

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Verringerung des Eintrags von Tierarzneimittelrückständen  
in die Umwelt mit besser abbaubaren Sulfonamiden**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer Doktorin  
der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
( Dr. med. vet. )

vorgelegt von  
**Katrin Zessel**  
Osnabrück

Hannover 2012

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Manfred Kietzmann,  
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Manfred Kietzmann

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Pablo Steinberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2012

Die Arbeit wurde durch die **Deutsche Bundesstiftung Umwelt** gefördert.

**Für meine Eltern  
und  
Steffen  
in Liebe und Dankbarkeit**



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Wege des Tierarzneimittleintrags in die Umwelt.....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Wirtschaftsdünger .....	14
2.1.2	Boden .....	15
2.1.3	Wasser.....	16
2.1.4	Staub und Bioaerosol.....	17
2.1.5	Nutzpflanzen .....	19
<b>2.2</b>	<b>Sulfonamide .....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Allgemeines .....	20
2.2.2	Wirkungsmechanismus.....	22
2.2.3	Pharmakokinetik von Sulfadiazin im Schwein .....	24
2.2.3.1	Absorption .....	24
2.2.3.2	Plasmaproteinbindung.....	25
2.2.3.3	Verteilung .....	25
2.2.3.4	Metabolismus .....	26
2.2.3.5	Elimination .....	27
<b>2.3</b>	<b>Verringerung des Tierarzneimittleintrags in die Umwelt: Lösungsansätze.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>30</b>
3.1.1	Sulfonamide/Testsubstanzen.....	30
3.1.2	<i>In-vitro</i> -Experimente.....	31
3.1.2.1	Geräte und Materialien .....	31
3.1.2.2	Reagenzien .....	31
3.1.3	<i>In-vivo</i> -Experimente .....	32
3.1.3.1	Geräte und Materialien .....	32
3.1.3.2	Reagenzien .....	32
3.1.4	Analytik .....	33
3.1.5	Puffermedien.....	33
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Versuchsübersicht .....	34
3.2.2	<i>In-vitro</i> -Experimente.....	35

## Inhaltsverzeichnis

3.2.2.1	Photooxidationsversuch.....	35
3.2.2.1.1	UVA/UVB-Bestrahlung.....	35
3.2.2.1.2	UVA-Bestrahlung.....	36
3.2.2.1.3	Feldversuch.....	37
3.2.2.2	Zellkultur.....	37
3.2.2.2.1	MTS-Vitalitätsassay.....	37
3.2.2.2.2	Kristallviolett-Proliferationsassay.....	38
3.2.2.3	Antimikrobielle Aktivität.....	40
3.2.3	<i>In-vivo</i> -Experimente.....	42
3.2.3.1	Versuchstiere.....	42
3.2.3.2	Versuchsdurchführung.....	42
3.2.3.2.1	Probenaufbereitung.....	48
3.2.4	Analytik.....	50
3.2.4.1	Validierung der HPLC für die untersuchten Testsubstanzen.....	51
3.2.5	Statistische Auswertung:.....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b><i>In-vitro</i>-Experimente.....</b>	<b>56</b>
4.1.1	Photooxidationsversuche.....	56
4.1.1.1	UVA/UVB-Bestrahlung.....	56
4.1.1.2	Feldversuch.....	58
4.1.1.3	UVA-Bestrahlung.....	59
4.1.2	MTS-Vitalitätsassay.....	61
4.1.3	Kristallviolett-Proliferationstest.....	65
4.1.4	Antibakterielle Aktivität (Brillantschwarz-Reduktionstest).....	69
<b>4.2</b>	<b><i>In-vivo</i>-Experimente.....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Mehlfütterung.....	73
4.2.1.1	Plasma.....	73
4.2.1.2	Urin.....	74
4.2.1.3	Sedimentationsstaub.....	76
4.2.1.4	Filterstaub.....	79
4.2.2	Pelletfütterung.....	80
4.2.2.1	Plasma.....	80
4.2.2.2	Urin.....	81
4.2.2.3	Sedimentationsstaub.....	82
4.2.2.4	Filterstaub.....	84
4.2.3	Vergleich Mehlfütterung vs. Pelletfütterung.....	85
4.2.3.1	Plasma.....	85
4.2.3.2	Urin.....	85

# Inhaltsverzeichnis

4.2.3.3	Sedimentationsstaub .....	86
4.2.3.4	Filterstaub .....	87
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
5.1	<i>In-vitro</i> -Experimente .....	90
5.2	<i>In-vivo</i> -Experimente .....	101
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	104
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AUC	Area under the curve
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
CAP	Chloramphenicol
CTC	Chlortetracyclin
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
EN	Europäische Norm
et al.	et alii
HQS	High quality control standard
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis 50%
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LQS	Low quality control standard
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MeOH	Methanol
MTS	(3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium Salz)
OTC	Oxytetracyclin
PABA	Paraaminobenzoensäure
PBS	phosphate buffered saline
pKa	Dissoziationskonstante
PMS	Phenazin Methosulfat
p. o.	per os
PP	Polypropylen
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute



## Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
syn.	synonym
SA	Sulfanilamid
SCY	Sulfachloropyridazin
SDM	Sulfadimethoxin
SDZ	Sulfadiazin
SMPD	Sulfamethoxypyridazin
SMR	Sulfamerazin
SMX	Sulfamethoxazol
SMZ	Sulfamethazin
STZ	Sulfathiazol
TC	Tetracyclin
TSGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
TYL	Tylosin
UV	ultraviolett
UV-VIS	Ultraviolet and visible spectroscopy
V	Volumen
VO	Verordnung
vs.	versus
ZNS	Zentralnervensystem



### 1 Einleitung

In der konventionellen Landwirtschaft werden - bedingt durch die intensive Nutztierhaltung - Veterinärarzneimittel in beträchtlichen Mengen eingesetzt. Antibiotika gehören dabei zu den verordnungsstärksten Gruppen. Die verabreichten Substanzen werden von den therapierten Tieren in unveränderter Form oder als zum Teil noch aktive Metaboliten ausgeschieden und gelangen mit der Ausbringung des Wirtschaftsdüngers auf die landwirtschaftlichen Nutzflächen. Von dort erfolgt ein Eintrag in den Erdboden und die Oberflächengewässer, wie zahlreiche Studien belegen. In einigen Fällen gelangen einzelne Wirkstoffe bis in das Grundwasser. Auch eine Verlagerung antibiotisch wirksamer Substanzen in Nutzpflanzen wurde beobachtet.

Für Veterinärpharmaka stellt der Wirtschaftsdünger somit den Haupteintragspfad in die Umwelt dar, da kontaminierte Gülle zur Belastung terrestrischer und aquatischer Systeme führen kann. In den letzten Jahren ist das Interesse an der Umweltrelevanz der eingesetzten Antibiotika stark gestiegen auch im Hinblick auf die weltweit zunehmende Resistenzentwicklung. Daraus resultierend werden in vermehrtem Umfang Untersuchungen zur Verteilung sowie zum Verhalten und möglicher Effekte von Veterinärpharmaka in der Umwelt durchgeführt. Es wurden erste Lösungsansätze zur Verringerung des Arzneimitteleintrags in die Umwelt entwickelt, zu denen die Photodegradation zählt. Sulfonamide lassen sich unter entsprechenden Voraussetzungen durch Photooxidation mittels UV-Irradiation annähernd vollständig abbauen (MOUAMFON et al. 2010; LAI et al. 2011). Unter Ausnutzung dieser Eigenschaft könnte eine Photooxidation der Güllefracht vor Verbringung auf die landwirtschaftlichen Flächen zu einer Verringerung des Tierarzneimitteleintrages in die Umwelt führen. Hinsichtlich der Biokompatibilität der Photooxidationsprodukte ist jedoch kaum etwas bekannt. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die Umweltverträglichkeit der UV-Licht-induzierten Abbauprodukte zu eruieren. Neben der Untersuchung ausgewählter Sulfonamide hinsichtlich ihrer Photooxidierbarkeit sowie der Effekte der Photooxidationsprodukte auf die Zellvitalität und das

## Einleitung

Proliferationsverhalten wurde im Rahmen dieser Arbeit die antibakterielle Aktivität der Photooxidationsprodukte ermittelt.

Einen weiteren Eintragsweg für Tierarzneimittel in die Umwelt stellen kontaminierte Stallstäube dar, die im Rahmen der landwirtschaftlichen Produktion in hohen Mengen anfallen und über die Ablufteinrichtungen in die Außenwelt gelangen können. In der intensiven Nutztierhaltung werden die Chemotherapeutika in der Regel über das Futter oder Wasser an die zu therapierenden Tiere verabreicht. Die Veterinärarzneimittel gelangen zum einen während der Fütterung direkt in die Stallumgebung oder werden nachfolgend durch das Eintrocknen kontaminierter Exkreme in die Stallaerosole freigesetzt. Die Inhalationsexposition durch kontaminierte Aerosole birgt ein unmittelbares Gesundheitsrisiko für den Landwirt. Werden die Stallaerosole über die Abluftvorrichtung in die Umwelt freigesetzt, stellen sie zusätzlich eine Emissionsbelastung dar. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Validierung des Sulfadiazineintrages in die Stallumgebung in Abhängigkeit vom Staubpotential des Futtermittels, in dem das Arzneimittel verabreicht wurde. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit eruiert, ob die Sulfadiazinapplikation über das Futter zu einer Arzneimittelverschleppung im Stall führt. Diese wiederum könnte aufgrund der subtherapeutischen Konzentrationen zur Resistenzentwicklung sowie zum Auftreten von Rückständen in eigentlich unbehandelten Tieren beitragen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Wege des Tierarzneimiteleintrags in die Umwelt

Arzneimittel werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin in beträchtlichen Mengen eingesetzt. Antibiotika zählen zu den verordnungstärksten Gruppen, wobei die Sulfonamide neben den Tetracyclinen und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu den häufig verwendeten Veterinärantibiotika gehören (KRATZ et al. 2000; BROLL et al. 2002; KREIENBROCK 2011).

Auch im Hinblick auf die weltweit zunehmende bakterielle Resistenzentwicklung stieg in den letzten Jahren die Besorgnis über die Auswirkungen des Arzneimiteleintrages in die Umwelt. Wegen der zunehmenden Resistenzbildungen wurde daher 2006 gemäß VO 1831/2003/EEC die Anwendung von Antibiotika zum Zwecke der Leistungsförderung EU-weit verboten.

Wie Abbildung 1 zeigt, gelangen Veterinärarzneimittel über verschiedene Eintragspfade in die Umwelt (BOXALL et al. 2004), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

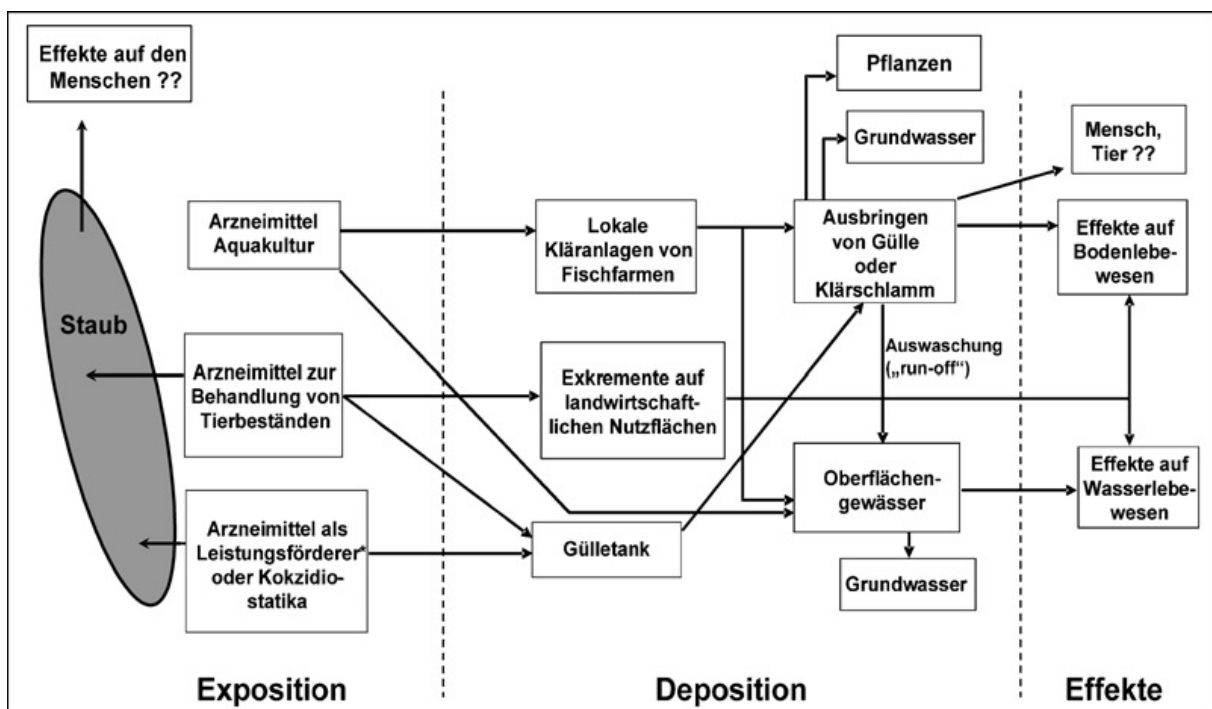


Abbildung 1: Eintragspfade für Veterinärarzneimittel in die Umwelt (HAMSCHE 2008).

### 2.1.1 Wirtschaftsdünger

Den Haupteintragsweg für Tierarzneimittel in die Umwelt stellt der Wirtschaftsdünger dar. In der Nutztierhaltung eingesetzte Antibiotika werden überwiegend über das Futter oder Trinkwasser an den zu therapierenden Viehbestand verabreicht. Über die Exkremente gelangen die noch aktiven Ausgangssubstanzen und ihre im Organismus metabolisierten Produkte in die Gülle und werden zu einem späteren Zeitpunkt auf die landwirtschaftlich genutzten Flächen ausgebracht. Dies führt zur Belastung terrestrischer und aquatischer Systeme (HAMSCHER et al. 2002; HAMSCHER et al. 2005a).

Diverse Untersuchungen belegen, dass Antibiotika, darunter auch Sulfadiazin, in der Gülle vorab behandelter Tiere nachweisbar sind. Von WINCKLER et al. (2004) wurden bei Untersuchungen von Gülleproben in 48,9% der Fälle Sulfadiazin in einer mittleren Konzentration von 4,9 mg/kg gemessen, während Sulfamethazin in 48,3% der Proben in einer mittleren Konzentration von 7 mg/kg detektiert wurde. In einer weiteren Studie wurden in zwei von vier Gülleproben Sulfadiazin, Acetyl-Sulfadiazin und Sulfamethazin nachgewiesen (PFEIFER et al. 2002).

Eine Untersuchung von HALLER et al. (2002) ergab bei fünf von sechs Schweinegülleproben einen Gehalt von Sulfamethazin und Acetyl-Sulfamethazin von bis zu 11,3 mg/kg und in vier Proben einen Sulfathiazolgehalt von maximal 12,4 mg/kg.

Auch gibt es Untersuchungen zum Tetracyclineintrag in die Umwelt über Schweinegülle. Tetracycline, die den größten Anteil des Antibiotikaverbrauches ausmachen (SCHNEIDEREIT 2006), wurden in 87 von 176 (49,4%) untersuchten Schweinegülleproben nachgewiesen. Die mittlere Konzentration betrug etwa 10 mg/kg (WINCKLER et al. 2004). Eine vorherige Untersuchung von 181 Schweinegülleproben ergab bei 24% der Proben einen Tetracyclinnachweis mit Konzentrationen zwischen 0,6 und 66 mg/kg (WINCKLER u. GRAFE 2001).

GROTE et al. (2007) behandelten Ferkel mit Chlortetracyclin und Sulfadiazin. Über die Ausscheidungen gelangten die Chemotherapeutika in die Gülle, die acht Monate gelagert wurde, ehe sie auf die Äcker gelangte. Die Substanzen wurden in dieser

Zeitspanne nur etwa zur Hälfte abgebaut, so dass noch ein beträchtlicher Anteil der antimikrobiell aktiven Arzneimittel in der ausgebrachten Gülle vorhanden war.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stoffwechselmetaboliten während der Güllelagerung über verschiedene Reaktionen weiter reagierten. Der antimikrobiell nicht mehr wirksame Hauptmetabolit N4-Acetyl-Sulfadiazin wurde durch Deacetylierung in Sulfadiazin retransformiert, das durch diesen Prozess auch seine antibakterielle Aktivität wiedererlangte (BERGER et al. 1986; KREUZIG u. HÖLTGE 2005; LAMSHÖFT et al. 2010).

### **2.1.2 Boden**

Nachdem die Sulfonamide mit der Güllefracht auf die Wirtschaftsflächen ausgebracht worden sind, besteht die Gefahr, dass die Chemotherapeutika sich im Boden anreichern. In Deutschland ist ein schnelles Unterpflügen der Gülle vorgeschrieben, um ein Abfließen in die Oberflächengewässer zu minimieren (FRIMMEL u. MÜLLER 2006). Dadurch gelangen die Arzneimittel bis zu 30 cm tief in die obere Bodenschicht. Das weitere Vordringen in die unterschiedlichen Bodenschichten ist abhängig von der Bodenart. In Lössböden ist aufgrund ihrer hohen nutzbaren Feldkapazität und damit verbundenen geringen Auswaschungsgefährdung das Eindringen von Arzneistoffen in tiefere Bodenschichten erschwert. Sand- und Tonböden stellen hingegen „worst-case“-Standortbedingungen dar. Sandboden ist stark auswaschungsgefährdet, bei Tonboden besteht die Gefahr der Schrumpfrissbildung und erhöht damit ein Vordringen in tiefere Bodenschichten bis hin zum Grundwasser (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Heinrich Höper, Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie, Hannover).

Im Rahmen einer dreijährigen Feldstudie von HAMSCHEER et al. (2005a) wurden sandige Ackerflächen in regelmäßigen Abständen mit Gülle beaufschlagt, die insgesamt 110 g Tetracycline, 2,4 g Chlortetracyclin, 9,3 g Sulfamethazin und 19,1 g Sulfadiazin pro Hektar und pro Jahr enthielt. Die Resultate zeigten, dass sich über den genannten Zeitraum hohe Tetracyclinkonzentrationen mit mehr als 150 µg/kg Erde im Boden befanden.

Der Gehalt an Chlortetracyclin lag zwischen 2 und 22 µg/kg. Sulfamethazin war in der Erde nur im unteren µg/kg-Bereich und Sulfadiazin überhaupt nicht nachweisbar, obwohl der Gehalt der Sulfonamide im Wirtschaftsdünger höher war als der des Chlortetracyclins. HÖPER et al. (2002) zeigten zudem, dass Tetracycline im Boden persistieren. Keines der untersuchten Antibiotika konnte in Erdschichten tiefer als 40 cm nachgewiesen werden (HÖPER et al. 2002; HAMSCHER et al. 2005a). Jedoch belegen weitere Studien von KREUZIG u. HÖLTGE (2005), FÖRSTER et al. (2009) und ZARFL et al. (2009), dass Sulfadiazin in sequestrierter Form und damit schwer nachweisbar im Erdboden persistiert, es jedoch unter bestimmten Milieuänderungen reaktiviert und in geringen Konzentrationen wieder freigesetzt werden kann. Infolge dessen ist es in der Erde wieder verfügbar und kann das Ökosystem beeinflussen.

In einer Studie von BAGUER et al. (2000) bezüglich der Auswirkungen von Chemotherapeutika auf Bodenbewohner wie Regenwürmer und Springschwänze erwiesen sich diese als relativ tolerant gegenüber Arzneimitteln (Tylosin, Oxytetracyclin).

### **2.1.3 Wasser**

Nach Ausbringung antibiotikabelasteter Gülle auf Wirtschaftsflächen besteht das Risiko der Arzneimittelverlagerung in die aquatische Umwelt.

Dem Eindringen der Arzneimittel in tiefere Bodenschichten kommt eine besondere Bedeutung zu, da über diesen Weg die potentielle Möglichkeit des Eintrages in das Grundwasser besteht. HAMSCHER et al. (2005a) konnten während einer Feldstudie nachweisen, dass Tetracycline, obwohl sie in der Bodenkrume in hohen Konzentrationen vorliegen, nicht bis in tiefere Bodenschichten vordringen und daher nicht im Grundwasser vorhanden sind. Eine Ausnahme bildete ein hochbelasteter Boden, in dem Tetracycline erst nach vier Jahren das Grundwasser erreichten (HAMSCHER et al. 2005b). Sulfamethazin, das im Oberboden nur in geringen Konzentrationen vorlag (< 2 µg/kg), konnte dagegen im Grundwasser mit Werten über 0,1 µg/l nachgewiesen werden (HAMSCHER et al. 2005a). Untersuchungen von



HIRSCH et al. (1999) zeigten kongruente Ergebnisse. In keiner von 69 Grundwasserproben befanden sich Tetracycline; in zwei Proben befand sich Sulfamethazin in einer Konzentration bis zu 0,16 µg/l. Sulfadiazin wurde weder in der Erde noch im Grundwasser ermittelt (HAMSCHEER et al. 2002; HAMSCHEER et al. 2005a). Die Untersuchung von 39 Grundwasserproben ergab in einer Studie von GARCIA-GALAN et al. (2011) jedoch in 3 Proben einen positiven Nachweis für Sulfadiazin mit maximal 2,2 ng/l sowie für seinen Metaboliten Acetyl-Sulfadiazin mit 1 ng/l.

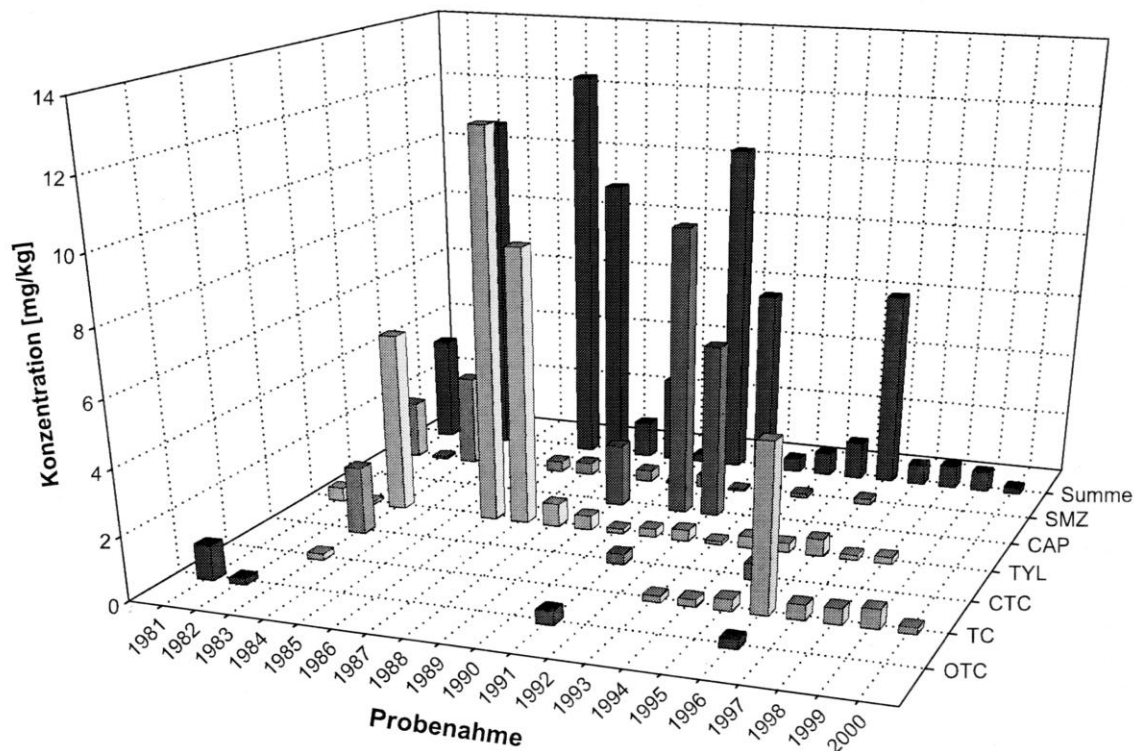
Einen weiteren Eintragungsweg in die aquatische Umwelt stellt der Oberflächen-Abfluss dar. Besonders Starkregen begünstigt den Abfluss der Arzneimittel von der Bodenoberfläche in Oberflächengewässer (KAY et al. 2005; KREUZIG et al. 2005). LINDSEY et al. (2001) erachten den Eintrag über den Veterinärarzneimittelabfluss in die Oberflächengewässer als wahrscheinlicher als das Versickern in die tieferen Bodenschichten und das Erreichen des Grundwassers. LINDSEY et al. (2001) zeigten in ihren Untersuchungen von 1999 bis 2001 in den USA, dass Tierarzneimittel häufiger in Oberflächengewässern als im Grundwasser zu finden sind. In neun von 144 Grund- und Oberflächenwasserproben waren Tetracycline und Sulfonamide in Konzentrationen von 0,07–15 µg/l zu verzeichnen. Tetracycline konnten auch hier nicht im Grundwasser, sondern nur im Oberflächenwasser nachgewiesen werden. Sulfamethoxazol hingegen, das häufig in der Humanmedizin eingesetzt wird, wurde in einer Probe im Grundwasser nachgewiesen (0,22 µg/l).

### **2.1.4 Staub und Bioaerosol**

Bei der Staubentstehung in den Schweineställen nimmt das Futter eine wesentliche Rolle ein, gefolgt von der Einstreu sowie den Ausscheidungen der Tiere und den Tieren selbst, wie z. B. durch Abschilferung von Hautschuppen (PEDERSEN et al. 2000; SEEDORF u. HARTUNG 2002). Werden Antibiotika eingesetzt, finden sich diese in der Gülle und in der Luft wieder. HAMSCHEER et al. (2003) konnten in einer retrospektiven Studie Antibiotika in Stallstäuben nachweisen (siehe Abbildung 2).

## Literaturübersicht

Von 1981 bis 2000 wurden in den Ställen intensiver Schweinemast in regelmäßigen Abständen Sedimentationsstaubproben genommen. Die Auswertungen ergaben in 65% der Fälle den Nachweis von Sulfamethazin mit Konzentrationen bis zu 2,9 mg/kg Staub. Verschiedene Tetracycline konnten in 60% der Proben mit 0,2–5,2 mg/kg detektiert werden. Chloramphenicol wurde in 15% der Fälle mit Konzentrationen von 2–9 mg/kg nachgewiesen, jedoch nicht mehr seit dem Verbot dieser Substanz 1994. Tylosin wurde 1998 als Leistungsförderer verboten und war seit diesem Zeitpunkt in den nachfolgend gezogenen Proben nicht mehr nachweisbar, obwohl es weiterhin als Arzneimittel verwendet wurde. Vor dem Verbot konnte es jedoch in 80% der Fälle detektiert werden.



**Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf und Verhältnis der Antibiotika-Konzentrationen in Stäuben eines Schweinemastbetriebes von 1981 bis 2000 (HAMSCHER et al. 2003) zitiert nach PAWELZICK (2005).**

**CAP: Chloramphenicol; CTC: Chlortetracyclin; OTC: Oxytetracyclin; SMZ: Sulfamethazin; TC: Tetracyclin; TYL: Tylosin.**

Tylosin und Sulfamethazin können in Einzelfällen Allergien hervorrufen und durch Inhalation der Aerosole zur gesundheitlichen Beeinträchtigung des Landwirts beitragen (HAMSCHER et al. 2003).

In Deutschland sind in Schweineställen inhalierbare Staubkonzentrationen von durchschnittlich  $1,95 \text{ mg/m}^3$  sowie alveolengängige Staubkonzentrationen von  $0,18 \text{ mg/m}^3$  im Durchschnitt messbar (TAKAI et al. 1998). Als alveolengängiger Staub gilt gemäß DIN EN 481 der Massenanteil der eingeatmeten Partikel, der bis in nicht cilierte Luftwege vordringt. So sind z. B. Aerosolanteile von  $4 \mu\text{m}$  Größe gemäß definierter mathematischer Abscheidefunktion zu 50% alveolengängig.

Nationale Vorschriften legen in einigen europäischen Ländern Werte zur maximalen Gesamtstaubmenge und alveolengängigem Staub in Ställen von etwa  $10 \text{ mg/m}^3$  bzw.  $5 \text{ mg/m}^3$  fest (PEDERSEN 1998; SALEH 2006). Die in Deutschland von der DFG (2011) festgesetzten MAK-Staubgrenzwerte mit  $4 \text{ mg/m}^3$  für die einatembare Fraktion sowie mit  $0,3 \text{ mg/m}^3$  für alveolengängige Aerosole besitzen lediglich Richtwertcharakter. Arbeitsschutzrechtliche Verbindlichkeit besitzen die MAK-Werte der TRGS 900 mit einem Staubgrenzwert von  $10 \text{ mg/m}^3$  für die einatembare Fraktion und  $3 \text{ mg/m}^3$  für die alveolengängige Fraktion (SEEDORF u. HARTUNG 2002; HAHN u. MÖHLMANN 2011). Die Werte beziehen sich jedoch nicht speziell auf den Stallbereich und gehen von einer achtstündigen Exposition des Menschen aus. In der deutschen Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung werden keine Grenzwerte für die Gesamtstaubmenge oder alveolengängigen Staub genannt. Die Staubinhalation stellt dabei sowohl für den Menschen als auch für das Tier eine Gesundheitsbelastung dar (PLATZ et al. 1995; NOWAK 1998).

Die Aerosole können über die Lüftung in die Außenwelt gelangen; eine hohe Staubentwicklung führt zu einer vermehrten Emission der Partikel (SEEDORF u. HARTUNG 1995; HARTUNG et al. 1998; PEDERSEN et al. 2000) Die Emissionsrate der einatembaren Stäube liegt bei  $651 \text{ mg/h}$  (500 kg KG Tier) und die der alveolengängigen Stäube bei  $53 \text{ mg/h}$  (500 kg KG Tier) (TAKAI et al. 1998).

### 2.1.5 Nutzpflanzen

Nutzpflanzen sind in der Lage, nach Düngung mit antibiotikabelasteter Gülle die Arzneimittel aufzunehmen. KUMAR et al. (2005) konnten zeigen, dass der aufgenommene Tetracyclinanteil in den Pflanzen mit der Tetrazyclinmenge in der Gülle korrelierte. GROTE et al. (2007) führten eine kontrollierte Behandlung von

Ferkeln mit Chlortetracyclin und Sulfadiazin durch. Praxisnah bewirtschaftete Versuchspartzen wurden mit der antibiotikabelasteten Gülle beaufschlagt und anschließend Weizen angebaut. Beide Arzneimittel gelangten bis in die Stängel und Blätter der Pflanze, Chlortetracyclin nach entsprechender Düngung sogar bis ins Korn. Eine Untersuchung von DOLLIVER et al. (2007) zeigte, dass auch Sulfamethazin von Getreide, Kartoffeln und Salat aufgenommen wird. Der Gehalt in den Pflanzen ist auch hier abhängig vom Sulfamethazingehalt in der Gülle.

Der Eintragungsweg von Tierarzneimitteln in die Umwelt über die Pflanzen stellt daher in Anbetracht der oralen Aufnahme von entsprechenden Nahrungsmitteln ein potentiellcs Gesundheitsrisiko für den Menschen dar.

## 2.2 Sulfonamide

### 2.2.1 Allgemeines

Sulfonamide sind Derivate des Prontosil. Sie bestehen aus einem Benzolkern mit einer Amino- und einer Sulfonamidgruppe (RIVIERE u. PAPICH 2009; KROKER 2010) (siehe Abbildung 3).

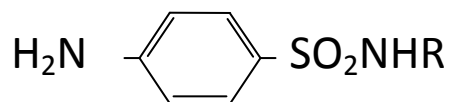


Abbildung 3: Grundstruktur der Sulfonamide.

Für die antimikrobielle Aktivität ist die para-Stellung der beiden Substituenten von Bedeutung. Durch unterschiedliche Substitution am Stickstoff der Sulfonamidgruppe entstehen verschiedene Derivate, die sich in Löslichkeit, Proteinbindung, Gewebeverteilung, Metabolisierungs- und Eliminationsrate unterscheiden (STRAUSS et al. 1941; NOUWS et al. 1985; NOUWS et al. 1989) (siehe Abbildung 4).

Literaturübersicht

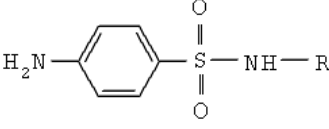
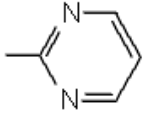
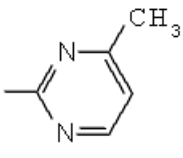
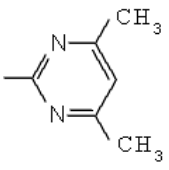
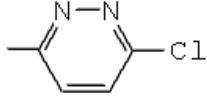
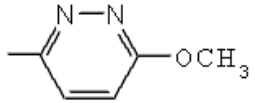
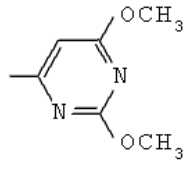
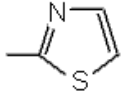
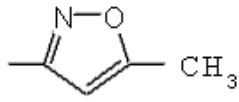
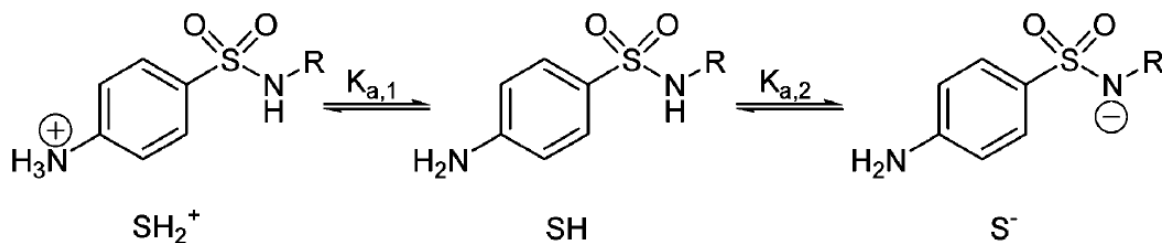
Name	Grundstruktur	Rest (R)
Sulfanilamid		— H
Sulfadiazin		
Sulfamerazin		
Sulfamethazin		
Sulfachloropyridazin		
Sulfamethoxypyridazin		
Sulfadimethoxin		
Sulfathiazol		
Sulfamethoxazol		

Abbildung 4: Strukturformeln der untersuchten Sulfonamide.

Eine Substitution am Amidstickstoff mit einem heterozyklischen Rest bewirkt eine verbesserte antibakterielle Wirkung und optimiert die o. g. Eigenschaften. Die Substitution an der Aminogruppe reduziert jedoch die Wirksamkeit, da eine freie para-Aminogruppe für die antibakterielle Aktivität essentiell ist (STRAUSS et al. 1941; NOUWS et al. 1985).

