

# Rapportage deelresultaten project Antibiotica in de bodem

## **Titelblad:**

*SKB projectnummer: PP8348*

*Deelrapport: Antibiotica in de bodem: Onderzoek van grondwater, bodem en mest*

*Auteurs: Robert Schilt en Dick van de Lagemaat (DUCARES)*

*Datum: 30/11/2009*

## Samenvatting

Op diverse locaties verzamelde monsters grondwater, bodem en mest zijn onderzocht met LC-MS/MS op aanwezigheid van alle gangbare tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen. Voor de grondwatermonsters is het onderzoek gericht op het lage ng/l (ppt) niveau en voor de grond- en mestmonsters op het lage ppb niveau.

In de grondwatermonsters werden geen tetracyclinen aangetroffen. Wel werd een aantal sulfonamiden gedetecteerd. Dit betrof sulfamethoxazol, sulfadiazine en sulfamethazine (= sulfadimidine). In veel gevallen waren de gehalten lager dan de LOQ (1 ng/l).

In een aantal bodemmonsters werden oxytetracycline en doxycycline, soms voorkomend in combinatie aangetoond, steeds met gehalten lager dan 1 µg/kg. De onderzochte mestmonsters bevatten, conform de verwachting, hogere gehalten aan deze twee tetracyclinen en de belangrijkste metabooliet van oxytetracycline, het 4-epi-oxytetracycline. Ook werden lage gehalten aan tetracycline aangetroffen.

De sulfonamiden en quinolonen lieten een ander beeld zien. In de grondmonsters werd een aantal (zeer) lage gehalten aan sulfonamiden en quinolonen gezien. Vanwege de sterke interacties tussen de stoffen (met name de tetracyclinen en (fluro)quinolonen) die moeilijk te verbreken zijn is het niet uit te sluiten dat de werkelijke gehalten hoger zouden kunnen liggen.

In mest viel met name de aanwezigheid van sulfadiazine op, naast een aantal quinolonen op laag niveau.

Uit de gegevens kon geen verband worden afgeleid tussen gehalten in grondwater enerzijds en gehalten in de mest anderzijds.

## 1. Inleiding

### Korte beschrijving

Er is weinig informatie beschikbaar over resistentievorming van micro-organismen in de met varkensmest bemeste bodem. In een door SKB gesubsidieerd onderzoeksprogramma is op basis van een uitgebreid literatuuronderzoek een selectie gemaakt 2 antibiotica, te weten oxytetracycline en sulfamethoxazol die kunnen fungeren als modelstoffen (Geofox-Lexmond, 2009).

Als ondersteuning bij het onderzoek naar resistentievorming bij micro-organismen in de bodem is het nuttig informatie te hebben over de gehalten in grondwater en de bodem van de antibiotica die in de varkenshouderij gebruikt worden en die via de mest op het land terecht komen, waarna migratie naar het grondwater zou kunnen plaatsvinden.

In de literatuur is beschreven dat de gehalten van antibiotica en andere geneesmiddelen in grondwater, net als in oppervlaktewater, laag zijn (Grujic et al., 2009; Mackie et al., 2006). Om die reden moet het onderzoek gericht zijn op het ng/l (ppt) niveau.

Door het toepassen van groepselectieve methoden kan het onderzoek van de twee genoemde stoffen worden uitgevoerd in de vorm van een brede analyse gericht op alle gangbare tetracyclinen en sulfonamiden. Bovendien kunnen de monsters tegelijkertijd worden onderzocht op aanwezigheid van quinolonen. Deze tegen gram negatieve bacteriën gerichte groep van antibiotica wordt ook toegepast in de varkenshouderij (zie website FIDIN).

Met als doel om kennis te verkrijgen over het type en hoeveelheid van de antibiotica die via de mest op de onderzochte locaties terecht komen wordt een aantal (drijf)mestmonsters onderzocht. Vanwege de complexe samenstelling van mest is de analyse niet eenvoudig (Karci and Balcioglu, 2009; Martinez-Carballo et al., 2007).

De analyse van grondmonsters is vanwege de uiteenlopende samenstelling nog gecompliceerder (Andreu et al., 2009; Bao et al., 2009; Brambilla et al., 2007).

Bij het onderzoek van zowel het grondwater als de bodem en mest wordt rekening gehouden met de complexerende eigenschappen van de tetracyclinen (Gu and Karthikeyan, 2008; Gu et al., 2007).

### Doel / probleemstelling

In dit onderzoek worden monsters grondwater op laag niveau (ng/l) geanalyseerd om een indruk te krijgen van de mogelijke aanwezigheid van oxytetracycline en sulfamethoxazol. Door de keuze van een brede analysemethode wordt tegelijkertijd een beeld verkregen van andere antibiotica. Daarnaast komt aanvullende informatie beschikbaar door onderzoek te verrichten op een beperkt aantal monsters bodem (grond) en (drijf)mest.

## 2. Beschrijving van de uitgevoerde werkzaamheden

### 2.1. Veldwerkzaamheden

De keuze van de locaties en de wijze van bemonstering zijn beschreven in de deelrapportage *Resistentie in de bodem*

### 2.2. Laboratoriumwerkzaamheden

#### 2.2.1. Kwaliteitssysteem

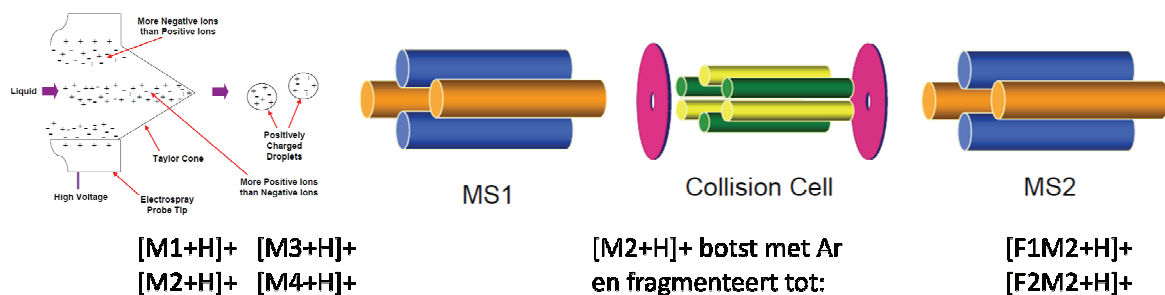
De analyses zijn uitgevoerd in overeenstemming met ISO 17025 (RvA O&O accreditatie).

