

# **Untersuchungen zur Aufnahme und zum Transport antibiotisch wirksamer Stoffe in Getreide- und Gemüsepflanzen**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften  
Department Chemie  
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Ing. Umwelttechnik, Dipl.-Chem.-Ing.  
Didem Hanım Meriç (geb. Yolcu)  
aus Adıyaman

Paderborn 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2006 bis Dezember 2009 an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie des Departments Chemie der Fakultät für Naturwissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote angefertigt.

### **Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:**

D. H. Meriç, M. Grote, H. Hayen, M. Freitag; *Untersuchungen zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Nutzpflanzen*; Jahrestagung 2009 der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh: Stoffverhalten und -wirkungen in Umweltkompartimenten, 23 - 25 September 2009, Trier; Tagungsband, 2009, S. 50

M. Grote, D. H. Meriç, G. Langenkämper, H. Hayen, T. Betsche, M. Freitag; *Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Porree und Weißkohl [Investigation on the transfer of pharmacologically active substances used in animal husbandary into leek and cabbage]*; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 4, 2009, 287-304, Online im Internet (10.09.2009): <http://www.springerlink.com/content/89713532jk8n6618/>

D. H. Yolcu, M. Grote, H. Hayen, M. Freitag; *Antibiotika-Rückstände in Getreide aus viehstarken Gebieten – Methodenentwicklung und Ergebnisse einer Screening-Studie*; Lebensmittelchemie, 3, 70, 2009

M. Freitag, M. Grote, D.H. Yolcu, T. Betsche; *Untersuchungen zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Getreide in der landwirtschaftlichen Praxis*; Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, 9. – 10. April 2008, Fulda; Tagungsband, 2008, 194-198.

D. H. Yolcu, H. Hayen, M. Grote; *Bestimmung von Antibiotika-Rückständen in Getreide*; LaborPraxis, März 2008, 28–30, Online im Internet (17.03.2008): <http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/chromatographie/hplc/articles/113847/?ACMP=DMC-beleg>

M. Freitag, D. H. Yolcu, H. Hayen, T. Betsche, M. Grote; *Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen*; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 3, 2008; 174-184, Online im Internet (15.03.2008): <http://www.springerlink.com/content/588w26444155w406/>

D. H. Meriç, M. Grote, H. Hayen, M. Freitag; *Untersuchungen zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Nutzpflanzen*; Jahrestagung 2009 der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh: Stoffverhalten und -wirkungen in Umweltkompartimenten, 23. - 25.09.2009, Trier; Vortrag

D. H. Meriç, M. Grote, H. Hayen, M. Freitag; *Antibiotika-Rückstände in Getreide aus viehstarken Gebieten – Methodenentwicklung und Ergebnisse einer Screening-Studie (Yogun olarak Gübrenemis Tarim Alanlarındaki Tahil ürünlerinde görülen Antibiyotik Kalıntılar - Metod Gelistirme ve Screening-Arastirmasi Sonuclari)*; Mersin Symposium - Landwirtschaft und Lebensmittel, 19.-22. November 2008, Mersin/Türkei; Vortrag

D. H. Meriç, M. Grote, H. Hayen, M. Freitag; *Antibiotika-Rückstände in Getreide aus viehstarken Gebieten – Methodenentwicklung und Ergebnisse einer Screening-Studie*; 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag. 8.-10. September 2008, Kaiserslautern; Posterpräsentation.

D. H. Yolcu, C. Schwake-Anduschus., R. Michel, H. Hayen, T. Betsche, M. Freitag, M. Grote; *Uptake of veterinary antibiotics into cereals and vegetables from manured soil*; Third German-Hungarian Workshop: Synthesis, Isolation and Biological Activity of Natural Products, 15.-17. May 2008, Paderborn; Posterpräsentation/Kurzvortrag

1. Referent: Herr Prof. Dr. M. Grote  
(Department Chemie, Anorganische und Analytische Chemie)

2. Referent: Herr Prof. Dr. med. M. Weiß  
(Department Sport und Gesundheit, Sportmedizin)

Eingereicht am: 31.08.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2010

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Grote für die interessante Themenstellung, stete Diskussionsbereitschaft und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. M. Weiß danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Heiko Hayen (Universität Wuppertal/Wuppertal), Frau Prof. Dr. M. Freitag (Fachhochschule Südwestfalen/Soest), Herrn. Dr. Georg Langenkämper (Max Rubner Institut/Detmold) und allen weiteren Mitwirkenden an interdisziplinären Forschungsprojekten.

Herzlich möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere bei TA R. Knaup, A. Sitzer, Dr. H. Stevens, Dr. R. Michel, Dipl.-Chem. M. Busse, Dipl.-Chem. M. Ewe, Dr. C. Schwake-Anduschuss, Dr. C. Heine, Staatl. gepr. LM. Chem. F. Chowdhury, A. Demir für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Ferner möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere meinem Ehemann Tamay Meriç für ihre jahrelange Geduld und Unterstützung sehr herzlich bedanken.

## INHALTVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 WIRTSCHAFTSDÜNGER.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Begriffsbestimmungen.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Bedeutung von Wirtschaftsdünger für Getreide- und Gemüseanbau.....</b>	<b>4</b>
<b>3 TIERARZNEIMITTEL IN DER LANDWIRTSCHAFT .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Begriffsbestimmung .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Antibiotika in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3 Verbrauchsmengen von Veterinärantibiotika.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4 Eigenschaften von Antibiotika .....</b>	<b>11</b>
3.4.1 Tetracycline.....	11
3.4.2 Sulfonamide .....	15
3.4.3 Fluorchinolone .....	18
3.4.4 Ionophore .....	20
<b>3.5 Antibiotika in der Umwelt - Eintrag und Verhalten .....</b>	<b>22</b>
<b>4 VERBRAUCHERGEFÄHRDUNG DURCH DEN ANTIBIOTIKA-EINSATZ IN DER   LANDWIRTSCHAFT.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Rückstandsproblematik .....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Begriffsbestimmungen.....	27
4.1.2 Antibiotikarückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft .....	28
4.1.3 Lebensmittelrechtliche Aspekte zu Antibiotikarückständen .....	29
<b>4.2 Resistenzproblematik .....</b>	<b>32</b>
4.2.1 Begriffsbestimmungen und Resistenzentstehung .....	32
4.2.2 Resistenzmechanismen .....	34
<b>4.3 Verbrauchergefährdung.....</b>	<b>35</b>
<b>5 AUFNAHME VON TIERARZNEISTOFFEN IN PFLANZEN.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Eintrag von Xenobiotika in Pflanzen.....</b>	<b>40</b>
5.1.1 Physiologie der pflanzlichen Wurzelzelle.....	42
5.1.2 Stoffaufnahme über die Wurzel aus dem Boden.....	43
5.1.3 Pflanzenverfügbarkeit .....	45
<b>5.2 Metabolismus in Pflanzen.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3 Stand der Forschung zur Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen.....</b>	<b>49</b>

<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>52</b>
6.1	<b>Ausgangssituation</b>	<b>52</b>
6.2	<b>Verlauf der Projekte - Untersuchungsmethodik</b>	<b>52</b>
6.3	<b>Methodenentwicklung</b>	<b>53</b>
6.3.1	Rückstandsanalytik	53
6.3.2	Erweiterung und Anwendung des Analysensverfahrens	54
6.3.2.1	LCQ, Niedrigauflösendes MS-System (Low Resolution-MS, LR-MS)	54
6.3.2.2	FTICR-MS, Hochauflösendes MS-System (High Resolution-MS, HR-MS)	60
6.3.3	Optimierung der Probenvorbereitung	62
6.3.3.1	Homogenisierung	63
6.3.3.2	Fest-Flüssig-Extraktion	64
6.3.3.3	Festphasenextraktion (SPE)	66
6.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung	69
6.4	<b>Validierung</b>	<b>71</b>
6.4.1	Wiederfindung	71
6.4.2	Präzision	71
6.4.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	74
6.4.4	Selektivität	75
6.4.5	Matrixeffekte	77
6.4.6	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse	80
<b>7</b>	<b>UNTERSUCHUNG ZUM ANTIBIOTIKATRANSFER AUS DEM BODEN IN GETREIDE</b>	<b>82</b>
7.1	<b>Screening-Studie</b>	<b>82</b>
7.1.1	Probennahme	83
7.1.2	Ergebnisse der Screening-Studie	84
7.1.2.1	Positiver Demeclocyclin-Befund	88
7.1.2.2	Positiver Doxycyclin-Befund	97
7.1.3	Proben aus der besonderen Erntermittlung des Bundessortenamtes	101
7.2	<b>Erkennung falsch positiver Befunde mit hochauflösender MS</b>	<b>101</b>
7.2.1	Koelution von Peptiden bei der LC/MS-Analyse	105
7.2.2	Protease-Behandlung	107
7.3	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse der Screening-Studie</b>	<b>109</b>
7.4	<b>Untersuchung von handelsüblichen Weizenproben aus Niedersachsen</b>	<b>110</b>
7.4.1	Probengewinnung	111
7.4.2	Ergebnisse der Analysen von handelsüblichen Weizenproben	112
7.4.3	Positiver Enrofloxacin-Befund	113
7.5	<b>Zeitliche Veränderung der Antibiotika-Gehalte in belastetem Getreide</b>	<b>118</b>

<b>8</b>	<b>UNTERSUCHUNG ZUR AUFNAHME VON VETERINÄRANTIBIOTIKA IN GEMÜSE...</b>	<b>121</b>
<b>8.1</b>	<b>Aufnahmeexperimente in Hydrokultur .....</b>	<b>121</b>
8.1.1	Anzucht der Pflanzen.....	122
8.1.2	Zudotierung der Antibiotika .....	123
8.1.3	Ernte und Lagerung .....	123
<b>8.2</b>	<b>Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur.....</b>	<b>125</b>
8.2.1	Porree .....	126
8.2.1.1	Aufnahme von Sulfadiazin.....	126
8.2.1.2	Aufnahme von Chlortetracyclin .....	127
8.2.1.3	Aufnahme von Tetracyclin .....	130
8.2.1.4	Aufnahme von Enrofloxacin.....	131
8.2.1.5	Aufnahme von Monensin.....	133
8.2.2	Weißkohl.....	135
8.2.2.1	Aufnahme von Sulfadiazin.....	135
8.2.2.2	Aufnahme von Chlortetracyclin .....	137
8.2.2.3	Aufnahme von Tetracyclin .....	138
8.2.2.4	Aufnahme von Enrofloxacin.....	140
8.2.2.5	Aufnahme von Monensin.....	141
8.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Aufnahmeexperimente .....	143
<b>8.3</b>	<b>Analyse von Gemüse aus landwirtschaftlichen Betrieben .....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>159</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>164</b>
<b>A</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>A1</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMG	Arzneimittelgesetz
Anhydro-CTC	Anhydrochlortetracyclin
ADI	Acceptable daily intake
ATC	Anhydrotetracyclin
BEE	Besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
CIP	Ciprofloxacin
CTC	Chlortetracyclin
Da	Dalton, Masseneinheit
DAN	Danofloxacin
DC	Doxycyclin
DIF	Difloxacin
DIN	Deutsche Industrie Norm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMC	Demeclocyclin
ECD	Electrochemical Detection
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
ENR	Enrofloxacin
e-CTC	Epi-Chlortetracyclin
e-DC	Epi-Doxycyclin
e-DMC	Epi-Demeclocyclin
e-Iso-CTC	Epi-Isochlortetracyclin
e-TC	Epi-Tetracyclin
ERY	Erythromycin
ESI	Electrospray Ionisation
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (Heute FLI)
FEDESA	Fédération Européenne de la Santé Animale
FG	Frischgewicht
FMG	Futtermittelgesetz
FLU	Flumequin
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balanced
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IS	Interner Standard
Iso-CTC	Isochlortetracyclin
K <sub>OW</sub>	Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MAR	Marbofloxacin
MIN	Minocyclin
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MON	Monensin
MRL	Maximum Residue Limit
MRSA	Methicillin resistente Staphylococcus aureus Stämme

MS	Massenspektrometrie
MUNLV	Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Anzahl der Messwerte (HPLC-Injektionen pro Probe)
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NOEL	No Observed Effect Level
NOR	Norfloxacin
NRK	Nationaler Rückstandskontrollplan
N-SFD	N4-Acetylsulfadiazin
NWG	Nachweisgrenze
PAK	Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
pK <sub>a</sub>	Säuredissoziationskonstante
R <sub>2</sub>	Bestimmtheitsmaß
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
Srel	Relative Standardabweichung
SDD	Sulfadimidin
SDM	Sulfadimethoxin
SFD	Sulfadiazin
SMOAZ	Sulfamethoxazol
SMTZ	Sulfamethizol
SMZ	Sulfamerazin
S/N	Signal-zu-Rauschverhältnis (Signal to Noise Ratio)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
SRM	Selective Reaction Monitoring
STR	Streptomycin
STZ	Sulfathiazol
TC	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TIC	Total Ion Current
TM	Trockenmasse
TMP	Trimethoprim
TYL	Tylosin A
t	Zeit
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
(v/v)	Volumenanteil

## 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Antibiotika zählen sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin zu den verordnungstärksten Indikationsgruppen. Das weltweit steigende Risiko der Resistenzbildung bei humanpathogenen Mikroorganismen wird auch mit dem extensiven Antibiotika-Einsatz in der Tiermast in Verbindung gebracht. Infolge der zunehmenden Resistenzentwicklung wurde die subtherapeutische Anwendung von Antibiotika zum Zwecke der Leistungsförderung über das Futter EU-weit gestoppt (BGVV 1997). Ab 2006 dürfen Antibiotika gemäß VO 1831/2003/EEC nur noch nach tierärztlicher Verschreibung auf Grundlage des Arzneimittelrechtes zur Therapie angewendet werden.

In der landwirtschaftlichen Tierhaltung fallen in Deutschland jährlich ca. 30 Mill. Tonnen Gülle an, die regional auf viehstarke Gebiete konzentriert sind [1, 2, 3]. Mit der Gülle, die als Wirtschaftsdünger verwendet wird, gelangen die von den Tieren nach Anwendung ausgeschiedenen Antibiotika-Wirkstoffe und Metaboliten auf landwirtschaftlich genutzte Flächen, aber auch auf Mikroorganismen, die Antibiotika-Resistenz entwickeln können. Für das Jahr 2005 wurde der veterinärmedizinische Antibiotikaeinsatz auf mindestens 784 Tonnen geschätzt, wobei besonders intensiv Tetracycline mit einem Anteil von ca. 45 % für Schwein, Rind und Geflügel angewandt wurden. Zu den verordnungstarken Veterinärpharmaka zählen auch  $\beta$ -Lactame, Sulfonamide und Makrolide. Deutlich niedriger sind die Verbrauchsmengen an Fluorchinolonen und Kokzidiostatika [4].

Der Eintrag humanpathogener Keime und (subinhibitorischer) Spurenkonzentrationen antibiotisch aktiver Stoffe in die Nahrungsmittelkette über Lebensmittel tierischer Herkunft ist seit längerer Zeit bekannt [5, 6, 7]. Auch die Aufnahme von Antibiotika-Wirkstoffen über die Pflanzenwurzeln wurde bereits vor über 50 Jahren experimentell erkannt [8]: Weizen, Mais und Feldsalat „assimilierten“ Penicillin und Streptomycin, wobei phytotoxische und bakterizide Effekte beobachtet wurden. Eine Modellstudie unter praxisnahen Bedingungen der konventionellen Landwirtschaft zeigte erstmalig, dass antibiotisch wirksame Stoffe aus Gülle-beaufschlagten Böden von Nutzpflanzen aufgenommen werden. Dabei wurden Chlortetracyclin (CTC), Sulfadiazin (SFD) und Trimethoprim (TMP) als repräsentative Veterinärwirkstoffe eingesetzt, die intensiv in der landwirtschaftlichen Schweine- und Geflügelhaltung Anwendung finden [9, 10]. Diese Ergebnisse waren als Hinweis auf einen möglichen Eintragungspfad von Antibiotika-Rückständen aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung in pflanzliche Lebens- und Futtermittel zu werten. Da in der Regel die Antibiotikagehalte in Gülle aus der landwirtschaftlichen Praxis geringer sind als die Gehalte, die im Rahmen der beschriebenen Studie erreicht wurden, blieb zu klären, ob der Antibiotikatransfer Boden-Getreide auch in der Praxis der konventionellen Landwirtschaft von Bedeutung ist.

Inzwischen wurden auch aus der internationalen Fachliteratur Untersuchungen bekannt, die in Töpfen im Gewächshaus durchgeführt wurden [10, 11, 12]. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Veterinärpharmaka von Nutzpflanzen über die Wurzel aufgenommen und in der Pflanze transportiert werden können. Jedoch bleiben genauere bzw. allgemeingültige Informationen über Aufnahmepotenzial nach Pflanzenart und welche mögliche Metabolite sowie anderen Umwandlungsprodukte entstehen, ungeklärt.

Daraus resultierende Verbraucherrisiken sind noch nicht abschätzbar, da die Anzahl systematischer Untersuchungen gering und die Datenbasis zu schmal ist.

Aus dieser Situation ergaben sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele:

- Entwicklung von Extraktions- und Bestimmungsmethoden zum Nachweis von Antibiotika in Nutzpflanzen mittels LC-MS<sup>n</sup>,
- Durchführung eines Screenings der Antibiotikagehalte in Getreide, das in Regionen mit intensiver Schweinehaltung auf langjährig mit Gülle gedüngten Böden angebaut wurde,
- Analyse von handelsüblichen Weizenproben, um die Rückstandssituation von Antibiotika sowohl in Getreide als auch in Getreidemahlerzeugnissen aus niedersächsischen Mühlen zu überprüfen,
- Durchführung von Aufnahmeexperimenten in Hydrokultur: Bestimmung des Aufnahmepotentials von Weißkohl und Porree für verordnungstarke Wirkstoffe und ihrer Hauptmetabolite aus der Nutztierhaltung,
- Gewinnung rückstandsanalytischer Daten über die Belastungssituation von Gemüse, das in landwirtschaftlicher Praxis angebaut wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zur Durchführung dieser grundlegenden Aufgaben leisten. Denn wenn Nutzpflanzen Antibiotika über die Gülle und den Boden aufnehmen, so können diese Antibiotika und ihre Metabolite auch wieder in die Nahrungsmittelkette von Mensch und Futtermittel von Tier gelangen und somit letztendlich die Ausbreitung resistenter Bakterienstämme fördern. Diese Erkenntnisse sind dabei unter dem Gesichtspunkt eines nachhaltigen Verbraucherschutzes von wesentlicher Bedeutung, da gesicherte Risikoabschätzungen nur durch fundierte Kenntnisse über die komplexen Zusammenhänge zwischen Gölledüngung und Aufnahme von Pflanzen möglich sind.

## 2 WIRTSCHAFTSDÜNGER

### 2.1 Begriffsbestimmungen

Der Begriff „Düngemittel“ wird laut dem Düngemittelgesetz vom 17. Dezember 1999 (BGBl. I S. 245) folgendermaßen definiert:

*„Düngemittel sind Stoffe, die dazu bestimmt sind, unmittelbar oder mittelbar Nutzpflanzen zugeführt zu werden, um ihr Wachstum zu fördern, ihren Ertrag zu erhöhen oder ihre Qualität zu verbessern; ausgenommen sind Stoffe, die überwiegend dazu bestimmt sind, Pflanzen vor Schadorganismen und Krankheiten zu schützen oder, ohne zur Ernährung von Pflanzen bestimmt zu sein, die Lebensvorgänge von Pflanzen zu beeinflussen, sowie Bodenhilfsstoffe, Kultursubstrate, Pflanzenhilfsmittel, Kohlendioxid, Torf und Wasser“.*

Die Ziele der Düngemittel-Ausbringung in intensiv landwirtschaftlichen Systemen sind zum einen der Ersatz verbrauchter Nährstoffe und zum anderen die Erhöhung des Nährstoffangebotes selbst an ertragsärmeren Standorten, so dass höhere Ernteerträge erzielt werden können. Neben dem Begriff „Düngemittel“ wird auch der Begriff „Wirtschaftsdünger“ im Düngemittelgesetz vom 17. Dezember 1999 (BGBl. I S. 425) wie folgt definiert:

*„Wirtschaftsdünger sind tierische Ausscheidungen, Gülle, Jauche, Stallmist, Stroh sowie ähnliche Nebenerzeugnisse aus der landwirtschaftlichen Produktion, auch weiterbehandelt, die dazu bestimmt sind, zu einem der in Nummer 1 erster Teilsatz genannten Zwecke angewandt zu werden“.*

Gülle wird auch als Flüssig-, Treib- oder Schwemmmist bezeichnet. Sie ist ein Gemisch aus Kot und Harn von Nutztieren sowie mit einem geringen Anteil von Einstreu- und Futterresten, die ggf. mit Wasser verdünnt sind [13, 14]. Der Harn der Tiere, welcher gesondert von Kot und Einstreu aufgefangen wird, ist die sogenannte Jauche. Jauche wird auch häufig mit Wasser verdünnt. In Deutschland fielen 155 Mio. t Gülle und 45 Mio.t Festmist (eine Mischung aus Harn, Kot, Einstreu und Futterreste) als Wirtschaftsdünger nach den Tierbestandszahlen von 1997 an [15].

Neben Gülle (Schweine- oder Rindergülle) werden als Wirtschaftsdünger in der landwirtschaftlichen Praxis auch tierische Ausscheidungen aus der Geflügelhaltung z.B. Hühner- und Putenmist, Hühnertrockenkot sowie Flüssigdünger angewendet. Je nach Tierart werden Düngemittel unterschiedlich zusammengesetzt (Tab. 1). Der Gehalt an Inhaltstoffe in Gülle und Mist innerhalb einer Tierart variieren je nach Konsistenzgrad, Trockensubstanzgehalt, Fütterung und Haltungsform beträchtlich [14].

**Tab. 1:** Gehalte an Inhaltstoffen verschiedener Wirtschaftsdünger; angegeben in kg/t FG [16]

Düngart	Menge je GV [t/a]	TS [%]	N	P	K	Mg
Rindergülle, Milchvieh	23	10	3,8	1,0	4,7	0,6
Schweinegülle	21	6	4,0	1,0	1,7	0,7
Geflügelmist	10	45	17,0	5,6	8,5	2,3
Rindermist, Milchvieh	11	25	5,9	1,5	4,7	0,8
Schweinemist	5	25	11,0	3,6	6,6	1,3

FG: Frischgewicht

GV: Großvieheinheit

TS: Grad der Entwässerung bzw. Trocknung

Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Wirtschaftsdünger beeinflusst die Bodeneigenschaften differenziell. Die Wirksamkeit der Wirtschaftsdünger hängt nicht nur von ihrer Zusammensetzung sondern auch von Art und Zeitpunkt der Ausbringung ab.

## 2.2 Bedeutung von Wirtschaftsdünger für Getreide- und Gemüseanbau

Landwirtschaftlich genutzte Fläche ist der Oberbegriff für alle bewirtschafteten Flächen wie Ackerland, Dauergrünland und Dauerkulturen. Im Jahr 2008 bewirtschafteten landwirtschaftliche Betriebe in Deutschland ca. 17 Mio. ha Fläche (davon entfielen 11,9 Mio. ha (70,5 %) auf Ackerland) [17]. Deutschland befand sich im Vergleich der landwirtschaftlichen Flächen mit den anderen Ländern der Europäischen Union im oberen Drittel. Als Anbaufrucht ist Getreide im deutschen Ackerbau am bedeutendsten, was sich auch darin zeigt, dass es nach der Haupterhebung über die Bodennutzung 2008 mit 7,038 Millionen ha rund 59 % der Fläche des Ackerlandes ausmacht. Der Anbau von Weizen wuchs im Jahr 2008 von 3,2 Mio. ha auf 26,9 % der Ackerflächen und 45,7 % der Getreideflächen in Deutschland. Dementsprechend fiel die Getreideernte mit 50,1 Mio. Tonnen desselben Jahres überdurchschnittlich aus. Im Jahr 2007 wurden in Niedersachsen 960723 ha Getreide angebaut, davon 399995 ha Winterweizen. Somit ist es das Bundesland mit dem größten Getreideertrag [17, 18].

Die Anbaufläche von Gemüse, Erdbeeren und anderen Gartengewächsen nahm in den letzten zehn Jahren ebenfalls um 24,2 % zu (131000 ha im Jahr 2008). Auf 22600 ha Fläche in Deutschland werden die gesamten Kohlarten angebaut und belegen damit die größte Anbaufläche im Jahr 2008. Davon zählt Weißkohl zu den meisten angebauten Kohlarten (6800 ha) in Deutschland. Es folgt Blumenkohl mit 4800 ha, Rotkohl mit 2400 ha, Kohlrabi mit 2300 ha und Brokkoli mit 2200 ha. Die Erntemengen für die wichtigsten Gemüsearten in Deutschland sind Weißkohl mit 482700 t (davon 219877 dt aus Niedersachsen), 547100 t Möhren (davon 1304902 dt) sowie 99300 t Porree (davon 186166 dt Porree aus Niedersachsen) [17,18].

Laut Düngeverordnung wurde das Ziel der Düngung wie folgt beschrieben [19]:

*„Ziel der Düngung ist die zeitlich und mengenmäßig bedarfsgerechte Ernährung der Pflanzen bei möglichst geringen Nährstoffverlusten.“*

Aufgrund des Entzuges von Nährstoffen durch die pflanzliche Biomasse führt die landwirtschaftliche Nutzung von Böden zur Öffnung von Stoffkreisläufen. Durch Düngung sollen diese Nährstoffkreisläufe geschlossen werden. Der Landwirt muss Art und Menge der Düngemittel festlegen unter Berücksichtigung des Nährstoffbedarfs der angebauten Kulturen sowie der im Boden verfügbaren Nährstoffe. Die Düngeverordnung schränkt jedoch ein, die Gesamtstickstoffmenge der Wirtschaftsdünger aus tierischer Haltung im betrieblichen Durchschnitt auf 170 kg N/ha für Ackerland und 210 kg N/ha für Grünland [19, 20].

Sowohl die Ertragsleistung als auch die Qualität von Winterweizen sind in ihrer Ausprägung durch die Faktoren Bodenart, Jahreswitterung, Vorfrucht sowie N-Düngung stark beeinflusst [20, 21]. Deshalb spielen Wirtschaftsdünger eine wichtige Rolle beim Getreideanbau. Untersuchungen zeigen, dass Gülle die höchsten Ertragsleistungen beim Einsatz von ca. 20 m<sup>3</sup>/ha je Gabe brachte [22]. Im Herbst ist für das Wintergetreide auch eine Kopfdüngung (Düngung in der Wachstumsphase) möglich, wobei eine exakte und gleichmäßig feine Ausbringung bis zu 200 dt/ha erforderlich ist [23].

Die Ausbringung der Gülle sollte generell im Frühjahr erfolgen. Für Wintergerste und Winterroggen ist eine Herbstgabe in Höhe von 10-12 m<sup>3</sup>/ha sinnvoll. Dabei sollte man eine Gesamtmenge von 30-35 m<sup>3</sup>/ha nicht überschreiten. Für die Sommerung (Pflanzen, die im Frühjahr ausgesät werden) ist eine Gesamtmenge von 25-30 m<sup>3</sup>/ha empfehlenswert, wobei die Düngung möglichst vor der Anpflanzung erfolgen muss. Die Düngebedürftigkeit der Gemüsekulturen ist sehr unterschiedlich und schwankt je nach Gemüseart im Bereich zwischen 250 und 400 dt/ha (organische Düngemittel). Kohlpflanzen zum Beispiel wird eine Güllegabe von 30 m<sup>3</sup>/ha auf das Feld vor der Pflanzung empfohlen [20, 24].

### **3 TIERARZNEIMITTEL IN DER LANDWIRTSCHAFT**

#### **3.1 Begriffsbestimmung**

Der Oberbegriff „Arzneimittel“ wird laut Richtlinie 65/65EWG folgendermaßen definiert:

*„Arzneimittel sind alle Stoffzusammensetzungen, die als Mittel zur Heilung oder zur Verhütung menschlicher oder tierischer Krankheiten bezeichnet werden, alle Stoffe oder Stoffzusammensetzungen, die dazu bestimmt sind, im oder am menschlichen oder tierischen Körper zur Erstellung einer ärztlichen Diagnose oder zur Wiederherstellung, Besserung oder Beeinflussung der menschlichen oder tierischen Körperfunktionen angewandt zu werden.“*

In der Landwirtschaft sind Tierarzneimittel verschreibungspflichtige Medikamente, die durch den Tierarzt verordnet und in der Veterinärmedizin in therapeutisch wirksamen Dosierungen appliziert werden. Tierarzneimittel unterliegen auch dem Arzneimittelgesetz (AMG) und

werden durch § 1 AMG Mensch und Tier bezüglich der Anforderungen an Arzneimittel auf die gleiche Stufe gestellt. Antibiotika sind mit einem Anteil von 30% die am häufigsten eingesetzten Tierarzneimittel [25, 26]. Laut Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 werden Antibiotika wie folgt definiert:

*„Antibiotika sind antimikrobielle Stoffe, die durch einen Mikroorganismus erzeugt bzw. aus diesem gewonnen werden und andere Mikroorganismen zerstören bzw. deren Wachstum hemmen“.*

### **3.2 Antibiotika in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung**

In der landwirtschaftlichen Tierhaltung dient der Einsatz von Antibiotika dazu, Tierkrankheiten und Seuchen -besonders in der Massentierhaltung- zu bekämpfen und auch von vorne herein entgegenzuwirken. Für die Tiermedizin lässt sich der Gebrauch von Antibiotika in drei Einsatzgebiete unterteilen. Hier sind die Prophylaxe und Therapie zur Behandlung von Infektionskrankheiten sowie auch der Einsatz zur Leistungsförderung zu nennen [27].

#### ***Therapeutischer Einsatz***

Beim Einsatz von Antibiotika zu Therapiezwecken werden bereits erkrankte oder infizierte Einzeltiere behandelt. Die Behandlung erfolgt oral oder parenteral als Injektion. Die am häufigsten auftretenden bakteriellen Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren sind Atemwegs-, Harnwegs-, Geschlechtsorgan-, Haut- und Wundinfektionen sowie Magen-Darm-Trakt- und Gebärmutterentzündungen. Beispielsweise werden Fluorchinolone beim Einzeltier im Bestand zur Behandlung von Atemwegserkrankungen sowie Erkrankungen des Magen- und Darmtraktes eingesetzt [28]. Für den therapeutischen Einsatz in der Veterinärmedizin werden die gleichen Antibiotikaklassen verwendet, die auch in der Humanmedizin eingesetzt werden. So wird z.B. von den Fluorchinolonen in der Veterinärmedizin Enrofloxacin und im Humanbereich Ciprofloxacin angewendet. Die Dosierung der Antibiotika zur therapeutischen Behandlung von Tieren sind ähnlich wie beim Menschen in mg/kg Körpergewicht (KG) angegeben, so dass die Dosierung auf jedes Tier individuell abgestimmt werden kann. Erfolgt eine Dosierung über die Einmischung ins Futter oder in das Trinkwasser, so muss zunächst die Futter- oder Trinkwasser-Aufnahme des Tieres bestimmt werden, um die erforderliche Dosierung zu gewährleisten.

#### ***Prophylaktischer Einsatz***

Ziel des prophylaktischen Einsatzes von Antibiotika ist es, eine vermutete Gefahr für die Gesundheit der Tiere abzuwenden. Die Applikation erfolgt, wenn einzelne Tiere schon erkrankt sind und die Krankheit auch weitere Tiere zu ergreifen droht. Die prophylaktische Anwendung an ganzen Tiergruppen, bei denen bereits einzelne Tiere des Bestandes Krankheitssymptome zeigen und eine Ausbreitung der Erkrankung in Kürze zu erwarten ist,

wird als metaphylaktischer Einsatz bezeichnet [29]. Somit werden sowohl mögliche nachfolgende Tierverluste vermindert, als auch die zu einem späteren Zeitpunkt erforderliche Antibiotikamenge und ebenfalls die Kosten für die Behandlung einer großen Zahl klinisch erkrankter Tiere reduziert. Die Prophylaxe kommt häufig im Fall von Darminfektionen bei Hühnern oder bei der Einstellung von Ferkeln aus unterschiedlichen Beständen zum Einsatz. Die Verabreichung erfolgt meistens über das Futter oder Trinkwasser, während dagegen bei lokalen Infektionen das Antibiotikum direkt oberflächlich auf die betroffene Stelle aufgetragen wird [30].

Kokzidien, welche Durchfall verursachende intestinale Parasiten sind, stellen ein besonderes Problem in Geflügelbeständen dar. Sie sind nur durch die prophylaktischen Gabe Kokzidien-wirksamer Medikamente, sog. Kokzidiostatika, über das Futter in Kombination mit gewissenhafter Anwendung geeigneter hygienischer Maßnahmen zu beherrschen [31, 32]. Nachteil der Anwendung von Kokzidiostatika ist jedoch, dass die meisten dieser Arzneimittel bedeutende Nebenwirkungen (z.B. kanzerogene Wirkung) zeigen können. Deshalb wurden bereits einige kokzidiostatische Wirkstoffe als Leistungsförderer bei Nutztieren EU-weit verboten jedoch als Futterzusatzstoffe zur Prophylaxe weiterhin erlaubt [33, 34].

### ***Einsatz als Leistungsförderer***

Antibiotika werden als Leistungsförderer in der Tierzucht eingesetzt, um eine höhere Nährstoffverfügbarkeit sowie eine bessere Nährstoffdurchlässigkeit der Darmwand zu erzielen. Dadurch wird die Futtermittelverwertung verbessert, die Tiere wachsen schneller und setzen mehr Fleisch an [28, 35]. Um diesen Effekt zu erzielen, werden Antibiotika in subtherapeutischen (nutritiven) Dosen eingesetzt. Diese subtherapeutischen Dosen sind nicht für eine generelle Prophylaxe gegen bestimmte Krankheitserreger geeignet und wirken nicht keimabtötend. Stattdessen verschieben sie das Keimspektrum im Verdauungstrakt, um ein günstigeres Keimmilieu zu schaffen. Das bedeutet eine verbesserte Kontrolle von subklinischen, inapparenten und unspezifischen Infektionen, die wiederum zu einer verminderten Infektionsanfälligkeit führt [28, 36, 37]. Aus diesen Gründen wurden Antibiotika bis zum Jahre 2006 im Bereich der Veterinärmedizin zur Leistungsförderung eingesetzt. Es besteht die Annahme, dass die Problematik der zunehmenden Bildung resistenter pathogener Bakterienstämme (s. Kap.4.2) sowohl im tiermedizinischen als auch im humanmedizinischen Bereich u.a. auf den vermehrten Einsatz von Leistungsförderern zurückzuführen ist. Aufgrund der sich daraus ergebenden Resistenzproblematik wurde der Einsatz von Arzneimitteln zum alleinigen Zweck der Leistungsförderung seit 2006 EU-weit verboten (Tab. 2).

**Tab. 2:** Wirkstoffe, die innerhalb der EU nicht mehr als Leistungsförderer angewendet werden dürfen und Begründung des Verbots (modifiziert nach [38])

Leistungsförderer (Gruppe)	Verbot seit	Begründung der Rücknahme der Zulassung
Avoparcin (Glycopeptid)	04/1997	Kreuzresistenz zu Glycopeptid-Antibiotika
Spiramycin (Makrolid)	07/1998	Resistenz gegen Spiramycin und Kreuzresistenz zu Makrolid-Antibiotika
Tylosin (Makrolid)	07/1998	Resistenz gegen Tylosin und Kreuzresistenz zu Makrolid-Antibiotika
Virginiamycin (Streptogramin)	07/1999	Kreuzresistenz zu Quinupristin/Dalfopristin
Zink-Bacitracin (Bacitracin)	07/1998	Resistenz gegen Bacitracin
Carbadox / Olaquinox (Chinoxaline)	09/1999	Toxisch (mutagen, kanzerogen, photoallergen)
Monensin* (Ionophere)	01/2006	Risiko für Kreuzresistenzen zu therapeutisch eingesetzten Antibiotika, Toxisch (kanzerogen)
Avilamycin* (Glykopeptide)	01/2006	Kreuzresistenz zu Everninomycine
Salinomycin (Ionophere)	01/2006	Resistenz gegen Salinomycin, Toxisch (kanzerogen)
Flavophospholipol (Phosphoglykopeptide)	01/2006	Resistenz gegen Flavophospholipol

\*Anwendung als Kokzidiostatikum

Tab. 2 gibt einen Überblick über Wirkstoffe, die in der EU nicht mehr als Leistungsförderer eingesetzt werden dürfen und die spezifische Begründung für das Verbot. 1974 wurde in der EU erstmals das Verbot erlassen, Tetracycline als Leistungsförderer einzusetzen [39]. Ab 1997 wurden dann zusätzlich die Wirkstoffe Avoparcin, Zink-Bacitracin, Virginiamycin, Tylosin und Spiramycin in der EU verboten [40]. Bis 1999 wurde dadurch der Verbrauch an Leistungsförderern um 50% reduziert. Die letzten vier in der EU zugelassenen Wirkstoffe Avilamycin, Flavophospholipol, Monensin und Salinomycin dürfen seit dem 1/2006 gemäß EG-Verordnung Nr. 1831/2003 nicht mehr als Leistungsförderer in der Tierernährung eingesetzt werden. Jedoch ist der Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen als Futtermittelzusatzstoff im Anwendungsbereich der Kokzidiostatika oder Histomonostatika weiterhin zugelassen, da diese parasitären Erkrankungen mit einem hohen (Tier-)

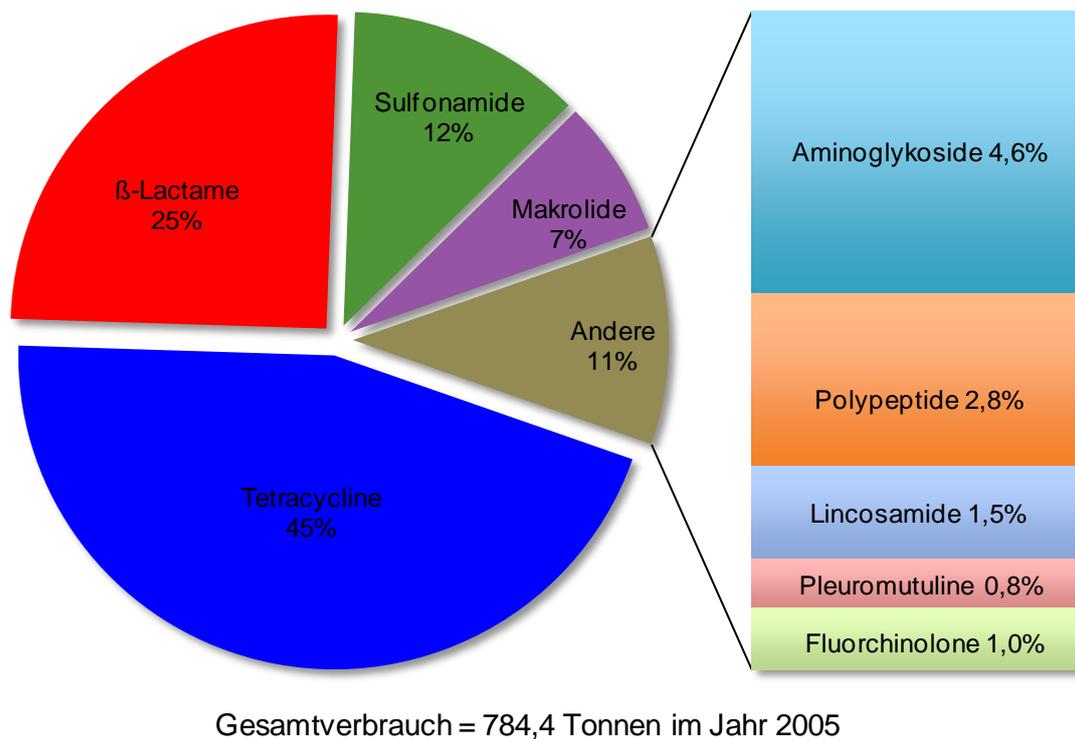
Verlustrisiko behaftet sind und somit eine große Gefahr, besonders für die Kaninchen- und Geflügelzucht, darstellen [34].

### **3.3 Verbrauchsmengen von Veterinärantibiotika**

Durch die Intensivierung der Tierproduktion, d.h. mehr Tiere pro Fläche und Betrieb, entstehen Probleme, die einen vermehrten Antibiotikaeinsatz erforderlich machen.

In Deutschland werden jährlich 40 Mio. t Mastschweine und über 1,19 Mio. t Geflügel produziert, wobei die Dosierung der Wirkstoffe bei 10-100 µg/kg KG der Tiere beträgt. Eines der wichtigsten Produktionsgebiete in Deutschland ist dabei Niedersachsen mit einem Anteil von 34% an der Schweine- und 48% an der Putenproduktion [41].

Wie bereits in Kap. 3.2 beschrieben, wurden seit 1974 schrittweise verschiedene Antibiotika für die Anwendung als Leistungsförderer im Bereich der Tierhaltung verboten. Seit dem Verbot im Jahre 2006 liegen keine genauen Angaben über die Entwicklung des Antibiotikaverbrauchs vor. Jedoch gibt es Hinweise, dass der Antibiotikaeinsatz zurückgegangen ist [4]. In Deutschland liegen ausschließlich geschätzte Daten über den tatsächlichen Verbrauch an Antibiotika vor, die durch das Veterinärpanel von der Gesellschaft für Konsumforschung (GfK) für den Bereich der Veterinärtherapie ermittelt wurden. Beim Veterinärpanel, welches auf einer Stichprobenuntersuchung des Einkaufsverhaltens der niedergelassenen Tierärzten beruht, wurde aus den verkauften Einheiten über die angegebenen Konzentrationen auf die Wirkstoffmenge zurückgerechnet. Damit kein Rückschluss auf ein einzelnes Produkt möglich ist, wurden die Einzelwirkstoffe zu Wirkstoffklassen zusammengeführt.



**Abb. 1:** Einsatz von Veterinärantibiotika in Deutschland im Jahr 2005 [4]

Nach diesen Daten (Abb. 1) stieg die Verbrauchsmenge an Antibiotika in Deutschland im Jahr 2005 im Vergleich zu 2003 mit 784 t um 8,3 % an. Jedoch wurde der Tetracyclin-Einsatz um 35 t reduziert. Dieses hängt mit dem Auslaufen von Zulassungen mehrerer günstiger oraler Tetracyclinpräparate in der gegenwärtigen Zeit zusammen. Trotzdem stellen Tetracycline mit 45 % den Hauptanteil an der Gesamtverbrauchsmenge von Antibiotika dar. Mit 44 t stieg demgegenüber der Verbrauch an  $\beta$ -Lactamen im gleichen Zeitraum stark an, was möglicherweise auf die Preisentwicklung bei Amoxicillinen zurückzuführen ist. Auch die Einsatzmengen an Sulfonamiden nahmen erkennbar zu. Im Jahr 2003 lag innerhalb Deutschlands die Verbrauchsmenge an Sulfonamiden bei 71,7 t (inkl. Trimethoprim) für den veterinärmedizinischen Bereich. Im Jahr 2005 wurden etwa 27 t an Sulfonamiden mehr verbraucht als im Vergleichsjahr 2003.

Fluorchinolone haben in der Praxis in den vergangenen Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Die Verbrauchsmenge an Fluorchinolonen in Deutschland verzeichnet im Jahr 2005 (3,7 t) gegenüber dem Jahr 2003 (3,5 t) einen leichten Anstieg (5,7 %). Bei einer durchgeführten Umfrage gaben 90 % der bayerischen Rinderzüchter an, Chinolone in der Praxis einzusetzen [42]. Die große Bedeutung der Fluorchinolone wird deutlich, wenn man sich die Gesamtverbrauchsmengen für die gesamte EU und die Schweiz vor Augen hält. Diese lagen im Jahr 1997 in der EU bei 42 t mit einem Anteil von 1,2 % aller eingesetzten antimikrobiell wirksamen Stoffen. Auffällig ist der hohe Verbrauch von Fluorchinolonen in den

Niederlanden, der mehr als 20 % über dem Durchschnitt der in der EU eingesetzten Fluorchinolone liegt [43]. Der Fluorchinoloneverbrauch im veterinärmedizinischen-Bereich macht in Deutschland nur ca. 1 % (~3,7 t) aus. Trotzdem wird seit etwa 10 Jahren in Deutschland ein Anstieg der Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen beobachtet d.h. eine relativ hohe Resistenzlage mit ca. 40% bei Geflügel und beim Menschen. Der hohe Verbrauch an Fluorchinolonen, die als Reservemittel bei schweren, sonst nicht beherrschbaren Infektionen eingesetzt werden, ist in Bezug auf die Förderung einer Resistenzselektion kritisch zu sehen [44].

Zusammenfassend lässt sich der Anstieg des Antibiotikaeinsatzes in Deutschland durch die Ausweitung der Tierproduktion, die Änderung der Produktionsweise und durch das relativ niedrige Preisniveau der Wirkstoffe erklären.

Nach einer Studie von Boatman im Jahre 1996 wurden in der EU etwa 50 % (3375 t) der Antibiotika als Futtermittel (Wachstumsförderer, Kokzidiostatika) eingesetzt, was 25 % des weltweiten Bedarfs entspricht [45]. Jedoch rechnen die Autoren seit Anfang 1999 mit einer verstärkten Verwendung von Ionophoren bei Schweinen, Rindern und Geflügel aufgrund des Anwendungsverbotes von Kokzidiostatika als Leistungsförderer. In Schweden und Dänemark werden Kokzidiostatika in den meisten Geflügelfarmen genutzt, während der sonstige Antibiotikaverbrauch für Geflügel gering ist. Im Jahr 2001 wurden Kokzidiostatika in Dänemark 17739 kg in der Geflügelproduktion eingesetzt [31, 32].

Laut des Bundesverbandes für Tiergesundheit wurden für die europäischen Länder folgende Einsatzmengen an Antibiotika angegeben: Dänemark: ~ 110 Tonnen, Niederlande:~450 Tonnen, Großbritannien: ~ 480 Tonnen und Frankreich: ~ 1260 Tonnen. Die Zahlen sind dennoch nicht unmittelbar vergleichbar, weil sie aus unterschiedlichen Erhebungsjahren (von 2003 bis 2005) stammen [7].

### 3.4 Eigenschaften von Antibiotika

#### 3.4.1 Tetracycline

Chlortetracyclin, ein Vertreter der Wirkstofffamilie der Tetracycline, wurde im Jahr 1947 bei einer Bodenuntersuchung erstmals entdeckt [46]. Etwa 1 Jahr später isolierte Duggar Chlortetracyclin aus einem Kulturfiltrat des Bakterienstammes von *Streptomyces aureofaciens*. Im Folgenden wurde z.B. mit der Isolierung von Oxytetracyclin aus einer Nährlösung von *Streptomyces rimosus*-Bakterien isoliert. Es folgten im Jahr 1953 Isolierungen von Tetracyclin aus Nährlösungen von verschiedenen Streptomycesarten und im Jahr 1962 die Entdeckung des Doxycyclins [47].

Der Name der Tetracycline leitet sich von ihrem isocyclischen Grundkörper ab, welcher aus vier linear-kondensierten Cyclohexanringen (Naphtacen-Grundgerüst) besteht. Aus diesem

Grundgerüst ergeben sich die Strukturen der unterschiedlichen Vertreter der Tetracycline durch die Position der unterschiedlichen Substituenten (Tab. 3) [48].

**Tab. 3:** Struktur von Tetracyclin-Wirkstoffen [49]

Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Tetracyclin	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H
Doxycyclin	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-OH
Oxytetracyclin	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H
*Demeclocyclin	-Cl	-H	-OH	-H
Chlortetracyclin	-Cl	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H

\* Demeclocyclin ist als Wirkstoff in Human- und Veterinärmedizin nicht mehr zugelassen

Die Wirkstoffe unterscheiden sich durch ihre Substituenten an C5, C6, C7 und C2. Die Derivate zeigen vergleichbare physiko-chemische Eigenschaften.