Aufgrund seines amphotereren Charakters besitzt z. B. das Sulfonamid Sulfadiazin zwei Dissoziationskonstanten: Die Säurekonstante  $pK_{a1}$  liegt bei  $2 \pm 1$  und bezieht sich auf die Protonierung der  $NH_2$ -Gruppe. Dies führt zu einer positiven Ladung des Sulfadiazins in saurem Milieu. Die Basenkonstante  $pK_{a2}$  liegt zwischen 6,4 und 6,6 und bezieht sich auf die Deprotonierung der Sulfamido-Gruppe (MENGELEERS et al. 1997; BOREEN et al. 2005; BURKHARDT et al. 2005; LAI u. HOU 2008) (siehe Abbildung 5).

Sulfadiazin ist im Allgemeinen schlecht wasserlöslich und liegt bei physiologischen pH-Werten als schwache Säure vor. Die Löslichkeit ist vom pH-Wert der Lösung abhängig. Die Löslichkeit ist in alkalischen Lösungen besser als in neutralem oder saurem Milieu (HAWKING 1945; HOM u. AUTIAN 1956; BURKHARDT et al. 2005; RIVIERE u. PAPICH 2009). Die Wasserlöslichkeit als Natriumsalz hingegen ist besser und ist durch steigenden pH-Wert weiter zu erhöhen (HOM u. AUTIAN 1956).



<sup>a</sup>  $\text{SH}_2^+$  = kationische Form, SH = neutrale Form,  $\text{S}^-$  = anionische Form

**Abbildung 5: Protonierungsstadien der Sulfonamide (BOREEN et al. 2004).**

### 2.2.2 Wirkungsmechanismus

Die Wirkung der Sulfonamid-Antibiotika richtet sich gegen zahlreiche grampositive und gramnegative Bakterien sowie Protozoen. Die antibakterielle Wirkung wird durch

die Inhibition der Folsäuresynthese wachsender Bakterien erzielt. Die bakterielle Folsäure ist für proliferierende Mikroorganismen essentiell, da sie einen wichtigen Baustein in der DNA- und RNA- sowie Eiweißsynthese darstellt und diese Mikroorganismen nicht wie Menschen und Tiere in der Lage sind, Folsäure mit der Nahrung aufzunehmen. Das Folsäuredefizit hemmt das Wachstum und die Vermehrung der Mikroorganismen, so dass das Immunsystem des Wirtes in der Lage ist, die Bakterien effektiver zu eliminieren. Bakterien, die exogene Folsäure nutzen können oder sich nicht in einer Wachstumsphase befinden, weisen eine natürliche Resistenz gegen Sulfonamide auf (WOODS 1940).

Durch die kompetitive Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase, die die Entstehung von Dihydropteroinsäure aus Paraaminobenzoessäure (PABA) und Pteridin in dem Bakterium katalysiert, kommt der antimikrobielle Effekt der Sulfonamide zustande. Sulfonamid-Antibiotika sind Strukturanaloga des natürlichen Substrats Paraaminobenzoessäure und verdrängen dieses kompetitiv, indem sie an der gleichen Stelle der Synthetase binden (WOODS 1940).

Sulfonamide besitzen eine bakteriostatische Wirkung, die nach einer Latenzzeit von 4-6 Stunden eintritt, da die bereits synthetisierte Folsäure zunächst verbraucht werden muss (MILLER et al. 1972; SEYDEL u. WEMPE 1977). Trimethoprim, das auch zur Retardation von Resistenzbildungen in Kombination mit Sulfonamiden eingesetzt wird, wirkt synergistisch, da es ebenfalls mit dem Folsäurestoffwechsel der Mikroorganismen interferiert (BUSHBY u. HITCHINGS 1968).

Die Kombination Trimethoprim/Sulfonamid in dem Verhältnis 1:5 lässt auf Grund der additiven Wirkungsintensität eine nicht unerhebliche Dosisreduzierung der Einzelkomponenten zu und es kommt teilweise zu einem bakteriziden Effekt (BUSHBY u. HITCHINGS 1968; SEYDEL u. WEMPE 1977; BUSHBY 1980). LÖSCHER (1984) sieht das Potential der synergistischen Wirkung aufgrund der unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften jedoch kritisch. Die Verabreichung der Sulfonamid/Trimethoprim-Kombination in dem Mischungsverhältnis 1:5 ergibt durch eine unterschiedliche Distribution im Organismus das optimale Wirkungsverhältnis von etwa 1:20 im Blut. Dieses

Verhältnis wurde jedoch aufgrund humaner pharmakokinetischer Daten ermittelt und für die Veterinärmedizin lediglich übernommen.

Das optimale Verhältnis von 1:20 wird nicht immer im Blut der Tiere erreicht, da die Verteilung der beiden Komponenten im Tierkörper im Vergleich zum Menschen unterschiedlich verläuft (GARWACKI et al. 1996). Das Verteilungsvolumen von Trimethoprim beim Tier entspricht in etwa dem des Menschen, jedoch sind die Halbwertszeiten beim Tier im Vergleich zum Menschen wesentlich kürzer. Auch die Eliminationshalbwertszeit des Sulfadiazins ist beim Tier kürzer als beim Menschen, woraus eine nur kurze Wirkungsdauer resultiert. Infolge der schnellen Elimination von Trimethoprim wird nur kurzfristig ein additiver synergistischer Effekt kurz nach der Applikation erreicht (LÖSCHER 1984; GARWACKI et al. 1996).

Sulfadiazin wurde in der vorliegenden Arbeit für die Versuche am Tier ausgewählt, da es zur Behandlung von Schweinen verkehrsfähige sowie im Handel verfügbare Präparate gibt. Im Nutztierbereich ist ein häufiger Einsatz zu verzeichnen. In der Schweinehaltung wird Sulfadiazin in Kombination mit Trimethoprim im frühen Infektionsstadium bei Primär- und Sekundärinfektionen des Atmungsapparates, des Harn- und Geschlechtsapparates, des Magen-Darm-Traktes, der Augen und Ohren sowie der Haut und der Gelenke eingesetzt (NIELSEN u. GYRD-HANSEN 1994; BAERT et al. 2001).

### **2.2.3 Pharmakokinetik von Sulfadiazin im Schwein**

#### **2.2.3.1 Absorption**

Die Sulfadiazinabsorption beim Schwein verläuft schnell. Bei einer Absorptionshalbwertszeit von 0,5 Stunden (BAERT et al. 2001) bis 0,9 Stunden (SOLI et al. 1990) kommt es zu einem schnellen Konzentrationsanstieg im Plasma. Eine Studie von NIELSEN u. GYRD-HANSEN (1994) zeigte, dass Sulfadiazin langsamer resorbiert wird, wenn es zusammen mit dem Futter verabreicht wird. Die Bioverfügbarkeit wird dadurch allerdings nicht beeinflusst.



### 2.2.3.2 Plasmaproteinbindung

Die Plasmaproteinbindung von Sulfadiazin beim Schwein liegt bei etwa 28% (NOUWS et al. 1989). Der  $pK_{a2}$ -Wert von Sulfadiazin liegt zwischen 6,4 und 6,6 (MENGELERS et al. 1997; BOREEN et al. 2005; BURKHARDT et al. 2005; LAI u. HOU 2008). Ein niedriger  $pK_{a2}$  hat eine hohe Proteinbindungsfähigkeit zur Folge. Eine hohe Proteinbindung wiederum beeinflusst die Verteilung und erhöht die Halbwertszeit der Sulfonamide (RIVIERE u. PAPICH 2009). Im Falle von Sulfadiazin erhöht die Acetylierung die Plasmaproteinbindung nur minimal auf etwa 33% (NOUWS et al. 1989). Für die antimikrobielle Aktivität sind nur die ungebundenen Sulfonamide relevant, da nur dieser Teil in die Gewebe diffundiert (HAWKING 1945; MUNSEY et al. 1996).

Im Versuch von NIELSEN u. GYRD-HANSEN (1994) lag die Bioverfügbarkeit beim Schwein nach einer oralen Verabreichung von 40 mg/kg KG Sulfadiazin bei gefasteten Tieren bei 89% und bei Gefütterten bei 85%.

Nach oraler Applikation von 25 mg/kg Sulfadiazin und 5 mg/kg Trimethoprim wird die maximale Plasmakonzentration nach 2-3 Stunden bei einer mittleren Plasmakonzentration von etwa 18  $\mu\text{g/ml}$  (SOLI et al. 1990) erreicht bzw. die maximale Plasmakonzentration nach 1-3 Stunden bei einer mittleren Plasmakonzentrationen von etwa 30  $\mu\text{g/ml}$  (BAERT et al. 2001) erreicht.

### 2.2.3.3 Verteilung

Sulfadiazin wird im ganzen Körper verteilt und gelangt auch in die Synovia und ins ZNS (HAWKING 1945; BROWN et al. 1983; GUISE et al. 1986; RIVIERE u. PAPICH 2009).

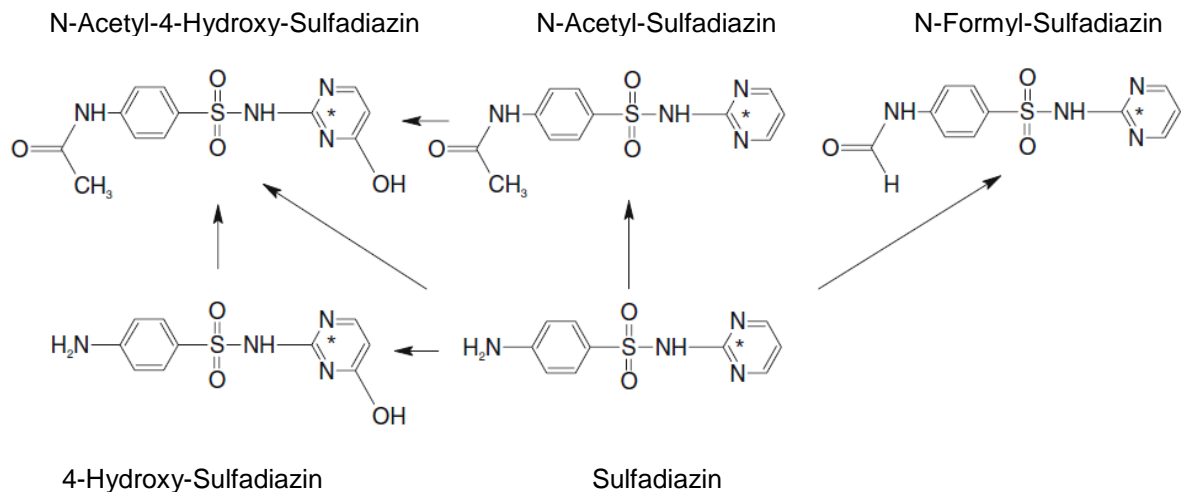
Nach oraler Applikation von 25 mg/kg Sulfadiazin und 5 mg/kg Trimethoprim liegt das Verteilungsvolumen bei etwa 0,6 l/kg (BAERT et al. 2001).

### 2.2.3.4 Metabolismus

Wie bei den anderen Tierarten gehören auch beim Schwein die Acetylierung (Phase-II-Biotransformationsreaktion) und Hydroxylierung (Phase I-Biotransformationsreaktion) zu den wichtigsten Metabolisierungsschritten, die in der Leber stattfinden (NIELSEN et al. 1986; NOUWS et al. 1989; LAMSHÖFT et al. 2007). Die freie Aminogruppe des Sulfadiazins wird N-4 acetyliert, dies führt zum Verlust der antimikrobiellen Aktivität (NOUWS et al. 1985).

Beim Schwein findet die Hydroxylierung von Sulfadiazin an Position 4 des Pyrimidinringes statt (NOUWS et al. 1989). Die Hydroxymetaboliten weisen noch eine geringe antibakterielle Restaktivität von 2,5% der Originalsubstanz auf, da die freie Paraaminogruppe noch vorhanden ist, die den Einbau von PABA in die Dihydropteroinsäure im Bakterium blockiert (NOUWS et al. 1985).

Innerhalb von zehn Tagen nach oraler Applikation werden 44% des verabreichten Sulfadiazins unverändert sowie über 50% als Biotransformationsprodukte ausgeschieden. Nachgewiesen werden N4-Acetyl-Sulfadiazin (21%) und 4-Hydroxy-Sulfadiazin (26%), außerdem wird ein geringer Teil (2%) zu N-Acetyl-4-Hydroxy-Sulfadiazin sowie N-formyl-Sulfadiazin metabolisiert. 3% des ursprünglich applizierten Sulfadiazins sind nicht identifizierbar, 4% verbleiben im Schwein (siehe Abbildung 6) (LAMSHÖFT et al. 2007). Methylsubstitutionen am Pyrimidinring erschweren die Hydroxylierung der Sulfonamide im Allgemeinen, daher wird Sulfadiazin relativ leicht hydroxyliert (NOUWS et al. 1989).



**Abbildung 6: Stoffwechselweg von Sulfadiazin im Schwein nach oraler Applikation (LAMSHÖFT et al. 2007).**

Bezüglich des Geschlechts sind geringe Differenzen im Metabolismus zu beobachten. So scheiden weibliche Tiere weniger Sulfadiazin und N4-Acetylsulfadiazin aus als männliche Schweine. Ähnlich verhält es sich bei dem Anteil der Hydroxymetaboliten. Die weiblichen Schweine scheiden nur 5,8% Hydroxysulfadiazin aus, während es 23% bei den männlichen Tieren sind (VREE et al. 1991).

Zu einem gewissen Teil werden Sulfonamide auch deacetyliert, wobei die Deacetylierung von Sulfadiazin beim Schwein im Gegensatz zu anderen Sulfonamiden kaum relevant ist (SHIMODA et al. 1997). Eine N1-Glucuronidierung des Sulfadiazins wurde beim Schwein nicht beobachtet (VREE et al. 1991).

### 2.2.3.5 Elimination

Die Elimination der Sulfonamide erfolgt zum größten Teil über die Nieren und durch Biotransformation (NOUWS et al. 1989). Ein geringer Anteil wird auch über die Faeces, Galle, Milch, Tränensekretion und den Schweiß ausgeschieden (HAWKING 1945; PEDERSEN 1973)

Freies, nicht an Plasmaproteine gebundenes Sulfadiazin, wird glomerulär filtriert (NOUWS et al. 1989) sowie im distalen Tubulus zurückresorbiert (VREE et al. 1991). Es findet keine tubuläre Sekretion statt (NOUWS et al. 1989). Der Aufkonzentrierungsprozess im Tubulus sorgt für hohe Sulfadiazingehalte im Urin, die im Vergleich zum Plasma langsamer abfallen (FODEY et al. 1997). Neben der glomerulären Filtration spielt die tubuläre Sekretion eine wichtige Rolle bei der renalen Exkretion der Metaboliten. Acetylierung und Hydroxylierung erhöhen die Polarität von Sulfadiazin und steigern infolge dessen die Exkretion und damit die Elimination des Wirkstoffes aus dem Organismus. Der zusätzliche Exkretionsmechanismus der tubulären Sekretion steigert die renale Clearance der Metaboliten um das zehnfache im Vergleich zu Sulfadiazin (NOUWS et al. 1989; SHIMODA et al. 1997).

Eine Methylgruppensubstitution am Pyrimidinring der Metaboliten vermindert die tubuläre Sekretion der Sulfonamide im Allgemeinen (NOUWS et al. 1989).

Ist die Absorption erheblich langsamer im Vergleich zur Elimination, spricht man vom „Flip-Flop“-Phänomen. Daraus resultierend kann die Elimination nach oraler Applikation verlängert sein (SOLI et al. 1990).

Die Eliminationshalbwertszeit beträgt nach oraler Applikation von 25 mg/kg Sulfadiazin beim Schwein etwa 4 Stunden (SOLI et al. 1990) bzw. 2-3 Stunden (BAERT et al. 2001). Nach Verabreichung von 40 mg/kg KG p. o. beobachteten NIELSEN u. GYRD-HANSEN (1994) jedoch eine Halbwertszeit von etwa 8-10 Stunden. Innerhalb von 10 Tagen sind 96% des ursprünglich oral verabreichten Sulfadiazins ausgeschieden (LAMSHÖFT et al. 2007).

### **2.3 Verringerung des Tierarzneimittleintrags in die Umwelt: Lösungsansätze**

Die unter 2.1 aufgeführten Eintragspfade von Veterinärarzneimitteln in die Umwelt sind vielseitig, jedoch stellt der Wirtschaftsdünger den Haupteintragsweg dar, gefolgt von antibiotikabelasteten Stallstäuben, die über die Abluft in die Umwelt gelangen. Verschiedene Lösungsansätze zur Verringerung des Arzneimittleintrages in die

## Literaturübersicht

Umwelt wurden daher entwickelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass es durch künstliche Photooxidation aber auch durch natürliches Sonnenlicht zur Degradation von Sulfonamiden kommt (KANIOU et al. 2005; SUKUL et al. 2008). Eine UV-Bestrahlung der Gülle, vor Beaufschlagung der Äcker, könnte zu einer Inaktivierung der antimikrobiell wirksamen Substanzen führen. Jedoch wurden bislang kaum Versuche in Bezug auf die Biokompatibilität der Photooxidationsprodukte durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Photooxidationsprodukte auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von Zellen untersucht und ihre antibakterielle Aktivität getestet. Dies soll Aufschluss darüber geben, ob die Photooxidation ein umweltverträgliches und effektives Mittel zur Verringerung des Arzneimitteleintrages in die Umwelt darstellen könnte.

Eine grundsätzliche Verringerung der Staubentwicklung in der intensiven Landwirtschaft könnte zu einem reduzierten Aerosoleintrag in die Abluft der Ställe führen. Da in der Schweinemast aufgrund der hohen Besatzdichte in der Regel der gesamte Bestand therapeutisch behandelt wird, wäre es optimal, ein Futtermittel mit geringem Staubpotential zu wählen, in das der Wirkstoff integriert wird. In dieser Arbeit wurde daher eine vergleichende Fütterung mit Mehlfutter vs. Pellets durchgeführt, um zu testen, ob verschiedenartige galenische Formulierungen die Staubentwicklung und den Antibiotikagehalt in den Stallstäuben beeinflussen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Sulfonamide/Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden folgende Sulfonamide in Pulverform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet:

Sulfamerazin

Sulfanilamid

Sulfamethoxypyridazin

Sulfamethoxazol

Sulfachloropyridazin

Sulfamethazin-Na (syn. Sulfadimidin)

Sulfadiazin-Na

Sulfathiazol-Na

Sulfadimethoxin-Na

Stammlösungen von Sulfamerazin, Sulfanilamid, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamethoxazol und Sulfachloropyridazin wurden in DMSO (100 mg/ml), von Sulfamethazin-Na, Sulfadiazin-Na, Sulfathiazol-Na sowie Sulfadimethoxin-Na in PBS (1 mg/ml) angesetzt. Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Für den *In-vivo*-Teil der vorliegenden Arbeit stand Sulfadiazin in Form des Veterinärarzneimittels Trimosulf<sup>®</sup> in handelsüblicher Pulverform zur Verfügung. 1 g Trimosulf<sup>®</sup> enthält 500 mg Sulfadiazin, 100 mg Trimethoprim und 400 mg Lactose-Monohydrat.

### 3.1.2 *In-vitro*-Experimente

#### 3.1.2.1 Geräte und Materialien

Brutschrank	Varolab, Giesen
BRT MRL-Suchtest ESL	AiM GmbH, München
Falconröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Feinwaage ALS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Kulturfläschchen 25 cm <sup>2</sup> , 50 ml L929	Greiner, Frickenhausen
Mikroskop Axiovet 25	Cell Lines Sevice, Eppelheim
MSC-P5	Zeiss, Jena
Orbitalshaker Stuart Scientific S03	Cell Lines Sevice, Eppelheim
Photometer Microplate Reader MRX	Bibby Scientific, Stone, Großbritannien
Reagenzglas	Dynatech, Denkendorf
Schraubbecher 100 ml	Sarstedt, Nürnberg
Schutzbrille	Sarstedt, Nürnberg
Sterilbank MSC Advantage	Uvex, Fürth
Sterilfilter Minisart	ThermoElectron LED, Langenselbold
Thermoblock	Sartorius stedi biotech, Göttingen
UV-Lampe Sol 500	Aerne Analytik, Pfaffenhofen
Ventilator	Hönle GmbH, Planegg
Waage SBA 53	ISC GmbH, Landau/Isar
Wasserbad	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
96-Well-Platte	Memmert GmbH & CoKG, Schwabach
	Greiner BIO ONE, Frickenhausen

#### 3.1.2.2 Reagenzien

Crystal Violet	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Glutaraldehyd 2% in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Milchstandard	AiM GmbH, München
MTS	Promega, Mannheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

## Material und Methoden

Benzylpenicillin-Standard	AiM GmbH, München
RPMI-Medium 1640	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure (Kristallwasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt

### 3.1.3 *In-vivo*-Experimente

#### 3.1.3.1 Geräte und Materialien

EDTA-Röhrchen 10 ml	Sarstedt, Nürnberg
Einmalspritze 3 ml, Omnifix	Braun, Melsungen
Heizblock TCS-Metallblock-Thermostat	Barkey, Bielefeld
Kanüle 20 G, Neolus	Terumo Europe, Leuven, Belgien
Luftprobenahmepumpe PCXR8	SKC INC., Eighty Four, P.A., USA
Magnetrührer Magnetomix	Colora Messtechnik, Lorch
Mehrzweckbecher 26 ml PP	Sarstedt, Nürnberg
pH-Meter: PH 320	WTW, Weilheim
Polycarbonatfilter Porengröße 0,8 µm	Whatman, Dassel
Polypropylen-Röhrchen 11 ml	Greiner, Frickenhausen
Schraubbecher 100 ml PP	Sarstedt, Nürnberg
Schüttelgerät IKA Vibrax VXR basic	IKA, Staufen
Veterinär-Spezialtupfer	WDT, Garbsen
Vortex Reax 2000	Heidolph, Nürnberg
Waage SBA 53	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg

#### 3.1.3.2 Reagenzien

Ethylacetat	VWR International GmbH, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Panthenol-Salbe® Lichtenstein 5 %	Winthrop Arzneimittel, Mülheim-Kärlich
Octenivet®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Trimosulf®	WDT, Garbsen



### 3.1.4 Analytik

HPLC: Beckmann Coulter, System Gold	Beckmann, München
508 Autosampler	
166 Detector	
126 Solvent Systeme Pumpe	
Glasvial	Wheaton, Millville N.Y., USA
Säule: LiChroCart 250-4 (5 µm, 25 cm)	Merck, Darmstadt
Säulenofen SpH 99	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin Electronic, Berlin
Vorsäule: LiChroCart 4-4 (5 µm)	Merck, Darmstadt
24 Karat 5.0	Beckmann, München

### 3.1.5 Puffermedien

#### **Mcllvaine-Puffer (pH 2,2)**

Zitronensäure (Kristallwasserfrei)	20,80 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat	0,40 g/l

#### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (pH 7,4)**

Natriumchlorid	8,00 g/l
Kaliumchlorid	0,20 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	0,20 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat	1,44 g/l

#### **Phosphatpuffer (pH 6,8)**

Kaliumdihydrogenphosphat	14,29 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat	25,81 g/l

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte jeweils mit Salzsäure bzw. Natriumhydroxid.

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Versuchsübersicht

In einer Serie von *In-vitro*-Versuchen wurde die Photooxidierbarkeit der Sulfonamide getestet. Die Ursprungslösungen und die aus der Bestrahlung resultierenden Produkte wurden nachfolgend in der Zellkultur auf eine Beeinflussung der Vitalität und des Proliferationsverhaltens bei murinen Keratinozyten und Fibroblasten untersucht. Um die antibakterielle Wirkung von bestrahlter Lösung vs. unbestrahlter Lösung zu eruieren, wurden sie außerdem in einem Brillantschwarz-Reduktionstest verwendet.

Im Anschluss wurde Sulfadiazin im Modellversuch in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Futterformulierungen an Schweine verabreicht. Der Sulfadiazingehalt wurde sowohl in Plasma- und Urinproben der Schweine als auch in Sedimentationsstaubproben und Stallaerosolen bestimmt. Abbildung 7 zeigt die Gliederung der experimentellen Arbeiten.

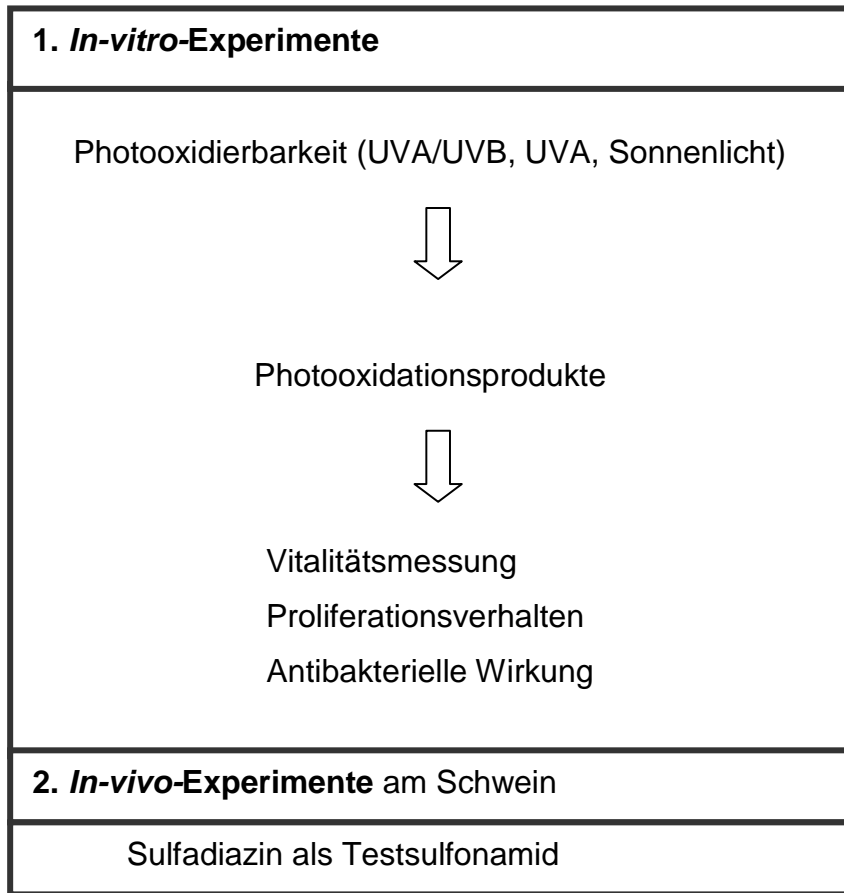


Abbildung 7: Versuchsgliederung.

### 3.2.2 *In-vitro*-Experimente

#### 3.2.2.1 Photooxidationsversuch

##### 3.2.2.1.1 UVA/UVB-Bestrahlung

Zur Bestimmung des photooxidativen Abbaus der Sulfonamide wurden diese zunächst mit UVA/UVB-Licht (Lichtintensität UVA 3,21 mW/cm<sup>2</sup>, UVB 0,068 mW/cm<sup>2</sup>, Abstand von der Petrischale zur Lichtquelle 9,7 cm) bestrahlt, was in etwa dem UV-Spektrum des Sonnenlichts entspricht.

Aus den Stammlösungen der Sulfonamide wurden Lösungen in Konzentration von 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml in PBS angesetzt. Die Probenentnahme zum Zeitpunkt 0 h erfolgte vor Irradiationsbeginn.

50 ml der Lösung wurden in eine Petrischale (Durchmesser 14 cm) gegeben. Die Petrischale wurde an einem Orientierungspunkt mittig unter der Quecksilber Lampe SOL 500 ausgerichtet und für eine Stunde mit UVA/UVB-Licht bestrahlt. Zur Vermeidung einer Überhitzung lief ein Ventilator während der gesamten Bestrahlungsdauer. Die Lösung in der Petrischale erreichte eine Temperatur von etwa 31 °C, die Lufttemperatur unter der angeschalteten UV-Lampe betrug 33°C.

Nach einstündiger Photooxidation wurden gewichtsmäßig ermittelte Verdunstungsverluste mit PBS ausgeglichen. Nach 20-maligem Schwenken der Petrischale zur Vermischung wurden den Lösungen der Konzentrationen 5 µg/ml und 10 µg/ml 2 x 400 µl entnommen und in die Glasvials für die HPLC überführt. Die aus den 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml Lösungen entnommenen Proben mussten zunächst 1:10 mit PBS verdünnt werden, ehe sie in die Glasgefäße gegeben wurden.

Die Probenentnahmen erfolgten jeweils nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h sowie 6 h.

Die gewonnenen Proben wurden bis zur Messung mittels HPLC (s. Punkt 3.2.4) bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

### **3.2.2.1.2 UVA-Bestrahlung**

Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses verschiedener Wellenlängen wurden die Sulfonamide mit reinem UVA-Licht (400–315 nm) bestrahlt, indem ein UVA-Filter (h1) der Hönle GmbH verwendet wurde. Die Bestrahlung mit UVA-Licht fand unter identischen Bedingungen wie der UVA/B-Photooxidationsversuch statt. Bestrahlt wurde allerdings nur eine Lösung mit 10 µg/ml über einen Zeitraum von sechs Stunden.

### **3.2.2.1.3 Feldversuch**

Um zu prüfen, ob eine Photooxidation auch unter Feldbedingungen stattfindet, wurden Sulfonamidlösungen zusätzlich natürlichem Sonnenlicht ausgesetzt. Die Versuche fanden im Juni und Juli statt, die Temperatur lag während des Versuchszeitraums bei 20-28°C. Das Wetter war wechselhaft, es kamen sowohl sonnige als auch bedeckte Abschnitte vor. Die Lösungen hatten eine Ausgangskonzentration von 100 µg/ml. Die Petrischalen mit je 50 ml der Lösung wurden sieben Tage der natürlichen Witterung ausgesetzt. Alle 24 Stunden wurden Proben entnommen. Dafür wurden, wie schon im 3.2.2.1.1 beschrieben, gewichtsmäßig ermittelte Verdunstungsverluste mit PBS ausgeglichen. Nach 20-maligem Schwenken der Petrischale wurde 1 ml der Lösung entnommen, nachfolgend im Verhältnis 1:10 verdünnt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Nach Versuchsende wurde die Sulfonamiddegradation mittels HPLC bestimmt.

### **3.2.2.2 Zellkultur**

#### **3.2.2.2.1 MTS-Vitalitätsassay**

Der CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-Test) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zellvitalität durch Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Das CellTiter 96 AQueous One Solution Reagenz enthält ein gelbes wasserlösliches Tetrazoliumsalz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS) und einen Elektronenfänger (phenazine methosulfate (PMS)). Die mitochondrialen Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen reduzieren das Substrat MTS zu blau-violetter ebenfalls löslichem Formazan. Die Aktivität dieser Dehydrogenasen ist von der Stoffwechselaktivität der Zellen abhängig und wird durch eine photometrische Messung des farbigen Formazanproduktes bei 490 nm quantifiziert.

### **Versuchsdurchführung:**

Zur Untersuchung auf eine zytotoxische Wirkung der Photooxidationsprodukte (s. Punkt 3.2.2.1.1) wurden murine Keratinozyten (MSC-P5) und Fibroblasten (L929) verwendet.

Für den MTS-Test wurden die unbestrahlten Sulfonamidlösungen in der Konzentration 100 µg/ml sowie im Vergleich dazu die Photooxidationsprodukte nach sechsständiger UVA/UVB-Bestrahlung jeweils zur Doppelbestimmung pro Substanz appliziert. Der Test wurde an sechs verschiedenen Tagen (n = 6) durchgeführt.

Die murinen Zelllinien wurden standardmäßig mit Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Aussaat von 10.000 Zellen/Well erfolgte fünf Tage vor der eigentlichen Behandlung. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei bis drei Tage vorgenommen.

Am Behandlungstag wurden die Proben im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:3 mit RPMI-Medium verdünnt und anschließend jeweils 100 µl/Well auf die 96-Well-Platte appliziert. Danach wurden die 96-Well-Platten 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten 100 µl RPMI-1640-Medium/Well.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Wells zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden insgesamt 100 µl/Well MTS und RPMI-Medium im Verhältnis 1:5 aufgetragen und eine Stunde im Brutschrank inkubiert, um daraufhin die optische Dichte photometrisch bei 490 nm zu bestimmen.

### **3.2.2.2.2 Kristallviolett-Proliferationsassay**

Der Kristallviolett-Test misst mittels einer Proteinfärbung die Adhäsion von Zellen. Die kolorimetrische Bestimmung der Farbextinktion korreliert mit der Biomasse der adhärennten Zellen, die als Maß für die Proliferation der Zellen dient (BERNHARDT et al. 1992). Aus diesem Grund wird dieser Test nicht an konfluenten Zellrasen, sondern an proliferierenden Zellen angewendet.

Bei adhären wachsenden Zellen wie Keratinozyten und Fibroblasten sind apoptotische und nekrotische Zellen durch eine reduzierte Adhäsion charakterisiert. Diese Zellen werden mit dem Kulturüberstand im initialen Waschschrift entfernt.

Zurück bleiben nur die vitalen adhären Zellen, die für den Test mittels Glutaraldehyd am Boden der Gewebekulturschale fixiert werden. Erst dann werden die Zellkerne mit Kristallviolett angefärbt. Kristallviolett ist ein basischer Farbstoff, der an die DNA bindet. Nach vorgegebener Inkubation wird in einem Waschschrift der ungebundene Farbstoff entfernt. Nach Applikation von Triton X-100, das den gebundenen Farbstoff durch Lyse der Zellmembran freisetzt, kann die Extinktion der Monolayerschicht bei 595 nm photometrisch bestimmt werden. Der aus den Zellen gelöste Kristallviolett-Farbstoff ist dabei direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

### **Versuchsdurchführung:**

Die Kristallviolett-Methode für Monolayer-Kulturen (GILLIES et al. 1986) wurde in modifizierter Form durchgeführt.

Testsubstanzen, Zelllinien und Kultivierung waren identisch mit dem MTS-Test (s. Punkt 3.2.2.2.1). Auch hier wurde jeweils eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Behandlung ausgesät und nach 24 Stunden, wenn noch kein konfluenter Zellrasen vorlag, mit 100 µl Probe/Well behandelt. Die Proben wurden 1:1 bzw. 1:3 mit dem Medium verdünnt und anschließend 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Entfernung des Zellkulturmediums und die Fixierung mit je 100 µl Glutaraldehydlösung pro Well. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten, ehe die Zellen nach Absaugen des Glutaraldehyds mit 100 µl/Well Kristallviolett-Lösung angefärbt wurden. Darauf folgend wurden die Zellen nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und anschließend 50 µl Triton X-100 pro Well hinzupipettiert. Zum vollständigen

Herauslösen des Farbstoffes inkubierten die 96-Well-Platten anschließend für etwa eine Stunde auf dem Orbitalshaker, ehe die Absorption bei 595 nm gemessen wurde.

### 3.2.2.3 Antimikrobielle Aktivität

Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) wurde erstmals 1967 durch Kraack und Tolle beschrieben und seither in verschiedener Art und Weise modifiziert. 1982 wurde der BR-Test in Deutschland als offizielle Untersuchungsmethode zum Hemmstoffnachweis in Sammelmilch in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches aufgenommen.