#### 2.2.2. Materiaal en methoden

In Bijlage 1 is de gedetailleerde beschrijving van relevante chemicaliën en de instrumentele analysemethode gegeven.

De gebruikte instrumentele analysemethode is gebaseerd op vloeistofchromatografie in combinatie met tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS). Voor de diverse antibiotica is dit de enige methode van eerste keus om de verwachte lage ng/l (ppt) niveaus te kunnen analyseren.

In Figuur 1 is het principe van LC-MS/MS schematisch aangegeven.



Figuur 1. Schematisch overzicht van LC-MS/MS

Moleculen worden als geprotoneerde ionen ( $[M1+H]^+$ , etc.) in de gasfase gebracht in de electro-spray interface. De gewenste ionen worden in de MS1 fase doorgelaten naar de botsingscel (collision cell) waar een botsing met Argon (Ar) moleculen plaatsvindt. De verwachte gevormde geladen brokstukken (één of meerdere per uitgangsmolecuul) worden in de MS2 fase doorgelaten en gedetecteerd. Omdat de instellingen van MS1 en MS2, een finger print die voor iedere stof anders is, vast ligt is er sprake van target analyse (gericht op vooraf ingestelde stoffen).

## 3. Resultaten en discussie

### 3.1. Tetracyclinen

#### 3.1.1. Grondwater

Uitgangspunt voor de analyse was het bereiken van een limit of quantification (LOQ, grens waarvan af het gehalte met een acceptabele betrouwbaarheid kan worden bepaald) voor oxytetracycline (OTC) van ca. 1 ng/l (ppt). Door het in bewerking nemen van 250 ml monstermateriaal kon deze grens worden bereikt. Tegelijkertijd zijn ook de 4 epi-metaboliëten en andere gangbare tetracyclinen met hun corresponderende 4 epi-metaboliëten bij het onderzoek meegenomen. M.u.v. 4 epi-chloortetracycline kon voor de meeste stoffen een LOQ van 5 ng/l worden vastgesteld (Tabel 1).

De methode was derhalve geschikt voor de beoogde doelstelling.

**Tabel 1. Prestatiekenmerken van de analyse van tetracyclinen in grondwater**

Analiët	LOQ (ng/l = ppt)	Recovery (%)
4-epi-Tetracycline	5	150
Tetracycline	1	118
4-epi-Oxytetracycline	5	142
Oxytetracycline	1	207
4-epi-Chloortetracycline	10	261
Chloortetracycline	5	111
Doxycycline	5	106

Tetracyclinen zijn stoffen met een analytisch gezien aparte eigenschappen. Naast de complexerende eigenschappen speelt ook de aard en samenstelling van het monster een rol op de in de LC-MS/MS verkregen respons. Uit de recovery waarden (opbrengst na extractie en detectie berekend t.o.v. (academische) standaarden) blijkt dat voor sommige tetracyclinen hoge waarden zijn verkregen, vermoedelijk doordat de in het monsterextract aanwezige ionen de ionisatie bevorderen en/of adsorptie door ionogene interacties verminderen. Omdat deze stoffen niet zijn aangetroffen (Tabel 2) zijn er verder geen consequenties voor de kwantitatieve resultaten.

**Tabel 2. Analyseresultaten tetracyclinen in grondwater**

Monster	4-epi-Tetra- cycline	Tetra- cycline	4-epi- Oxytetra- cycline	Oxytetra- cycline	4-epi- Chloortetra- cycline	Chloor- tetracycline	Doxy- cycline
Gehalten in ng/l (= ppt)							
LOQ	5	1	5	1	10	5	5
SC REF 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SC 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SC 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SC 3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SC 4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
OL REF 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
OL 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
OL 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
OL 3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
OL 4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR REF 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR 3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR 4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 9	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 31	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 38	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 41	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

### 3.1.2. Bodem en mest

Alhoewel dit niet het primaire doel van het onderzoek was zijn monsters bodem en mest onderzocht op aanwezigheid van tetracyclinen en hun belangrijkste metabolieten.

Bekend is dat de analyse van de sterk complexerende tetracyclinen in grond en andere monsters niet eenvoudig is. Omdat het project niet voorzag in mogelijkheden tot een uitgebreide studie van de monstervoorbewerking is een aanpak die gangbaar is voor vlees en organen in gemodificeerde vorm toegepast. Uit de resultaten van onderzoek van gespikete monsters bleek dat een aantal tetracyclinen niet konden worden teruggevonden in gespikete grondmonsters. Voor de belangrijkste tetracyclinen oxytetracycline en doxycycline bleek analyse echter wel mogelijk (Tabel 3). Voor mest verliep de

analyse naar verwachting. Vanwege de aanwezigheid van forse hoeveelheden oxytetracycline en doxycycline in het gebruikte uitgangsmateriaal konden er geen recoveries worden berekend. De te behalen LOQ's voor deze stoffen zijn geschat op basis van de respons van de andere analieten.