### **Physikalische und chemische Eigenschaften**

Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlortetracyclin sind kristalline, gelb bis braun gefärbte, pulverige Substanzen. In neutraler und saurer Lösung zeigen sie charakteristische UV-Spektren bei 260 nm. Im alkalischen Milieu besitzen die Tetracycline ein Absorptionsmaxima bei 320-380 nm [50, 51].

Die Wasserlöslichkeit der Tetracycline ist im physiologischen pH-Bereich recht gering (ca. 1 mg/ml), wobei sie als Hydrochloride jedoch meist gut löslich sind. Tetracycline sind in Säuren, Basen, Alkoholen sowie polaren organischen Lösemitteln sehr gut löslich (50-100 mg/ml) und lassen sich gut damit extrahieren [51].

Durch ihre sauren Gruppen und dem basischen Dimethylamino-Rest besitzen Tetracycline einen amphoteren Charakter und vier Säurekonstanten. Aufgrund der OH-Gruppe an Position C-3 reagieren Tetracycline als Säuren mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von 3,3 bis 3,4. Eine zweite Deprotonierung resultiert an der enolischen OH-Gruppe an Position C-12 aus der Struktur einer vinylogenen Carbonsäure (pK<sub>a</sub>= 7,6). Die basischen Eigenschaften beruhen auf der Dimethylaminostruktur. So ist der pK<sub>a</sub>-Wert von 9,7 einem protonierten N-4-Atom

zuzuordnen. Der vierte  $pK_a$ -Wert von 12 wird dabei der phenolischen OH-Gruppe am C10-Atom zugeordnet [52, 53, 54].

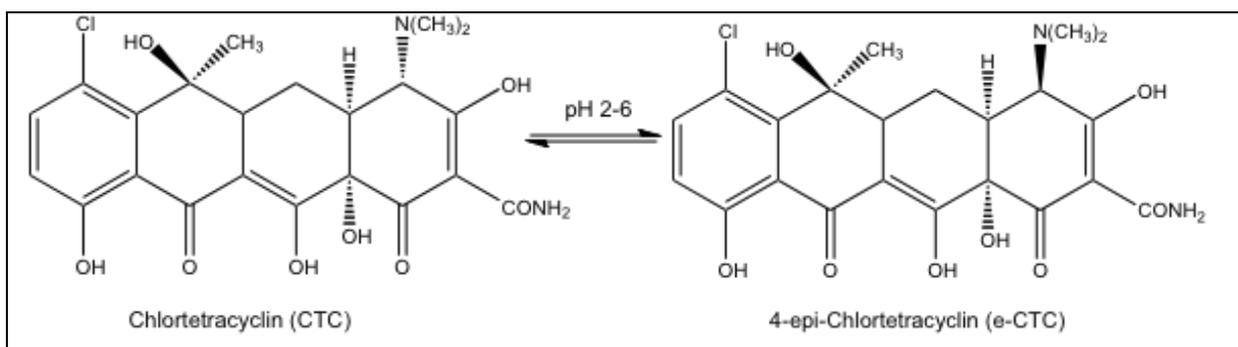
Tetracycline weisen eine große Tendenz zur reversiblen Bildung schwerlöslicher Komplexe mit Kationen ( $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  und  $Zn^{2+}$ ) und Anionen (Phosphat, Citrat, Salicylat,  $\beta$ -Hydroxybenzoat) [55, 56].

### Umwandlungs- und Abbaureaktionen

In Abhängigkeit vom Lösungsmittel, von der Temperatur, der Lichteinstrahlung und insbesondere vom pH-Wert kommt es bei den verschiedenen Tetracyclinen (in Lösung) zu einer Vielzahl von Umwandlungs- und Abbaureaktionen [46, 57].

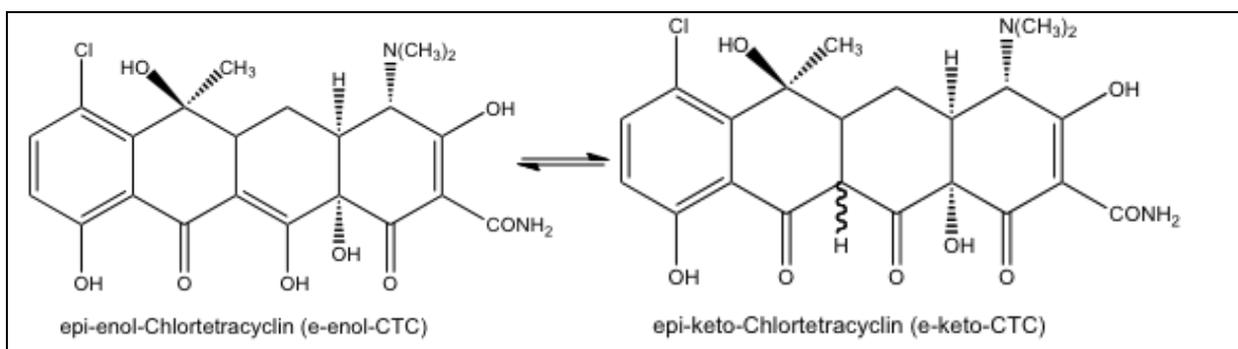
#### Epimerisierung

Tetracycline sind in saurer Lösung relativ stabil, aber in basischer nicht beständig [58]. Hieraus wird deutlich, dass die Epimerisierungen pH-Wert abhängig sind. Zwischen pH 2 und 6 epimerisieren die Tetracycline (Abb. 2).



**Abb. 2:** Epimerisierung von Chlortetracyclin [60]

Nach einer Reaktion erster Ordnung verläuft die Epimerisierung reversibel und wird z.B. durch Citrat katalysiert [59]. Andererseits können Tetracycline in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Polarität des Lösungsmittels verschiedene tautomere Formen annehmen (Abb. 3).



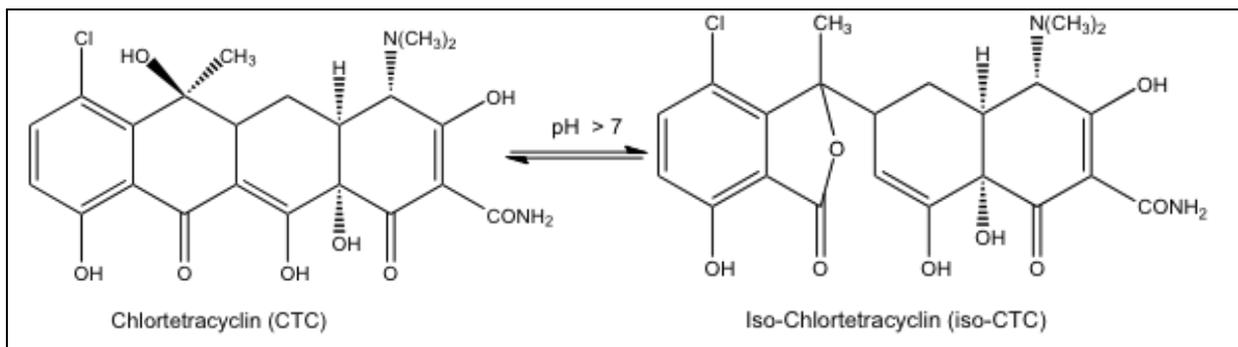
**Abb. 3:** Keto-Enol-Tautomerie von Chlortetracyclin [60]

Epimere besitzen eine bessere Löslichkeit in den meisten Lösungsmitteln als ihre Muttersubstanz. Gegenüber saurer oder alkalischer Einwirkung haben sie eine erhöhte Stabilität [46].

Durch die Epimerisierung der Tetracycline wird die antibiotische Wirksamkeit gegenüber der Muttersubstanz um 90-100 % vermindert. Ob die Epimere überhaupt eine antibiotische Wirksamkeit besitzen oder die antibiotische Aktivität auf Rückepimerisierung zurückzuführen ist [60, 61], da die Epimerisierung reversibel ist, ist unklar.

#### Isomerisierung

Ab pH 6 sind Tetracycline instabil. Durch eine alkalische Behandlung führt die Hydroxygruppe an Position C6 zum Aufbrechen des C-Ringes und somit zur Bildung der iso-Tetracycline (irreversible Reaktion). Beispielweise bildet Chlortetracyclin bei pH 7,5 unter Erwärmen iso-Chlortetracyclin aus (Abb. 4) [46].

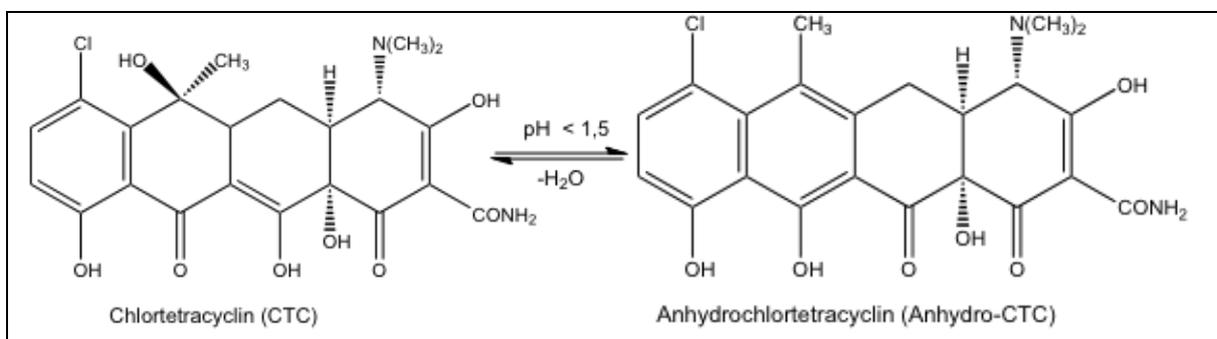


**Abb. 4:** Isomerisierung der Tetracycline, Beispiel Chlortetracyclin [60]

Diese Isomeren besitzen keine oder nur noch sehr geringe antibiotische Aktivität [62]. Auch epimerisieren Iso-Tetracycline bei pH 2-6 zu 4-epi-iso-Tetracyclinen [63].

#### Dehydratisierung

Bei pH < 2 spalten die Tetracycline mit einer Hydroxygruppe an C6 Wasser ab. Dabei entstehen unter Aromatisierung vom C-Ring die entsprechenden Anhydrotetracycline (Abb. 5) [51].



**Abb. 5:** Dehydratisierung von Chlortetracyclinen [60]

Die Anhydrotetracycline unterliegen ebenfalls der Epimerisierung und der Keto-Enol-Tautomerie. Anhydro-Verbindungen sind ebenfalls antimikrobiell wirksam. Jedoch finden sie keine klinische Anwendung, da sie toxischer als ihre Muttersubstanz sind [63].

#### ***Wirkmechanismen und Wirkungsspektren***

Die Wirkung der Tetracycline beruht auf der Hemmung der Proteinsynthese. Dazu binden sich die funktionalen Stellen der Tetracycline in der Bakterienzelle an die 30 S Untereinheiten des 70 S Ribosoms und blockieren diese dadurch. Die Elongationsphase der Proteinsynthese ist unterbrochen durch die Blockade der Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Akzeptoren des mRNA-Ribosomenkomplexes [64, 65].

Die Wirkung der Tetracycline ist bakteriostatisch, was bedeutet, dass diese Wirkstoffe zwar das Bakterienwachstum einschränken, die Bakterien jedoch nicht abtöten. Sie sind wirksam gegen viele grampositive (*Streptokokken, Pneumokokken*) und gramnegative Erreger (*Neisseria, Bordetella pert., Campylobacter*). Ihr Wirkungsspektrum erfasst außerdem noch intrazelluläre Keime (*Mykoplasmen, Rickettsien, Chlamydien*) und Spirochäten [66].

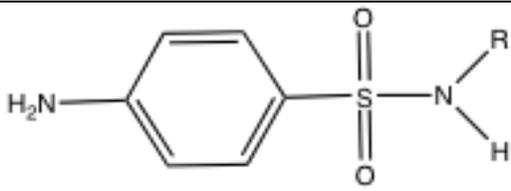
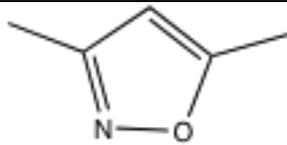
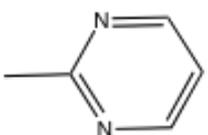
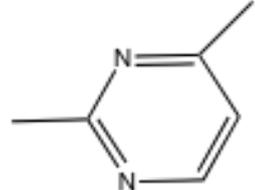
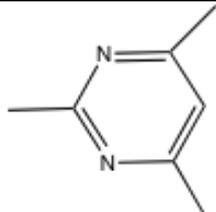
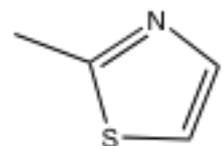
#### ***Anwendung in der Tierhaltung***

Tetracycline besitzen durch ihren Molekülbau stark lipophile Eigenschaften. Dadurch kann sich der Wirkstoff leicht im Körpergewebe verteilen und so auch intrazellulär Krankheitserreger erreichen [38]. Infektionen des Urogenitalsystems und des Magen-Darm-Traktes, der Haut sowie der Atemwege sind Indikationsgebiete von Tetracyclinen. Zusätzlich zu diesen breitgefächerten Anwendungsmöglichkeiten tragen auch die niedrigen Therapiekosten für Tetracyclin-Präparate gerade in der veterinären Anwendung (z.B. mit Therapiekosten von 7,5 € für Oxytetracyclinpräparate) bei. Die Dosierungsmengen für Tetracycline liegen bei Schweinen etwa im Bereich von 20-50 mg/kg und für Hühner bei 50-100 mg/kg pro Tag [28]. Ein Teil der verabreichten Tetracyclinen wird in aktiver Form renal durch die Nieren oder auch durch die Faeces ausgeschieden. Die Ausscheidungsrate von Tetracyclinen beträgt bis zu 90 % [60].

### **3.4.2 Sulfonamide**

Die Stoffklasse der Sulfonamide leitet sich vom Sulfanilamid (para-Aminobenzolsulfonamid) ab. Dieses wurde erstmalig 1908 synthetisiert, dessen antibiotische Wirkung jedoch erst 1932 Domagk erkannte [67].

**Tab. 4:** Struktur von Sulfonamid-Wirkstoffen [68]

			
Name	R-Struktur	Name	R-Struktur
Sulfanilamid		Sulfamethoxazol	
Sulfadiazin		Sulfamerazin	
Sulfamethazin		Sulfathiazol	

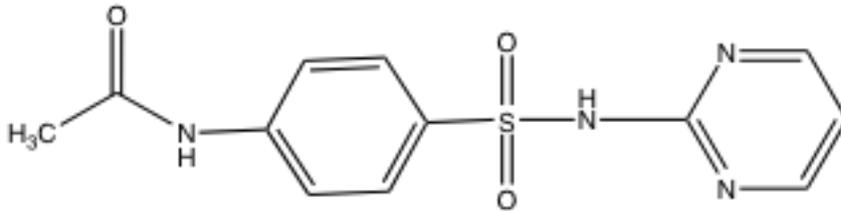
Durch die Veränderung der Substituenten an der N1-Position verändern sich die pharmakokinetischen Eigenschaften des Wirkstoffes [69]. Diese Tatsache ermöglicht, dass sich ausgehend vom Sulfonilamid eine ganze Stoffklasse durch eben diese Veränderung eines einzigen Substituenten ableiten lässt.

#### **Physikalische und chemische Eigenschaften**

Sulfonamide sind weiße, kristalline Pulver. In neutraler und saurer Lösung zeigen sie eine charakteristische UV-Absorption bei 270 und 320 nm. Sie besitzen amphoteren Charakter, was bedeutet, dass ihre Löslichkeit in wässriger Lösung pH-Wert abhängig ist. Sie können daher in Lösung als kationische, neutrale bzw. zwitterionische und/oder anionische Spezies vorliegen. Das Löslichkeitsminimum in wässriger Lösung liegt etwa bei einem pH-Wert zwischen drei und fünf. Es sind zwei Säurekonstanten für Sulfonamide bekannt. Der erste pKa-Wert liegt bei 2-3 und wird der Protonierung der Aminogruppe zugeordnet. Der zweite pKa-Wert liegt bei 4,5-10,6 und ist der Deprotonierung des  $R_1SO_2NHR_2$ -Teils zuzuordnen [70, 71].

### **Metabolisierung**

Die Sulfonamide metabolisieren in der Leber von tierischen z.B. von Schweinen oder auch menschlichen Organismus. Als Hauptmetabolite werden dort N4-Acetyl-Sulfonamide durch die Acetylierung des primär-gebundenen 4-Anilinstickstoffes gebildet [72].



**Abb. 6:** Struktur von N4-Acetyl-Sulfadiazin

Studien wiesen bei Schweinen eine Ausscheidungsgrade von 50 % des eingesetzten Sulfadiazin nach. Jedoch sind N4-Acetyl-Sulfonamide nicht antibakteriell wirksam, wobei z.B. das N4-Acetyl-Sulfadiazin mit der Zeit wieder deacetyliert wird [73, 74, 75, [76].

### **Wirkmechanismen und Wirkungsspektren**

Sulfonamide wirken ebenfalls wie Tetracycline bakteriostatisch. Sie können bei hohen Konzentrationen jedoch auch bakterizid wirken. Sulfonamide haben eine ähnliche Struktur wie die p-Aminobenzoesäure (p-ABS), die sich in der bakteriellen Zelle befindet und dort zur Synthese der Folsäure beiträgt. Sulfonamide greifen damit in die bakteriellen Synthesewege der Folsäure ein, verbleiben hier als Antimetabolit und binden die Dihydropteroinsäure-Synthetase an Stelle der p-Aminobenzoesäure. Dadurch kann Hydropteroinsäure nicht mehr gebildet werden, die eine Vorstufe der Dihydrofolsäure (DHF) ist. Diese wird wiederum von Bakterien benötigt, um daraus die zur DNA und RNA-Synthese und somit auch für die Proteinsynthese benötigte Tetrahydrofolsäure zu synthetisieren [77].

Sulfonamide besitzen eine Breitbandwirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie Chlamydien und einigen Kokzidien. Zwischen pH 5,5 und 7,5 erreichen Sulfonamide ihr Wirkungsoptimum und haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein sehr breites Wirkungsspektrum [28, 33].

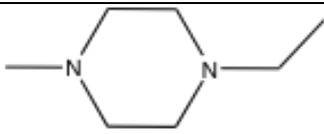
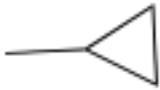
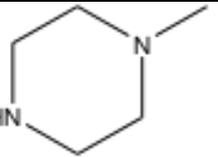
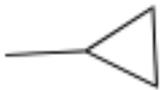
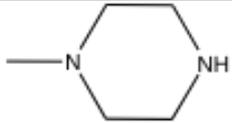
### **Anwendung in der Tierhaltung**

Sulfonamide werden bei Harnwegsinfektionen, Infektionen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich und des Magen-Darm-Traktes sowie Infektionen der Atemwege oral angewendet. Neben diesem breiten Anwendungsspektrum trägt zur großen Bedeutung der Sulfonamide gleichermaßen bei, dass es relativ kostengünstige Medikamente sind. Die Dosierungsmengen für Sulfonamide bei Tieren sind mit denen der Tetracycline vergleichbar. Beispielweise wird Sulfamethazin bei Schweinen in Dosen von 50-100 mg/kg KG pro Tag verabreicht [28, 30].

### 3.4.3 Fluorchinolone

Die Fluorchinolone sind wie die Sulfonamide synthetisch hergestellte Substanzen und werden daher als Chemotherapeutika bezeichnet. Die Synthese von Nalidixinsäure (Grundgerüst der Fluorchinolone) (Tab. 5) wurde im Jahr 1962 als erste Substanz der Chinolone patentiert. Zur ersten Generation der Chinolone werden zusammen mit der Gruppe der Naphthyridine, Cinnoline und Pyridopyrimidine gezählt. Als erster Vertreter der Gruppe von Fluorchinolonen wurde Norfloxacin synthetisiert, welches 1984 auf den Markt kam [78, 79].

**Tab. 5:** Struktur der Fluorchinolone [80]

Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Enrofloxacin		
Ciprofloxacin		
Danofloxacin		
Norfloxacin		-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

In Tab. 5 sind die Strukturen der Fluorchinolone wie Enrofloxacin, Danofloxacin, Norfloxacin sowie Marbofloxacin, die in der Veterinärmedizin am häufigsten verwendet werden [81], dargestellt. Der bedeutendste Vertreter der Stoffklasse ist Enrofloxacin (ENR), das nur für die Veterinärmedizin zugelassen ist. Dieses ist für die Geflügelmast von Bedeutung. Dabei ist die Anwendung im Bereich der Legehennen wiederum ausgenommen, um Rückstände in Eiern zu vermeiden [82].

### **Physikalische und chemische Eigenschaften**

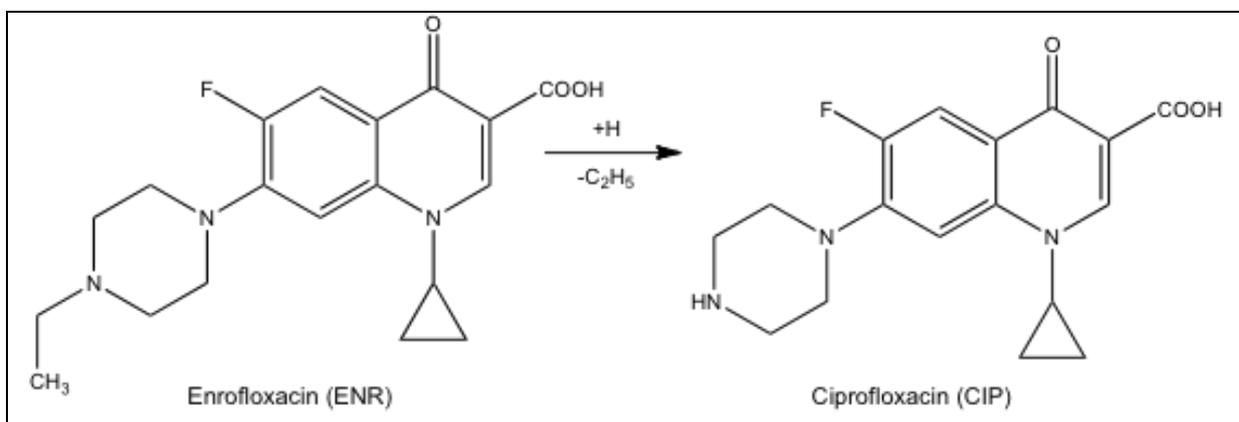
Fluorchinolone sind schwach gelbe, kristalline Pulver, thermostabil und schwach lichtempfindlich. Sie absorbieren UV-Strahlung im Bereich von 285-335 nm. Die Löslichkeit der Fluorchinolone in Wasser ist auf Grund ihrer Struktur pH-Wert-abhängig. Die bessere Löslichkeit in alkalischen wässrigen Lösemitteln beruht auf der Deprotonierung der Säurefunktion ( $pK_s \approx 5$ ) [83]. Im neutralen Bereich führt das ungeladene bzw. als Zwitterion vorliegende Molekül dagegen zu einer schlechteren Löslichkeit, während sich dann im Säuren durch die Protonierung des tertiären Stickstoffs am Piperazinring die Löslichkeit wiederum erhöht ( $pK_s \approx 8-9$ ) [84].

Fluorchinolone besitzen auch wie Tetracycline unterschiedliche  $pK_a$ -Werte. ENR besitzt beispielweise einen  $pK_a$ -Wert von 6,27 bis 8,3 und CIP von 5,9 bis 8,89 [85].

### **Metabolisierung**

Strukturell sind die Fluorchinolone als Derivate der Chinolin-4-on-3-carbonsäure aufzufassen. Durch die Einführung eines Piperazins an die C7-Position der Carbonsäure entsteht die Pipemidsäure. Und durch die Fluorierung an Position sechs des Grundgerüsts werden die Fluorchinolone dargestellt. So wird eine erhebliche Aktivitätssteigerung der Chinolone erreicht. Ebenfalls bewirkt eine Cyclopropylsubstitution eine Steigerung der antibakteriellen Aktivität [79].

Durch Abspaltung der Ethylgruppe vom Piperazinylring entsteht der Hauptmetabolit Ciprofloxacin (CIP) (Abb. 7).



**Abb. 7:** Metabolisierung von Enrofloxacin zu Ciprofloxacin [79]

Das veterinärmedizinisch eingesetzte ENR wird in der Leber bei Schweinen bis zu 52 % zum CIP abgebaut (Abb. 7) [86]. Das CIP wird zwischen 44 und 62 % mit Harn und zwischen 15 und 25 % mit Faeces von menschlichem Körper ausgeschieden [87]. Der Metabolit CIP, der ebenfalls antimikrobiell wirkt, ist als Wirkstoff nur in der Humanmedizin zugelassen.

***Wirkmechanismen und Wirkungsspektren***

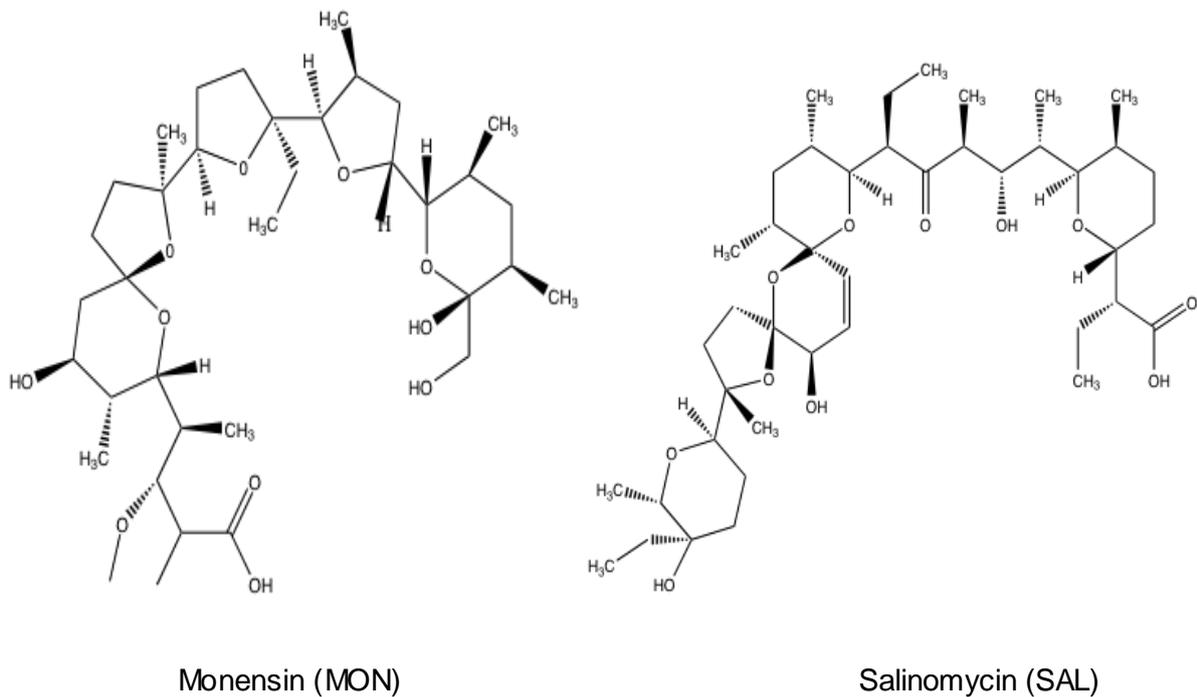
Fluorchinolone hemmen die bakterielle DNA-Gyrase. Um die DNA richtig zu strukturieren, benötigt die Bakterienzelle Gyrase. Die Gyrase bildet mit Fluorchinolonen stabile Komplexe, so dass die Torsion der DNA aufgehoben wird. Fluorchinolone wirken daher bakterizid und haben ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Keime [64, 76].

***Anwendung in der Tierhaltung***

Die Fluorchinolone werden seit den 80er-Jahren in der Veterinärmedizin insbesondere zur weitverbreiteten Behandlung ganzer Geflügelbestände verwendet. Fluorchinolone werden bei Atemwegsinfektionen, bei bakteriellen Darmerkrankungen, bei Harnwegsinfektionen, Infektionen des Hals-Nasen-Ohrenbereiches und des Genitalbereiches sowie auch der Knochen eingesetzt. Enrofloxacin, ein wichtiger Vertreter dieser Klasse im Veterinärbereich, wird z.B. bei Respirations-, Digestionstrakt, bakterielle Sekundärinfektionen und Mischinfektionen bei Puten, Hühnern, Kälbern, Ferkeln, Schweinen u.a. angewandt [28, 81]. Die Applikation erfolgt meistens oral. Preislich liegen die Präparate deutlich über den meisten anderen Antibiotika. Die Richtdosierung an Fluorchinolonen für Schweine liegt bei 2,5-10 mg/kg KGW [28]. Nach 3-12 Stunden werden die Fluorchinolone überwiegend über die Nieren ausgeschieden [81].

**3.4.4 Ionophore**

Polyether-Antibiotika können Ionen über biologische Membranen transportieren, weshalb sie auch als Ionophore bezeichnet werden. Die Carboxylgruppe, polyketidische Einheiten sowie mehrere Tetrahydrofuran- oder Tetrahydropyranringsysteme sind die charakteristischen Elemente der Polyether [88, 89].



**Abb. 8:** Strukturen von Monensin (MON) und Salinomycin (SAL) [90]

Aus *Streptomyces cinnamomensis* ATCC 15413 isoliertes Monensin ist einer der wichtigen Vertreter dieser Klasse [88].

#### **Physikalische und chemische Eigenschaften**

Ionophore sind hellgelb gefärbte Pulver [91]. Zusätzlich sind sie nicht oder nur in geringem Maße wasserlöslich, schlecht löslich in Methanol, aber dagegen gut löslich in Wasser oder in organischen Lösungsmitteln nach Zugabe von Natriumsalzen [88]. Ionophore sind in der Lage Alkalimetallionen z.B.  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  reversibel zu Chelaten zu binden, um damit deren Transport in biologischen Systemen durch Membrane zu ermöglichen [92].

#### **Metabolisierung**

Ionophore können an unterschiedlichen Positionen der verschiedenen Ringe des Moleküls metabolisieren. Nach Donoho et al. wurden z.B. für Monensin in Hühnern unterschiedliche Metabolite nachgewiesen. Die Metabolite entstanden entweder durch Demethylierung, Decarboxylierung oder durch Hydroxylierung. Die Metabolite besitzen eine viel geringere biologische Aktivität als die Muttersubstanz, welche weniger als 10 % der gesamten Rückstände ausmachten [93, 94].

#### **Wirkmechanismen und Wirkungsspektren**

Polyetherantibiotika sind wirksam gegen alle Kokzidien, wie z.B. die *Sporozoit*en sowie gegen parasitische Amöben, insbesondere *Eimeria* und *Plasmodium*. Diese Antibiotika vermitteln den Einstrom von Kationen in die Zelle. Durch Monensin werden insbesondere Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ) im Austausch gegen Protonen ( $\text{H}^+$ ) in die Zelle transportiert. Dieses führt zu

einem Zusammenbruch des natürlichen transmembranen Ionengradienten und zu einer pH-Verschiebung sowie zum Wassereintritt in die Zelle. Die damit verbundene Druckerhöhung bewirkt eine Zerstörung intrazellulärer Strukturen und damit den Zelltod. Das Wachstum der grampositiven Bakterien wird durch die Ionophore gehemmt [95].

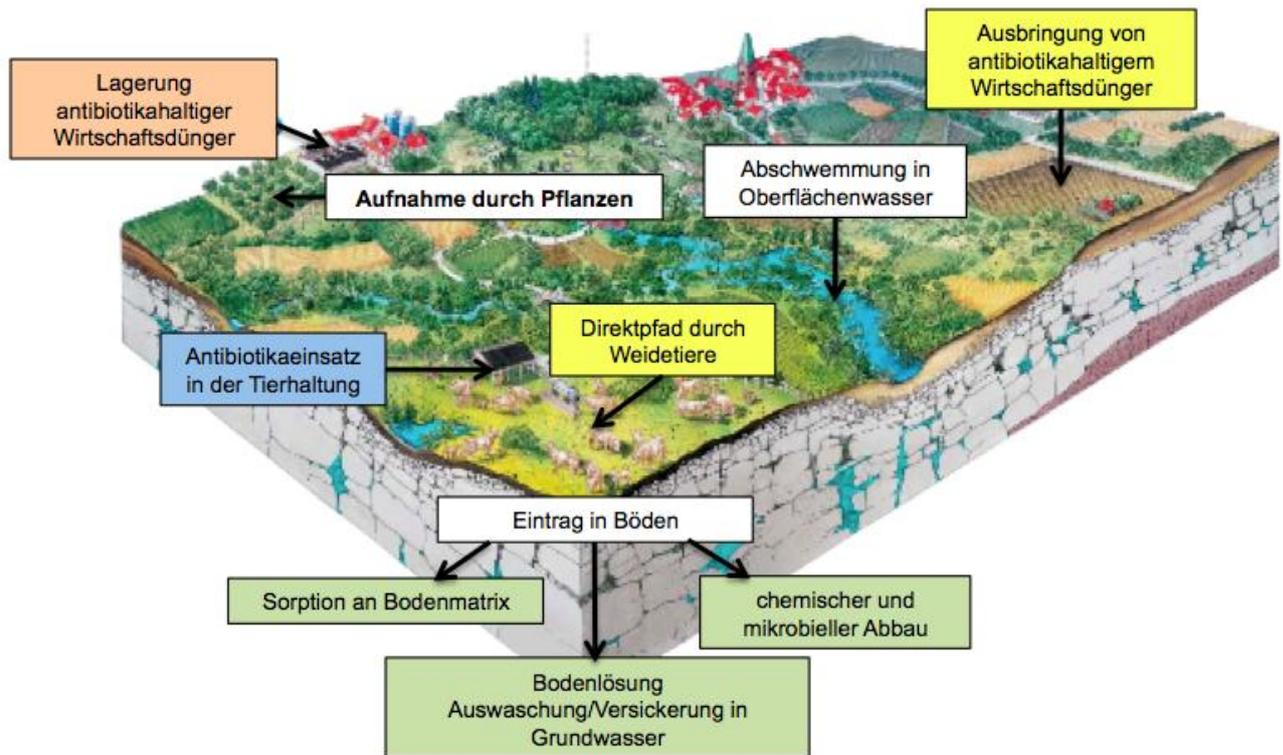
### **Anwendung in der Tierhaltung**

Seit der Zulassung im Jahre 1971 findet Monensin einen weltweiten veterinärmedizinischen Einsatz. Aufgrund seiner kokzidiostatischen Eigenschaften wurde es zunächst in der Geflügelzucht als Futtermittelzusatz seit 1977 bei der Rindfleischproduktion eingesetzt. Seit 2000 wird es zudem auch an Milchvieh zur Ertragssteigerung angewendet. Die therapeutische Anwendung der Ionophore Monensin, Lasalocid, Salinomycin, Narasin und Maduramycin ist in der EU (VO 1831/2003/EEC) aufgrund ihrer genotoxischen bzw. kanzerogenen Wirkpotentiale seit Februar 2006 verboten. Jedoch sind sie aufgrund Ihrer guten Wirksamkeit gegen Kokzidien und Kryptosporidien bei Geflügel, kleinen Wiederkäuern, Kälbern und Kaninchen zum Einsatz als Kokzidiostatika oder Histomonostatika weiterhin erlaubt.

Sie besitzen eine starke Wirkung gegen grampositive Bakterien, Viren und Kokzidien. Bei Wiederkäuern ist die Anwendung z.B. gegen *Clostridium welchii* oder bei Geflügelbeständen gegen die Kokzidien *Eimeria Tenella* möglich [96]. Die Dosierung an Kokzidiostatika beträgt für Masthühner von 100-125 mg/kg KG, für Junghennen von 100-120 mg/kg KG und für Truthühner von 60-100 mg/kg KG [97]. Monensin wird von Monogastriern zu einem hohen Prozentsatz enteral absorbiert und metabolisiert. Im Hühnerkot wurden nicht mehr als 10 % der Muttersubstanz nachgewiesen [98].

### **3.5 Antibiotika in der Umwelt - Eintrag und Verhalten**

In der Landwirtschaft eingesetzte Antibiotika können auf mehreren Eintragungspfaden in die Umwelt gelangen, deren wichtigste in Abb. 9 dargestellt sind.



**Abb. 9:** Eintrag von Antibiotika aus der Landwirtschaft in die Umwelt (modifiziert nach [99, 100, 101])

Nach der Verabreichung von Tierarzneimitteln erfolgen während der Tierpassage Abbaureaktionen (z.B. in Leber, Niere) wie enzymatische Spaltung, Glycosylierung, Acetylierung oder Hydrolyse. Antibiotika, insbesondere Tetracycline, werden im Tier nur geringfügig metabolisiert und in hohen Anteilen (bis 90%) wieder ausgeschieden [60]. Die Ausscheidungen, Festmist oder Gülle, werden aus der Stallhaltung gesammelt und als Wirtschaftsdünger verwendet.

Die Gehalte an Antibiotika in den Wirtschaftsdüngern sind von vielen Einflussfaktoren abhängig. Dazu zählen u.a. der Verdünnungseffekt und die Lagerungsbedingungen (Temperatur, Belüftung etc.) sowie die physiko-chemischen Eigenschaften der Matrix. In den Untersuchungen wurde festgestellt, dass Antibiotika je nach Gülleart und Wirkstoff im mg/kg-Bereich in der Gülle hinterlassen werden können (s. Tab. 6).

Im Veterinärbereich gibt es zwei dominierende Pfade, die zum Eintrag von Antibiotika in den Boden führen können. Es ist entweder der Eintrag durch Weidevieh oder durch die Gülleausbringung. Wenn die mit Antibiotika behandelten Tiere auf Weiden gehalten werden, gelangen die Ausscheidungen direkt auf den Boden und verursachen an dieser lokalen Stelle hohe Antibiotikakonzentrationen. Die Ausbringung von Antibiotika-belasteten

Wirtschaftsdüngern auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ist der Haupteintragsweg für Veterinärantibiotika in die Umwelt. Stallmist wird direkt auf den Boden und Gülle entweder mit Schleppschläuchen oder mit Streutellern auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ausgebracht. Durch die Gülleausbringung können im Boden Antibiotikakonzentrationen im µg/kg-Bereich erreicht werden (s.Tab.7).

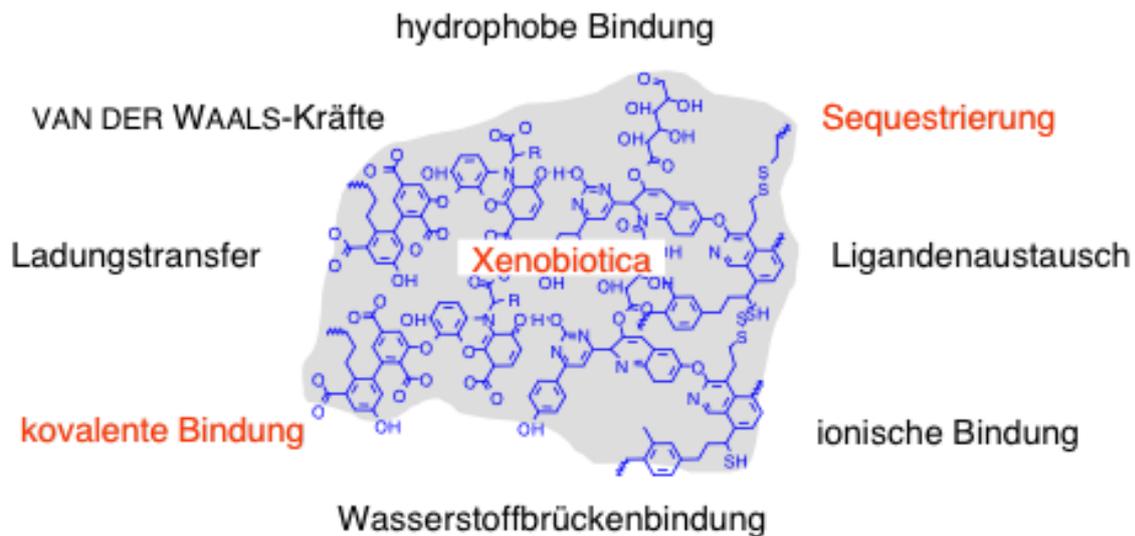
Antibiotika, die über Wirtschaftsdünger in den Boden gelangen, können dort akkumulieren. Hamscher et al. [3] und Grote et al. [102] konnten Tetracycline und Sulfonamide und ihre Metabolite in der oberen Bodenschicht (0-30 cm) nachweisen. Trotz hoher Tetracyclinkonzentrationen war eine Verlagerung der Substanzen in tiefere Bodenschichten nicht nachweisbar. Grund dafür kann es sein, dass durch das Unterpflügen von Gülle die Substanzen offensichtlich stark in der Ackerkrume (Pflugbereich) festgehalten werden. So werden Tetracycline unter Feldbedingungen als persistent klassifiziert und neigen in Böden zur Akkumulation. Auch Fluorchinolone bilden im Boden persistente Rückstände [85, 103].

Antibiotika und ihre Metabolite können an der Bodenmatrix z.B an Huminstoffen sowie an Tonmineralen festgelegt werden, wobei die Bindungsformen zwischen reversibler Sorption und irreversibler Festlegung variieren [104]. Diese Bindungsformen werden in der Agrarwissenschaft als nicht extrahierbare Rückstände bezeichnet und laut der EU-Richtlinie 91/141/EWG folgendermaßen definiert:

*„Unter nicht extrahierbaren Rückständen sind chemische Stoffe zu verstehen, die aus der Anwendung eines Pflanzenschutzmittels gemäß guter landwirtschaftlicher Praxis stammen und durch Verfahren, welche die chemische Natur dieser Rückstände nicht bedeutend verändern, nicht extrahiert werden können. Durch Stoffwechselprozesse entstandene Bruchstücke, die zu natürlichen Produkten führen, gelten nicht als nicht extrahierbare Rückstände.“*

Die nicht extrahierbaren Rückständen bzw. gebundenen Rückstände wurden schon in den 1970er Jahren besonders in den Studien über Pestizide und PAK (Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe) untersucht [105, 106].

Generell lässt sich vermuten, dass die Entstehung nicht-extrahierbarer Rückstände auf adsorptive Prozesse, die durch Ausbildung kovalenter Bindungen an Huminstoffe oder auch durch weniger starke Bindungen wie van der Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brücken oder hydrophobe Wechselwirkungen beruhen können [107]. Dieses führt zu einer Sequestrierung von Schadstoffen bzw. Xenobiotika (Abb. 10).



**Abb. 10:** Mögliche Bindungsformen/Wechselwirkungen von Xenobiotika an der Bodenmatrix [107]

Als Sequestrierung wird der langsame Einschluss bzw. die Diffusion der Schadstoffe in nicht-zugängliche Mikroporen oder molekulare Hohl- und Zwischenräume der Bodenmatrix beschrieben, in denen die Xenobiotika zurückgehalten werden. Dieses beruht darauf, dass organische Bodensubstanzen Hohlräume mit adsorptiv wirksamen inneren Oberflächen aufweisen, in denen Xenobiotika eingeschlossen werden können. Der Verlauf einer möglichen Sequestrierung in hydrophoben Regionen von Huminstoffen wurde schon für viele Pflanzenschutzmittel beschrieben [105, 106, 107]. Es ist auch nachgewiesen worden, dass Tetracycline durch Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix sequestriert werden können [108]. Xenobiotika können im Boden nicht nur sequestriert werden, sondern es sind auch zahlreiche Ab- und Umbauprozesse wie chemische Zerfallprozesse (abiotischer Abbau) und mikrobielle Abbauprozesse (biotischer Abbau) möglich [107]. Gelangt z.B. Monensin auf landwirtschaftlich genutzte Flächen, so erfolgt offensichtlich ein abiotischer Abbau im Boden [109]. Jedoch spielen Polarität sowie Molekülgröße bei diesen Prozessen eine große Rolle. Ebenfalls sind diese Prozesse und Gehalte der Substanzen im Boden von der Bodenart abhängig (lehmiger Schluff > humoser Sand). Tetracyclin z.B. weist in sandigen und lehmigen Böden eine hohe Stabilität und eine geringe Verlagerungsneigung auf [110, 111, 112].

Die Wasserlöslichkeit der Antibiotikawirkstoffe bestimmt wesentlich ihre Mobilität. Wasserlösliche Stoffe werden leichter mit dem Bodenwasser in tiefere Bodenschichten verlagert. Tetracycline und Chinolone weisen eine starke Sorptionsneigung an feste Bodenbestandteile auf. Die Adsorptionskoeffizienten an die Bodenmatrix ( $K_f$ ) liegen für Tetracycline bei bis zu 1620 ml/g an Torf und für Enrofloxacin bei bis 6300 ml/g an Tonminerale. Aufgrund dieser Werte gelten diese Wirkstoffe als immobil. Im Vergleich dazu liegt der Adsorptionskoeffizient  $K_f$  für Sulfamethazin zwischen 0,6 und 3,1 ml/g. Somit hat

Sulfamethazin nur eine geringe Sorptionsaffinität an die feste Bodenmatrix und kann daher im Boden als sehr mobil angesehen werden [82, 113, 114]. Sie werden ausgewaschen und gelangen somit in höheren Konzentrationen als Tetracycline oder Enrofloxacin ins Grundwasser.

Durch Oberflächenabfluss „Runoff“ können Antibiotikarückstände von kontaminierten Böden ins Oberflächenwasser gelangen. Heberer wies in Oberflächengewässern maximale Tetracyclin-Konzentrationen von 1 µg/l nach, trotz der sehr geringen Bodenbelastung (<2 µg/kg) (Tab. 6) [115].

**Tab. 6:** Nachgewiesene Antibiotika-Konzentrationen in Wirtschaftsdüngern, landwirtschaftlich genutzten güllegedüngten Böden und in Oberflächenwasser

Wirkstoff	in Wirtschaftsdünger [mg/kg TM]		in Boden [µg/kg TM]	in Oberflächenwasser [µg/l]
	Schweingülle	Hühnermist		
<b>TC</b>	23,0 [26]	n.n. [26]	199,0 [116]	1,0 [116]
<b>OTC</b>	29,0 [26]	1,1 [26]	322,0 [116]	71,7 [116]
<b>CTC</b>	46,0 [26]	1,7 [26]	810,0 [116]	0,16 [117]
<b>SFD</b>	>10,0 [118]	51,0 [26]	<100,0 [116]	0,09 [117]
<b>ENR</b>	0,75 [26]	2,8 [26]	200,0 [26]	0,10 [119]
<b>CIP</b>	0,18 [26]	1,2 [26]	370,0 [26]	0,018 [117]
<b>MON</b>	-	-	1,08 [117]	0,036 [120]

- : keine Daten, n.n.: nicht nachweisbar

Ein weiterer Eintrag von Antibiotika in die Umwelt erfolgt über luftgetragene Stallstäube in der Intensivtierhaltung. Stallstaub besteht aus Partikeln von Futtermittel, Einstreu und Faeces, die Antibiotika-belastet sein können. Die landwirtschaftliche Produktion, insbesondere die Schweine- und Geflügelmast ermöglichen die Entstehung enormer Mengen an Gülle bzw. Geflügelmist. Hinzu kommt, dass über die Abluft der Ställe hohe Mengen an Stäuben austreten und letztendlich die Antibiotika auf diesem Wege in die Umwelt gelangen [121, 122, 123, 124, 125]. Untersuchungen ergaben für Tylosin in Staub eine maximale Konzentration von 12,18 mg/kg, für Sulfamethazin von 2,90 mg/kg und für Tetracycline von 5,18 mg/kg [126].

