **22**, 1023-1031.
- Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schäfer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP (1999): Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ* **225**, 101-108.
- Berger U, Jämberg U, Kallenborn R (2004): Perfluorinated alkylated substances in the European Nordic environment. *Organohalogen Compounds* **66**, 4046-4052.
- Bergmann S, Delschen T, Leuchs W, Schroers S, Susset B (2008): PFT-Monitoring im Einzugsgebiet von Möhne und Ruhr. In: Sengl M, Körner W, Fromme H, Hrsg. PFT-Fachtagung 27–28 November 2007, Münchner Beiträge 2008. Vol. 59. München: Oldenbourg-Verlag.
- Bioabfallverordnung (1998) (21.09.1998, in der zur Zeit geltenden Fassung): Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden. *BGBL I*, 2955.
- Birkhäuser MH (1999): Effect of Oestrogen-like Substances on Male Fertility. In: International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999.
- BLAC (1999): BUND / LÄNDERAUSSCHUSS FÜR CHEMIKALIENSICHERHEIT, Oktober 1999, Bericht an die 53. Umweltministerkonferenz am 27./28. 10 1999, Augsburg.
- BLAC (2003): BUND / LÄNDERAUSSCHUSS FÜR CHEMIKALIENSICHERHEIT, November 2003, Arzneimittel in der Umwelt, Auswertung der Untersuchungsergebnisse.
- BPI, VFA, BAH, VAP (2002): Rote Liste 2002. Rote Liste Service GmbH, Frankfurt a. M.
- Brauch HJ, Sacher F, Denecke E, Tacke T (2000): Wirksamkeit der Uferfiltration für die Entfernung von polaren organischen Spurenstoffen. (Efficiency of bank filtration for the removal of polar organic tracer compounds). *gwf (Gas- und Wasserfach) Wasser Abwasser* **14**, 226–234.
- Brooke D, Footitt A, Nwaogu TA (2004): Environmental risk evaluation report: perfluorooctanesulphonate (PFOS). Environment agency (UK). Internet: http://www.environment-agency.gov.uk/commondata/105385/pfos_rer_sept04_864557.pdf (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Bundesgesundheitsblatt 4/1989, 5/1995, 7/1996, 11/1997, 1/1999 ISSN: 1436-9990.
- Bundestierärztekammer (2001): Fachanhörung „Verbraucher schützen – Antibiotika-Einsatz in der Tierhaltung minimieren“. Bonn. Internet: http://www.bundestieraerztekammer.de/datei.htm?filename=pm10-01.doc&themen_id=5170 (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Buser HR, Müller MD, Theobald N (1998a): Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea. *Environ Sci Technol* **32**, 188-192.

- Buser HR, Poiger T, Müller MD (1998b): Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ Sci Technol* **32**, 3449-3456.
- Buser HR, Poiger T, Müller MD (1999): Occurrence and environmental behavior of the pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ Sci Technol* **33**, 2529-2535.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992): evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit Med J* **305**, 609-613.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* **101**, 378-384.
- Danish-EPA (Danish Environmental Protection Agency) (2005): More environmentally friendly alternatives to PFOS-compounds and PFOA. Environmental project no. 10132005. Internet: <http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2005/87-7614-668-5/pdf/87-7614-669-3.pdf> (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Daughton CG, Ternes TA (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* **107**, 907-938.
- Daughton CG, Jones-Lepp T (Eds.) (2001): *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington DC.
- Daughton CG (2004): Non-regulated water contaminants: emerging researches. *Environmental Impact Assessment Review* **24**, 711-732.
- Delschen T, Barkowski D, Hachen J, Jungmann A, Leuchs W, Pape R (2007): Bodenbelastungen nach Aufbringen PFT-haltiger Abfälle in Nordrhein-Westfalen. *Bodenschutz* **3**, 65-70.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M (1998): Identification of estrogenic chemicals in STP effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* **32**, 1549-1558.
- Eckel WP, Ross B, Isensee RK (1993): Pentobarbital found in ground water. *Ground Water* **31** 801-804.
- Empfehlung des Rates der EU, 2001, 2002/77/EG.
- EU-Kommission (2002): Kommissionsvorschlag „Neue Sicherheitsvorschriften für Futtermittelzusatzstoffe und Verbot von Antibiotika als Wachstumsförderer“. Pressenachrichten, Brüssel.
- EU-Parlament und EU-Rat (2006): Richtlinie 2006/122/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 zur dreißigsten Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten für Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Perfluorooctansulfonate). Amtsblatt der Europäischen Union L 372/32 DE vom 27.12.2006.
- Färber H, Skutlarek D, Exner M (2003): Abschlussbericht zum Forschungsprojekt „Untersuchung von Krankenhausabwässern eines Universitätsklinikums, von kommunalem Abwasser sowie von Oberflächenwasser und Uferfiltraten auf Rückstände ausgewählter Antibiotika“ (LUA NRW 112-1781/MZ 43/99 und MZ 2/2000).

- FEDESA (2001): Progress Report on Antimicrobial Resistance. Brussels, Internet: <http://www.fedesa.be/Antibio/Visby/Visby-JV/Visby.htm> (Seite am 5. Juli 2008 nicht mehr abrufbar).
- Feuerpfeil I, Lopez-Pila J, Schmidt R, Schneider E, Szewzyk R (1999): Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz **42**, 37-50.
- Flaherty JM, Connolly PD, Decker ER, Kennedy SM, Ellefson ME, Reagan WK, Szostek B (2005): Quantitative determination of perfluorooctanoic acid in serum and plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr B **819**, 329-338.
- FLUGS-Fachinformationsdienst (2007): Antibiotika und Antibiotikaresistenzen. Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (Stand: 24. 01.2007) Internet: <http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/FLUGS/PDF/Themen/Krankheitsbilder/Antibiotika.End.pdf> (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- FLUOROS 2005: International Symposium on fluorinated alkyl organics in the environment. Toronto, Canada August 18th - 20th, 2005, Internet: <http://www.chem.utoronto.ca/symposium/fluoros/presentations.htm> (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Fránek M, Kolár V, Deng A, Crooks S (1999): Determination of sulfadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA. Food Agric Immunol **11**, 339-349.
- Fricke M, Lahl U (2005): Risk evaluation of perfluorinated surfactants as contribution to the current debate on the EU Commission's REACH document. UWSF – Z Umweltchem Ökotox **17**, 36-49.
- Fromme H, Midasch O, Twardella D, Angerer J, Boehmer S, Liebl B (2007): Occurrence of perfluorinated substances in an adult German population in southern Bavaria. Int Arch Occup Environ Health **80**, 313-319.
- FSA Food Standards Agency UK – Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment COT (2006a): Third draft working paper on the tolerable daily intake for perfluorooctanoic acid. TOX/2006/24. July 2006. Internet: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/TOX-2006-24.pdf> (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- FSA Food Standards Agency UK – Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment COT (2006b): Third draft working paper on the tolerable daily intake for perfluorooctane sulfonate. TOX/2006/23. July 2006. Internet: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/TOX-2006-23.pdf> (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Galensa R, Engelhardt U, Bahadir M, Böhm H (1995): Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der HPLC. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim. ISBN 3-527-28747-7.
- Garrison AW, Pope JD, Allen FR(1976): GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In: Keith CH (Ed.), Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, pp. 517-556 Chapter 30.
- Gebrauchsinformation Vetoprim (2002), 24 % ad us. vet. Essex Animal Health, Friesoythe, Germany.