**Tabel 3. Prestatiekenmerken van de analyse van tetracyclinen in grond en mest**

	<b>Bodem</b>	<b>Mest</b>	<b>Bodem</b>	<b>Mest</b>
<b>Analiet</b>	<b>LOQ</b> (ug/kg = ppb)	<b>LOQ</b> (ug/kg = ppb)	<b>Recovery</b> (%)	<b>Recovery</b> (%)
4-epi-Tetracycline	-	5	0	74
Tetracycline	-	2.5	0	68
4-epi-Oxytetracycline	-	5	0	212
Oxytetracycline	2.5	2.5 (geschat)	81	Nvt (zie tekst)
4-epi-Chloortetracycline	-	5	0	85
Chloortetracycline	-	2.5	0	127
Doxyxycline	2.5	2.5 (geschat)	52	Nvt (zie tekst)

In een aantal van de grondmonsters werden geringe hoeveelheden (0.2 tot 0.7 µg/kg ) oxytetracycline en doxycycline aangetroffen (Tabel 4).

De gehalten in enkele van de mestmonsters waren zeker voor oxytetracycline en doxycycline fors hoger (tot een factor 2000). Ook de belangrijkste metabooliet van oxytetracycline het 4 epi-tetracycline werd in de monsters aangetoond.

**Tabel 4. Analyseresultaten tetracyclinen in grond en mest**

<b>Monster</b>	4-epi-Tetra-cycline	Tetra-cycline	4-epi-Oxytetra-cycline	Oxytetra-cycline	4-epi-Chloortetra-cycline	Chloor-tetracycline	Doxy-xycline
Gehalte in µg/kg (= ppb)							
<b>LOQ (bodem)</b>	-	-	-	2.5	-	-	2.5
1 WRS3 mix	-	-	-	0.7	-	-	0.4
4 OLS Ref 2	-	-	-	0.2	-	-	0.2
5 OLS 2	-	-	-	< LOQ	-	-	0.3
6 OLS 3	-	-	-	< LOQ	-	-	0.3
7 SCS 2	-	-	-	< LOQ	-	-	< LOQ
8 SCS 4	-	-	-	< LOQ	-	-	< LOQ
<b>LOQ (mest)</b>	5	2.5	5	2.5	5	2.5	2.5
9 SWRM1 manure	12	10	608	1973	< LOQ	0.1	374
12 SWRM 2	11	8	414	1414	< LOQ	< LOQ	1292
13 SCM m2 manure	0.5	0.6	18	88	< LOQ	< LOQ	458
14 OSM manure	0.3	0.3	4	21	< LOQ	< LOQ	109

### 3.2. Sulfonamiden en quinolonen

#### 3.2.1. Grondwater

Een van de uitgangspunten van het onderzoek was het op laag niveau (ca. 1 ng/l) kunnen aantonen van sulfamethoxazol. Door het onderzoek met een brede sulfonamide & quinolonen multi-methode uit te voeren is meer informatie verkregen over een range aan analieten.

De LOQ waarden voor de sulfonamiden waren 1 ng/l en voldeden aan de gestelde eis (Tabel 5). Ook de quinolonen konden vanaf een range van 1-5 ng/l worden gemeten. De recoveries waren, zeker gezien het lage niveau, goed.

**Tabel 5. Prestatiekenmerken van de analyse van sulfonamiden en quinolonen in grondwater**

<b>Analiet</b>	<b>LOQ</b> (ug/kg = ppb)	<b>Recovery</b> (%)
----------------	-----------------------------	------------------------

<b>Analiët</b>	<b>LOQ</b> (ug/kg = ppb)	<b>Recovery</b> (%)
Sulfaguanidine	1	90
Sulfacetamide	1	64
Sulfadiazine	1	81
Sulfamerazine	1	65
Sulfathiazole	1	78
Sulfapyridine	1	67
Dapson	1	49
Sulfachloropyradizine	1	67
Sulfamethoxy-pyridazine	1	75
Sulfamethazine	1	70
Sulfamethoxazole	1	81
Sulfadoxine	1	63
Sulfatroxazole	1	63
Sulfisoxazole	1	92
Sulfaphenazole	1	60
Sulfadimethoxine	1	65
Sulfaquinoxaline	1	87
Marbofloxacin	1	90
Norfloxacin	2	83
Ciprofloxacin	1	72
Levloxacin	1	77
Cinoxacin	1	65
Lomefloxacin	1	105
Danofloxacin	5	93
Enrofloxacin	1	77
Sarafloxacin	1	100
Sparfloxacin	1	109
Difloxacin	4	144
Oxolinic acid	1	86
Nalidixic acid	1	81
Flumequine	1	61

In één van de watermonsters is sulfamethoxazol aangetroffen (2 ng/l, Tabel 6). In de overige monsters valt op dat sulfadiazine en sulfamethazine (= sulfadimidine) eveneens voorkwamen. Bij veel monsters zijn de gehalten lager dan de LOQ, zodat rekening moet worden gehouden met een lagere betrouwbaarheid van de vermelde waarden.

**Tabel 6. Analyseresultaten sulfonamiden en quinolonen in grondwater**

Monster	Sulfa- guanidine (*)	Sulfadiazine	Sulfachloro- pyradizine	Sulfamethazine (= sulfadimidine)	Sulfame- thoxazole	Ciprofloxacin
Gehalte in ng/l (= ppt)						
LOQ	1	1	1	1	1	1
SC REF 1	< LOQ	0.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
SC 1	3.4	< LOQ	< LOQ	0.7	< LOQ	< LOQ
SC 2	2.7	1.1	< LOQ	0.6	< LOQ	< LOQ
SC 3	3.5	0.5	< LOQ	0.8	< LOQ	< LOQ
SC 4	3.2	< LOQ	< LOQ	1.6	< LOQ	< LOQ
OL REF 1	1.0	0.5	< LOQ	0.2	< LOQ	< LOQ
OL 1	2.8	0.4	< LOQ	0.1	< LOQ	< LOQ
OL 2	1.7	< LOQ	< LOQ	0.1	< LOQ	< LOQ
OL 3	1.1	0.5	< LOQ	0.2	< LOQ	< LOQ
OL 4	1.1	0.4	< LOQ	0.1	2.2	< LOQ
WR REF 1	< LOQ	0.3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
WR 2	1.2	< LOQ	< LOQ	1.8	< LOQ	< LOQ
WR 3	< LOQ	1.4	< LOQ	1.3	< LOQ	< LOQ
WR 4	0.7	0.4	< LOQ	1.8	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 3	< LOQ	< LOQ	1.3	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 9	< LOQ	0.3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 31	< LOQ	0.7	< LOQ	0.3	< LOQ	< LOQ
Drenthe loc 38	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.7
Drenthe loc 41	< LOQ	0.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

NB.