Durch Sorptions- oder Bindungsvorgänge an die Bodenmatrix gebundene antibiotisch wirksame Stoffe und ihrer Metabolite führen zu geringeren Konzentrationen im Bodenwasser. Daher sind ihre Extrahierbarkeit durch organische Lösungsmittel, ihre biologische Wirksamkeit, ihr mikrobieller Abbau und ihre Aufnahme durch Pflanzen bzw. ihre Bioverfügbarkeit, stark eingeschränkt. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass die Wirkstoffe oder ihre Metabolite in unzugänglichere Mikroporen der Huminstoffe oder

Tonminerale eingekapselt werden, wodurch sie sich nur geringfügig in tiefere Bodenschichten verlagern und somit in den oberen Bodenschichten verbleiben [107, 127]. Mittlerweile wurde gezeigt, dass an Bodenpartikel gebundene Antibiotika biologisch aktiv bleiben. Unter bestimmten Umständen, beispielsweise beim Abbau der Huminstoffe, sind die adsorbierten Substanzen jedoch wieder remobilisierbar [128].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ein Potential der Aufnahme von Antibiotika aus kontaminierten Böden durch Pflanzen besteht (s. Kap.5.3).

#### **4 VERBRAUCHERGEFÄHRDUNG DURCH DEN ANTIBIOTIKA-EINSATZ IN DER LANDWIRTSCHAFT**

Die Gefährdungen des Verbrauchers, welche durch den Einsatz von Antibiotika in der Tiermast entstehen können, lassen sich in zwei Kategorien einteilen [60],

- die direkte Wirkung stellt die toxikologische Wirkung eines antibiotisch wirksamen *Rückstands* dar,
- die indirekte Wirkung stellt die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen spezifisch für jedes einzelne Antibiotikum dar.

Die Problematik von Rückständen und Resistenzen wird in nächstem Kapitel zum besseren Verständnis dargestellt.

##### **4.1 Rückstandsproblematik**

###### **4.1.1 Begriffsbestimmungen**

Im Interesse einer besseren Übersichtlichkeit wird bei Fremdstoffen in Lebensmitteln (je nach Art des Stoffes) zwischen Rückständen und Kontaminationen bzw. Verunreinigungen unterschieden. Diese Begriffe sind wie folgt definiert.

###### *Rückstände*

Nach § 4 des Fleischhygienegesetzes (FIHG) und Artikel 2 Richtlinie 96/23/EG wurde die folgende Definition für Rückstände formuliert:

*„Rückstand von pharmakologisch wirkenden Stoffen und deren Umwandlungsprodukten sowie von anderen Stoffen, die auf tierische Erzeugnisse übergehen und für den Menschen gesundheitsschädlich sein können.“*

###### *Kontamination - Kontaminant*

Die Verordnung (EWG) Nr. 315/93 regelt das Verfahren zur Kontrolle von Kontaminanten in Lebensmitteln, wobei Artikel 1 Kontaminanten wie folgt definiert:

*“Als Kontaminant gilt jeder Stoff, der dem Lebensmittel nicht absichtlich hinzugefügt wird, jedoch als Rückstand der Gewinnung (einschließlich der Behandlungsmethoden in Ackerbau, Viehzucht und Veterinärmedizin), Fertigung, Verarbeitung, Zubereitung,*

*Behandlung, Aufmachung, Verpackung, Beförderung oder Lagerung des betreffenden Lebensmittels oder infolge einer Verunreinigung durch die Umwelt im Lebensmittel vorhanden ist.“*

So könnte man DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) sowohl den Rückständen (wenn es aus der landwirtschaftlichen Anwendung stammt) als auch den Kontaminationen (wenn es aus der Malariabekämpfung stammt) zuordnen [129]. Nach der gleichen Definition müssen die Antibiotika in Nahrungsmitteln tierischer- und pflanzlicher Herkunft, die aus landwirtschaftlichen Anwendungen stammen, den Rückständen zugeordnet werden.

#### **4.1.2 Antibiotikarückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft**

Abgesehen vom Austrag antibiotikahaltiger Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftlich genutzte Felder besteht für den Menschen eine weitere Aufnahmequelle durch Nahrungsmittel tierischer (Fleisch, Milch, Ei) und pflanzlicher (Getreide, Gemüse, Obst) Herkunft.

Rückstände von Antibiotika in Fleischproben wurden in vielen Untersuchungen bei Puten, Hühnern, Kälbern und Schweinen gefunden [130, 131]. Die bedeutendsten Substanzklassen waren hierbei Tetracycline, Sulfonamide und Aminoglykoside. Auch Rückstände von Kokzidiostatika (Ionophore) sind in Geflügelfleisch relativ häufig zu finden [132]. Die von Grote et al. durchgeführten Untersuchungen belegen, dass nach bestimmungsgemäßer Anwendung von CTC bei Schweinen Rückstände in den aus diesen Tieren erzeugten Lebensmitteln nachweisbar sind [133]. Tetracycline weisen aufgrund ihrer Struktur eine hohe Affinität zu metallischen Kationen auf. Deshalb können sie mit Calcium stabile Chelate bilden und werden auf diese Weise bevorzugt in die Mineralisierungszonen von knochenbildenden Geweben eingelagert. Das erklärte, dass Tetracycline auch in Knochengewebe in z.T. hoher Konzentration nachweisbar sind [133]. Nicht nur die Fleischprodukte können Antibiotikarückstände enthalten, sondern auch andere tierische Produkte wie Milch und Eier. Zurhelle wies z.B. bei mit Tetracyclinen medikamentierten Legehennen Tetracyclinrückstände in den Eiern nach [134]. Auch in Honig wurden Rückstände von Antibiotika gefunden [135], obwohl für dieses Lebensmittel eine Nulltoleranz für Antibiotika-Rückstände gefordert wird [136]. Es wurden in vier von 34 aus Südamerika stammenden Honigproben Umwandlungsprodukte von Nitrofuranen sowie Streptomycin und Tetracyclinen nachgewiesen. Auch in Bio-Honig waren Nitrofurane und Streptomycin nachweisbar [137], obwohl Nitrofurane in der EU 1995 verboten wurden, da sie das Erbgut schädigen und Krebs erzeugen können [135, 137, 138]. Ein illegaler Einsatz oder eine Mischung verschiedener Rohhonige sowie eine Kontamination können zu positiven Befunden von Antibiotika in Bioprodukten führen. Ebenfalls wurden im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplanes (2001-2005) im Honig Sulfonamide und Aminoglykoside nachgewiesen [139].

Es lässt sich deshalb zusammenfassen, dass Lebensmittel tierischer Herkunft ein Eintragungspfad von Antibiotika-Rückständen in die Nahrungskette sind. Falls Antibiotika aus Gülle-beaufschlagten Böden von Nutzpflanzen aufgenommen würden, wäre ein weiterer Eintragungspfad über pflanzliche Lebensmittel gegeben (s. Kap.5.3). Die grundsätzliche Aufnahme dieser Wirkstoffe über die Pflanzenwurzeln wurde bereits vor über 50 Jahren experimentell erkannt [8]. Bei der Selektion gentechnisch veränderter Pflanzen (GVPs) werden Antibiotika eingesetzt, was zeigt, dass zumindest unter in vitro-Bedingungen eine Aufnahme in die pflanzliche Zelle erfolgen kann [140, 141, 142]. Es gibt somit eine Reihe experimenteller Befunde, die auf Wechselwirkungen von Antibiotika mit Pflanzenwurzeln in homogener und heterogener Phase schließen lassen, was zur Aufnahme sowie zur Translokation in Nutzpflanzen bzw. pflanzlichen Lebensmitteln führen kann.

#### **4.1.3 Lebensmittelrechtliche Aspekte zu Antibiotikarückständen**

Wie auch schon in den vorherigen Kapiteln deutlich gemacht wurde, ist das Problem der Antibiotikarückstände in Lebensmitteln durchaus nicht mehr unbekannt und Behörden sowie Gesetzgeber sehen sich gezwungen, darauf zu reagieren. Aus diesem Grund gibt es zahlreiche Verbote und Regulierungen zum Einsatz von Arzneimitteln in der landwirtschaftlichen Produktion, aus denen Grenzwerte wie z.B. der NOEL, ADI und MRL hervorgebracht wurden.

##### *NOEL (non observed effect level)*

Der sogenannte NOEL wird definiert als diejenige Dosis, die keine adversen Effekte mehr mit sich bringt. Anhand von Tierversuchen wird NOEL und somit die Dosis-Wirkungsbeziehung von Arzneimitteln für den in Frage stehenden Wirkstoff ermittelt. Der ermittelte Wert wird durch den Sicherheitsfaktor 100 dividiert, weil davon ausgegangen wird, dass der Mensch 10-fach empfindlicher als das Tier ist. Zusätzlich können individuelle Schwankungen auftreten, die in einem weiteren Faktor berücksichtigt werden [143].

##### *ADI (Acceptable Daily Intake)*

Der ADI wird definiert als diejenige Menge einer Substanz, die lebenslang täglich aufgenommen werden kann, ohne dass mit einer Gesundheitsgefährdung des Menschen gerechnet werden muss. Um den ADI-Wert zu bestimmen, werden Parameter wie Toxizität, Reproduktionstoxizität, Mutagenität, Kanzerogenität und Immunotoxizität überprüft. Zusätzlich sind bei Antibiotika experimentell die Auswirkungen auf die menschliche Darmflora zu prüfen [144].

##### *MRL (Maximum Residue Limit)*

Durch die Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 wird die Höchstmenge, der sogenannte MRL-Wert (Maximum Residue Limit) wie folgt definiert:

„Der MRL-Wert ist in Anlehnung an das Arzneimittelgesetz die maximal zugelassene Höchstmenge eines Stoffes, die nach wissenschaftlichen Erkenntnissen bei durchschnittlichen Essgewohnheiten keine Gefährdung der menschlichen Gesundheit darstellt.“

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Tierarzneimitteln werden die Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier und auf die Umwelt geprüft. Bereits seit 1990 gibt es in der EU ein einheitliches Verfahren für die Festlegung von Rückstandshöchstmengen für Tierarzneimittel in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs, das auf der Verordnung Nr. 2377/90 vom 26. Juni 1990 beruht (zuletzt geändert durch die VO (EG) Nr. 712/2005). Darin sind MRL-Werte für die verschiedenen tierischen Lebensmittel (Fleisch, Leber, Niere, Fett, Milch, Eier, Honig) auf der Basis des ADI festgelegt. Diese MRL-Werte sind so festgelegt, dass auch bei täglicher Aufnahme von Tierarzneimittelrückständen bis zu dieser Konzentration keine Gefahr für den Verbraucher zu erwarten ist [145]. Aufgrund dieser Verordnung werden seit dem 1. Januar 1992 Arzneimittel, die neue Wirkstoffe enthalten, zur Anwendung bei Lebensmittel-liefernden Tieren nur noch zugelassen, wenn für diese MRL-Werte in essbaren Geweben und tierischen Produkten festgelegt sind. Die Wirkstoffe, die für Lebensmittel-liefernde Tiere zugelassen sind, werden in den Anhängen I bis III der Verordnung zusammengefasst (Tab. 7). Weiterhin werden in Anhang IV für Lebensmittel-liefernde Tiere nicht zugelassene Wirkstoffe erfasst. Der Wirkstoff Enrofloxacin z.B. ist in Europa nicht für die Behandlung von Legehennen zugelassen [146].

**Tab. 7:** Anhänge I bis IV von der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90

Anhang	Beschreibung	Beispiele
Anhang I	<b>endgültiger MRL-Wert</b> (ohne Zeitbeschränkung)	Benzylpenicillin Chlortetracyclin Oxytetracyclin Tetracyclin Trimethoprim
Anhang II	<b>kein MRL-Wert</b> (Rückstände in allen Konzentrationen für den Verbraucher unbedenklich)	Apramycin
Anhang III	<b>vorläufiger MRL-Wert</b> (Geltungsdauer von maximal fünf Jahren. Nach Ablauf der Frist ist eine Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren nur noch möglich, wenn eine Umgruppierung des Stoffes in Anhang I oder II erfolgt ist.)	Kanamycin Tulathromycin
Anhang IV	<b>keine Festlegung von MRL-Werten</b> (Aufgrund ihrer Toxizität oder wegen des Fehlens von Daten, ihre Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren ist in der gesamten EU verboten.)	Chloramphenicol Nitrofurane Enrofloxacin

In Studien wurde als wesentliche Wirkung von OTC die Induktion von Resistenzen bei Enterobacteriaceae beobachtet und deshalb ein NOEL von 2 mg/Person/Tag festgelegt.

Dieser Wert wird unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 10, d.h., ein ADI von 0-3 µg OTC/kg KG festgestellt [146, 147]. Außerdem wurde auch Doxycyclin hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf die humane Darmflora überprüft und ebenfalls ein ADI-Wert von 0-3 µg/kg KGW empfohlen [148]. Diese in der EWG-Verordnung Nr. 2377/90 festgesetzten ADI-Werte dürfen nicht überschritten werden. Um dieses zu sichern, werden MRL-Werte vorgeschrieben, die für einen Wirkstoff und ein bestimmtes Gewebe gelten und in den Anlagen I und III der EWG-Verordnung Nr. 2377/90 aufgelistet sind.

**Tab. 8:** MRL-Werte für Tetracycline in Gewebe (nach Verordnung (EWG) 2377/90)

Wirkstoff	Rückstand	Tierart	MRL [µg/kg]	Zielgewebe
CTC	CTC+ e-CTC	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	100/300/ 600/100/200	Muskel/Leber/ Nieren/Milch/Eier
OTC	OTC+ e-OTC			
TC	TC+e-TC			
DC	DC	Rinder <sup>*</sup>	100/300/600	Muskel/Leber/Nieren
		Schweine	100	Muskel
		Geflügel <sup>**</sup>	300/300/600	Haut+Fett/Leber/Nieren

<sup>\*</sup>Nicht anwenden bei Tieren, von denen Milch für den menschlichen Verzehr gewonnen wird

<sup>\*\*</sup>Nicht anwenden bei Tieren, von denen Eier für den menschlichen Verzehr gewonnen werden

Wie in der Tab. 8 aufgeführt ist, sind Rückstände von CTC in Lebensmitteln tierischen Ursprungs gemäß gesetzlicher Vorschriften als Summe der Gehalte an CTC und des Epimeren e-CTC zu ermitteln. CTC ist in der Lage, weitere Umwandlungs- und Abbauprodukte wie iso-CTC (nicht antibiotisch wirksam) und Anhydrochlortetracyclin zu bilden, welche toxikologisch relevant sind und die ebenfalls epimerisieren können. Diese Produkte wurden trotz zuverlässig-analytischer Erfassbarkeit nicht bei der Festlegung der MRL-Werte berücksichtigt.

Das Arzneimittelgesetz, welches bezüglich der Wartezeiten auf die tierärztliche Hausapothekenverordnung (TÄHAV) verweist, spielt bei der Vermeidung von Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprung eine zentrale Rolle. In der Verordnung legt Paragraph 12a fest, dass im Falle des sogenannten Therapienotstandes zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren Wartezeiten bei der Verabreichung eingehalten werden müssen, um zu gewährleisten, dass die festgesetzten ADI- bzw. auch MRL-Werte nicht überschritten werden [149].

Die Relevanz der Wartezeiten zwischen Antibiotikaanwendung und Schlachtung für die Einhaltung der MRL-Werte wurde auch von Grote et al. bestätigt [6, 60, 133]. Dabei wurden Untersuchungen zum Gehalt von Chlortetracyclin in Fleisch durchgeführt. In der Tab. 9 werden diese CTC-Gehalte für unterschiedliche Schlachtungszeiten dargestellt.

**Tab. 9:** CTC-Gehalte im Schlachtkörper der Tiere [133]

Zielgewebe	CTC-Gehalte [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	
	Schlachtung direkt nach Medikation	Schlachtung 14 Tage nach Medikation
Muskel	210,4	4,0
Leber	392,2	7,4
Niere	659,0	19,7

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass auch bei bestimmungsgemäßer Anwendung von Antibiotika bei Nutztieren Rückstände in den aus diesen Tieren erzeugten Lebensmitteln unvermeidbar sind. Im nächsten Abschnitt wird beschrieben, dass die den Tieren verabreichten Wirkstoffe als ursprünglicher Wirkstoff oder als Metabolit mit antibiotisch wirksamer, resistenzfördernder oder toxischer Wirkung in die Nahrungskette und die Umwelt gelangen können.

## 4.2 Resistenzproblematik

### 4.2.1 Begriffsbestimmungen und Resistenzentstehung

Die Resistenz wird als eine Entstehung einer verminderten Empfindlichkeit pathogener Mikroorganismen gegen Pharmaka bzw. antimikrobiell wirksame Substanzen definiert [150]. Flindell hat den Begriff „Resistenz“ für pathogene Mikroorganismen folgendermaßen definiert [151]:

*„Ein pathogener Mikroorganismus muss dann als resistent bezeichnet werden, wenn die in vitro ermittelte minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums oder Chemotherapeutikums höher ist als die in vivo am Infektionsort erreichbare Serum- bzw. Gewebekonzentration“.*

Die MHK wird als *in vivo* gemessene geringste Konzentration bezeichnet, welche *in vitro* das Wachstum des zu testenden Bakterienisolates bzw. des Erregers in einem flüssigen oder festen Medium hemmt [152]. Während der Antibiotikabehandlung hängt die Wirksamkeit einer Substanz auch von einem Konzentrationsgradienten zwischen Interzellulärflüssigkeit/Gewebe und Mikroorganismen ab. Nur in einem bestimmten selektiven Bereich werden sensitive Bakterien abgetötet bzw. gehemmt. In subinhibitorischer Konzentration, welcher die als minimale Hemmkonzentration (MHK) definiert ist, finden Mikroorganismen ideale Bedingungen vor, um verschiedene Resistenzmechanismen zu entwickeln [60]. Wenn Genkomplexe vorhanden sind, die eine Resistenzsteigerung bewirken oder wenn Organismen Fremdgene aufnehmen und exprimieren, können sich dadurch Resistenzen entwickeln. Die resistenten Krankheitserreger können sich durch einen Selektionsdruck Wachstumsvorteile verschaffen und sich dementsprechend ausprägen.

Dieser Selektionsdruck wird durch die Anwendung von Antibiotika bei Mensch und Tier ausgeübt, sodass jede Anwendung die Resistenzentwicklung fördert [153, 154].

Ein Resistenzniveau ist abhängig vom Bakterium selbst, vom Resistenzmechanismus und von der Art des Antibiotikums. Man unterscheidet zwischen natürlicher (primärer) Resistenz und erworbener (sekundärer) Resistenz. Man spricht von natürlicher Resistenz, wenn die native Population einer Spezies von Bakterien unempfindlich gegenüber einem oder mehreren Antibiotika ist. Als Beispiel für die natürliche ist z.B. zu erwähnen, dass *E.coli* Bakterien gegenüber den Makroliden oder auch die Spezies *Pseudomonas* gegenüber Benzylpenicillin resistent sind [155]. Demgegenüber erwerben Mikroorganismen Resistenzen entsprechend zweier verschiedener genetischer Veränderungsmechanismen. Zum einen erfolgt der Erwerb durch Mutation und zum anderen durch den Transfer von Resistenzgenen. Zu den erworbenen Resistenzen gehört auch die infektiöse übertragbare Resistenz. Die übertragbare Resistenz basiert auf der Übertragung genetischen Materials von einer Bakterienzelle auf eine andere, wobei dieser Transfer zur Weitergabe der multiplen Resistenz führt [156].

Der multiplen Resistenz wird in der praktischen Anwendung von Antibiotika sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin große Bedeutung zugemessen. Durch eine verminderte intrazelluläre Wirkstoffkonzentration oder einen verstärkten Efflux durch die Zytoplasmamembran können Resistenzen entstehen [60]. Dieser Effekt führte insbesondere hier zum Verbot von Leistungsförderern in Form von subtherapeutischen Dosen in der Veterinärmedizin.

Wenn Keime gleichzeitig gegen ein oder mehrere andere Antibiotika resistent sind, wird dieses als Kreuzresistenz bezeichnet [157]. Häufig zeigen dementsprechend die Substanzen Kreuzresistenzen, die eine ähnliche chemische Struktur oder einen gleichen Wirkungsmechanismus haben. Deshalb trägt eine Anwendung gleicher Antibiotikaklassen in human- und veterinärmedizinischen Bereichen zusätzlich zur Resistenzproblematik für humanmedizinische Antibiotika bei. So bestehen Kreuzresistenzen zwischen den Tetracyclinen, wie Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demeclochlortetracyclin sowie auch zwischen Fluorchinolonen und Virginiamycin, wodurch die Verwendung von Antibiotika in der Geflügelhaltung zur Zunahme der Infektionen der Menschen mit Fluorchinolon-resistenten *Campylobacter jejuni* und *Salmonella sp.* geführt hat [158].

Als Ko-Resistenz wird das Auftreten einzelner Bakterienpezies bezeichnet, die gleichzeitig Resistenzen gegenüber Antibiotika aus verschiedenen Wirkstoffgruppen aufweisen. Die Resistenzgene (Transposons, Plasmide), welche gemeinsam aus der gleichen genetischen Gruppe stammen, bilden im Allgemeinen die Grundlage der Ko-Resistenz [159].

### 4.2.2 Resistenzmechanismen

Mikroorganismen haben folgende wesentliche Resistenzmechanismen entwickelt [160]:

- eine Veränderung im Zielbereich des Wirkstoffs,
- eine enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums,
- eine verminderte Aufnahme des Wirkstoffs oder Transport des Wirkstoffes in den extrazellulären Raum.

Die oben genannten Resistenzmechanismen entwickeln sich in Abhängigkeit von der Wirkungsweise der Antibiotika. Dabei besteht keine unmittelbare Wechselwirkung zwischen der Stoffklasse eines Antibiotikums und der durch das Bakterium ausgebildeten Resistenzmechanismen.

Den effektivsten bakteriellen Resistenzmechanismus gegen Tetracycline stellt die aktive Ausschleusung der Tetracyclinmoleküle aus der Zelle dar. Hinzu kommt, dass die Veränderung der Porinproteine in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sowie in der cytoplasmatischen Membran eine Reduzierung der Penetrationsgeschwindigkeit der Tetracyclinmoleküle erreicht. Im Cytoplasma befinden sich weitere Resistenzproteine der Bakterien. Diese Schutzproteine, die nicht-kovalent mit dem Ribosom assoziiert sind, können auch in Gegenwart von Tetracyclin die Aminoacyl-t-RNA an das Ribosom binden. Dadurch kommt es zu einer ungehinderten Fortführung der Proteinbiosynthese [48, 161].

Weiterhin existieren auch Resistenzmechanismen, die die Wirkung der Sulfonamide abschwächen können. Eine Möglichkeit ist, die Bindungsstelle der Dihydropteroinsäuresynthetase so zu verändern, dass eine niedrigere Affinität für Sulfonamide hervorgerufen wird und p-ABS (p-Aminobenzoessäure) vermehrt gebunden wird. Die zweite Möglichkeit ist, in der Bakterienzelle die Produktion von p-ABS zu erhöhen. Um eine verstärkte Metabolisierung der Substanzen zu erreichen, können außerdem Mechanismen zur Inaktivierung von Sulfonamiden entwickelt werden [162].

Resistenzen gegen Sulfonamide sind recht weit verbreitet, besonders wenn Sulfonamide nicht in Kombination mit Trimethoprim, sondern als Einzelsubstanzen angewandt werden. Allerdings kann die Veränderung der Bindungsstelle des betreffenden Enzyms auf die Ausbildung von Resistenzen gegen Trimethoprim beruhen [163].

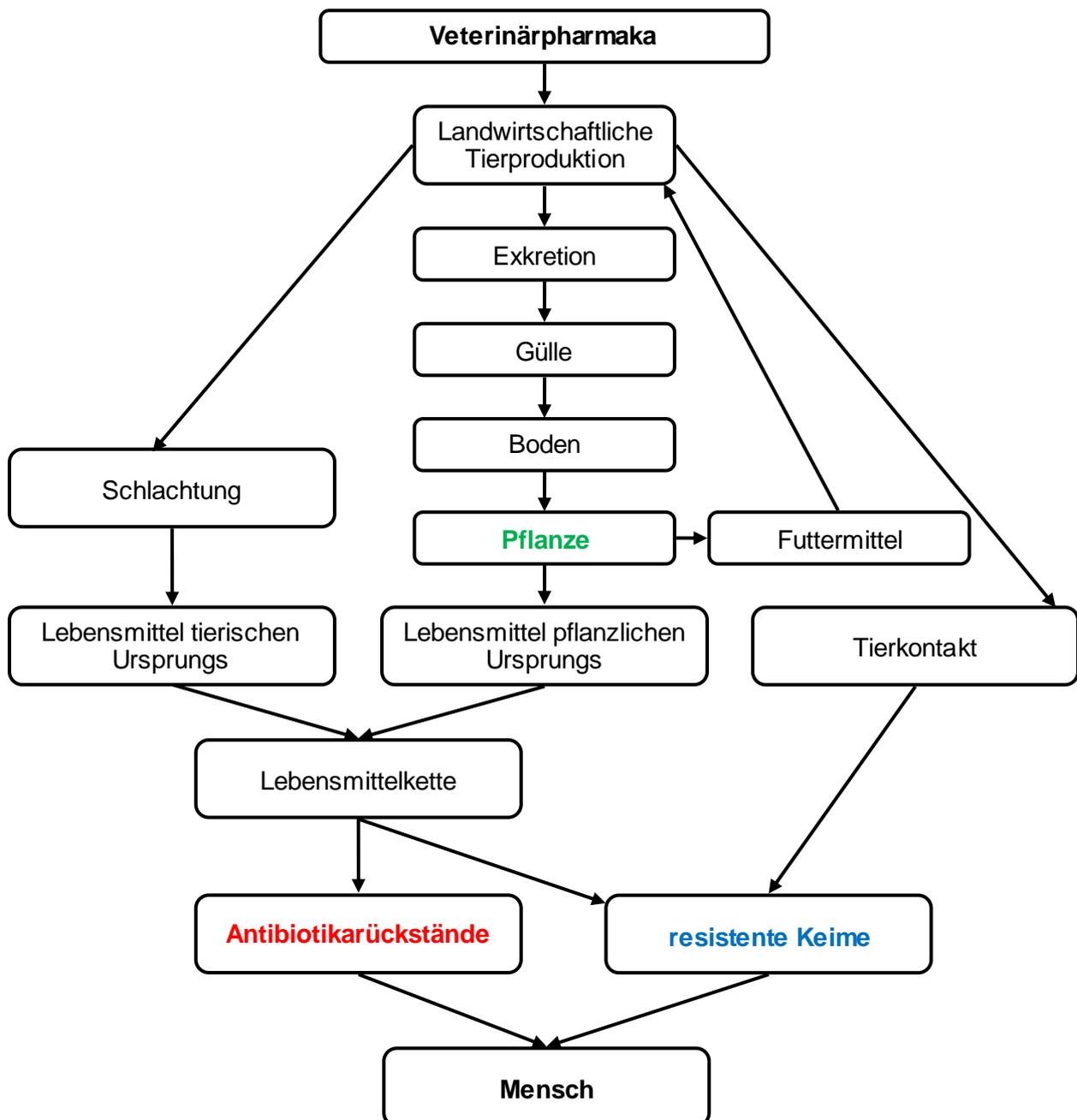
Die Fluorchinolon-Resistenz beruht auf einer Veränderung der Bindungsstelle am Topoisomerase II Enzym, das in allen Organismen vorkommt. Diese Enzyme können Helix-Windungen von doppelsträngigen DNA-Strängen auflockern und lösen. Eine bakterielle Topoisomerase kann auch zusätzliche Windungen in einem DNA-Strang einführen. Auf der anderen Seite können Resistenzmechanismen aktive Ausschleusungen störender Substanzen aus der Zelle beinhalten [162, 164].

Trotz jahrelang massiver Anwendung von Ionophoren ergab sich ein sehr günstiges Bild hinsichtlich der Resistenzentwicklung. Wirkungsverluste entwickelten sich, wenn auch

langsam, über Membranveränderungen, welche die Penetration der Ionophoren in die Parasiten verhindern [162].

### 4.3 Verbrauchergefährdung

Durch den Eintrag von Antibiotikarückständen in Umweltkompartimente bestehen neben Nahrungsmitteln tierischer- und pflanzlicher Herkunft weitere Aufnahme- und damit Gefährdungsquellen für den Menschen. Abb. 9 zeigt, dass eine Verbrauchergefährdung durch in der Tiermast eingesetzte Antibiotika auf mehreren Wegen möglich ist.



**Abb. 11:** Mögliche Eintragspfade und Effekte von Veterinärantibiotika (modifiziert nach [60])

Zum Einen kann eine Gefährdung durch die Aufnahme von Antibiotikarückständen stattfinden, zum anderen können auch direkt resistente (pathogene) Keime mit den Rückständen übertragen werden, die dann auch eine Resistenz beim Menschen ausüben.

In Kap.4.1.2 wurde schon beschrieben, dass Antibiotikarückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft (Fleisch, Milch, Ei) nachweisbar sind. Bei der Aufnahme von Antibiotikarückständen durch tierische Lebensmittel ist eine direkte Übertragung von Rückständen möglich, wodurch eine Resistenzproblematik resultieren kann. Deshalb ist das Tier bei der sogenannten direkten Gefährdung das Übertragungsmedium von Antibiotikarückständen und der Körper des Menschen selbst ist der Entstehungsort für eine mögliche Resistenz. Beispielweise können Antibiotikarückstände oder Metabolite, die noch Aktivität besitzen, bei ungenügender Erhitzung im Fleisch und den Fleischprodukten in unveränderter Form verbleiben und somit vom Menschen aufgenommen werden [165]. Deshalb wurden Richtlinien eingeführt, wie z.B. die Richtlinie 94/65/EG von Dezember/1994 zur Festlegung von Vorschriften für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Hackfleisch/Faschiertem und Fleischzubereitungen, die Verordnung über die hygienischen Anforderungen an das Behandeln und Inverkehrbringen von Hühnereiern und roheihaltigen Lebensmitteln oder die Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn [166].

Durch die dauerhafte Aufnahme von Antibiotikarückständen (z.B. Tetracycline) können für den Menschen mögliche Risiken entstehen, wie ein erhöhtes allergisches Potential, Lichtempfindlichkeit und Photosensibilisierung, Schwindel und Gleichgewichtsstörungen. Weiterhin kann es bei Medikamenten zu Interaktionen kommen wie z.B. Unwirksamkeit von oralen Kontrazeptiva [60].

Eine weitere Verbrauchergefährdung stellt den resistenten (pathogene) Keimen mit den Rückständen dar, was als eine indirekte Gefährdung definiert ist. Einige Antibiotika sind schwer biologisch abbaubar (z.B. Cefotiam, Ciproflaxin, Sulfamethoxazole und Tetracycline). Deshalb potenzieren sich nicht nur die in der Umwelt verbleibenden Rückstände bei vermehrtem Eintrag in die Natur, sondern auch die Gefahr des Beitrags an der zunehmenden Resistenzentwicklung. Neben diesem Aspekt muss jedoch noch berücksichtigt werden, dass auch in den Umweltkompartimenten schon resistente Keime ausgebildet werden, die dann ebenfalls wieder in die Nahrungskette und somit zum Menschen gelangen, wo sie dann als resistente Infektionserreger Schaden anrichten können.

Die Resistenzentwicklung kann entweder auf der Übertragung resistenter Mikroorganismen aus der Nahrung oder auf dem Transfer von Resistenzgenen im Menschen zwischen für den Menschen apathogenen, vom Tier stammenden Erregern und humanpathogenen Bakterien beruhen. Eine Übertragung von resistenten Mikroorganismen sowie auch resistenten Genen

aus der Landwirtschaft auf den Menschen ist über kontaminierte tierische Lebensmittel, den Kontakt mit Nutztieren, den luftgetragenen Transport von Stallstäuben aus landwirtschaftlichen Betrieben, die Gülleausbringung sowie die damit verbundene Belastung von Trinkwasser und pflanzlichen Nahrungsmitteln möglich [167].

#### *Gefährdungspotential durch resistente Mikroorganismen*

Zoonosen werden als Krankheiten definiert, die von Tier auf Mensch übertragen werden. Eine Aufnahme von Zoonoseerregern kann zu ungünstigen Krankheitsverläufen infolge der schlechteren Therapierbarkeit und sogar zu Todesfällen durch vom Nutztier stammende resistente Erreger führen [168, 169]. So wurde durch eine Studie belegt, dass Patienten, die sich mit resistenten Erregern z. B. Salmonellen- und Campylobacter-Stämme infiziert hatten, ein höheres Risiko hatten, innerhalb der nächsten zwei Jahre an Infektionen zu sterben, als Patienten, die mit Antibiotika-empfindlichen Erregern infiziert wurden [169]. Eine Forschungsarbeit zeigte, dass multiresistente Bakterien aus Rohwürsten ihre Resistenzen auf menschliche Krankheitserreger übertragen können wie z.B die zu Darminfektionen führenden Salmonellen aus Lebensmitteln. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) berichtete, dass in Deutschland jährlich etwa 250 Fälle von Salmonellose auftreten. Weil bei solchen Salmonellose-Fällen eine notwendige antibiotische Behandlung oftmals nicht mehr anschlügt, führt diese höchstwahrscheinlich zu Todesfällen [168]. Bywater und Casewell konnten belegen, dass ca. 4% der bei humanmedizinischen Infektionen auftretenden Resistenzprobleme ihren Ursprung in der Anwendung antibiotischer Wirkstoffe bei Tieren haben [170]. Zusammenfassend wird vermutet, dass der übermäßige Fluorchinolon-Einsatz besonders in der Geflügelhaltung dazu führt, dass immer mehr Bakterienstämme, die bei Mensch und Tieren zu Salmonellen-Infektionen führen, gegen Antibiotika resistent sind. Auch Großklaus et al. zeigten, dass durch orale Aufnahme von penicillinhaltiger Milch bei Menschen eine plasmidbedingte Resistenz entstehen kann [171]. Jedoch sind es nicht nur Zoonoseerreger bzw. resistente Krankheitserreger sondern auch nicht pathogene resistente Bakterien in der Darmflora des Menschen, die Resistenzgene an Krankheitserreger weitergeben [172].

#### *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus, MRSA*

Insbesondere stellt Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA-Stämme) als multiresistenter Erreger ein großes Risiko für den Menschen dar [173]. MRSA-Bakterien sind nicht nur gegen das Antibiotikum Methicillin resistent, sondern auch gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Tetracycline und gegen Glykopeptide. MRSA-Bakterien sind bei vielen Infektionen (Wundinfektionen, nosokomialen und ambulant erworbenen Infektionen) schwer zu behandeln. Deshalb haben MRSA-Infektionen oft einen längeren Krankheitsverlauf mit u.a. tödlichem Verlauf zur Folge. Heute nur noch mit dem Reserveantibiotikum Vancomycin therapierbare MRSA-Erreger sind weltweit verbreitet. Sollten einmal auch diese

Reserveantibiotika nicht mehr wirken, bedeutet dieses das Ende für jede Therapie. Zum Beispiel starben in den USA im Jahr 2006 ca 19.000 Menschen an den Folgen einer MRSA Infektion [174]. Nach einer Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft im Jahr 2001 lag der Anteil an Erkrankungen durch MRSA-Erregern in Deutschland bei 20,7 %, demgegenüber in den Niederlanden und den skandinavischen Ländern <1 % [175].

MRSA-Stämme können zwischen Tier und Mensch übertragen werden. So ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von MRSA bei den Personen, die Umgang mit Schweinen haben (z.B. Schweinehalter, Tierärzte, Schlachter) größer als bei anderen Menschen. Als Beispiel kann genannt werden, dass in Kanada MRSA-Stämme in 9 von 20 (45 %) schweinehaltenden Betrieben gefunden wurden [176]. In einer anderen Untersuchung in Kanada wurde festgestellt, dass die Anteile an MRSA-Erregern bei Schweinen ca. 25 % und bei Schweinezüchtern bei 20 % lagen. In den Niederlanden wurden MRSA-Raten von 39 % bei Schweinen und >20 % bei Schweinezüchtern verzeichnet [177]. Diese Untersuchungen zeigen, dass das genetische Material der aus den Tieren entnommenen Erreger identisch ist mit dem Genmaterial der MRSA-Stämme der Personals landwirtschaftlichen Betriebe, was einen eindeutigen Hinweis auf die Übertragung zwischen Menschen und Tieren darstellt.

Außerdem besteht neben dem Tierkontakt (wie oben beschrieben) auch durch Lebensmittel tierischen Ursprungs ein Risiko, sich mit MRSA-Bakterien infizieren zu können, da in Lebensmitteln (Fleisch, Milch und Käse) ebenfalls MRSA-Erreger enthalten sind. Im Rahmen einer Studie aus den Niederlanden wurden 1300 verschiedene rohe Fleischprodukte (Puten-, Hühner-, Kalb- und Schweinefleisch) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass etwa in 11 % der rohen Fleischprodukte MRSA-Erreger gefunden wurden [178]. Daher ist grundsätzlich auch über MRSA kontaminierte Lebensmittel eine Übertragung auf den Menschen möglich.

#### *Risiken durch den Antibiotikaeintrag in Böden*

Weiterhin wurde für zahlreiche Wirkstoffe nachgewiesen, dass antibiotische Wirkstoffe im Boden zu Umwandlungs- und Abbauprodukten reagieren können, was wiederum zu unterschiedlichen Wechselwirkungen dieser Produkte mit den Bakterien führen kann. Hinzukommend wurde von Chander et al. belegt, dass die fest an Bodenmatrix adsorbierten Tetracycline noch biologisch aktiv sind und damit die Selektion Antibiotika-resistenter Bakterien in der Umwelt beeinflussen können [179]. Infolgedessen kann also weiterhin gezeigt werden, dass sich das Auftreten von Resistenzgenen und die Übertragungsraten von Resistenzen erhöht.

Auch in aquatischen Systemen treten resistente Bakterien häufig auf [180]. Hier verbreiten sich die resistenten Bakterien auf zwei Wegen. Diese Wege gehen entweder über die Antibiotikarückstände und resistente Mikroorganismen aus anderen Umweltbereichen oder sie gehen über den Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen, der dann Resistenzbildung auslöst.

In einigen Studien wurde belegt, dass resistente Keime aus den Fäkalien der Tiere über Wirtschaftsdünger auch auf die Nutzpflanzen gelangen [168, 181, 182, 183]. Das UV-Licht der Sonne, welches sehr stark bakterizid wirkt, führt zu einer Keimreduktion. Wenn diese Nutzpflanzen direkt nach der Düngung, ohne sorgfältig gewaschen worden zu sein, verspeist werden, werden Keime von Menschen aufgenommen. In den Jahren 2004–2005 wurden beispielsweise pathogene Keime (Salmonellen- und Campylobacter) in Rucola nachgewiesen. Genauso wurden in den USA 2006 gefährliche *E.coli*-O121:H19-Stämme in Spinat gefunden, die zum Tode führten. Daraufhin wurde spinathaltige Babynahrung untersucht, die ebenfalls mehrfach resistente Bakterien enthielt [168].

Gene, die für bestimmte Antibiotika-Resistenz verantwortlich sind, wurden jedoch in der frühen Pflanzengentechnik gezielt zur Selektion eingesetzt [183]. Bezanson et al. wiesen in gentechnisch veränderten Pflanzen (Spinat und Salat) zahlreiche resistente Keime nach, die auch durch den Verzehr auf Menschen transferierbar sind [184]. Festzuhalten bleibt in diesem Zusammenhang, dass die Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen, die bestimmte Antibiotikaresistenzgene als Marker tragen, gemäß EU-Freisetzungs-Richtlinie (2001/18/EG) vom Oktober 2002 eingeschränkt wurde, da die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers (Gentransfer außerhalb der geschlechtlichen Fortpflanzung) von Pflanzenzellen auf Bakterien in der Umwelt und Darmbakterien nicht ausgeschlossen werden konnte.

Ebenfalls führt eine Verabreichung subtherapeutischer Dosen über das Futter zu einem hohen Selektionsdruck auf die Mikroorganismen [185]. Das bedeutet, dass die Gefahr der Bildung neuer Resistenzgene bei der Aufnahme von Antibiotika in subinhibitorischer Dosis über lange Zeit besteht, weil die resistenten Keime bevorzugt durch den Einsatz subinhibitorischer Mengen von Antibiotika im Intestinaltrakt des Tieres gebildet werden, sich dann im tierischen Gewebe verteilen und somit über die Aufnahme der tierischen Lebensmittel auf den Menschen übertragbar sind. Jedoch besteht der langfristige Einfluss subinhibitorischer Antibiotikamengen in der Nahrung auf die Resistenzentstehung und Resistenzausbreitung in der menschlichen Darmflora auf dieser Datenbasis noch Forschungsbedarf.

In welchem Ausmaß sich die Antibiotikabelastung für den Verbraucher über den Pfad Boden-Pflanze verstärkt, ist aufgrund der noch schmalen Datenbasis nicht sicher abschätzbar. Die publizierten Ergebnisse verschiedener Wissenschaftler bestärken aber die Annahme, dass allgemein mit einem Transfer antibiotisch aktiver und nicht aktiver Antibiotikarückstände in Nutzpflanzen aus güllebeaufschlagten Böden zu rechnen ist (s. Seite 49, Kap.5.3). Letztendlich entsteht dadurch die Möglichkeit eines Eintrags von Antibiotika in die Nahrungskette und somit ein potentielles Verbraucherrisiko. Darüber hinaus besteht auch die

Möglichkeit der Aufnahme von resistenten Bakterien durch den Verzehr roher pflanzlicher Lebensmittel wie Gemüse, Salat oder Obst.

## 5 AUFNAHME VON TIERARZNEISTOFFEN IN PFLANZEN

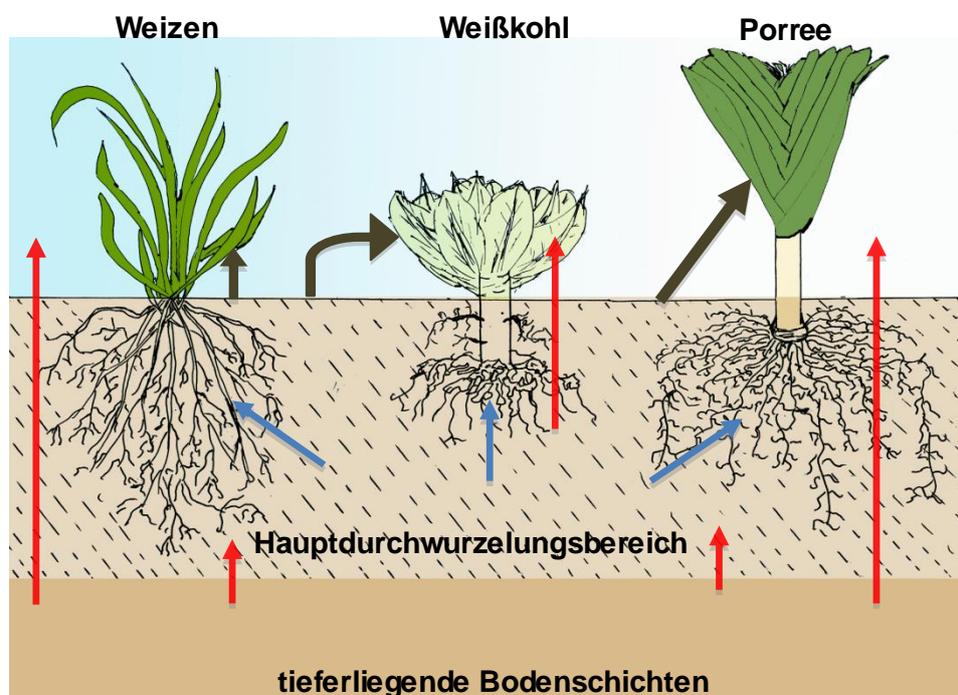
Antibiotika werden in der Pflanzenphysiologie bzw. für die Pflanze als pharmazeutisch organische Xenobiotika bezeichnet [186, 187, 188]. Deshalb sollen hier zunächst die fakultativen Aufnahme- und Transportwege für Xenobiotika beschrieben werden.

### 5.1 Eintrag von Xenobiotika in Pflanzen

Die Aufnahme von Xenobiotika kann prinzipiell auf folgenden Eintragungspfaden erfolgen [189],

- dem Luftpfad (über die bodennahe Luft in oberirdische Pflanzenteile)
- dem Verschmutzungspfad (durch Anlagern von Bodenpartikeln an Pflanzenoberflächen)
- dem systemischen Pfad (über die Bodenlösung oder Bodenluft in die Wurzeln)

Abb. 10 zeigt eine schematische Darstellung dieser Eintragungspfade der Schadstoffaufnahme in Pflanzen.



Xenobiotika-Aufnahme über...



das Wurzelsystem  
(systemischer Pfad)



die Blätter  
(Luftpfad)



die Pflanzenoberfläche  
(Verschmutzungspfad)

**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Eintragungspfade von Xenobiotika in Pflanzen (modifiziert nach [190])

*Luftpfad*

Durch Bodenluft und Atmosphärenluft werden die leichtflüchtigen Substanzen über die Kutikula (Schutzschicht, auf der äußersten Oberfläche der Epidermis aufliegend) und/oder Stomata (Spaltöffnung) der Blätter aufgenommen und im pflanzlichen Gewebe verteilt.

*Verschmutzungspfad*

Substanzen aus der Luft werden durch verschiedene Transportmedien auf Futter- und Nahrungspflanzen eingetragen. Die Medien können sein: Staub oder trockene Depositionen sowie nasse Depositionen wie Niederschlag und Nebel. Der Eintrag erfolgt über die Pflanzenoberfläche oder durch die Ablagerung aus der bodennahen Schicht bei der Ernte, wobei die Substanzen über die äußeren Gewebe der Pflanze aufgenommen werden können. Konkret nachgewiesen werden konnte beispielsweise, dass Antibiotika wie z.B. Streptomycin bei der Verwendung als Pflanzenschutzmittel über die Luft in die Pflanzenoberfläche gelangen kann. Das von Trapp und Matthies entwickelte Modell verdeutlicht, dass nur die Vegetationsschichten zwischen 2 und 5 cm Höhe von der Ausgasung betroffen sind (Tab. 10), die darüber liegenden Pflanzenteile werden nur von der Hintergrund-Luftbelastung beeinflusst [191, 192]. Jedoch kann eine Pflanze auch bereits als Jungpflanze kontaminiert werden [191].

**Tab. 10:** Schätzwerte von ausgasenden Stoffen z.B PCB (polychlorierten Biphenyle) [191]

Ernteprodukt	Bodennah	Kontaminationsgefahr durch Ausgasung
Blatssalat	2-5 cm	10 %
Spinat	2-5 cm	10 %
Grünkohl	>5 cm	0 %
Winterweizen (Korn)	>5 cm	0 %
Winterweizen (Stroh)	>5 cm	3 %

Die Tab. 10 zeigt, dass die Anteile des Ernteprodukts, die näher als 5 cm am Boden wachsen, stark von den ausgasenden Stoffen betroffen sind. Deshalb ist eine Kontaminationsgefahr durch die Ausgasung aus dem Boden bei Salat und Spinat hoch und bei Weizenstroh entsprechend niedriger. Bei Grünkohl und Weizenkorn hat dieser Anteil praktisch keinen Einfluss auf die Fremdstoffkonzentration im Ernteprodukt.

Andererseits ist das Eindringen in das äußere Gewebe der Pflanzen dann gegeben, wenn die Substanzen einen Dampfdruck von mindestens  $10^{-6}$  Pa haben und somit aus dem Boden ausgasen und in das äußere Gewebe der Pflanzen eindringen [104]. Antibiotika sind nicht flüchtige Stoffe, deshalb können sie keine Kontaminationen durch Gasphasentransport bzw. Ausgasung verursachen. Jedoch sind Kontaminationen durch anhaftende Bodenpartikel kurz vor der Ernte möglich. Es ist deshalb anzunehmen, dass eine Oberflächenkontamination von Antibiotika durch Bodenpartikel -insbesondere für bodennah wachsende Pflanzen- nicht auszuschließen ist [191].