- Giesy JP, Kannan K (2001): Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Technol* **35**, 1339-1342.
- Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA, Giger W (2001): Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chem* **73**, 3632-3638.
- Golet EM, Alder AC, Giger W (2002): Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* **36**, 3645-3651.
- Guruge KS, Yeung LWY, Yamanaka N, Miyazaki S, Lam PKS, Giesy JP, Jones PD, Yamashita N (2006): Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). *Toxicological Sciences* **89**, 93-107.
- Halling-Sørensen B, Nielsen N, Lansky PF, Ingerslev F, Hansen L, Lützhøft HC, Jørgensen SE (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* **36** 357-394.
- Halling-Sørensen B, Holten Lützhøft HC, Andersen HR, Ingerslev F (2000): Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* **46**, (Suppl 1) 53-58.
- 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. *Anal Chem* **74**, 1509-1518.
- Hansch C, Hoekman D, Leo A, Zhang LT, Li P (1995): The expanding role of quantitative structure-activity-relationships (QSAR) in toxicology. *Toxicol Lett* **79**, 45-53
- Hansen KJ, Johnson HO, Eldridge JS, Butenhoff JL, Dick LA (2002): Quantitative Characterization of Trace Levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River. *Environ Sci Technol* **36**, 1681-1685.
- Harada K, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Watanabe T, Sasaki S, Kamiyama S, Koizumi A (2004): The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate in human serum over the last 25 years. *J Occup Health* **46**, 141-147.
- Hartig C, Storm T, Jekel M (1999): Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **854**, 163-173.
- Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1998): Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ Toxicol Chem* **17**, 377-382.
- Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE (2001): Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4930-4933.
- Heberer T, Stan HJ (1996): Vorkommen von polaren organischen Kontaminanten im Berliner Trinkwasser. [Occurrence of polar organic contaminants in Berlin drinking water]. *Vom Wasser* **86**, 19-31.
- Heberer T, Stan HJ (1997a): Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *Int J Environ Anal Chem* **67**, 113-124.

- Heberer T, Dünnbier U, Reilich C, Stan HJ (1997b): Detection of drugs and drug metabolites in groundwater samples of a drinking water treatment plant. *Fresenius Environ Bull* **6**, 438-443.
- Heberer T, Fuhrmann B, Schmidt-Bäumler K, Tsipi D, Koutsouba V, Hiskia A (2001a): Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground and drinking water in Greece and Germany. In: Daughton CG, Jones-Lepp T (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington DC, pp. 70-83.
- Heberer T, Verstraeten IM, Meyer MT, Mechlinski A, Reddersen K (2001b): Occurrence and fate of pharmaceuticals during bank filtration - preliminary results from investigations in Germany and the United States. *Water Resources Update* pp. 4-17.
- Heberer T (2002a): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* **131**, 5-17.
- Heberer T, Feldmann D, Reddersen K, Altmann H, Zimmermann T (2002b): Production of drinking water from highly contaminated surface waters: removal of organic, inorganic, and microbial contaminants applying mobile membrane filtration units. *Acta Hydrochim Hydrobiol* **30**, 24-33.
- Heberer T, Reddersen K, Mechlinski A (2002c): From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci Technol* **46**, 81-88.
- Heberer T (2002d): Tracking down persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. In: Grischek T, Hiscock K (Eds.), *Attenuation of Groundwater Pollution by Bank Filtration*. *J Hydrol* **266**, 139-144.
- Hignite C, Azarnoff DL (1977): Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxoyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci* **20**, 337-342.
- Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Mehlich A, Ballwanz F, Kratz KL (1998): Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **815**, 213-223.
- Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **225**, 109-118
- HLFU Hessen (Hessische Landesanstalt für Umwelt) (Hrsg.) (1998): Fachtagung „Arzneimittel in Gewässern – Risiko für Mensch, Tier und Umwelt?“. Schriftenreihe der Hess. Landesanstalt für Umwelt, Wiesbaden, ISBN 3-89026-279-1.
- Hölzer J, Midasch O, Rauchfuss K, Kraft M, Reupert R, Angerer J, Kleeschulte P, Marschall N, Wilhelm M (2008): Biomonitoring of Perfluorinated Compounds in Children and Adults Exposed to Perfluorooctanoate-Contaminated Drinking Water. *Environ Health Perspect* **116**, 651-657.
- Holm JV, Rügge K, Bjerg PL, Christensen TH (1995): Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ Sci Technol* **29**, 1415-1420.
- Houde M, Martin JW, Letcher RJ, Solomon KR, Muir DCG (2006): Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substances: A Review. *Environ Sci Technol* **40**, 3463-3473.

- Huang CH, Sedlak DL (2001): Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunoadsorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem* **20**, 133-139.
- Inoue K, Okada F, Ito R, Kawaguchi M, Okanouchi N, Nakazawa H (2004): Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonamide in human plasma by column-switching liquid chromatography-electrospray mass spectrometry coupled with solid-phase extraction. *J Chromatogr B* **810**, 49-56.
- Jernbro S, Rocha PS, Skutlarek D, Färber H, Hollert H, Engwall M (2007): PFOS is increasing the genotoxicity of 3,4-cyclophosphamide in the micronucleus assay with V79 cells – Another additional hint for alterations in cell membrane properties caused by PFOS. *Environ Sci & Pollut Res* **14**, 85-87.
- Johnson A, Belfroid AC, di Corcia A (2000): Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ* **256**, 163-173.
- Kannan K, Tao L, Sinclair E, Pastva SD, Jude DJ, Giesy JP (2005): Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Arch Environ Contam Toxicol* **48**, 559-565.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* **36**, 1202-1211.
- Kuch HM, Ballschmiter K (2000): Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/l-level. *Fresenius J Anal Chem* **366**, 392-395.
- Kudo N, Kawashima Y (2003): Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *J Toxicol Sci* **28**, 49-57.
- Kühne M, Ihnen D, Möller G, Agthe O (2000): Experiments on the environmental stability of tetracycline in water and liquid manure. In: Ginkel LA van, Ruiters A (Eds.): Proceedings of the Euro-Residue IV Conference, Veldhoven, NL, May 8-10, Vol. 2, pp. 698-703.
- Kümmerer K, Steger-Hartmann T, Meyer M (1997): Biodegradability of the anti-tumor agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Res* **31** 2705-2710.
- Kümmerer K, Helters E (2000): Hospitals as a source of gadolinium in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* **34**, 573-577.
- Kümmerer K (2001a): Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* **45**, 957-969.
- Kümmerer K (Hrsg.) (2001b): Pharmaceuticals in the environment. Sources, Fate, Effects and Risks. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-41067-8.
- Lange FT, Schmidt CK, Metzinger M, Wenz M, Brauch HJ (2004): Determination of perfluorinated carboxylates and sulfonates from aqueous samples by HPLC-ESI-MS-MS and their occurrence in surface waters in Germany. Poster at the SETAC-Meeting in Prague (CZ), April, 18th - 22th 2004.