- De resultaten van sulfaguanidine zijn niet betrouwbaar en zijn slechts voor de discussie weergegeven (zie tekst).
- De gerapporteerde gehalten zijn zeer laag (lage nanogram/liter = ppt gebied). Dit houdt in dat er rekening gehouden moet worden met de een niet te verwaarlozen foutenmarge (schatting 25%). Gehalten onder de LOQ zijn gerapporteerd om een indruk te geven van de (waarschijnlijke) aanwezigheid, de betrouwbaarheid van het gehalte is minder goed dan die van de waarden boven de LOQ.
- Er is ook sulfadiazine in een 'blanco' watermonster aangetroffen met een gehalte van ca. 0.6 ng/l. Uit het onderzoek was af te leiden dat er geen sprake van kruiscontaminatie was maar dat deze stof in het als blanco gekozen watermonster (drinkwater) aanwezig was. In dit zelfde monster werd ca. 0.1 ng/l sulfamethazine (= sulfadimidine) aangetroffen.

Bij de analyses is er een indicatie verkregen dat een aantal monsters mogelijk sulfaguanidine bevat. Vanwege het feit dat de chromatografische resultaten voor dit erg polaire sulfonamide niet optimaal waren en deze stof in Nederland niet geregistreerd is als diergeneesmiddel (Tabel 7), is er waarschijnlijk sprake van een analytisch artefact en zijn deze waarden alleen t.b.v. de discussie weergegeven.

**Tabel 7. In Nederland als diergeneesmiddel geregistreerde sulfonamiden**

<b>CBG-MEB geregistreerde sulfonamiden in NL (11-10-2009)</b>	<b>Aantal producten</b>
sulfachloorpyrazine-natrium	1
sulfachloorpyridazine-natrium	1
sulfaclozine-natrium	1
sulfadiazine	26
sulfadiazinenatrium	7
sulfadimethoxine-natrium	1
Sulfadimidinenatrium (=sulfamethazine)	3
sulfadoxine	5
sulfamethoxazol	18
sulfaquinoxaline-natrium	1
sulfasalazine	1
<b>Grand Total</b>	<b>65</b>

### 3.2.2. Bodem en mest

Zoals beschreven bij de tetracyclinen was het onderzoek van bodem en mest niet het primaire doel van het onderzoek. De monsters zijn onderzocht met een aangepast op weefselonderzoek gerichte methode. Met name de grondmonsters lieten lage recoveries zien vermoedelijk veroorzaakt door een te sterke hechting van de stoffen aan het monstermateriaal (Tabel 8). Binnen het project was er onvoldoende ruimte om noodzakelijke extra werkzaamheden om het extractierendement te verbeteren uit te voeren.

Het onderzoek van de mestmonsters verliep beter waardoor er voor het merendeel van de stoffen bruikbare LOQ's werden verkregen.

**Tabel 8. Prestatiekenmerken van de analyse van sulfonamiden en quinolonen in grond en mest**

Analiët	Bodem	Mest	Bodem	Mest
	LOQ (ug/kg = ppb)	LOQ (ug/kg = ppb)	Recovery (%)	Recovery (%)
Sulfaguanidine	2.5	5	8	98
Sulfacetamide	2.5	10	15	20
Sulfadiazine	0.5	0.5	17	2071
Sulfamerazine	0.5	0.5	18	43
Sulfathiazole	2.5	0.5	10	214
Sulfapyridine	0.5	0.5	2	42
Dapson	2.5	0.5	5	18
Sulfachloropyradizine	0.5	2.5	8	21
Sulfamethoxypyridazine	2.5	0.5	4	28
Sulfamethazine	0.5	0.5	3	34
Sulfamethoxazole	0.5	0.5	14	36
Sulfadoxine	0.5	0.5	17	41
Sulfatroxazole	0.5	2.5	9	21
Sulfisoxazole	2.5	2.5	23	45
Sulfaphenazole	0.5	0.5	4	51
Sulfadimethoxine	0.5	0.5	14	72
Sulfaquinoxaline	0.5	0.5	9	48
Norfloxacin	-			57
Ciprofloxacin	-	10	0	181
Levofloxacin	-	2.5	0	71
Cinoxacin	0.5	2.5	0	86
Lomefloxacin	-	-	14	63
Danofloxacin	-	25	0	74
Enrofloxacin	-	10	0	71
Sarafloxacin	-	2.5	0	49
Sparfloxacin	-	0.5	0	118
Difloxacin	2.5	2.5	0	97
Oxalinic acid	0.5	0.5	33	171
Nalidixic acid	0.5	2.5	17	91
Flumequine	0.5	10	20	<10%

Sulfamethoxazol is niet in de bodem en mestmonsters aangetroffen (Tabel 9). In de bodemmonsters zijn enkele 'spoorjes' (gehalten ver onder de LOQ) van sulfadoxine, sulfaquinoxaline en sulfisoxazol (laatste niet als geregistreerd diergeneesmiddel) aangetroffen. In één bodemmonster (Tabel 10) zijn lage hoeveelheden van twee quinolonen aangetroffen (difloxacine en flumequine).

In de onderzochte mestmonsters vallen met name sulfadiazine en sulfathiazol op (laatste niet als geregistreerd diergeneesmiddel). Ook is een aantal quinolonen aangetroffen: enrofloxacine, danofloxacine en oxoline zuur.