Außerdem können Stoffe zusammen mit anderen Verschmutzungen, wie z.B. Partikeln aus dem Boden oder aus der Luft auf die Blätter gelangen. Für die Aufnahme über die Blätter müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein, die von der Pflanzenspezies und vor allem von der Behaarung der Pflanzenblätter abhängig sind. Auch die meteorologischen Einflüsse spielen hier eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Kontaminationen anders als die Partikel selbst in die Gasphase übergehen und verdampfen können oder auch direkt in die Pflanzenkutikula übergehen und dort verbleiben können [193].

#### *Systemischer Pfad*

Durch die Transportmedien (Bodenwasser und Transpirationsstrom) werden Xenobiotika aus dem Boden bzw. Bodenwasser über die Wurzeln aufgenommen und in der Pflanze verteilt [194]. Das setzt jedoch voraus, dass eine systemische Stoffaufnahme nur gelingt, wenn die Substanz durch Bodenwasser bzw. umgebendes Wasser in direktem Kontakt mit der Wurzel steht, wie Antibiotika, die über den Wirtschaftsdünger in den Boden sowie in das Bodenwasser gelangen.

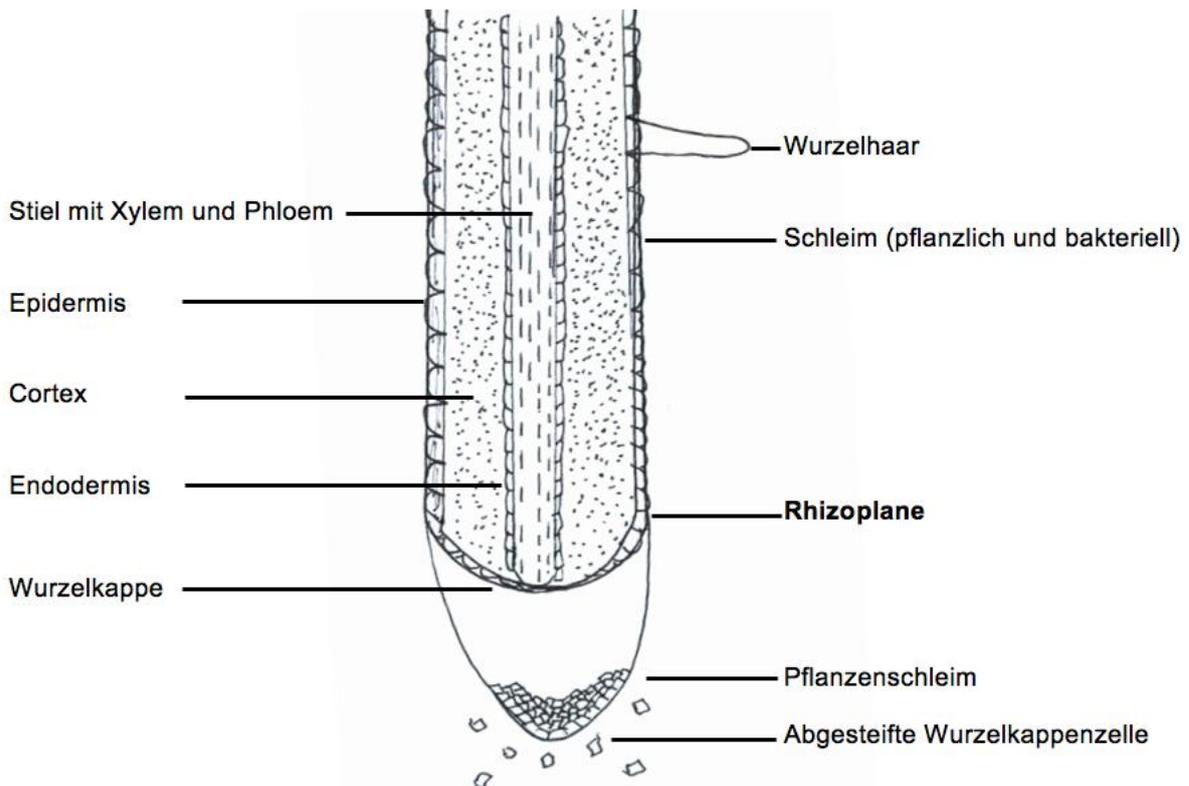
Grundsätzlich wäre die Aufnahme über die Blätter zu beachten, da diese durch die Begüllung mit den Wirkstoffen kontaminiert werden können. Antibiotika sind sehr wenig flüchtig, weshalb eine Aufnahme der Stoffe über die Blätter vernachlässigt werden kann. Daher ist für Antibiotika nur die Aufnahme über die Pflanzenwurzeln von Bedeutung.

### **5.1.1 Physiologie der pflanzlichen Wurzelzelle**

Im Boden nehmen Wurzeln Wasser und Nährstoffe auf und verteilen sie über ihr Transportsystem weiter (Blätter, Fruchtkörper). Sie bilden für die Pflanze ein enormes Netzwerk, welches je nach Pflanzenspezies oder Standort unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Mit Hilfe zunächst gebildeter schleimiger Zellwände, die das Wachstum der Wurzeln einleiten, kann die Pflanze tief in den Boden eindringen. Anschließend werden diese Zellen beim Wachstumsprozess abgestreift. Im weiteren Verlauf des Prozesses befinden sich innerhalb der sogenannten Wurzelhaube, die schleimige Zellwände besitzen, weitere Zellen, die für das Fortschreiten des Wurzelwachstums verantwortlich sind. Im Innenbereich der Wurzel befinden sich mehrere Zellarten z.B. die Zellen der Rhizodermis, Wurzelrinde und –haarezellen, sowie der Endodermis mit eingelagertem Casparischem Streifen und die der Leitelemente im Zentralzylinder. Als Rhizosphäre bezeichnet man den Teil des Bodens, der die Pflanzenwurzeln etwa 3 mm umgibt. Dieser Bereich wird in drei Zonen eingeteilt [195, 196]:

- Ectorhizosphäre, die einen beträchtlichen Abstand von der Wurzel einnimmt
- Rhizoplane, die als Wurzeloberfläche bezeichnet wird
- Endorhizosphäre, die sich innerhalb der Wurzelhaube befindet und auch von Bakterien besiedelt wird

Abb. 12 zeigt eine Wurzeloberfläche, die so genannte Rhizoplane, in schematischer Darstellung.



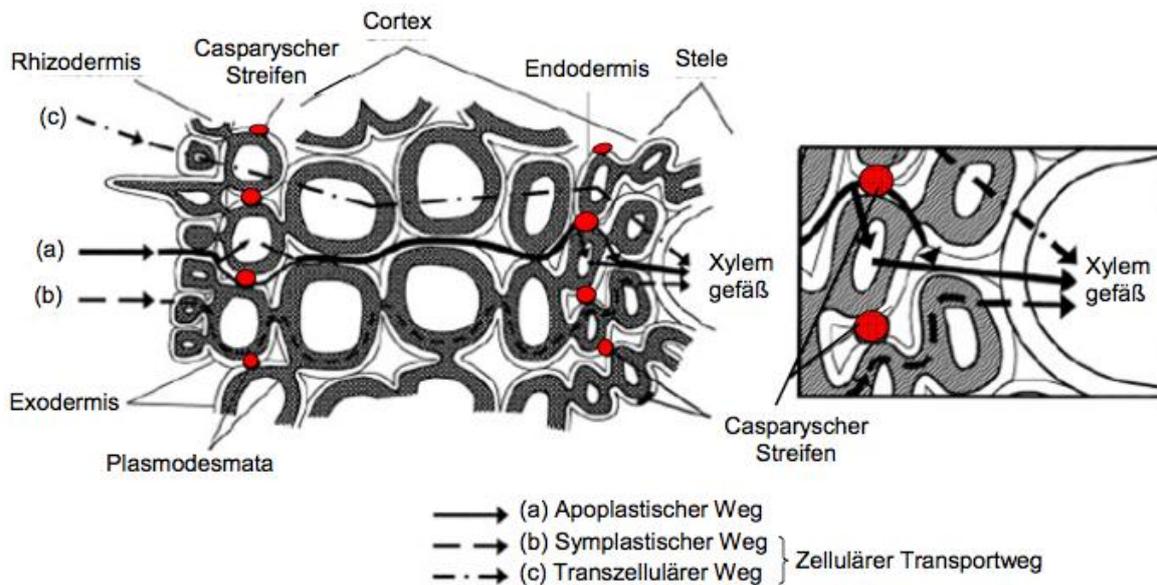
**Abb. 12:** Aufbau der Rhizosphäre in schematischer Darstellung [197]

Die Bedingungen in der Rhizosphäre beeinflussen die Wechselwirkungen. Gerade für die Bioverfügbarkeit der im Boden enthaltenen Xenobiotika spielt die Rhizosphäre eine entscheidende Rolle.

### 5.1.2 Stoffaufnahme über die Wurzel aus dem Boden

Die Aufnahme von Xenobiotika über die Wurzeln (systemische Pfad) erfolgt ähnlich der Aufnahme von Nährstoffen aus dem umgebenden System (Boden und Wasser). Wirkstoffe können entweder als Ionen frei in der Bodenlösung enthalten sein und somit durch die Pflanze absorbiert werden oder an Bodenpartikeln sorbieren und durch Austauschabsorption von den Wurzeln aufgenommen werden [191, 198].

Die Pflanzen haben durch die Wurzelhaare bzw. Feinwurzeln eine große Oberfläche für eine Stoffaufnahme. Die Aufnahme von Xenobiotika in die Pflanze erfolgt auf unterschiedlichen Wegen über die Pflanzenwurzel. Die Abb. 13 zeigt die prinzipiellen Stoffaufnahmewege über die Wurzel.



**Abb. 13:** Stoffaufnahme über die Wurzel in schematischer Darstellung [199]

Die Xenobiotika werden, je nach ihren physiko-chemischen Eigenschaften, meist durch einfache Diffusion aufgenommen. Die Zellwände der Wurzelhaare und die Wurzelrindenzellen werden als Apoplast bezeichnet. In ihnen erfolgt eine passive Aufnahme von Xenobiotika mit niedriger Hydrophobizität. Um eine passive Aufnahme über die Pflanzenwurzel zu ermöglichen, müssen die Substanzen in einer mobilen oder mobilisierbaren Form vorliegen. Durch die Konzentrationsdifferenz der Substanz zwischen Bodenlösung und Apoplast bzw. der Lösung im Apoplast wird ein Einströmen von Stoffen ermöglicht. So treten Substanzen durch das Symplast -dem so genannten Übergang- vom Apoplast in den pflanzlichen Metabolismus ein. Der Stoff wird schließlich an den Zentralzylinder bzw. das Xylem enthaltende Leitgewebe übergeben. Xylem besteht aus Elementen mit stabilen, verholzten Zellwänden, die kein Protoplasma enthalten. Schließlich sind die Assimilatbahnen (Phloem) zu nennen, die im Gegensatz zum Xylem aus lebenden, spezialisierten Zellen bestehen. Wenn eine Substanz im Phloem wandert, befindet sie sich im Symplasten. Das Phloem spielt eine Rolle im Transport bzw. bei der basipetalen (von der Spitze in Richtung auf die Wurzel) Verteilung der über das Blatt aufgenommenen Substanzen in den pflanzlichen Organismus, d.h., dass das Phloem einen Transport vom Blatt in Richtung Sproß und Wurzel ermöglicht. Die Translokation der aufgenommenen Stoffe von der Wurzel zum Spross macht zunächst einen Membrantransportschritt vom Symplasten der Wurzel in den Apoplast des Xylems notwendig. Die impermeable Suberinsschicht in der Zellwand der Wurzelendodermis (Casparistreifen) hindert gelöste Stoffe daran, direkt in das Xylem aufgenommen zu werden [199].

### 5.1.3 Pflanzenverfügbarkeit

Die Pflanzenverfügbarkeit, welche als Aufnahme und Transpiration von Pflanzen bezeichnet wird, spielt für ein hydrologisches System eine bedeutende Rolle. Die Pflanzenverfügbarkeit für ein Antibiotikum im Boden hängt von den bodenbedingten (pH-Wert, Belastungsausmaß, Anteil an Humus und Tonmineralien), substanz- (Adsorption in Boden und Mikroorganismen im Boden) und pflanzenbedingten Einflussfaktoren (Pflanzenart) sowie von den Umweltbedingungen (Niederschlag, Temperatur) ab [191].

Durch Sorptions- oder Bindungsvorgänge von Antibiotika an die Bodenmatrix wird ihre Aufnahme durch Pflanzen stark beeinflusst. Unter bestimmten Umständen, beispielsweise beim Abbau der Huminstoffe, können die adsorbierten Wirkstoffe jedoch wieder remobilisiert und für Pflanzen verfügbar werden [128]. Daher ist die Adsorption ein weitgehend reversibler Prozess und ein Teil der Wirkstoffe bleibt trotzdem verfügbar.

Eine theoretische Abschätzung einer möglichen Aufnahme von Tierarzneimitteln in die Pflanze ist mit Hilfe physikalisch chemischer Parameter wie Lipophilie (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{OW}$ )), Verdampfungstendenz (Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{AW}$ )), Säurekonstante ( $pK_a$ ) und pH-Wert möglich [191].

Die Mobilität der Wirkstoffe im Bodenwasser spielt eine wichtige Rolle für die Pflanzenverfügbarkeit. Die Wirkstoffe werden besser von der Pflanze aufgenommen, wenn sie beweglich sind. Für die Mobilität ist die Hydrophobie der Wirkstoffe von Bedeutung. Hydrophile bzw. polare Stoffe sind kaum bioverfügbar, da sie die Zellmembranen der Wurzelzellen nicht oder nur mit Hilfe von speziellen Transportproteinen passieren können [200]. Aber auch stark lipophile Substanzen gelten als nicht pflanzenverfügbar, weil sie zu stark an die organischen Partikel sorbieren. Ein maximales Aufnahmepotenzial in Pflanzen sollte deshalb für Substanzen mit mittlerer Lipophilie bestehen [201]. Es handelt sich bei der Aufnahme von Antibiotika über die Wurzeln also um Verteilungsprozesse zwischen den Systemen Luft, Wasser und natürlichen organischen Phasen. Verteilungskoeffizienten wie z.B. für das System Oktanol/Wasser ( $K_{OW}$ -Werte) werden in der englischsprachigen Literatur als P-Wert bezeichnet. Diese können das Verhalten näherungsweise beschrieben [202].

$$K_{OW} = P = \frac{\text{Konzentration in Oktanol}}{\text{Konzentration in Wasser}}$$

Der dekadische Logarithmus von  $K_{OW}$  ( $\log K_{OW}$ ) wird auch als  $\log P$  bezeichnet. Das bedeutet, „ $\log P$ “ ist hierbei synonym zum „ $\log K_{OW}$ “-Wert.

$$K_{OW} = P = \frac{c_O}{c_W} \qquad \log K_{OW} = \log P = \log \frac{c_O}{c_W} \qquad \log \frac{c_O}{c_W} = \log c_O - \log c_W$$

Außerdem können  $\log K_{OW}$ - bzw.  $\log P$ -Werte als  $pK_{OW}$ -Wert wie unten formuliert werden:

$$pK_{OW} = -\log K_{OW} = -\log P$$

Die log  $K_{OW}$ -Werte beruhen dabei auf strukturellen und physiochemischen Parametern wie z.B. der Polarität eines Stoffes. So lassen die berechneten oder gemessenen log  $K_{OW}$ -Werte eine Aussage über die Lipophilie und somit eine abschätzende Vorhersage über die Pflanzenverfügbarkeit von Antibiotika zu. Briggs konnte für die Pflanzenaufnahme von Herbiziden sogar eine Beziehung zwischen den  $K_{OW}$ -Werten und der optimalen Pflanzenaufnahme in Form einer Gaus'schen Normalverteilung feststellen. Des Weiteren erkannte Briggs, dass sein Maximalwert nicht universell auf jedes System zu übertragen ist. Gerade im System Boden-Wurzel werden lipophile Verbindungen stärker an die organischen Bodenpartikel gebunden, sodass für dieses System der  $K_{OW}$ -Wert für eine maximale Aufnahmefähigkeit deutlich geringer sein wird, als der von Briggs ermittelte Wert [203].

Tab. 11 zeigt eine Zusammenstellung der berechneten log  $K_{OW}$ /log P-Werte für verschiedene Antibiotika. Die Berechnungen hierzu wurden mit der Software „ACD/LogP v.8.02“ [204] durchgeführt.

**Tab. 11:** Berechnete log  $K_{OW}$ -Werte (log P) für verschiedene Antibiotika

Wirkstoff	log $K_{OW}$ (log P)	Standardabweichung, abs*
Tetracyclin	-1,47	0,81
epi-Tetracyclin	-1,47	0,81
Doxycyclin	0,54	0,80
epi-Doxycyclin	0,54	0,80
Oxytetracyclin	1,50	0,83
epi-Oxytetracyclin	1,50	0,83
Demeclocyclin	0,87	0,81
epi-Demeclocyclin	0,87	0,81
Chlortetracyclin	-0,33	0,82
e-keto-Chlortetracyclin	0,93	0,75
e-enol-Chlortetracyclin	-0,33	0,82
Iso-Chlortetracyclin	- 0,74	0,76
e-iso-Chlortetracyclin	-0,74	0,76
Sulfadiazin	-0,12	0,26
Enrofloxacin	2,54	0,77
Ciprofloxacin	1,31	0,78
Monensin	3,72	0,74

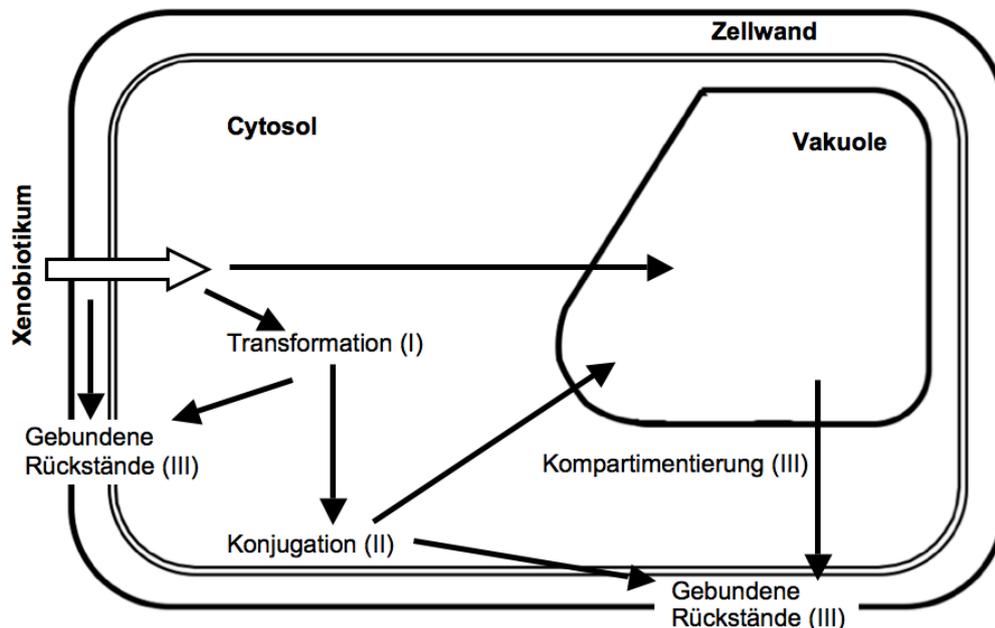
\*abs: Absolutbetrag

Aus der Tabelle lässt sich ablesen, dass fast alle kalkulierten log  $K_{OW}$ -Werte im sehr niedrigen Bereich von -2 bis +2 sind. Beispielweise lag der log  $K_{OW}$ -Wert für Tetracyclin bei -1,47, wobei in der Literatur 1,19 angegeben wird [26]. Aufgrund dieser Werte kann

grundsätzlich eine Aufnahme dieser Wirkstoffe von Pflanzen über die Wurzel erwartet werden. Abweichungen lassen sich vor allem für ENR und MON feststellen. ENR hat mit 2,54 einen günstigen Wert für das Aufnahmepotenzial und sollte, verglichen mit den anderen Wirkstoffen, deutlich besser aufgenommen werden können. MON hat mit 3,72 einen noch höheren  $\log K_{OW}$ -Wert und könnte eventuell etwas zu lipophil sein.

## 5.2 Metabolismus in Pflanzen

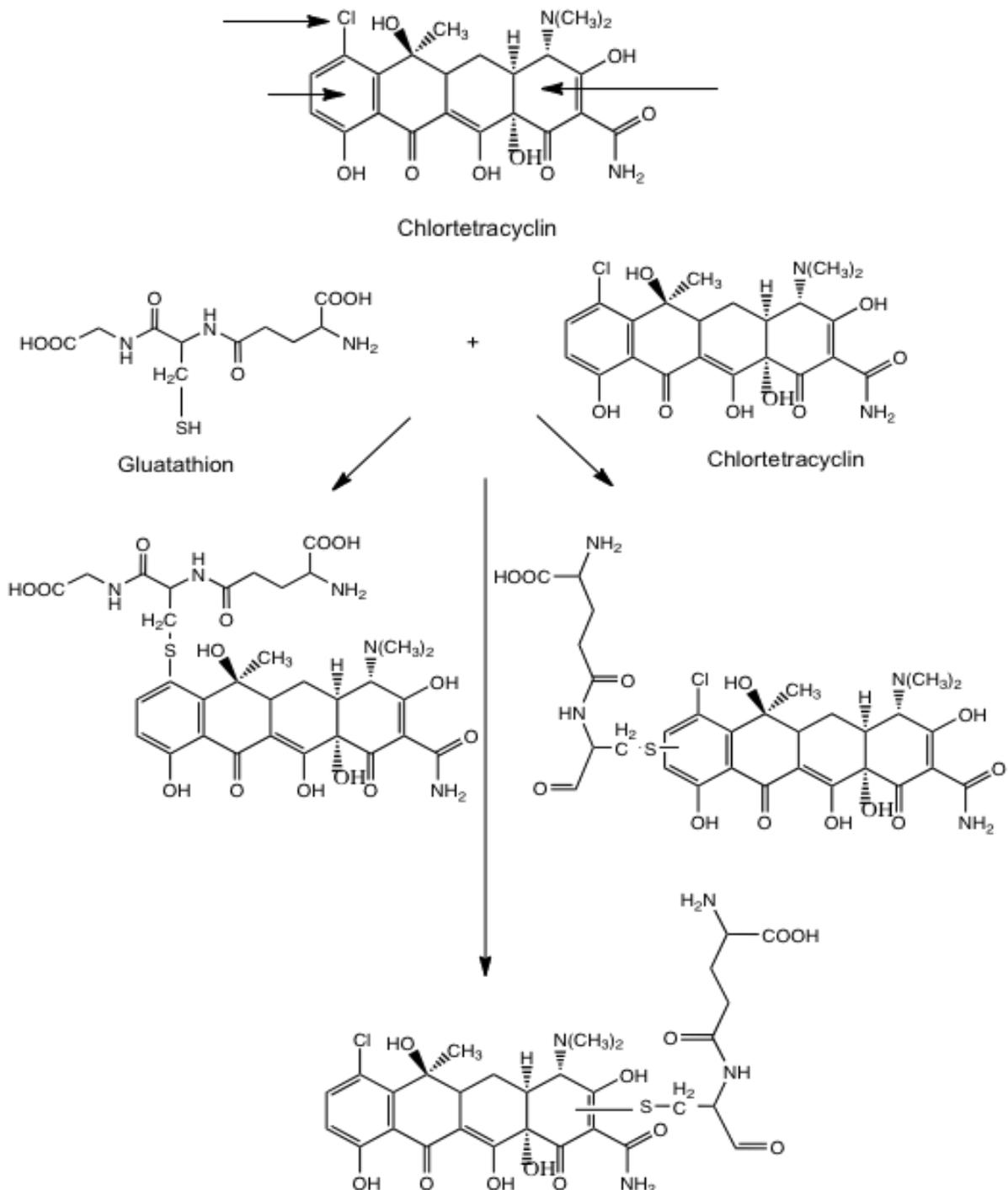
Wie verhalten sich Xenobiotika, wenn sie von der Pflanze aufgenommen werden? In der Literatur wird der Metabolismus der Xenobiotika in der Pflanze in drei Phasen unterteilt [205]. Die Phase-I beginnt mit einer Aktivierung der Xenobiotika. Es folgt die Konjugation in Phase-II. Anschließend enden die Kompartimentierungs- oder Speicherprozesse bei Phase-III. Zum Verständnis der Entgiftungsmechanismen wurde ein dreiphasiges Reaktionsschema der Xenobiotika in pflanzlichen Zellen vereinfacht dargestellt (Abb. 14).



**Abb. 14:** Metabolismus von Xenobiotika in pflanzlichen Zellen [206]

In Phase-I (Transformasyon) werden funktionelle Gruppen wie  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$  oder  $-COOH$  durch Reaktionen wie z.B. Hydrolyse, Oxidation, Reduktion oder Isomerisierung zu einer Aktivierung geführt. Durch die Aktivierung enthalten die Xenobiotika eine höhere Polarität und geringere Phytotoxizität. Daher spielen die Phase-I-Reaktionen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Xenobiotika. Anschließend erfolgen die Phase-II-Reaktionen, um den Fremdstoff weiter zu metabolisieren. In der Phase-I im Cytosol gebildete Primärmetaboliten mit zelleigenen niedermolekularen Verbindungen werden in Pflanzen entweder glycosyliert oder an die reduzierte Form des Tripeptides Glutathion ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin, GSH) gebunden [207]. Bei der Glutathion-Konjugation handelt es sich bei Pflanzen um einen weit

verbreiteten Entgiftungsmechanismus für Xenobiotika. Zu diesen Entgiftungs- bzw. Abbaumechanismen, die durch GST (Glutathion-S-Transferasen) konjugiert werden, zählen auch Antibiotikawirkstoffe. Batchfelder et al. konnten dieses mit Chlortetracyclin in Mais- und Bohnenpflanzen belegen [208]. CTC enthält harte und weiche Nucleophile (Abb.14). Deshalb ist die Möglichkeit der GSH Konjugation von CTC in Pflanzen groß [117]. In Abb. 15 sind verschiedene enzymatische Reaktionen der GSH Konjugation von CTC dargestellt.



**Abb. 15:** Mögliche Positionen der Glutathion-Konjugation von CTC [117]

Die reaktiven Stellen im CTC-Molekül können in Phase II mit dem Glutathion umgesetzt und die resultierenden Verbindungen dann in Phase III in die Vakuolen transportiert werden. Diese Metabolite aus Phase I oder II können als nicht extrahierbare Rückstände eingebunden werden, z.B. in Zellwände.

Zur Phase-III des pflanzlichen Metabolismus zählen Kompartimentierungs- und Speicherprozesse. Die Kompartimentierung in die Vakuole dient zur Kurzzeit-, Langzeit- und Endspeicherung von Stoffwechselprodukten, wobei komplexe Transport- und Speicherprozesse ablaufen, die sowohl aktive als auch passive, diffusive Transporte und reversible Fixierungen beinhalten.

### 5.3 Stand der Forschung zur Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen

Publikationen zum Antibiotikarückständen in Pflanzen ist in Tab. 12 zusammengefasst. Schon im Jahr 1958 belegte Krasilnikov experimentell, dass Penicillin und Streptomycin von Weizen, Mais und Feldsalat über die Wurzeln aufgenommen werden und das Pflanzenwachstum beeinflussen [8]. Migliore et al. untersuchten den Effekt von Sulfamethazin (SFM) auf verschiedene Pflanzen, wobei SFM in den Blättern der Maispflanze und in den Wurzeln der Rispen-Hirse bioakkumulierte [209]. Migliore et al. beschäftigten sich weiterhin mit den Effekten von SFM auf Pflanzen, die auf kontaminierten Böden wuchsen [210]. Sie konnten einen verminderten Pflanzenwuchs und eine SFM-Aufnahme in Wurzeln und den Blättern feststellen. Dabei war die aufgenommene SFM-Menge in den Wurzeln stets höher als in den Blättern. Migliore et al. zeigten, dass ENR (Enrofloxacin) von verschiedenen Gemüsepflanzen (s. Tab. 12) bei einer Konzentration von 5 mg/L im Substrat aufgenommen wird [211]. Kumar et al. konnten die Aufnahme von CTC und TYS (Tylosin) in Weißkohl, Frühlingszwiebeln und Getreide in Gewächshausversuchen nachweisen [212]. Auch Boxall et al. bestätigten die Aufnahme von Trimethoprim und Sulfadiazin in Salatblättern [213]. Langhammer et al. wiesen Sulfadimidin in den Wurzeln von Mais nach [214].

Im Rahmen einer Studie von Grote et al. [9] wurden unter praxisnahen landwirtschaftlichen Bedingungen antibiotikafrei aufgezogene Ferkel mit SFD (Sulfadiazin), TMP (Trimethoprim) und CTC (Chlortetracyclin) kontrolliert medikamentiert, die erhaltene Antibiotika-belastete Schweinegülle auf praxisnah bewirtschafteten Versuchspartzellen ausgebracht, anschließend Nutzpflanzen (Winterweizen, Feldsalat) ausgesät und beerntet. Dabei wurde ein Transfer von Antibiotika aus güllebeaufschlagtem Boden in den als Nahrungs- und Futtermittel genutzten Teil des Getreides, das Korn, nachgewiesen. Des Weiteren haben Grote et al. Aufnahmeexperimente für Feldsalat, Winterweizen und Möhren mit SFD und CTC dotierten Nährlösungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl CTC als auch SFD und ihre Metabolite von allen Pflanzenarten aufgenommen und innerhalb der Pflanzen weiter transportiert wurden. Außerdem lassen die Experimente in Hydrokultur einschließlich Tracerstudien mit Tritium-markiertem SFM und TC erkennen, in welchem Maße Aufnahme,

Transport und Verteilung in Pflanzenorganen von der Konzentration dotierter Antibiotika und der Wachstumszeit abhängen. Mikroautoradiographische Untersuchungen an Wurzelquerschnitten von Weizenpflanzen zeigten dabei deutlich die Haupteinlagerungsorte der Antibiotika, welche im Apoplast der Rhizodermis und der ersten Rindenlage lokalisiert wurden. Auch im Mesophyll der Blätter zeigten sich apoplastische Einlagerungen [75, 215]. Weitere Studien belegen das hohe Aufnahme- und Transportpotenzial zahlreicher Nutzpflanzen, die in der Lage sind, Veterinärpharmaka unterschiedlicher Wirkstoffgruppen über die Wurzel aufzunehmen: z.B. wurden unter Gewächshausbedingungen MON in Mais [216], SFM in Mais, Feldsalat und Kartoffeln [217] sowie OTC in Tomaten [218] aufgenommen. Die bisher vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen sind in der folgenden Tab. 12 zusammengefasst.

**Tab. 12:** Literaturübersicht der Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen

Wirkstoff	Pflanzenart	Medium	Effekt /Aufnahme	Referenz
CTC	Mais	Boden	kein Effekt	[208]
	Weizen, Rettich, Mais, Gartenbohne	Hydrokultur/ Boden	Wuchs gesteigert, nicht beeinflusst oder vermindert	[208, 219]
	Mais, Bohnen	Boden	kein Effekt	[219]
	Mais, Zwiebel, Kohl	Boden / 1µg pro Topf	Aufnahme von 10 bis 14,4 ng/g	[212]
	Möhre, Weizen, Feldsalat	Hydrokultur/ 5-20 µmol/L	Aufnahme von 0,9 mg/kg bis 338 mg/kg	[75, 220]
OTC	Mais	Boden	kein Effekt	[208]
	Weizen, Rettich, Mais, Gartenbohne	Hydrokultur/ Boden	Wuchs gesteigert, nicht beeinflusst oder vermindert	[208, 75]
	Luzerne	Hydrokultur / < 0,33 mM/L	phototoxische Effekt, Wuchs vermindert / Aufn. 0,35 µmol/g,	[221]
	Tomato	Boden/ 200 g/kg	Aufnahme von 420 bis 450 µg/kg	[218]
SFD	Möhre, Weizen, Feldsalat	Hydrokultur/ 5-20 µmol/L	Aufnahme von 0,01 mg/kg bis 18 mg/kg	[186]
SFM	Mais, Hirse, Erbse, Gerste	Agar/ 300mg/L	Wuchs vermindert / Aufnahme < 254 µg/g	[209, 210]
	Mais, Salat, Kartoffel	Boden	Aufnahme von 0,1 bis 1,2 mg/kg TM	[217]
SDM	Mais	Boden	-	[209, 210]

Fortsetzung von **Tab. 12**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Pflanzenart</b>	<b>Medium</b>	<b>Effekt /Aufnahme</b>	<b>Referenz</b>
ENR	Gurke, Rettich Gartensalat, Gartenbohne	Agar / 50,100, 5000 µg/L	Wuchs gesteigert oder vermindert Aufnahme < 8,1µg/g	[211]
	Salat	Boden 1mg/kg	Aufnahme von 2,8 µg/kg	[213]
Tylosin	Mais, Zwiebel,Kohl	Boden / 1µgpro Topf	keine Aufnahme	[212]
MON	Mais	Boden	Wuchs gesteigert	[117]
Lasalocid	Mais	Boden	Wuchs gesteigert	[117]
Florfenicol	Salat, Möhre	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 15 bzw. 5 µg/kg	[213]
TMP	Salat, Möhre	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 6 bzw. 5,3 µg/kg	[213]
Levamisol	Salat	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 170 µg/kg	[213]
Diazinon	Möhre	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 13 µg/kg	[213]

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Veterinärpharmaka in den Aufnahmeexperimenten/Hydrokultur sowie Feldbedingungen von Nutzpflanzen z.T. in sehr hohen Konzentrationen aufgenommen und in der Pflanze transportiert werden können.

## 6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 6.1 Ausgangssituation

Die in der Fachliteratur publizierten Ergebnisse (s. Kap.5.3) von Aufnahmeversuchen unter Gewächshausbedingungen zeigen, dass grundsätzlich mit Arzneiwirkstoffen, Metaboliten und anderen Umwandlungsprodukten belastete Wirtschaftsdünger durch den Transfer dieser Stoffe in Nutzpflanzen eine Eintragsquelle für antibiotisch wirksame Substanzen in Futtermittel und in die Nahrungskette darstellen können, was unter der zunehmenden Rückstands- und Resistenzproblematik als sehr kritisch zu bewerten ist.

In einem Forschungsprojekt [75] wurde ein Transfer von Antibiotika aus güllebeaufschlagtem Boden in den als Nahrungs- und Futtermittel genutzten Teil des Getreides, das Korn, nachgewiesen. Unklar ist jedoch, ob dieser Transfer auch in der Praxis der konventionellen Landwirtschaft von Bedeutung ist, da in der Regel die Antibiotikagehalte in GülLEN aus der landwirtschaftlichen Praxis geringer sind als die Gehalte, die unter den Bedingungen des o.a. Projektes erreicht wurden.

Andererseits stand Schweinegülle in vielen Studien im Vordergrund, die in Feldversuchen als Wirtschaftsdünger eingesetzt wurde und die (exemplarisch) mit Sulfadiazin, Chlortetracyclin und Metaboliten bzw. Umwandlungsprodukten belastet war. Neben den hauptsächlich in der Schweinegülle vorkommenden Wirkstoffen der Tetracycline und Sulfonamide sollen nun auch weitere Wirkstoffgruppen mit in die Analyse einbezogen werden, z.B. Fluorchinolone und die hauptsächlich in der Geflügelmast (z.B. Hühner- und Putenmist, Hühnertrockenkot, Flüssigdünger) eingesetzten Kokzidiostatika (Monensin), da auch aus diesem Bereich Wirtschaftsdünger gewonnen wird. Ein wichtiger Anwendungsbereich dieser Wirtschaftsdünger ist dabei sowohl der Getreide- als auch der Gemüseanbau insbesondere von Weißkohl und Porree (s. Kap.2.2).

### 6.2 Verlauf der Projekte - Untersuchungsmethodik

Diese Arbeit beruht auf der Mitarbeit im folgenden Forschungsprojekte:

- Zu Beginn des Projektes in Kooperation mit der FH Südwestfalen/FB Agrarwirtschaft (Soest) und dem Max Rubner-Institut (Detmold) mit dem Titel „Screening zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Getreide in viehstarken Regionen Nordrhein-Westfalens“ (MUNLV) wurden in der Erntezeit 2005 Felder mit Winterweizen sowie im Jahr 2006 Winterweizen, Gerste und Triticale in viehstarken Regionen beprobt und auf mögliche Antibiotikarückstände analysiert.
- Zusätzlich wurden Getreideproben aus der jährlichen "Besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung" (BEE) des Bundes und der Länder sowie aus Flächen verschiedener Prüfstellen angezogen sind, die mindestens 10 Jahre nicht mit Gülle gedüngt wurden,

analysiert. Zudem wurde im Rahmen des Projektes „Monitoring“ eine Untersuchung von Antibiotika in handelsüblichen Winterweizen aus Niedersachsen durchgeführt.

- Im Projekt in Kooperation mit der FH Südwestfalen/FB Agrarwirtschaft (Soest) und dem Max Rubner-Institut (Detmold) mit dem Titel „Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Gemüse - Porree und Weißkohl“ (MUNLV) wurde eine Hydrokultur-Versuchsreihe durchgeführt. Anschließend wurden Weißkohl und Porree in landwirtschaftlichen Hauptanbaugebieten beprobt und auf Antibiotikarückstände analysiert.

### **6.3 Methodenentwicklung**

#### **6.3.1 Rückstandsanalytik**

Zur Analyse möglicher Antibiotikarückstände in Pflanzen wurde die schon entwickelte, ursprünglich auf den Nachweis von SFD, TMP und CTC-Komponenten aus Getreideproben beschränkte Methode [102] erweitert. Die Getreide- und Gemüseproben wurden auf die Gehalte an Antibiotika auf Basis der angegebenen Medikationen sowie auf weitere veterinärmedizinisch relevante verordnungsstarke Wirkstoffe und, sofern bekannt, auf ihre Umwandlungsprodukte bzw. pflanzliche Metabolite analysiert. Es handelte sich um die folgenden Stoffe (Analyte) die in der Tab. 13 (s. Seite 56) zusammengestellt sind: SFD, AMO, CIP, ENR, TC, DC, OTC, DMC, CTC. Neben den Wirkstoffen TC, DC, OTC, DMC und CTC wurden auch die i.d.R. chromatographisch unterscheidbaren Epimere und die Keto-Enol-Tautomere des Epimers vom CTC (epi-CTC) mit in die Analyse eingeschlossen. Zusätzlich wurden in die entwickelten HPLC-MS-Methoden auch iso-CTC (ein Umlagerungsprodukt des CTC) und sein Epimer e-iso-CTC aufgenommen. Das zwar antibiotisch nicht aktive iso-CTC ist dennoch relevant, da es bereits in vorherigen Medikationsstudien in Gülle nachgewiesen wurde [60]. Es konnte auch bei der extraktiven Probenaufbereitung mit einem ammoniakalischen Puffer aus CTC-haltigen Böden extrahiert werden, wobei iso-CTC gebildet wird. Ebenfalls zeigten einige Untersuchungen, dass Winterweizen und Feldsalat in der Lage sind, dieses aufzunehmen und auch innerzellulär zu transportieren [102].

Schließlich wurden die Pflanzenproben auch auf extrahierbares DMC (DMC und e-DMC; beide als Standards erhältlich) analysiert. Bis 1989 wurde dieses Antibiotikum in der Humanmedizin eingesetzt, aber dann wegen seiner toxischen, teratogenen und fotosensibilisierenden Wirkungen vom Markt genommen [222]. Auch in der Veterinärmedizin ist DMC nicht mehr zugelassen. Neben der unwahrscheinlichen veterinärmedizinischen Anwendung in der Tierproduktion sind aber prinzipiell andere Eintragspfade bzw. Quellen in Boden und Pflanzen möglich, da sich DMC durch Abspaltung einer Methylgruppe vom CTC-

Molekül (C6-Demethylierung, s. Seite 88, Abb. 26) bilden kann. Demethylierungsreaktionen sind im Boden und der Rhizospäre der Pflanze durchaus denkbar, worauf eigene Untersuchungen und Literaturdaten hinweisen [205, 223, 224]. So wurden in Winterweizen-Wurzeln und -Blättern aus Hydrokultur verschiedene Metabolisierungsprodukte des Chlortetracyclins identifiziert. CTC kann auch am Stickstoff der Aminogruppe des A-Ringes demethyliert werden. Es würde draus N-Monodesmethyl-CTC entstehen [223, 225]. Weitere Demethylierungen könnten zu N-Monodesmethyl-Demeclocyclin oder N-Didesmethyl-CTC führen. Diese können ebenso wie andere Tetracycline unter  $\text{NH}_3$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Abspaltung fragmentieren (s. Seite 58, Abb. 17). Diese Stoffe sind als Standards kommerziell nicht erhältlich. Jedoch ist eine Identifizierung mit hochauflösender FTICR-MS möglich (s. Kap.6.3.2.2).

### 6.3.2 Erweiterung und Anwendung des Analysenverfahrens

Ziel war es, ein chromatographisches Verfahren mit HPLC-MS/MS für die quantitative Bestimmung von Antibiotikawirkstoffen in Getreide und Gemüse (Weißkohl und Porree) zu optimieren.

Zur Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter Antibiotikawirkstoffe und ihrer Metaboliten bzw. Umwandlungsprodukte in Getreide- und Gemüseproben wurden LC-MS/MS-Bestimmungsmethoden erweitert und angewendet. Diese LC-MS/MS-Analyse der SPE-Eluate erfolgte niedrigauflösend mit einem Ion-Trap-System. Bestätigungsanalysen wurden an ausgewählten Messproben mit dem hochauflösenden FTICR-MS-System (Fourier Transform Ionen Cyclotron Resonanz Massenanalysator) durchgeführt.

#### 6.3.2.1 LCQ, Niedrigauflösendes MS-System (Low Resolution-MS, LR-MS)

##### *HPLC-System*

Tetracycline sind entweder isokratisch oder mit einer Gradientenmethode chromatographisch zu trennen. Jedoch kann die isokratische Methode wegen der ähnlichen chromatographischen Eigenschaften der Analyten für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse ausgeschlossen werden. Deshalb wurde für die Bestimmung der Antibiotika und ihrer Metabolite eine Acetonitril/bidest.Wasser/MeOH-Gradientenmethode entwickelt, mit der eine chromatographische Trennung aller Verbindungen, insbesondere der schwer trennbaren Verbindungen e-CTC und iso-CTC, möglich ist. Als stationäre Phase werden hierbei modifizierte Umkehrphasen (RP) benutzt (YMC-Pack ODS-AM, 150 x 3,0 mm ID., S 5 $\mu\text{m}$ ). Bereits von Oka et al. wurde beschrieben, dass die YMC-ODS-AM-Säule für die Bestimmung von Tetracyclinen besonders gut geeignet ist [226]. Diese Säule zeichnet sich sowohl durch ein besonders gutes End-capping als auch einen sehr geringen Metallionen-Gehalt aus. Die stationäre Phase besteht aus polaren Trägerteilchen (Kieselgel), welche mit unpolaren Alkylgruppen modifiziert wurden. Die ursprünglich polare Oberfläche erhält

dadurch einen lipophilen Charakter. Deshalb werden polare Substanzen, wie z.B. Tetracycline, schwächer retardiert als unpolarere Moleküle, wie z.B. Monensin. Auch ist die Elutionsstärke der unpolaren Lösemittel wesentlich größer als die der polaren Lösemittel. Aus diesem Grunde wurde die Chromatographie mit hohem Anteil an wässriger Phase gestartet und während der Analyse der Anteil an lipophilerer Phase gesteigert.

### ***MS-Detektion***

Es wurde ein HPLC-Komplettsystem (Thermo Finnigan/Thermo Electron) mit dem massenselektiven Detektor LCQ-Advantage ESI-Ion-Trap verwendet. Die Identifizierung der Analyten erfolgt über die Massenspuren der Quasimolekül-Ionen und Fragmentionen (MS/MS-Stoßexperimente (He),  $MS^1$ ,  $MS^2$ ), ihre relativen Intensitäten und Retentionszeiten (Ionisierungsmethode: Electrospray Ionization (ESI), Positiv-Modus). In Tab. 13 sind die im SRM-Modus (Selected Reaction Monitoring) gemessenen Übergänge (Vorläufer- und Produkt-Ionen) aufgeführt. Die allgemeinen Parameter sind im Anh. 1.3.1 aufgelistet.

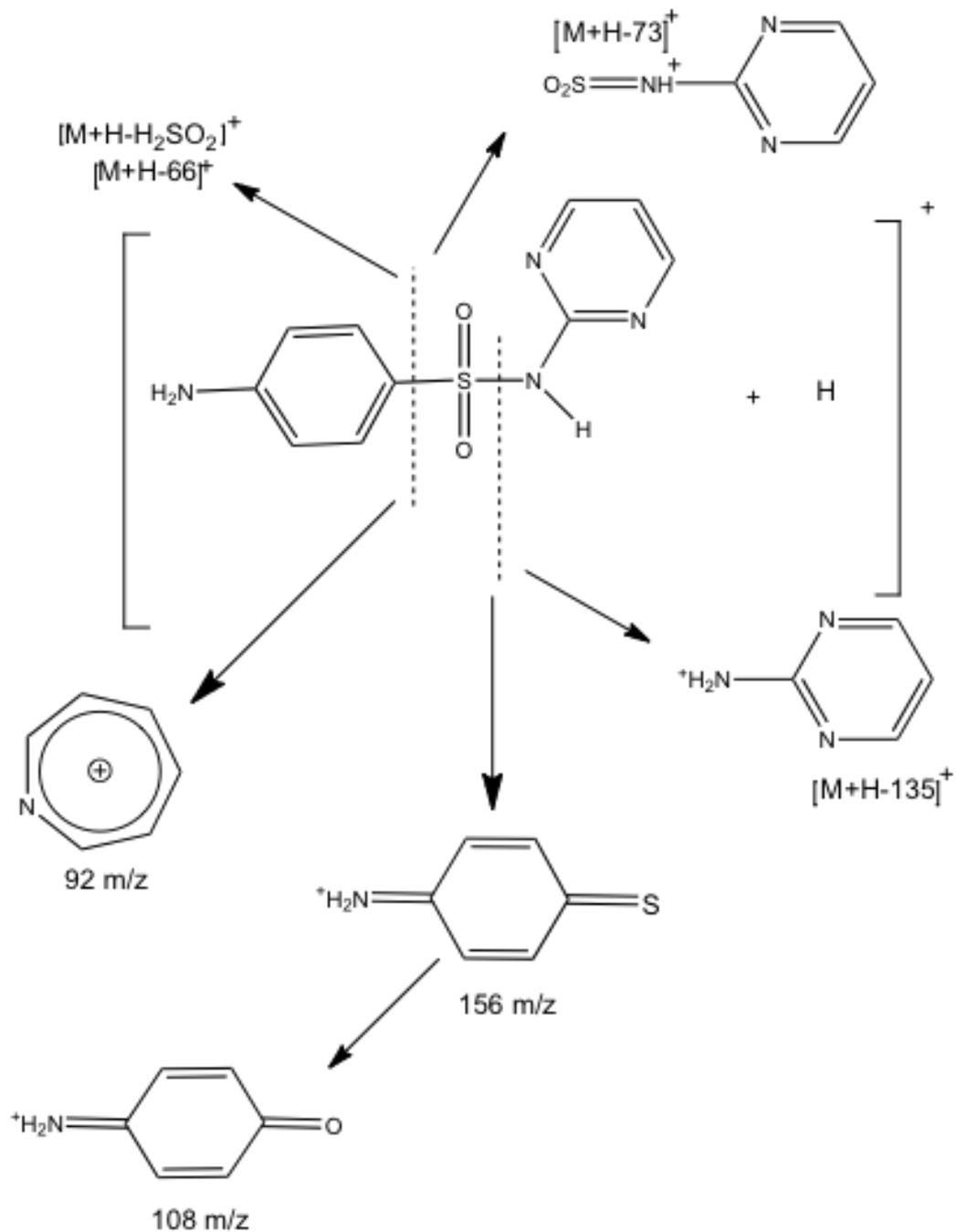
Zur Quantifizierung wurde die Summe der  $MS^2$ -Signalintensitäten korrespondierender Produkt-Ionen verwendet. Die Datenauswertung erfolgt mit der Xcalibur-Software 2.0 SR2. Die zur Identifizierung und Quantifizierung herangezogenen Retentionszeiten und Fragment-Intensitäten sind für alle Substanzen in Tab. 13 zusammengefaßt.