- Langhammer JP (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Dissertation, Universität Bonn.
- LANUV-NRW (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) (2008): Länderübergreifender Ringversuch LÜRVS-01 Perfluorierte Tenside (PFT) in Wasser und Schlamm - Auswertung, Juni 2008, Düsseldorf. Internet: http://www.lanuv.nrw.de/analytik/ringversuche/pdf/luerv_so1.pdf (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- LGL Bayern (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) (2006): Umweltmedizinische Bedeutung perfluorierter Kohlenwasserstoffe (PFC). Band 16 der Schriftenreihe *Materialien zur Umweltmedizin*. ISBN 978-3-939652-12-0 (Online-Ausgabe)
- Lindsey ME, Meyer M, Thurman EM (2001): Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* **73**, 4640-4646.
- Martin JW, Ellis DA, Mabury SA, Hurley MD, Wallington TJ (2006): Atmospheric chemistry of perfluoroalkanesulfonamides: kinetic and product studies of the OH radical and Cl atom initiated oxidation of N-ethyl perfluorobutanesulfonamide, *Environ Sci Technol* **40**, 864-872.
- Matissek R, Schnepel FM, Steiner G (1992): *Lebensmittelanalytik*, 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg. ISBN 3-540-54684-7.
- Midasch O, Schettgen T, Angerer J (2006): Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population. *Int J Hyg Environ Health* **209**, 489-496.
- Möhle E, Horvath S, Merz W, Metzger JW (1999): Bestimmung von schwer abbaubaren organischen Verbindungen im Abwasser - Identifizierung von Arzneimittelrückständen [Determination of hardly degradable organic compounds in sewage water - Identification of pharmaceutical residues]. *Vom Wasser* **92**, 207-223.
- Moody CA, Hebert GN, Strauss SH, Field JA (2003): Occurrence and persistence of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at Wurtsmith Air Force Base, Michigan, USA. *J Environ Monit* **5**, 341-345.
- MUNLV NRW (Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen) (2006): PFT-Belastungen in NRW: Befunde und Auswirkungen, Maßnahmen und erste Schlussfolgerungen. Bericht an den Ausschuss für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landtags Nordrhein-Westfalen zur Sitzung am 23.08.2006. Internet: http://www.umwelt.nrw.de/ministerium/presse/presse_extra/pdf/pft_bericht.pdf (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (Hrsg.) 8. Auflage (2001): *Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. ISBN 3-8047-1763-2.
- Myllyniemi AL, Rannikko R, Lindfors E, Niemi A (2000): Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues. *Food Addit Contam* **17**, 991-1000.

- Norpoth K, Nehr Korn A, Kirchner M, Holsen H, Teipel H (1973): Untersuchungen zur Frage der Löslichkeit und Stabilität ovulationshemmender Steroide in Wasser, Abwässern und Belebtschlamm. Zbl Bakt Hyg I, Abt. Orig. B 156, S. 500.
- OECD (2002): Hazard assessment of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and its Salts. ENV/JM/RD(2002)17/Final. Paris.
- OECD (2005): Results of survey on production and use of PFOS, PFAS and PFOA, related substances and products / mixtures containing these substances. ENV/JM/MONO(2005)1. Paris.
- Ollers S, Singer HP, Fässler P, Müller RS (2001): Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. J Chromatogr A **911**, 225-234.
- Otto M (1995): Analytische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim. ISBN 3-527-28691-8
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck, RC, Korzeniowski SH (2006): Sources, fate and transport of Perfluorocarboxylates - a critical review. Environ Sci Technol **40**, 32-44.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem Ecol **8**, 275–285.
- Putschew A, Wischnack S, Jekel M (2000): Occurrence of triiodinated X-ray contrast agents in the aquatic environment. Sci Total Environ **255**, 129-134.
- Putschew A Schittko S Jekel M (2001a): Quantification of triiodinated benzene derivatives and X-ray contrast media in water samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. J Chromatogr A **930**, 127-134.
- Putschew A, Jekel M (2001b): Iodierte Röntgenkontrastmittel im anthropogen beeinflussten Wasserkreislauf. [Iodinated X-ray contrast media in the anthropogenic influenced water cycle]. Vom Wasser **97**, 103-114.
- ROTE LISTE® 2000 Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte) Hrsg.: Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt a. M. ECV-Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf ISBN 3-87193-252-3.
- ROTE LISTE® 2008 Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte) Hrsg.: Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt a. M. Online-Version im Intranet des Universitätsklinikums Bonn.
- Sacher F, Lange FT, Brauch HJ, Blankenhorn I (2001): Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. J Chromatogr A **938**, 199-210.
- Safe SH (1994): Dietary and Environmental Estrogens and Antiestrogens and their Possible Role in Human Disease. Environ Sci & Pollut Res **1**, 29-33.
- Saito N, Harada K, Inoue K, Sasaki K, Yoshinaga T, Koizumi A (2004): Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. J Occup Health **46**, 49-59.