**Tabel 9. Analyseresultaten sulfonamiden in grond en mest**

Monster	Sulfagu anidine	Sulfadi azine	Sulfame razine	Sulfathi azole	Sulfame- thazine	Sulfameth oxazole	Sulfad oxine	Sulfiso xazole	Sulfaquin oxaline
Gehalten in µg/kg (= ppb)									
<b>LOQ (bodem)</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>
1 WRS3 mix	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
4 OLS Ref 2	0.06	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
5 OLS 2	0.07	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.01	< LOQ	0.04
6 OLS 3	0.07	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.01	< LOQ	< LOQ
7 SCS 2	0.06	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
8 SCS 4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>LOQ (mest)</b>	<b>5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>
9 SWRM1 manure	0.09	4.4	0.1	2.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
12 SWRM 2	0.1	4.2	< LOQ	2.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.1	< LOQ
13 SCM m2 manure	1.4	3.1	< LOQ	< LOQ	0.04	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
14 OSM manure	1.2	23.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

**Tabel 10. Analyseresultaten quinolonen in grond en mest**

Monster	Cipro- floxacin	Cino- xacin	Dano- floxacin	Enro- floxacin	Sara- floxacin	Di- floxacin	Oxolinic acid	Flume- quine
Gehalten in µg/kg (= ppb)								
<b>LOQ (bodem)</b>	<b>-</b>	<b>0.5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>
1 WRS3 mix	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.3	< LOQ	0.2
4 OLS Ref 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
5 OLS 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
6 OLS 3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
7 SCS 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
8 SCS 4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>LOQ (mest)</b>	<b>10</b>	<b>2.5</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>	<b>10</b>
9 SWRM1 manure	< LOQ	0.01	1.0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.0	< LOQ
12 SWRM 2	< LOQ	< LOQ	1.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.6	< LOQ
13 SCM m2 manure	0.9	< LOQ	< LOQ	0.5	< LOQ	< LOQ	0.3	< LOQ
14 OSM manure	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.08	< LOQ	0.2	< LOQ

#### 4. Conclusies en aanbevelingen

De analyse van de grondwatermonsters voor zowel de tetracyclinen en sulfonamiden in combinatie met de quinolonen is goed verlopen. De marker component oxytetracycline is niet en de marker component sulfamethoxazol is éénmaal aangetroffen.

Het onderzoek van de bodemonsters was niet voor alle analieten succesvol. Wel is een aantal stoffen aangetroffen. Verdere ontwikkeling van de onderzoeksmethode is noodzakelijk, hierbij wordt gedacht aan het verminderen van de complexerende eigenschappen van het monstermateriaal. Daarentegen is het onderzoek van mestmonsters redelijk succesvol afgerond. Naast een aantal sulfonamiden is ook een aantal quinolonen aangetroffen.

#### Begrippenlijst

LC-MS/MS	Vloeistofchromatografie gekoppeld aan tandem massaspectrometrie
O&O	Onderzoek en Ontwikkeling
RvA	Raad voor Accreditatie
UPLC	"Ultra performance" vloeistofchromatografie

## Literatuur

Andreu V, Vazquez-Roig P, Blasco C, Pico Y (2009) Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394:1329-1339.

Bao Y, Zhou Q, Wang Y (2009) Adsorption characteristics of tetracycline by two soils: assessing role of soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* 47:286-295.

Brambilla G, Patrizii M, De Filippis S, Bonazzi G, Mantovi P, Barchi D, Migliore L (2007) Oxytetracycline as environmental contaminant in arable lands. *Analytica chimica acta* 586:326-329.

Geofox-Lexmond (2009) Veterinaire antibiotica in de bodem en oppervlaktewater.

Grujic S, Vasiljevic T, Lausevic M (2009) Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216:4989-5000.

Gu C, Karthikeyan K (2008) Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality* 37:704.

Gu C, Karthikeyan K, Sibley S, Pedersen J (2007) Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere* 66:1494-1501.

Karci A, Balcioglu IA (2009) Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment*, The 407:4652-4664.

Mackie RI, Koike S, Krapac I, Chee-Sanford J, Maxwell S, Aminov RI (2006) Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities. *Animal biotechnology* 17:157-176.

Martinez-Carballo E, Gonzalez-Barreiro C, Scharf S, Gans O (2007) Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148:570-579.

## Bijlagen

Bijlage 1. Beschrijving van de analysemethode

Bijlage 2. Voorbeeld chromatogram van de analyse van tetracyclinen in grondwater

Bijlage 3. Voorbeeld chromatogram van de analyse van sulfonamiden en quinolonen in grondwater

## Bijlage 1

### Beschrijving van de analysemethode

#### 1. Laboratoriumwerkzaamheden

##### 1.1. Kwaliteitssysteem

De analyses zijn uitgevoerd in overeenstemming met ISO 17025 (RvA O&O accreditatie).

##### 1.1.1. Standaarden

De gebruikte referentiestandaarden zijn afkomstig van diverse commerciële bronnen. De bewaring vindt plaats conform de minimale eisen van de leverancier.

##### 1.1.2. Chemicaliën

De gebruikte chemicaliën zijn afkomstig van diverse bronnen en zijn van tenminste p.A. kwaliteit.

De gebruikte McIlvain buffer is als volgt bereid:

- Breng 500 ml 0,1 mol/l citroenzuuroplossing (19,2 g citroenzuur in 1 l demi water) op pH 4,0 met natriumfosfaatoplossing (35,6 g dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in 1 l demi water)
- Voeg toe 74,4 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Vul aan tot 2 liter met demi water en meng

##### 1.1.3. Controlemonster(s)

Bij iedere analyseserie zijn, op dezelfde wijze als de studiemonsters, met standaarden (opgelost in methanol of methanol/water) gespikete controlemonsters en gespikete studiemonsters geanalyseerd ter controle van de te behalen LOQ. Deze is bepaald op basis van extrapolatie van de signaal/ruisverhouding naar een waarde van 10 op 1, uitgaande van gespikte monsters. Omdat niet voor alle stoffen interne standaarden beschikbaar waren is gebruik gemaakt van een externe kwantificering, d.w.z. dat er per serie een aantal studiemonsters werd geanalyseerd waaraan een complete set aan standaarden was toegevoegd. Deze standaardadditieaanpak geeft betere resultaten (kleinere afwijking) dan een aanpak waarbij een klein aantal interne standaarden gebruikt wordt.