**Tab. 13:** LCQ-Daten: gemessene massenspektrometrische Daten und Retentionszeiten ( $t_R$ ),  $\beta=1$  mg/L, chromatographische Bedingungen s. Anh.1.3.1

Analyt	MS <sup>1</sup> [m/z]	Stoßenergie [%]	MS <sup>2</sup>		$t_R$ [min]
			m/z	Relative Intensität [%]	
SFD	251,1	35	156,0 173,9	84-100 80-100	5,8
ENR	360,2	42	245,2 316,2 342,2	<5 100 10-20	7,7
CIP	332,1	44	288,1, 314,1	100 <5	8,7
MON	693,4	45	675,4 479,2	100 <5	22,6
TC	445,0	34	410,1 427,0	40-50 100	7,9
e-TC	445,0	34	427,1 410,1	100 25	6,6
DC	445,0	34	428,1	100	13,3
e-DC	445,0	34	428,1	100	12,6
OTC	461,1	44	443,0 426,0 444,0	100 30 15	6,7
e-OTC	461,1	44	444,1 426,0	100 55	6,3
DMC	465,0	40	448,0 430,0	100 10-20	9,6
e-DMC	465,0	40	448,0 430,0	100 10	8,3
CTC	479,1	40	461,9 444,0	100 68-84	12,5
e-keto- CTC	479,1	40	461,9 444,0	100 <5	8,6
e-enol- CTC	479,1	40	461,9 444,0	84-100 80-100	10,6
iso-CTC	479,1	40	461,9	100	9,8
e-iso-CTC	479,1	40	461,0	100	8,2

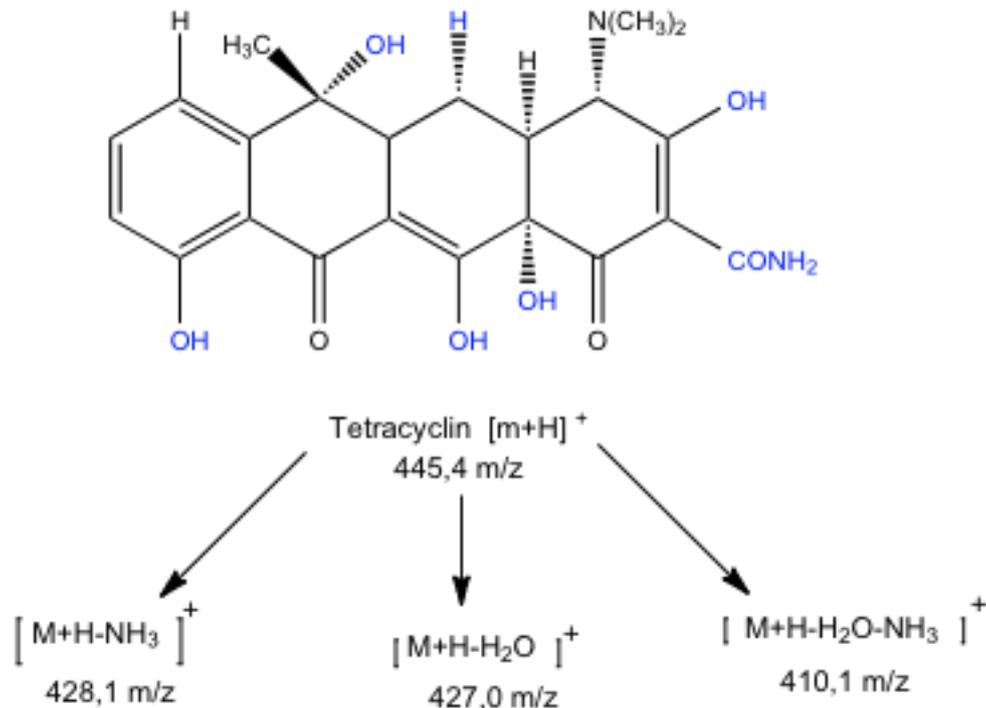
### Fragmentierungsreaktionen

Als Fragmentierung für SFD ist eine Aufspaltung in die Fragmente mit den  $m/z$ -Verhältnissen 156,0 und 173,9 zu beobachten. In Abb. 16 sind für das Quasimolekulation  $[M+H]^+$  von SFD die Produkt-Ionen angegeben.



**Abb. 16:** Fragmentierung von Sulfadiazin im positiven ESI-Modus [227]

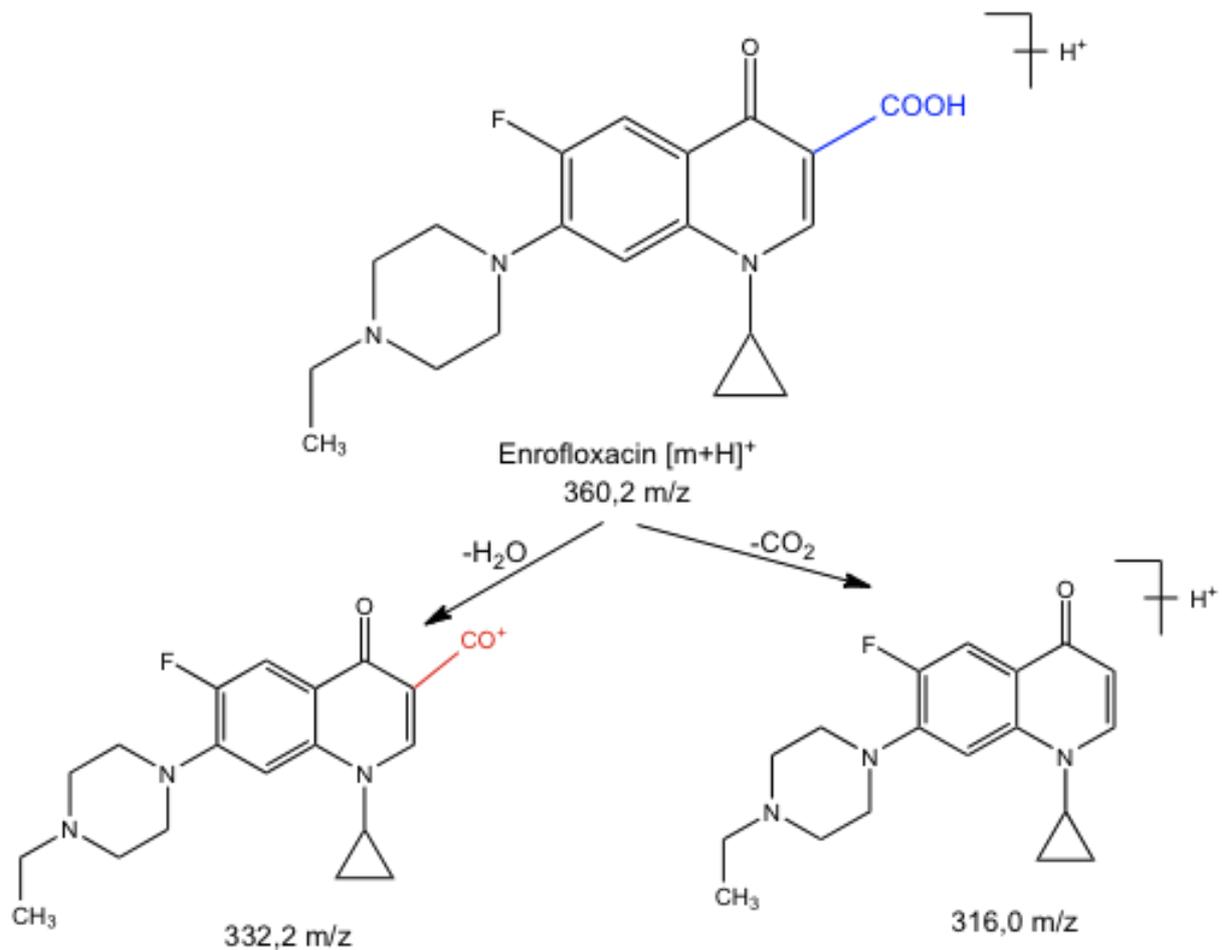
Bei der Fragmentierung der Tetracycline werden unspezifische Moleküle wie Wasser und Ammoniak abgespalten. In Abb. 17 sind die Produkt-Ionen von Tetracyclin beispielhaft dargestellt.



**Abb. 17:** Abgangsgruppen bei der Fragmentierung von Tetracyclin im positiven ESI-Modus [227]

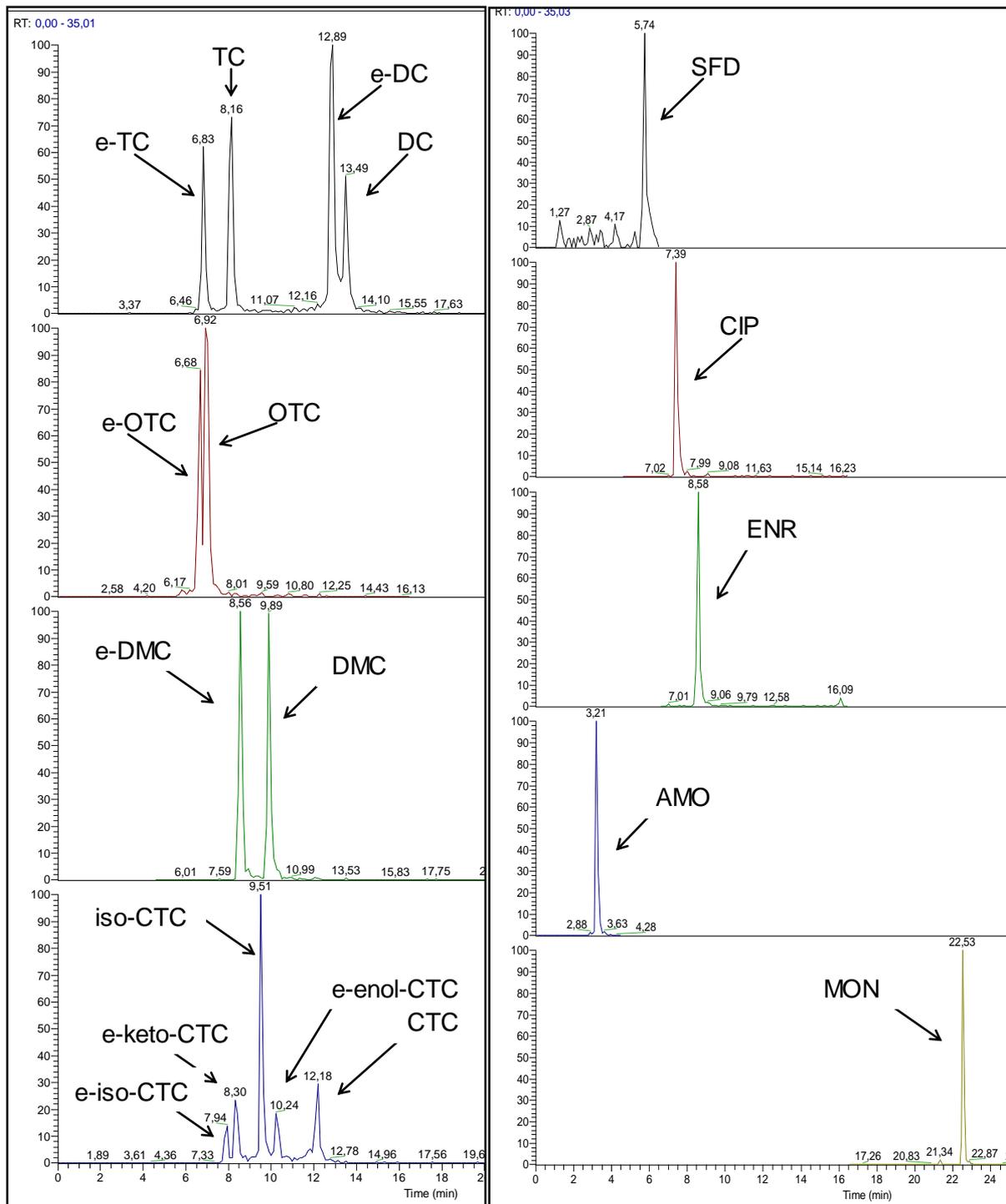
Die Fragmentierungsreaktionen der jeweiligen Epimere lassen erkennen, dass beide Substanzen zwar dieselben Produkt-Ionen bilden, sich aber in ihrem Intensitätsverhältnis unterscheiden, was zur Identifizierung der Epimere der Tetracycline genutzt wird.

In Abb. 18 ist das Fragmentierungsmuster der Fluorchinolone am Beispiel des Enrofloxacin dargestellt. Die Fluorchinolone bilden auch ein typisches Fragmentierungsmuster im ESI-Positiv-Modus, welches durch Abspaltung von Kohlendioxid oder Wasser charakterisiert ist. Nach Verlust der Carboxylfunktion kann ein Molekül HF abgespalten werden oder der Piperazin-Heterocyclus durch Abstraktion von C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N zum Aziridin erfolgen [228].



**Abb. 18:** Fragmentierung von Enrofloxacin im positiven ESI-Modus [228]

In Abb. 19 sind Massenchromatogramme einer Mischstandardlösung von ausgewählten Antibiotikawirkstoffen dargestellt.



**Abb. 19:** Massenchromatogramme einer Mischstandardlösung ( $\beta=1$  mg/L): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

### 6.3.2.2 FTICR-MS, Hochauflösendes MS-System (High Resolution-MS, HR-MS)

Die FTICR-MS ist die effizienteste MS-Technik in Bezug auf Auflösungsvermögen ( $>1,000.000$ ) und Massengenauigkeit. Die relative Massenabweichung zum theoretisch berechneten Wert kann weniger als 1 ppm betragen. Demnach erfolgt die Messung eines Ions mit 1000 Masseneinheiten bis auf die 3. Nachkommastelle genau. Im Gegensatz dazu

sind bei niedrigauflösenden MS Auflösungen LCQ, Ionenfalle von 2000 und eine Massengenauigkeit von 0,2 Masseneinheiten üblich. Dagegen ermöglicht die hohe Auflösung der FTICR-MS-Technik sehr geringe Unterschiede in der Masse bzw. m/z-Werten zu detektieren.

### **HPLC-System**

Im Rahmen der Analysen mittels FTICR-MS wurde ein HPLC-System von Thermo Electron (San Jose, CA, USA) verwendet und der Gradient gehalten. Als Säulenmaterialien wurden wiederum modifizierte Umkehrphasen (RP) benutzt (YMC-Pack ODS-AM, 150 x 1,0 mm ID., S 5  $\mu$ m). Als mobile Phase wurden Acetonitril und Methanol verwendet (s. Anh.1.3.2)

### **MS-Detektion**

Die Überprüfung der Tetracyclin-Befunde in den Pflanzenproben (s. Kap.7.1.2) wurde mit einem Hybrid-Massenspektrometer durchgeführt, welches aus einer linearen Quadrupol-Ionenfalle und einem FTICR-MS besteht (LTQ FT der Fa. Thermo Fisher Scientific, Bremen). Während der HPLC-Trennung wurden zeitlich parallel verschiedene MS-Experimente in beiden Massenanalysatoren durchgeführt. Übersichtsmassenspektren im Bereich m/z = 400-500 wurden im FTICR-MS mit einer Auflösung von R = 25 000 aufgenommen. Die zwei intensivsten Ionen wurden dann nacheinander für exakte Massenbestimmungen mit einem FTICR-SIM-Scan gemessen. Zeitgleich erfolgte die stoßinduzierte Fragmentierung ( $MS^2$ ,  $MS^3$ ,  $MS^4$ ) in der linearen Ionenfalle. Die Absicherung der Tetracyclin-Befunde basiert demzufolge nicht nur auf dem Retentionszeitvergleich mit Standardsubstanzen (sofern verfügbar), sondern stützt sich sowohl auf die exakte Masse des Vorläuferions (relative Massenabweichung zum theoretischen Wert nur wenige ppm) als auch auf die Übereinstimmung der  $MS^n$ -Fragmentspektren (Tab. 14)

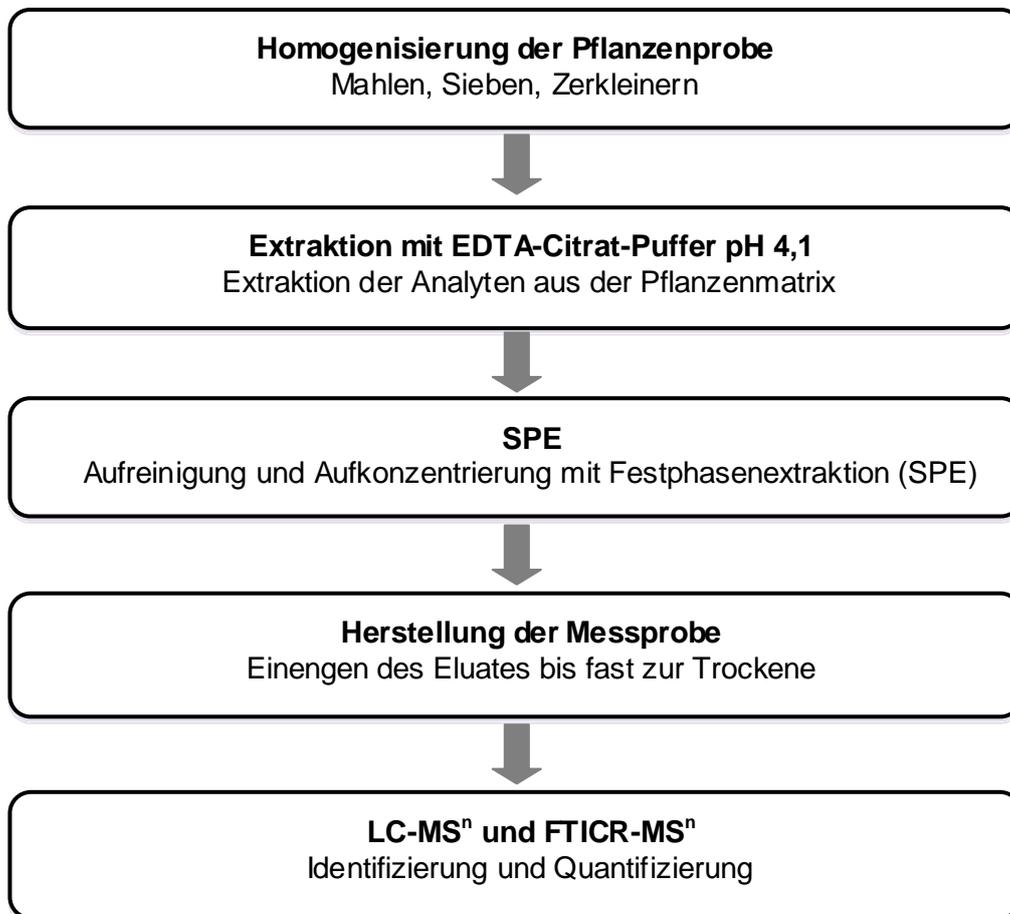
Die allgemeinen Parameter sind im Anh. 1.3.2 aufgelistet.

**Tab. 14:** Berechnete exakte m/z-Werte der Analyten mit hochauflösender MS  
(\* niedrigauflösend, ∇ hochauflösend)

Analyt	Summenformel	$\nabla$ MS <sup>1</sup> [M+H] <sup>+</sup>	*MS <sup>2</sup> [M-NH <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup>	*MS <sup>3</sup> [M-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
TC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	445,16054	428,1	410,1
e-TC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	445,16054	428,1	410,1
DC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	445,16054	428,1	410,1
e-DC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	445,16054	428,1	410,1
OTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	461,15546	444,1	426,1
e-OTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	461,15546	444,1	426,1
DMC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	465,10592	448,1	430,1
e-DMC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	465,10592	448,1	430,1
CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	479,12157	462,1	444,1
e-keto-CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	479,12157	462,1	444,1
e-enol-CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	479,12157	462,1	444,1
iso-CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	479,12157	462,1	444,1
e-iso-CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	479,12157	462,1	444,1
CIP	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	332,14050	288,1	270,1

### 6.3.3 Optimierung der Probenvorbereitung

Ziel der Probenvorbereitung war es, die Analyten aus den pflanzlichen Matrices möglichst quantitativ zu extrahieren. Da hierbei Matrixbestandteile mitextrahiert werden, welche sich auf die MS/MS-Detektion auswirken können, ist zur Reduzierung von Matrixeffekten eine Aufreinigung der erhaltenen Extrakte notwendig. Nach der Extraktion der Analyten aus der homogenisierten Probe mit EDTA/Citratpuffer pH 4,1 erfolgte die Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Extraktes mit Festphasenextraktion (SPE, Solid-Phase-Extraction). Das hierbei erhaltene Eluat wurde zur weiteren Aufkonzentrierung in einem Metallblockthermostat unter Luft-Strom eingengt. Zur Aufnahme des Rückstandes nach Einengen des Eluates erwies sich Fließmittel A als geeignet. In Abb. 20 ist der allgemeine Analysenablauf schematisch dargestellt.



**Abb. 20:** Allgemeiner Analysenablauf zur Bestimmung von Antibiotikawirkstoffen in Pflanzenproben

Für die Wiederfindungsstudien sowie auch für die Erkennung von Verschleppungen bei den Getreideproben wurden unbelasteter Bundessortenamt-Weizen (BSA) und Futterweizen, welche nach Analyse als "unbelastet" eingestuft wurden, aufgearbeitet. Bei den Gemüseproben wurden die Hydrokultur-Kontrollproben angewendet. Die als optimal beurteilten Bedingungen wurden schließlich auf die Analyse der Pflanzenproben übertragen.

### 6.3.3.1 Homogenisierung

Es wurden verschiedene Zerkleinerungstechniken zur Gewinnung eines Pflanzenhomogenats getestet. Durch den Zerkleinerungsprozess werden Zellorganellen (Gewebe) bei der Behandlung mit Ultraschall zerstört. Somit werden die nicht an Zellwände gebundenen, freien Antibiotikarückstände extrahierbar [186].

#### **Getreide**

Die Kornproben wurden mit Hilfe einer automatischen Mörsermühle gemahlen. Es wurden die Mahldauer sowie Einstellungen der Mörsermühle (Hauptzustellungsrichtung in Achsrichtung des Pistills) optimiert. Die Korngrößen-Fraktionierung des Mahlgutes erfolgte in

einer analytischen Siebmaschine. Die Fraktion mit einer Korngröße von  $d < 0,106$  mm wurde zur Analyse verwendet.

### **Gemüse**

Zur Aufbereitung von Gemüseproben wurden Küchenmixer, Küchenmesser, Mörsermühle und Schwingmühle erprobt. Als geeignet erwiesen sich die Schwing- und Mörsermühle. Zerkleinerte, tiefgekühlte ( $-80$  °C) Pflanzen aus den Hydrokultur-Versuchen wurden mit einer Schwingmühle homogenisiert. Tiefgekühlte ganze Pflanzen aus den Freilandversuchen wurden aber nach manueller Zerkleinerung mit einer für größere Mengen geeigneter Mörsermühle homogenisiert.

#### **6.3.3.2 Fest-Flüssig-Extraktion**

In der Literatur sind einige Extraktionsverfahren für Pflanzenproben beschrieben. Neben der Hochdruck-Extraktion (Accelerated Solvent Extraction, ASE) [229] kommen Mikrowellen-unterstützte (Microwave-Assisted Solvent Extraction, MAE) [230, 231, 232] und Ultraschall-unterstützte (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) [102, 233, 234] Extraktionen zum Einsatz.

Beim ASE-Verfahren senkt die erhöhte Temperatur des Extraktionsmittels ( $50 - 200$  °C) dessen Oberflächenspannung und Viskosität. Damit wird das Eindringen der Flüssigkeit in die feste Probe erleichtert, wodurch gleichzeitig auch der Stoffaustausch erleichtert wird. Jacobsen et al. beschrieben, dass verschiedene Antibiotika mit der ASE-Methode aus Boden und Getreide extrahiert werden können [229]. Dafür haben Jacobsen et al. als Extraktionsmittel ein Gemisch von Citronensäure und Methanol (1:1 v/v) verwendet. Die Wiederfindungen für OTC und CTC betragen bei Bodenproben 50-80 % und bei Kornproben 34-60 %.

Andererseits liegt der Hauptvorteil der MAE im Einsatz geschlossener Druckgefäße, die Extraktionstemperaturen weit über dem Siedepunkt der eingesetzten Lösemittel erlauben wodurch die Extraktionsgeschwindigkeit stark erhöht wird. In diesen druckstabilen Gefäßen wird die Extraktion bei Drücken zwischen 0,5 und 20 MPa durchgeführt [235]. Wollersen ermittelte eine Wiederfindung von ca. 95 % für Flavonoide in Getreide mittels der Mikrowellen-unterstützten Extraktion [232].

Bei der UAE liegen die Frequenzen der eingesetzten Ultraschallwellen oberhalb von 20 kHz. Die Ultraschallübertragung, welche wellenförmige Expansionen und Kompressionen der Stoffe verursacht, führt zu lokalen Erwärmungen und Blasenbildungen. Grote et al. extrahierten mit UAE Tetracycline aus Boden- und Pflanzenproben. Es wurden Wiederfindungen bei Pflanzen für iso-CTC von 31-39 % und für CTC von 56-67 % ermittelt [222].

Bei dem ASE-Versuch wurde als Probe Vollkornmehl Typ 1050 verwendet, da die BSA-Weizenprobe für den Filter im Druckbehälter zu fein gemahlen war. An die Extraktion mit Hilfe von Ultraschall, Hochdruck und Mikrowelle schloss sich jeweils eine Festphasenextraktion mit einer Oasis HLB-Kartusche zur Aufreinigung und Anreicherung an. Anschließend wurden die aufgearbeiteten Extrakte mittels LC-MS/MS analysiert. In Tab. 15 sind die Wiederfindungen mit den verschiedenen Extraktionsmethoden aufgeführt.

**Tab. 15:** Wiederfindungen mit verschiedene Extraktionsmethoden mit EDTA/Citratpuffer (Dotierung 5 mg/kg FG, BSA-Winterweizen, Futterweizen und Vollkornmehl, n = 3) [236]

Extraktionsmethode	Probe	Wiederfindung [%]		
		TC+ e-TC	CTC+ e-CTC	DMC+ e-DMC
ASE	Vollkornmehl-Type 1050	240,0	201,0	154,0
MAE	Mehl-Futterweizen	52,0	47,0	41,0
UAE	Mehl-BSA-Winterweizen	85,1	88,5	82,4

Das Vollkornmehl – Typ 1050 beinhaltet im Vergleich zum BSA-Weizenmehl einen höheren Anteil an Schalenbestandteilen, weshalb sich beide Mehle in ihrer Zusammensetzung (Kohlenhydrate, Proteine, Mineralien, Vitamine) unterscheiden

Mitextrahierte Matrixkomponenten können Koelutionen von Peptiden (s. Kap.7.2.1) verursachen. Diese Matrixbestandteile können die Analytsignale überlagern und zu einer Verringerung der Wiederfindung führen oder diese scheinbar erhöhen, wie es bei den ASE-Probenextrakten der Fall ist (154-240 %). Bei der Extraktion mit Hilfe einer Mikrowelle wurden Wiederfindungen von 41-52 % ermittelt, bei der ultraschallunterstützten Extraktion für Tetracycline zwischen 82,4 und 88,5 %.

#### *Extraktionsmittel*

Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften der Analyte werden meist schwach saure Puffer in Kombination mit einem organischen Lösungsmittel eingesetzt. Eine Komplexbildung soll dabei durch Zugabe von Agenzien wie EDTA, Citrat oder Oxalsäure unterbunden werden [237].

Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren werden zur Extraktion von Antibiotika insbesondere Tetracyclinen aus verschiedenen Matrices wie z.B. für Gülle-, Muskulatur- und Urinproben sowie auch für Bodenproben Gemische aus Citronensäure /Aceton/Ameisensäure [238, 239], Methanol/McIlvaine-Puffer [240] oder auch Methanol/EDTA/McIlvaine-Puffer [241, 242] verwendet. Grote et al. extrahierten Tetracycline aus Pflanzen mit EDTA/Citratpuffer pH 4,1 [9].

Ein Zusatz von MeOH könnte einen vorteilhaften Einfluß auf die Pflanzen-Extraktion ausüben. Deshalb wurden Antibiotika-dotierte EDTA/Citratpuffer mit einem MeOH-Zusatz von 5, 10, 15 und 20 % v/v eingesetzt, mit SPE aufgearbeitet und analysiert. In der Tab. 16 sind die Wiederfindungsergebnisse aufgeführt.

**Tab. 16:** Wiederfindung in Abhängigkeit vom MeOH-Zusatz des EDTA-Citrat-Puffers (Oasis HLB-60 mg-Kartusche), Dotierung: 250 µg/kg FG, BSA-Winterweizen und Porree-Blatt-Kontrollproben/Hydrokultur, n = 3

Anteil an MeOH im Extraktionsmittel (v/v) [%]	Wiederfindung[%]					
	Winterweizen			Porree		
	SFD	TC+e-TC	CTC+e-CTC	SFD	TC+e-TC	CTC+e-CTC
0	53,4	90,7	82,5	50,8	61,8	85,9
5	51,5	93,4	89,5	50,1	60,4	82,9
10	44,8	84,3	70,5	52,7	66,4	76,8
15	45,7	62,1	74,6	49,6	68,9	76,4
20	33,1	60,3	69,8	43,5	57,5	62,6

Die Ergebnisse zeigen, dass die höchsten Wiederfindungen für TC und CTC in Winterweizen mit einem MeOH-Zusatz von 5 % (v/v) erreicht werden (93,4 und 89,5 %). Ohne MeOH-Zusatz zeigte sich jedoch eine bereits leicht verringerte Wiederfindung (90,7 und 82,5 %). Man kann ebenfalls sehen, dass ein zu hoher MeOH-Zusatz (>5 % v/v) niedrigere Wiederfindungen im Winterweizen zur Folge hat, wobei es wahrscheinlich ist, dass die Analyten durch den zu hohen MeOH-Zusatz von der SPE-Phase unvollständig sorbiert werden – zumal MeOH als Elutionsmittel verwendet wird.

### 6.3.3.3 Festphasenextraktion (SPE)

Nach der Fest-Flüssig-Extraktion erfolgte eine Anreicherung der Analyte und eine Aufreinigung (Clean-Up) der extrahierten Lösungen mittels Festphasenextraktion (SPE). Von den zahlreichen Probenvorbereitungstechniken ist die Festphasenextraktion die am häufigsten eingesetzte Methode [243], wobei häufig relativ unspezifische Polymerphasen, wie z.B. die Oasis-HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) verwendet werden [244, 245]. Das Festphasenmaterial besteht aus zwei Monomeren: dem polaren N-Vinylpyrrolidon und dem unpolaren Di-Vinylbenzen, so dass das Verhältnis zwischen hydrophilen und lipophilen Anteilen ausgewogen ist. Dieses SPE-Material wurde zur Aufarbeitung der Getreide- und Gemüse-Extrakte verwendet.

#### **Anwendung des halbautomatisierten SPE-Systems: OPi-SPE**

Für die Festphasenextraktion wurde sowohl eine klassische manuelle SPE-Einheit als auch der Prototyp einer OPi-SPE-Einheit (Over Pressure inline Solid Phase Extraction) (Abb.A2)

eingesetzt, die von der Fa. RSC (Richard Sauerbrey Chromatographie, Reinhardshagen) entwickelt und im Arbeitskreis von Prof. Grote (Universität Paderborn) optimiert wurde. Die OPi-Einheit ermöglicht die automatisierte simultane Aufgabe von Extrakten über SPE-Kartuschen. Dabei wird - im Unterschied zum manuellen System - ein kontinuierlicher Durchfluss durch ein Pumpen-Hydraulik-System gewährleistet, was zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Wiederfindungen führen sollte. Bei den klassischen manuellen Systemen hängt der Durchfluss stark von den individuellen Durchfluss-Widerständen der SPE-Kartuschen ab. Deshalb sind manuelle Ventilregulierungen nötig, um ein Austrocknen einzelner Festphasen zu verhindern. Der unterschiedliche Widerstand der einzelnen SPE-Kartuschen wird ausgeglichen, in dem ein gleichbleibender Durchfluss für alle simultan betriebenen SPE-Kartuschen eingestellt wird. Unterschiedliche Durchflussgeschwindigkeiten können über die Pumpensteuerung eingestellt werden. Ein weiterer Vorteil ist die klar definierte Durchflusszeit, die bei den klassischen Systemen starken Schwankungen unterliegen kann.

#### **Vergleichsanalysen mit dem OPi-SPE- und SPE-Block-System**

Es wurden drei dotierte Citratpuffer-Proben in gleicher Weise mit der manuellen SPE-Einheit und dem OPi-SPE-System parallel aufgearbeitet (Anh. 1.5.3) und die Eluate mit der im Anh. 1.3.1 beschriebenen LC-MS/MS-Methode analysiert.

**Tab. 17:** Vergleichsanalysen mit manuellem SPE- und OPi-SPE-System (dotierte Citratpuffer, Dotierung: 50 µg/kg, LC/MS-Methode, Doppelbestimmung n=3)

Analyt	Manuell SPE		OPi-SPE	
	Wiederfindung [%]	Standardabweichung [%]	Wiederfindung [%]	Standardabweichung [%]
SFD	55,1	3,5	49,1	2,9
	51,2		48,5	
	58,2		53,9	
ENR	73,4	3,6	69,9	2,3
	70,1		66,7	
	77,3		71,2	
TC+ e-TC	100,7	1,9	96,9	1,7
	98,5		99,3	
	102,3		95,9	
MON	49,5	4,6	50,5	2,0
	56,9		47,9	
	48,5		51,9	

Die Ergebnisse in Tab. 17 zeigen, dass die Wiederfindungen bei allen Wirkstoffen mit beiden Systemen sehr ähnlich ausgefallen sind. Aus dieser Aufstellung kann des Weiteren die Standardabweichung um die Mittelwerte der Ergebnisse der drei Messungen einer Probe abgelesen werden. Es zeigt sich hier, dass die Standardabweichung für MON bei manueller SPE wesentlich höher ist (4,6 %), als bei OPi-SPE (2,0 %).

Es ist festzustellen, dass in der Tat mit dem OPI-SPE-System wesentlich bessere Wiederholbarkeiten erreicht wurden als mit der manuellen SPE-Einheit. Daher ist das OPI-SPE-System routinemäßig für die weitere Aufarbeitung von Pflanzenproben eingesetzt worden.

### **Auswahl der Filtermaterialien**

Ein weiteres Problem war, dass die Extrakte der Gemüseproben trotz Zentrifugation immer noch kleinste Partikel bzw. Schwebstoffe enthielten, wodurch die SPE-Kartuschen verstopften. Daher war es notwendig einen Filtrationsschritt in die Probenvorbereitung zu integrieren. Verschiedene Filtrationsmaterialien wurden getestet: Papierfilter, Glasswatte und verschiedene Aufsatzfilter (Tab. 18). Papierfilter und Glaswatte ließen sich direkt in die SPE-Kartusche einsetzen und die Extrakte direkt aufgeben. Der Filtrationsschritt erfolgte somit vor der SPE. Demgegenüber erfolgte die Filtration mittels Aufsatzfilter nach der SPE. Hierbei wurden die aufgearbeiteten SPE-Eluate (Messprobe, s. Anh.1.5.3.6) über eine Spritze, welche mit einem Aufsatzfilter versehen war, filtriert.

**Tab. 18:** Wiederfindungen an Wirkstoffen bei verschiedenen Filtermaterialien (Dotierung: 500 µg/kg FG, Porree/Blatt- und Weißkohl/Blatt-Kontrollproben aus Hydokultur, SPE, LC/MS-Methode, n=3)

Filtration	Filter-Material	Filter-Durchmesser	Filter-Porengröße	Firma	Wiederfindung für TC (TC+e-TC) [%]		
					Weißkohl	Porree	
ohne Filtration	-	-	-	-	75,2	71,7	
Glasswatte	Glasfaser (silanisiert)	-	-	Serva	72,4	69,4	
Filterpapier	Blauband, 589	70 mm	-	Whatmann	59,3	59,9	
Aufsatzfilter	RC	Cellulose	4 mm	0,45 µm	Phenomenex	54,0	56,7
	PTFE	Polytetrafluorethylen	4 mm	0,45 µm	Phenomenex	44,4	44,2
	NY	Nylon	4 mm	0,45 µm	Phenomenex	34,3	26,6
	GHP	Polypropylene	13 mm	0,45 µm	Pall (Acrodisc)	66,7	53,8

Bei Verwendung von alkyl- oder phenylmodifizierten Umkehrphasen kann wegen des möglichen Metallionengehaltes durch die ausgeprägten Komplexbildungseigenschaften mit Metallkationen die chromatographische Trennung der Tetracycline gestört werden. Zusätzlich wird die Bildung von  $\pi$ - $\pi$ -Komplexen zwischen den Phenylresten bzw. dem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer und den Tetracyclinen bei den Phenyl- und organischen Polymermaterialien angenommen [60]. Diese können der Grund niedriger Wiederfindungswerte (<66,7 %) mit Aufsatzfiltern sein.

Auch nach Einsatz des Papierfilters zeigten sich sehr niedrige Wiederfindungswerte (<59,9 %). Dies könnte ein aufgrund des Cellulosematerials und daran sorbierten Analyt-Wirkstoffen verursachter Analytenverlust sein. Da die Glaswatte erst nach dem Eluieren aus der Kartusche entfernt wird, ist damit ein Analytenverlust bei der Glaswatte-Aufarbeitung ausgeschlossen (Wiederfindung >69,4). Daher wurde silanisierte Glaswatte für die weitere Aufarbeitung der Gemüseproben verwendet.

#### **6.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung**

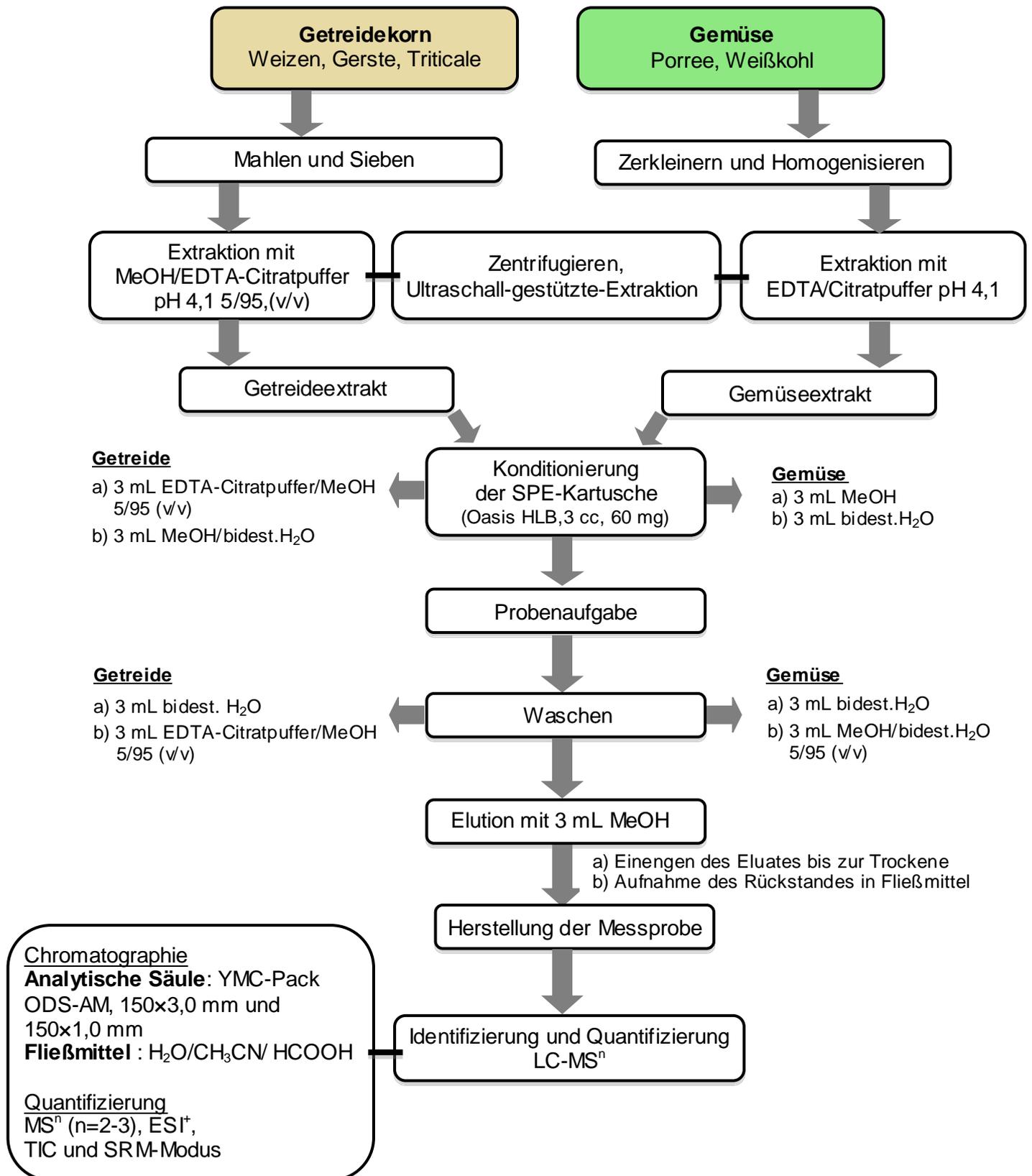
Es wurden erweiterte LC-MS/MS-Verfahren entwickelt, welche für die Bestimmung relevanter Antibiotikawirkstoffe und ihrer Metaboliten in Getreide- und Gemüseproben geeignet sind. Zur chromatographischen Bestimmung erwies sich die YMC-ODS-AM (150 x 3 mm, 3 µm) als analytische Säule in Verbindung mit einem Ameisensäure-Acetonitril-Gradienten (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH, 1 % HCOOH, (v/v)) als optimal. Die zur Kalibrierung eingesetzten Standardlösungen wurden in Fließmittel A (s. Anh. 1.3.1) angesetzt. Um Abbau- und Umwandlungsreaktionen zu minimieren, empfiehlt es sich für die Routineanalytik in jedem Fall, Kalibrierlösungen zu aliquotieren und einzufrieren, um häufiges Auftauen und Einfrieren der Stammlösungen zu vermeiden (s. Anh. 1.4).

Die hier beschriebene Methode zur Optimierung der Probenvorbereitung konzentrierte sich auf die Fest-Flüssig-Extraktion des gemahlene Korn bzw. homogenisierten Gemüses. Der Einsatz der Mikrowellentechnik führte bei 20-40 °C zu einer vergleichsweise niedrigen Wiederfindung. Andererseits wurde bei der Accelerated-Solvent-Extraction (ASE) in den MS-Chromatogrammen eine Intensitätssteigerung der Untergrundsignale beobachtet, was für Tetracycline zu Wiederfindungen von 154-240 % führte. Dieser Effekt wurde bei der Ultraschall-gestützten Extraktion nicht beobachtet. Daher wurde diese Extraktionsmethode in die Probenaufarbeitung übernommen.

Ursprünglich wurde ein rein wässriger EDTA/Citratpuffer als Extraktionsmittel für Gemüseproben verwendet. Ein geringer Zusatz an MeOH (5 % v/v) bewirkte bei Getreide eine Maximierung der Wiederfindungen.

Bei der Festphasenextraktion wurde zur Konditionierung der SPE-Kartusche (Oasis HLB) schließlich MeOH und anschließend bidest.H<sub>2</sub>O oder EDTA/Citratpuffer/MeOH verwendet. Nach der Extrakttaufgabe erfolgte ein erster Waschschrift der beladenen Festphase mit MeOH/Wasser (5/95 v/v) und bidest.H<sub>2</sub>O sowie EDTA/Citratpuffer/MeOH. Die Elution der Analyte erfolgte mit MeOH. Die Eluate der Extrakte wurden vereinigt und unter leichtem Luftstrom bis fast zur Trockne eingengt. Ein Einengen der Eluate im inerten N<sub>2</sub>-Strom war nicht notwendig, da dieses im Vergleich zum Einengen im Luftstrom keinen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindungen (Stabilität) der Analyte zeigte. Die eingengten Eluate wurden anschließend mit Fließmittel A aufgenommen und mittels LC-MS/MS analysiert. Der

schematische Ablauf der Verfahren ist in Abb. 21 dargestellt. Das für Getreide und Gemüse optimierte Analysenverfahren wurde anschließend validiert.



**Abb. 21:** Schematische Darstellung der Analysenverfahren zur Bestimmung von Antibiotika in Pflanzen

## 6.4 Validierung

Nachfolgend ist die Validierung für die Bestimmung ausgewählter Wirkstoffe für Getreide, Weißkohl und Porree mit LC-MS/MS beschrieben.

### 6.4.1 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindungen wurden die BSA-Winterweizen- und Kontrollproben von Porree- und Weißkohlpflanzen aus Hydrokultur mit Mischstandard dotiert (50 µg/kg FG), aufgearbeitet und die erhaltenen Messproben jeweils sechsfach injiziert. In Tab. 19 sind die ermittelten Wiederfindungen aufgelistet.

**Tab. 19:** Wiederfindungen für die Bestimmung von Antibiotika in Winterweizen (BSA), Porree/Blatt- und Weißkohl/Blatt-Kontrollproben aus Hydrokultur (Dotierung 50 µg/kg FG, Matrixkalibrierung, LC-MS-Methode, n=6)

Analyt	Wiederfindung [%]		
	Winterweizen	Porree	Weißkohl
SFD	50,3	49,1	38,3
AMO	61,2	56,5	55,9
ENR	71,2	63,9	65,3
CIP	73,4	68,1	62,4
TC+e-TC	92,1	62,4	60,0
DC+e-DC	61,8	54,5	57,9
OTC+e-OTC	107,0	65,9	64,3
DMC+e-DMC	96,4	67,6	65,2
CTC+e-CTC	91,5	88,0	91,3
iso-CTC+e-iso-CTC	87,6	71,1	61,6
MON	54,9	56,0	49,0

Bei den Tetracyclinen wurde die Summe von Muttersubstanz und Epimer ermittelt. Die Wiederfindungen der Tetracycline für das Winterweizenkorn lagen zwischen 61,8 % und 107,0 % und für Gemüse zwischen 54,5 % und 91,3 %.

Da diese Werte (mit Ausnahme der für DC) alle oberhalb von 60 % liegen (70-110 %), kann man schließen, dass sie nach der EU-Richtlinie 2002/657/EG im akzeptablen Bereich liegen und die Methode somit hinsichtlich der Wiederfindbarkeit geeignet erscheint. Demgegenüber wird SFD in Pflanzenproben nur zu 38,3-50,3 % wiedergefunden. Als Ursache für niedrige Wiederfindungen können Suppressionseffekte durch Matrixbestandteile bei der massenspektrometrischen Bestimmung vermutet werden (s. Kap.6.4.5). Auch MON lieferte niedrigere Wiederfindungswerte (49,0-54,9 %).