#### Testprinzip:

Der BRT nutzt die Sensibilität des Testkeims *Geobacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* C953 gegenüber Hemmstoffen, die die Stoffwechselaktivität und somit die Vermehrung des Testkeimes inhibieren.

In den Wells der Mikrotiterplatten des BRT ist ein blaues Testmedium enthalten, das in einem Nährstoffgemisch Brillantschwarz als Redox-Indikator enthält. Außerdem ist das Agarmedium mit einer standardisierten Sporenanzahl von *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 beimpft.

Nach Auftragen der Testsubstanz werden die Mikrotiterplatten zur Inkubation in einen Thermoblock bei 65°C bebrütet. Handelt es sich um keine Hemmstoffprobe, kann sich der thermophile Testkeim ungehindert entwickeln. Während der Inkubation überführen die wachsenden Testkeime den Redoxindikator Brillantschwarz durch Spaltung zweier Azobindungen in seine gelbe Reduktionsstufe und die Agarfarbe schlägt von blau nach gelb um. Diffundieren jedoch Hemmstoffe in den Agar, wird der Stoffwechsel des Testkeims inhibiert und die blaue Agarfarbe bleibt erhalten.



### **Versuchsdurchführung**

Wie schon bei den Versuchen in der Zellkultur wurden auch für den BRT-Test die unbestrahlten Sulfonamidlösungen in der Konzentration 100 µg/ml sowie im Vergleich dazu die entsprechenden Photooxidationsprodukte nach sechsständiger UVA/UVB-Bestrahlung verwendet. Zusätzlich wurde in diesem Fall bei den nicht bestrahlten Proben die ursprüngliche Konzentration von 100 µg/ml an die niedrigere Sulfonamidkonzentration nach sechsständiger Bestrahlung angeglichen. Die Proben wurden jeweils für eine Doppelbestimmung auf das Testsystem appliziert.

Der Test wurde gemäß des Versuchsprotokolls der AiM GmbH, München, durchgeführt, allerdings mit geringen Modifikationen. So inkubierten die Mikrotiterplatten, die im Kühlschrank gelagert wurden zunächst 20 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 100 µl hemmstofffreie „H-Milch“ in jede Kavität pipettiert, um den Testkeim mit ausreichend Nährstoffen, die auch entsprechend bei in der Praxis zu untersuchenden Milchproben vorkommen, zu versorgen. Nach weiterer 20-minütiger Inkubationsdauer wurde die Milch verworfen, die Vertiefungen vorsichtig mit Wasser gespült und im nächsten Schritt die eigentlichen Proben aufgetragen.

Als Negativ-Kontrolle diente das hemmstofffreie Milch-Vollmilch-Lyophilisat der AiM GmbH. Benzylpenicillin-Standard Vollmilch Lyophilisat wurde in der Konzentration 4 ng/ml als Positiv-Kontrolle verwendet.

Die Kalibrationsreihe mit Penicillin-Standard wurde in folgenden Konzentrationen appliziert: PBS pur, 0,4 ng/ml, 0,8 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,6 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,8 ng/ml sowie 3,6 ng/ml.

Die Testeinheiten wurden mit Klebefolie fest verschlossen. Anschließend wurden sie in einen Thermoblock bei 65°C bebrütet, bis die Kavität mit der Negativkontrolle vollständig nach gelb entfärbt wurde (nach ca. 2,5 Stunden).

Die Klebefolie wurde entfernt und die Vertiefungen vorsichtig mit Wasser gespült. Abschließend erfolgte die photometrische Extinktionsmessung bei 570 nm.

### **3.2.3 *In-vivo*-Experimente**

Die *In-vivo*-Versuche an den Schweinen sind gem. Aktenzeichen 33.9-42502-04-11/0338 genehmigt worden.

Eine Übersicht der Versuche ist in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt.

#### **3.2.3.1 Versuchstiere**

Es wurden insgesamt 12 Tiere für die vorliegende Arbeit eingesetzt. Die Ferkel stammten vom Lehr- und Forschungsgut Ruthe aus Sarstedt und wurden mit einem Körpergewicht von etwa 12 bis 15 Kilogramm (kg) in den Tierstall des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover eingestallt. Alle Ferkel waren weiblichen Geschlechts. Die Tiere wurden in der Gruppe á sechs Tiere gehalten und zweimal täglich mit handelsüblichem Mehlfutter (Scharnebecker Mühle, DiHa, Scharnebeck) bzw. pelletiertem Futter in einem in sechs Fressplätze unterteilten Trog gefüttert. Trinkwasser stand ad libitum über eine Nippeltränke zur Verfügung. Die Ferkel waren zum Zeitpunkt der Versuche klinisch gesund.

Der Raum, in dem die Schweine gehalten wurden, hatte eine Größe von 4,8 m x 4,9 m, die Größe der Bucht bemaß sich auf 1,9 m x 4,6 m. Die Fenster, die ausreichend Tageslicht in den Stall einfallen ließen, und Türen wurden geschlossen gehalten. Ein Lüftungssystem war vorhanden. Die Raumtemperatur lag zwischen 19 und 22°C.

#### **3.2.3.2 Versuchsdurchführung**

##### **Orale Medikation mittels Mehlfutter**

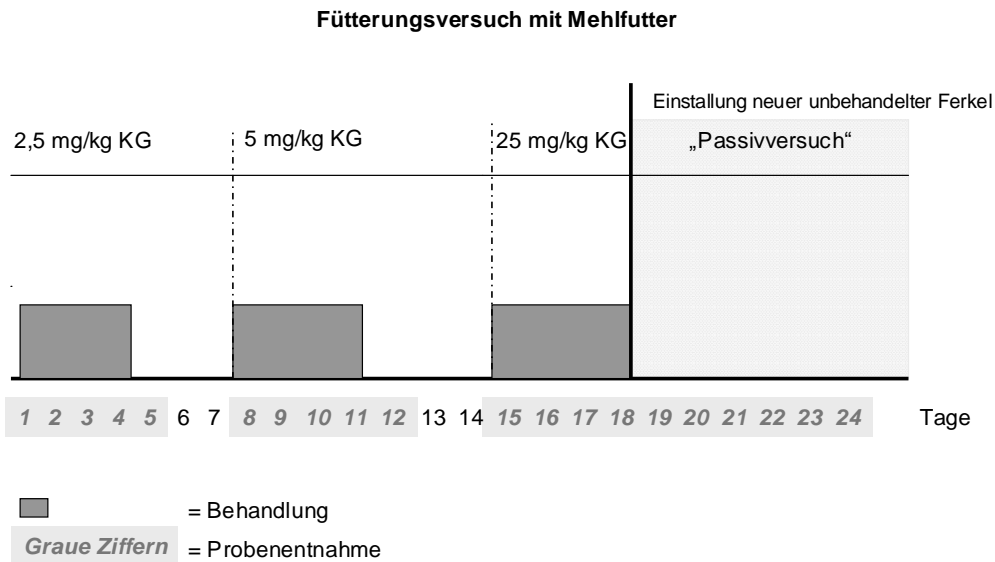
Sechs Schweine wurden über das Futter, in diesem Fall handelsübliches Mehlfutter, in das Sulfadiazin (SDZ) als Modellsubstanz eingemischt wurde, behandelt.

## Material und Methoden

Der Gehalt an SDZ wurde sowohl in Plasma- und Urinproben als auch in sedimentierten Stallstaubproben gemessen. Zusätzlich wurde der Sulfadiazingehalt im Aerosol mittels einer Luftprobenahmepumpe bestimmt.

Gemäß Versuchsübersicht (s. Abbildung 8) wurde das Mehlfutter jeweils mit verschiedenen SDZ-Konzentrationen versetzt, zum einen mit der bestimmungsgemäßen Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht (KG) und zum anderen mit geringeren Wirkstoffmengen von 2,5 mg/kg KG und 5 mg/kg KG zur Simulation einer Wirkstoffverschleppung. Die Ferkel wurden zweimal täglich mit insgesamt 3-4 kg Futter pro Tag gefüttert. Die erste Fütterung erfolgte um 7:15 Uhr nach der ersten Blutentnahme und die Zweite um 16:15 Uhr. Im Futter befanden sich bei einer Dosis von 2,5 mg/kg KG ca. 94 mg SDZ/kg Futter, bei einer Dosis von 5 mg/kg KG 151 mg/kg Futter sowie bei einer Dosis von 25 mg/kg KG ca. 820 mg SDZ/kg Futter.

Nach Beendigung dieses Fütterungsversuches mit der bestimmungsgemäßen Sulfadiazindosis von 25 mg/kg KG wurde eine Studie zur möglichen Verschleppung in Anlehnung an KIETZMANN et al. (1995) durchgeführt („Passivversuch“). Die Tiergruppe wurde ausgestallt, der Stall nur trocken gereinigt. Direkt im Anschluss wurde eine unbehandelte Ferkelgruppe á sechs Tiere eingestallt. Anhand der bei diesen Tieren gewonnenen Blut- und Urinproben sowie mittels Staub- und Aerosolproben sollte eine mögliche Sulfonamidverschleppung über Stäube und Ausscheidungen festgestellt werden.

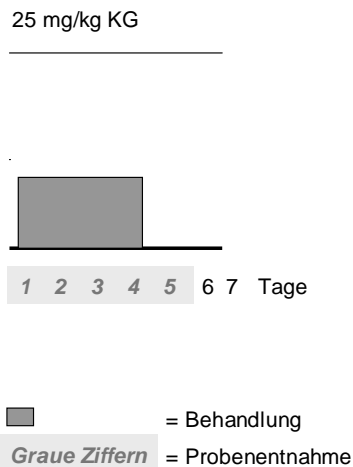


**Abbildung 8: Zeitplan des Fütterungsversuchs mit Mehlfutter.**

## **Orale Medikation mittels pelletiertem Futter**

Im zweiten Teil des Fütterungsversuches wurden anstatt Mehlfutter Pellets verfüttert. Mehlfutter, das Sulfadiazin in bestimmungsgemäßer Dosis von 25 mg/kg KG enthielt, wurde vom Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zu Pellets verarbeitet. Um das Staubverhalten bei Mehl- vs. Pelletfütterung zu prüfen, wurde eine entsprechende SDZ-Verteilung in den Stallaerosolen sowie in den Sedimentationsstäuben untersucht (siehe Abbildung 9).

### Fütterungsversuch mit Pelletfutter



**Abbildung 9: Zeitplan des Fütterungsversuchs mit pelletiertem Futter.**

Die folgenden Angaben beziehen sich sowohl auf den Fütterungsversuch mit Mehlfutter als auch auf die Pelletfütterung. Bei Abweichungen wird gesondert darauf verwiesen.

#### **Urinproben:**

Von jedem Schwein wurden vor Versuchsbeginn sowie mindestens einmal pro Behandlungstag spontan abgesetzte Urinproben gewonnen. Bis zur Extraktion wurden die Urinproben bei -20°C gelagert.

#### **Plasmaproben:**

Zur Bestimmung der minimalen SDZ-Konzentration im Plasma wurde die erste Blutprobenentnahme morgens um 7:00 Uhr, direkt vor der ersten Fütterung und damit Behandlung durchgeführt. Um die maximale SDZ-Plasmakonzentration (SOLI et al. 1990; BAERT et al. 2001) zu ermitteln, wurde um 10:15 Uhr eine weitere

## Material und Methoden

Blutprobe gezogen. Für die Analytik wurde 1 ml Blut aus der *Vena jugularis* benötigt, das in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen wurde und kurz nach der Blutentnahme für 10 min. bei 3000 g zentrifugiert wurde. Das so gewonnene Plasma wurde in Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren.

Während des Passivversuchs erfolgte die Blutentnahme nur einmal täglich um 7:30 Uhr.

Vor Beginn der Versuche wurden von jedem Schwein Leerplasmaproben gewonnen.

### **Sedimentationsstaubproben:**

Um einen Eintrag von SDZ in die Umgebung zu überprüfen, wurden an fünf verschiedenen Lokalisationen im Stall Sedimentationsstäube gesammelt. Der Staub wurde dazu mittels Kartenblättchen in ein Polypropylenröhrchen verbracht. Das Röhrchen wurde vor und nach dem Eingeben des Staubes dreimal gewogen. Anschließend wurden die Proben zur Extraktion bei -20°C eingefroren.

Die fünf Sammelstellen befanden sich, wie in Abbildung 10 dargestellt, im Bereich der Fensterbank (1), auf dem Fressgitter oberhalb des Troges (2), auf dem Fressgitter oberhalb der Liegefläche (3), in der Rinne vor dem Trog (4) und auf den Abtrenngittern gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (5). Sie wurden jeweils nach der zweiten Fütterung um 16:30 Uhr gesammelt.

Vor Versuchsbeginn wurden in dem Stall ebenfalls Sedimentationsstaubleerproben gewonnen.

## Material und Methoden

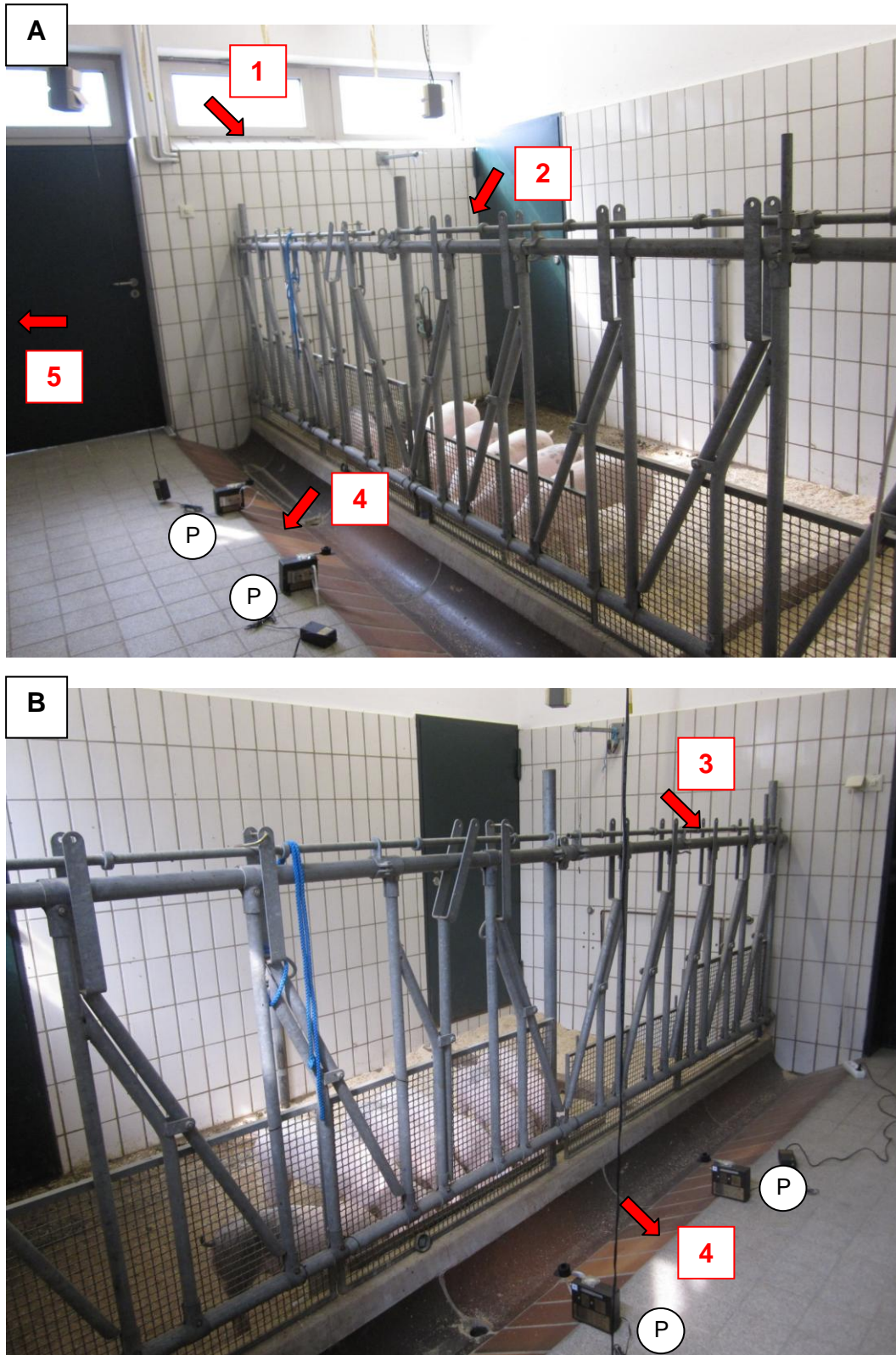


Abbildung 10: Stallraum aus verschiedenen Perspektiven (A, B); die roten Pfeile zeigen die Sammelstellen des Sedimentationsstaubes im Bereich der Fensterbank (1), des Troges (2), der Liegefläche (3), der Rinne (4) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (5); P = Luftprobenahmepumpe.

### **Filterstaubproben:**

Zur Bestimmung des SDZ-Gehaltes in den Stallaerosolen wurden zwei Luftprobenahmepumpen eingesetzt. Die Pumpen wurden gegenüber den Trogenden auf der Stallgasse positioniert, so dass sie sich in etwa in Höhe der Schweine befanden. Das Luftzugvolumen der Pumpen betrug 3 l/min. Auf das Ansaugsystem wurde ein Filterkopf verbracht, der einen Polycarbonatfilter enthielt. Vor der Messung wurde ein steriler Filter in den Filterkopf gelegt und dreimal hintereinander gewogen. Nach dem Messungsintervall erfolgte eine ebenfalls dreifache Auswaage. Dann wurde der Filter mit einer Pinzette vorsichtig entnommen und in einen Polypropylenmehrzweckbecher gelegt, in dem er bis zur Extraktion dunkel bei Raumtemperatur lagerte. Die Messungen begannen um 6:55 Uhr und endeten um 16:40 Uhr. Die vordere Pumpe lief in zwei Messintervallen á 270 min., die hintere Pumpe lief kontinuierlich über neun Stunden. Die Laufzeiten wurden zusammen mit dem Luftzugvolumen der Pumpen zur Berechnung der Sulfadiazinkonzentration pro m<sup>3</sup> herangezogen. Vor Versuchsbeginn wurden die Pumpen für eine Leermessung im Stall eingesetzt.

### **3.2.3.2.1 Probenaufbereitung**

Die Extraktionsmethode modifiziert nach van Duijkeren (VAN DUIJKEREN et al. 1994) ist in Tabelle 1 dargestellt. Als interner Standard diente Sulfamerazin.



## Material und Methoden

**Tabelle 1: Extraktion der Urin-, Plasma- und Sedimentationsstaub- sowie der Filterstaubproben**

		Urin	Plasma	Sedimentations- staub	Filterstaub
1.	<b>Probenmenge</b>	1 ml	0,5 ml	Zugabe von 1 ml PBS	Zugabe von 2 ml MeOH
2.	<b>Schütteln</b>	-	-	X	X
3.	<b>Versetzung mit internem Standard (SMR)</b>	100 µl [100 µl/ml]	50 µl [100 µl/ml]	50 µl [100 µl/ml]	40 µl [100 µl/ml]
4.	<b>Schütteln</b>	X	X	X	1 h auf den Orbitalshaker (lichtgeschützt)
5.	<b>Zugabe von Phosphatpuffer</b>	jeweils 0,2 ml			-
6.	<b>Schütteln</b>	X	X	X	-
7.	<b>Ethylacetat</b>	jeweils 6 ml			-
8.	<b>Rüttler</b>	5 min.			-
9.	<b>Zentrifugieren</b>	10 min., 3000 g			-
10.	<b>Überstand</b>	Komplette Abnahme des Überstands, Überführen in neues PP-Röhrchen, bei 50°C im Heizblock mit Druckluft eindampfen.			
11.	<b>Wiederholung von Schritt 8-9</b>	Jeweils 6 ml Ethylacetat auf den verbleibenden Bodensatz geben.			-
12.		Überstand auf das PP-Röhrchen geben, in dem zuvor eingedampft wurde.			-
13.	<b>Eindampfen</b>	Bei 50°C im Heizblock mit Druckluft eindampfen.			-
14.	<b>Aufnahme in MeOH</b>	500 µl	250 µl	250 µl	200 µl
15.	<b>Rüttler</b>	5 min.			10 min.
16.	<b>Zugabe von McIlvaine-Puffer</b>	+ 500 µl	+ 250 µl	+ 250 µl	+ 200 µl
17.	<b>Rüttler</b>	5 min.			10 min.
18.	<b>Überführung in HPLC Vial</b>	jeweils 400 µl			

### 3.2.4 Analytik

Die quantitative Bestimmung der Testsubstanzmenge in den Proben erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Von den in den Bestrahlungsversuchen gewonnenen Proben wurden jeweils 100 µl mittels Autosampler in die HPLC-Anlage injiziert. Die Auftrennung erfolgte über eine RP-18 Trennsäule sowie eine vorgeschaltete RP-18 Vorsäule bei 40°C. Zur Detektion wurde ein UV-VIS-Detektor bei 264 nm verwendet. Die mobilen Phasen sowie die Retentionszeit für jeden gemessenen Analyten sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Flussrate lag bei 1 ml/min.

**Tabelle 2: Detektion der Sulfonamide mittels HPLC modifiziert nach Sharma (SHARMA et al. 1976); (ACN=Acetonitril, MeOH=Methanol).**

<b>Testsubstanz</b>	<b>Mobile Phase [V/V]</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>
Sulfanilamid	MeOH/McIlvaine-Puffer (20/80)	2,7
Sulfachloropyridazin	MeOH/McIlvaine-Puffer (40/60)	3,0
Sulfadiazin	MeOH/McIlvaine-Puffer (15/85)	6,0
Sulfadimethoxin	ACN/McIlvaine-Puffer (80/20)	2,7
Sulfamerazin	MeOH/McIlvaine-Puffer (15/85)	9,0
Sulfamethazin	MeOH/McIlvaine-Puffer (40/60)	3,5
Sulfamethoxazol	MeOH/McIlvaine-Puffer (20/80)	14,0
Sulfamethoxypyridazin	MeOH/McIlvaine-Puffer (20/80)	9,0
Sulfathiazol	MeOH/McIlvaine-Puffer (20/80)	5,0

Durch den Vergleich mit einer Kalibrationsreihe wurde die Testsubstanz quantifiziert, wobei die Flächen unterhalb der Graphen (AUC) für die Auswertung herangezogen wurden. Die Kalibrationsreihe der jeweils in Doppelbestimmung untersuchten Substanz beinhaltete die Konzentrationen 10.000 ng/ml, 7.500 ng/ml, 5.000 ng/ml, 1.000 ng/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml sowie PBS pur.

Die Proben aus den Photooxidationsversuchen konnten ohne weitere Aufbereitung analysiert werden. Die aus den *In-vivo*-Experimenten gewonnenen Proben wurden vor der Analytik gemäß Punkt 3.2.3.2.1 aufbereitet.

### **3.2.4.1 Validierung der HPLC für die untersuchten Testsubstanzen**

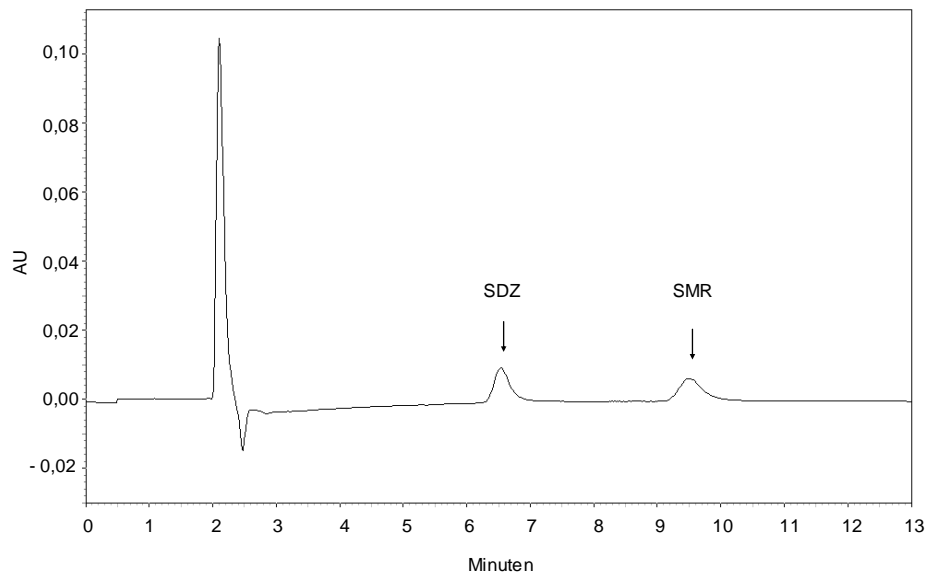
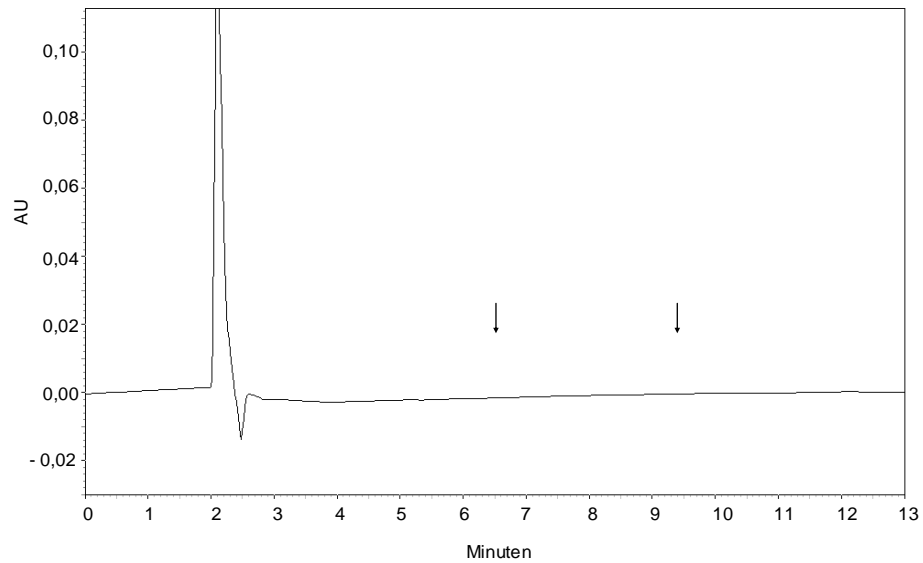
Zur Validierung der Analysemethode wurden folgende Parameter untersucht:

#### **Selektivität**

Die Selektivität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, verschiedene parallel zu messende Substanzen ohne gegenseitige Störung zu detektieren. Zudem wird das Vorhandensein eines Störpeaks zur Retentionszeit des Analyten ausgeschlossen (KROMIDAS 1999).

Zur Überprüfung der Selektivität wurden Chromatogramme von Leermatrixproben mit Chromatogrammen von analytenhaltigen Proben verglichen, um sicherzustellen, dass zur jeweiligen Retentionszeit des Analyten kein Störpeak vorhanden ist. Abbildung 11 zeigt beispielhaft Chromatogramme einer Leermatrixprobe (PBS) sowie einer mit Sulfadiazin und Sulfamerazin dotierten Probe.

## Material und Methoden



**Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme von einer Leermatrixprobe (oben) sowie einer sulfonamidhaltigen Probe (600 ng/ml) (unten) im gleichen Zeitintervall; der Pfeil markiert jeweils den Peak des Analyten; SDZ: Sulfadiazin; SMR: Sulfamerazin.**

### **Linearität**

Eine Methode ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear, wenn das Messsignal direkt proportional zu der Analytkonzentration in der Probe ist (KROMIDAS 1999).

Gemäß DIN 38402 (1986) wurde die Linearität überprüft. Hierzu wurden mindestens fünf Leermatrixproben mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Analyten dotiert. Die gewählten Konzentrationen waren äquidistant und deckten den gesamten Messbereich ab. Pro Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Werte unterhalb der Nachweisgrenze von Sulfadiazin (0,1 µg/ml) wurden nicht in die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung mit einbezogen. Die Linearität war für alle untersuchten Sulfonamide im Bereich von 0,1 µg/ml bis 10 µg/ml gegeben.

### **Detektions- und Quantifizierungsgrenze**

Die **Detektionsgrenze** (Limit of detection, LOD) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten, die vom Instrumentensignal einer Leermatrix unterschieden werden und damit qualitativ identifiziert werden kann. Ihre Bestimmung erfolgte mittels Kalibrationskurvenmethode nach DIN 32645 (1994).

Die **Quantifizierungsgrenze** (Limit of quantification, LOQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Analyten, die mit gegebener Präzision und Richtigkeit gerade noch detektiert werden kann (KROMIDAS 1999; DIN 32645 1994). In Tabelle 3 werden die Detektions- und Quantifizierungsgrenzen der Analyten aufgeführt.

**Tabelle 3: Detektions- und Quantifizierungsgrenzen der Analyten; SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; ; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.**

	SA	STZ	SMPD	SCY	SMZ	SMR	SMX	SDZ	SDM
Detektionsgrenze [µg/ml]	0,13	0,09	0,08	0,04	0,10	0,03	0,03	0,09	0,05
Quantifizierungsgrenze [µg/ml]	0,25	0,19	0,15	0,1	0,20	0,1	0,1	0,1	0,1

### **Richtigkeit**

Die Richtigkeit einer Methode charakterisiert das Maß für die Abweichung vom erwarteten Referenzwert und den ermittelten Messergebnissen. Sie wurde anhand einer chromatographischen Quantifizierung von dotierten Leermatrixproben der höchsten (High quality control standard, HQS) sowie der niedrigsten (Low quality control standard, LQS) Kalibrationskonzentration an drei verschiedenen Tagen bestimmt. Abweichungen vom erwarteten Wert um bis zu 15 % bei der HQS und um bis zu 20 % bei der LQS gelten als vertretbar. Die untersuchten Konzentrationen von Sulfadiazin und Sulfamerazin unterliegen Schwankungen der LQS < 20 % und der HQS < 15 % vom Mittelwert. Damit ist die Richtigkeit für die zu untersuchten Analytenkonzentrationen gegeben.

### **Präzision bzw. Reproduzierbarkeit**

Unter Präzision versteht man das Maß der Übereinstimmung zwischen wiederholten Messungen unter identischen Bedingungen. Man unterscheidet zwischen der Wiederholpräzision (Tagespräzision, Intraday batch reproducibility) und der Zwischenpräzision (Interday batch reproducibility).

Zur Überprüfung der Präzision bzw. Reproduzierbarkeit wurden HQS und LQS an drei verschiedenen Tagen chromatographisch quantifiziert. Die Berechnung erfolgte in Anlehnung an (HERBOLD u. SCHMITT 2000).

Dabei waren Abweichungen der HQS bis 10 % und der LQS bis 20 % vom gemessenen Mittelwert zulässig (LINDNER u. WAINER 1998). Die Prüfungsergebnisse der Intra- und Interday-Präzision von Sulfadiazin und Sulfamerazin erfüllten diese Voraussetzungen, somit war die Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode gegeben.

### **Stabilität der Analyten**

Die Stabilität der Analyten war bei einer lichtgeschützten Lagerung bei 4 °C für die gesamte Versuchsdauer gegeben.

### **3.2.5 Statistische Auswertung:**

Die statistische Auswertung des MTS-Vitalitätsassays und des Kristallviolett-Proliferationassays erfolgte mit dem Friedmann-Test sowie dem Dunns-Post-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P < 0,05$ . Als Software diente GraphPadPrism 5.01 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, USA).

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 *In-vitro*-Experimente

##### 4.1.1 Photooxidationsversuche

###### 4.1.1.1 UVA/UVB-Bestrahlung

Die Bestrahlung von Sulfonamiden mit künstlichem UVA/UVB-Licht führte zu einer unterschiedlich starken Degradation der Sulfonamide (siehe Abbildung 12). Schnell (binnen 4 h) und fast vollständig abgebaut wurden nach UVA/UVB-Bestrahlung Sulfathiazol und Sulfanilamid. Sulfamethoxypyridazin und Sulfachloropyridazin waren nach 6 h zu etwa 70% degradiert. Sulfadiazin, Sulfamethoxazol, Sulfamethazin, Sulfadimethoxin sowie Sulfamerazin waren binnen 6 h um lediglich 20–30% abgebaut.

Während der Bestrahlung mit künstlichem UVA/UVB-Licht verfärbten sich die ansonsten farblosen Sulfonamidlösungen in den Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml. Bei der Sulfanilamidlösung kam es nach zweistündiger Bestrahlung zu einem violetten Farbumschlag. Sulfathiazol verfärbte sich nach zwei Stunden gelb. Nach etwa dreistündiger UVA/UVB-Licht-Exposition nahmen ebenfalls die Lösungen von Sulfamethoxazol, Sulfachloropyridazin und Sulfamethoxypyridazin eine gelbliche Farbe an. Die Lösungen von Sulfamethazin, Sulfamerazin, Sulfadiazin und Sulfadimethoxin blieben farblos. Die Mittelwerte der Degradation sind prozentual in Tabelle 4 dargestellt.