##### 1.1.4. Monsters

De monsters zijn verzameld door het project team en in een koelkast of koelkamer opgeslagen bij de Universiteit Utrecht.

In de periode van april en mei 2009 zijn de monsters in deelleveringen bij de Universiteit Utrecht opgehaald.

Na tussenopslag in de koelkast ( $< 8\text{ }^\circ\text{C}$ , max. 2 weken) zijn de monsters na uitschenken van een deel (ter voorkoming van het scheuren van de glazen flessen) bewaard bij  $< -18\text{ }^\circ\text{C}$ .

##### 1.1.5. Gebruikte onderzoeksmethoden

###### 1.1.5.1. Monstervoorbewerking

###### 1.1.5.1.1. Grondwatermonsters

Tetracyclinen zijn stoffen die complexeren met metalen en andere verbindingen. Bij de extractie is hiermee rekening gehouden door EDTA toe te voegen aan de extractievloeistof.

Aan 250 ml monster werd 7.5 ml methanol en 5 ml McIlvaine buffer (0.1 mol/l, pH 4.0) toegevoegd.

Indien nodig werd de pH op 4 gebracht.

Het gehele extract werd op een 200 mg HLB SPE kolom gebracht die daarvoor geconditioneerd was met 2 ml acetonitril en 3 ml water.

Na wassen met 2 ml water werd de kolom geëluëerd met 2 ml acetonitril gevolgd door 3 ml 5 mmol/l ammoniumacetaat in methanol/acetonitril (2:1).

Het eluaat werd na toevoegen van 200  $\mu\text{l}$  ethyleenglycol in methanol drooggedampt bij  $45\text{ }^\circ\text{C}$  onder een stikstofstroom (Turbovap).

Het residu werd na oplossen in 100  $\mu\text{l}$  2% mierenzuur in methanol verdund met 200  $\mu\text{l}$  2% mierenzuur in water en het plaatsen in een ultrasoonbad en aansluitend vortexen overgebracht naar een injectie vial.

### 1.1.5.1.2. Grond en drijfmest

Aan 10 gram monster werd 25 ml McIlvaine buffer (0.1 mol/l, pH 4.0) toegevoegd. Vervolgens werd de pH op 4 gebracht met mierenzuur. Na toevoegen van 10 ml methanol werd 1 uur geschud m.b.v. een schudmachine. Na centrifugeren met ca. 2000g werd de bovenlaag overgebracht naar een maatkolf van 100 ml. Na aanvullen tot 100 ml met water werd 25 ml verdund met 25 ml water.

en op SPE (HLB 200 mg) gebracht.

Het gehele extract werd op een 200 mg HLB SPE kolom gebracht die daarvoor geconditioneerd was met 2 ml acetonitril en 3 ml water.

Na wassen met 2 ml water werd de kolom geëluëerd met 2 ml acetonitril gevolgd door 3 ml 5 mmol/l ammoniumacetaat in methanol/acetonitril (2:1).

Het eluaat werd na toevoegen van 200 µl ethyleenglycol in methanol drooggedampt bij 45 °C onder een stikstofstroom (Turbovap).

Het residu werd na oplossen in 200 µl 2% mierenzuur in methanol verdund met 800 µl 2% mierenzuur in water en het plaatsen in een ultrasoonbad en aansluitend vortexen overgebracht naar een injectie vial.

### 1.1.5.2. LC-MS/MS analyse

#### 1.1.5.2.1. UPLC tetracyclinen

Kolom: Acquity BEH C18 1.7 µm, 2.1 x 100 mm

Gradient elutie met A: 0.1% mierenzuur in water en B: 0.1% mierenzuur in acetonitril:methanol (1:1).

	Time(min) (min)	Flow Rate (ml/min)	%A	%B	Curve
1.	Initial	0.400	95.0	5.0	-
2.	0.50	0.400	95.0	5.0	6
3.	7.00	0.400	60.0	40.0	6
4.	7.10	0.400	5.0	95.0	6
5.	8.00	0.400	5.0	95.0	6
6.	8.10	0.400	95.0	5.0	6

Injectievolume (µl): 5.0

#### 1.1.5.2.2. MS parameters tetracyclinen

Waters Premier XE UPLC-MS/MS met electrospray interface.

Capillary (kV): 1.0, positive mode

Cone (V): 30.00

Source Temperature (°C): 120

Desolvation Temperature (°C): 350

Inter Channel Delay (sec): 0.020

InterScan Time (sec): 0.020

Dwell(s) (sec): 0.050

Function	Start Time (min)	End Time (min)	Analyte	Parent (Da)	Daughter (Da)
1	3.0	5.4	Tetracycline (TC) en 4 epi-tetracycline (4 epi-TC)	445.10	154.00 410.10 427.05
			Oxytetracycline (OTC) en 4 epi-oxytetracycline (4 epi-OTC)	461.10	201.05 426.10 443.10
2	4.5	7.2	Demetylchloortetracycline (DMCTC, istd, NB. Niet gebruikt bij dit onderzoek)	465.10	429.90 447.90
			Chloortetracycline (CTC) en 4 epi-chloortetracycline (4 epi-CTC)	479.10	154.00 444.00 462.00
3	6.0	8.0	Doxycycline (DOX)	445.10	154.00 428.05

1.1.5.2.3. UPLC sulfonamiden en quinolonen

Kolom: Acquity BEH C18 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 100 mm

Gradient elutie met A: 0.1% mierenzuur in water en B: 0.1% mierenzuur in acetonitril:methanol (1:1).