- Samuelson OB, Torsvik V, Ervik A (1992): Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Sci Total Environ* **114**, 25-36.
- Scheytt T, Mersmann P, Heberer T (2001): Natural attenuation of pharmaceuticals. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water*, October 9-11, Minneapolis, Minnesota, pp. 253-259.
- Schneiderei M (2006): Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen Veredelungsregionen. Vortrag auf der 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. , 14. bis 16. September 2006 in Bonn.
Internet: http://www.p-e-g.org/archiv_tmp/jahrestagung_20/symp2/Schneiderei.pdf
(letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Schröder H, Nunk K, Günther J, Kern WV (2003): Antibiotika: Solange sie noch wirken....GGW – G+G Wissenschaft **3**, 7-16.
- Seiler RL, Zaugg SD, Thomas JM, Howcroft DL (1999): Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water* **37**, 405-410.
- Skutlarek D, Exner M, Färber H (2006 a): Bestimmung von perfluorierten Tensiden (PFC) in der aquatischen Umwelt und Trinkwasser mittels HPLC-MS/MS. Poster at the 72th Annual Meeting of the Waterchemical Society (Division of the German Chemical Society) in Celle (D) May, 22th -24th 2006.
- Skutlarek D, Exner M, Färber H (2006 b): Perfluorinated surfactants (PS) in surface and drinking waters. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* **18**, 151-154.
- Sonneborn M, Aurand K, Hässelbarth H, Lahmann E, Müller G, Niemitz W (1978): Zum Vorkommen von Steroiden mit biologisch wirksamer Östrogenaktivität im Wasserkreislauf. In: *Organische Verunreinigungen in der Umwelt*, ISBN 3 503 017 135 20 3.
- Spengler P, Körner W, Metzger JW (1999): Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. [Hardly degradable substances with estrogenic activity in effluents of municipal and industrial sewage plants]. *Vom Wasser* **93**, 141-157.
- Stan HJ, Linkerhägner M (1992): Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methyl-propionsäure im Grundwasser mittels Kapillar-Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie. [Identification of 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl-propionic acid in ground water using capillary-gas chromatography with atomic emission detection and mass spectrometry]. *Vom Wasser* **79**, 75-88.
- Stan HJ, Heberer T, Linkerhägner M (1994): Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System - Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? [Occurrence of clofibric acid in the aquatic system - Is their therapeutic use responsible for the loads found in surface, ground- and drinking water?]. *Vom Wasser* **83**, 57-68.
- Stan HJ, Heberer T (1997): Pharmaceuticals in the aquatic environment. In: Suter MJF (Ed.), *Dossier Water Analysis. Analysis* **25**, M20–M23.
- Steger-Hartmann T, Kümmerer K, Schecker J (1996): Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **726**, 179-184.

- Steger-Hartmann T, Kümmerer K, Hartmann A (1997): Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotox Environ Safety* **36**, 174-179.
- Straub RF, Voyksner RD (1993): Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephalosporin by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr* **647**, 167-181.
- Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen LP, Holten Lützhøft HC, Halling-Sørensen B (2000): Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* **40**, 783-793.
- Stumpf M, Ternes T, Haberer K, Baumann W (1996): Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. [Determination of natural and synthetic estrogens in sewage plants and river water]. *Vom Wasser* **87**, 251-261.
- Stumpf M, Ternes T, Haberer K, Baumann W (1998): Isolierung von Ibuprofen-Metaboliten und deren Bedeutung als Kontaminanten in der aquatischen Umwelt. [Isolation of ibuprofen-metabolites and their importance as pollutants of the aquatic environment]. *Vom Wasser* **91**, 291-303.
- Stumpf M, Ternes TA, Wilken RD, Rodrigues SV, Baumann W (1999): Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* **225**, 135-141.
- Sumpter JP (1998a): Xenoendocrine disrupters--environmental impacts. *Toxicol Lett* **102-103**, 337-342.
- Sumpter JP (1998b): Reproductive effects from estrogen activity in polluted water. *Arch Toxicol Suppl* **20**, 143-150.
- Sumpter JP (1999): Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Freshwater Fish. In: International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999.
- Swedish Chemicals Inspectorate (2006): Perfluorooctane sulfonate (PFOS) working draft profile. Internet:
http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/tech_comments/PFOS%20risk%20profile%202nd%20draft_Swe.pdf
 (Seite am 5. Juli 2008 nicht mehr aufrufbar).
- Taniyasu S, Kannan K, Horii Y, Hanari N, Yamashita N (2003): A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan. *Environ Sci Technol* **37**, 2634-2639.
- Taniyasu S, Yamashita N, Kannan K, Horii Y, Sinclair E, Petrick G, Gamo T (2004): Perfluorinated carboxylates and sulfonates in open ocean waters of the Pacific and Atlantic ocean. *Organohalogen Compounds* **66**, 4035-4040.
- Ternes TA (1998a): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* **32**, 3245-3260.
- Ternes TA, Stumpf M, Schuppert B, Haberer K (1998b): Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water. *Vom Wasser* **90**, 295-309.

- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999a): Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* **225**, 81-90.
- Ternes TA, Kreckel P, Mueller J (1999b): Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* **225**, 91-99.
- Ternes TA, Hirsch R (2000a): Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. *Environ Sci Technol* **34**, 2741-2748.
- Ternes TA (2000b): Rückstände von Arzneimitteln, Diagnostika und Antiseptika in Abwasser, Flüssen und Grundwasser - Eine neue Herausforderung für die Wissenschaft. Habilitationsschrift, Mainz, Juli 2000.
- Ternes TA (2001a): Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. In: Daughton CG, Jones-Lepp T (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory*.
- Ternes TA, Bonerz M, Schmidt T (2001b): Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **938**, 175-185.
- Teuber M (2000): Antibiotikaresistenzen - Ausbreitung und Konsequenzen. *Biologie heute* (2).
- Tolls J (2001): Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils. *Environ Sci Technol* **35**, 3397-3406.
- Track T, Kreysa G (Hrsg.) (2003): *Spurenstoffe in Gewässern – Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen*. Wiley-VCH Verlag Weinheim. ISBN 3-527-31017-7.
- Trinkwasserkommission (2006): Vorläufige Bewertung von Perfluorierten Tensiden (PFT) im Trinkwasser am Beispiel ihrer Leitsubstanzen Perfluorooctansäure (PFOA) und Perfluorooctansulfonsäure (PFOS). Statement of the German drinking water commission of the Federal Ministry of Health at the Federal Office of environment June, 21st 2006, revised July 13th. 2006 Internet:
<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-presse/hintergrund/pft-im-trinkwasser.pdf>
 (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Umweltbundesamt (2003): Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht. Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission beim Umweltbundesamt. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **46**, 249-251.
- Umweltbundesamt (2007): Perfluorierte Verbindungen: Flascher Alarm oder berechtigte Sorge? UBA-Hintergrundpapier vom 16.02.2007. Internet:
<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-presse/hintergrund/perfluorierte-verbindungen.pdf>
 (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- US EPA (2005): Draft risk assessment of the potential human health effects associated with exposure to perfluorooctanoic acid. January 2005. Internet:
<http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/pfoarisk.pdf>
 (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).

