



# Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Sulfonamiden und Tetracyclinen in landwirtschaftlich genutzten Bodenflächen

Petri, M. S., Hamscher, G.

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

## Einleitung

Antibiotika, wie Sulfonamide und Tetracycline, werden in großen Mengen in der intensiven Tierhaltung zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Über Jahrzehnte hinweg gelangten Antibiotika durch Aufbringen von Gülle in landwirtschaftlich genutzten Bodenflächen und können dort auch persistieren. Über das Sorptionsverhalten der Wirkstoffe und insbesondere über die Bildung von Abbau- und Transformationsprodukten ist jedoch relativ wenig bekannt.

## Ziel

Die hochselektive und immer sensibler werdende LC-MS/MS-Analytik kann sich vor allem bei der hochkomplexen Matrix Boden zu Nutze gemacht werden. Für die Quantifizierung der einzelnen Substanzen sowie zur Identifizierung möglicher Abbau- und Transformationsprodukte muss zunächst eine leistungsstarke Methode etabliert werden. Wirkstoffe mit nach wie vor hoher veterinärmedizinischer Bedeutung sind Abbildung 1 zu entnehmen.

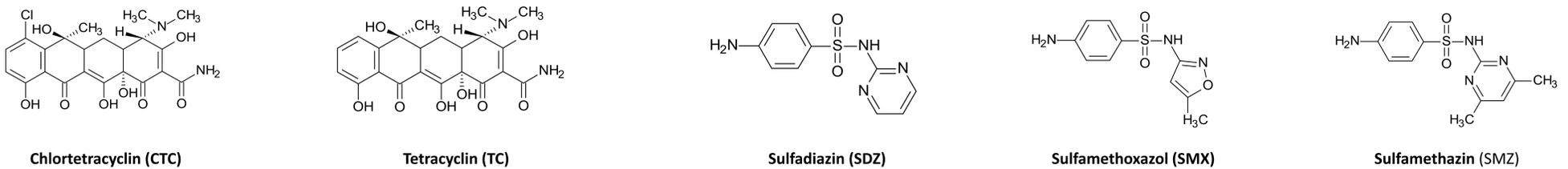


Abb. 1: Ausgewählte Wirkstoffe mit hoher veterinärmedizinischer Bedeutung

### Probenvorbereitung



- Einwaage: 1 g (analytfreier) auf 1 mm gesiebter sandiger Boden
- Dotierung: 100 µg/kg Analyten und interne Standards (<sup>13</sup>C<sub>6</sub> SDZ, <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SMZ, <sup>13</sup>C<sub>6</sub> SMX)
- Inkubation: 10 Minuten

### Extraktion



Mischen → 24 Stunden → Überstand x 2

- wässrige Phase: 1 M Citratpuffer mit 0,05 M EDTA (pH 4,7)
- organische Phase: Methanol/Acetonitril/Dichlormethan (1:3:1)

### Konzentrierung

Programm ASPEC [1]:

<b>Konditionierung</b>	3 mL Methanol + 0,1% Ameisensäure 3 mL Methanol 3 mL Citratpuffer
<b>Probenaufgabe</b>	50 mL Probe
<b>Elution</b>	2 x 1 mL Methanol + 0,1% Ameisensäure 2 x 1 mL Methanol

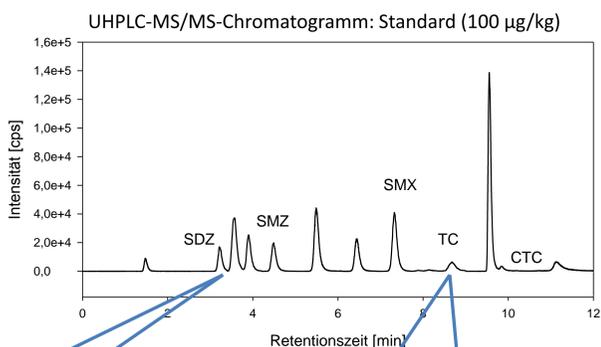


- automatische Festphasenextraktion mittels ASPEC™-System
- SPE-Kartusche: Chromabond® HR-X, 200 mg, 3 mL

### Quantifizierung



- Quantifizierung mittels UHPLC-MS/MS
- Identifizierung über 2 spezifische Massenübergänge für Sulfonamide und Tetracycline



Eluent A:  
1mM Ammoniumacetat + 0,5% Ameisensäure  
Eluent B:  
Methanol + 0,1% Ameisensäure  
Säule: Phenomenex® Kinetex PFP

Abbildung 3: spezifische MS/MS-Übergänge von Sulfonamiden, 108 m/z (l), 156 m/z (r)

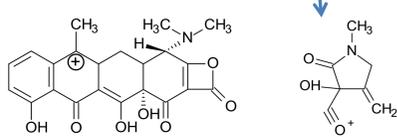


Abbildung 4: spezifische MS/MS Übergänge von Tetracyclin, 410 m/z (l), 154 m/z (r, Vorschlag nach [2])

### Matrix-Problematik

- starke Sorptionsprozesse der Sulfonamide an die Bodenmatrix
- messbare Matrixeffekte

Tabelle 1: Wiederfindungsraten (WDF) von SMZ und TC nach Aufarbeitung einer Leermatrix mit anschließender Dotierung der aufgearbeiteten Probe

WDF [%]	SMZ	TC
dotierte Leermatrix	73-75	108-110

Tabelle 2: Wiederfindungsrate von SMZ und TC nach 10 Minuten bzw. 10 Tagen Inkubation

WDF [%]	SMZ	TC
10 Minuten	39-40	63-67
10 Tage	14-18	46-49

→ Temperaturerhöhung bei der Extraktion nicht möglich, da die Tetracycline nur bis ca. 40 °C stabil sind

### Ausblick:

- Methodvalidierung
- Langzeituntersuchung Dauerbeobachtungsflächen
- Identifikation von Abbau- und Transformationsprodukten (exakte Massenbestimmung mittels QTOF und Strukturaufklärung mittels NMR)

### Literatur:

- [1] Bailey, C., Spielmeyer, A., Hamscher, G., Schüttrumpf, H., Frings, RM. 2016. The veterinary antibiotic journey: comparing the behavior of sulfadiazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole and tetracycline in cow excrement and two soils. 16, 1690-1704.  
[2] Vartanian, VH., Goolsby, B., Brodbelt, S. 1998. Identification of tetracycline antibiotics by electrospray ionization in a quadrupole ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 9, 1089-1098.