	Time(min) (min)	Flow Rate (ml/min)	%A	%B	Curve
1.	Initial	0.400	95.0	5.0	-
2.	0.50	0.400	95.0	5.0	6
3.	10.00	0.400	60.0	40.0	6
4.	10.10	0.400	5.0	95.0	6
5.	11.10	0.400	5.0	95.0	6
6.	11.40	0.400	95.0	5.0	6

Injectievolume ( $\mu$ l): 10.0

1.1.5.2.4. MS parameters sulfonamiden en quinolonen

Waters Premier XE UPLC-MS/MS met electrospray interface.

Capillary (kV): 1.0, positive mode

Cone (V): 28.00

Source Temperature ( $^{\circ}$ C): 120

Desolvation Temperature ( $^{\circ}$ C): 350

Inter Channel Delay (sec): 0.020

InterScan Time (sec): 0.020

Dwell(s) (sec): 0.010

Function	Start Time (min)	End Time (min)	Analyte	Parent (Da)	Daughter (Da)
1	0.5	2.5	Sulfacetamid	172.90	92.00 107.90 155.90
			Sulfaguanidin	215.00	60.10 65.00 92.00 155.90
2	2.2	5.2	Sulfapyridin	250.00	92.00 155.90
			Sulfadiazin	250.90	92.00 155.90
			Sulfathiazol	256.00	92.00 155.90
			Sulfamerazin	265.00	92.00 155.90
			Marbofloxacin	362.90	275.90 319.90
3	3.8	6.3	Dapsone	249.00	92.00 155.90
			Sulfametazin	279.00	123.90 155.90 185.90
			Sulfamethoxyridazin	281.00	92.00 125.90 155.90
			Norfloxacin	319.90	232.90 276.00
			Enoxacin	320.90	205.90 256.90
			Ciprofloxacin	331.90	244.90 287.90
			Levofloxacin	361.90	260.90 318.00
4	4.6	9.0	Sulfamethoxazole	254.00	92.00 155.90 171.90

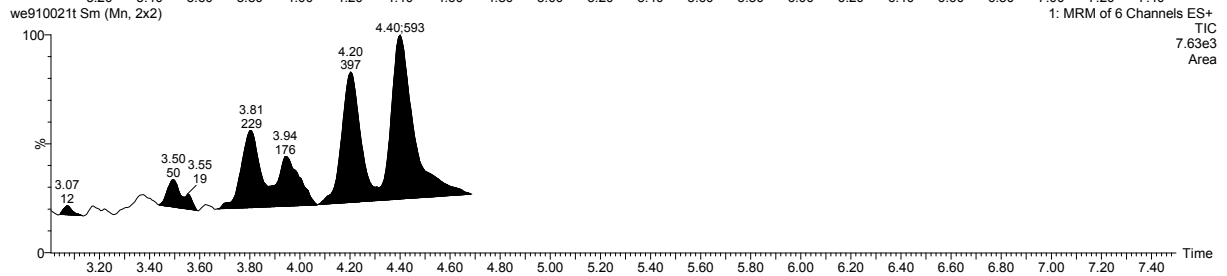
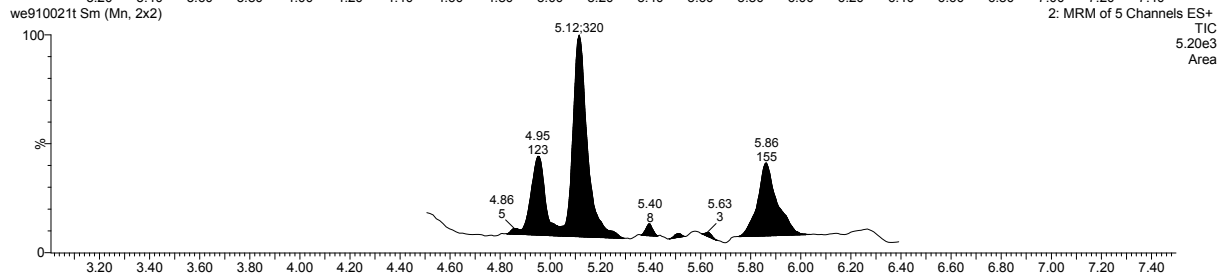
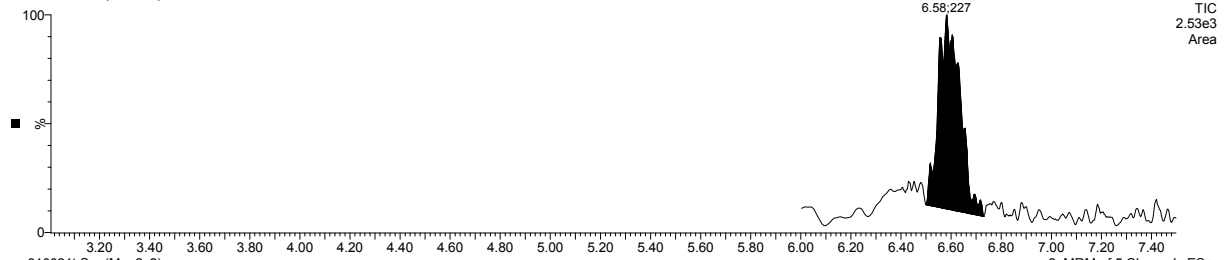
Function	Start Time (min)	End Time (min)	Analyte	Parent (Da)	Daughter (Da)
			Cinoxacin	262.90	188.80 216.90
			Sulfatroxazole, Sulfaoxazole	267.90	92.00 155.90
			Sulfachloropyridazin	284.90	92.00 155.90
			Sulfadoxin	310.90	92.00 155.90
			Lomefloxacin	351.90	264.90 307.90
			Danofloxacin	357.90	95.90 333.90
			Enrofloxacin	359.90	316.00 342.00
			Sarafloxacin	385.90	298.90 341.90
			Sparfloxacin	392.90	291.90 348.90
			Difloxacin	399.90	298.90 355.90
5	7.1	9.3	Oxolinic acid	261.90	159.80 201.90 215.90 243.90
			Sulfaquinoxalin	301.00	92.00 155.90
			Sulfadimethoxin	310.90	92.00 155.90
			Sulfaphenazole	314.90	92.00 155.90
6	9.2	12.0	Nalidixic acid	232.90	158.90 186.90 214.90
			Flumequin	261.90	201.90 243.90