- US EPA (2006): 2010/15 PFOA stewardship program. Internet:
<http://www.epa.gov/opptintr/pfoa/pubs/pfoastewardship.htm>
 (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Verstraeten IM, Heberer T, Scheytt T (2003): Occurrence, characteristics, and transport and fate of pesticides, pharmaceutical active compounds, and industrial and personal care products at bank-filtration sites. In: Ray C (Ed.), *Riverbank Filtration. Improving Source – Water Quality*, Springer Netherlands, Dordrecht, ISBN 978-1-4020-1133-7, pp. 175-227.
- Wallington TJ, Hurley MD, Xia J, Wuebbels DJ, Sillman S, Martin J, Mabury DA, Nielsen OJ, Sulbaek Andersen MP (2006): Formation of C₇F₁₅COOH (PFOA) and other perfluorocarboxylic acids during the atmospheric oxidation of 8:2 fluorotelomer alcohol. *Environ Sci Technol* **40**, 924-930.
- Werres F, Stien J, Balsaa P, Schneider A, Winterhalter P, Overath H (2000): Automatisierte Bestimmung polarer Arzneimittelrückstände in Wässern mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) und Derivatisierung. *Vom Wasser* **94**, 135-147.
- Witte W, Klare I (1999): Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. Mikrobiologisch-epidemiologische Aspekte. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* **42**, 8-16.
- WWF (2004): „Politiker mit Giftcocktail im Blut“ – WWF-Analyse: EU-Parlamentarier mit 76 Chemikalien belastet, Presseerklärung vom 21.04.2004, Internet:
http://www.wwf.de/presse/details/news/politiker_mit_giftcocktail_im_blut/
 (letzter Aufruf der Seite: 5. Juli 2008).
- Xiao XY, McCalley DV, McEvoy J (2001): Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J Chromatogr A* **923**, 195-204.
- Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Hanari N, Okazawa T, Petrick G (2004): Environmental contamination by perfluorinated carboxylates and sulfonates following the use of fire-fighting foam in Tomakomai, Japan. *Organohalogen Compounds* **66**, 4063-4068.
- Yao X, Zhong L (2005): Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. *Mutation Research* **587**, 38-44.
- Zwiener C, Frimmel FH (2000a): Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Res* **34**, 1881–1885.
- Zwiener C, Glauner T, Frimmel FH (2000b): Biodegradation of pharmaceutical residues investigated by SPE-GC/ ITD-MS and on-line derivatization. *HRC - J High Res Chromatogr* **23**, 474–478.

Anhang

Anhang A

Weiterentwicklung der PFT-Bestimmungsmethode mit optimierter Erfassung der kurzkettigen perfluorierten Alkylcarbonsäuren durch Anreicherung auf einem polymerbasierten schwachen Anionentauscher (ab 2007 / 2008)

Aufgrund der Untersuchungsbefunde des Jahres 2006 konnte für Trinkwasser und Oberflächenwasser festgestellt werden, dass längerkettigen perfluorierten Tensiden in wässrigen Matrices eher ein untergeordnete Bedeutung zukommt, kürzerkettige PFT inklusive der Perfluorbutansäure dagegen häufig, auch in größeren Konzentrationen vorkommen. Daher wurde 2007 für das Land Nordrhein-Westfalen in Zusammenarbeit mit dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV-NRW) eine Methodenumstellung erarbeitet. Zur Verbesserung der Extraktionsausbeuten der Perfluorbutansäure bei gleichzeitig hohen Ausbeuten für PFOA und PFOS wurde die Extraktion auf einem schwachen Anionentauscher auf Polymerbasis durchgeführt (Strata-X-AW, Phenomenex). Tabelle A.1 veranschaulicht die optimierte Extraktionsmethode.

Tabelle A.1: SPE-Anreicherung perfluorierte Tenside (Extraktion auf schwachem Anionentauscher)

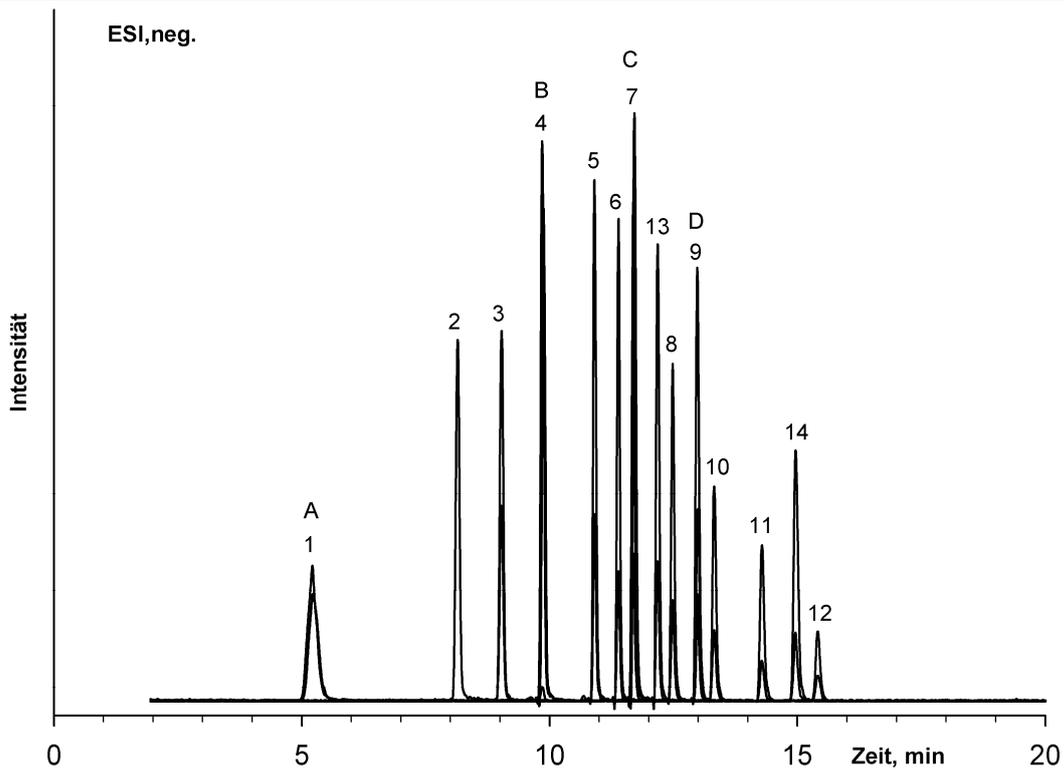
SPE-Anreicherung PFT (Anionentauscher)	
Probenvorbereitung	<ul style="list-style-type: none">- 50 mL Probe werden unfiltriert in einen 50 mL-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführt.- Die Probe wird bei Bedarf mit H₂SO₄ (1N) oder NaOH (1N) auf pH 7-8 eingestellt.- Die Probe wird mit 10 µL einer 0,5 mg/L-Lösung der ¹³C-markierten internen Standards versetzt, so dass die Konzentration in der Probe 100 ng/L beträgt.- Zugabe von 2 mL Methanol (dynamische Solvatisierung)
SPE-Kartusche	<ul style="list-style-type: none">- Strata-X-AW, 6 mL, 200 mg (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Konditionierung	<ul style="list-style-type: none">- 8 mL Methanol (0,1% Ammoniak)- 4 mL Methanol- 4 mL MilliQ-Wasser- Nach dem Konditionieren wird die Strata-X-AW-Kartusche mit 2 mL MilliQ-Wasser gefüllt und mit einem Säulenadapter verschlossen, auf den ein 70 mL-Reservoir gesteckt wird.
Extraktion	<ul style="list-style-type: none">- Die Extraktion erfolgt mit Hilfe einer mehrkanäligen Schlauchpumpe durch Saugen der Probenlösung durch die Kartusche mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 2,5 mL/min (Extraktionszeit ca. 20 Minuten)
Waschen	<ul style="list-style-type: none">- 4 mL MilliQ-Wasser- 4 mL Acetonitril-Aceton-Ameisensäure (50/50/2, v/v/v)- 4 mL Methanol
Trocknen	<ul style="list-style-type: none">- Die Strata-X-AW-Kartusche wird nicht getrocknet
Elution	<ul style="list-style-type: none">- 2 x 4 mL Methanol (0,1% Ammoniak)
Umlösen	<ul style="list-style-type: none">- Das Eluat wird im Wasserbad bei 35°C im schwachen Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und in 0,5 mL Methanol-Wasser (50/50, v/v) aufgenommen.- Der Extrakt wird messfertig in ein HPLC-Vial abgefüllt.