# Ergebnisse

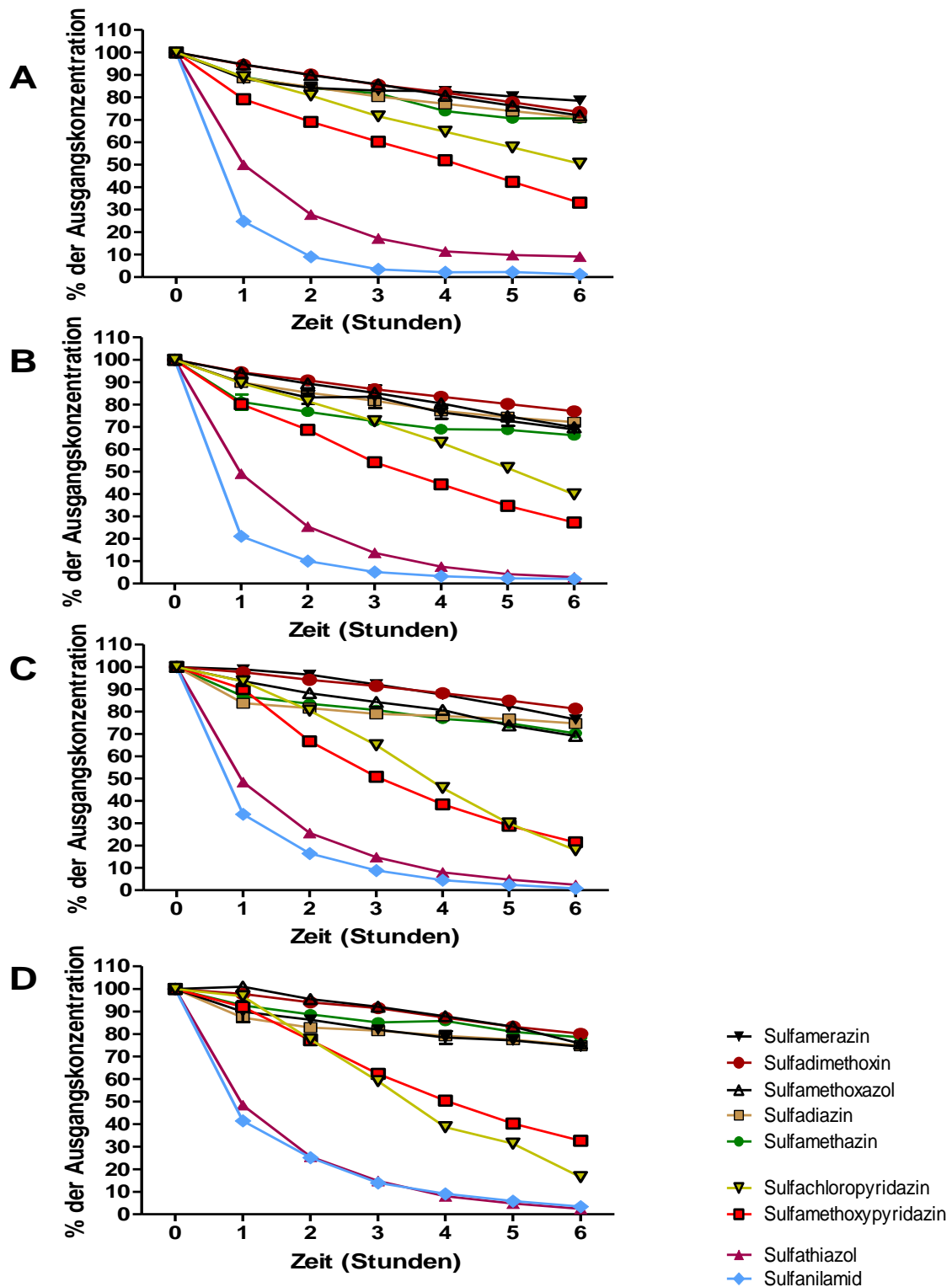


Abbildung 12: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS über 6 Stunden bei Bestrahlung mit künstlichem UVA/UVB-Licht. Die Ausgangskonzentrationen der unbestrahlten Proben betragen 5 µg/ml (A), 10 µg/ml (B), 50 µg/ml (C) und 100 µg/ml (D) (= 100%).

#### 4.1.1.2 Feldversuch

Die durch Bestrahlung mit Tageslicht unter Feldbedingungen erzeugte Degradation verlief analog zur Bestrahlung mit künstlichem UVA/UVB-Licht, jedoch erfolgte der Photoabbau verlangsamt (siehe Abbildung 13).

Nach zweitägiger Tageslichtexposition konnte eine beginnende Gelbverfärbung der Lösungen von Sulfachloropyridazin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol festgestellt werden. Die Gelbfärbung der Lösungen von Sulfamethoxyypyridazin sowie von Sulfadiazin erfolgte nach dreitägiger Tageslichtbestrahlung. Die Sulfonamidlösung verfärbte sich nach fünftägiger natürlicher Bestrahlung weinrot. Die Sulfathiazollösung wies nach sieben Tagen unter natürlichem Tageslicht eine hellbraune/gelbliche Farbe auf.

Die Sulfamerazin- und Sulfadimethoxinlösungen blieben während der gesamten Expositionsdauer unverändert farblos.

Die Degradation binnen siebentägiger Tageslichtexposition unter Feldbedingungen ist prozentual in Tabelle 4 dargestellt.

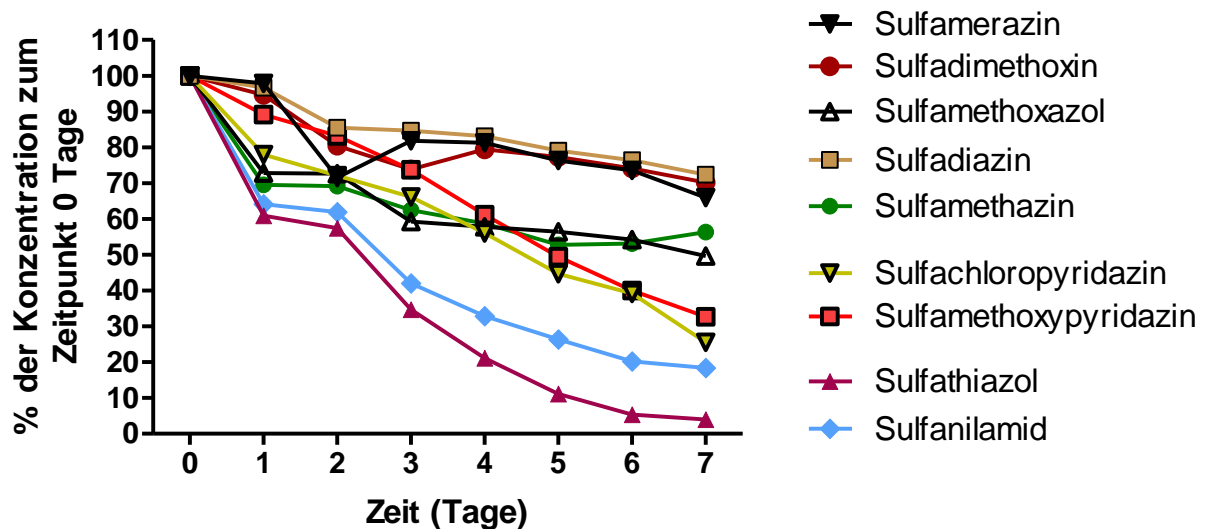


Abbildung 13: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS bei 7-tägiger Bestrahlung unter Feldbedingungen (Tageslicht). Die Ausgangskonzentrationen der unbestrahlten Proben betragen 100 µg/ml.

### 4.1.1.3 UVA-Bestrahlung

Die Degradation, die unter sowohl künstlichem UVA/UVB-Licht (Abbildung 12) als auch natürlichem Tageslicht-Licht auftrat (Abbildung 13), wurde bei Bestrahlung mit UVA-Licht nicht beobachtet. Hier wurden Sulfathiazol und Sulfanilamid nur geringgradig abgebaut und lediglich Sulfachloropyridazin und Sulfamethoxyipyridazin zeigten eine verstärkte Abbaurrate (Abbildung 14).

Bezüglich der Farbveränderungen der Lösungen konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Die Sulfanilamidlösung mit der Konzentration 100 µg/ml verfärbte sich nach zweistündiger UVA-Bestrahlung violett. In der Konzentration 10 µg/ml konnte diese Veränderung nicht beobachtet werden. Ähnlich verhielten sich die Lösungen von Sulfamethoxyipyridazin. Bei der Konzentration von 100 µg/ml erfolgte eine gelbliche Verfärbung nach drei Stunden, während bei einer Konzentration von 10 µg/ml kein Farbumschlag erfolgte. Die Lösung von Sulfathiazol verfärbte sich in der Konzentration 10 µg/ml nach dreistündiger UVA-Licht Exposition hellgelb. Bei den restlichen Sulfonamiden konnte in dieser Konzentration keine Farbveränderung nachgewiesen werden. Die Degradation binnen sechsständiger Bestrahlung mit künstlichem UBA-Licht ist prozentual in Tabelle 4 dargestellt.

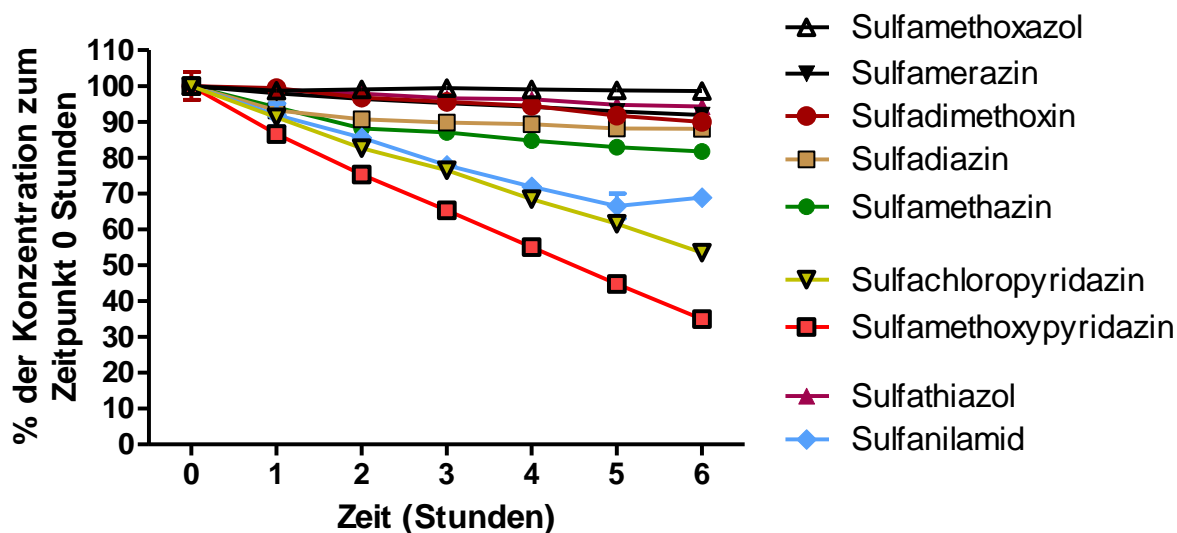


Abbildung 14: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS über 6 Stunden bei Bestrahlung mit künstlichem UVA-Licht. Die Ausgangskonzentrationen der unbestrahlten Proben betragen 10 µg/ml.

Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der Sulfonamiddegradation nach Bestrahlung mit verschiedenen UV-Licht-Quellen.

## Ergebnisse

1): Darstellung der Mittelwerte der Degradation nach einer Bestrahlung mit künstlichem UVA/UVB-Licht. Die Bestrahlung erfolgte über sechs Stunden in vier verschiedenen Sulfonamidkonzentration (5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml).

2): Darstellung der Degradation nach einer siebentägigen Bestrahlung unter Feldbedingungen mit Tageslicht. Die ursprüngliche Konzentration betrug 100 µg/ml.

3): Darstellung der Degradation nach einer sechsstündigen Bestrahlung mit künstlichem UVA-Licht. Die ursprüngliche Konzentration betrug 10 µg/ml.

	<b>UVA/UVB- Bestrahlung <sup>1)</sup></b> <b>Durchschnittliche Degradation</b> <b>[ % ]</b>	<b>Feldversuch <sup>2)</sup></b> <b>Degradation</b> <b>[ % ]</b>	<b>UVA- Bestrahlung <sup>3)</sup></b> <b>Degradation</b> <b>[ % ]</b>
<b>Sulfanilamid</b>	98,1	81,6	31,1
<b>Sulfathiazol</b>	95,8	96,0	5,7
<b>Sulfamethoxypyridazin</b>	71,4	67,3	65,1
<b>Sulfachloropyridazin</b>	68,8	74,5	46,5
<b>Sulfamethazin</b>	28,6	43,7	18,3
<b>Sulfamethoxazol</b>	28,4	50,4	1,4
<b>Sulfadiazin</b>	26,9	27,7	12,0
<b>Sulfamerazin</b>	25,9	34,0	8,1
<b>Sulfadimethoxin</b>	22,0	29,9	10,1

### 4.1.2 MTS-Vitalitätsassay

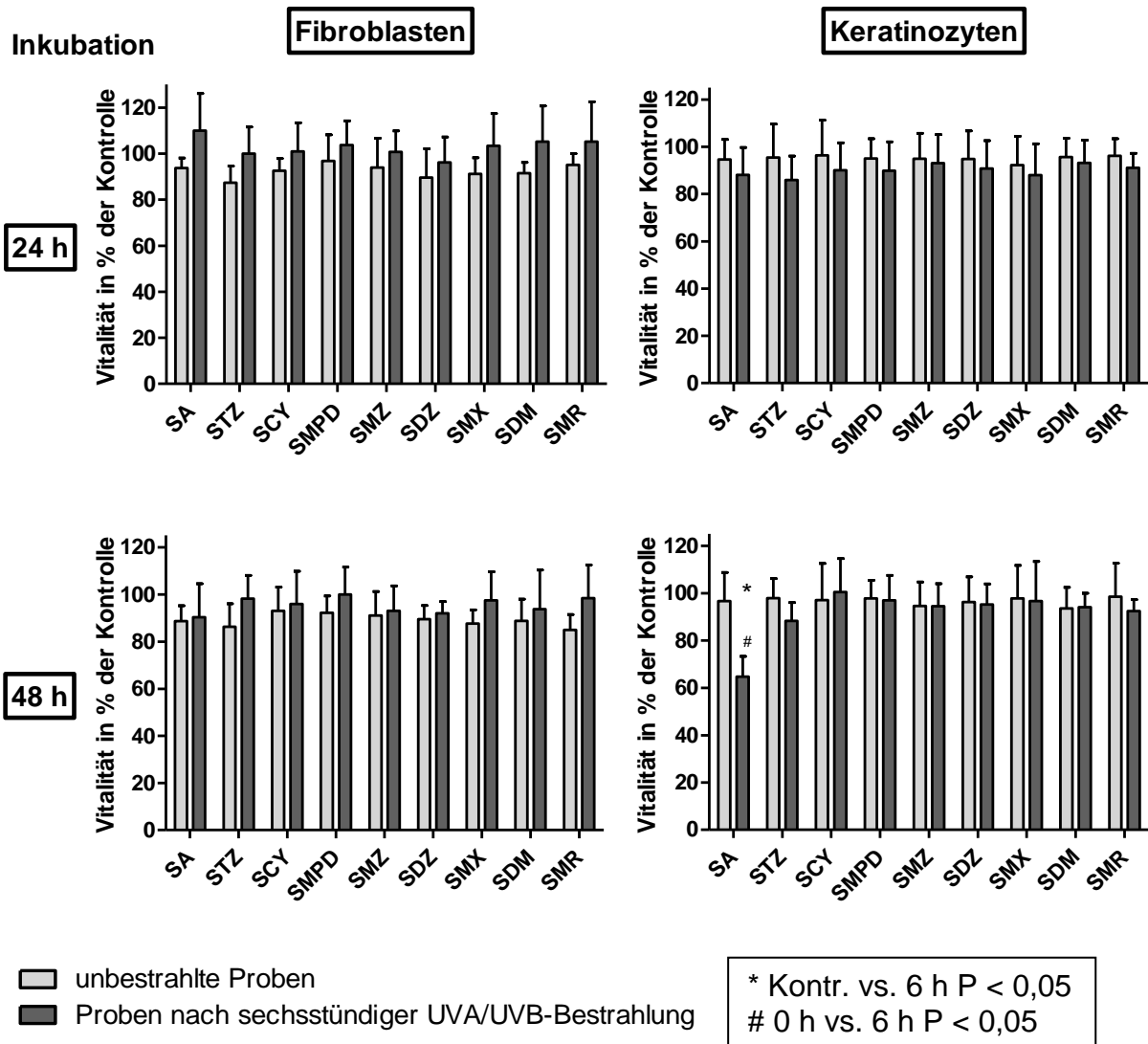
Zur Überprüfung des Einflusses der Sulfonamide und ihrer Photooxidationsprodukte auf die Zellvitalität wurden die Keratinozyten sowie die Fibroblasten zunächst in der Verdünnung 1:3 (entspricht 25 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz) behandelt. Bis zur Erzielung eines deutlichen Effekts wurden nachfolgend die Behandlungseinheiten auf 1:2 (entspricht 33,3 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz) und daran anschließend auf 1:1 (entspricht 50 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz) hinaufkonzentriert.

Die Keratinozyten sowie die Fibroblasten wurden zunächst in der Verdünnung 1:3 (entspricht einem Zusatz von 25 µl der unbestrahlten Sulfonamidausgangslösung bzw. des Photooxidationsproduktes (s. 4.1.1.1) und 75 µl Zellkulturmedium pro Well) behandelt. Die Inkubationszeit betrug 24 und 48 Stunden. In Abbildung 15 ist die Auswirkung der einzelnen Sulfonamide auf die Zellvitalität im Vergleich zur Medium-Kontrolle (= 100%) dargestellt. Es zeigte sich, dass die einzelnen Substanzen in der Verdünnung 1:3 appliziert keinen negativen Effekt auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten hatten.

Die Photooxidationsprodukte von Sulfanilamid hingegen führten nach 48-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Reduktion der Keratinozytenvitalität.

## Ergebnisse

### Verdünnung 1:3 (25 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)



**Abbildung 15:** Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:3 auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n=6).

SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

In Abbildung 16 ist der Effekt der einzelnen Sulfonamide, aufgetragen in der Verdünnung 1:2 (entspricht einem Zusatz von 33,3 µl der Sulfonamidausgangslösung bzw. des Photooxidationsproduktes (s. 4.1.1.1) und 66,6 µl Zellkulturmedium pro Well) auf die Zellvitalität dargestellt. Analog zur Verdünnungsstufe 1:3 ließ sich auch hier keine zytotoxische Wirkung erkennen.

## Ergebnisse

Nach jeweils 48-stündiger Inkubation des Photooxidationsproduktes von Sulfanilamid konnte analog zur Verdünnung 1:3 eine signifikant verminderte Vitalität der Keratinozyten gezeigt werden.

### Verdünnung 1:2 (33,3 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

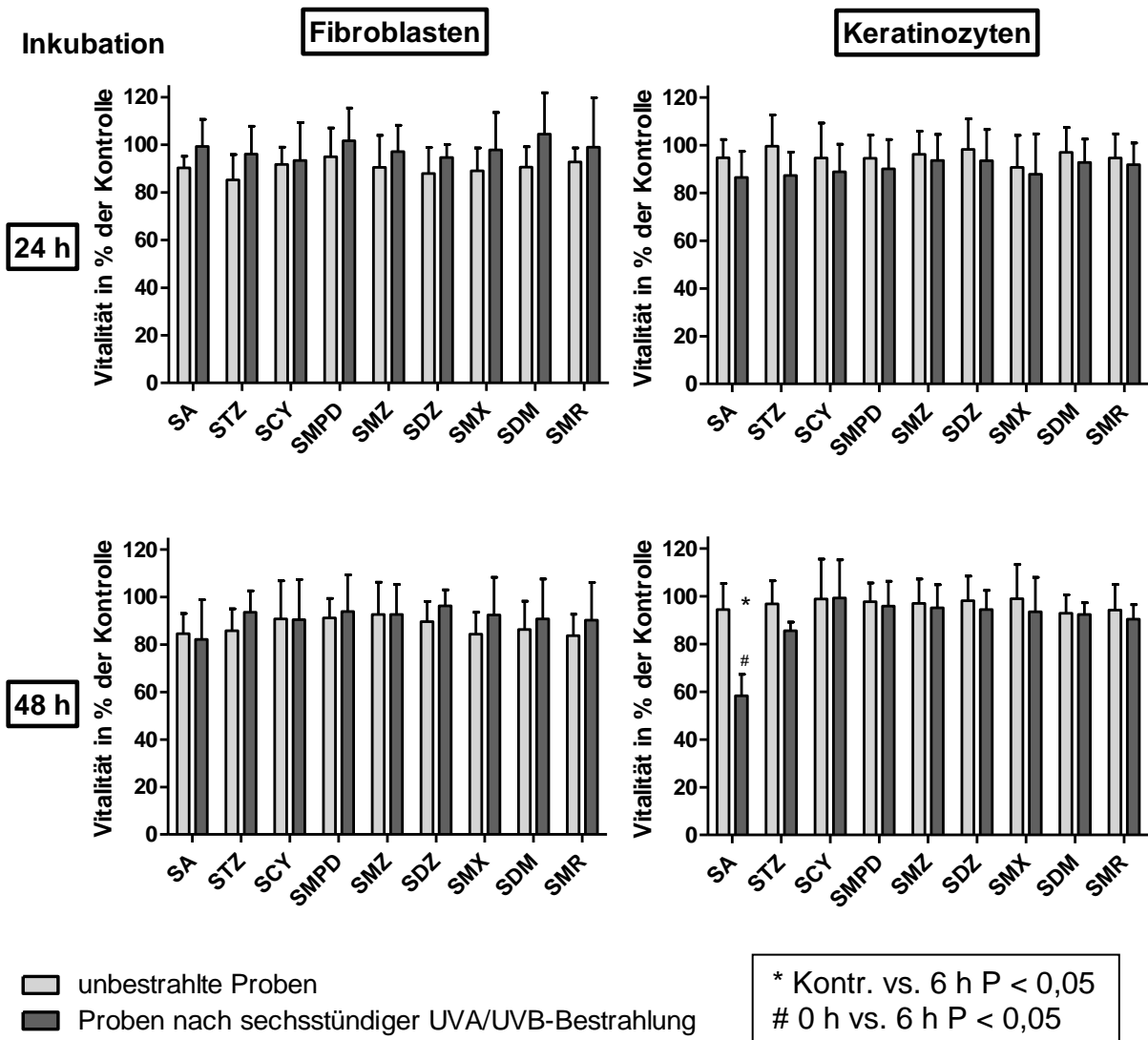


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:2 auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n=6).

SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

## Ergebnisse

Für alle getesteten Substanzen galt, dass die Photooxidationsprodukte in einer Verdünnung von 1:1 eine deutliche Abnahme der Zellvitalität im Zytotoxizitätstest zeigten (Abbildung 17). Die Verdünnung 1:1 entspricht einem Zusatz von 50 µl der unbestrahlten Sulfonamidausgangslösung bzw. des Photooxidationsproduktes (s. 4.1.1.1) und 50 µl Zellkulturmedium pro Well. Signifikante Unterschiede waren bei allen bestrahlten Analyten versus der Kontrolle vorhanden. Die Ausnahme bildeten die Photooxidationsprodukte von Sulfamethazin und Sulfadimethoxin, die die Zellvitalität der Keratinozyten nach 24-stündiger Inkubation und von Sulfadiazin nach 48-stündiger Inkubation nicht signifikant beeinflussten.

Photooxidiertes Sulfonamid wies bei beiden Zellarten und Inkubationszeiten einen signifikanten Unterschied zu den unbestrahlten Sulfonamidproben auf, was auch auf Sulfamethazin und Sulfadiazin zutraf.



## Ergebnisse

### Verdünnung 1:1 (50 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

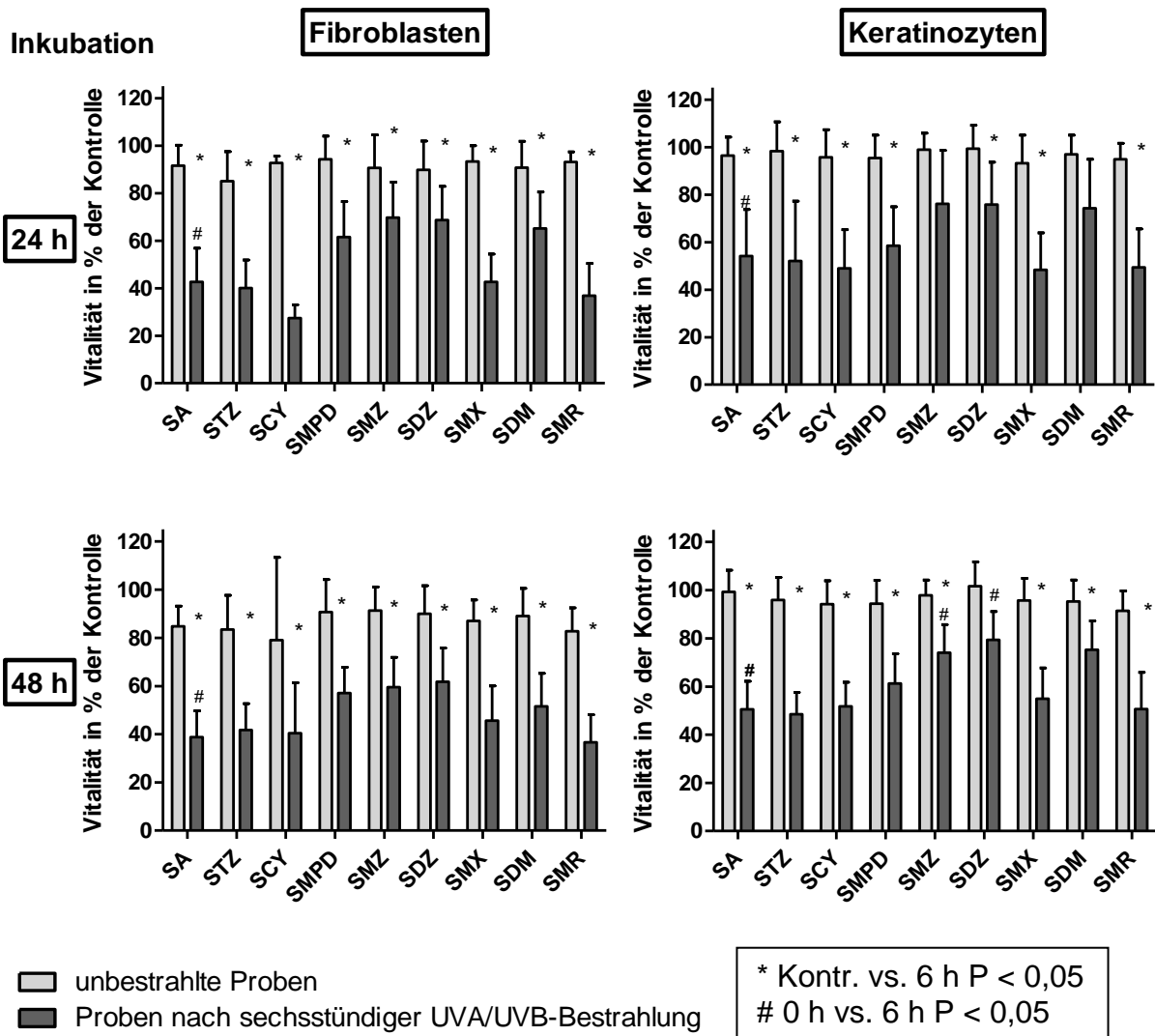


Abbildung 17: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:1 auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n=6).

SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

#### 4.1.3 Kristallviolett-Proliferationstest

Zur Untersuchung des Effektes der Sulfonamide und ihrer Photooxidationsprodukte auf die Zellproliferation wurden die Keratinozyten sowie die Fibroblasten zunächst in der Verdünnung 1:3 (entspricht 25 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

## Ergebnisse

behandelt. Nachfolgend wurden die Zellen in der Verdünnung 1:1 (entspricht 50 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz) behandelt, da dort analog zum MTS-Test eine deutliche Beeinflussung der Zellaktivität zu erwarten war.

Die Keratinozyten sowie die Fibroblasten wurden in der Verdünnung 1:3 (entspricht einem Zusatz von 25 µl der Sulfonamidausgangslösung bzw. des Photooxidationsproduktes (s. 4.1.1.1) und 75 µl Zellkulturmedium pro Well) mit den unbestrahlten Sulfonamiden sowie den Photooxidationsprodukten behandelt. Unbestrahltes Sulfanilamid und Sulfathiazol bewirkten nach 24-stündiger Inkubationsdauer bei den Keratinozyten eine geringfügig gesteigerte Zellproliferation (110%), allerdings in Verbindung mit einer hohen Standardabweichung. Die Photooxidationsprodukte von Sulfathiazol und Sulfachloropyridazin führten zu einer signifikanten Reduktion der Fibroblastenproliferation, während die Photooxidationsprodukte von Sulfamethoxypyridazin und ebenfalls von Sulfachloropyridazin und eine signifikante Reduktion der Keratinozytenproliferation aufwiesen. Nicht-photooxidiertes Sulfamethoxypyridazin bewirkte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine signifikante Reduktion der Keratinozytenproliferation im Vergleich zur Kontrolle.

Die Effekte der Sulfonamide auf das Proliferationsverhalten der Keratinozyten nach 48-stündiger Inkubation waren den Auswirkungen nach 24-stündiger Inkubation ähnlich. Die gesteigerte Keratinozytenproliferation nach Applikation von Sulfanilamid und Sulfathiazol reduzierte sich jedoch auf etwa 95 % (Standardabweichung 17 %). In Abbildung 18 ist die Auswirkung der einzelnen Sulfonamide auf die Zellproliferation im Vergleich zur Medium-Kontrolle dargestellt.

Verdünnung 1:3 (25 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

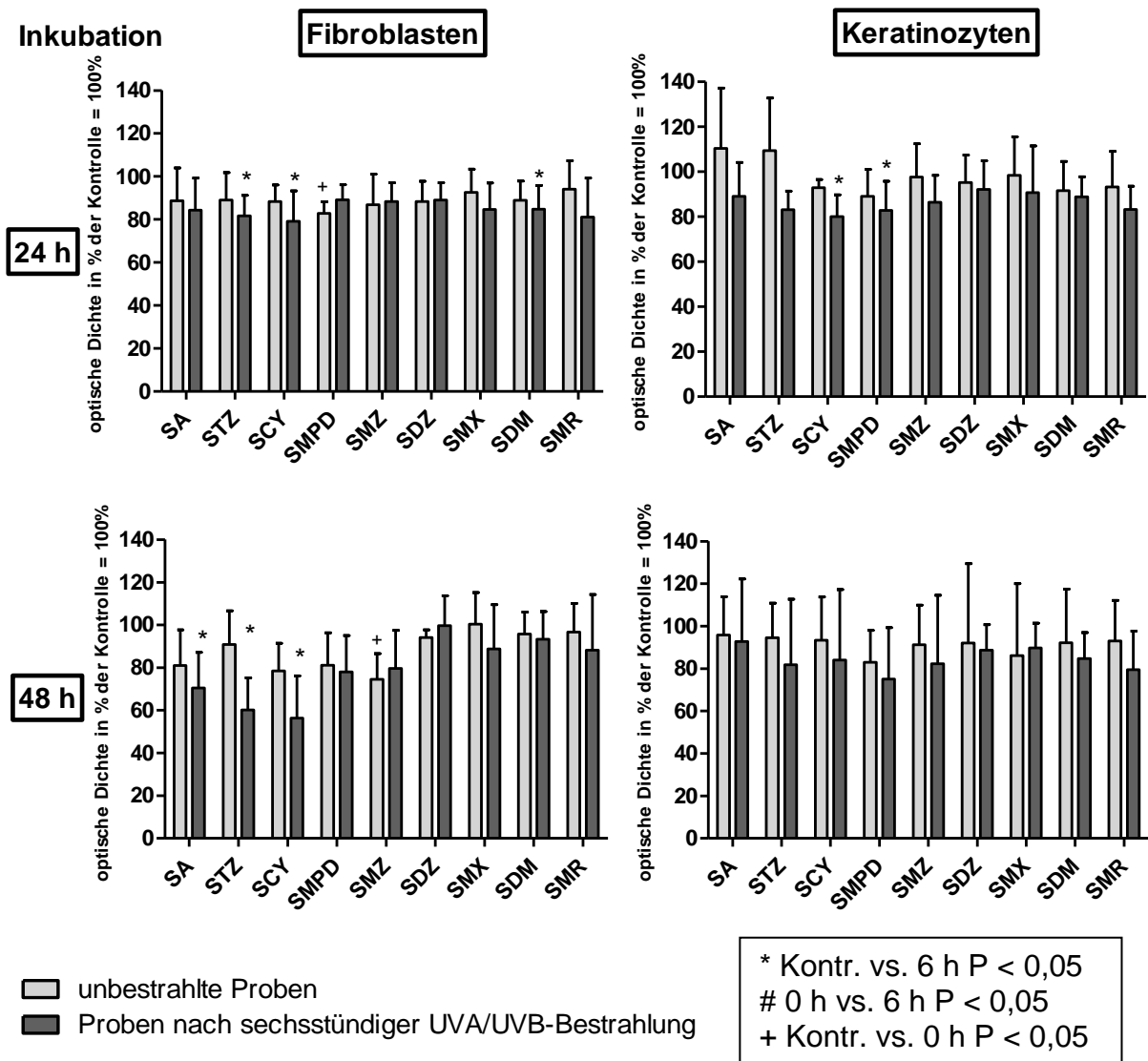


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:3 auf die Zellproliferation von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n=6).

SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

Für alle getesteten Substanzen galt, dass die Photooxidationsprodukte in einer Verdünnung von 1:1 eine deutliche Abnahme der Zellproliferation im Kristallviolettassay zeigten. Die Verdünnung 1:1 entspricht einem Zusatz von 50 µl der Sulfonamidausgangslösung bzw. des Photooxidationsproduktes (s. 4.1.1.1) und

## Ergebnisse

50 µl Zellkulturmedium pro Well. Signifikante Unterschiede waren bei allen bestrahlten Analyten versus der Kontrolle (= 100%) vorhanden. Die Ausnahme bildete das Photooxidationsprodukt von Sulfanilamid, das die Zellproliferation der Keratinozyten verstärkte.

Die Photooxidationsprodukte von Sulfamethazin und Sulfamerazin konnten die Zellproliferation von Fibroblasten nach 24-stündiger Inkubation nicht signifikant beeinflussen.

Photooxidiertes Sulfanilamid sowie Sulfadiazin wiesen eine signifikant reduzierte Fibroblastenproliferation im Vergleich zu den nicht-photooxidierten Analyten auf.

Nach einer 48-stündigen Inkubationsdauer bewirkten alle Analyten allgemein eine gering- bis mittelgradige Abnahme der Fibroblastenproliferation. Eine signifikante Reduktion war bei allen bestrahlten Analyten vs. der Kontrolle vorhanden mit Ausnahme des bestrahlten Sulfamethazins.

Die Photooxidationsprodukte von Sulfachloropyridazin, Sulfamethoxy-pyridazin, Sulfamethoxazol, Sulfadimethoxin und Sulfamerazin beeinflussten das Proliferationsverhalten der Keratinozyten nach 48-stündiger Inkubation signifikant.

Photooxidiertes Sulfathiazol wies eine signifikant reduzierte Fibroblastenproliferation im Vergleich zu dem nicht-photooxidierten Analyten auf, photooxidiertes Sulfanilamid hingegen eine signifikant gesteigerte Fibroblastenproliferation im Vergleich zum nicht-photooxidierten Sulfanilamid.

In Abbildung 19 ist der Effekt der einzelnen Sulfonamide, aufgetragen in der Verdünnung 1:1, auf die Zellproliferation dargestellt.