## Bijlage 2

### Voorbeeld chromatogram van de analyse van tetracyclinen in grondwater (1 ng/l)

17 REC 1 PPT

we910021t Sm (Mn, 2x2)

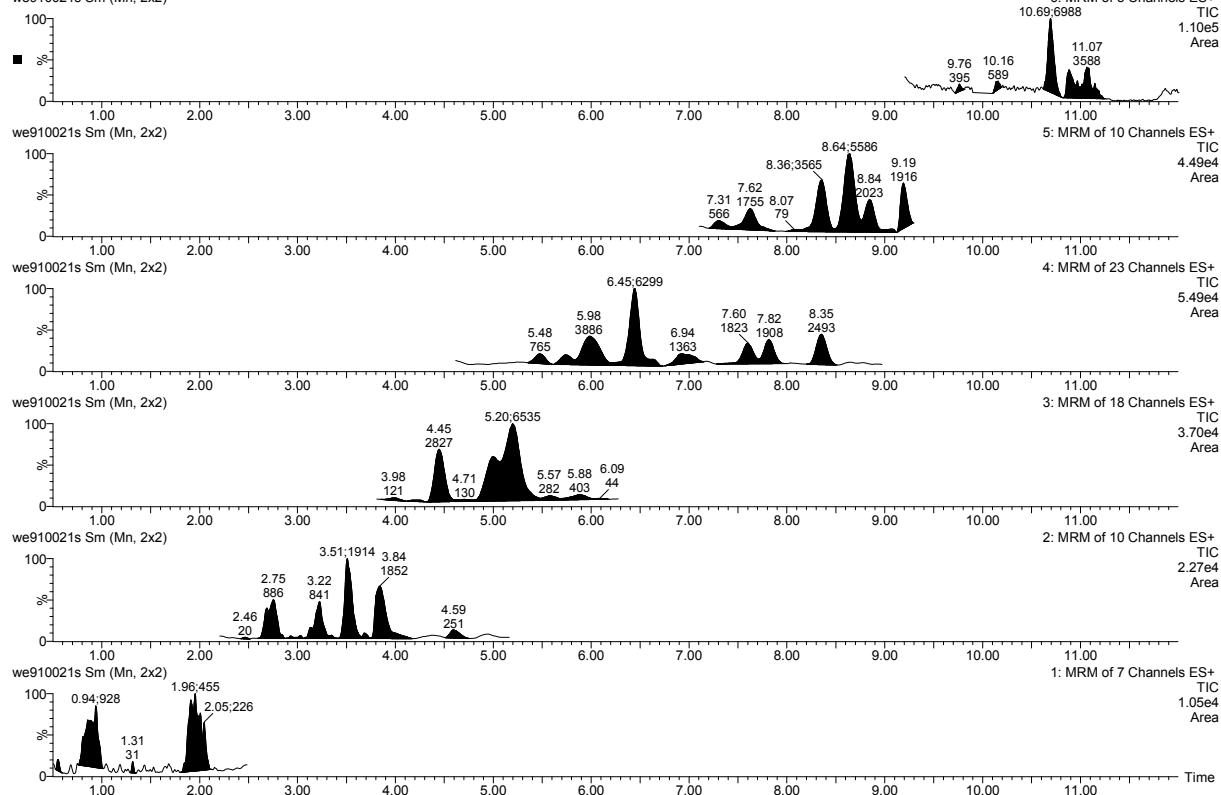


Retentietijd	Analiët	Function (van onder (1) naar boven (3))
3.80.	4 epi-tetracycline	1
4.00.	4 epi-oxytetracycline	1
4.20.	Oxytetracycline	1
4.40.	Tetracycline	1
5.17.	4 epi-chloortetracycline	2
5.87.	Chloortetracycline	2
6.58.	Doxycycline	3

### Bijlage 3 Voorbeeld chromatogram van de analyse van sulfonamiden en quinolonen in grondwater (1 ng/l)

17 REC 1 PPT

we910021s Sm (Mn, 2x2)



Retentietijd	Analiët	Groep Sulfonamide (S) of quinoloon (Q)	Function (van onder (1) naar boven (6))
0.94	Sulfaguandine	S	1
1.96	Sulfacetamide	S	1
2.75	Sulfadiazine	S	2
3.21	Sulfathiazole	S	2
3.51	Sulfapyridine	S	2
3.83	Sulfamerazine	S	2
4.45	Dapson	S	3
4.58	Marbofloxacin	Q	2
4.99	Sulfamethazine	S	3
5.15	Levofloxacin	Q	3
5.17	Enoxacin	Q	3
5.20	Sulfamethoxy-pyridazine	S	3
5.28	Norfloxacin	Q	3
5.48	Sulfachloropyradizine	S	4
5.57	Ciprofloxacin	Q	3
5.75	Sulfamethoxdazole	S	4
5.91	Enrofloxacin	Q	4
5.94	Danofloxacin	Q	4
6.00	Sulfatroxazole	S	4
6.06	Lomefloxacin	Q	4
6.34	Difloxacin	Q	4
6.40	Sulfisoxazole	S	4

<b>Retentietijd</b>	<b>Analiët</b>	<b>Groep</b> Sulfonamide (S) of quinoloon (Q)	<b>Function</b> (van onder (1) naar boven (6))
6.45	Sulfadoxine	S	4
6.58	Sarafloxacin	Q	4
7.59	Sparfloxacin	Q	4
7.64	Sulfaphenazole	S	5
7.82	Cinoxacin	Q	4
8.34	Sulfadimethoxine	S	5
8.63	Oxolinic acid	Q	4
8.84	Sulfaquinoxaline	S	5
10.70	Nalidixic acid	Q	6
10.88	Flumequine	Q	6