Da bei der Perfluorbutansäure nur ein Massenübergang zur Identifikation herangezogen werden kann, kommt der Retentionszeit eine wichtige Aufgabe als zweiter Identifikationspunkt zu. Daher wurde für die Flüssigchromatographie eine Trennsäule mit größerer Retentionskraft für PFBA als erste Substanz im Chromatogramm gewählt (NUCLEODUR PYRAMID-RP, Macherey-Nagel), um diese besonders polare Verbindung erst viel später als zur Totzeit von der Säule zu eluieren. Die HPLC-Bedingungen sind in Tabelle A.2 dargestellt, das entsprechende Chromatogramm in Abbildung A.1.

Tabelle A.2: HPLC-Bedingungen perfluorierte Tenside (Extraktion auf schwachem Anionentauscher)

HPLC-Bedingungen PFT	
Instrument	Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Säule	NUCLEODUR PYRAMID-RP 2,0 x 125 mm, 3 µm (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
Mobile Phase	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ (Wasser:Methanol, 75:25, v:v) B: 10 mM CH ₃ COONH ₄ (Acetonitril:Methanol, 75:25, v:v)
Gradient	0 min 10% B, 3 min 30% B, 11 min 55% B, 15 min 70% B
Flussrate	0,3 mL/min
Säulenofen-Temperatur	50 °C
Injektions-Volumen	50 µL

Abbildung A.1: Chromatogramm perfluorierte Tenside (Standard 10 µg/L), getrennt auf einer Nucleodur Pyramid-Säule
Chromatogramm PFT (Standard 10 µg/L) NUCLEDUR PYRAMID



Nr.	RT [min]	Substanz	Nr.	RT [min]	Substanz	Nr.	RT [min]	Substanz
1	5,2	PFBA	7	11,7	PFOA	13	12,2	PFHpS
2	8,2	PFPeA	8	12,5	PFNA	14	15,0	PFDS
3	9,0	PFBS	9	13,0	PFOS	A	5,2	¹³ C ₄ -PFBA
4	9,9	PFHxA	10	13,3	PFDA	B	9,9	¹³ C ₂ -PFHxA
5	10,9	PFHpA	11	14,3	PFUnDA	C	11,7	¹³ C ₄ -PFOA
6	11,4	PFHxS	12	15,4	PFDoDA	D	13,0	¹³ C ₄ -PFOS

Kursivdruck – Substanzen NICHT im Untersuchungsprogramm

In Absprachen mit dem LANUV-NRW wurden zehn Substanzen (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFBS, PFHxS, PFOS) in das Untersuchungsspektrum aufgenommen, für die Quantifizierung vier ¹³C-markierte interne Standards (¹³C₄-PFBA, ¹³C₂-PFHxA, ¹³C₄-PFOA, ¹³C₄-PFOS). Die substanzspezifischen MS-Parameter sind in Tabelle A.3 aufgeführt, die allgemeinen MS-Bedingungen in Kapitel 1.3.3. nachzulesen.

Tabelle A.3: Optimierte substanzspezifische MS-Parameter perfluorierte Tenside (14 Substanzen + 4 interne Standards)

Substanz	Q1 mass [amu]	Q3 mass [amu]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
PFBA	213,0	169,1 -	-11	-60	-6	-16	-12 -	-6 -
PFPeA	263,0	219,0 -	-11	-70	-6	-16	-12 -	-6 -
PFHxA	313,0	269,1 119,0	-11	-60	-5	-18	-12 -26	-6 -18
PFHpA	363,1	319,0 169,1	-11	-70	-4	-26	-14 -24	-8 -4
PFOA	413,0	369,1 169,1	-11	-140	-5	-24	-14 -26	-8 -4
PFNA	463,0	419,0 219,1	-11	-80	-6	-28	-16 -24	-10 -4
PFDA	513,1	469,1 219,0	-11	-50	-7	-32	-16 -26	-12 -6
<i>PFUnDA</i>	<i>563,1</i>	<i>519,1</i> <i>219,0</i>	<i>-11</i>	<i>-130</i>	<i>-6</i>	<i>-32</i>	<i>-18</i> <i>-30</i>	<i>-12</i> <i>-4</i>
<i>PFDoDA</i>	<i>613,1</i>	<i>569,1</i> <i>169,1</i>	<i>-11</i>	<i>-120</i>	<i>-7</i>	<i>-42</i>	<i>-22</i> <i>-40</i>	<i>-10</i> <i>-8</i>
PFBS	299,0	80,0 99,0	-31	-180	-11	-16	-54 -44	-10 -12
PFHxS	399,0	80,1 99,0	-31	-230	-10	-22	-78 -54	-10 -10
<i>PFHpS</i>	<i>449,0</i>	<i>80,1</i> <i>99,0</i>	<i>-41</i>	<i>-340</i>	<i>-12</i>	<i>-22</i>	<i>-84</i> <i>-64</i>	<i>-10</i> <i>-10</i>
PFOS	499,1	80,0 99,0	-31	-190	-11	-26	-92 -60	-8 -10
<i>PFDS</i>	<i>599,0</i>	<i>80,0</i> <i>98,9</i>	<i>-56</i>	<i>-340</i>	<i>-12</i>	<i>-40</i>	<i>-108</i> <i>-76</i>	<i>-8</i> <i>-12</i>
¹³ C ₄ -PFBA	217,0	172,0 -	-16	-50	-5	-18	-12 -	-6 -
¹³ C ₂ -PFHxA	315,0	270,0 119,1	-16	-50	-5	-16	-12 -28	-8 -14
¹³ C ₄ -PFOA	416,9	372,1 168,9	-21	-280	-4	-26	-16 -26	-8 -4
¹³ C ₄ -PFOS	502,9	80,1 99,0	-76	-290	-9	-30	-82 -60	-1 -6