### 6.4.2 Präzision

Unter der Präzision wird die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse verstanden. Sie gibt die Streuung einzelner Ergebnisse als Folge von zufälligen Fehlern an. Als Maß für zufällige Fehler gilt die Mess- und Methodenpräzision, wobei sich die

Messpräzision auf zufällige Fehler, die durch das Analysegerät selbst evoziert sind, bezieht, während sich die Methodenpräzision auf zufällige Fehler bei der Durchführung des gesamten Analysenverfahrens bezieht. Die Präzision wird meistens in Form der relativen Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) ausgedrückt.

### **Messpräzision**

Zur Ermittlung der Messpräzision wurden Weizenproben aus BSA und Porree- sowie Weißkohl-Kontrollpflanzen aus der Hydrokultur-Anzuchtreihe mit Standard dotiert, aufgearbeitet und mittels HPLC-MS/MS sechsfach analysiert. Die erhaltenen Mittelwerte der Konzentrationen sowie die relativen Standardabweichungen für die Antibiotika sind in Tab. 20 dargestellt.

**Tab. 20:** Messpräzision für die Bestimmung von Antibiotika in BSA-Winterweizen und Porree/Blatt- sowie Weißkohl/Blatt-Kontrollpflanzen aus Hydrokultur (Dotierung: 50 µg/kg FG, Doppelbestimmung, LC-MS-Methode, n=6)

Analyt	Relative Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) [%]		
	Getreide	Gemüse	
	Winterweizenkorn	Porree	Weißkohl
SFD	4,8	5,2	4,9
AMO	3,8	5,1	4,1
ENR	2,1	1,3	2,9
CIP	1,8	1,1	1,3
TC+ e-TC	1,1	1,8	1,0
DC+ e-DC	4,5	1,3	4,5
OTC + e-OTC	6,7	6,0	4,9
DMC + e-DMC	3,3	2,1	4,4
CTC + e-CTC	1,0	1,9	3,4
iso-CTC + e-iso-CTC	9,1	7,4	9,8
MON	5,1	4,9	3,6

\*Indirekte Bestimmung der Tautomere (Schätzwert), instabiles Gleichgewicht

\*\*e-iso-CTC kein kommerzieller Standard: instabiles Gleichgewicht der Epimere

Die relativen Standardabweichungen belegen mit Werten für Weizen zwischen 1,0 % und 9,1 % und für Gemüse zwischen 1,0 % und 9,8 % die hohe Präzision des LC-MS/MS-Verfahrens. Die ermittelten Messpräzisionen liegen damit unter der in der EU-Richtlinie 2002/657/EG akzeptierten Grenze von 20 %.

### **Methodenpräzision**

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden BSA-Winterweizen und Blindproben von Porree- und Weißkohlpflanzen (Kontrolle) mit Mischstandard dotiert (50 µg/kg), aufgearbeitet und die erhaltenen Messproben jeweils sechsfach injiziert. Die Aufarbeitung der Getreideproben erfolgte nach zwei Varianten. Die Aufarbeitung (Citrat-Puffer-Extraktion,

SPE) und Analyse einer gemahlene 1-g-Einwaage erfolgte sowohl einzeln als auch mit zwei parallel aufgearbeiteten Proben, deren SPE-Extrakte vereinigt wurden. In Tab. 21 sind die relativen Standardabweichungen aufgelistet.

**Tab. 21:** Methodenpräzision bei unterschiedlichen Aufarbeitungsvarianten von Getreide und Gemüse (Dotierung: 50 µg/kg FG, BSA-Winterweizen und Porree/Blatt- sowie Weißkohl/Blatt-Kontrollpflanzen aus Hydrokultur, Doppelbestimmung, LC-MS-Methode, n=6)

Analyt	Relative Standardabweichung [%]			
	Getreide		Gemüse	
	Winterweizenkorn		Weißkohl	Porree
	1 Einwaage (1 SPE- Eluat)	2 Einwaagen (kombinierte SPE- Eluate)		
SFD	11,4	11,9	10,6	12,3
AMO	5,9	6,1	6,2	4,1
ENR	7,5	7,4	8,3	7,1
CIP	6,9	6,3	11,4	9,4
TC + e-TC	8,2	2,3	4,4	4,9
DC + e-DC	7,5	7,5	4,6	4,8
OTC + e-OTC	6,7	3,5	9,3	7,4
DMC + e-DMC	8,4	2,7	6,4	2,9
CTC + e-CTC	7,3	5,6	4,7	7,5
iso-CTC + e-iso-CTC	9,6	4,2	5,3	5,4
MON	3,8	3,5	1,2	3,0

Die in Tab. 21 aufgeführten relativen Standardabweichungen zeigen, dass die parallele Aufarbeitung zu einer deutlich besseren Präzision führt. Daher wurde diese Methode auch zur Analyse der Getreideproben eingesetzt.

Die Methodenpräzisionen sind mit Werten zwischen 1,2 % und 12,3 % nur geringfügig größer als die Messpräzisionen. Damit liegen die Werte unterhalb der Angaben in Literaturverfahren, bei denen Methodenpräzisionen bis zu 40 % beschrieben werden [246, 247]. Tetracycline können *in vitro* Umwandlungs- bzw. Epimerisierungsprodukte bilden, wobei die Epimerisierungsgrade in Abhängigkeit von der Temperatur und der Dauer der Probenvorbereitung zwischen 10 % und 20 % differieren kann [60].

Dies könnte bei der Aufarbeitung der Proben an unterschiedlichen Tagen beispielsweise zu deutlich schlechteren Methodenpräzisionen führen. Deshalb beziehen sich einerseits der Analyten-Gehalt sowie andererseits auch die Methodenpräzision auf die der jeweiligen Epimerenpaare.

### 6.4.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Nach Kromidas und Funk ist die Nachweisgrenze die kleinste qualitativ noch nachweisbare Konzentration ohne Forderung einer bestimmten Präzision [248]. Die Bestimmungsgrenze wiederum ist nach Funk definiert als kleinste Konzentration einer Substanz, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann [249].

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 wurden mit Antibiotika dotierte BSA-Winterweizen sowie Kontrollproben von Porree- und Weißkohlpflanzen aus Hydrokultur jeweils sechsfach analysiert und mit Matrixkalibrierung quantifiziert. Die Dotierungen lagen im Bereich von 1 bis 80 µg/kg FG. Die Auswertung der Messergebnisse wurde unter Zuhilfenahme des Softwareprogramms "Valoo" [250] durchgeführt. In Tab. 22 sind die ermittelten Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) aufgelistet.

**Tab. 22:** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Analyten in verschiedenen Matrices (Dotierter BSA-Winterweizen und Porree/Blatt- sowie Weißkohl/Blatt-Kontrollpflanzen aus Hydrokultur, Einfachbestimmung, LC-MS-Methode, n = 6)

Analyt	NWG			BG		
	[µg/kg FG]					
	Winterweizen	Porree	Weißkohl	Winterweizen	Porree	Weißkohl
SFD	8,0	8,3	7,1	40,8	41,0	32,5
AMO	6,9	7,9	6,6	24,5	25,5	24,3
ENR	6,3	6,1	3,9	20,8	23,4	12,7
CIP	6,3	7,4	7,2	21,4	27,8	25,0
TC	3,5	4,8	3,6	14,1	16,8	11,2
e-TC	4,1	6,6	5,7	17,4	28,1	21,9
DC	3,3	6,3	6,1	12,4	25,9	24,6
e-DC	4,2	4,7	5,8	18,6	16,7	22,8
OTC	5,3	4,4	3,5	19,0	14,8	8,1
e-OTC	3,9	5,5	3,8	11,7	20,8	9,6
DMC	2,9	4,5	4,0	10,5	15,6	13,4
e-DMC	2,8	5,0	5,1	10,0	17,9	18,6
CTC	2,7	4,5	4,2	9,5	15,6	13,4
*e-keto-CTC	7,3	7,9	7,5	54,3	30,5	35,9
*e-enol-CTC	4,4	5,4	7,3	21,2	20,2	34,6
iso-CTC	2,4	5,8	7,4	8,3	22,9	34,7
**e-iso-CTC	6,6	7,1	8,7	42,2	32,3	47,8
MON	7,5	9,6	6,8	29,9	32,1	30,0

\*Indirekte Bestimmung der Tautomere (Schätzwert), instabiles Gleichgewicht

\*\*e-iso-CTC kein kommerzieller Standard: instabiles Gleichgewicht der Epimere

Auffällig ist, dass die ermittelten Bestimmungsgrenzen für die Epimerprodukte (e-keto-CTC, e-enol-CTC, e-iso-CTC) höher sind als die für die anderen Analyten, welches am instabilen Gleichgewicht der Epimere liegen kann.

#### 6.4.4 Selektivität

Die Selektivität als Validierungsparameter wird bestimmt, um Aussagen darüber treffen zu können, ob eine Analysenmethode fähig ist, bestimmte Analyten aus einer komplexen Matrix ohne Interferenzen zu identifizieren [251]. Laut der EU-Richtlinie 657 ist die Selektivität durch einen Vergleich der Retentionszeiten und durch Übereinstimmung der Spektren der Analyt-Peaks in Standardlösungen mit denen in der Probe zu ermitteln [252]. Dafür wurden die Messergebnisse der Validierproben mit denen eines entsprechenden Standards der Weizen, Porree- und Weißkohlproben unter den gleichen Versuchsbedingungen ermittelt und verglichen. Dabei darf eine Retentionszeittoleranz von 5 % und Höchsttoleranz für die relativen Ionenintensitäten  $\pm 50$  % nicht überschreiten. Weiterhin gilt für alle massenspektrometrische Verfahren, bei denen Fragmente nicht im Full-Scan-Modus gemessen werden, zur Identifizierung ein Punktesystem, wobei zur sicheren Charakterisierung zu bestimmten Analyten mindestens drei Identifizierungspunkte (ein Precursor-Ion und zwei Produkt-Ionen) benötigt werden [268].

##### **Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeit**

Die erste Selektivitätsprüfung des LC-MS/MS-Verfahrens erfolgte durch einen Vergleich der Retentionszeiten von Analyten aus einer Pflanzenprobe mit denen einer Mischstandardlösung. Hierzu wurden sowohl eine Winterweizenproben (BSA-Proben) als auch Kontrollpflanzen aus Hydrokultur aufgearbeitet und vergleichend mit einer Mischstandardlösung der Wirkstoffe vermessen.

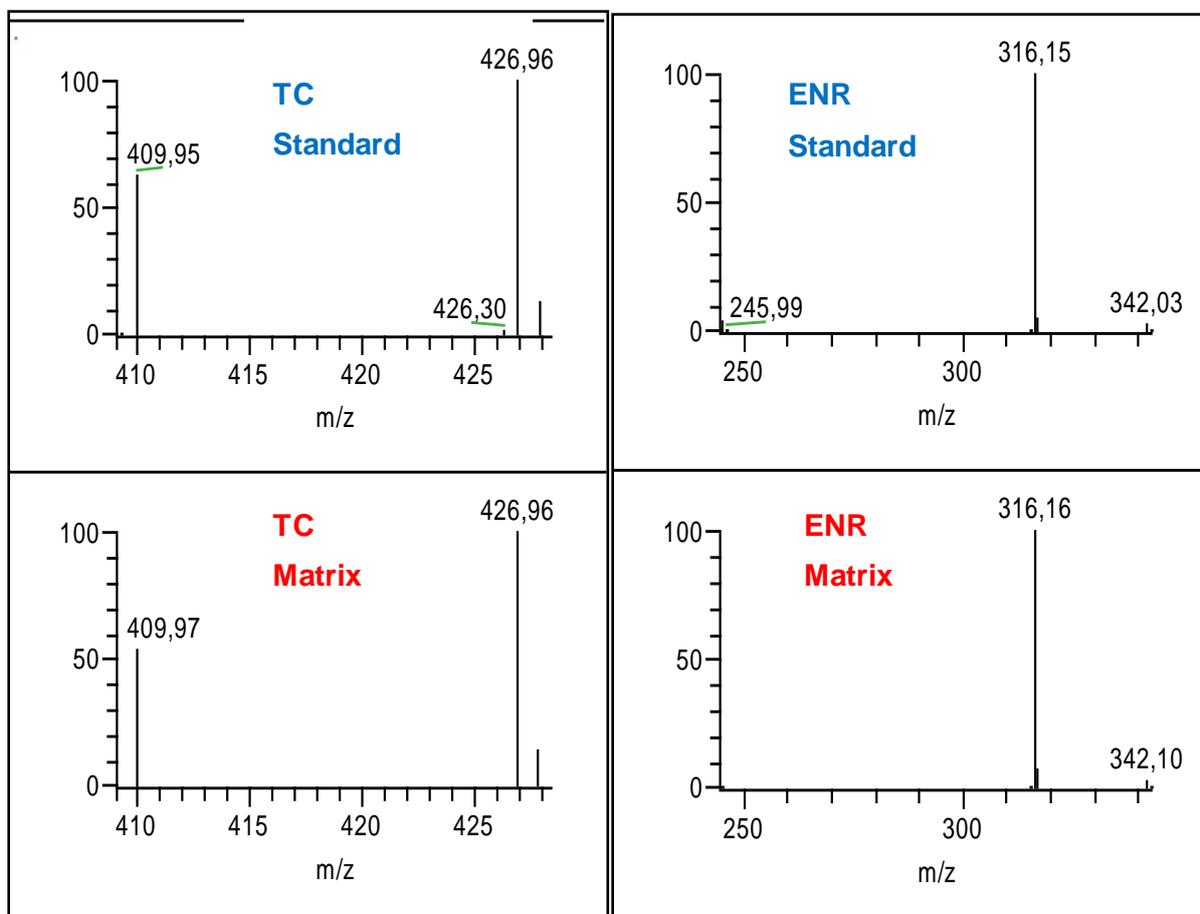
**Tab. 23:** Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten (Dotierung: 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG, Mischstandard  $\beta=1\text{mg}/\text{L}$ , BSA-Winterweizen und Porree/Blatt- sowie Weißkohl/Blatt-Kontrollproben aus Hydrokultur, Doppelbestimmung, LC-MS,  $n=3$ )

Analyt	Retentionszeit-Standard [min]	Retentionszeit-Matrix [min]		
		Winterweizen	Porree	Weißkohl
SFD	5,87	5,85	5,91	5,92
AMO	3,21	3,18	3,24	3,22
ENR	9,28	9,25	9,26	9,16
CIP	8,09	8,06	8,09	7,98
TC	7,29	7,27	8,61	7,20
e-TC	8,74	8,72	7,60	8,63
DC	14,43	14,42	14,46	14,53
e-DC	13,71	13,69	13,74	13,81
OTC	7,50	7,48	7,51	7,53
e-OTC	7,14	7,12	7,16	7,05
DMC	10,59	10,57	10,56	10,57
e-DMC	9,14	9,12	9,01	9,02
CTC	13,00	12,98	13,01	13,00
e-keto-CTC	9,00	8,98	8,87	8,89
e-enol-CTC	11,05	10,92	11,01	10,91
iso-CTC	10,33	10,19	10,18	10,20
e-iso-CTC	8,52	8,49	8,39	8,41
MON	23,02	22,28	22,92	22,92

Die Tab. 23 zeigt, dass die Retentionszeiten von den Analyten in der Pflanzenprobe nahezu mit denen im Standard übereinstimmen (maximale Differenz 3,8 % bei MON) und damit das Richtigkeitskriterium aufgrund der Retentionszeiten mit einer maximalen Toleranz von 5 % erfüllt ist.

### **Selektivitätstest durch Vergleich der MS-Spektren**

Als weiteres Kriterium für die Selektivität eines Verfahrens gilt die Übereinstimmung der Spektren der Analyt-Peaks in Standardlösungen mit denen der Spektren aus der Probe. Dazu wurden die MS-Spektren von ENR und TC aus der Standardlösung mit denen der Analyten aus den Getreide- und Gemüseproben verglichen (Abb. 22).



**Abb. 22:** Selektivitätstest durch Vergleich der MS-Spektren: Produkt-Ionen-Scan des Vorläuferions von TC ( $m/z$  445,0) und von ENR ( $m/z$  360,1) in Standardlösung ( $\beta = 1$  mg/L) und in dotierter BSA-Winterweizen (Dotierung: 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG, LC/MS-Methode, SRM-Modus)

Die durchgeführten Vergleiche der Spektren der Analyten zeigen für die massenspektrometrische Detektion eine gute Übereinstimmung zwischen Standardlösung und Probe und geben damit deutliche Hinweise auf die Selektivität des Verfahrens. Unter Zugrundelegung der gültigen zulässigen Höchsttoleranz von 50 % sind auch die

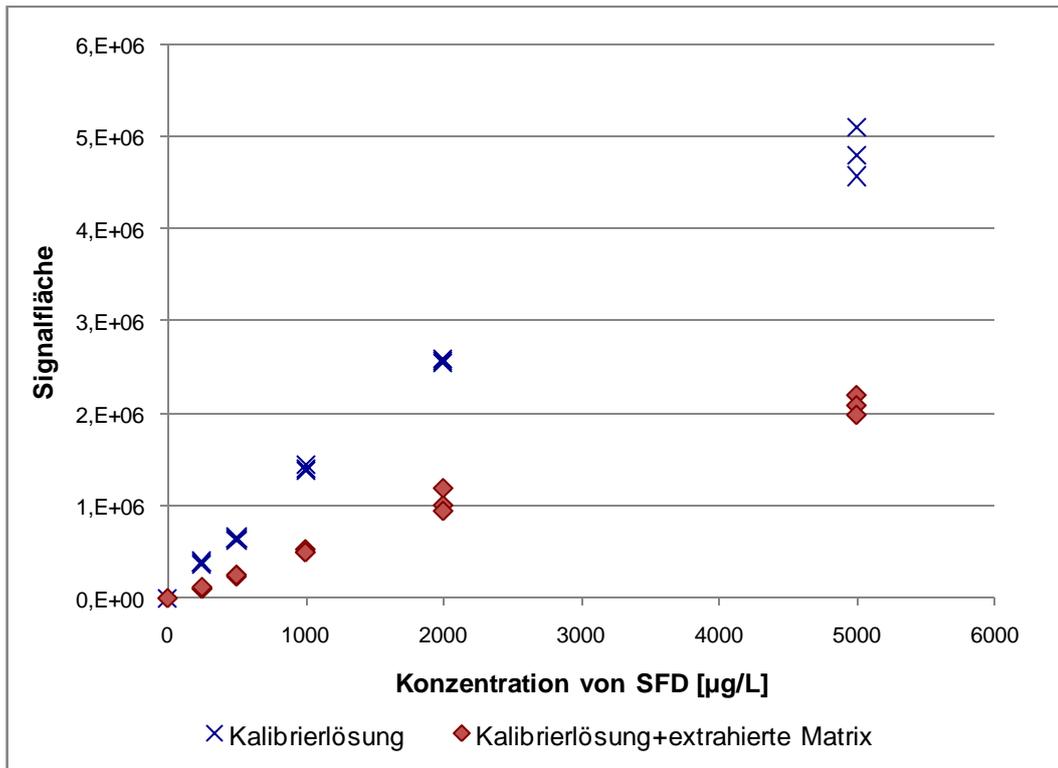
Fragmentmuster der Analyte in der Standardlösung und in den Winterweizenproben als identisch zu betrachten.

Zusammenfassend kann mit den erhaltenen Ergebnissen die Selektivität des HPLC-MS/MS-Verfahrens für die Bestimmung von Antibiotika in Getreide und Gemüse als gesichert angesehen werden.

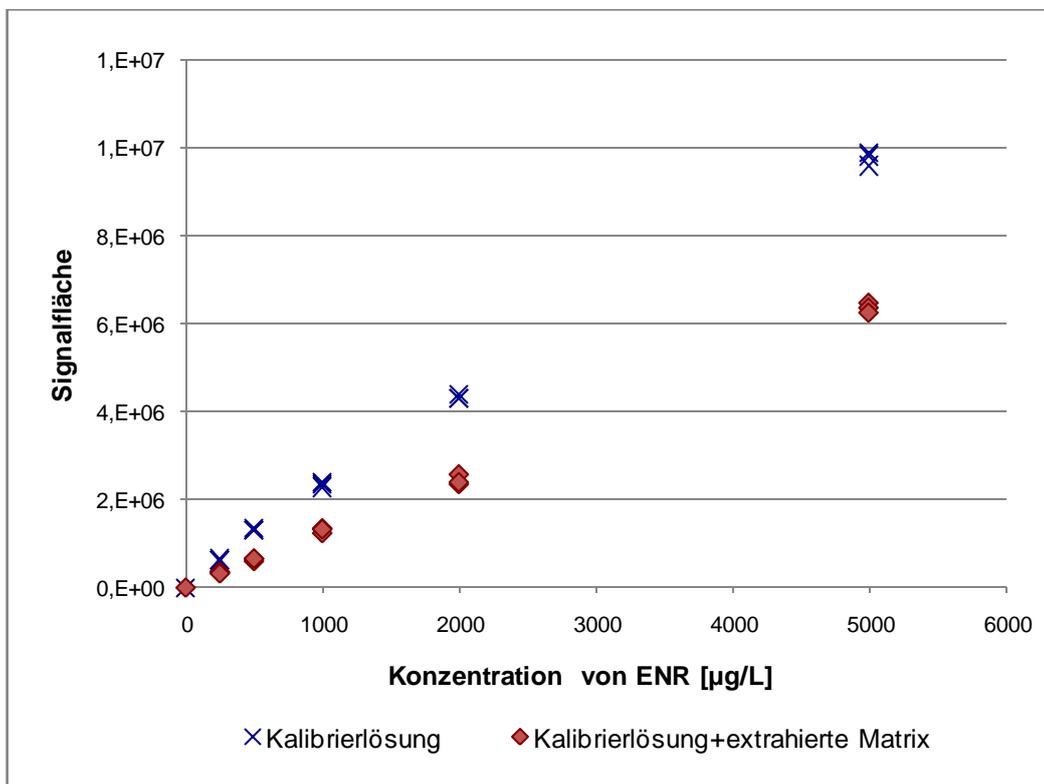
#### **6.4.5 Matrixeffekte**

Matrixeffekte resultieren aus der Veränderung der Ionisationseffizienz der Analytmoleküle durch die Anwesenheit koeluiender Substanzen. Koeluierte Matrixbestandteile insbesondere aus Umweltproben können bei der Quantifizierung der Analyte mittels LC-ESI-MS durch eine Beeinflussung der Ionisierung in der ESI-Quelle Fehler verursachen, wobei Matrixbestandteile zu einer Unterdrückung- (Signalsuppression) oder einer Erhöhung der Signalfächen führen können [60, 253, 254, 255]. Stevens beobachtete eine Signalsuppression für SFD durch eine Bodenmatrix [165]. Ebenfalls weist Vockel eine Signalsuppression für CTC durch Muskulaturproben hin [60]. Schwake-Anduschuss ermittelte auch eine Signalsuppression für SFD sowie für iso-CTC bei Konzentrationen oberhalb 5 mg/L durch eine Pflanzenmatrix [186]. Da diese Einflüsse bei einer externen Kalibrierung nicht festgestellt werden können, wurde der Einfluss der koeluierten Pflanzenmatrix auf das entwickelte LC-MS/MS-Verfahren überprüft. Hierzu wurden unbelastete BSA-Winterweizenproben mit Standard dotiert, aufgearbeitet und entsprechende Kalibrierfunktionen verglichen. Der Einfluss der Matrixbestandteile auf die Bestimmung von SFD, ENR und TC sowie die Summe von TC (e-TC+TC) wurde durch Vergleich der Signalfächen der Kalibrierlösungen mit und ohne der Pflanzenmatrix (Winterweizen) ermittelt und die entsprechenden Kalibrierfunktionen verglichen (Abb. 23, Abb. 24).

a)

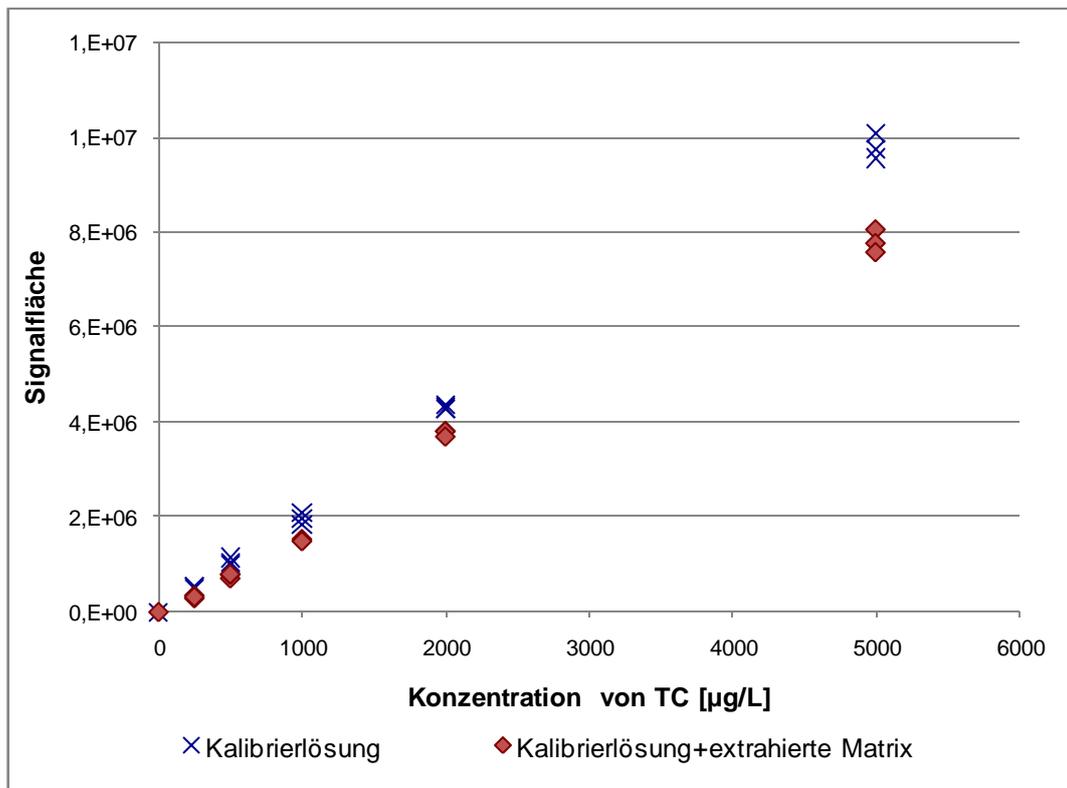


b)

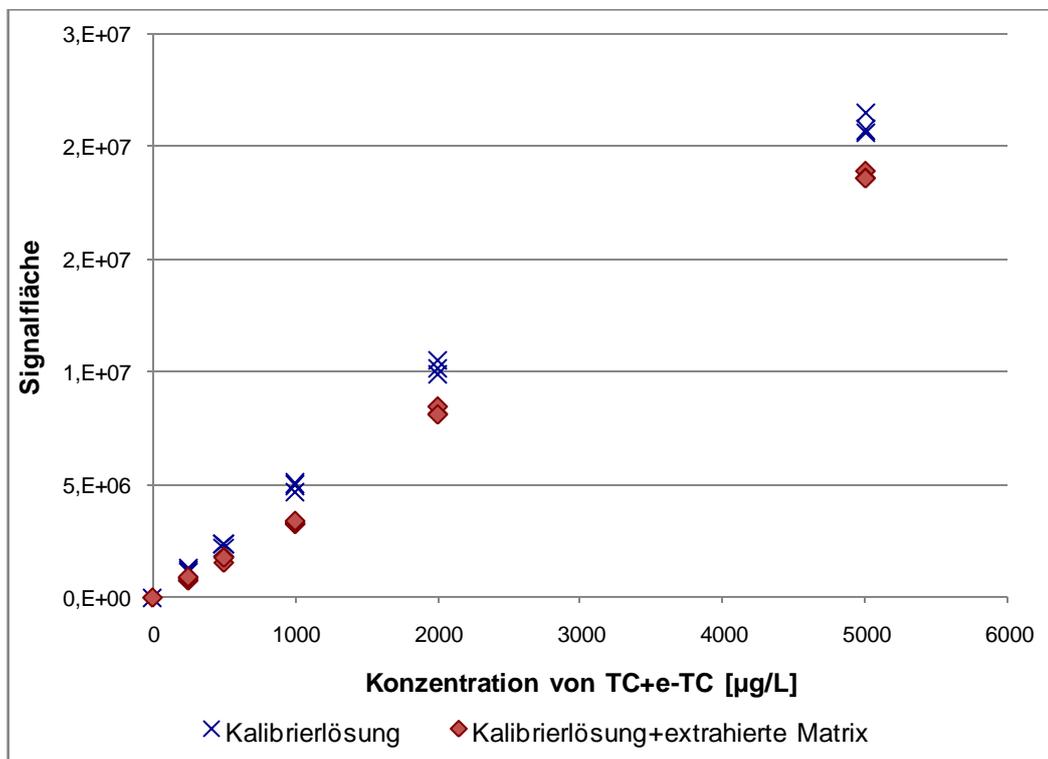


**Abb. 23:** Vergleich der Signalflächen der Analytpeaks (BSA-Winterweizen, Doppelbestimmung, n=3, LC-MS- Methode, SRM-Modus)  
a) Matrixeinflüsse auf die Bestimmung von SFD  
b) Matrixeinflüsse auf die Bestimmung von ENR

c)



d)



**Abb. 24:** Vergleich der Signalfächen der Analytpeaks  
(BSA-Winterweizen, Doppelbestimmung,  $n=3$ , LC-MS-Methode, SRM-Modus)  
c) Matrixeinfüsse auf die Bestimmung von TC  
d) Matrixeinfüsse auf die Summenbestimmung von TC (e-TC+TC)

Abb. 23a) zeigt, dass für SFD eine deutliche Suppression des Signals durch Matrixbestandteile über den gesamten Kalibrationsbereich festzustellen ist. Folglich liefern die durch externe Kalibrierung ermittelten Messwerte der Pflanzenproben einen kalibrierungsbedingten Minderfund.

Ein Einfluss der Matrix auf die Bestimmung von TC ist erst bei der höchsten Konzentration erkennbar (Abb. 24c). Dieses ist jedoch vernachlässigbar, da dieser Kalibrationswert nicht mehr im Konzentrationsbereich liegt, der für die Pflanzenproben relevant ist. Es gilt auch für den Einfluss der Matrix auf die Summenbestimmung von TC (TC+e-TC) (Abb. 24d). Daher ist die externe Kalibrierung für die Bestimmung von TC als Summengehalt von TC und e-TC eine akzeptable Methode.

Wie bei TC ist auch ein Einfluss der Matrix auf die Bestimmung von ENR bei der höchsten Konzentration erkennbar (Abb. 24b). Matrixeinflüsse auf die Bestimmung der Fluorchinolone werden auch in der Literatur beschrieben. Beispielweise zeigen Fluorchinolone eine deutliche Ion-Suppression durch eine Wassermatrix [256].

#### **6.4.6 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse**

Für die Getreide- und Gemüseproben wurden als Validierungsparameter die Wiederfindung, die Präzision sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Zusätzlich wurden Selektivität und auch Matrixeffekte überprüft. Als Probenmaterial für diese Validierungsuntersuchungen dienten die Kontroll- bzw. Blindproben. Dafür stellte das Bundessortenamt Hannover (BSA) die Getreideproben, die auf Flächen verschiedener Prüfstellen erwachsen, die mindestens 10 Jahre nicht mit Gülle gedüngt wurden, bereit. Ebenfalls wurden für die Validierung Kontrollproben von Porree- und Weißkohlpflanzen aus eigenen Hydrokultur-Anzuchtreihen verwendet.

Zur Beurteilung der Richtigkeit der Analysenergebnisse wurden die Wiederfindungen ermittelt. Diese liegen für Tetracycline mit 54,5 %-107,0 % größtenteils (außer für DC) in dem in der EU-Richtlinie 2002/657/EG angegebenen akzeptierten Bereich von 70 % bis 110 %. Demgegenüber wird SFD in Pflanzenproben nur zu 38,3-50,3 % wiedergefunden. Die Ursache niedriger Wiederfindungen für SFD kann an Bildung nicht extrahierbare Anteile nach der Dotierung der homogenisierten Pflanzenprobe und an Suppressionseffekten liegen.

Die Überprüfung der Präzision erfolgte durch Ermittlung der Mess- und Methodenpräzision mit der MS/MS-Detektion. Dabei wurden für die Messpräzision Werte zwischen 1,0-9,8 % ermittelt. Für die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen ergaben sich Höchstwerte von 11,9 % für SFD und Minimalwerte von 2,3 % für TC, welche damit größer sind als die Messpräzisionen. Somit zeichnet sich das angewendete Analysenverfahren im Vergleich mit den in der Literatur gemachten Angaben für die Methodenpräzision in den unterschiedlichen Matrices durch eine hohe Präzision aus (<20 %) [257].

Die mit der MS/MS-Detektion ermittelten Nachweisgrenzen für die Getreideproben betragen 2,4-8,0 µg/kg und die Bestimmungsgrenzen 8,3-54,3 µg/kg. Für die Gemüseproben wurden die Nachweisgrenzen im Bereich von 8,1-47,8 µg/kg und die Bestimmungsgrenzen von 8,1-41,0 µg/kg ermittelt. Boxall berechnete eine Nachweisgrenze für OTC in Möhren von 23 µg/kg [213]. Somit lagen die Nachweisgrenzen für OTC bei 3,5 µg/kg in Weißkohlproben und 4,4 µg/kg in Porreeproben deutlich niedriger im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten.

Der Selektivitätsnachweis des HPLC-MS/MS-Verfahrens erfolgte nach den in der EU-Richtlinie 2002/657/EG geforderten Kriterien durch einen Vergleich der Retentionszeiten, der MS-Spektren sowie der Produkt-Ionen-Intensitäten der Analyten in einer Standardlösung und in einer Pflanzenprobe. Die dargestellten Chromatogramme für die MS/MS-Detektion zeigen, dass die Retentionszeiten von den Analyten in der Pflanzenprobe fast exakt mit denen im Standard übereinstimmen und damit das Richtigkeitskriterium aufgrund der Retentionszeiten mit einer maximalen Toleranz von 5 % erfüllt ist. Andererseits zeigen die durchgeführten Vergleiche der Spektren der Analyten für die massenspektrometrische Detektion eine gute Übereinstimmung zwischen Standardlösung und Probe und belegen damit die Selektivität des Verfahrens.

Um den Einfluss der Matrixbestandteile auf die Bestimmung von Antibiotika zu ermitteln, wurde ein Vergleich der Signalfächen der Kalibrierlösungen mit und ohne Pflanzenmatrix angestellt. Für SFD ist eine deutliche Suppression des Signals durch Matrixbestandteile über den gesamten Kalibrationsbereich festzustellen. Für TC, ENR scheint es eine nur geringfügige Suppression des Messsignals durch Matrixbestandteile zu geben. Somit ist die externe Kalibrierung für die Bestimmung von TC und ENR in Pflanzen geeignet. Für die Bestimmung von SFD wäre die Verwendung eines internen Standards oder die Bestimmung mittels Standardaddition angebracht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gehalte an ausgewählten Antibiotika in den Pflanzenproben zur Absicherung mittels Matrixkalibrierung bestimmt.

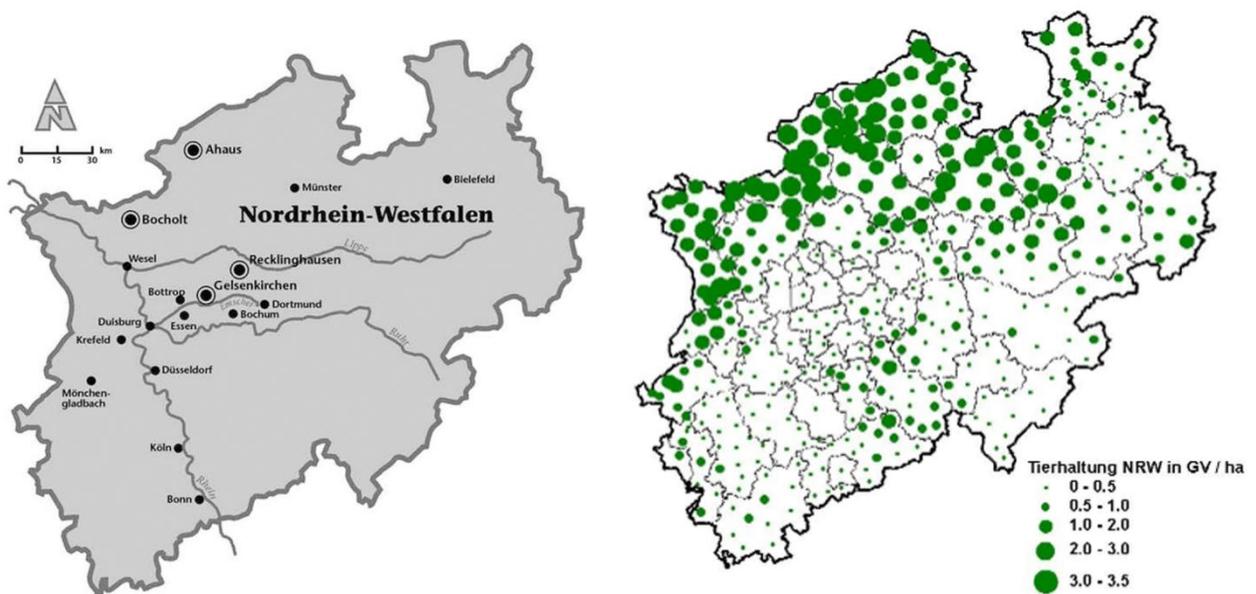
Die hier vorgestellten LC-MS/MS-Verfahren sind gleichermaßen auf die Analyse von Getreide und Gemüse (Weißkohl, Porree) anwendbar. Diese Analysenverfahren wurden nachfolgend auf Pflanzenproben der durchgeführten Screening- und Hydrokulturstudien sowie bei der Analyse der handelsüblichen Weizenproben angewendet.

## 7 UNTERSUCHUNG ZUM ANTIOTIKATRANSFER AUS DEM BODEN IN GETREIDE

Im Rahmen der Untersuchung zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Getreide wurde eine Screening Studie durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Untersuchung von handelsüblichen Weizenproben aus Niedersachsen.

### 7.1 Screening-Studie

In NRW ist die landwirtschaftliche Tierproduktion ein bedeutender Wirtschaftsfaktor. Derzeit werden in NRW etwa 2,6 Millionen Großvieheinheiten (GVE) gehalten, das entspricht etwa 19 Millionen Tieren, vorrangig Rinder, Schweine und Geflügel [258] (Abb. 25).



**Abb. 25:** NRW-Karte [259] mit viehstarken Gebieten in NRW [258]

Die in der Karte mit großen Punkten ausgewiesenen Regionen weisen in Nordrhein-Westfalen die höchste Schweinedichte auf, sodass von einer intensiven Gülleausbringung der landwirtschaftlich genutzten Flächen auszugehen ist. Deshalb wurden mit Unterstützung der Landwirtschaftskammern Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen in den Jahren 2005 und 2006 in den Kreisen Borken, Coesfeld und Warendorf (nur 2005) sowie der Grafschaft Bentheim (nur 2006) aus der laufenden Ernte Getreideproben gezogen. Die Betriebe wurden so ausgewählt, dass eine größtmögliche Variation der Anbaubedingungen gewährleistet war, um Einflüsse der Bodenqualität und der Bodenbearbeitung auf den möglichen Antibiotikatransfer erkennen zu können. Im Anhang 2 sind die von den jeweiligen Betrieben angegebenen Informationen zu den Produktionsbedingungen, zu Viehbestand, Medikation und Gülleausbringung aufgeführt.

Zusätzlich stand eine geringe Zahl von Getreideproben aus der jährlichen "Besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung" (BEE) des Bundes und der Länder zur Verfügung, die nach Agrarstatistikgesetz gezogen und von der BfEL Detmold zugeleitet wurden.

Das Bundessortenamt Hannover (BSA) stellte ebenfalls Getreideproben bereit, u.a. Winterweichweizen, Winter- und Sommergerste sowie Winterroggen. Diese Proben sind auf Flächen verschiedener Prüfstellen gewachsen, die mindestens 10 Jahre nicht mit Gülle gedüngt wurden.

Erntereifes Getreide wurde auf die Gehalte an Antibiotika entsprechend der angegebenen Medikationen sowie auf die Gehalte weiterer veterinärmedizinisch relevanter, verordnungstarker Wirkstoffe und, sofern bekannt, ihre Umwandlungsprodukte bzw. (pflanzliche) Metabolite analysiert.

### 7.1.1 Probennahme

#### ***Erntezeit 2005***

Die erste Beprobung des Getreides wurde vom Fachbereich Agrarwirtschaft der FH Südwestfalen/Soest im Münsterland in den Landkreisen Borken, Coesfeld und Warendorf durchgeführt (s. Tab. 24).

**Tab. 24:** Erntezeit 2005 - Probennahmegebiete und Probenbezeichnung

	Getreideart	Probennahmegebiete		
		Kreis Coesfeld	Kreis Borken	Kreis Warendorf
<b>Probenbezeichnung</b>	Weizen	K-S-1, K-S-2 K-S-3, K-S-4 K-S-5	K-H-1, K-H-2 K-H-3, K-H-4 K-H-5, K-H-6	K-B-1, K-M-1 K-M-2

#### ***Erntezeit 2006***

In den folgenden Bereichen Nordrhein-Westfalens und Niedersachsens wurden Getreideproben genommen:

Kreis Borken (Winterweizen, Gerste, Triticale)

Heek, Ahaus, Schöppingen, Velen, Reken

Kreis Coesfeld (Winterweizen):

Coesfeld, Senden, Havixbeck, Dülmen

Kreis Grafschaft Bentheim (Winterweizen, Gerste)

Nordhorn, Neuenhaus, Gölenkamp, Uelsen, Halle

Die Bezeichnungen der entnommenen Proben sind in Tab. 25 aufgeführt.

**Tab. 25:** Erntezeit 2006 - Probenahmegebiete und Probenbezeichnung

	Getreideart	Probennahmegebiete		
		Kreis Borken	Kreis Coesfeld	Kreis Grafschaft Bentheim
Probenbezeichnung	Weizen	B2 W, B3 W B4 W, B5 W B6 W	Coe1 W, Coe2 W Coe3 W, Coe4 W Coe5 W, Coe6 W Coe7 W, Coe8 W Coe9 W, Coe10 W	NS1 W, NS2 W NS3 W, NS4 W NS5 W, NS6 W NS7 W, NS8 W
	Gerste	B1 G, B2 G B3 G, B4 G B6 G	-	-
	Triticale	B1 T, B5 T	-	-

Von erntereifem Getreide wurden an ebenfalls vier unterschiedlichen Stellen des Ackerschlags ganze Ähren vom Halm getrennt, in beschriftete Gefrierbeutel verpackt und in einem Kühlbehälter zum Fachbereich Agrarwirtschaft der FH Südwestfalen in Soest transportiert. Im Labor wurden die Körner mechanisch aus den Ähren gelöst und alle Körner eines Schlags in einem Beutel vereinigt. Dieser wurde bis zur Analyse tiefgekühlt gelagert.

Im Erntejahr 2006 war aufgrund der extrem hohen Juni Temperaturen in einigen Betrieben eine vorzeitige Ernte notwendig geworden. In diesem Fall wurde während des Dreschprozesses vom Betriebsleiter aus dem Korntank eine Getreideprobe gewonnen und sofort eingefroren. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand für die Durchführung der Analysen zur Universität Paderborn transportiert.

### 7.1.2 Ergebnisse der Screening-Studie

#### ***Ernte 2005***

Die Befunde zu dem in der Erntezeit 2005 beprobten erntereifen Winterweizen sind in Tab. 26 aufgeführt.

**Tab. 26:** Ernte 2005 - Ergebnisse der Getreideanalysen (Winterweizen)

- negativer Befund      + positiver Befund (> BG) mit LC/MS<sup>2</sup> niedrig auflösend    ‡ Bestätigung durch hochauflösende MS  
 (+) und (+‡) positiver Befund (< BG)

Probe	TC	e-TC	DC	e-DC	OTC	e-OTC	DMC	e-DMC	CTC	e-keto-CTC	e-enol-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC
<b>Coesfeld</b>													
K-S-1	(+‡)	(+‡)	-	-	-	-	+‡	(+‡)	+	(+)	(+)	+	+
K-S-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-S-3	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
K-S-4	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
K-S-5	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
<b>Borken</b>													
K-H-1	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
K-H-2	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+
K-H-3	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+
K-H-4	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+
K-H-5	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+‡)	+	+‡
K-H-6	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+
<b>Warendorf</b>													
K-B-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-M-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)

Insgesamt wurden in 9 von 14 verschiedenen Weizenproben Tetracycline nachgewiesen. Insbesondere waren alle Weizenproben aus dem Kreis Borken mit Antibiotikarückständen belastet. Zur Absicherung der positiven Befunde wurden einige ausgewählte Weizenproben mit hochauflösender MS gemessen (s. Kap.7.1.2).

Ebenfalls wurden Bodenproben aus dem Pflugbereich analysiert. Zur Extraktion der Arzneistoffe aus den Bodenproben wurde ein im Vorprojekt entwickelter ammoniakalischer EDTA-Puffer eingesetzt [9]. CTC ist besonders alkaliempfindlich und isomerisiert schon ab pH 7 zum iso-CTC. Im Boden vorhandenes CTC ist daher infolge der Extraktionsbedingungen bei der Analyse mittels LC-MS/MS nur als iso-CTC nachweisbar. So konnte beispielsweise iso-CTC in der K-S-1-Bodenprobe aus dem Kreis Coesfeld gefunden werden [9, 222]. Von den aus der Erntezeit 2005 entnommenen Boden- und Winterweizenproben wurden die Antibiotika-Gehalte mittels LC-MS/MS ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 27 zusammengefaßt.