Verdünnung 1:1 (50 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

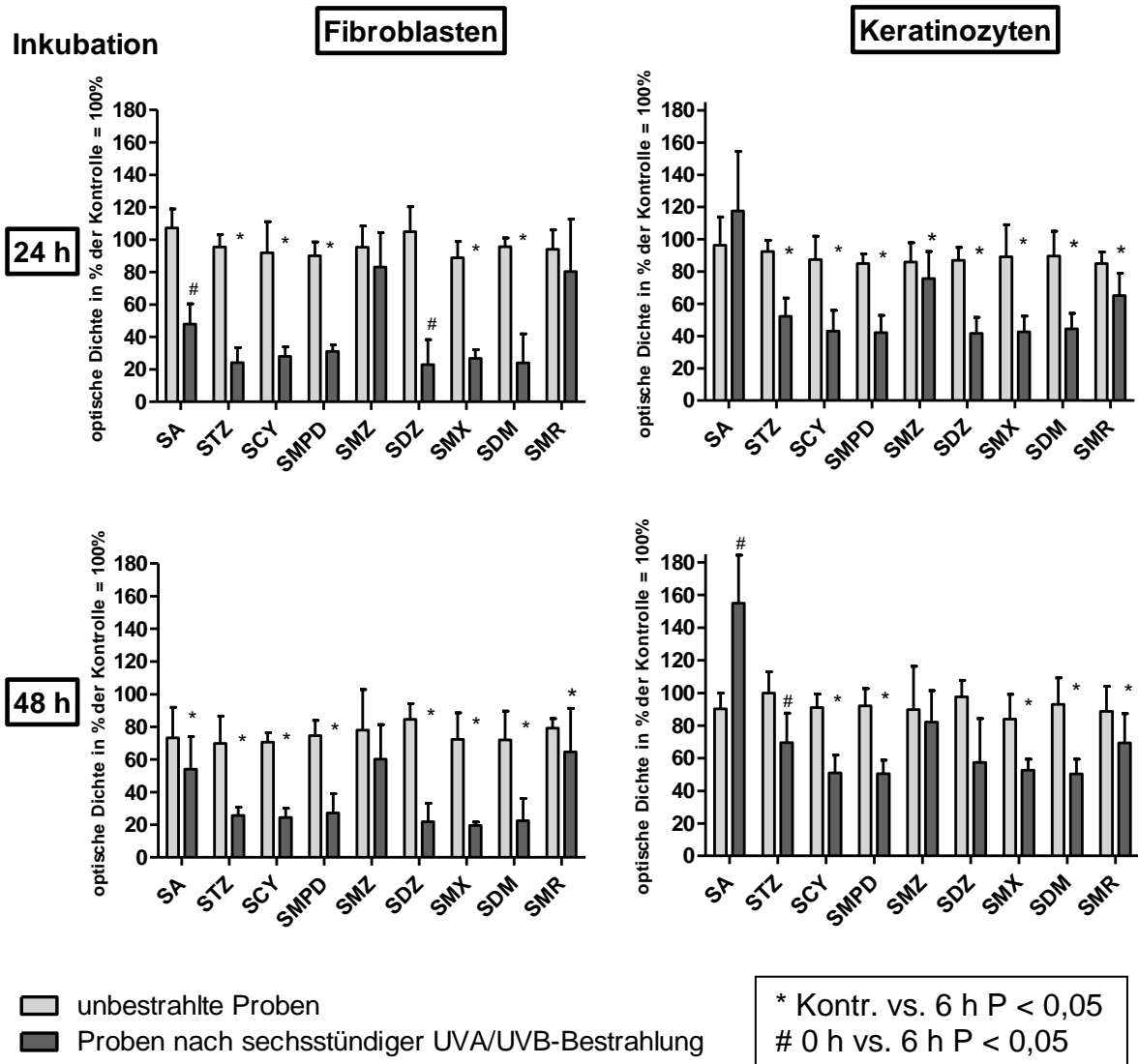


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:1 auf die Zellproliferation von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n=6).

SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

#### 4.1.4 Antibakterielle Aktivität (Brillantschwarz-Reduktionstest)

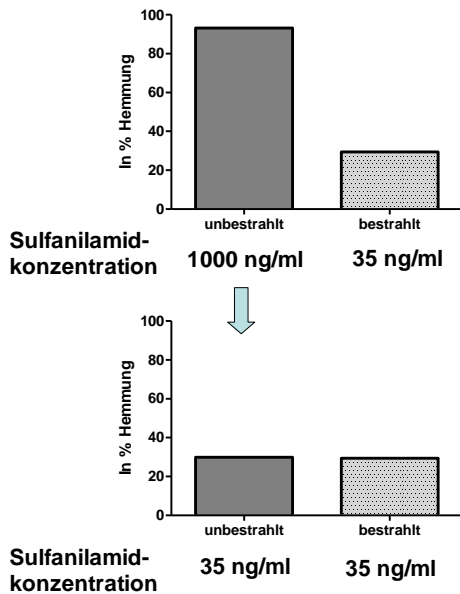
Es zeigte sich, dass die Sulfonamidlösungen, die binnen 6-stündiger UVA/UVB-Bestrahlung hochgradig abgebaut wurden, eine entsprechend verringerte antibakterielle Aktivität aufwiesen.

## Ergebnisse

Da durch die Photooxidation die Ausgangssubstanz nachweisbar degradiert wurde (siehe 4.1.1.1), war die Abnahme der antibakteriellen Aktivität zu erwarten. Zur Überprüfung des antimikrobiellen Effekts der Photooxidationsprodukte wurde daher die Konzentration der unbestrahlten Ausgangssubstanz auf die Konzentration des verbleibenden nicht degradierten Sulfonamids nach sechsständiger Bestrahlung angeglichen.

Dies wird hier am Beispiel von Sulfanilamid erläutert: Die ursprüngliche Lösung enthielt vor der Photooxidation eine Sulfanilamidkonzentration von 100 µg/ml. Nach Photooxidation waren hiervon degradationsbedingt nur noch 3,5 µg/ml in der Lösung enthalten. Da diese Konzentrationen für den BRT zu hoch waren, war es notwendig, die Lösungen auf 1000 ng/ml und die bestrahlte Lösung dementsprechend auf 35 ng/ml herunterzuverdünnen. Wurden nun unbestrahlte Lösung vs. bestrahlte Lösung auf das Testsystem appliziert, war aufgrund der geringeren Sulfanilamidkonzentration von 35 ng/ml vs. der ursprünglichen Konzentration von 1000 ng/ml ein Rückgang des antibakteriellen Effektes der photooxidierten Sulfanilamidlösung zu erwarten. Unbestrahltes Sulfanilamid verursachte eine Hemmung von etwa 90% im Vergleich zu photooxidiertem Sulfanilamid mit einer Hemmung von etwa 30%. Aus diesem Grund wurde die Konzentration des Sulfanilamids in der nicht bestrahlten Lösung von 1000 ng/ml auf 35 ng/ml herabgesetzt, so dass sie der verbliebenen Sulfanilamidkonzentration in der bestrahlten Lösung entsprach. Wie sich nach anschließender vergleichender Applikation der beiden Lösungen auf den Testagar zeigte, verursachte unbestrahltes Sulfonamid in angeglichener Konzentration nun ebenfalls eine Hemmung von etwa 30%. Dies bedeutete, dass die Hemmung durch die verbleibende Sulfanilamidkonzentration von 35 ng/ml hervorgerufen wurde, die Photooxidationsprodukte aber keine antibakterielle Wirkung aufwiesen. Dies ist am Beispiel von Sulfanilamid in Abbildung 20 dargestellt.

## Ergebnisse



Antibakterieller Effekt von Sulfanilamid vor und nach Bestrahlung:  
Herabgesetzte antibakterielle Wirkung verursacht durch verminderte Sulfanilamidkonzentration nach Bestrahlung

Antibakterieller Effekt von Sulfanilamid vor und nach Bestrahlung bei angeglicherter Konzentration der unbestrahlten Ausgangssubstanz an die verbliebene Sulfanilamidkonzentration nach Bestrahlung:

**Die gebildeten Photoproducte weisen keine antibakterielle Aktivität auf.**

**Abbildung 20: Ergebnis des BRT für das im UVA/UVB-Photooxidationsversuch hochgradig degradierte Sulfanilamid. Oben ist die antibakterielle Aktivität des Sulfanilamids vor (dunkelgrau) und nach Photooxidation (hellgrau) dargestellt. Unten wurde die unbestrahlte Ausgangssubstanz (dunkelgrau) auf die verbleibende Sulfanilamidkonzentration nach Bestrahlung (hellgrau) angeglichen, um einen möglichen antibakteriellen Effekt der Photooxidationsprodukte darzustellen.**

Bei keinem der untersuchten Sulfonamide in der ursprünglichen Konzentration von 1000 ng/ml konnte ein antibakterieller Effekt der Photooxidationsprodukte detektiert werden. Analog zu Sulfanilamid war die prozentuale Hemmung des Testkeims nach Behandlung mit unbestrahlter Lösung in angeglicherter Konzentration vs. bestrahlter Lösung identisch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die Sulfonamide wurden außerdem in den Konzentrationen 100 ng/ml, 10 ng/ml sowie 1 ng/ml auf den Testagar appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass erwartungsgemäß mit sinkender Sulfonamidkonzentration die antibakterielle Wirkung der Sulfonamide abnahm.

Nach Angleichung der ursprünglichen Konzentration an die des Photooxidationsprodukts zeigte sich auch in den Verdünnungsstufen für jedes untersuchte Sulfonamid, dass keines der entstandenen Photooxidationsprodukte einen antimikrobiellen Effekt hatte.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der antibakteriellen Aktivität der Sulfonamide in den Konzentrationen 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml sowie 1 ng/ml.

## Ergebnisse

**Tabelle 5: Vergleich der antibakteriellen Hemmung der einzelnen Sulfonamide in Prozent. Für den Versuch wurde die Konzentration der unbestrahlten Ausgangssubstanz auf ihre verbleibende Konzentration nach Photooxidation angeglichen. Die Hemmung durch den Positivstandard Penicillin G entspricht 100%; SA: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyipyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.**

		Hemmung [%]								
Konz.		SA	STZ	SMPD	SCY	SMZ	SMR	SMX	SDZ	SDM
<b>1000 ng/ml</b>	<b>Unbestrahltes Sulfonamid</b>	93,1	84,9	94,71	83,2	88,8	91,8	93,3	77,3	87,7
	<b>Photooxidationsprodukt</b>	29,5	53,2	72,4	85,6	95,7	86,7	93,2	68,7	89,0
	<b>Unbestrahltes Sulfonamid angeglichen auf Restkonzentration nach Photooxidation</b>	30,0	51,6	68,6	85,1	94,6	88,4	97,2	68,3	88,7
<b>100 ng/ml</b>	<b>Unbestrahltes Sulfonamid</b>	61,7	72,8	76,0	61,8	69,8	60,9	77,5	70,5	81,8
	<b>Photooxidationsprodukt</b>	20,6	18,6	23,8	53,5	62,2	49,2	79,5	44,9	59,9
	<b>Unbestrahltes Sulfonamid angeglichen auf Restkonzentration nach Photooxidation</b>	19,5	11,7	27,4	45,3	65,9	51,6	77,8	40,1	63,8
<b>10 ng/ml</b>	<b>Unbestrahltes Sulfonamid</b>	46,6	21,0	43,2	38,1	35,2	24,5	39,6	24,2	14,9
	<b>Photooxidationsprodukt</b>	21,9	7,4	9,7	28,9	39,5	23,2	39,8	13,6	28,3
	<b>Unbestrahltes Sulfonamid angeglichen auf Restkonzentration nach Photooxidation</b>	21,1	7,3	14,0	29,6	40,9	20,2	38,9	13,0	30,9
<b>1 ng/ml</b>	<b>Unbestrahltes Sulfonamid</b>	39,1	14,7	12,1	10,2	15,0	13,5	17,5	13,4	10,5
	<b>Photooxidationsprodukt</b>	23,5	11,0	9,6	31,7	21,4	19,1	34,9	5,6	17,3
	<b>Unbestrahltes Sulfonamid angeglichen auf Restkonzentration nach Photooxidation</b>	25,6	8,5	9,0	26,1	18,7	21,7	31,8	6,1	16,0



## 4.2 In-vivo-Experimente

### 4.2.1 Mehlfütterung

#### 4.2.1.1 Plasma

Nach jeweils viertägiger Verabreichung von Sulfadiazin in den Konzentrationen 2,5 und 5 mg/kg KG (unterdosiert) sowie 25 mg/kg KG (bestimmungsgemäße Dosis) über Mehlfutter an sechs Schweine konnten bei jeder der Sulfadiazindosen messbare Plasmaspiegel detektiert werden.

Es wurden bei Fütterung der Dosis 2,5 mg SDZ/kg KG Konzentrationen von im Mittel 0,4–1,0 µg SDZ/ml Plasma erreicht, bei der Dosis 5 mg SDZ/kg KG Konzentrationen von 0,8–2,0 µg SDZ/ml Plasma. Bei Verabreichung der bestimmungsgemäßen Dosis von 25 mg SDZ/kg KG konnten Sulfadiazinkonzentrationen von 5,2–14,2 µg/ml Plasma detektiert werden. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse.

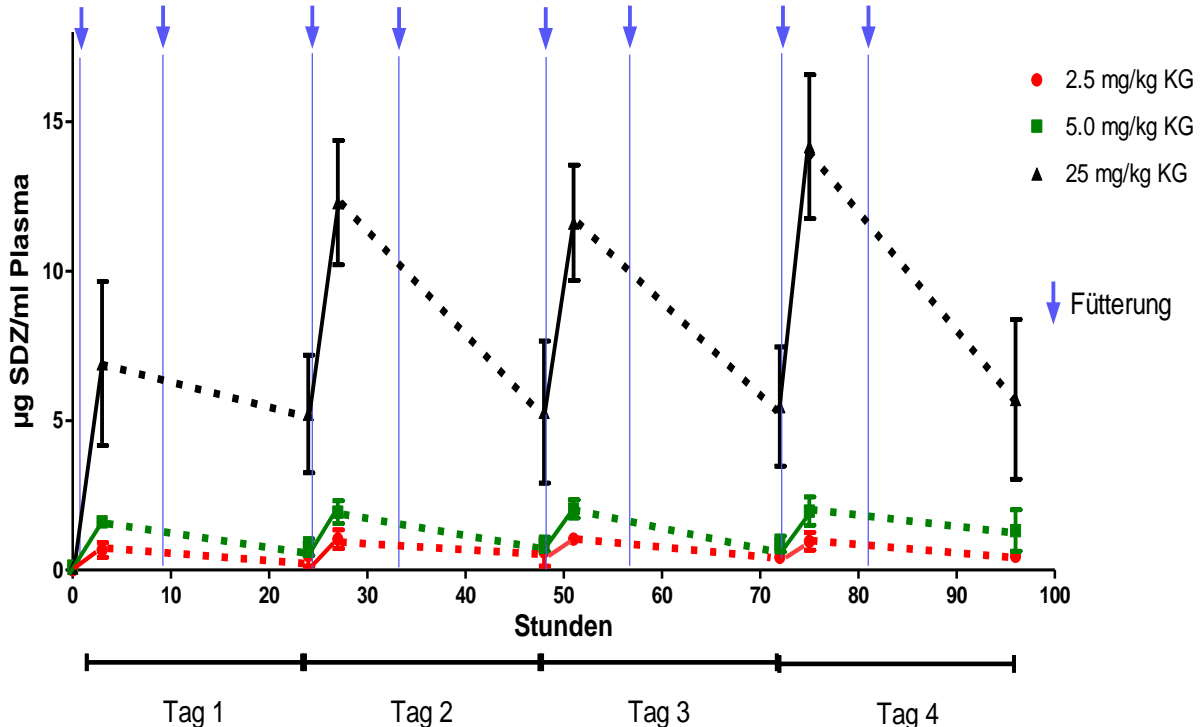


Abbildung 21: Plasmakonzentration von Sulfadiazin (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen) nach Mehlfütterung mit Sulfadiazin in den Dosen 2,5 mg/kg KG, 5 mg/kg KG und 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage.

## Ergebnisse

Nach der Behandlung mit 25 mg/kg KG wurden die Schweine ausgestallt, der Stall trocken gereinigt und anschließend unbehandelte Schweine eingestallt. Im Plasma der unbehandelten Schweine konnten über den Probenentnahmezeitraum von vier Tagen Sulfadiazinkonzentrationen bis etwa 0,1 µg/ml nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

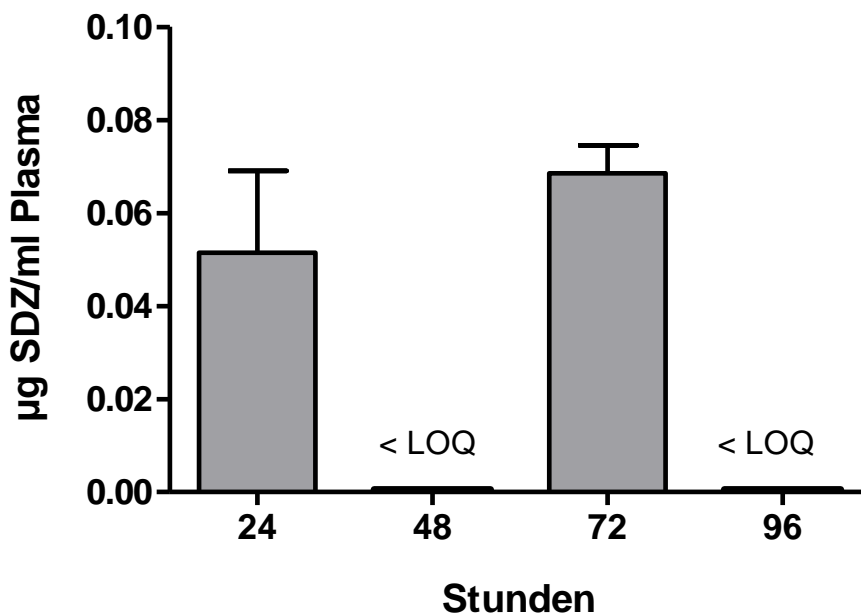


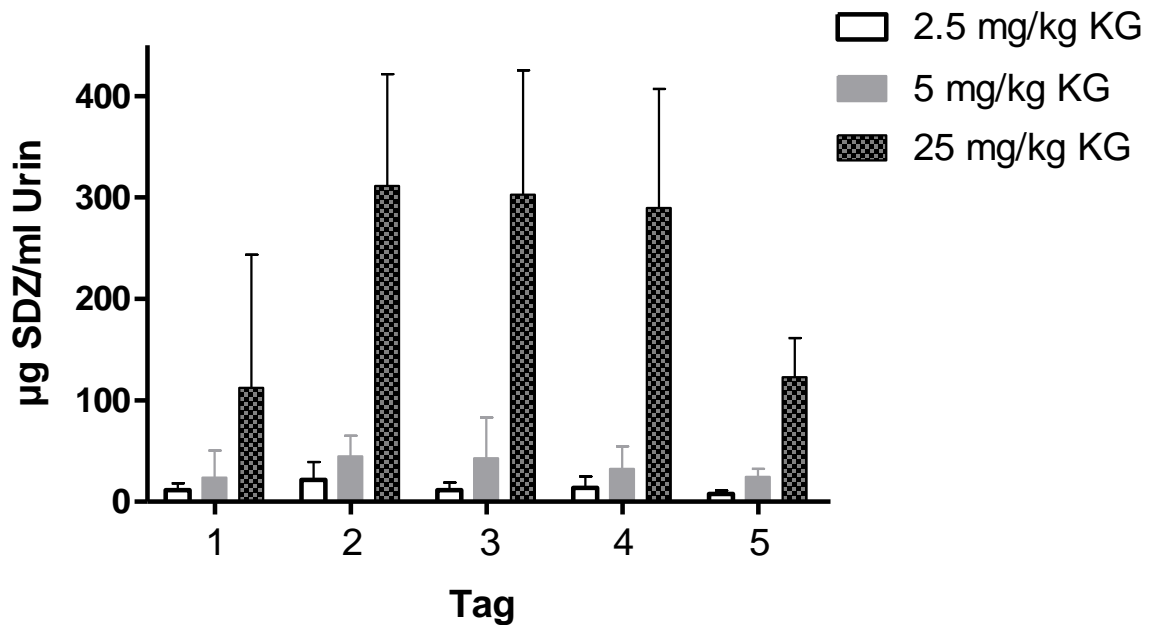
Abbildung 22: Plasmakonzentration von Sulfadiazin (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen) bei neu eingestellten unbehandelten Schweinen, nachdem die Tiere, die mit bestimmungsgemäßer Dosis behandelt worden sind, ausgestallt wurden; LOQ = 0,1 µg/ml.

### 4.2.1.2 Urin

Auch im Urin fanden sich dosisabhängig nachweisbare Mengen an Sulfadiazin, die in Abbildung 23 dargestellt sind.

Nach Applikation von 2,5 mg SDZ/kg KG konnten im Urin Sulfadiazinkonzentrationen von 7,7-21,5 µg/ml Urin nachgewiesen werden. Nach Verabreichung der Dosis von 5 mg/kg KG wurden 23,8-45,0 µg SDZ/ml, nach Fütterung der Dosis 25 mg/kg KG wurden 112,3-311,5 µg/ml im Urin detektiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 23: Sulfadiazin-Konzentration im Urin (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen) nach Mehlfütterung von 2,5 mg/kg KG, 5 mg/kg KG und 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage.**

Nach der Behandlung mit 25 mg/kg KG wurden die behandelten Tiere ausgestallt und unbehandelte Schweine neu eingestallt, deren Sulfadiazingehalt im Urin in Abbildung 24 dargestellt ist. Im Urin unbehandelter Schweine fand sich über den gesamten Probenentnahmezeitraum von sechs Tagen Sulfadiazin in abnehmenden Konzentrationen von 3,5 µg SDZ/ml Urin bis auf etwa 1 µg SDZ/ml Urin wieder.

## Ergebnisse

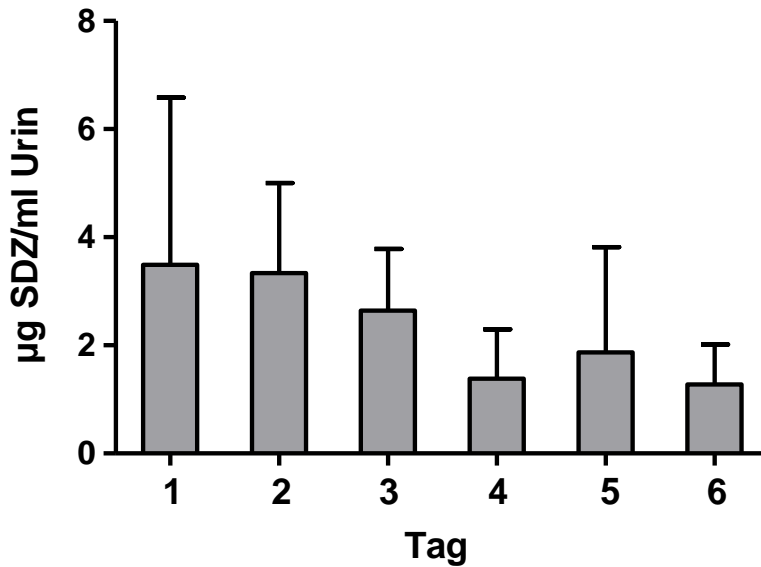


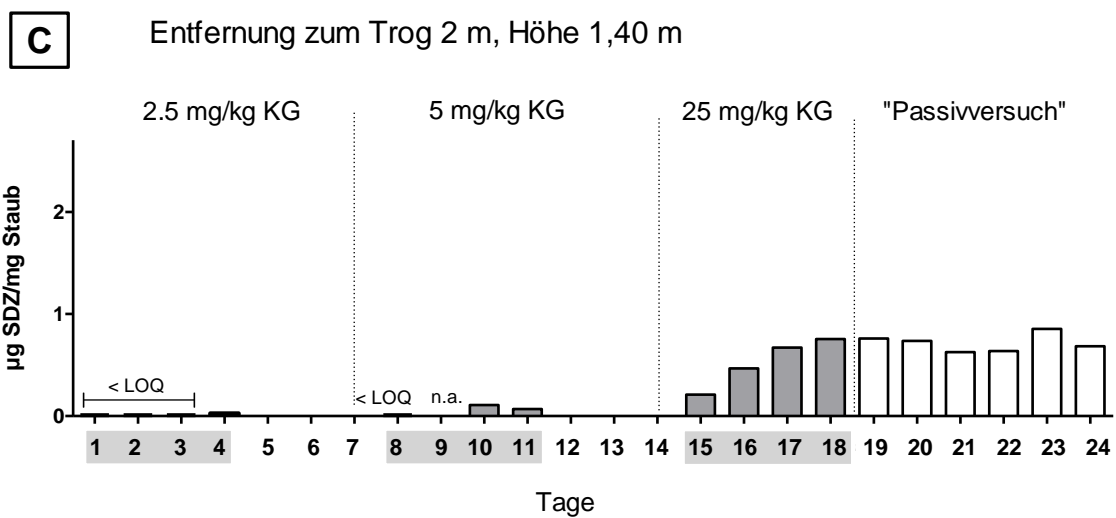
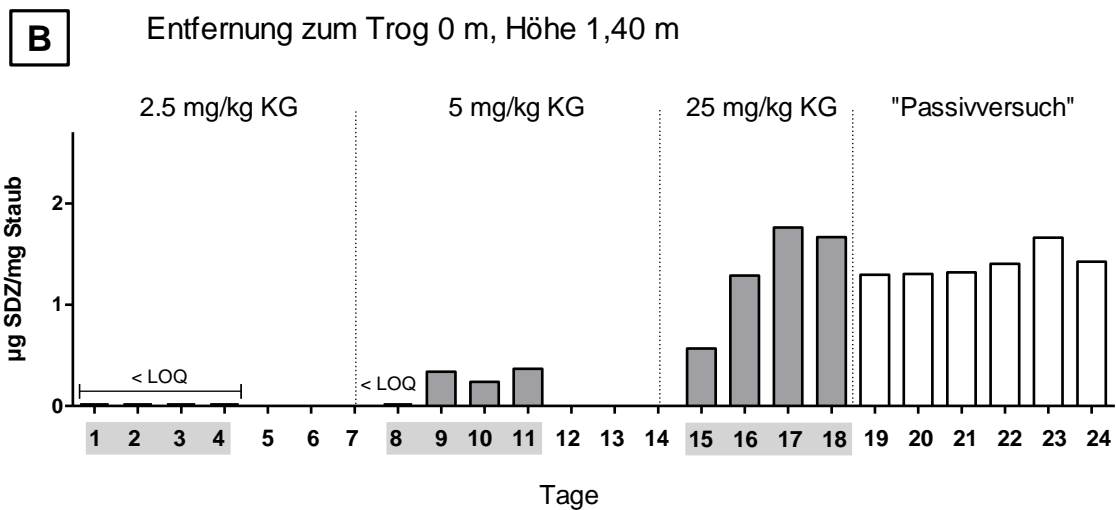
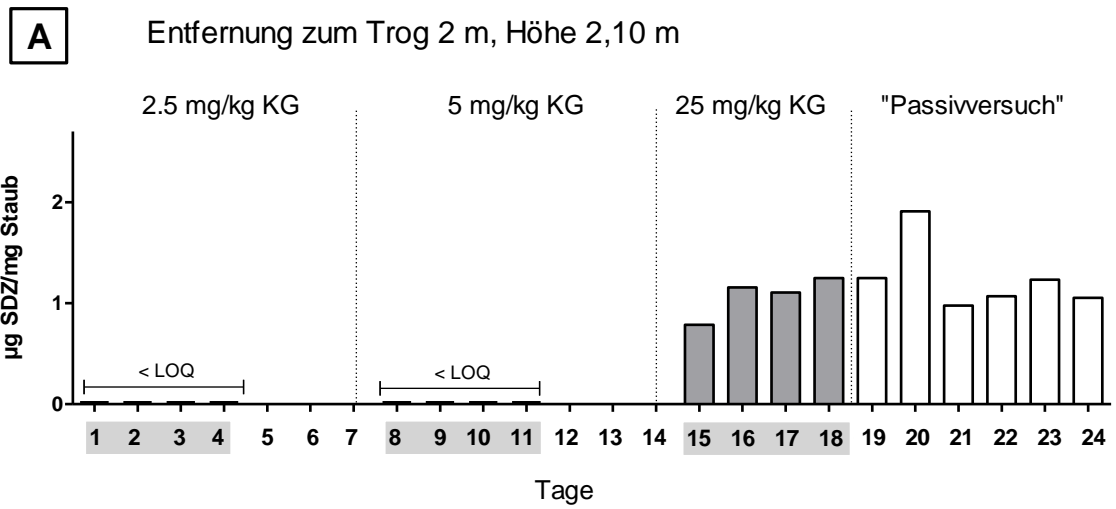
Abbildung 24: Urinkonzentration von Sulfadiazin (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen) bei neu eingestellten unbehandelten Schweinen, nachdem die Tiere, die mit bestimmungsgemäßer Dosis behandelt worden sind, ausgestallt wurden.

### 4.2.1.3 Sedimentationsstaub

Die Untersuchung von Sedimentationsstaubproben aus unterschiedlichen Bereichen des Stalles zeigte, dass sich während der Mehlfütterung innerhalb der Behandlungstage nachweisbare Mengen an Sulfadiazin im Staub befanden (Abbildung 25) Parallel zu jeder Dosiserhöhung kam es zu einem Anstieg der Sulfadiazinkonzentration an allen fünf Lokalisationen. Dabei gab es starke Konzentrationsunterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Sammelstaubproben. Die höchsten Gehalte konnten im Bereich des Troges gemessen werden, gefolgt von dem Bereich der Fensterbank, der anderen Seite der Stallgasse, der Rinne sowie der Liegefläche.

An allen fünf Lokalisationen ließ sich auch nach Abschluss der Behandlung weiterhin Sulfadiazin im Bereich von 0,6-1,9 µg/mg über sechs Tage in den Stallstäuben nachweisen. Im Futter befanden sich bei einer Dosis von 2,5 mg/kg KG ca. 94 mg SDZ/kg Futter, bei einer Dosis von 5 mg/kg KG 151 mg/kg Futter sowie bei einer Dosis von 25 mg/kg KG ca. 820 mg SDZ/kg Futter.

# Ergebnisse



## Ergebnisse

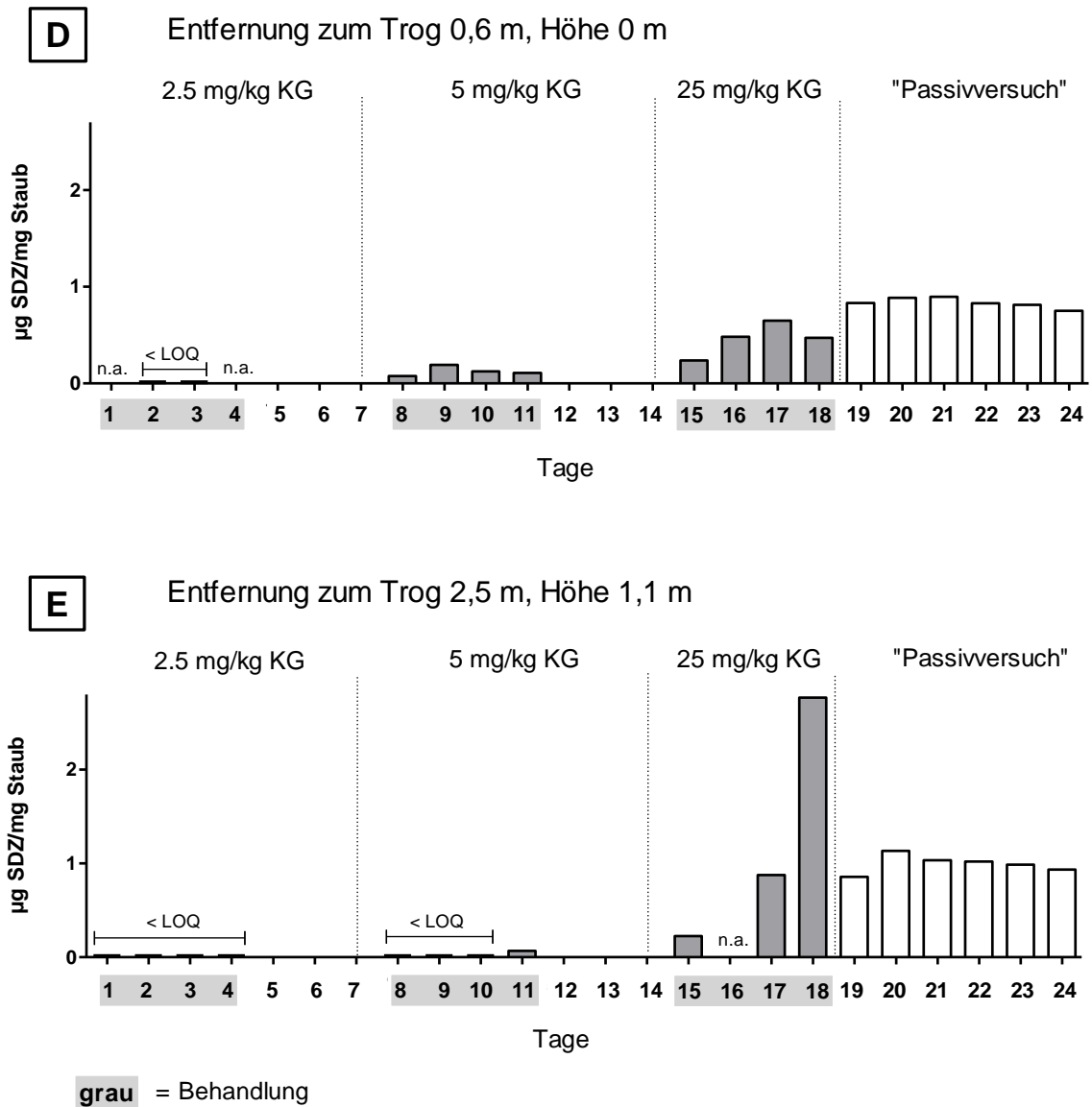
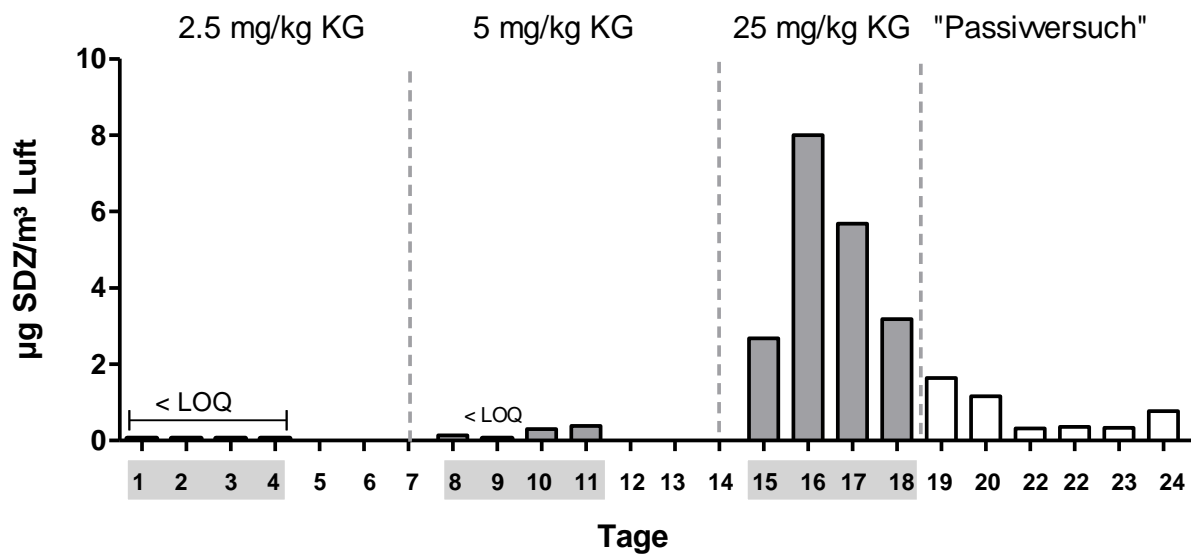


Abbildung 25: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) während der Mehlfütterung; die weißen Balken signalisieren das Fehlen der Sulfadiazin-Fütterung; LOQ = 0,1 µg/ml; n. a. = nicht auswertbar.