Kursivdruck – Substanzen NICHT im Untersuchungsprogramm

Aufgrund des Zielwertes von 0,1 µg/L für die Summe aus PFOA und PFOS im Trinkwasser [Trinkwasserkommission 2006] wurde eine Bestimmungsgrenze von 0,01 µg/L (10% des Zielwertes) für jede Einzelkomponente festgelegt. Nachfolgend sind einige Kenndaten der Methode für verschiedene Wassermatrizes dargestellt (Tabelle A.4):

Tabelle A.4: Wiederfindungen (WDF) über das Gesamtverfahren

Dotierung	VEW		TRW		TRW		TRW		OFW	
	0,1 µg/L 4 fach- Bestimmung		0,01 µg/L 4 fach- Bestimmung		0,1 µg/L 6 fach- Bestimmung		1 µg/L 4 fach- Bestimmung		0,1 µg/L 6 fach- Bestimmung	
Substanz	WDF [%]	±	WDF [%]	±	WDF [%]	±	WDF [%]	±	WDF [%]	±
PFBA	97,6	2,5	119,0	0,4	97,7	4,1	93,4	3,9	99,2	1,4
PFPeA	94,1	2,7	91,5	0,2	98,7	2,5	95,6	1,7	94,3	2,1
PFHxA	92,1	4,1	108,5	0,2	98,3	3,4	95,1	2,8	98,0	1,1
PFHpA	90,8	5,2	94,9	0,3	100,7	3,5	96,4	3,3	96,3	2,5
PFOA	90,7	3,0	119,5	0,6	104,9	3,5	96,8	1,9	97,9	2,1
PFNA	92,9	3,3	99,7	0,5	95,0	4,1	95,2	1,7	93,2	3,9
PFDA	85,3	4,9	81,8	0,2	82,6	7,0	86,7	4,0	81,9	5,8
PFBS	100,8	2,5	123,0	0,5	98,5	3,4	97,2	2,9	103,0	1,4
PFHxS	103,3	3,2	130,3	0,6	100,3	3,8	97,9	1,4	99,2	1,9
PFOS	97,0	4,0	98,7	0,2	86,9	6,4	89,5	2,3	82,2	4,6
¹³ C ₄ -PFBA	88,7	3,7	95,8	4,5	93,4	5,8	90,8	4,9	99,8	6,4
¹³ C ₂ -PFHxA	86,6	3,7	95,6	4,1	93,3	2,2	93,4	2,0	94,7	6,6
¹³ C ₄ -PFOA	91,3	2,2	97,2	5,9	95,1	4,7	89,8	1,5	97,1	5,2
¹³ C ₄ -PFOS	81,7	2,4	77,5	4,5	76,1	6,0	85,4	2,8	77,4	5,0

VEW Vollentsalztes Wasser, TRW Trinkwasser Bonn, OFW Oberflächenwasser (Swist bei Meckenheim)

Anhang B

Ergebnisse der Teilnahme an der bundesweiten Laborvergleichsuntersuchung S-01 vom April 2008 zur Bestimmung von PFT in Wässern und Schlämmen (ohne Methodenvorgabe) zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der eigenen Methode nach Anhang A

Für den länderübergreifenden Ringversuch (LÜRV) S-01 Perfluorierte Tenside (PFT) in Wasser und Schlamm [LANUV-NRW 2008] waren im April 2008 ein Rohwasser, zwei Oberflächenwässer und zwei Klärschlämme (Pressschlämme) (jeweils undotierte Realproben) zu untersuchen. Das Untersuchungsspektrum umfasste 10 Substanzen (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFBS, PFHxS, PFOS), dabei sollten Analysenverfahren zur Anwendung kommen, die folgende untere Grenzen des Arbeitsbereiches erreichen mussten:

- Wasserproben: 10 ng/L
- Schlammproben: 10 µg/kg TM

Für eine erfolgreiche Teilnahme an diesem Ringversuch mussten mindestens 80% der bewerteten Proben-Parameter-Kombinationen (27 von 33) und mindestens 80% der bewerteten Parameter (8 von 10) erfolgreich bestimmt werden, d.h. das Ergebnis musste mit einem Z_u -Score $|Z_u| \leq 2$ bewertet sein (siehe auch Kapitel 1.3.7.). Die eigenen Ergebnisse für Wasser (Tabelle B.1) und Klärschlamm (Tabelle B.2) werden im Nachfolgenden dargestellt [LANUV-NRW 2008].

Tabelle B.1: PFT-Ringversuchsergebnisse für die Wasserproben LÜRV-S01 (2008)

Substanz	Einheit	Laborwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore / Werte
WASSERPROBE 1						
PFBA	ng/L	1620,000	1727,412	50,00%	- 0,163	32
PFPeA	ng/L	2240,000	2471,383	46,27%	- 0,254	32
PFHxA	ng/L	4330,000	5089,115	39,79%	- 0,444	33
PFHpA	ng/L	914,000	1288,390	32,24%	- 1,023	34
PFOA	ng/L	1950,000	2681,965	30,29%	- 1,015	37
PFBS	ng/L	335,000	355,875	24,89%	- 0,261	33
PFHxS	ng/L	43,200	57,889	28,50%	- 0,997	33
PFOS	ng/L	201,000	207,184	35,59%	- 0,097	36
WASSERPROBE 2						
PFBA	ng/L	21,100	33,466	50,00%	- 0,966	27
PFPeA	ng/L	11,300	16,467	38,93%	- 0,949	27
PFHxA	ng/L	19,500	31,218	43,25%	- 1,058	33
PFHpA	ng/L	12,700	23,538	37,23%	- 1,440	33
PFOA	ng/L	386,000	447,900	26,75%	- 0,575	37
PFBS	ng/L	19,100	26,887	40,09%	- 0,858	32
PFHxS	ng/L	10,100	11,619	21,84%	- 0,656	23
PFOS	ng/L	511,000	427,457	36,28%	+ 0,431	37
WASSERPROBE 3						
PFBA	ng/L	84,400	96,898	50,00%	- 0,337	30
PFPeA	ng/L	46,500	71,828	48,36%	- 0,936	32
PFHxA	ng/L	113,000	170,586	31,01%	- 1,230	33
PFHpA	ng/L	22,700	45,084	36,84%	- 1,566	34
PFOA	ng/L	253,000	306,788	30,89%	- 0,641	37
PFBS	ng/L	103,000	125,47	24,93%	- 0,795	33
PFHxS	ng/L	28,100	34,486	29,26%	- 0,710	33
PFOS	ng/L	36,300	31,481	40,09%	- 0,300	36