**Tab. 27:** Gehalte an Tetracyclinen in Boden und Korn aus der Ernte 2005

- : kleiner Nachweisgrenze (<NWG), k.A.: keine Angaben

Kreis	Probe	a)Einsatz von TC und CTC	Boden [ $\mu\text{g}/\text{kg TM}$ ]		Korn [ $\mu\text{g}/\text{kg FG}$ ]		
			TC	b) $\Sigma\text{CTC}$	TC	CTC	c)iso- CTC
Coesfeld	K-S-1	CTC	-	51,2	<BG	58,3 (+DMC 68,4)	53,4
	K-S-2	k.A.	-	-	-	-	-
	K-S-3	TC	30,2	23,1	-	-	-
	K-S-4	TC	10,3	-	-	-	-
	K-S-5	TC	120,4	22,6	-	-	-
Borken	K-H-1	TC	26,3	31,2	-	-	<BG
	K-H-2	k.A.	-	-	-	-	71,5
	K-H-3	k.A.	-	-	-	-	95,9
	K-H-4	TC	-	-	-	-	29,5
	K-H-5	k.A.	-	-	-	-	42,3
	K-H-6	CTC	-	-	-	-	37,7
Warendorf	K-B-1	CTC	17,7	13,9	-	-	-
	K-M-1	CTC	-	33,7	-	-	-
	K-M-2	CTC	10,5	<BG	-	-	<BG

a) Angaben der Betriebsleiter

b)  $\Sigma\text{CTC}$ : Summenparameter, bestimmt aus iso-CTC- und epi-iso-CTC-Gehalte (entsteht während der ammoniakalischen Extraktion des Bodens aus CTC)

c) Summe iso-CTC und epi-iso-CTC

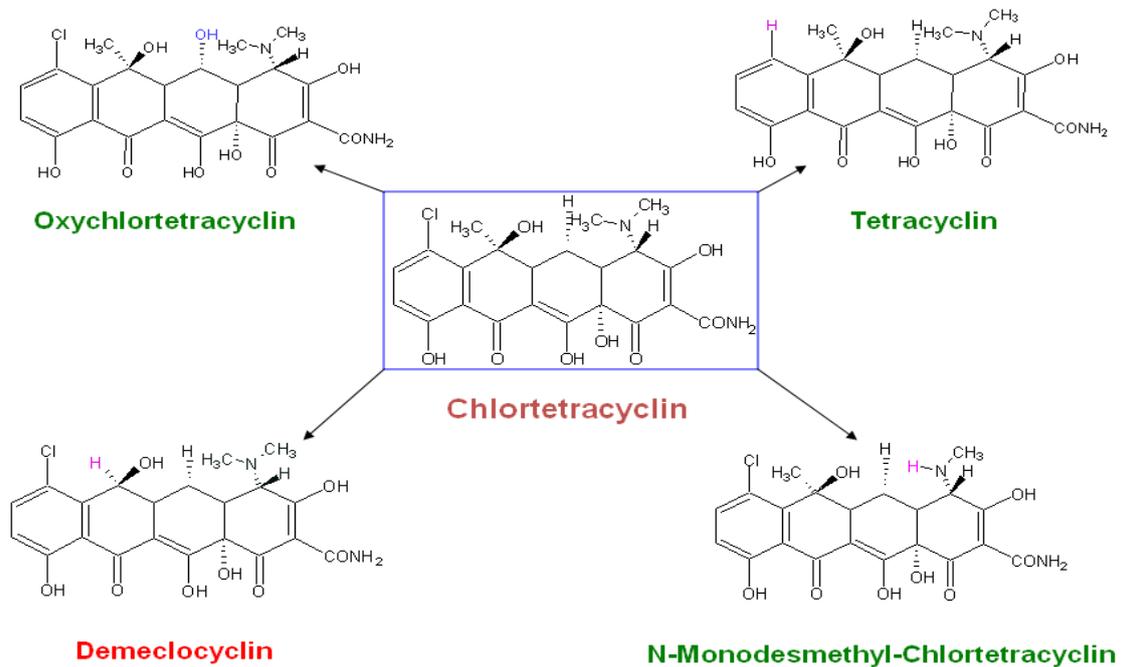
Die extrahierbaren Gehalte an CTC und TC liegen maximal im Bereich von 120 µg/kg TM (Probe K-S-5). Dagegen enthielt eine Bodenprobe aus dem Kreis Coesfeld (K-S-2), auf dem nach Angaben des Betriebsleiters keine Tetracycline eingesetzt worden waren, enthielt keine nachweisbaren Pharmakarückstände. Bei fünf Proben aus dem Kreis Borken (K-H-2 bis K-H-6) wurden in den LC-MS-Chromatogrammen der Extrakte im Bereich der Nachweisgrenze schwache, nicht mehr quantifizierbare CTC- und TC-Signale detektiert. DC, OTC und DMC waren in keiner Bodenprobe nachweisbar.

In den Getreideproben sind positive Befunde besonders auffällig im Weizen K-S-1. In dem Getreide fanden sich CTC- und iso-CTC-Komponenten (58 und 53 µg/kg FG) sowie TC-Komponenten (<BG). Chlortetracyclinspuren wurden auch in Proben aus dem Kreis Borken gefunden, sowie in einer Probe aus dem Kreis Warendorf (K-M-2).

Auffällig ist, dass TC von Betrieben nicht angegeben wurde, aber trotzdem in einer Coesfelder Weizenprobe (K-S-1) nachgewiesen worden war. Vermutlich ist CTC über einen Dehalogenierungsprozess zu TC umgebildet worden (s. Abb. 26).

In der Probe K-M-2 konnten CTC-Gehalte (<BG) festgestellt werden. Der höchste CTC-Gehalt (iso-CTC+e-iso-CTC) von 95,9 µg/kg wurde im Kreis Coesfeld gefunden. Die ermittelten Gehalte für Winterweizen im Kreis Borken betragen durchschnittlich 55,4 µg/kg. Auch im Kreis Warendorf wurde CTC nachgewiesen. Dagegen wurde in den Kontrollproben (Futterweizen) kein CTC gefunden.

Einen besonderen Befund stellt das in der Weizenprobe K-S-1 sicher qualitativ nachgewiesene und quantitativ bestimmte DMC dar (68 µg/kg FG). Mit hochauflösender Massenspektrometrie wurde DMC in weiteren Proben des Kreises Borken eindeutig identifiziert. Bis 1989 wurde dieses Antibiotikum in der Humanmedizin eingesetzt, aber dann wegen seiner toxischen, teratogenen und fotosensibilisierenden Wirkungen vom Markt genommen [75]. Auch in der Veterinärmedizin ist DMC nicht mehr zugelassen. Hier hatte nach eigenen Angaben keiner der am Screening beteiligten Betriebe DMC angewandt, sondern CTC. Neben der unwahrscheinlichen veterinärmedizinischen Anwendung in der Tierproduktion sind aber prinzipiell andere Eintragspfade bzw. Quellen in Boden und Pflanzen möglich, da sich DMC durch Abspaltung einer Methylgruppe vom CTC-Molekül (C<sub>6</sub>-Demethylierung, s. Abb. 26) bilden kann.



**Abb. 26:** Mögliche Reaktionswege der Metabolisierung von Chlortetracyclin

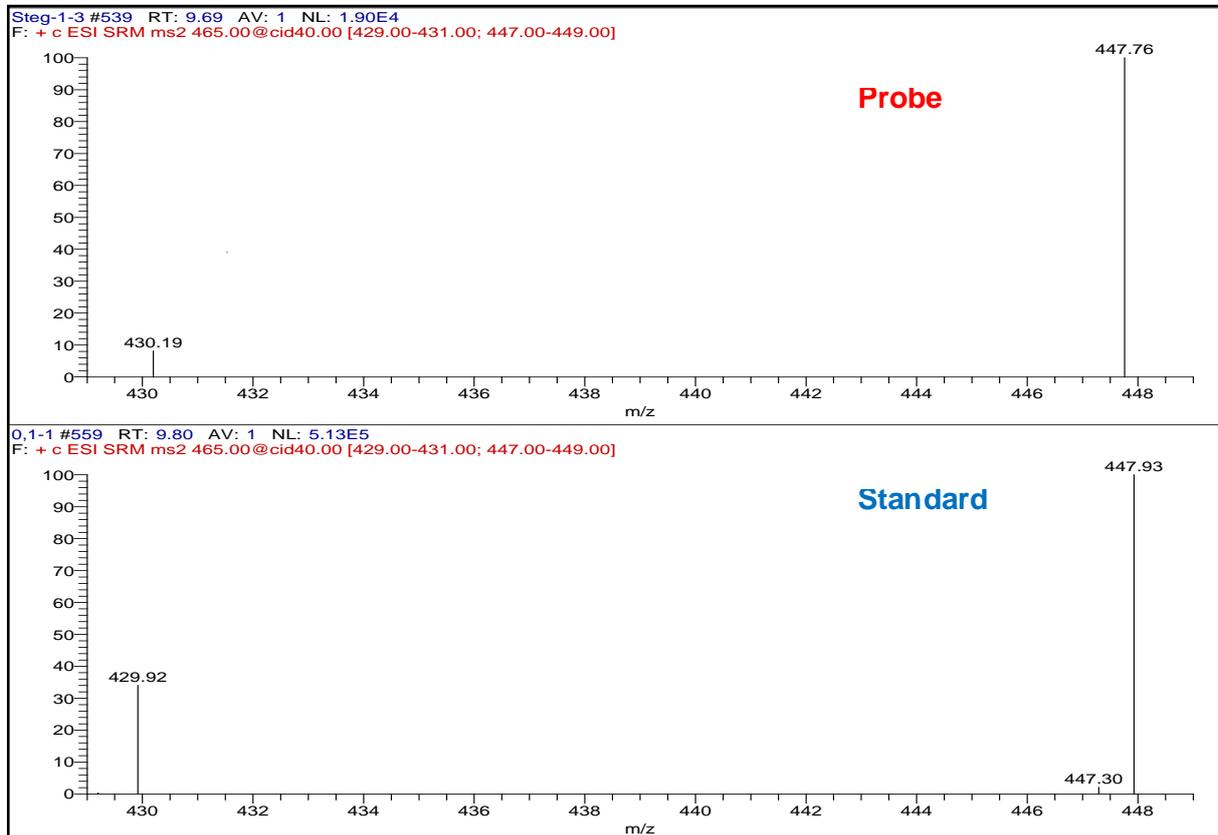
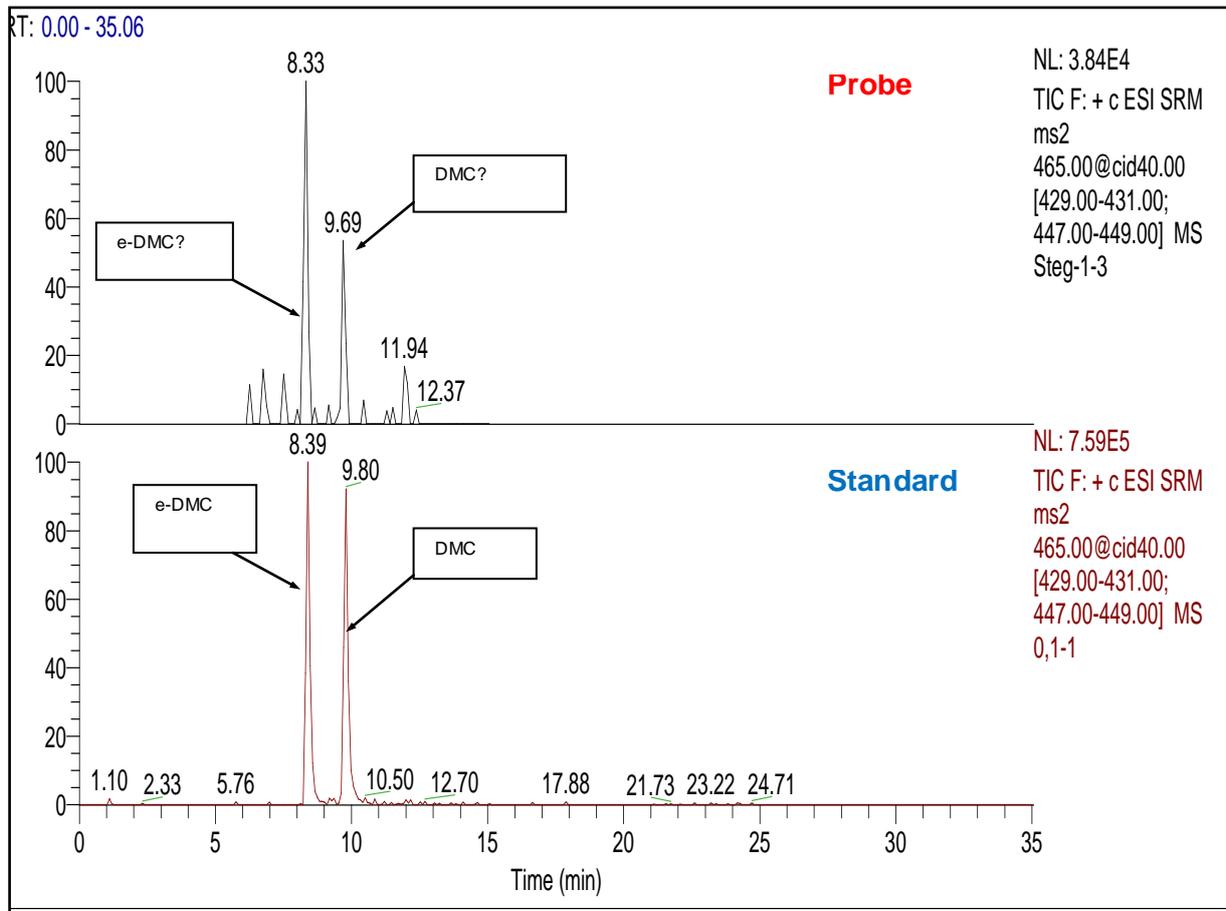
Im CTC-Molekül sind mehrere Methylgruppen vorhanden, deshalb könnten auch mehrere demethylierte Metabolite auftreten. Demethylierte Produkte von CTC zeigen eine vergleichsweise hohe Stabilität hinsichtlich der Bildung von Epimeren, die während der Probenvorbereitung entstehen können. Demethylierungsreaktionen sind im Boden und der Rhizospäre der Pflanze durchaus denkbar, worauf eigene Untersuchungen und Literaturdaten (s. Kap.5.3) hinweisen.

Im nächsten Abschnitt werden exemplarisch positive Befunde auf DMC in Weizen im Detail beschrieben.

### 7.1.2.1 Positiver Demeclocyclin-Befund

#### **Identifizierung und Quantifizierung mit niedrig auflösender MS (LC-MS)**

In der Weizenprobe K-S-1 wurde DMC über den Vergleich mit dem Standard im niedrig auflösenden LC-MS<sup>2</sup> identifiziert. Die Analyse der K-S-1-Weizenprobe lieferte die in den folgenden Abbildungen dargestellten Massenchromatogramme und MS-Spektren.



**Abb. 27:** Vergleich der Massenchromatogramme und -spektren der K-S-1-Weizenprobe (oben) mit dem DMC-Standard (unten): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

Im ersten Schritt wurden die Retentionszeiten von DMC in der Probe und in einem Standard verglichen. Die Abweichung der Retentionzeiten war <5% (Toleranz 5 %). In einem zweiten Schritt wurden die relativen Intensitäten der Produkt-Ionen miteinander verglichen. Die relative Skala der Intensität bezieht sich auf das intensivste MS-Signal. Die Abweichung der relativen Intensitäten war 8 % (Toleranz 50 %). Zur Bestätigung von Befunden mittels LC-MS/MS werden mindestens 1 Precursor- und 2 Produkt-Ionen benötigt [260]. DMC besitzt in der Weizenprobe im positiven ESI-Modus ein Precursor-Ion mit dem m/z-Verhältnis 465,1. Der MS<sup>2</sup>-Scan liefert zwei Produkt-Ionen: 448,0 m/z und 430,0 m/z.

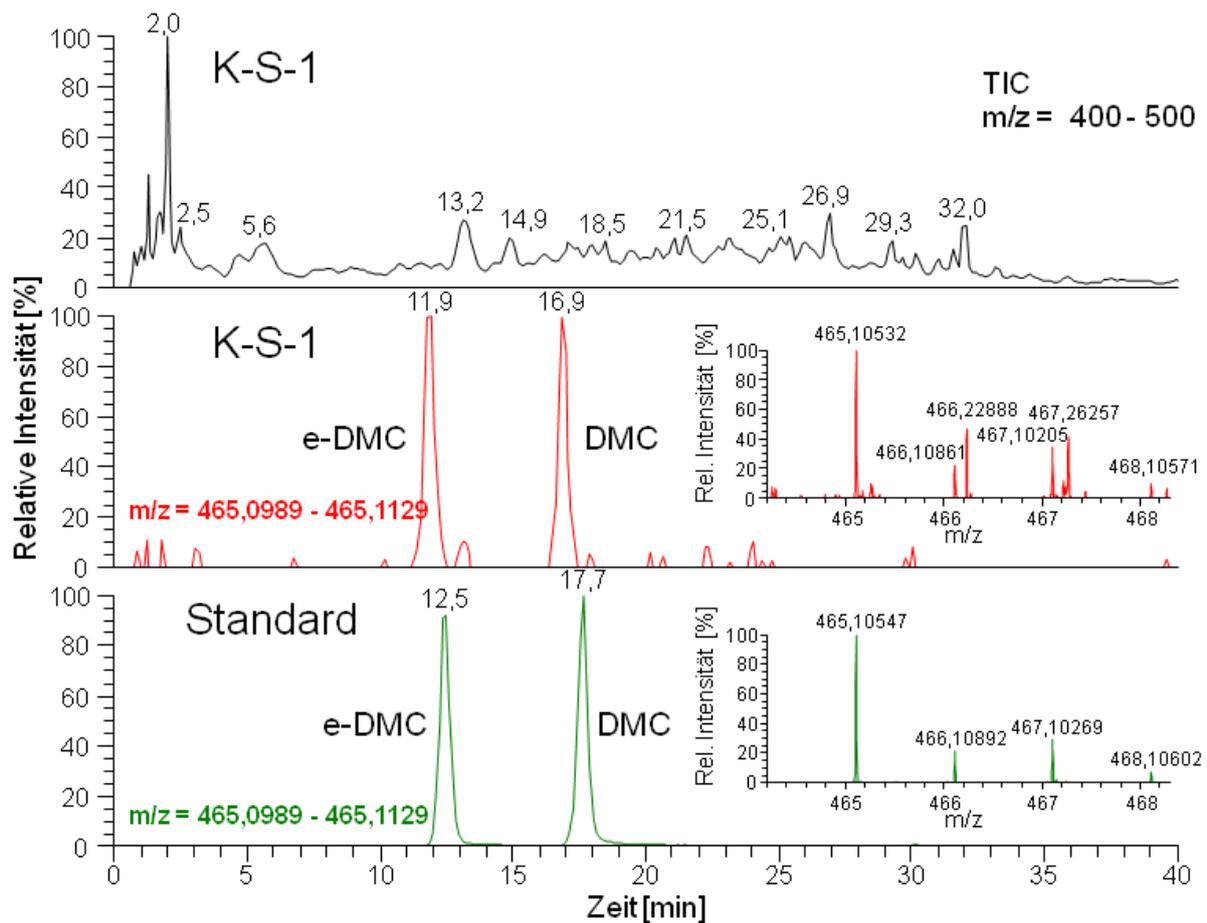
Aus der Übereinstimmung der Retentionszeiten sowie MS-Spektren mit dem Standard und den charakteristischen Fragmentierungen (Verlust von NH<sub>3</sub> und Verlust von H<sub>2</sub>O aus dem [M+H]<sup>+</sup>, s. Kap.6.3.2.1) von DMC kann angenommen werden, dass es sich um die angegebenen Verbindungen handelt.

So wurde die eindeutige Identifizierung mittels niedrigauflösender MS unter Beachtung europäischer Richtlinien durchgeführt. Eine weitere Absicherung der Identifizierung ist über den Vergleich der berechneten exakten Massen mit den gemessenen Massen im hochauflösenden FTICR-MS möglich.

#### ***Bestätigung positiver Befunde mit hochauflösendem MS (FTICR-MS)***

Bei der K-S-1-Weizenprobe wurden zur Absicherung der positiven DMC-Befunden MS<sup>n</sup> Experimente mit einem hochauflösenden FTICR-MS des ISAS (Institute of Analytical Science), Dortmund durchgeführt. Dabei wurde die Übereinstimmung der Retentionszeiten, der exakten Massen, der Isotopenmuster und Fragmentierungen von DMC beobachtet.

Die Abb. 28 zeigt die Massenchromatogramme und MS-Spektren der K-S-1-Weizenprobe.



**Abb. 28:** Vergleich der Massenchromatogramme und –spektren der K-S-1-Weizenprobe (oben) und mit den e-DMC- und DMC-Standard (unten): FTICR-MS (HR-MS), Full Scan

Die Retentionzeiten von e-DMC (11,9 min) und DMC (16,9 min) in der Probe stimmen fast mit der Retenzionzeit im Standard (12,5 und 17,7 min) überein sowie auch die exakte Masse von DMC in der Probe (465,10532) und im Standard (465,10547).

Zur Unterscheidung der massengleichen Verbindungen von DMC wurden die  $MS^n$ -Spektren der jeweils intensivsten Vorläuferionen bis zu den  $MS^4$ -Experimenten miteinander verglichen (Abb. 29).

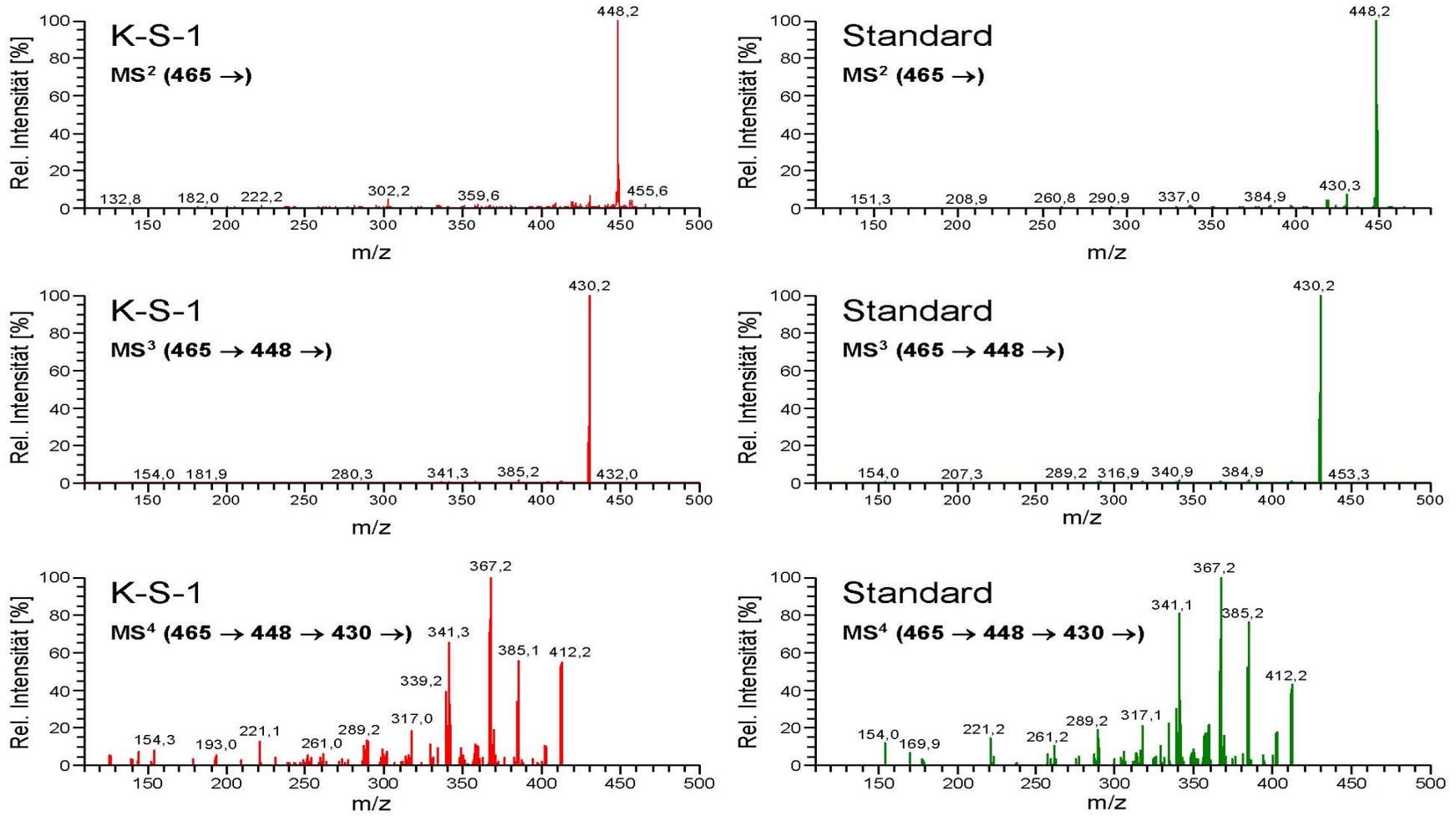
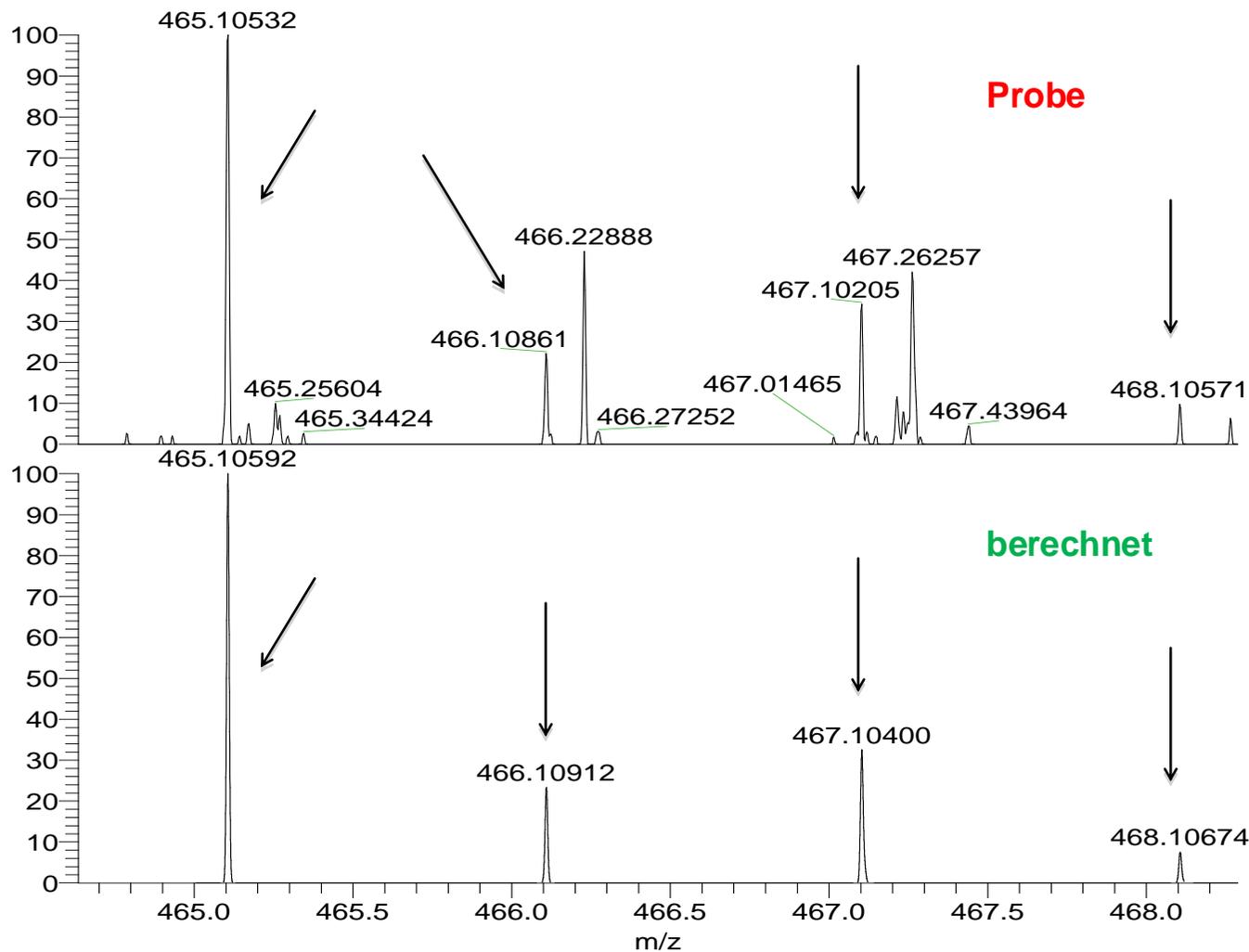


Abb. 29: Vergleich der Massenspektren der K-S-1-Weizenprobe mit dem DMC-Standard: FTICR-MS (HR-MS), Full Scan

---

Die FTICR-MS<sup>n</sup>-Spektren von DMC in der Probe stimmen mit den Spektren vom DMC-Standard sehr gut überein. Bei einer Retentionszeit von 16,9 min wurden die Fragmente im MS<sup>1</sup> m/z=465,1, im MS<sup>2</sup> m/z=448,0, im MS<sup>3</sup> m/z=430,1 und im MS<sup>4</sup> m/z=367,2 registriert. Bei dem Standard tauchen dieselben Fragmente auf. So lässt sich daraus auf die Anwesenheit von DMC sowie auch e-DMC schließen.

Mit dem zugehörigen Kalkulationsprogramm des FTICR-MS-Gerätes können exakte Massen des DMC-Wirkstoffes berechnet werden. Die exakte Masse (monoisotopische Masse) eines Ions ist berechnet aus den häufigsten Isotope der im Ion vorhandenen Elemente. Für jeden Peak aus dem Chromatogramm lassen sich die gemessenen exakten Massen der Fragmente mit den berechneten Werten vergleichen. Eine Massenabweichung zwischen berechneter und gemessener Masse von  $\leq 2$  ppm lässt eine eindeutige Identifizierung der Substanz zu.



NL:  
5.67E3  
070807-41#865 RT: 11.87  
AV: 1 T: FTMS + p ESI d SIM  
ms [461.00-471.00]

NL:  
1.38E4  
C<sub>21</sub> H<sub>22</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> Cl:  
C<sub>21</sub> H<sub>22</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> Cl<sub>1</sub>  
p (gss, s /p:40) Chrg 1  
R: 50000 Res .Pwr . @FWHM

**Abb. 30:** Vergleich des gemessenen Massenspektrums der K-S-1-Winterweizenprobe bei 11,87 min (oben) mit dem berechneten Massenspektrum von DMC mit m/z = 465,010592 (unten): FTICR-MS (HR-MS)

---

Wie in Abb. 30 zu sehen ist, wurde DMC über die exakte Masse wie auch über die Isotopenübereinstimmung identifiziert. Die berechneten Massendaten der Isotopenpeaks (465,10592, 466,10912, 467,10400 und 468,10874) stimmen mit den gemessenen sehr gut überein, wobei die maximale Massenabweichung <2 ppm war. So ließ sich mit dem hochauflösenden MS-System in der Weizenprobe K-S-1 DMC sowie e-DMC sicher identifizieren.

### ***Ernte 2006***

Die Ergebnisse der Analysen des im Jahr 2006 in den Kreisen Borken und Coesfeld beprobten Getreides unterscheiden sich erheblich von den Ergebnissen der Erntezeit 2005 (Tab. 28). Im Winterweizen waren keine Tetracycline nachweisbar und auch nicht in Gerste und Triticale. In einigen LC-MS-Chromatogrammen der Getreideextrakte wurden im Intensitätsbereich des Matrixuntergrundes sehr schwache Peaks detektiert, die im MS<sup>2</sup>-Modus auf TC/CTC-Spuren hinweisen, aber letztendlich keine sichere Identifizierung erlauben.

**Tab. 28:** Ernte 2006 - Ergebnisse der Getreideanalysen- negativer Befund+ positiver Befund (> BG) mit LC/MS<sup>2</sup> niedrig auflösend

‡ Bestätigung durch hochauflösende MS

**(+)** und **(+‡)**: positiver Befund (< BG)

Probe	TC	e-TC	DC	e-DC	OTC	e-OTC	DMC	e-DMC	CTC	e-keto-CTC	e-enol-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC
<b>Niedersachsen</b>													
NS1 W a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS1 W b)	-	-	+‡	+‡	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS2 W	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS3 W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS4 W	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS5 W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS6 W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS7 W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NS8 W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Borken</b>	kein positiver Befund												
<b>Coesfeld</b>	kein positiver Befund												

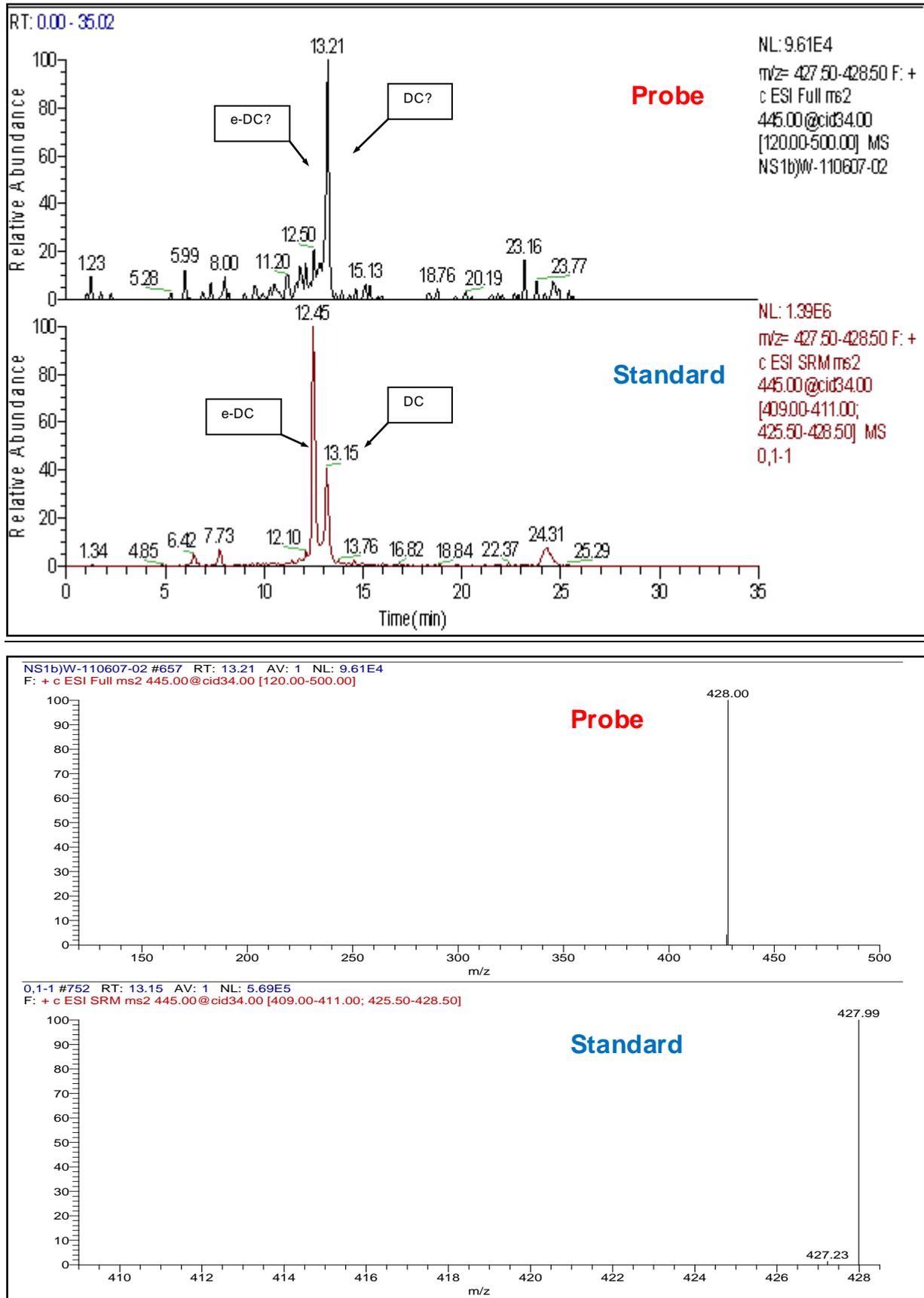
In den Proben NS1 W b) und NS2 W wurde ein DC-Gehalt von ca. 30 mg/kg FG ermittelt, in Probe NS4 W lag er unter der Bestimmungsgrenze. Keiner der niedersächsischen Betriebe hatte aber nach eigenen Angaben DC angewandt (s. Anh.2, Tab. A6c), sondern CTC, TC (Betriebe NS1 und NS2) und Oxytetracyclin (OTC, Terramycin). Wie schon bei der Abhandlung der möglichen Bildung des Demeclocyclins (Ernte 2005, Kreis Borken) angedeutet, wären neben einem Eintrag über OTC-haltige Gülle auch die Bildung über metabolische reduktive / oxidative Prozesse in Boden oder Pflanze und die Bildung des DC aus OTC (Dehydroxylierung), TC (Hydroxylierung) oder CTC (Dehalogenierung und Hydroxylierung) chemisch möglich (s. Seite 88, Abb. 26). Die Interpretationen der DC-Befunde müssen bei der gegenwärtigen Datenlage als spekulativ angesehen werden. Ergänzend ist darauf hinzuweisen, dass in der Weizenprobe NS1-W a) im Unterschied zur Probe NS1-W b) keine Tetracycline nachgewiesen wurden, obwohl die jeweiligen Felder mit der gleichen Gülle in vergleichbarer Menge gedüngt worden waren. Unterschiede zwischen den Proben ergaben sich lediglich in der Bodenart: lehmiger Sand bei Probe NS1-W a) und Sand bei Probe NS1-W b). Ob dies die Ursache für den unterschiedlichen Tetracyclintransfer darstellt, ist zurzeit ungewiss.

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Ausmaß des Eintrags in Getreide ist wahrscheinlich auch in der Antibiotikakonzentration der Gülle gegeben. Aus früheren Untersuchungen in der landwirtschaftlichen Praxis [6] ist bekannt, dass diese stark variiert und zum Teil ein erhebliches Ausmaß erreichen kann ( $\geq 45$  mg/kg TC bzw. 30 mg/kg CTC). Die vorhergehenden Studien lassen vermuten, dass die Aufnahme in Getreide von der Höhe der Bodenbelastung während des Pflanzenwachstums mitbestimmt wird. Die Antibiotikakonzentration in den Güllen zum Zeitpunkt der Ausbringung der am Screening beteiligten Betriebe konnte jedoch nicht ermittelt werden.

### **7.1.2.2 Positiver Doxycyclin-Befund**

#### ***Identifizierung und Quantifizierung mit niedrig auflösender MS (LC-MS)***

Eine auffällige Singularität wurde in drei Weizenproben aus Niedersachsen entdeckt, in denen Doxycyclin identifiziert wurde. In der Abb.31 werden die Massenchromatogramme und MS-Spektren der NS1 b)-Winterweizenprobe dargestellt.

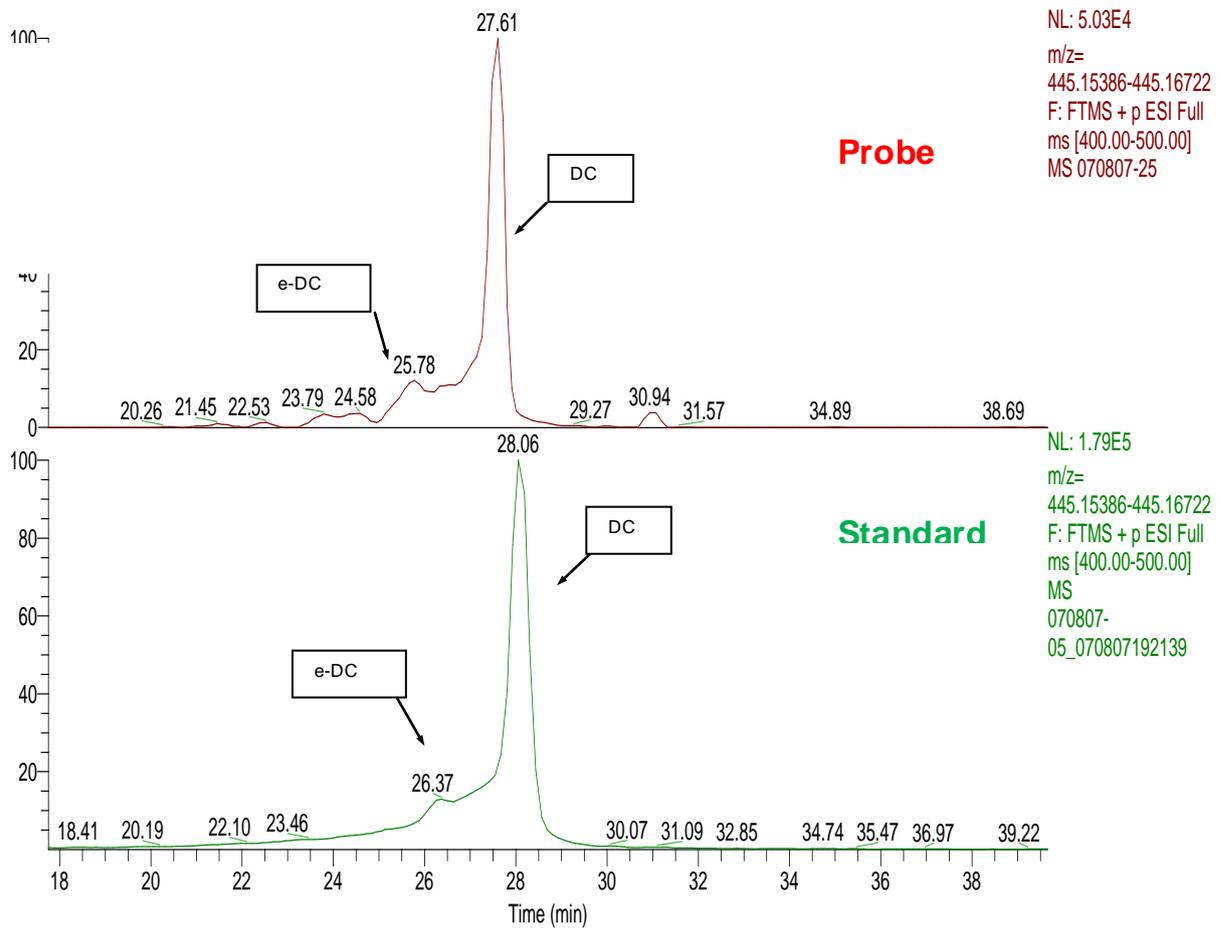


**Abb.31:** Vergleich der Massenchromatogramme und -spektren der NS1 b)-Weizenprobe (oben) mit dem DC-Standard (unten): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

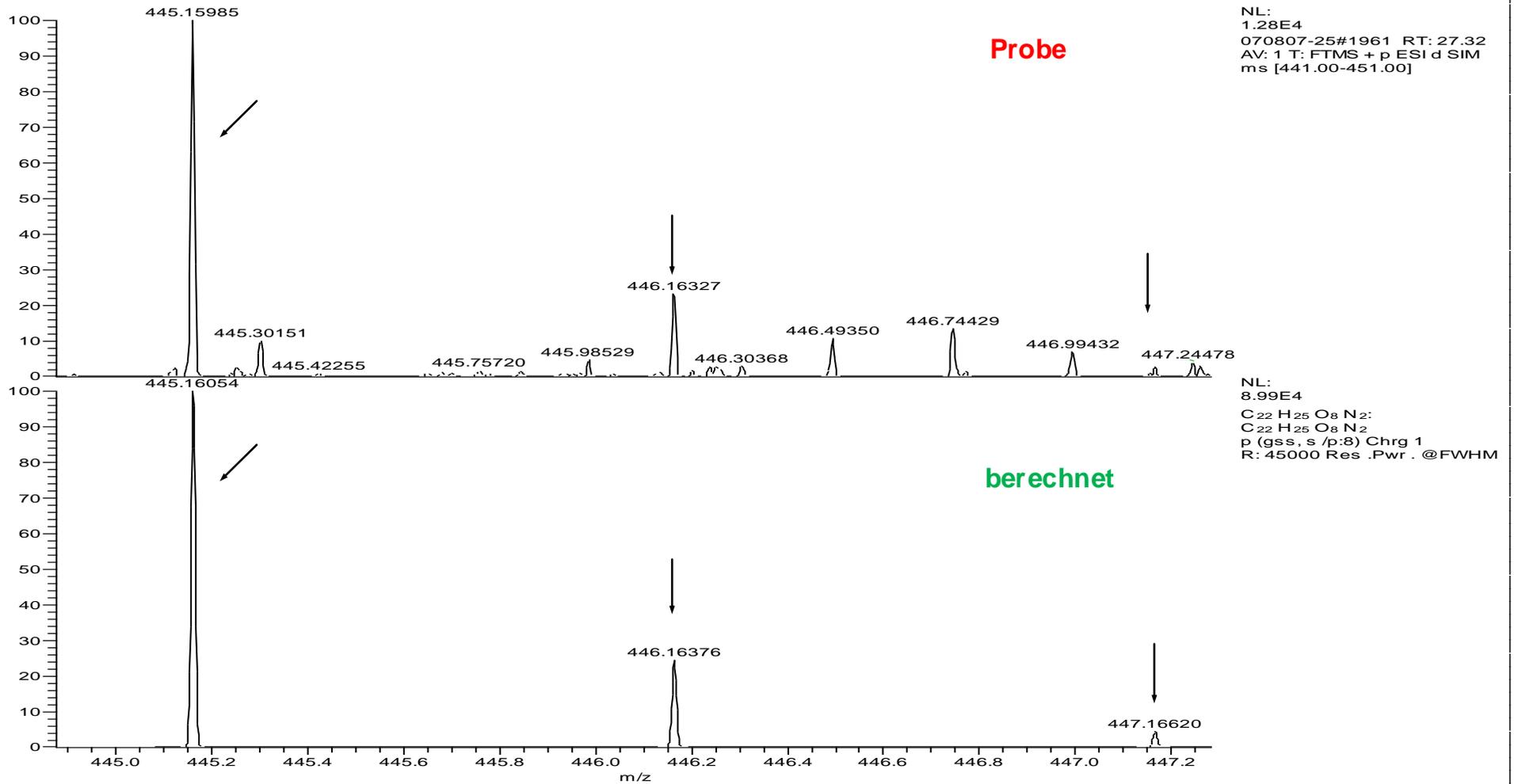
DC und e-DC wurden in dieser Weizenprobe eindeutig detektiert. Sowohl Retentionszeit, m/z-Bereich sowie Fragmentierungen im Fullscan stimmen überein.

### **Bestätigung positiver Befunde mit hochauflösender MS (FTICR-MS)**

Die erhaltenen Massenspuren mittels hochauflösender MS für DC und e-DC sind in der Abb. 32 dargestellt.



**Abb. 32:** Vergleich der Massenchromatogramme der N-S-1b)-Weizenprobe (oben) mit dem DC-Standard (unten): FTICR MS (HR-MS), Full Scan



**Abb. 33:** Vergleich des gemessenen Massenspektrums der N-S-1 b)-Winterweizenprobe bei 27,32 min (oben) mit dem berechneten Massenspektrum von DC mit  $m/z = 445,16054$  (unten): FTICR-MS (HR-MS)

Für jeden einzelnen Peak lassen sich die gemessenen exakten Massen (hochauflösend) mit den berechneten Massen vergleichen. Die Abbildungen zeigen, dass bei DC und e-DC Retentionszeit, SIM-Scan und Isotopenmuster im Fullscan übereinstimmen. Somit konnten DC und e-DC mit hochauflösender MS sicher identifiziert werden.