#### 4.2.1.4 Filterstaub

Sulfadiazin wurde ebenfalls in Stallaerosolen nachgewiesen. Auch nach Abschluss der Behandlung an Tag 18 wurde in den darauffolgenden Tagen bis Tag 24 Sulfadiazin im Bereich von 0,3-1,6  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  in den Aerosolen detektiert (siehe Abbildung 26).



**grau** = Behandlung

**Abbildung 26: Dosisabhängiger Sulfadiazingehalt in der Stallaerosolen während des Mehlfütterungsversuches; die weißen Balken signalisieren das Fehlen der Sulfadiazin-Fütterung; LOQ = 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .**

Zur Überprüfung des Sulfadiazingehaltes in den Stallaerosolen in Abhängigkeit von der Tageszeit, wurden vergleichende Messungen vormittags und nachmittags durchgeführt. Auch hier ließ sich der Sulfadiazingehalt dosisabhängig in den Aerosolen nachweisen (siehe Abbildung 27). Beide Messintervalle enthielten jeweils einen Fütterungszeitpunkt, jedoch war keine kontinuierliche Sulfadiazinverteilung ermittelbar.

## Ergebnisse

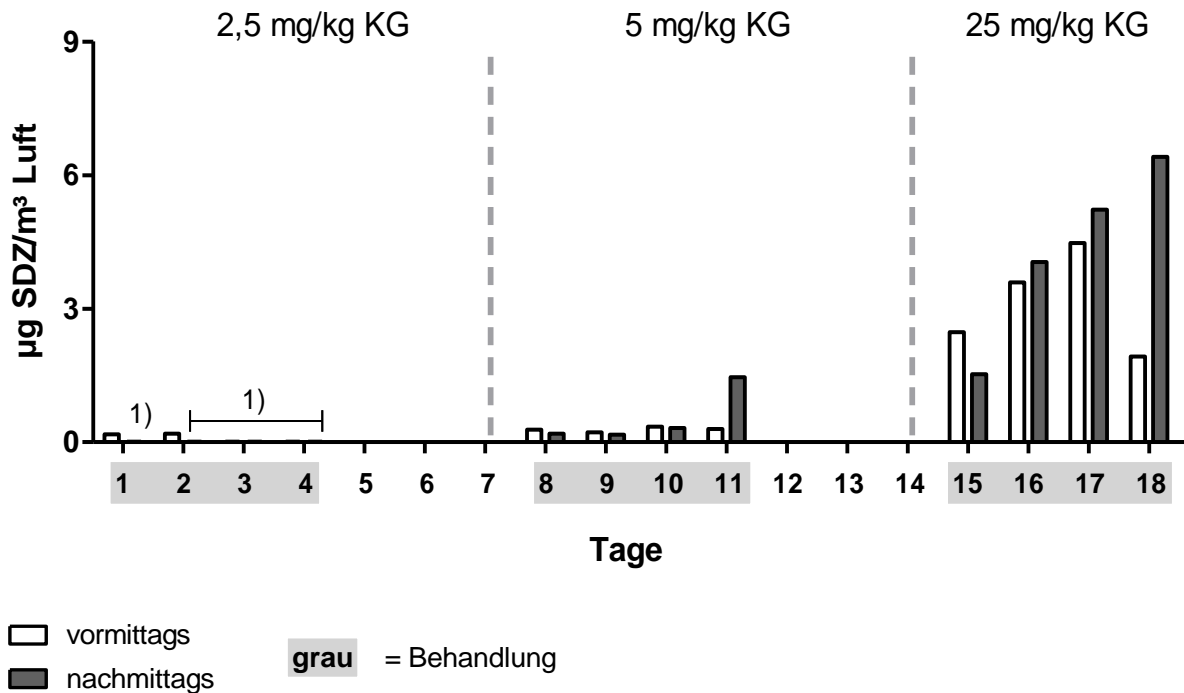


Abbildung 27: Vergleich des Sulfadiazineintrages in die Stallaerosole während des Vormittags vs. Nachmittags. Jeweils vormittags und nachmittags fand jeweils eine Fütterung/Behandlung statt; 1) = < LOQ; LOQ = 0,1 µg/ml.

### 4.2.2 Pelletfütterung

Sulfadiazin wurde in der bestimmungsgemäßen Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht enthalten in Pellets an die Tiere verfüttert. Der Sulfadiazingehalt in den Pellets betrug ca. 820 mg/kg Futter.

#### 4.2.2.1 Plasma

Die im Plasma detektierten Sulfadiazinkonzentrationen sind in Abbildung 28 dargestellt. Die erreichten Plasmakonzentrationen lagen im Bereich von 4,6-11,4 µg SDZ/ml Plasma.



## Ergebnisse

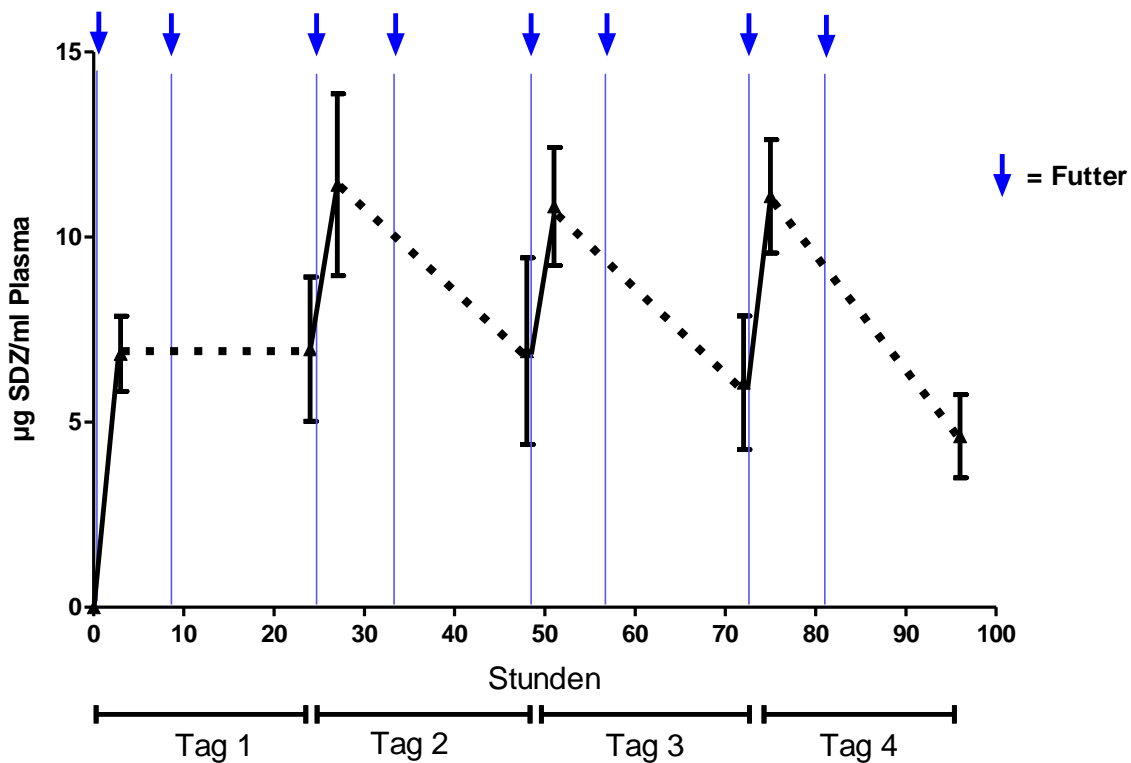


Abbildung 28: Sulfadiazin-Konzentration im Plasma (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen) nach Pelletfütterung von 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage.

### 4.2.2.2 Urin

In Abbildung 29 werden die im Urin detektierten Sulfadiazin-Konzentrationen nach Pelletfütterung von 25 mg/kg KG dargestellt. Über die ersten drei Tage kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Sulfadiazinkonzentration beginnend am ersten Tag der Behandlung mit 83,5 µg SDZ/ml Urin. Am dritten Behandlungstag wurde ein Maximalwert von etwa 340,0 µg SDZ/ml Urin erreicht, der am vierten Behandlungstag bestehen blieb. Einen Tag nach Abschluss der Behandlung sank der Sulfadiazingehalt im Urin auf 140,0 µg/ml.

## Ergebnisse

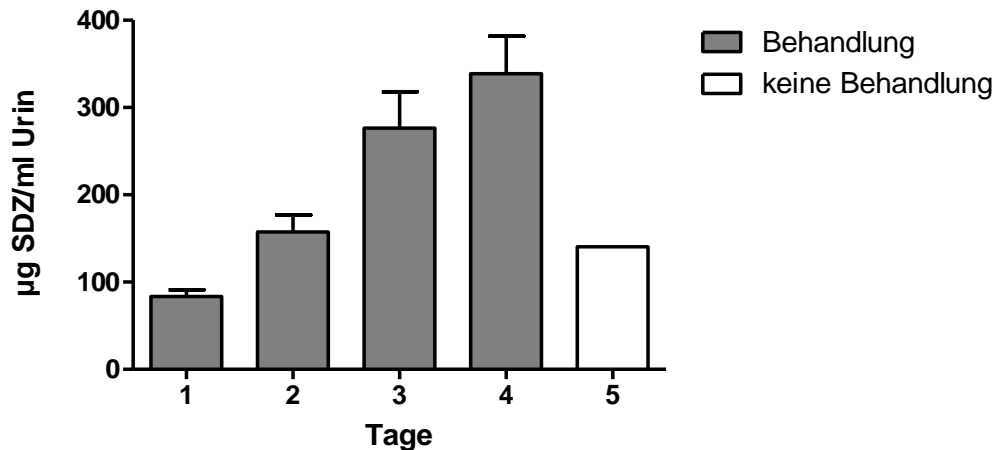


Abbildung 29: Sulfadiazin-Konzentration im Urin (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen) nach Pelletfütterung von 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2x täglich über 4 Tage; der weiße Balken signalisiert die fehlende Fütterung an Tag 5.

### 4.2.2.3 Sedimentationsstaub

Die Untersuchung von Sedimentationsstaubproben aus fünf unterschiedlichen Bereichen des Stalles zeigte, dass sich während der Pelletfütterung innerhalb der Behandlungstage nachweisbare Mengen an Sulfadiazin im Staub befanden. An allen Lokalisationen mit Ausnahme des Bereiches der Fensterbank ließ sich ein Anstieg des Sulfadiazingehaltes im Stallstaub während der Behandlungsdauer erkennen. Dies trifft ebenfalls auf die gemessenen Werte an Tag fünf zu, an dem keine Behandlung stattfand. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse.

## Ergebnisse

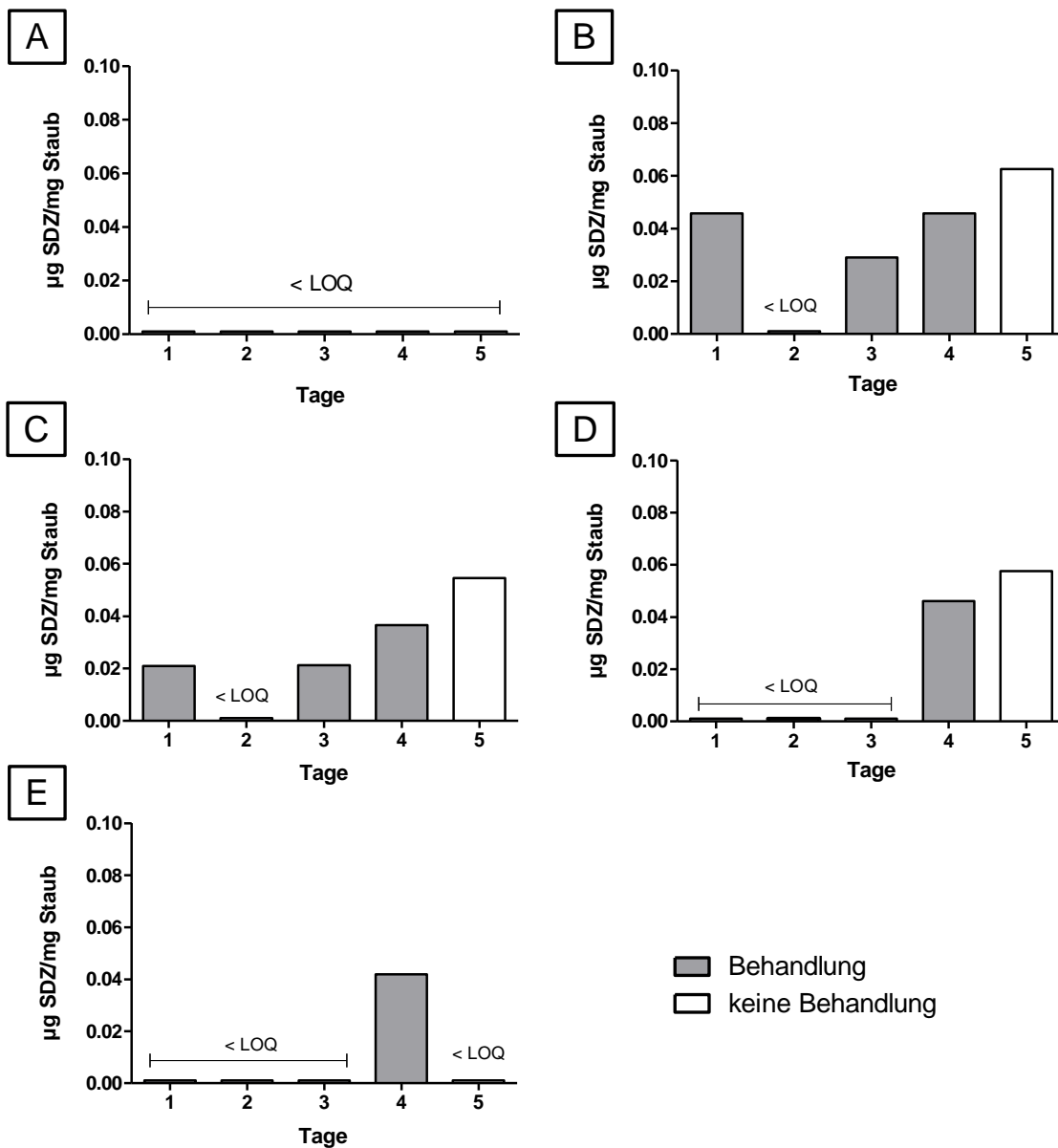


Abbildung 30: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) während der Pelletfütterung; die weißen Balken signalisieren das Fehlen der Sulfadiazin-Fütterung an Tag 5; LOQ = 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.2.2.4 Filterstaub

Während der Verfütterung von pelletiertem Futter konnte Sulfadiazin im Aerosol zum größten Teil nur unterhalb der LOQ = 0,1 µg/ml ermittelt werden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Sulfadiazingehalt im Aerosol nach Verabreichung von 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich) über das Pelletfutter; an Tag 5 fand keine Sulfadiazin-Fütterung mehr statt; LOQ = 0,1 µg/ml.**

Tag	µg SDZ/m <sup>3</sup> Luft
1	< LOQ
2	< LOQ
3	< LOQ
4	0,18
5 (keine Behandlung)	Nicht gemessen

Zur Überprüfung des Sulfadiazingehaltes in der Stallluft in Abhängigkeit von der Tageszeit wurden vergleichende Messungen vormittags und nachmittags durchgeführt. Auch hier blieb der Sulfadiazingehalt in den Aerosolen zum größten Teil unterhalb der LOQ. Beide Messintervalle enthielten jeweils einen Fütterungszeitpunkt, jedoch war keine kontinuierliche Sulfadiazinverteilung ermittelbar. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 7 dargestellt.

## Ergebnisse

**Tabelle 7: Vergleich des Sulfadiazineintrages in die Stallaerosole während des Vormittags vs. Nachmittags. Es wurden 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich) über das pelletierte Futter verabreicht; an Tag 5 fand keine Sulfadiazin-Fütterung mehr statt; LOQ = 0,1 µg/ml.**

Tag	Tageszeit	µg SDZ/m <sup>3</sup> Luft
1	vormittags	< LOQ
	nachmittags	< LOQ
2	vormittags	< LOQ
	nachmittags	< LOQ
3	vormittags	< LOQ
	nachmittags	< LOQ
4	vormittags	< LOQ
	nachmittags	0,29
5 (keine Behandlung)	vormittags	< LOQ
	nachmittags	< LOQ

### 4.2.3 Vergleich Mehlfütterung vs. Pelletfütterung

#### 4.2.3.1 Plasma

Die erreichten Plasmakonzentrationen an Sulfadiazin unterschieden sich nur geringfügig von denen der Mehlfütterung mit der gleichen Sulfadiazindosis.

Nach der Applikation der Dosis 25 mg/kg KG während der Mehlfütterung konnten 5,2-14,2 µg SDZ/ml Plasma nachgewiesen werden, während der Pelletfütterung waren es 4,6-11,4 µg SDZ/ml Plasma.

#### 4.2.3.2 Urin

Die erreichten Urinkonzentrationen an Sulfadiazin unterschieden sich ebenfalls nicht von der Mehlfütterung mit der identischen Sulfadiazinkonzentration.

Die Urinkonzentration an Sulfadiazin betrug während der Mehlfütterung 112,3-311,5 µg SDZ/ml Urin und bei der Pelletfütterung 83,5-340 µg/ml Urin.

## Ergebnisse

### 4.2.3.3 Sedimentationsstaub

Der Vergleich der beiden galenischen Zubereitungen zeigte, dass bei Pelletfütterung erheblich geringere Sulfadiazinkonzentrationen im Staub zu finden sind als bei der Mehlfütterung. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 31 dargestellt.

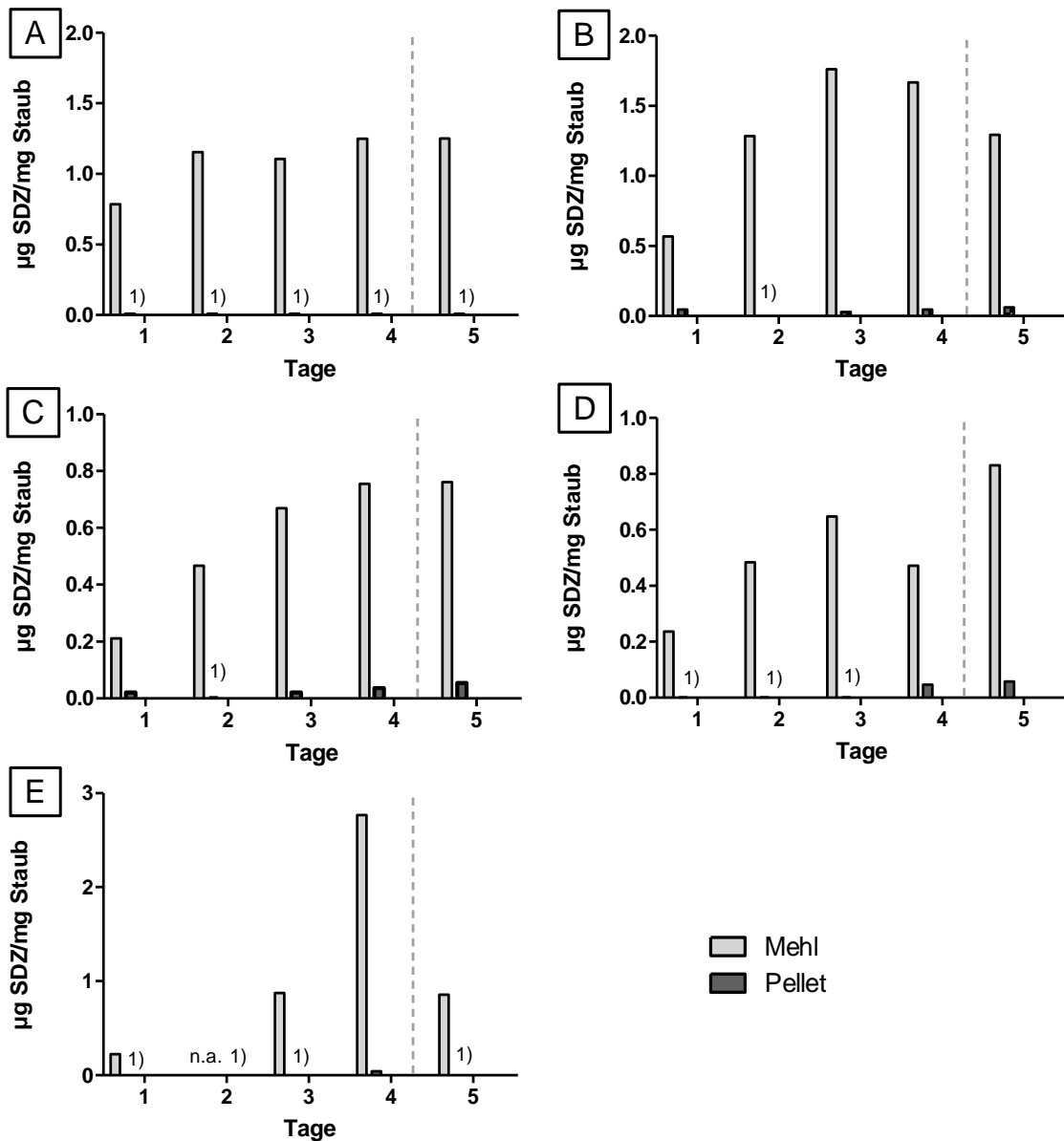


Abbildung 31: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) im Vergleich zwischen Mehlfütterung (hellgrau) und Pelletfütterung (dunkelgrau) nach Verabreichung von 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich); an Tag 5 fand keine Sulfadiazin-Fütterung mehr statt. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen; 1) = < LOQ; LOQ = 0,1 µg/ml; n. a. = nicht auswertbar.

## Ergebnisse

### 4.2.3.4 Filterstaub

Nach Sulfadiazinextraktion von den Filtern wurden nach Mehlfütterung erheblich höhere Mengen an Sulfadiazin nachgewiesen als bei Pelletfütterung (Abbildung 32).

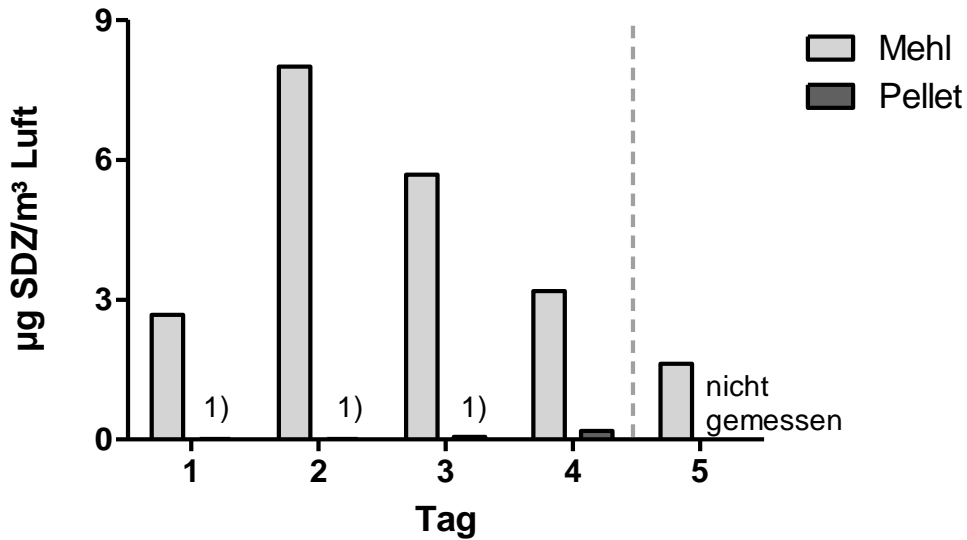


Abbildung 32: Vergleich der Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Filterstaub zwischen Mehl- (hellgrau) und Pelletfütterung (dunkelgrau) nach Verabreichung von 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich); an Tag 5 fand keine Sulfadiazin-Fütterung mehr statt; 1) = < LOQ; LOQ = 0,1 µg/ml.

### 5 Diskussion

Veterinärarzneimittel gelangen über verschiedene Eintragspfade in die Umwelt (BOXALL et al. 2004). In der Nutztierhaltung eingesetzte Antibiotika werden überwiegend über das Futter oder Trinkwasser an den zu therapierenden Viehbestand verabreicht. Zum einen kann es durch die orale Medikation zu einem Antibiotikaeintrag in die Stallaerosole kommen, die über die Lüftungssysteme in die Außenwelt freigesetzt werden. Zum anderen werden die verabreichten Antibiotika über die Exkremente ausgeschieden und gelangen als noch aktive Ausgangssubstanzen und ihre metabolisierten Produkte in die Gülle, die zu einem späteren Zeitpunkt auf die landwirtschaftlich genutzten Flächen ausgebracht wird (HAMSCHEER et al. 2002; HAMSCHEER et al. 2005b). Der Wirtschaftsdünger stellt somit einen bedeutenden Eintragspfad für Tierarzneimittel in die Umwelt dar. Diverse Untersuchungen belegen, dass Antibiotika, darunter auch Sulfadiazin, in der Gülle vorab behandelter Tiere nachweisbar sind (WINCKLER et al. 2004).

Die durchgeführten *In-vivo*-Experimente dieser Arbeit zeigen, dass bei oraler Medikation der bestimmungsgemäßen Sulfadiazindosis von 25 mg/kg KG, die auch *in praxi* verwendet wird, im Urin der behandelten Tiere deutlich detektierbare Sulfadiazinkonzentrationen bis zu 340 µg/ml zu ermitteln sind. Da Sulfadiazin zu etwa gleichen Teilen unverändert und metabolisiert innerhalb von 10 Tagen über den Urin fast vollständig wieder ausgeschieden wird (LAMSHÖFT et al. 2007), sind entsprechende Konzentrationen in der Gülle zu verzeichnen. Zu beachten ist jedoch, dass es während der Güllelagerung zu einer Deacetylierung des Stoffwechselmetaboliten N4-Acetyl-Sulfadiazin, das keine antibakterielle Aktivität mehr besitzt, in das antimikrobiell wirksame Sulfadiazin kommt. Dadurch erhöht sich der Sulfadiazingehalt in der Gülle (BERGER et al. 1986; KREUZIG u. HÖLTGE 2005; LAMSHÖFT et al. 2010). Nach Verbringung der Güllefracht auf die landwirtschaftlichen Flächen besteht insbesondere durch Regenfälle die Gefahr des Fortspülens von Sulfadiazin von der Erdoberfläche und eine Verlagerung in die Oberflächengewässer. Durch das gemäß Gülleverordnung vorgeschriebene Einpflügen unmittelbar nach Ausbringung der Güllefracht, wird Sulfadiazin in die Erde



eingearbeitet (BURKHARDT et al. 2005; KREUZIG et al. 2007; ZARFL et al. 2009). Im Erdboden wird Sulfadiazin unter anderem in eine sequestrierte Rückstandsfraktion transformiert, die biologisch nicht aktiv ist. Dieser Transformationsprozess ist jedoch reversibel, d. h. Sulfadiazin, OH-Sulfadiazin und in sehr geringen Mengen Acetyl-Sulfadiazin können langsam reaktiviert und freigegeben werden, wodurch sie in der Erde wieder verfügbar sind und das Ökosystem beeinflussen können. Die sequestrierte Fraktion stellt damit ein langfristiges Reservoir dar, das Sulfadiazin und seinen Metaboliten eine jahrelange Persistenz in der Erde ermöglicht (KREUZIG u. HÖLTGE 2005; FÖRSTER et al. 2009).

Grund zur Besorgnis gibt die Beobachtung, dass Nutzpflanzen in der Lage sind, nach Düngung mit antibiotikabelasteter Gülle die Arzneimittel aufzunehmen (KUMAR et al. 2005). Auch in Getreide, Kartoffeln und Salat konnten Sulfonamide in Abhängigkeit vom Gehalt in der Gülle nachgewiesen werden (DOLLIVER et al. 2007).

Der Verlagerung von Tierarzneimitteln von der Gülle bzw. dem Boden in die Pflanzen stellt daher durch die orale Aufnahme von entsprechenden Nahrungsmitteln ein potentiell Gesundheitsrisiko für den Menschen dar. Dies trifft auch auf Tiere zu, deren Futter aus den kontaminierten Pflanzen besteht. Antibiotika wurden selbst in Insekten nachgewiesen (AHMAD et al. 2011), die wiederum Vögeln und Kleinsäugetern als Nahrung dienen, über die Antibiotika weiter in die Nahrungskette gelangen können.

In den letzten Jahren ist das Interesse über die Konsequenzen der in die Umwelt eingebrachten Antibiotika bezüglich ihrer Ökotoxizität und vermehrten Resistenzentwicklungen immens gestiegen. Auch aufgrund der oben aufgeführten Sachlage ist eine Reduzierung des Arzneimiteleintrages in die Umwelt unumgänglich (KÜMMERER 2004; CHAPIN et al. 2005).

Ziel dieser Arbeit war daher die nähere Untersuchung von Möglichkeiten zur Verminderung des Veterinärarzneimiteleintrags in die Umwelt am Beispiel der Sulfonamide.

### 5.1 *In-vitro*-Experimente

Die Eigenart der Sulfonamide, unter Lichteinfluss zu degradieren (BOREEN et al. 2004; LAM u. MABURY 2005; SUKUL et al. 2008; MOUAMFON et al. 2011), könnte als Lösungsansatz für einen reduzierten Arzneimitteleintrag in die Umwelt dienen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Photodegradation verschiedener Sulfonamide unter Einsatz unterschiedlicher UV-Strahlungen eruiert. Da über die Biokompatibilität der entstehenden Photooxidationsprodukte kaum etwas bekannt ist, wurden die bestrahlten Sulfonamide nachfolgend auf toxische sowie antiproliferative Effekte untersucht. Auch die antibakterielle Wirkung der Degradationsprodukte wurde geprüft.

Die für die Photooxidationsexperimente verwendete UV-Lampe simulierte nicht das komplette Sonnenlichtspektrum (750–100 nm), sondern nur die Zusammensetzung der UVA/UVB- Strahlung des Sonnenlichts, die auf die Erdoberfläche trifft.

Das natürliche Sonnenlicht besteht zu 65% aus Infrarotstrahlen (750–600 nm), zu 30% aus sichtbarem Licht (600–400 nm) und nur zu etwa 5% aus ultravioletter Strahlung (400–100 nm). Die UV-Strahlung wiederum wird in drei Wellenlängenbereiche unterteilt. Die langwelligen UVA-Strahlen (400–315 nm), die mittelwelligen UVB-Strahlen (315–280 nm) und die kurzwellige UVC-Strahlen (280–100 nm). Die UV-Strahlung, die auf die Erdoberfläche trifft, besteht zu 90% aus UVA-Strahlen und zu 10% aus UVB-Strahlung. Das UVC-Licht wird von der Ozonschicht absorbiert und erreicht die Erde nicht (ZEPP u. CLINE 1977; WATKINS 1979; Europäische Kommission 2007).

Sulfonamide und ihre dazugehörigen Absorptionsmaxima liegen in etwa zwischen 250 und 270 nm. Das gesamte Absorptionsspektrum erstreckt sich jedoch über 280 nm hinaus, d.h. Sulfonamide sind in der Lage, im von der Ozonschicht gefilterten Spektrum des Sonnenlichts Photonen zu absorbieren (MASCHKA et al. 1953; TROVO et al. 2009b). Aus diesem Grund ist eine direkte Photodegradation der Sulfonamide möglich. Ist in der Lichtquelle keine UV-Strahlung enthalten, bleiben die Sulfonamide stabil, wie JUNG et al. (2008) darlegten.

Die Verbringung der kontaminierten Gülle auf Nutzflächen setzt die Sulfonamide dem Sonnenlicht aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass es unter dem Einfluss natürlicher Sonneneinstrahlung zu einer Photooxidation der Sulfonamide kommt. Das Abbauverhalten der Sulfonamide korrespondiert mit Beobachtungen von WERNER et al. (2005). Die Resultate der Photooxidationsexperimente demonstrieren analog zu den Untersuchungen von HU et al. (2007) sowie LAI et al. (2011), dass das Abbauverhalten der Sulfonamide unter künstlichem UVA/UVB-Licht dem unter natürlichem Tageslicht in etwa entspricht, die Degradation unter Sonnenlichteinstrahlung jedoch langsamer abläuft.

Die beschleunigte Degradation unter künstlichem UVA/UVB-Licht lässt sich durch die höhere Lichtintensität der mittels UV-Lampe erzeugten UVA/UVB-Strahlung erklären im Vergleich zum natürlichen Tageslicht, dessen UV-Strahlung nur einen geringen Anteil am Gesamtspektrum des Sonnenlichts ausmacht.

Dass die Lichtintensität den Photoabbau beeinflussen kann, dokumentierten JUNG et al. (2008). Sulfathiazol wurde durch eine pulsierend eingesetzte höhere Lichtintensität stärker degradiert als durch eine schwache kontinuierliche Lichtintensität, obwohl die UV-Strahlen-Dosis für den Versuchszeitraum identisch war. Für Sulfamethazin und Sulfamethoxazol wurde dieses unterschiedliche Abbauverhalten allerdings nicht beobachtet.

Obwohl zwischen den einzelnen Sulfonamiden nur geringe strukturelle Unterschiede bestehen, belegen die Resultate der UVA/UVB-Licht-Irradiationen erstaunlicherweise, dass es große Differenzen innerhalb der Sulfonamidgruppe bezüglich des Degradationsverhaltens gibt. In der vorliegenden Arbeit lässt sich mit dem Grad der Photooxidierbarkeit kein direkter Zusammenhang zur Struktur herstellen.

Untersuchungen von AVISAR et al. (2010) und LI et al. (2011) veranschaulichten jedoch, dass der pH-Wert der bestrahlten Matrix die Photodegradation der amphoteren Sulfonamide beeinflusst. Außerdem zeigten Untersuchungen von MASCHKA et al. (1953) und TROVO et al. (2009b), dass die Absorptionsspektren der Sulfonamide durch den pH-Wert der zu bestrahlenden Matrix beeinflusst werden.

## Diskussion

Das Degradationsverhalten der Sulfonamide, deren an die Sulfonamidgruppe gebundener Rest aus einem C<sub>5</sub>-Ring besteht (Sulfamethoxazol, Sulfathiazol), scheint besonders von pH-Wert abhängig zu sein. BOREEN et al. (2004) zeigten am Beispiel von Sulfamethoxazol durch Messungen der Dissoziationskonstanten pK<sub>a1</sub> und pK<sub>a2</sub>, dass dieses bei einem pH-Wert von 7,4-8,4 in seine anionische und damit stabilste Form überging und somit - analog zu unseren Ergebnissen - schlecht photolytisch abgebaut werden konnte (siehe Abbildung 5). Dies könnte neben der häufigen Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin eine zusätzliche Erklärung dafür sein, dass Sulfamethoxazol häufiger in natürlichen Gewässern, deren pH-Wert je nach Härtegrad zwischen 6-8,5 liegt, nachgewiesen werden kann. Bei einem niedrigen pH (3,4) erfolgte hingegen eine schnelle Degradation von Sulfamethoxazol (ZHOU u. MOORE 1994).