Tabelle B.2: PFT-Ringversuchsergebnisse für die Klärschlammproben LÜRV-S01 (2008)

Substanz	Einheit	Laborwert	Sollwert	Rel. Soll-Stdabw.	Z-Score	Labore / Werte
KLÄRSCHLAMMPROBE 1						
PFHxA	µg/kg TM	14,300	17,513	39,18%	- 0,552	26
PFOA	µg/kg TM	203,000	214,522	29,84%	- 0,202	32
PFNA	µg/kg TM	50,800	51,807	45,75%	- 0,053	30
PFDA	µg/kg TM	489,000	478,774	45,42%	+ 0,036	30
PFOS	µg/kg TM	384,000	330,732	43,67%	+ 0,285	32
KLÄRSCHLAMMPROBE 2						
PFOA	µg/kg TM	62,600	66,909	48,97%	- 0,170	32
PFNA	µg/kg TM	17,100	16,473	49,41%	+ 0,059	27
PFDA	µg/kg TM	156,000	156,395	50,00%	- 0,007	30
PFOS	µg/kg TM	1570,000	1269,351	43,28%	+ 0,424	32

Für die Untersuchung der Klärschlämme wurde die bestehende Wassermethode um folgende Schritte im Vorfeld erweitert: Der homogenisierte Klärschlamm wurde bei 110°C über Nacht getrocknet. 1,0 Gramm des Trocknungsrückstandes wurde in einem 50 mL-Polypropylen-Zentrifugröhrchen mit 20 mL Methanol aufgeschlämmt, mit internem Standard versetzt und 60 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. 2 mL des zentrifugierten Extraktes (andere Mengen je nach Substanzgehalt) wurden mit Wasser auf 50 mL aufgefüllt und anschließend wie eine Wasserprobe weiterbearbeitet.

Die Ergebnisse des Ringversuches können als Validierung der Extraktions- und Messmethode für perfluorierte Tenside in den Matrices Wasser und Klärschlamm angesehen werden, die in Anhang A beschriebene Methode stellt damit ein leistungsfähiges Instrument zur Bestimmung perfluorierter Tenside in den oben genannten Matrices dar.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit gemäß §8 (3) b) und c) der Promotionsordnung, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Dirk Skutlarek

Ich danke...

Herrn Dr. Harald Färber für das entgegengebrachte Vertrauen, das sehr persönliche und freundschaftliche Klima, die weitreichende Unabhängigkeit, unvergessliche Probenahmetouren und – nicht zu vergessen – für das „Projekt Motorrad“.

Herrn Prof. Dr. Heinz Friedrich Schöler für seine Bereitschaft zur Betreuung und Auseinandersetzung mit dieser Arbeit, die seine anregende Hilfe und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Martin Exner für die Bereitstellung der nötigen Ressourcen, die entgegengebrachte Geduld und die umfassenden Freiheiten.

Frau Dr. Gryta Kuroпка für die eine entscheidende Nachfrage und Anregung.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen in der Wasserabteilung des Institutes für Hygiene und Öffentliche Gesundheit für das unkomplizierte und fröhliche Arbeitsklima in den zurückliegenden Jahren.

Frau Maria Leppin für das prompte Erfüllen aller Literaturwünsche.

Danke

Dirk Skutlarek

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 13. Oktober 1970
Geburtsort: Osnabrück
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAU SBILDUNG

09 / 1977 - 07 / 1981 Grunds chule Belm
08 / 1981 - 06 / 1983 Orientierungsstufe DOM in Osnabrück,
Schule in freier Trägerschaft des Bistums Osnabrück
08 / 1983 - 05 / 1990 Ursulaschule in Osnabrück,
staatl. Anerkanntes Gymnasium des Bistums Osnabrück
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

ZIVILD IENST

07 / 1990 - 09 / 1991 Zivildienst im Kinderhospital in Osnabrück

HOCHSCHULAU SBILDUNG

10 / 1991 - 03 / 1994 Bergische Universität – Gesamthochschule Wuppertal,
Grundstudium Lebensmittelchemie (staatliche Zwischenprüfung)
04 / 1994 - 11 / 1996 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn,
Hauptstudium Lebensmittelchemie (1. Staatsexamen)
05 / 1997 - 06 / 1998 Chemisches Landes- und Staatl. Veterinäruntersuchungsamt
Münster, Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker
(2. Staatsexamen)
seit 10 / 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn, Abt.
Wasserhygiene - Chemie
2008 Promotion an der Universität Heidelberg
Titel: Analysenmethoden für Antibiotika und perfluorierte Tenside
in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung
– Methodenentwicklung, Methodvalidierung, Datenerhebung

TÄTIGKEITEN NEBEN DER HOCHSCHULAU SBILDUNG

12 / 1996 - 04 / 1997 TÜV Rheinland Sicherheit und Umweltschutz, Köln,
Erlernen von Probenvorbereitungsmethoden (Flüssigextraktion,
Festphasenextraktion, Derivatisierung) und chromatographischen
Methoden (DC, GC, GC-MS, HPLC), Untersuchung von Textilien, Leder,
Holz, Wasser, Boden (PAK, PCP, Organochlorpestizide, Holzschutzmittel,
PCB, Arylamine aus Azofarbstoffen, Dispersionsfarbstoffe, Reaktionsfarbstoffe,
Formaldehyd, Chrom VI), Bestimmung der Globalmigration bei
Lebensmittelimitaten, Bestimmung der Schweiß-, Speichel-,
Reibe- und Waschbarkeit von Textilien
07 / 1998 - 10 / 1998 TÜV Rheinland Sicherheit und Umweltschutz, Köln,
analog zum Zeitraum 12 / 1996 – 04 / 1997