Sulfathiazol hingegen zeigte ein umgekehrtes Abbauverhalten: im sauren pH-Bereich wurde ein geringgradiger Abbau detektiert, im basisch/neutralen Bereich wies es die höchste Degradationsrate auf (BOREEN et al. 2004). Letzteres stimmte mit unseren Messungen, die bei einem pH von 7,4 durchgeführt wurden, überein. Die Tatsache, dass Sulfathiazol in der Umwelt kaum nachgewiesen wird, könnte ebenfalls auf einen nur geringfügigen Einsatz als Veterinärarzneimittel zurückzuführen sein, oder auf seine Eigenschaft in dem pH-Niveau natürlicher Gewässer unter Lichteinfluss schnell abgebaut zu werden (BOREEN et al. 2004).

Das Degradationsverhalten der Sulfonamide, deren Rest aus einer C<sub>6</sub>-Ringform besteht (Sulfamethazin, Sulfamerazin, Sulfadiazin, Sulfachloropyridazin), ist offenbar unabhängig vom pH-Niveau. Sulfadimethoxin bildete hier jedoch eine Ausnahme, allerdings wird es wegen seines geringen Einsatzes in der Veterinärmedizin kaum in der Gülle oder in Abflussgewässern detektiert. Mit steigendem pH-Wert nahm die Degradationsrate dieser Substanz ab (BOREEN et al. 2005).

Über das Abbauverhalten der Sulfonamide unter Lichteinfluss wurden in der Vergangenheit diverse Studien durchgeführt (GUERARD et al. 2009; MOUAMFON et al. 2010; LI et al. 2011), jedoch gestaltet sich ein direkter Vergleich mit unseren

Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schwierig, da der Abbau, wie bereits ausgeführt, durch zahlreiche Faktoren bestimmt wird.

So beeinflusst die Matrix, in der das Sulfonamid der Lichtquelle ausgesetzt ist, ebenfalls die Degradation (TROVO et al. 2009b). Die Entdeckung, dass Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol in unsterilen Wasserproben schneller photodegradiert wurden als in sterilen, führten die Autoren dieser Studie auf einen synergistischen Effekt der mikrobiellen Aktivität in Verbindung mit Licht zurück, die im Vergleich zum Lichteinfluss jedoch nur einen geringen Teil ausmachte (LAI u. HOU 2008; LAI et al. 2011). BOREEN et al. (2005) sowie WERNER et al. (2005) wiesen nach, dass gelöstes organisches Material die Photodegradationsrate erhöhte. Untersuchungen von LAM et al. (2004) zeigten allerdings, dass es keinen Unterschied in der Photodegradation zwischen unsterilen und sterilen Matrixproben gab. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Biodegradation kaum zum Abbau beitrug. Auch BARAN et al. (2006) konnten für Sulfadiazin, Sulfamethoxazol sowie Sulfathiazol keine Biodegradation im Wasser feststellen, jedoch für die entstandenen Photooxidationsprodukte.

Zu den Analyseproben hinzugefügte Photokatalysatoren beschleunigten den Photoabbau und erschwerten den Vergleich der Resultate von KANIOU et al. (2005) und TROVO et al. (2009a) und unseren Ergebnissen. SUKUL et al. (2008) zeigten, dass Huminsäure und Fulvinsäure, die bei der Humifizierung, der Zersetzung pflanzlichen Materials, entstehen, als natürliche Photokatalysatoren betrachtet werden können. Die Entstehung von OH-Radikalen sowie Singlet-Sauerstoff-Reaktionen beschleunigen dabei die Photolyse (ZEPP 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sulfonamide unter UV-Licht-Exposition in wässriger Lösung photodegradiert werden. Dass die Photooxidation von Sulfadiazin auch in der Gülle möglich ist, demonstrierten SUKUL et al. (2008). Die Halbwertszeit von Sulfadiazin betrug nach Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht (290-800 nm) in Gülle 158 h im Vergleich zu Wasser mit 32 h (SUKUL et al. 2008). Sulfadiazin ist in Gülle und damit auch in der Umwelt als persistent anzusehen auch vor dem Hintergrund, dass während des Irradiationsexperimentes

die Gülle kontinuierlich umgewälzt wurde, um das Sulfadiazin dem Licht zugänglich zu machen. In der Umwelt wird die Photolyse von Sulfadiazin noch langsamer ablaufen, da die Güllepartikel das Sulfonamidmolekül vor der Lichteinstrahlung abschirmen. Die dunkle Färbung sowie die Viskosität des organischen Materials erschweren den Lichteinfall. Als Sulfadiazin-Photoprodukte in der Gülle wiesen SUKUL et al. (2008) die gleichen Photoprodukte nach, die auch durch UV-Irradiation in wässriger Lösung entstanden.

Neben einer Photodegradation verursacht durch eine Bestrahlung mittels UVA/UVB-Spektrum wurde in der vorliegenden Arbeit ermittelt, dass durch den Einsatz unterschiedlicher Wellenlängen die Degradation der Sulfonamide beeinflusst wird, was sich besonders deutlich bei Sulfanilamid und Sulfathiazol darstellen lässt. Unsere Ergebnisse ähneln denen von LAI et al. (2011) und bestätigen auch Resultate von HU et al. (2007). In deren Untersuchung wurden Sulfamethoxazol und Sulfathiazol unter UVA-Licht allerdings unter Zugabe eines Photokatalysators ähnlich stark abgebaut. Sulfanilamid wurde im UVA-Spektrum kaum photooxidiert (BARAN et al. 2009). Die Tatsache, dass Sulfathiazol und Sulfanilamid unter UVA-Bestrahlung in wesentlich geringerem Umfang degradiert werden als unter UVA/UVB-Strahlung, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Absorptionsspektren beider Substanzen sich weniger mit dem UVA-Spektrum (315–400 nm) überschneiden, so dass weniger Photonen absorbiert werden. Da das reine UVA-Licht keinen nennenswerten Einfluss auf die Degradation der weiteren Sulfonamide im Vergleich zur UVA/UVB-Strahlung nimmt, wurden die Untersuchungen bezüglich der Biokompatibilität an den Photooxidationsprodukten der UVA/UVB-Bestrahlung durchgeführt. Da bereits Sonnenlicht zur Photodegradation der Sulfonamide führt, ist die Ökotoxizität der Photoprodukte, die durch UVA/UVB-Bestrahlung entstehen, möglicherweise vergleichbar mit der in der Umwelt entstehenden Abbauprodukte.

Bisher ist über die Auswirkungen der Photoprodukte auf die Umwelt und ihre Eigenschaften kaum etwas bekannt und in der Literatur sind nur wenige Studien darüber zu finden. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, einen eventuell toxischen Effekt der Photooxidationsprodukte zu ermitteln. Da die Abbauprodukte bislang nicht

vollständig identifiziert werden konnten, ist es schwer zu erklären, weshalb sie toxisch auf die Zellen wirken.

Von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Hamscher, Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, wurden massenspektroskopische Untersuchungen unserer Photooxidationsprodukte aus den Versuchen mit künstlichem UVA/UVB-Licht vorgenommen. Die Resultate zeigten, dass bei Sulfamethoxypyridazin, Sulfadimethoxin sowie Sulfachloropyridazin eine SO<sub>2</sub>-Extrusion stattfand. Sulfathiazol wurde zwar zum größten Teil abgebaut, es konnte jedoch keine SO<sub>2</sub>-Extrusion ermittelt werden (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Gerd Hamscher, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2012).

Die Photooxidation scheint nach den bisherigen Erkenntnissen über zwei Haupt- und einige Nebenreaktionen abzulaufen. Eine maßgebliche Bedeutung kommt dabei zum einen der SO<sub>2</sub>-Extrusion und zum anderen der Spaltung der S-N-Bindung zu (GIVENS et al. 1984) (s. Abbildung 33). Schon SPITELLER u. KASCHNITZ (1963) belegten, dass Sulfonamide, die an ihrem N1 stark elektrophile Substituenten tragen, bevorzugt an dieser Stelle durch Extrusion des stabilen SO<sub>2</sub> zerbrechen.

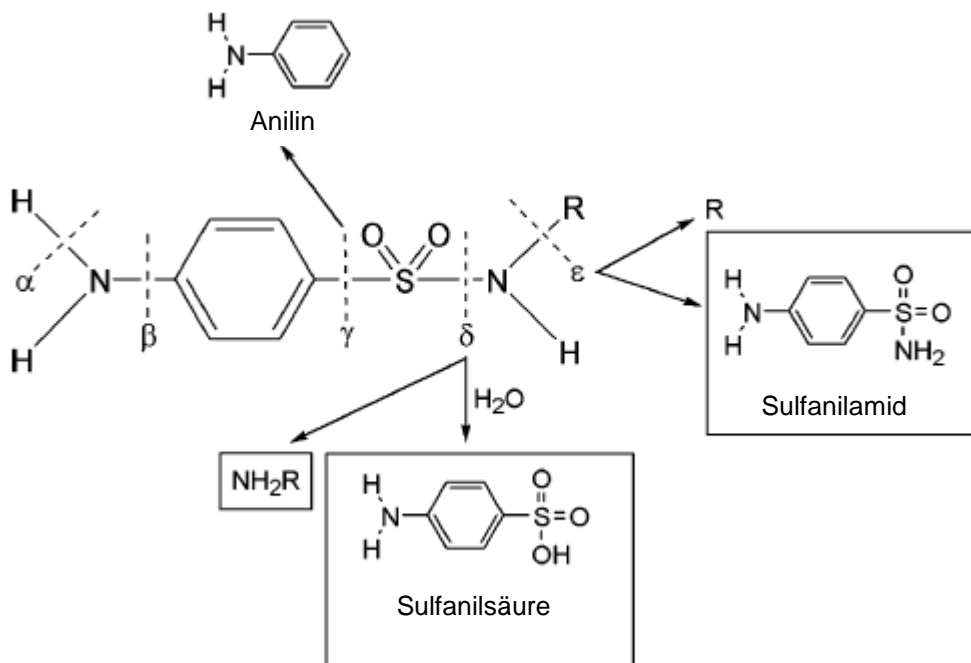


Abbildung 33: Mögliche Spaltstellen durch direkte Photolyse (BOREEN et al. 2004).

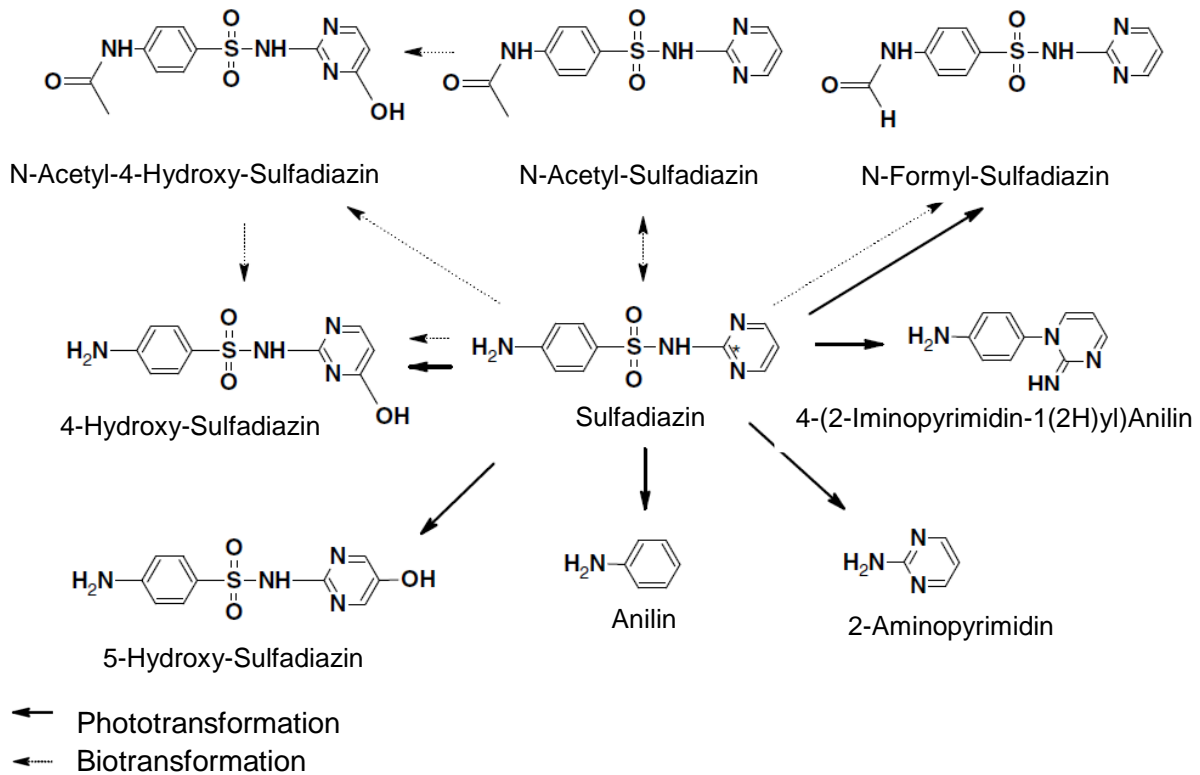
## Diskussion

Die SO<sub>2</sub>-Extrusion stellt für Sulfadiazin, Sulfamethazin, Sulfamerazin, Sulfachloropyridazin, Sulfadimethoxin sowie Sulfamethoxazol eine der Hauptreaktionen der Photodegradation dar (BOREEN et al. 2005; LESTER et al. 2008; SUKUL et al. 2008; KIM u. TANAKA 2009). Daneben konnte für Sulfamethazin und Sulfamethoxazol die Spaltung der S-N-Bindung beobachtet werden (ZHOU u. MOORE 1994; BOREEN et al. 2004; KIM u. TANAKA 2009). Initial wurde bei Sulfamethoxazol die N-O-Bindung des Fünfringes aufgebrochen (ZHOU u. MOORE 1994), außerdem formierten sich freie Radikale (MOORE 1998). Neben dem Hauptphotodegradationsprodukt [4-Amino-N-(5methyl-2oxazolyl)benzensulfonamid] entstanden 3-Amino-5-methylisoxazol, Sulfanilsäure sowie Anilin (ZHOU u. MOORE 1994; BOREEN et al. 2004; LAM et al. 2004; KIM u. TANAKA 2009). TROVO et al. (2009b) belegten in einem Toxizitätstest am Wasserfloh *Daphnia magna*, dass die entstandene Sulfanilsäure sowie 3-Amino-5-methylisoxazol keine toxische Wirkung besaßen, sondern diese anderen Abbauprodukten zuzuschreiben war.

In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf Sulfadiazin, da es im *In-vivo*-Experiment als Modellsubstanz bei Schweinen verwendet wurde. Nach Ausscheidung über die Exkremente gelangt es in die Gülle und damit nachfolgend auf die Wirtschaftsflächen, oder durch Regenfälle begünstigt, fortgespült in Oberflächengewässer, wo es durch Sonnenlicht photodegradiert wird. SUKUL et al. (2008), deren Versuchsbedingungen für die Photooxidation in etwa unserem Feldversuch entsprachen, ermittelten, dass durch die SO<sub>2</sub>-Extrusion 50% des ursprünglichen Sulfadiazins in nicht näher identifizierbares Material transformiert wurde. Neben Sulfadiazin konnte als Hauptphotoprodukt [4-(2-iminopyrimidin-1(2H)-yl)anilin] charakterisiert werden, das 13% des ursprünglichen Sulfadiazins ausmachte. Zudem wurden mit einem Anteil von 10% 2-Aminopyridin sowie mit 2% Anilin als Photoprodukte detektiert, sowie Spuren von 4-Hydroxy-Sulfadiazin, 5-Hydroxy-Sulfadiazin sowie N-Formyl-Sulfadiazin gemessen (s. Abbildung 34). Sulfanilsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Der Anteil der jeweils entstehende Photooxidationsprodukte ist abhängig vom Ausgangs-pH-Wert der bestrahlten Matrix (LESTER et al. 2008).



## Diskussion



**Abbildung 34: Spaltprodukte von Sulfadiazin durch Photodegradation und Biotransformation (SUKUL et al. 2008).**

Für andere Sulfonamide konnten zum Teil analoge Photooxidationsprodukte ermittelt werden. So wurde für Sulfamethazin [4-(2-imino-4,6-dimethylpyrimidin-1(2H)-yl)anilin] als analoges Hauptprodukt des Photoabbaus charakterisiert (BOREEN et al. 2005), für Sulfadimethoxin dementsprechend [4-(6-imino-2,4-dimethoxypyrimidin-1(6H)-yl)aniline] (GUERARD et al. 2009). Außerdem detektierten die Autoren neben Aminosulfonsäure Phenole, Hydroxypyrimidin, N-Oxide und Hydroxyamide.

Jedoch wiesen nicht alle Studien entsprechende Ergebnisse auf. GARCIA-GALAN et al. (2012) zeigten in ihrer Studie, dass Sulfamethazin durch das Spektrum des natürlichen Sonnenlichtes in sieben verschiedene Photoprodukte transformiert wurde. Den größten Anteil stellten auch hier die desulfonierten Produkte dar, jedoch entsprach das Hauptprodukt des photooxidierten Sulfamethazins nicht exakt dem von (BOREEN et al. 2005). GARCIA-GALAN et al. (2012) beobachteten, dass auch die im Körper durch Metabolisierung entstandenen Sulfonamidprodukte (N4-

## Diskussion

Acetylsulfamethazin), durch UV-Irridation, die eine SO<sub>2</sub>-Extrusion sowie eine Abspaltung der Methylgruppe vom Acetylrest verursachte, degradiert werden.

Die Untersuchung der Photooxidationsprodukte hinsichtlich ihrer Biotoxizität und Umweltverträglichkeit zeigte im Vitalitätstest, dass die Abbauprodukte, entstanden durch Bestrahlung einer Sulfonamidlösung mit Ausgangskonzentration von 50 µg/ml, toxisch wirken. Die oben erwähnte Radikalbildung oder auch das extruierte SO<sub>2</sub> könnten gegebenenfalls Veränderungen in den Zellen bewirken (WEIß 1980). Die Photooxidationsprodukte, entstanden aus bestrahlten Sulfonamidlösungen mit Ausgangskonzentrationen von 25 und 33,3 µg/ml, haben jedoch keinen negativen Effekt auf die Zellvitalität. Die Konzentration von 25 µg/ml entsprach in etwa der erreichten Plasmakonzentration nach oraler Applikation der bestimmungsgemäßen Sulfadiazindosis im Schwein. Sulfonamide gehören mit einer LD<sub>50</sub> > 500 mg/kg bei Labornagern oral oder intravenös appliziert zu den gering toxischen Substanzen (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE 1978). Währenddessen beeinflussen die unbestrahlten Substanzen die Zellvitalität nicht. Dies bedeutet, dass die Photobehandlung von sulfonamidbelasteter Matrix zu Produkten führt, die in einer höheren Konzentration toxisch wirken, während die unbestrahlte Ausgangssubstanz kaum oder kein toxisches Potential aufweist.

Auch JUNG et al. (2008) und TROVO et al. (2009b) demonstrierten, dass Photooxidationsprodukte von Sulfathiazol, Sulfamethazin sowie Sulfamethoxazol toxisch auf *Daphnia magna* wirkten. Bedauerlicherweise liegen kaum weitere Studien über die toxischen Effekte der photooxidierten Sulfonamide auf weitere Kleinstlebewesen vor. Lediglich TROVO et al. (2009b) konnten zeigen, dass bei der Durchführung eines Toxizitätstest an *Vibrio fischeri*, einem im Meer heimischen Bakterium, eine minimale Reaktion auf photooxidiertes Sulfamethoxazol zu verzeichnen war.

Das durch die SO<sub>2</sub>-Extrusion freigesetzte SO<sub>2</sub>, könnte möglicherweise eine plausible Erklärung für die toxische Wirkung der Photooxidationsprodukte darstellen. Auf der anderen Seite wurde bei der massenspektroskopischen Untersuchung unserer Proben festgestellt, dass bei der Photooxidation von Sulfathiazol keine SO<sub>2</sub>-Extrusion

stattfand (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Gerd Hamscher, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2012). Dennoch hat das Abbauprodukt von Sulfathiazol einen negativen Effekt auf die Zellvitalität. BOREEN et al. (2004) konnten jedoch beim Abbau von Sulfathiazol unter den entstehenden Produkten, die zum Großteil aus Sulfanilsäure bestanden, einen geringen Anteil von Sulfanilamid detektieren. TROVO et al. (2009b) wiesen nach, dass die entstandene Sulfanilsäure in ihrer Studie keine toxische Wirkung auf *Daphnia magna* hatte, sondern diese weiteren Abbauprodukten zuzuschreiben war. Eventuell wurde also der geringe Sulfanilamidanteil weiter abgebaut und entspricht damit der Wirkung der Degradationsprodukte von Sulfanilamid. Interessanterweise bewirkt das Photooxidationsprodukt von Sulfanilamid im Gegensatz zu den anderen bestrahlten Sulfonamiden in unseren Experimenten bereits in niedrigen Konzentrationen appliziert, nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden einen negativen Einfluss auf die Keratinozytenvitalität. Über das Abbauprodukt von Sulfanilamid ist in der Literatur kaum etwas bekannt. Sulfanilamid wird unter UV-Bestrahlung fast vollständig degradiert, dementsprechend ist ein größerer Gehalt an Abbauprodukten vorhanden im Vergleich zu den anderen Sulfonamiden. Dies könnte möglicherweise einen Grund für die vermehrt toxische Wirkung darstellen. Auch JUNG et al. (2008) beobachteten bei den von ihnen untersuchten Sulfonamiden einen sich in Abhängigkeit von Expositionsdauer erhöhenden toxischen Effekt.

Einen weiteren Grund für die zytotoxische Wirkung könnten durch Photolyse entstehende Radikale darstellen. GOLPASHIN et al. (1984) postulierten, dass es während einer lichtinduzierten Zersetzung von Sulfonamiden zur Radikalbildung kommt, die durch Rekombination, Dimerisation, Abstraktion oder aber auch durch Umlagerung zu weiteren Folgeprodukten führen können. Auch MOORE (1998) beobachtete bei der Photooxidation von Sulfamethoxazol, dessen Rest wie bei Sulfathiazol aus einem C<sub>5</sub>-Ring besteht, die Bildung von Radikalen, deren Entstehung insbesondere unter dem Einsatz von Photokatalysatoren verzeichnet wurde (HU et al. 2007; YANG et al. 2010), allerdings wurden Photokatalysatoren in dieser Arbeit nicht verwendet.

## Diskussion

Ähnlich dem Vitalitätsassay verursachen fast alle Photooxidationsprodukte, entstanden aus einer bestrahlten Lösung mit einer Ausgangskonzentration von 50 µg/ml, eine Inhibition der Zellproliferation. Interessanterweise stimuliert allerdings das Degradationsprodukt von Sulfanilamid die Zellproliferation der Keratinozyten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Dieses Ergebnis ist vor dem Hintergrund, dass die Sulfanilamidprodukte im Zytotoxizitätstest schon in den geringen Konzentrationen einen toxischen Effekt haben, schwer zu erklären und entspricht nicht den Erwartungen. Eine Erklärungsmöglichkeit stellt die Umwandlung des Sulfanilamids durch Photolyse oder mögliche nachfolgende Reaktionen in die strukturell sehr ähnliche Paraaminonobenzoesäure dar, die die Zellproliferation anregt. Warum dies scheinbar aber nicht im Zytotoxizitätstest geschieht, muss abgeklärt werden. In Bezug auf das Proliferationsverhalten erscheinen die Fibroblasten im Allgemeinen in den durchgeführten Versuchen empfindlicher als die Keratinozyten auf die Photooxidationsprodukte zu reagieren, da sie bereits bei einigen Photooxidationsprodukten in geringer Konzentration aufgetragen, mit einer verminderten Zellproliferation reagieren.

Sowohl die Ergebnisse von JUNG et al. (2008) als auch unsere Resultate verdeutlichen, dass der Einsatz von UV-Strahlung zum Zwecke der Sulfonamiddegradation unter dem Aspekt der Toxizität und des Proliferationsverhaltens als negativ anzusehen ist. Jedoch konnte auf der anderen Seite in dieser Arbeit für alle untersuchten Sulfonamide nachgewiesen werden, dass es durch die Photooxidation zum Verlust der antibakteriellen Wirkung kommt. Dies wiederum ist ein Vorteil der Photooxidation. Das antibakterielle Verhalten der Photooxidationsprodukte ist im Hinblick auf den Eintrag in die Umwelt sehr wichtig. Das Risiko der Resistenzbildungen in der Umwelt wird im Vergleich zu einer antimikrobiell wirksamen Substanz, die in die Umwelt gelangt, beträchtlich gemindert. Der Verlust der antibakteriellen Aktivität könnte möglicherweise durch die Aufspaltung der S-N-Verbindung bzw. die SO<sub>2</sub>-Extrusion während der Photolyse entstehen. Eine weitere Erklärung könnte der Verlust der für die antimikrobielle Aktivität ausschlaggebende para-Stellung der Substituenten sein.

Die bislang in der Umwelt gemessenen Sulfonamidkonzentrationen lagen unterhalb von 50 µg/ml (WINCKLER et al. 2004; HAMSCHER et al. 2005a), allerdings beziehen sich diese Werte auf unbestrahlte Sulfonamide, die ein geringes toxisches Potential aufweisen. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass in der Zukunft Untersuchungen über die in der Umwelt erreichten Konzentrationen der Photooxidationsprodukte angestellt werden. Auch bleibt zu prüfen, ob sie einen toxischen Effekt auf Mikroorganismen oder gar höhere Lebewesen haben.

### **5.2 *In-vivo*-Experimente**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Rolle des Stallstaubes als Eintragspfad für Veterinärarzneimittel in die Umwelt untersucht. Die Tatsache, dass Stäube Arzneistoffe beinhalten, die im Stall verabreicht wurden, konnten HAMSCHER et al. (2003) in einer retrospektiven Studie nachweisen. Die kontaminierten Stallaerosole können über das Abluftsystem in die Außenwelt gelangen, wo sie über 100 Meter vom Stall entfernt in der Außenumgebung nachgewiesen wurden (HARTUNG et al. 1998). Wie bereits aufgeführt, besteht in der Umwelt die Möglichkeit, dass sie sich auf Nutzpflanzen ablagern und auf diesem Weg in die Nahrungskette gelangen. Außerdem könnten sie in nahe gelegene Oberflächengewässer eingetragen werden sowie im Allgemeinen wegen ihrer sehr geringen Konzentration die Resistenzbildung in der Umwelt fördern.

Stäube stellen auch aufgrund ihrer Inhaltsstoffe ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier insbesondere in Form von Atemwegserkrankungen dar (DONHAM 1990; PLATZ et al. 1995; NOWAK 1998; IVERSEN et al. 2000; MC DONNELL et al. 2008). Für maximale Gesamtstaubwerte und alveolengängige Fraktionen existieren lediglich MAK-Werte, die sich jedoch auf eine achtstündige Expositionsdauer des Menschen beziehen und nicht speziell für die Nutztierhaltung gelten. Für Tiere, die 24 Stunden pro Tag dem Staubaufkommen ausgesetzt sind, sind laut Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung keine Grenzwerte für Stäube in Tierställen festgelegt.

## Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wahl einer staubarmen Futterformulierung bei oraler Medikation die Staubentwicklung per se und damit korrelierend den Arzneimiteleintrag im Stall erheblich reduziert. Daraus resultierend gelangt weniger Wirkstoff über Abluftvorrichtungen in die Außenwelt. Eine weitere positive Konsequenz ist die Verbesserung der Atemwegsgesundheit.

Mittels oraler Medikation in Pellets wurden im Tier analoge Wirkspiegel zur Mehlfütterung erreicht. Die Arzneistoffapplikation im pelletierten Futter stellt somit ein geeignetes Mittel zur oralen Therapie dar.

Während es bei der Pelletfütterung nur durch den Abrieb der Pellets untereinander zur Staubentwicklung und Sulfadiazinfreisetzung kommt, werden während der Mehlfütterung durch das hohe Staubpotential erheblich größere Sulfadiazingehalte in die Stallumgebung freigesetzt. Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass sich Sulfadiazin luftgetragen in der Stallumgebung verteilt, da es sowohl in den Aerosolen als auch in den Sedimentationsstäuben, deren Probeentnahmestellen sich teilweise in 2 m Höhe befanden, detektiert werden konnte.

Eine staubarme Futterformulierung wie z. B. pelletiertes Futter zur oralen Medikation stellt somit ein wirksames Mittel zur Reduzierung des Arzneimiteleintrages in die Umwelt dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die orale Medikation der *in praxi* eingesetzten Dosis über das Futter zu einer Arzneimittelverschleppung im Stall führt. Für diesen Versuch wurde vorab eine Verschleppung simuliert, indem subtherapeutische Dosen von 2,5 mg/kg KG und 5 mg/kg KG an die Ferkel verabreicht wurden. Außerdem wurde überprüft, ob die erreichten Konzentrationen im Probenmaterial detektierbar sind.

Der Versuchsaufbau des Verschleppungsversuches („Passivversuch“) an sich erfolgte in Anlehnung an KIETZMANN et al. (1995). Während des Probenentnahmezeitraumes von vier Tagen ist bis zu 0,1 µg/ml Sulfadiazin im Plasma nachweisbar. Urinproben wurden über sechs Tage genommen, in denen sich in diesem Zeitraum in abfallender Konzentration Sulfadiazingehalte von 3,5–1 µg/ml

## Diskussion

detektieren lassen. Dies belegt, dass die unbehandelten Schweine das verschleppte Sulfadiazin aus der Umgebung aufnehmen. ELLIOTT et al. (1994) detektierten in einem ähnlich konfigurierten Versuch schon nach einstündiger Exposition Sulfamethazin im Urin unbehandelter Schweine. Auch KIETZMANN et al. (1995) wiesen in ihrer Studie im Urin unbehandelter Schweine über sechs Tage lang bis zu 4 µg/ml Sulfamethazin nach, das von den Tieren in einem nur trocken gereinigten Stall aufgenommen wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem detektierbare Sulfadiazingehalte sowohl in den Sedimentationsstäuben als auch den Aerosolen nachgewiesen, die bereits bei der vorausgehenden oralen Medikation in bestimmungsgemäßer Dosis entstanden waren. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutungen der vorangegangenen Untersuchungen, dass Sulfadiazin unter anderem über den Stallstaub übertragen wird. Die Bewegungsaktivität der Tiere spielt eine große Rolle, da dadurch der Staub in der Nähe der Bucht vermehrt aufgewirbelt und in die Umgebungsluft verbracht wird. Auf diesem Wege, möglicherweise durch die Luftströme des Lüftungssystems unterstützt, verteilen sich die Arzneistoffe im Stall (TAKAI et al. 1998; PEDERSEN et al. 2000).

Die Verschleppung subtherapeutischer Dosen ist im Hinblick auf die Bildung von Resistenzen ein sehr wichtiger Aspekt. Zwar ist der Antibiotikagehalt der inhalierten Stäube in der Lunge zu gering, um einen antimikrobiellen Effekt zu bewirken, jedoch bietet die permanente Exposition in subtherapeutischen Dosen möglicherweise optimale Bedingungen für eine Resistenzentwicklung (TAKAI et al. 1998). Bei entsprechendem Tierbestand kann eine relativ große Tieranzahl den verschleppten Sulfadiazinkonzentrationen ausgesetzt sein. Ein weiteres Problem stellt das Auftreten von Antibiotikarückständen im Gewebe eigentlich unbehandelter Tiere dar. Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit sah keine Gewebeprobenentnahme vor, jedoch konnten ELLIOTT et al. (1994) in ihrem Verschleppungsversuch bereits nach zweistündigem Aufenthalt in einem nur trocken gereinigten Stall Sulfamethazin in der Niere und im Muskelgewebe unbehandelter Tiere nachweisen. Dabei wurde im Zielgewebe die Rückstandshöchstmenge gemäß EU-Verordnung Nr. 37/2010 von

0,1 µg/ml überschritten. Der schnelle Anstieg in den Geweben nach bereits kurzer Expositionsdauer konnte Ergebnisse von MCCAUGHEY et al. (1990) bestätigen.

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sulfonamide unter dem Einfluss von UV-Strahlung photodegradiert werden. Trotz des ähnlichen Strukturaufbaus erfolgt der Abbau der untersuchten Sulfonamide in unterschiedlichem Ausmaß, das zum einen von der Lichtintensität der verwendeten Strahlungsquellen und zum anderen von den Wellenlängen der eingesetzten UV-Spektren bestimmt wurde. Aus der Literatur wird ersichtlich, dass weitere Faktoren die Photodegradation der Sulfonamide beeinflussen, jedoch war eine nähere Untersuchung dieser Kriterien nicht Ziel dieser Arbeit.

Die entstandenen Photooxidationsprodukte wirken in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration zytotoxisch und haben einen negativen Effekt auf die Zellproliferation. In Bezug auf die unbestrahlten Ausgangssubstanzen werden diese Konzentrationen in der Umwelt nicht erreicht. Über die in der Umwelt vorliegenden Konzentrationen der Photooxidationsprodukte wurden jedoch in dieser Hinsicht bislang keine Untersuchungen angestellt. Als grundsätzlich positiv im Hinblick auf die Resistenzsituationen in der Umwelt ist der mittels Photooxidation verursachte Verlust der antimikrobiellen Aktivität zu bewerten.

Da bislang nur wenige Studien über die Abbauprodukte und ihre Eigenschaften durchgeführt wurden, besteht besonders unter dem Aspekt der Biokompatibilität nach wie vor großer Forschungsbedarf. Besonders die toxische Potenz der Photooxidationsprodukte indiziert für die Zukunft eine konkrete Untersuchung und kritische Betrachtung des Photoabbaus als Instrument für einen reduzierten Arzneimiteleintrages in die Umwelt. Nach dem *Status quo* sollte die UV-Irradiation als Abbaumöglichkeit von Sulfonamiden nicht in Erwägung gezogen werden.

Der im Rahmen dieser Arbeit simulierte Verschleppungsversuch ("Passivversuch") verdeutlicht, dass es durch die Mehlfütterung zu einer Sulfadiazinverschleppung im



## Diskussion

Tierstall kommt und konkretisiert außerdem die Wichtigkeit des Hygienemanagements. Über die Stallaerosole und Stäube sowie Chemotherapeutika in Ausscheidungen therapierter Tiere besteht die Möglichkeit, dass unbehandelte Schweine in schlecht gereinigten Ställen die verschleppten Arzneimittel aufnehmen. Dies führt zu nachweisbaren Sulfadiazinspiegeln in Plasma sowie Urin und war in vorausgegangenen Studien sogar ein Grund zur Schlachtkörperbeanstandung unter dem Gesichtspunkt der Rückstandsproblematik.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass bei oraler Medikation durch die Wahl einer staubarmen Futterformulierung wie z. B. Pellets, sowohl die Staubentwicklung per se als auch der Sulfadiazineintrag in die Stallumgebung deutlich reduziert werden kann. Dies mindert zum einen die gesundheitliche Belastung von Mensch und Tier und ist durch die Verschleppung subtherapeutischer Dosen auch im Hinblick auf Resistenzentwicklungen ein wichtiger Aspekt. Der verminderte Arzneistoffeintrag in die Stallumgebung sowie in die Aerosole hat auch zur Konsequenz, dass weniger Sulfadiazin über die Abluftvorrichtungen in die Außenwelt gelangt. Eine staubarme Futterformulierung zur oralen Medikation stellt somit ein wirksames Mittel zur Reduzierung des Arzneimittleintrages in die Umwelt dar.

## 6 Zusammenfassung

Katrin Zessel

### **Verringerung des Eintrags von Tierarzneimittelrückständen in die Umwelt mit besser abbaubaren Sulfonamiden**

Veterinärantibiotika und darunter auch die Sulfonamide gelangen über zahlreiche Eintragspfade, insbesondere jedoch über die Gülle, in die Umwelt. Auch belastete Stallstäube stellen ein Kontaminationsrisiko für die Umwelt dar (BOXALL et al. 2004; HAMSCHE 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung verschiedener Verfahren, durch die sich der Eintrag von Sulfonamidrückständen in die Umwelt reduzieren lässt.

Unter dem Aspekt, dass Sulfonamide photooxidierbar sind, wurde die Photodegradation neun verschiedener Sulfonamide untersucht und mittels HPLC detektiert. Unter UVA/UVB-Licht-Irradiation werden Sulfanilamid und Sulfathiazol hochgradig degradiert, während Sulfamethoxypyridazin, Sulfachloropyridazin, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfadimethoxin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadiazin mittel- bis geringgradig abgebaut werden. Vergleichende Untersuchungen zwischen eingesetztem UVA/UVB-Licht sowie UVA-Strahlung veranschaulichen, dass die Wellenlänge die Degradationsrate beeinflusst. Auch bei Sonnenlichtexposition unter Feldbedingungen führt diese bei den einzelnen Sulfonamiden zu unterschiedlich starkem Photoabbau.

Die Photooxidationsprodukte wurden anschließend hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht. Mittels MTS-Vitalitätsassay sowie Kristallviolett-Proliferationsassay konnte gezeigt werden, dass die Photodegradationsprodukte, entstanden aus einer unbestrahlten Sulfonamidlösung in einer ursprünglichen Konzentration von 50 µg/ml, toxisch wirken und die Zellproliferation negativ beeinflussen.

Zur Detektion der antibakteriellen Aktivität der Degradationsprodukte wurde ein modifizierter Brillantschwarz-Reduktionstest verwendet. Die Ergebnisse

## Zusammenfassung

dokumentieren, dass die Photooxidation den Verlust der antibakteriellen Aktivität verursacht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Wahl der Futterformulierung die Staubentwicklung und damit korrelierend den Arzneimiteleintrag im Stall erheblich beeinflusst.

Sechs Schweine wurden jeweils über vier Tage mit Mehlfutter, in das Sulfadiazin als Testsubstanz eingemischt wurde, gefüttert. Der Sulfadiazingehalt wurde im Plasma und im Urin, in Sedimentationsstäuben sowie in Stallaerosolen bestimmt. Entsprechend wurde ein Versuch mit pelletiertem Futter durchgeführt. Die detektierten Sulfadiazingehalte in den Sedimentationsstäuben sowie Aerosolen waren während der Pelletfütterung deutlich geringer im Vergleich zur Mehlfütterung.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die orale Medikation über das Futter zu einer Arzneimittelverschleppung im Stall führt. Für diesen Versuch wurde sechs Schweinen über einige Tage Sulfadiazin über das Futter verabreicht, nach Abschluss der Behandlung wurden die Tiere ausgestallt und die Bucht trocken gereinigt. Nachfolgend wurden unbehandelte Schweine in die gleiche Bucht eingestallt. Diese Tiere wiesen über mehrere Tage nachweisbare Sulfadiazingehalte im Plasma und Urin auf. Auch in den Sedimentationsstäuben sowie Aerosolen ließ sich Sulfadiazin detektieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass bei der oralen Medikation durch die Wahl einer staubarmen Futterformulierung, sowohl die Staubentwicklung per se als auch der Sulfadiazineintrag in die Stallumgebung deutlich reduziert werden kann. Dies mindert zum einen die gesundheitliche Belastung von Mensch und Tier und ist durch die Verschleppung subtherapeutischer Dosen auch im Hinblick auf Resistenzentwicklungen ein wichtiger Aspekt. Infolge einer verminderten Staubproduktion im Tierstall wird der Arzneimiteleintrag über das Abluftsystem in die Umwelt reduziert.

### 7 Summary

Katrin Zessel

#### **Decreased entry of veterinary drug residues into the environment by improved degradability of sulphonamides**

Veterinary antibiotics including sulphonamides are released into the environment by various pathways in particular by manure. Drug contaminated dust originating from livestock farming possesses the risk of environmental contamination, as well (BOXALL et al. 2004; HAMSCHEER 2008).

The aim of this study was the determination of different ways of preventing environmental pollution by sulphonamides. Considering the photooxidability of sulphonamides, the photodegradation of nine different sulphonamides was investigated and measured by HPLC. UVA/UVB irradiation leads to high degradation of sulphanilamide and sulfathiazole whereas sulphamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole and sulfadiazine merely undergo moderate or mild degradation. Comparative studies exposing sulphonamides to UVA/UVB- vs. UVA-light reveal the impact of wavelengths in regard to the amount of degradation. Exposure of sulphonamides to sunlight under field conditions leads to degradation of different degrees.

The biocompatibility of the degrading products was studied subsequently by MTS-viability assay and crystal violet-proliferation assay with regard to their environmental sustainability. The results illustrate toxic effects on cell viability and proliferation caused by products of photodegradation emerged from a non-irradiated solution containing sulphonamide in concentrations of 50 µg/mL.

The antimicrobial activity of the products degradation was evaluated by the brilliant-black reduction test, which reveals the loss of antibacterial activity caused by UVA/UVB-irradiation.

## Summary

The results of this study indicate that the choice of feeding formulation influenced the environmental pollution by veterinary drugs according to dust formation during the feeding process.

Six pigs were orally treated with powder or pellet feeding containing sulfadiazine for four days respectively. Plasma and urine samples of the pigs as well as samples of dust sedimentation and aerosol of the stable were analyzed for sulfadiazine. Pellet feeding generated a lower content of sulphadiazine in sedimentation dust and stable aerosol in contrast to powder feeding.

Furthermore, it could be proved that oral medication by feeding resulted in drug carry-over in the stable setting. Six pigs were orally medicated with sulphadiazine via feeding. At the end of the treatment period the six pigs were removed, the bay was dry-cleaned and different non-treated pigs were stabled in that bay. Plasma and urine samples of these pigs contained detectable amounts of sulphadiazine for up to six days. Sedimentation powder and aerosol samples were also contaminated.

The results of this study demonstrate that the application of medicated feeding with low dust potential led to substantial dust reduction and diminished stable contamination by sulphadiazine. Consequentially, it led to reduced health hazards in humans and animals as well as to less carry-over of subtherapeutic concentrations, which in turn has an important impact with regard to the development of antibiotic resistance.

The emission of drugs by way of the exhaust ventilation air decreased due to the reduced amount of dust appearance in the stable.

## 8 Literaturverzeichnis

AHMAD, A., A. GHOSH, C. SCHAL u. L. ZUREK (2011):

Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community.

BMC Microbiol. 11, 1-13

AVISAR, D., Y. LESTER u. H. MAMANE (2010):

pH induced polychromatic UV treatment for the removal of a mixture of SMX, OTC and CIP from water.

J. Hazard. Mater. 175, 1068-1074

BAERT, K., S. DE BAERE, S. CROUBELS, F. GASTHUYS u. P. DE BACKER (2001):

Pharmacokinetics and bioavailability of sulfadiazine and trimethoprim (trimazin 30%) after oral administration in non-fasted young pigs.

J. Vet. Pharmacol. Ther. 24, 295-298

BAGUER, A. J., J. JENSEN u. P. H. KROGH (2000):

Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna.

Chemosphere 40, 751-757

BARAN, W., J. SOCHACKA u. W. WARDAS (2006):

Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions.

Chemosphere 65, 1295-1299

BARAN, W., E. ADAMEK, A. SOBCZAK u. A. MAKOWSKI (2009):

Photocatalytic degradation of sulfa drugs with TiO<sub>2</sub>, Fe salts and TiO<sub>2</sub>/FeCl<sub>3</sub> in aquatic environment - Kinetics and degradation pathway.

Appl. Catal. B Environ. 90, 516–525

BERGER, K., B. PETERSEN u. H. BÜNING-PFAUE (1986):

Persistenz von Gülle-Arzneistoffen in der Nahrungskette.

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 99-102

BERNHARDT, G., H. REILE, H. BIRNBÖCK, T. SPRUSS u. H. SCHÖNENBERGER (1992):

Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118, 35-43

BOREEN, A. L., W. A. ARNOLD u. K. MCNEILL (2004):

Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups.

Environ. Sci Technol. 38, 3933-3940

BOREEN, A. L., W. A. ARNOLD u. K. MCNEILL (2005):

Triplet-sensitized photodegradation of sulfa drugs containing six-membered heterocyclic groups: identification of an SO<sub>2</sub> extrusion photoproduct.

Environ. Sci. Technol. 39, 3630-3638

BOXALL, A. B. A. (2004):

The environmental side effects of medication.

EMBO reports 5, 1110-1116

BROLL, S., M. KIETZMANN, U. BETTIN u. L. KREIENBROCK (2002):

Use of medicated feedingstuffs in animal production in Schleswig-Holstein.

Tierärztl. Praxis 30, 357-361

## Literaturverzeichnis

BROWN, M. P., R. H. KELLY, S. M. STOVER u. R. GRONWALL (1983):

Trimethoprim-sulfadiazine in the horse: serum, synovial, peritoneal, and urine concentrations after single-dose intravenous administration.

Am. J. Vet. Res. 44, 540-543

BURKHARDT, M., C. STAMM, C. WAUL, H. SINGER u. S. MULLER (2005):

Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland.

J. Environ. Qual. 34, 1363-1371

BUSHBY, S. R. (1980):

Sulfonamide and trimethoprim combinations.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 176, 1049-1053

BUSHBY, S. R. u. G. H. HITCHINGS (1968):

Trimethoprim, a sulphonamide potentiator.

Br. J. Pharmacol. Chemother. 33, 72-90

CHAPIN, A., A. RULE, K. GIBSON, T. BUCKLEY u. K. SCHWAB (2005):

Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation.

Environ. Health Perspect. 113, 137-142

DOLLIVER, H., K. KUMAR u. S. GUPTA (2007):

Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil.

J. Environ. Qual. 36, 1224-1230

DONHAM, K. J. (1990):

Health effects from work in swine confinement buildings.

Am. J. Ind. Med. 17, 17-25



ELLIOTT, C. T., W. J. MCCAUGHEY, S. R. CROOKS u. J. D. MCEVOY (1994):  
Effects of short term exposure of unmedicated pigs to sulphadimidine contaminated housing.

Vet. Rec. 134, 450-451

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2007):

Scientific committees

<http://ec.europa.eu/health/opinions2/de/glossar/tuv/uv-strahlung.htm>

FODEY, T. L., S. R. CROOKS, C. T. ELLIOTT u. W. J. MCCAUGHEY (1997):  
Comparison of porcine urine and bile as matrices to screen for the residues of two sulfonamides using a semi-automated enzyme immunoassay.

Analyst. 122, 165-168

FÖRSTER, M., V. LAABS, M. LAMSHÖFT, J. GROENEWEG, S. ZÜHLKE, M. SPITELLER, M. KRAUSS, M. KAUPENJOHANN u. W. AMELUNG (2009):

Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils.

Environ. Sci. Technol. 43, 1824-1830

FRIMMEL, F. H. u. M. B. MÜLLER (2006):

Heil-Lasten: Arzneimittelrückstände in Gewässern.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

GARCIA-GALAN, M. J., T. GARRIDO, J. FRAILE, A. GINEBREDÁ, M. S. DIAZ-CRUZ u. D. BARCELO (2011):

Application of fully automated online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides and their acetylated metabolites in groundwater.

Anal. Bioanal. Chem. 399, 795-806

GARCIA-GALAN, M. J., M. S. DIAZ-CRUZ u. D. BARCELO (2012):

Kinetic studies and characterization of photolytic products of sulfamethazine, sulfapyridine and their acetylated metabolites in water under simulated solar irradiation.

Water Res. 46, 711-722

GARWACKI, S., J. LEWICKI, M. WIECHETEK, S. GRYS, J. RUTKOWSKI u. M. ZAREMBA (1996):

A study of the pharmacokinetics and tissue residues of an oral trimethoprim/sulphadiazine formulation in healthy pigs.

J. Vet. Pharmacol. Ther. 19, 423-430

GILLIES, R. J., N. DIDIER u. M. DENTON (1986):

Determination of cell number in monolayer cultures.

Anal. Biochem. 159, 109-113

GIVENS, R. S., B. HRINCZENKO, J. H.-S. LIU u. B. T.-C. MATSZEWSKI, J. (1984):

Photoextrusion of SO<sub>2</sub> from arylmethyl sulfones: exploration of the mechanism by chemical trapping, chiral, and CIDNP probes.

J. Am. Chem. Soc. 106, 1779-1789

GOLPASHIN, F., B. WEISS u. H. DÜRR (1984):

Photochemical model studies on skin photosensitizing drugs: sulfonamides and sulfonylureas.

Arch. Pharm. 317, 906-913

GROTE, M., C. SCHWAKE-ANDUSCHUS, R. MICHEL, H. STEVENS, W. HEYSER, G. LANGENKÄMPER, T. BETSCHE u. M. FREITAG (2007):

Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil.

Landbauforschung Völkenrode 1 57, 25-32

GUERARD, J. J., Y. P. CHIN, H. MASH u. C. M. HADAD (2009):  
Photochemical fate of sulfadimethoxine in aquaculture waters.  
Environ. Sci. Technol. 43, 8587-8592

GUISE, H. J., R. H. PENNY u. D. J. PETHERICK (1986):  
Streptococcal meningitis in pigs: field trial to study the prophylactic effect of  
trimethoprim/sulphadiazine medication in feed.  
Vet. Rec. 119, 395-400

HAHN, J. U. u. C. MÖHLMANN (2011):  
Neuer A-Staub-Grenzwert - Aspekte für dessen Anwendung.  
Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 71, 429-432

HALLER, M. Y., S. R. MÜLLER, C. S. MCARDELL, A. C. ALDER u. M. J. SUTER  
(2002):  
Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal  
manure by liquid chromatography-mass spectrometry.  
J. Chromatogr. A 952, 111-120

HAMSCHER, G., S. SCZESNY, H. HÖPER u. H. NAU (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

HAMSCHER, G., H. T. PAWELZICK, S. SCZESNY, H. NAU u. J. HARTUNG (2003):  
Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health  
hazard for farmers?  
Environ. Health Perspect. 111, 1590-1594

## Literaturverzeichnis

HAMSCHER, G., H. T. PAWELZICK, H. HÖPER; H. NAU (2005a):

Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure.

Environ. Toxicol. Chem. 24, 861-868

HAMSCHER, G., H. T. PAWELZICK, H. HÖPER u. H. NAU (2005b):

Tierarzneimittel in Böden – eine Grundwassergefährdung?

Tagungsband des Fachgespräches “Arzneimittel in der Umwelt – Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt“, UBA-Texte 29, 175 – 184

HAMSCHER, G. (2008):

Review: Tierarzneimittel in der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von Stallstäuben.

J. Verbr. Lebensm. 3, 165 – 173

HARTUNG, J., J. SEEDORF, T. TRICKL u. H. GRONAUER (1998):

Emission of particulates from a pig farm with central air exhaust in the pig stall.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 105, 244-245

HAWKING, F. (1945):

Pharmacology of sulphonamides: recent work.

Br. Med. J. 1, 505-509

HERBOLD, M. u. G. SCHMITT (2000):

Validierung und Analyseverfahren - Theorie und Praxis.

GTFCh-Weiterbildung Kirkel 2000

HIRSCH, R., T. TERNES, K. HABERER u. K. L. KRATZ (1999):

Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.

Sci. Total Environ. 225, 109-118

## Literaturverzeichnis

HOM, F. S. u. J. AUTIAN (1956):

Study of stability of sulfadiazine sodium injection. I. Determination of solubility of sulfadiazine sodium as a function of pH in several parenteral solvent systems.

J. Am. Pharm. Assoc. 45, 608-611

HÖPER, H., J. KUES, H. NAU u. G. HAMSCHER (2002):

Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden.

Bodenschutz 7, 141-148

HU, L., P. M. FLANDERS, P. L. MILLER u. T. J. STRATHMANN (2007):

Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO<sub>2</sub> photocatalysis.

Water Res. 41, 2612-2626

IVERSEN, M., S. KIRYCHUK, H. DROST u. L. JACOBSON (2000):

Human health effects of dust exposure in animal confinement buildings.

J. Agric. Saf. Health 6, 283-288

JUNG, J., Y. KIM, J. KIM, D. H. JEONG u. K. CHOI (2008):

Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*.

Ecotoxicology (London, England) 17, 37-45

KANIOU, S., K. PITARAKIS, I. BARLAGIANNI u. I. POULIOS (2005):

Photocatalytic oxidation of sulfamethazine.

Chemosphere 60, 372-380

KAY, P., P. A. BLACKWELL u. A. B. BOXALL (2005):

Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land.

Chemosphere 59, 951-959

KIETZMANN, M., W. MARKUS, J. CHAVEZ u. W. BOLLWAHN (1995):

Drug residues in untreated swine.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 102, 441-442

KIM, I. u. H. TANAKA (2009):

Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment.

Environ. Int. 35, 793-802

KRATZ, W., B. ABBAS u. I. LINKE (2000):

Arzneimittelwirkstoffe in der Umwelt.

UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 12, 343-349

KREIENBROCK, L (2011):

Erfassung des Antibiotikaverbrauchs als Grundlage von Verminderungsstrategien in der Veterinärmedizin.

Statusseminar „Arzneistoffe in der Umwelt“, Dresden

KREUZIG, R. u. S. HÖLTGE (2005):

Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies.

Environ. Toxicol. Chem. 24, 771-776

KREUZIG, R., S. HÖLTGE, J. BRUNOTTE, N. BERENZEN, J. WOGRAM u. R. SCHULZ (2005):

Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation.

Environ. Toxicol. Chem. 24, 777-781

KREUZIG, R., S. HÖLTGE, J. HEISE, M. KOLB, N. BERENZEN, T. HAHN, S. JERGENTZ, J. WOGRAM u. R. SCHULZ (2007):

Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide.

Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 202 67 435, UBA-Texte 24, 1-162

KROKER, R. (2010):

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen.

In LÖSCHER, W., F. R. UNGEMACH u. R. KROKER: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.

7. Auflage, Parey in Medizinverlag Stuttgart, Stuttgart

KROMIDAS, S. (1999):

Validierung in der Analytik.

In: GRUBER, U. u. W. KLEIN (Hrsg.): Die Praxis der instrumentellen Analytik.

Verlag Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapur, Toronto

KUMAR, K., S. C. GUPTA, S. K. BAIDOO, Y. CHANDER u. C. J. ROSEN (2005):

Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure.

J. Environ. Qual. 34, 2082-2085

KÜMMERER, K. (2004):

Resistance in the environment.

J. Antimicrob. Chemother. 54, 311-320

LAI, H. T. u. J. H. HOU (2008):

Light and microbial effects on the transformation of four sulfonamides in eel pondwater and sediment.

Aquaculture 283, 50-55

LAI, H. T., T. S. WANG u. C. C. CHOU (2011):

Implication of light sources and microbial activities on degradation of sulfonamides in water and sediment from a marine shrimp pond.

Bioresour. Technol. 102, 5017-5023

LAM, M. W., C. J. YOUNG, R. A. BRAIN, D. J. JOHNSON, M. A. HANSON, C. J. WILSON, S. M. RICHARDS, K. R. SOLOMON u. S. A. MABURY (2004):

Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study.

Environ. Toxicol. Chem. 23, 1431-1440

LAM, M., W. u. S. A. MABURY (2005):

Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters.

Aquat. Sci. 67, 177-188

LAMSHÖFT, M., P. SUKUL, S. ZÜHLKE u. M. SPITELLER (2007):

Metabolism of <sup>14</sup>C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs.

Anal. Bioanal. Chem. 388, 1733-1745

LAMSHÖFT, M., P. SUKUL, S. ZÜHLKE u. M. SPITELLER (2010):

Behaviour of (<sup>14</sup>C)-sulfadiazine and (<sup>14</sup>C)-difloxacin during manure storage.

Sci. Total. Environ. 408, 1563-1568

LESTER, Y., I. GOZLAN, D. AVISAR u. H. MAMANE (2008):

Photodegradation of sulphadimethoxine in water by medium pressure UV lamp.

Water Sci. Technol. 58, 1147-1154

LI, W., X. PENG, H. WANG, Z. LIANG u. Z. LUAN (2011):

Uv irradiation for removal of veterinary antibiotics.

Fresen. Environ. Bull. 20, 93-98



## Literaturverzeichnis

LINDNER, W. u. I. W. WAINER (1998):

Requirements for initial assay validation and publication in J. Chromatography B.  
J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 707, 1-2

LINDSEY, M. E., T. M. MEYER u. E. M. THURMAN (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

LÖSCHER, W. (1984):

Critical remarks on trimethoprim/sulfonamide combinations in veterinary medicine.  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 91, 135-139

MASCHKA, A., M. STEIN u. W. TRAUER (1953):

UV-Absorptionsspektren von Benzolsulfonamiden. I.  
Mh. Chem. 84, 1071-1083

MC DONNELL, P. E., M. A. COGGINS, V. J. HOGAN u. G. T. FLEMING (2008):

Exposure assessment of airborne contaminants in the indoor environment of Irish swine farms.

Ann. Agric. Environ. Med. 15, 323-326

MCCAUGHEY, W. J., C. T. ELLIOTT u. S. R. CROOKS (1990):

Carry-over of sulphadimidine in the faeces and urine of pigs fed medicated feed.  
Vet. Rec. 126, 351-354

MENGELERS, M. J., P. E. HOUGEE, L. H. JANSSEN u. A. S. VAN MIERT (1997):

Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemical properties of sulfonamides.

J. Vet. Pharmacol Ther. 20, 276-283

MILLER, G. H., P. H. DOUKAS u. J. K. SEYDEL (1972):

Sulfonamide structure-activity relationship in a cell-free system. Correlation of inhibition of folate synthesis with antibacterial activity and physicochemical parameters.

J. Med. Chem. 15, 700-706

MOORE, D. E. (1998):

Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs.

Mutat. Res. 422, 165-173

MOUAMFON, M. V., W. LI, S. LU, Z. QIU, N. CHEN u. K. LIN (2010):

Photodegradation of sulphamethoxazole under UV-light irradiation at 254 nm.

Environ. Technol. 31, 489-494

MOUAMFON, M. V. N., W. LI, S. LU, N. CHEN, Z. QUI u. K. LIN (2011):

Photodegradation of sulfamethoxazole applying UV- and VUV-based processes.

Water Air Soil Pollut. 218, 265–274

MUNSEY, T., R. E. GRIGG, A. MCCORMACK, H. W. SYMONDS u. C. J. BOWMER (1996):

Binding of sulphamethazine to pig plasma proteins and albumin.

J. Vet. Pharmacol. Ther. 19, 135-141

NIELSEN, P., C. FRIIS, N. GYRD-HANSEN u. F. RASMUSSEN (1986):

Metabolism of sulfadiazine in neonatal and young pigs. Comparative in vivo and in vitro studies.

Biochem. Pharmacol. 35, 2509-2512

NIELSEN, P. u. N. GYRD-HANSEN (1994):

Oral bioavailability of sulphadiazine and trimethoprim in fed and fasted pigs.

Res. Vet. Sci. 56, 48-52

## Literaturverzeichnis

NOUWS, J. F., T. B. VREE u. Y. A. HEKSTER (1985):

In vitro antimicrobial activity of hydroxy and N4-acetyl sulphonamide metabolites.

Vet. Q. 7, 70-72

NOUWS, J. F., D. MEVIUS, T. B. VREE u. M. DEGEN (1989):

Pharmacokinetics and renal clearance of sulphadimidine, sulphamerazine and sulphadiazine and their N4-acetyl and hydroxy metabolites in pigs.

Vet. Q. 11, 78-86

NOWAK, D. (1998):

Health effects of airborne pollutants particularly in swine confinement houses - a review on aspects of occupational medicine.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 105, 225-234

PAWELZICK, H. (2005):

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

Hannover, Universität Hannover, Diss.

PEDERSEN, K. B. (1973):

Excretion of some drugs in bovine tears.

Acta Pharmacol. Toxicol. 32, 455-466

PEDERSEN, S. (1998):

Dust reduction in pig houses.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 105, 247-250

PEDERSEN, S., M. NONNENMANN, R. RAUTIAINEN, T. G. DEMMERS, T. BANHAZI u. M. LYNGBYE (2000):

Dust in pig buildings.

J. Aric. Saf. Health 6, 261-274

PFEIFER, T., J. TUERK, K. BESTER u. M. SPITELLER (2002):

Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 663-669

PLATZ, S., M. SCHERER u. J. UNSHELM (1995):

Burden of fattening pigs and the environment of the pig fattening farms caused by lung-passing dust particles, pig stall specific bacteria and ammonia.

Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 196, 399-415

RIVIERE, J. E. u. M. G. PAPICH (2009):

Chemotherapie of microbial diseases

In RIVIERE, J. E. u. M. G. PAPICH: Veterinary pharmacology and therapeutics.

9. Auflage, Wiley-Blackwell, Iowa

SALEH, M. (2006):

Untersuchungen zur Luftqualität in verschiedenen Systemen der Geflügelhaltung mit besonderer Berücksichtigung von Staub und Luftkeimen.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, PhD-These

SCHNEIDEREIT, M. (2006):

Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen.

Vortrag auf der 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, 14. September 2006, Bonn.

[http://www.p-e-g.org/archiv\\_tmp/jahrestagung\\_20/jahrestagung\\_20\\_2006\\_d.htm](http://www.p-e-g.org/archiv_tmp/jahrestagung_20/jahrestagung_20_2006_d.htm)

SEEDORF, J. u. J. HARTUNG (1995):

Emission of airborne particulates from animal production.

Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 226, 15-22

SEEDORF, J. u. J. HARTUNG (2002):

Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung.

Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft, Darmstadt

SEYDEL, J. K. u. E. WEMPE (1977):

Untersuchungen zum synergistischen Verhalten und zur Pharmakokinetik von Sulfonamid-Trimethoprim-Kombinationen. IV. Eine vergleichende Untersuchung zur Potenzierung der Trimethoprim-Wirkung durch verschiedene Sulfonamide und eine kritische Betrachtung ihrer Dosierung

Arzneimittel-Forschung 27, 1521-1532

SHARMA, J. P., E. G. PERKINS u. R. F. BEVILL (1976):

High-pressure liquid chromatographic separation, identification, and determination of sulfa drugs and their metabolites in urine.

J. Pharm. Sci. 65, 1606-1608

SHIMODA, M., K. OKAMOTO, G. SIKAZWE, C. FUJII u. D. S. SON (1997):

Deacetylation as a determinant of sulphonamide pharmacokinetics in pigs.

Vet. Q. 19, 186-191

SOLI, N. E., T. FRAMSTAD, E. SKJERVE, S. SOHLBERG u. S. A. ODEGAARD (1990):

A comparison of some of the pharmacokinetic parameters of three commercial sulphadiazine/trimethoprim combined preparations given orally to pigs.

Vet. Res. Commun. 14, 403-410

SPITELLER, G. u. R. KASCHNITZ (1963):

Anwendung der Massenspektrometrie zur Untersuchung von Arzneimitteln, 1. Mitt.: Sulfonamide.

Mh. Chem. 94, 964-980

STRAUSS, E., F. C. LOWELL u. M. FINLAND (1941):

Observations on the inhibition of sulfonamide action by para-aminobenzoic acid.

J. Clin. Invest. 20, 189-197

SUKUL, P., M. LAMSHÖFT, S. ZÜHLKE u. M. SPITELLER (2008):

Photolysis of <sup>14</sup>C-sulfadiazine in water and manure.

Chemosphere 71, 717-725

TAKAI, H., S. PEDERSEN, J. O. JOHNSEN, J. H. M. METZ, P. W. G. GROOT KOERKAMP, G. H. UENK, V. R. PHILLIPS, M. R. HOLDEN, R. W. SNEATH, J. L. SHORT, R. P. WHITE, J. HARTUNG, J. SEEDORF, M. SCHRÖDER, K. H. LINKERT u. C. M. WATHES (1998):

Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe.

J. agric. Engng. Res. 70, 59-77

## Literaturverzeichnis

TROVO, A. G., R. F. NOGUEIRA, A. AGUERA, A. R. FERNANDEZ-ALBA, C. SIRTORI u. S. MALATO (2009a):

Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. chemical and toxicological evaluation.

Water Res. 43, 3922-3931

TROVO, A. G., R. F. NOGUEIRA, A. AGUERA, C. SIRTORI u. A. R. FERNANDEZ-ALBA (2009b):

Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment.

Chemosphere 77, 1292-1298

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE (1978);

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH):

Registry of toxic effects of chemical substances.

R. J. Lewis Sr.; R. L. Tatken

VAN DUIJKEREN, E., A. G. VULTO, M. M. SLOET VAN OLDRUITENBORGHOOSTERBAAN, D. J. MEVIUS, B. G. KESSELS, H. J. BREUKINK u. A. S. VAN MIERT (1994):

A comparative study of the pharmacokinetics of intravenous and oral trimethoprim/sulfadiazine formulations in the horse.

J. Vet. Pharmacol. Ther. 17, 440-446

VREE, T. B., E. W. BENEKEN KOLMER u. A. PEETERS (1991):

Comparison of the metabolism of four sulphonamides between humans and pigs.

Vet. Q. 13, 236-240

WATKINS, D. A. M. (1979):

Photochemical studies on pesticides.

Pestic. Sci. 10, 181-182

WEIß (1980):

Photochemie von Sulfonamiden und Sulfonylharnstoffen: Ein Beitrag zum Problem der Lichtdermatosen.

Angew. Chem. 92, 647-649

WERNER, J. J., A. L. BOREEN, B. EDHLUND, K. H. WAMMER, E. MATZEN, K. MCNEILL u. W. A. ARNOLD (2005):

Photochemical transformation of antibiotics in Minnesota waters.

CURA Reporter 35, 1-5

WINCKLER, C. u. A. GRAFE (2001):

Use of veterinary drugs in intensive animal production evidence for persistence of tetracycline in pig slurry.

J. Soils & Sediments 1, 66-70

WINCKLER, C., H. ENGELS, K. HUND-RINKE, T. LUCKOW, M. SIMON u. G. STEFFENS (2004):

Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden.

Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 200 73 248, UBA-Texte 44, 1-142

WOODS, D. D. (1940):

The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulfanilamide.

Br. J. Exp. Path. 21, 74-90

YANG, H., G. LI, A. T., Y. GAO u. J. FUA (2010):

Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub>: a case of sulfa drugs.

Catal. Today 153, 200–207



ZARFL, C., J. KLASMEIER u. M. MATTHIES (2009):

A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils.

Chemosphere 77, 720-726

ZEPP, R. G. (1985):

Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances.

Environ. Sci. Technol. 19, 74-81

ZEPP, R. G. u. D. M. CLINE (1977):

Rates of direct photolysis in aquatic environment.

Environ. Sci. Technol. 11, 359–366

ZHOU, W. u. D. E. MOORE (1994):

Photochemical decomposition of sulfamethoxazole.

Int. J. Pharm. 110, 55-63

## Danksagung

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Kietzmann für die Überlassung des interessanten Themas, seine hervorragende und jederzeit engagierte Betreuung sowie die sehr nette Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Jessica Stahl für ihre humorvolle Unterstützung, ihre selbstverständliche Hilfsbereitschaft und eine wirklich ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bäumer danke ich für seine Anregungen und Ratschläge sowie die freundliche Unterstützung.

Bei Dr. Kristine Rossbach und Stephan Schumacher, PhD bedanke ich mich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die geduldige Beantwortung diverser Fragen.

Ein großes Dankeschön geht an Viktoria Garder, Caroline Schulz, Vanessa Dewor, Theiss Wystemp und Hans-Herbert Bohr für ihre Hilfe im Labor, die gute Stimmung in der Arbeitsgruppe und für die schöne Zeit auch außerhalb des Instituts.

Vielen lieben Dank an Katrin für zwei tolle Jahre in unserem Doktorandenzimmer und unsere äußerst unterhaltsamen Gespräche bei einem wohlverdienten Heißgetränk. Verena danke ich für die schöne gemeinsame Zeit (auch wenn sie leider etwas kürzer war) und all die gedanklichen Ausflüge abseits der Pharma. Meinen weiteren Mitdoktoranden Hannah, Maren, Ruta, Bella, Britta, Yousra, Sarah, Thomas und Gesine danke ich für die lustige Zeit. Es war großartig mit euch!

Ein herzliches Dankeschön geht an die Verbundpartner des DBU-Projektes: die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher, Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Kümmerer, Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie, Fakultät für Nachhaltigkeit, Leuphana Universität Lüneburg und Herrn Dr. Heinrich

## Danksagung

Höper vom Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie in Hannover sowie die WDT. Vielen Dank für die kollegiale Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen im Rahmen der DBU-Projekt-Treffen. Ganz besonders danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher für die massenspektroskopische Untersuchung der Photooxidationsprodukte. Herrn Dr. Heinrich Höper danke ich für die Informationen zu den einzelnen Bodenarten und ihren Eigenschaften.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt möchte ich mich ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotionsarbeit bedanken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Jochen Schulz, Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover für die freundliche Überlassung der Luftprobenahmepumpen nebst Filtern, seine engagierte Hilfe und die Beantwortung zahlreicher Fragen rund um das Thema Stallstäube.

Großer Dank geht an Herrn Ernst Meier für seine geduldige Hilfe im Tierstall und seine Ideen, den Schweinen und mir das Leben während der Versuchsdauer zu verschönern.

Herrn Mike Patzer aus dem Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover danke ich für die Herstellung der Pellets.

Meinen Freunden möchte ich für ihre Motivation und ihre klaglose Hinnahme meines Zeitmangels zum Ende der Dissertation danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ich danke meinen Eltern von Herzen für ihren Rückhalt und ihre Liebe. Sie haben mir alles ermöglicht und mich auf meinem Lebensweg in jeglicher Hinsicht unterstützt.

Mein letzter und ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Steffen, der unglaublich viel für mich getan und immer an mich geglaubt hat. Danke für alles!