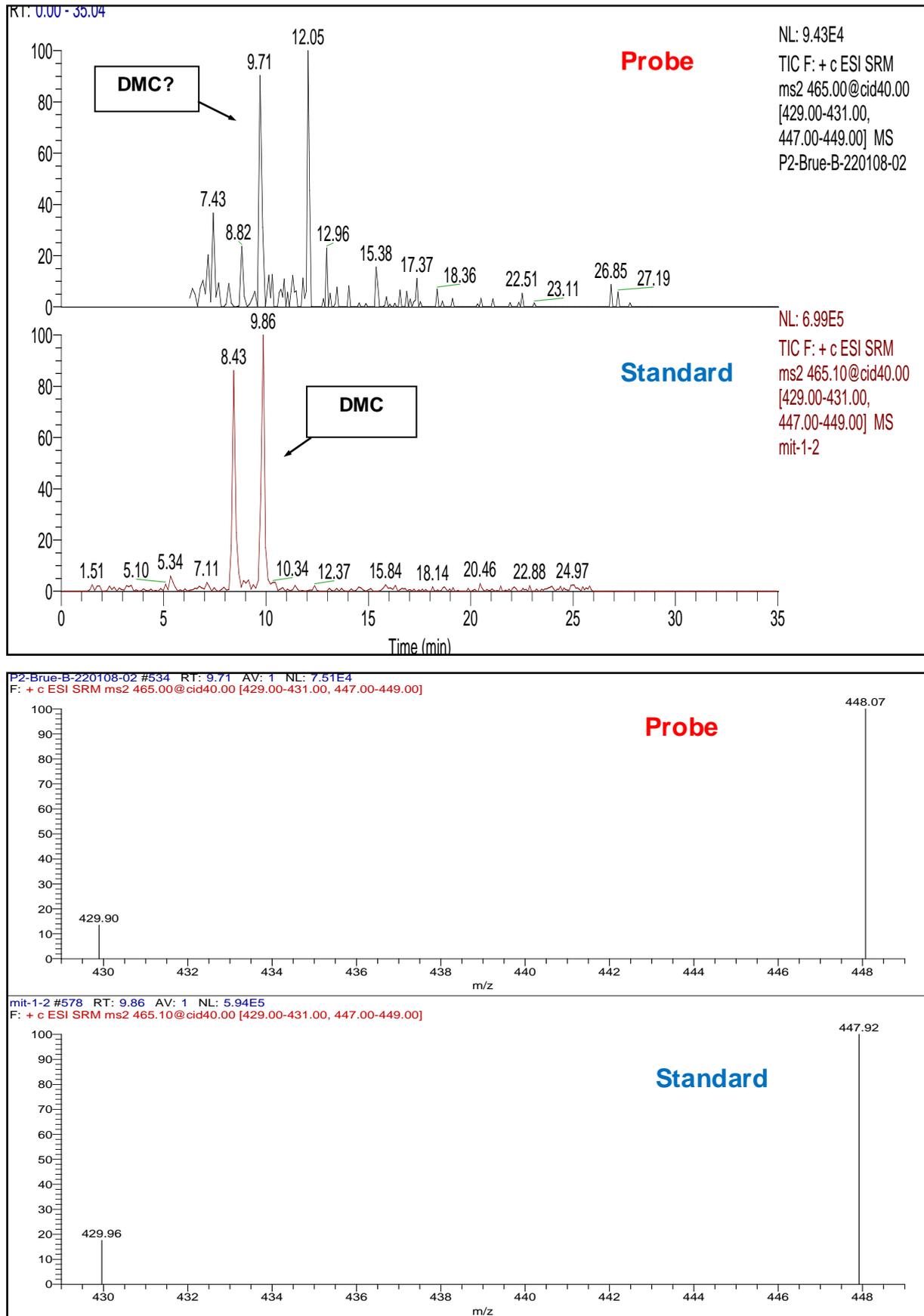
### 7.1.3 Proben aus der besonderen Ernteermittlung des Bundessortenamtes

In zwei Weizenproben aus der besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung (BEE) nach Agrarstatistikgesetz (Max Rubner-Institut, Detmold) wurden keine Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen. Negativbefunde ergaben auch Proben von Winterweichweizen und Wintergerste des Bundessortenamtes der Prüfstelle Rethmar. Dieser Befund ist von Bedeutung für die Verlässlichkeit der angewandten Analytik, denn diese Proben entstammen BSA- Flächen, die mindestens 10 Jahre nicht mit Gülle gedüngt worden waren. Die Analytik hat folgerichtig keine (falsch) positiven Befunde ergeben, die durch die bekannte Neigung der Tetracycline zu Verschleppungseffekten verursacht werden kann.

Auffällige Peaks in Chromatogrammen der BEE- und BSA-Proben (und auch anderer Kornproben), die im Retentions- und Massenbereich der in Weizenwurzeln (Hydrokultur) identifizierten N-Desmethyl-Tetracycline lagen, konnten im hochauflösenden Modus nicht diesen Demethylierungsprodukten zugeordnet werden. Diese Signale wurden wohl von Matrixbestandteilen hervorgerufen; es handelt sich also um Artefakte, die als solche erkannt wurden.

## 7.2 Erkennung falsch positiver Befunde mit hochauflösender MS

Der offensichtlich hohe Matrixanteil in den Messproben von Getreide und Gemüse beeinflusst die Selektivität der LC/MS-Technik. Dieses gilt besonders für Matrices mit hohem Proteinanteil. Proteine sowie Peptide werden koextrahiert und somit durch die Probenaufarbeitung mit SPE nicht vollständig entfernt. Dieses kann bei der LC/MS-Analyse zur Koelution von störenden Matrixbestandteilen bzw. zu falsch positiven Ergebnissen führen. Bei diesen hochkomplexen Proben reicht die Selektivität der niedrigauflösenden MS nicht immer aus, um trotz der chromatographischen Vortrennung falsch positive Befunde zu vermeiden. Das folgende Beispiel (Abb. 34) zeigt die vermeintliche Detektion von DMC in einer Weizenprobe aus Ernte 2006 (Coe7W) mit der niedrigauflösenden LC-MS/MS-Methode. Zur Vermeidung falsch positiver Befunde wurde die hochauflösende MS eingesetzt. Diese liefert gesteigerte Selektivität aufgrund der wesentlich höheren Auflösung und der exakten Masse.



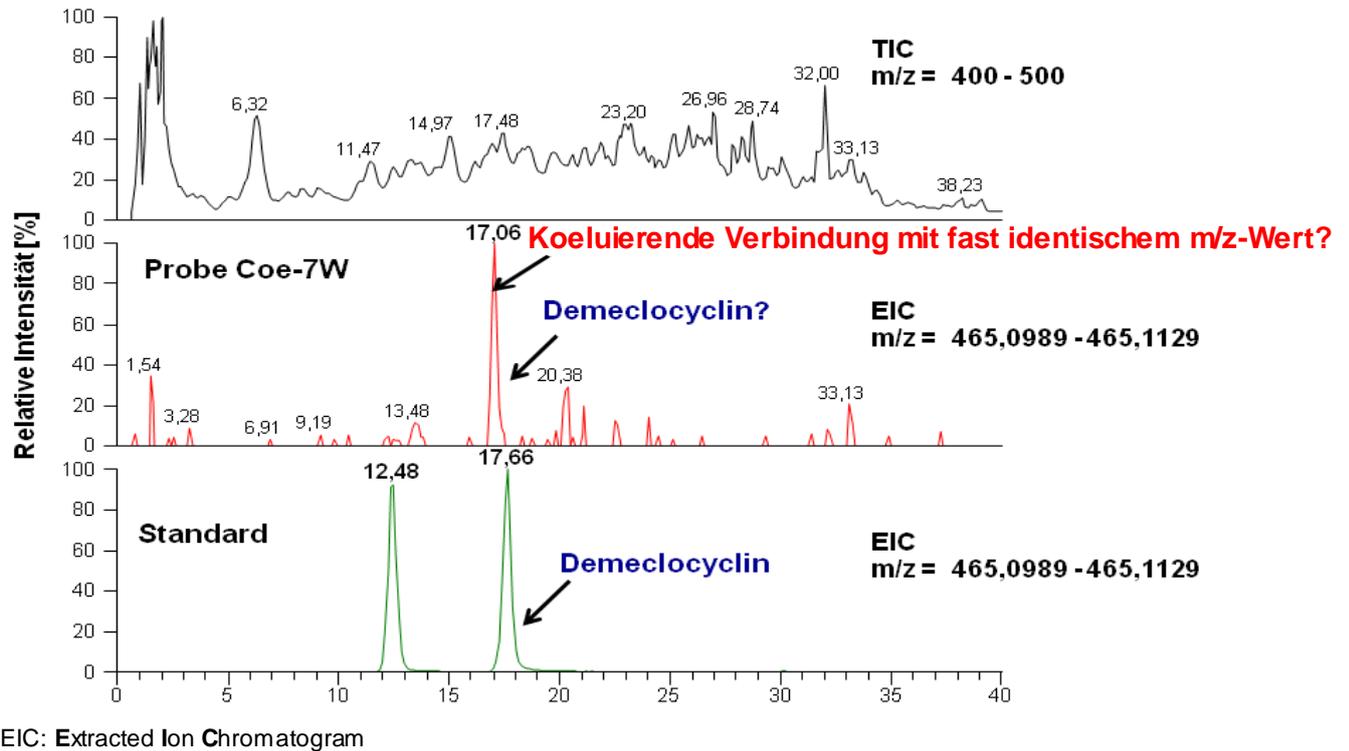
**Abb. 34:** Vergleich der Massenchromatogramme und -spektren der Coe 7W-Weizenprobe (oben) mit dem DMC-Standard (unten): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

Wie in Abb. 34 zu sehen, wurden in einigen LC-MS-Chromatogrammen der Getreideextrakte im Intensitätsbereich des Matrixuntergrundes sehr schwache Peaks detektiert, die im MS/MS-Modus auf DMC-Spuren hinweisen. Diese Peaks in den Chromatogrammen der Getreideprobe aus der Erntezeit 2006 lagen im Retentionszeits- und  $m/z$ -Bereich von DMC. Um Matrixeffekte auszugleichen, wurde die zu analysierende Messprobe mit bestimmten Mengen an DMC-Standardlösung versetzt. Die Ergebnisse lieferten eine Übereinstimmung der Retentionszeit und MS-Spektren von dotierten und undotierten Getreideproben.

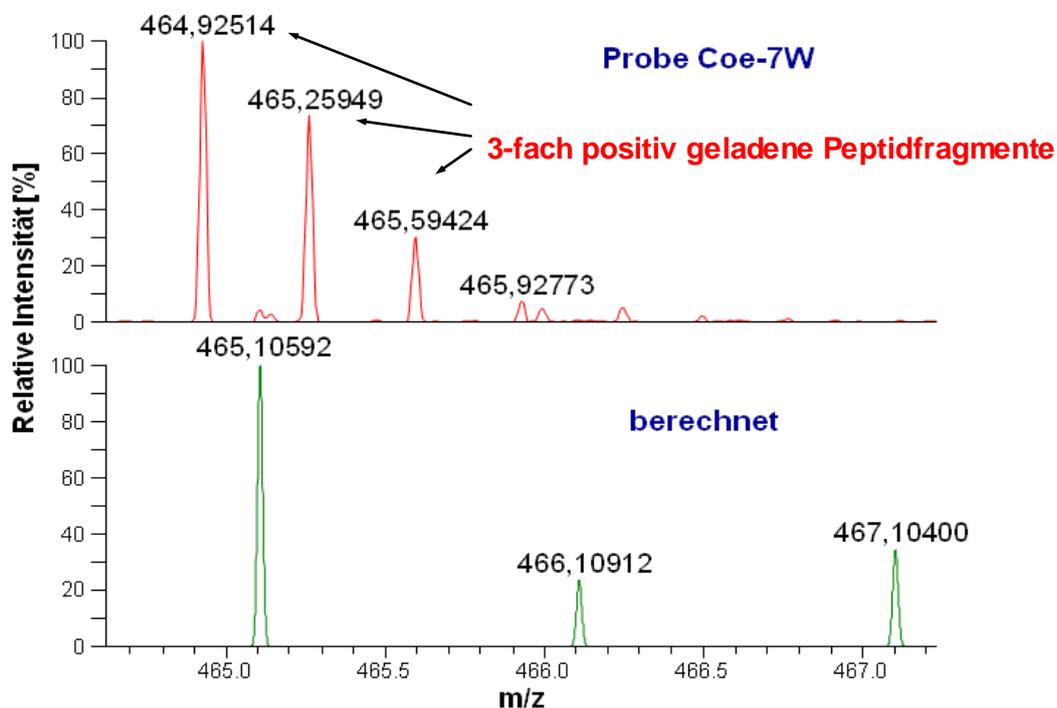
Zur Absicherung des positiven DMC-Befunds wurde die Weizenprobe (Coe-7W, Ernte 2006), zusätzlich mit hochauflösender MS gemessen. In Abb. 35 ist das Massenchromatogramm für DMC mit FTICR-MS aufgeführt.

Bei Elektrospray-Ionisation (ESI)-Massenspektrometrie treten nicht nur einfach geladene Molekül-Ionen auf, sondern es entstehen bei Proteinen und Peptiden bevorzugt mehrfach geladene Molekül-Ionen vom Typ  $(M+nH)^n$  [261]. Die Peptid-Ionen zeigen meist weniger Ladungen, je nach Größe des Peptids und nach Anzahl und Position von basischen Aminosäuren. Wenn man nur eine geladene Spezies im Spektrum detektiert, kann die Ladung und damit die Masse eines Peptids bestimmt werden, indem man die jeweilige Differenz der  $m/z$ -Werte der Isotopenpeaks verwendet (Abb. 36).

Der Abstand beträgt bei einfach geladenen Ionen zwischen den Isotopen 1 Da (Masseneinheit,  $1 \text{ Da} = 1,6605 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ ), bei doppelt geladenen (wegen  $m/z$ ) 0,5 Da und bei dreifach geladenen 0,33 Da. Bei größeren Molekülen kann die Auflösung der niedrigauflösenden MS nicht mehr ausreichen, um die Isotopen von hochgeladenen Ionen zu unterscheiden [262]. Zuordnungen der Signale der Massenchromatogramme, die ursprünglich dem DMC zugeordnet worden sind, ließen sich in der Hochauflösung (FTICR-MS) nicht bestätigen. Dabei stellte sich heraus, dass die  $m/z$ -Werte mehrfach geladener Peptidfragmente,  $[M+H]^{n+}$  ( $n=3$ , Abstand zwischen den Isotopen 0,33 Da) in den Quasi-Molekülionenbereich von DMC fallen, was zu falsch positiven Befunden mit der niedrigauflösenden LC-MS-Methode führen kann (s. Abb. 36). Dieser Sachverhalt wird im folgenden Kapitel näher erläutert.



**Abb. 35:** Vergleich der Massenchromatogramme der Coe-7W-Weizenprobe (oben) mit dem DMC-Standard (unten): FTICR MS (HR-MS), Full Scan

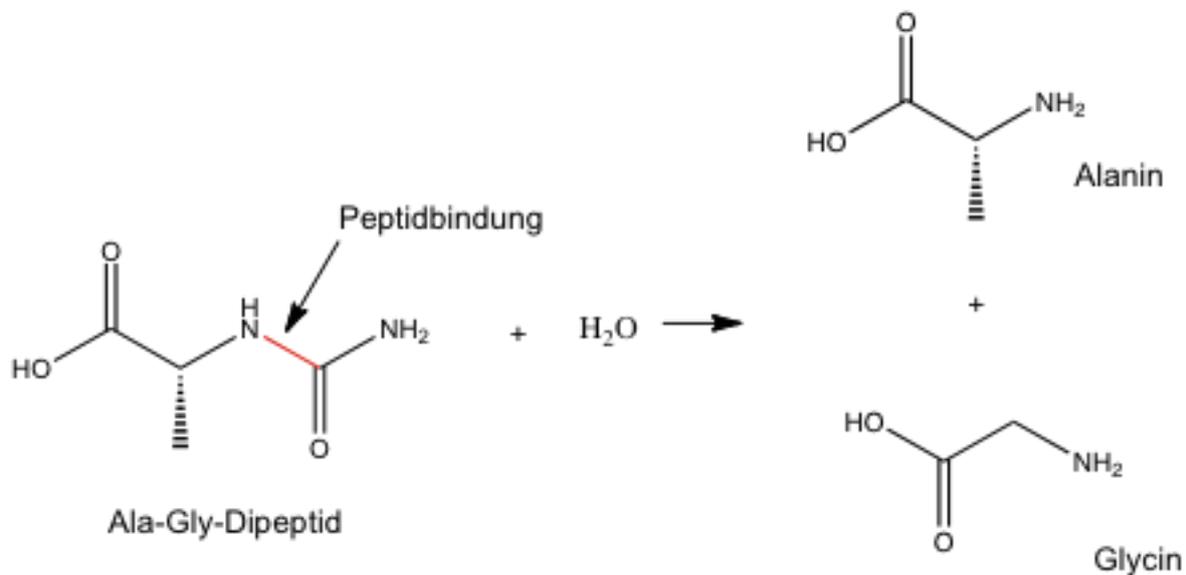


**Abb. 36:** Vergleich des gemessenen Massenspektrums der Coe7W-Weizenprobe bei 17,06 min (oben) mit dem berechneten Massenspektrum für DMC (unten): FTICR-MS (HR-MS), Full Scan

### 7.2.1 Koelution von Peptiden bei der LC/MS-Analyse

Die Koelution bedeutet für die LC-MS mit einem ESI-Interface, dass diese auch gleichzeitig ionisiert und detektiert werden. Diese bilden im Spektrum eine Reihe von Signalen mit  $m/z = (M + nH^+)/n$  und können ähnliche  $m/z$ -Werte aufweisen wie die Analytmoleküle. Des Weiteren kann es zu Matrixeffekten kommen (Ionensuppression).

Proteine bzw. Polypeptide sind im Getreide enthalten, etwa 80 % der Proteine des Getreidekorns im Mehlkörper. Diese Proteine sind durch Hydrolyse der Peptidverbindungen spaltbar (Abb. 37).



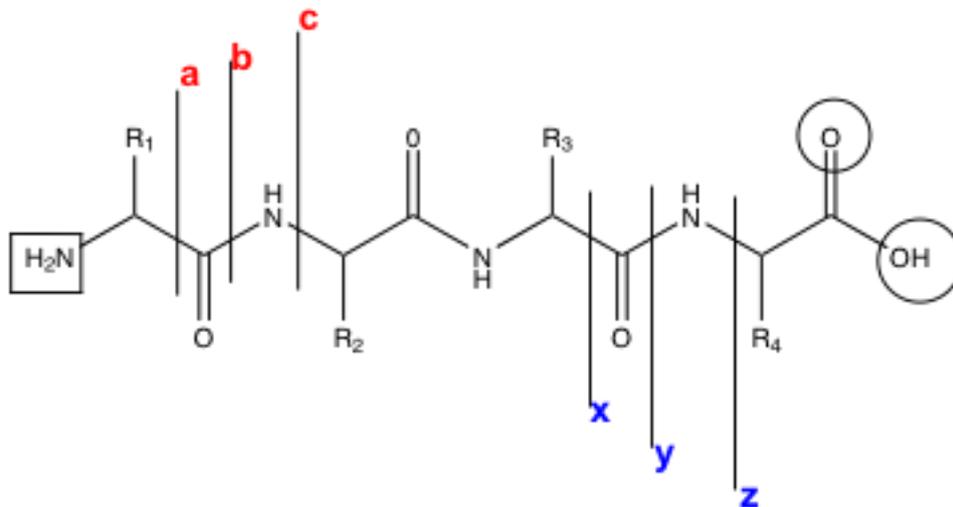
**Abb. 37:** Spaltung einer Peptidbindung (Amidbindung) durch enzymatische Hydrolyse [263]

Die Proteinhydrolyse erfolgt entweder chemisch oder enzymatisch. Insbesondere findet diese enzymatische Hydrolyse in saurer Lösung statt. Dabei liegt das pH-Optimum der enzymatischen Proteolyse im sauren Bereich. Daher ist anzunehmen, dass sich Peptide durch enzymatische Proteolyse während der Extraktion mit Citratpuffer (pH 4,1) bilden, die bei der anschließenden Festphasenextraktion (SPE) nicht vollständig entfernt werden.

#### Peptid-Fragmentierung

Die Fragmentierung der Peptide (Abb. 37) kann an drei verschiedenen Bindungspositionen erfolgen:

- an der vom Carbonyl-Kohlenstoff ausgehenden C-C-Bindung,
- an der vom Carbonyl-Kohlenstoff ausgehenden C-N-Bindung,
- an der vom Amid-Stickstoff ausgehenden N-C-Bindung.



**Abb. 38:** Fragmentierung der Peptide [263]

(a, b, c: N-terminalen Fragmente

x, y, z: C-terminalen Fragmente)

Falls die Ladung bei der Spaltung am N-terminalen Fragment verbleibt, entstehen die N-terminalen Sequenzen a, b, c, wohingegen sich die C-terminalen Sequenzen x, y, z, bilden, wenn das C-terminale Fragment die Ladung trägt. Zudem kann es neben diesen drei Fragmentierungsmöglichkeiten der Peptide zu Abspaltungen von  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}$  und an den Seitenketten der Aminosäuren kommen [263].

Peptide fragmentieren recht fragmentreich, so dass es auch bei selektiven SRM-Methoden zu falsch positiven Resultaten kommen kann. Dies liegt bei den Tetracyclinen eben an dem recht unselektiven Massenverlusten von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NH}_3$ , die ebenfalls bei Peptiden auftreten.

In Abb. 39 ist ein Fragmentierungsbeispiel in einem Positiv-Ion MS-(ESI)-Spektrum des Peptids PFGK (Prolin-Phenylalanin-Glycin-Lysin) dargestellt.

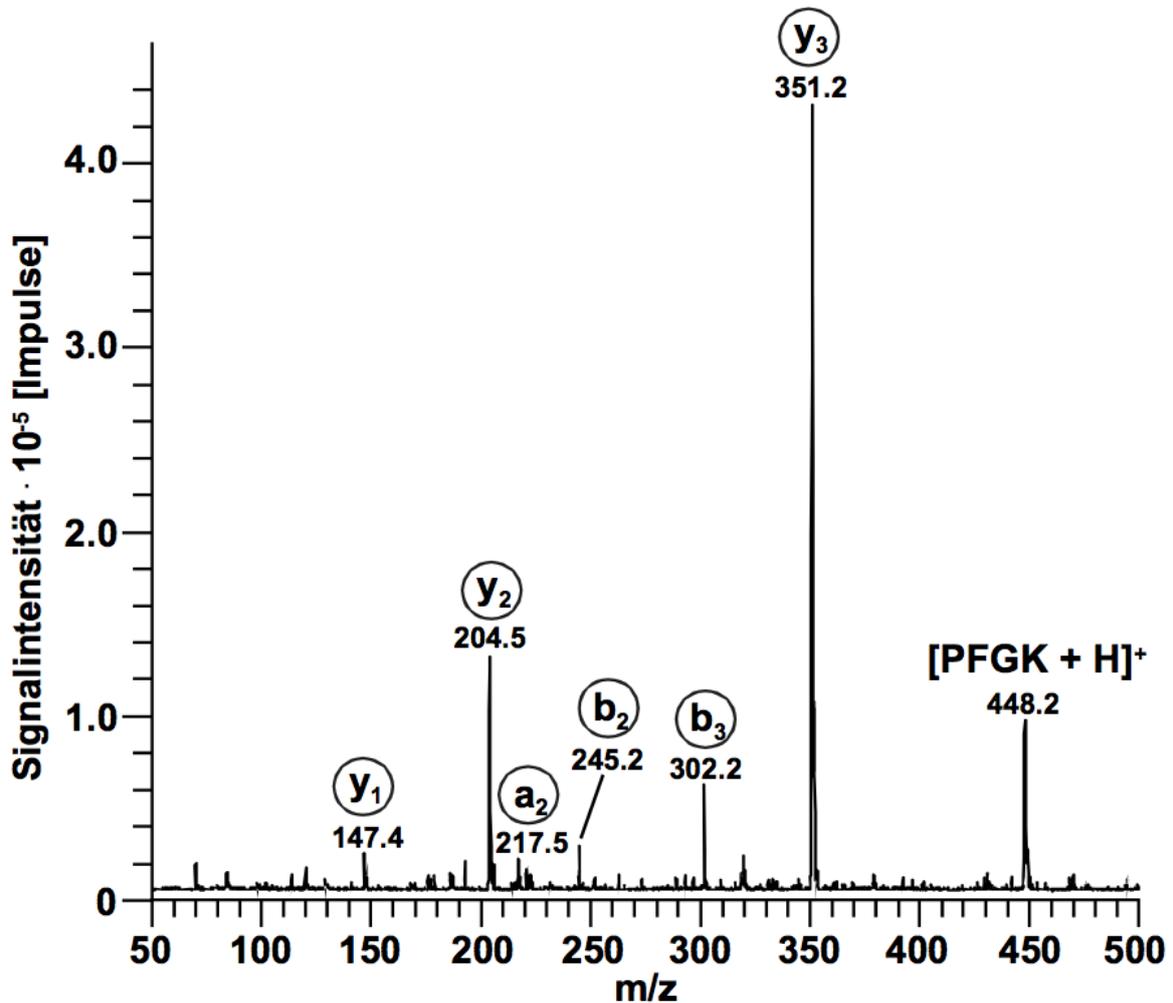


Abb. 39: MS/MS Spektrum des Peptids PFGK [264]

In der Abb. 39 sind die kompletten y- und b- Fragmentionenserien und das a<sub>2</sub>-Fragmention sowie das protonierte intakte Peptid PFGK (m/z 448,2) dargestellt. Das a<sub>2</sub>-Fragmention (m/z 217,5) wird durch die Abspaltung von Kohlenmonoxid aus dem b<sub>2</sub>-Fragmention (m/z 245,2) gebildet.

Abschließend ließ sich zusammenfassen, dass Peptide recht fragmentreich fragmentieren, so dass es auch mit selektiven SRM-Methoden zu falsch positiven Resultaten kommen kann. Dies liegt bei den Tetracyclinen eben an dem recht unselektiven Massenverlusten von H<sub>2</sub>O und NH<sub>3</sub>, die ebenfalls bei Peptiden auftreten.

### 7.2.2 Protease-Behandlung

Die mehrfach geladenen Peptid-Spezies, die in den Massenchromatogrammen in dem m/z-Bereich von TC (400-500) fallen, können in der niedrigauflösenden MS positive TC-Befunde vortäuschen. Deshalb ergab sich der methodische Ansatz, im Verlauf der Probenaufarbeitung die Bildung der Peptide weitgehend zu unterdrücken. Dies könnte durch

Zusatz von Protease-Inhibitoren erreicht werden, die eine Hemmung der Peptidasen bzw. der proteolytischen "Verdauung" im Extrakt vor der LC/MS-Analyse bewirken.

Der in dieser Arbeit verwendete Protease-Inhibitor-Cocktail (Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts, Sigma) ist eine Mischung mit breiter Spezifität für die Hemmung von Serin-, Cystein-, Asparaginsäure- und Metalloproteasen sowie Aminopeptidasen. Zur Vermeidung des Protein-Abbaus in biologischen Proben ist die Behandlung mit Protease-Inhibitoren bekannt [265, 266, 267]. Die Behandlung erfolgt meistens durch Zugabe des Protease-Inhibitors in das Extraktionsmittel.

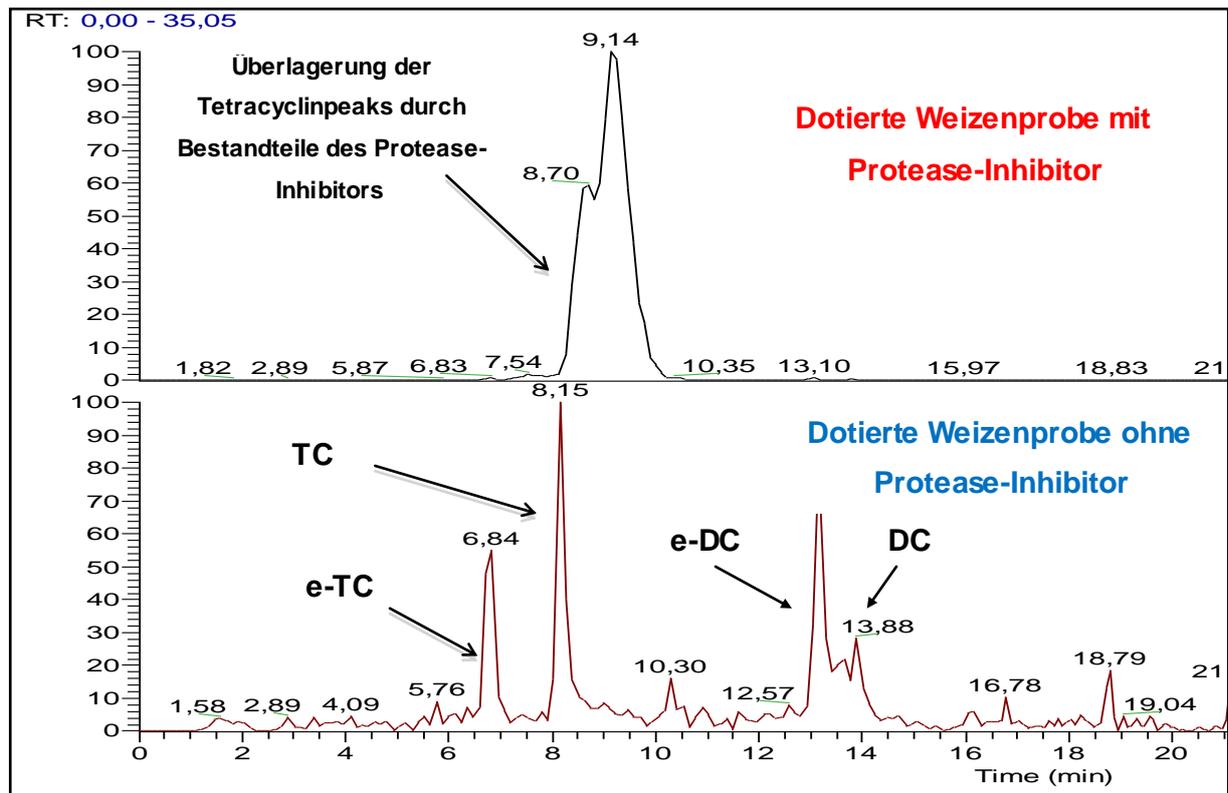
Im Rahmen der durchgeführten Voruntersuchungen wurden verschiedene Varianten dieser Inkubationsmethode erprobt. Die Wiederfindungen wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten von 10, 20, 30 min bei Raumtemperatur (RT) ermittelt (Tab. 29).

**Tab. 29:** Wiederfindungen für verschiedene Inkubationsverfahren mit Protease-Inhibitor Cocktail bei RT (BSA-Winterweizen, Dotierung 250 µg/kg FG, LC-MS/MS, n = 3)

Analyt	Wiederfindung [%]			
	ohne Protease-Inhibitor	mit Protease-Inhibitor		
		Inkubationszeit		
		10 min	20 min	30 min
SFD	57,3	25,3	32,8	49,6
ENR	76,9	56,1	63,5	81,9
CIP	74,5	70,1	73,2	76,8
TC+e-TC	90,1	*	*	*
DC+e-DC	66,2	*	*	*
OTC+e-OTC	98,6	97,5	101,9	103,5
DMC+e-DMC	88,9	84,5	94,3	96,1
CTC+e-CTC	98,6	100,3	102,4	103,0
iso-CTC+e-iso-CTC	85,6	80,1	89,6	87,5
MON	51,4	50,5	62,6	51,9

\* Peaküberlagerungen durch Protease-Inhibitor

Wie in der Tab. 29 zu sehen ist, schwanken die Wiederfindungen mit Ausnahme von SFD nicht stark. Jedoch konnte nicht für alle Analyte ein Wiederfindungswert ermittelt werden, da auch in den Chromatogrammen der mit Protease-Inhibitor dotierten Extrakte Zusatzpeaks auftraten. Insbesondere im m/z-Bereich der Tetracycline überlagerten diese zusätzlichen Peaks die eigentlichen TC-Peaks (Abb. 40).



**Abb. 40:** Überlagerung der Tetracyclin-Peaks durch Bestandteile des Protease-Inhibitors: Aufarbeitung Standard-dotierte Weizenprobe mit Protease Inhibitor (oben) und Aufarbeitung Standard-dotierte Weizenprobe ohne Protease Inhibitor (unten): LC-MS/MS (LR-MS)

Daher wurden die Getreideextrakte bei weiteren Probenaufarbeitungen nicht mit Protease-Inhibitor-Cocktail behandelt, weil sich diese Methode nicht bewährt hat.

### 7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Screening-Studie

Die Analyse vom Getreide der Erntezeiten 2005 und 2006, das vieldarke Gebieten entstammt, führte zu sicher identifizierten positiven Befunden über das Vorkommen von Tetracyclinen (TC, CTC einschließlich Epimeren und Tautomeren, iso-CTC sowie DC und DMC) - überwiegend in Winterweizen aus dem Jahre 2005. Die ermittelten Gehalte lagen vielfach unter der jeweiligen Bestimmungsgrenze ( $\sim 8 - 18 \mu\text{g}/\text{kg}$  FG) oder, in seltenen Fällen im Bereich zwischen  $\sim 30$  (iso-CTC, DC),  $\sim 60$  (DMC, CTC) und maximal  $95 \mu\text{g}/\text{kg}$  FG (iso-CTC). Es ist anzunehmen, dass eine äußere Kontamination des Getreides durch Staub- bzw. Bodenpartikel vernachlässigbar ist, so dass die nachgewiesenen Spuren an TC, CTC und auch iso-CTC weitgehend auf einen Transfer von Tetracyclinen aus güllebeaufschlagten Böden in die Pflanze zurückzuführen sind.

Es wurde festgestellt, dass nur in der Ernte 2005 (Kreise Borken, Coesfeld und Warendorf) ein Zusammenhang zwischen angegebener Medikamentierung an Tetracyclinen (s. Anh.2)

und nachgewiesenen Tetracyclin-Gehalten (s.Tab. 26) in Boden und Korn erkennbar ist. Im Getreide der Erntezeit 2006, das den Kreisen Borken und Coesfeld entstammt (Winterweizen, Gerste und Triticale), wurden keine positiven Tetracyclin-Befunde festgestellt. Ungeklärt bleiben sowohl die relativ hohen Gehalte an DMC im Winterweizen der Erntezeit 2005 aus dem Kreis Borken als auch die Befunde an DC in drei Proben aus Niedersachsen. Ob Metabolisierung in Boden und/oder in Pflanze stattfinden kann, ist in weiteren Untersuchungen zu klären. Die ermittelte, sehr heterogene Kontamination des Getreides der beiden Erntezeiten könnte möglicherweise besser erklärt werden, falls mehr Informationen über Kenngrößen und Daten, wie z.B. zu Güllebelastung und Witterungseinflüssen zur Verfügung gestanden hätten.

Insgesamt ergab sich für die Erntezeiten 2005 und 2006 ein heterogenes Belastungsprofil. Es wurden Punktbelastungen festgestellt, d.h., dass keine flächendeckende Belastung an Tetracyclinen vorlag. Die Negativbefunde im Kreis Borken könnten zu einem Großteil darauf zurückgeführt werden, dass diese Betriebe in 2006 - im Unterschied zu 2005 – nach eigenen Angaben weniger Tetracycline angewendet hatten (s. Anh.2), was aber nicht für den Kreis Coesfeld zutrifft (s. Tab. 28). Ob besondere Bodenverhältnisse sowie Wetterbedingungen den Transfer Boden-Pflanze und/oder den Transport in den Getreidepflanzen bis ins Korn verhindert haben, bleibt ungeklärt.

In der vorangegangenen Antiinfektiva-Modellstudie war ein Transfer von CTC und iso-CTC in die Getreidepflanze auf den Versuchsflächen nachweisbar, die zweimal organisch (mit definiert Antibiotika-haltiger Gülle) gedüngt worden waren [75]. Daraus wurde gefolgert, dass auch in der landwirtschaftlichen Praxis ein Antibiotikatransfer möglich ist. Die Ergebnisse der Screening-Studie bestätigen, dass auch unter den Bedingungen der konventionellen Landwirtschaft CTC-Rückstände im Boden pflanzenverfügbar sind und damit auch ein Transportpfad in die Nahrungskette besteht. Jedoch tritt ein derartiger Transfereffekt unter bestimmten, noch nicht definierbaren Bedingungen auf.

#### **7.4 Untersuchung von handelsüblichen Weizenproben aus Niedersachsen**

Im Rahmen eines Monitorings der niedersächsischen Mühlen wurden handelsübliche Getreide und Getreidemahlerzeugnisse auf Antibiotikarückstände analysiert.

Handelsübliche Weizenmehle sind Produkte aus Auszugsmehl. Sie werden zur Herstellung von Back- und Teigwaren, die im täglichen Alltag genutzt werden, verwendet. Die Typenangabe der Mehle richtet sich nach der Mehltypenregelung der DIN 10355. Die Typenzahl gibt dabei den Mineralstoffgehalt in Milligramm pro 100 Gramm der Trockenmasse des Mehls an. Die Mineralstoffgehalte dürfen sich dabei in bestimmten Bandbreiten bewegen. Das hier untersuchte Weizenmehl vom Typ 550 darf z.B. einen Mineralstoffgehalt von 500 bis 630 mg pro 100 g Trockenmasse aufweisen.

Die Analyse von handelsüblichen Weizenproben dient dazu, die Rückstandssituation im Getreidewirtschaftsjahr 2008-2009 sowohl in Getreide als auch Getreidemahlerzeugnissen zu überprüfen. Die aus der Screening-Studie gewonnenen Erkenntnisse wurden dabei auf die rückstandsanalytischen Untersuchungen der unter Freilandbedingungen gewachsenen Getreidepflanzen angewendet.

#### **7.4.1 Probengewinnung**

Die analysierten handelsüblichen Weizenproben entstammen fünf verschiedenen Mühlen aus Niedersachsen. Insgesamt wurden 46 Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb des Jahres 2008 (Herbst 2008, Winter und Frühsommer 2009) auf Antibiotikarückstände untersucht. Es standen Weizenproben in Form von Korn, Kleie oder Mehl zur Verfügung. Dabei handelte es sich um:

- Weizengetreide, gereinigt (Probenanzahl= 36)
- Weizenmehl vom Typ 550 (Probenanzahl= 6)
- Weizenkleie (Probenanzahl= 4)

Zusätzlich wurden 4 Weizenproben außerhalb des Monitoringsprogramms untersucht. Diese Proben stammten aus Anbaugebieten mit Gülleausbringung und flossen als sogenannte „Verdachtsproben“ in die Untersuchungen ein. Die entsprechenden Weizenpartien sind von den im Monitoring teilnehmenden Mühlen nicht verarbeitet worden.

Die Weizenproben (Korn, Kleie, Mehl) wurden bis zur Analyse bei Raumtemperatur bis zu 9 Monate gelagert.

#### ***Mahlen und Sieben***

Die bei RT gelagerten Weizenproben (Korn, Mehl, Kleie) wurden zuerst in verschiedenen Schritten (Mahlen und Sieben) homogenisiert.

##### *Weizenkorn*

Die handelsüblichen Weizenproben wurden mit der in Anh.1.5.2.2 beschriebenen Methode (Mahlen und Sieben) homogenisiert und zur Extraktion eingesetzt.

##### *Weizenmehl*

Makroskopisch war zu erkennen, dass die Weizenmehle viel feiner als die nach der Hausmethode (mit der Labor-Mörsermühle) gemahlene und gesiebte Weizenmehle (Partikelgröße:  $d \leq 0,106$  mm) waren. Diese Mehle wurden daher ohne weitere Homogenisierung direkt zur Extraktion eingesetzt.

*Weizenkleie*

Die Kleieproben wurden nach der in Anh.1.5.2.2 beschriebenen Methode zuerst gesiebt (ohne Mahlen). Anschließend wurde das gesiebte Mehl ( $d \leq 0,106$  mm) zur Extraktion eingesetzt.

Des Weiteren wurde die aus der Screening-Studie abgeleitete Analysenmethode (s. Anh.1.5.2) auf die rückstandsanalytischen Untersuchungen der handelsüblichen Weizenproben angewendet.

**7.4.2 Ergebnisse der Analysen von handelsüblichen Weizenproben**

Von den insgesamt 46 Getreideproben wurden in drei Weizenproben (Korn) ENR und in einer Weizenprobe (Korn) OTC oberhalb der Nachweisgrenze detektiert. Die detektierten massenchromatographischen Signale sind zwar von geringer Intensität, geben aber im niedrig- und insbesondere im hochauflösenden MS quantitative Hinweise auf ENR (BG > 20,8 µg/kg für ENR, s. Tab. 22). Demgegenüber waren keine Antibiotikarückstände in Weizenmehl und Weizenkleie nachweisbar. Die positiven Befunde sind in der Tab. 30 aufgeführt.

**Tab. 30:** Gehalte an Antibiotikarückständen in handelsüblichen Weizenproben

Probenbezeichnung	Analyt	Gehalt [µg/kg]
HW-12	ENR	30,1
HW-14		32,7
HW-04		<BG
HW-36	OTC	<BG

Die Quantifizierung wurde anhand von matrixkalibrierten Referenzstandards vorgenommen. In drei analysierten Weizengetreideproben (HW-12, HW-14, HW-04) war das Antibiotikum ENR nachweisbar: In der Probe HW-14 ein Gehalt von 32,7 µg/kg und in HW-12 ein Gehalt von 30,1 µg/kg. In der Probe HW-04 lag der ENR-Gehalt unter der Bestimmungsgrenze wie auch für OTC in der Probe HW-36.

Weiterhin ist festzuhalten, dass in Kleie verschiedener Weizenproben HW-12, HW-14, HW-04, HW-36 keine Antibiotika-Rückstände gefunden wurden, obwohl ENR in dem Mehl nachweisbar war, das mit der Labormühle gemahlen worden war. Verschleppungen bzw. Kontaminationen sind auszuschließen.

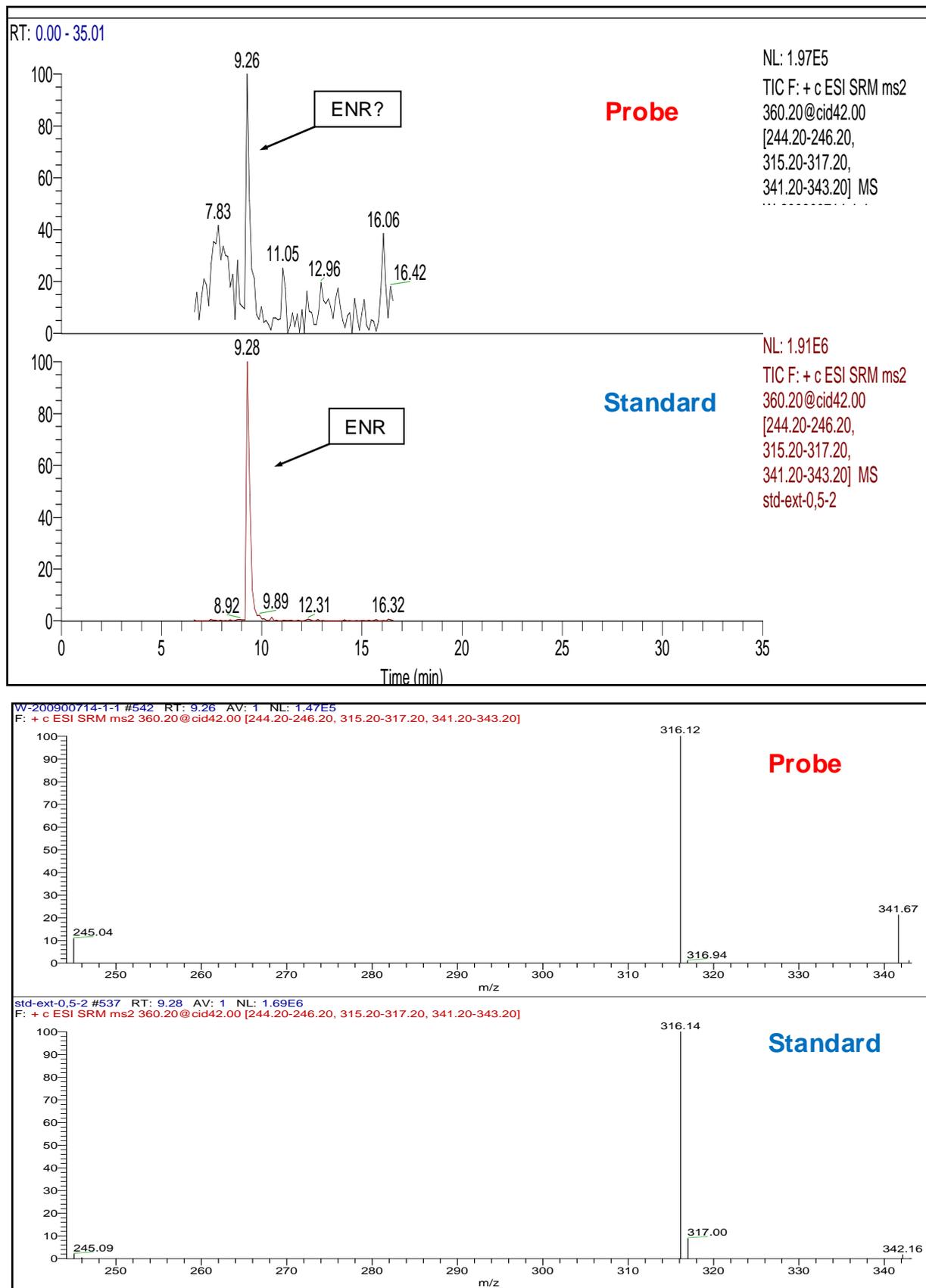
Schon visuell war zu erkennen, dass die konventionellen Weizenmehle (Typ 550) viel feiner und heller waren als die selbst gemahlene Weizenmehle (mit Labormühle). Das Weizenmehl vom Typ 550 wird erheblich stärker ausgemahlen, somit ist möglicherweise die

Extrahierbarkeit von Matrixbestandteilen beim Mehl Typ 550 besser als bei selbst gemahlenem Mehl. Wie im Kap. 7.2 beschrieben, können die Matrixbestandteile bei der Analyse mit LC-MS zu negativen Befunde führen, z.B. durch Unterdrückung der Signale (Suppression). In der Literatur lagen die Werte der Ionenunterdrückung in Wasserextrakten für ENR bei 23-31 %, für SFM betragen diese 12-27 % [28]. Auch in dieser Arbeit wurde für ENR eine deutliche Suppression des Signals (SFD>ENR>TC) durch Matrixbestandteile festgestellt. Daher wären Suppression-Effekte als mögliche Ursachen der negativen Befunde in den Kleieproben denkbar.

### **7.4.3 Positiver Enrofloxacin-Befund**

#### ***Identifizierung und Quantifizierung mit niedrig auflösender MS (LC-MS)***

In der Abb. 41 sind als Beispiel die Massenchromatogramme und MS-Spektren der Weizenprobe (HW-14) dargestellt, wobei ENR nachweisbar war: Die Identifizierung von ENR mit niedrig auflösender MS (LC-MS/MS) erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und der MS-Spektren sowie der Produkt-Ionen-Intensitäten mit Standard nach Anhang I der Richtlinie 96/23/EG [268].



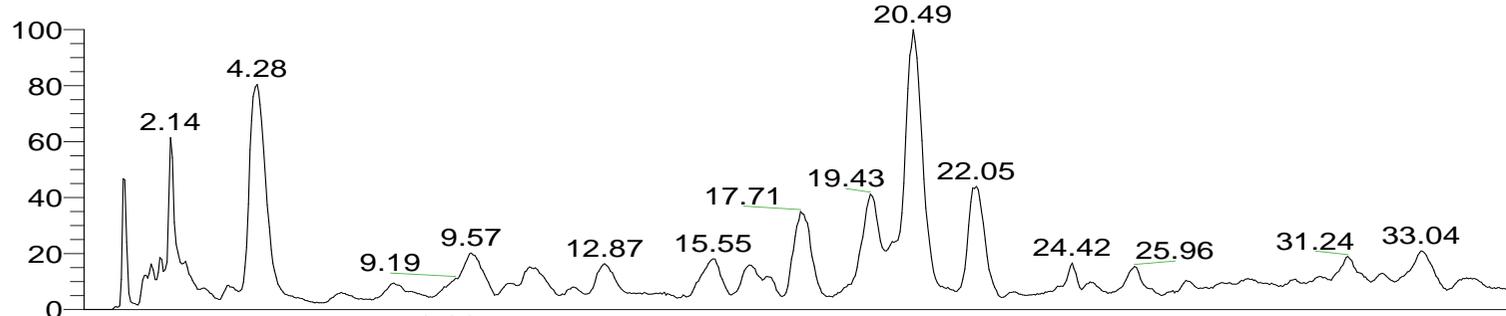
**Abb. 41:** Vergleich der Massenchromatogramme und -spektren der HW-14-Weizenprobe (oben) mit dem ENR-Standard (unten): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

ENR besitzt im positiven ESI-Modus ein Precursor-Ion mit dem m/z-Verhältnis 360,2 (s.Tab. 13). Der MS<sup>2</sup>-Scan liefert drei Produkt-Ionen: 316,1 m/z und 342,0 m/z und 245,0 m/z. Wenn man die relativen Intensitäten der Produkt-Ionen in der Weizenprobe (21 % für 341,67 m/z) und im Standard (<2 % für 342,16 m/z) miteinander vergleicht, stellt man fest, dass die Abweichung der relativen Intensitäten bei 20 % liegt und damit unter dem Toleranzwert von 50 % (s. Kap.6.4.4). Jedoch stimmen die m/z-Verhältnisse der Produkt-Ionen dieses Probenbestandteils nicht mit denen der Standardsubstanz überein. Die Massenabweichung von ENR in der Weizenprobe (341,67 m/z) und im Standard (342,16 m/z) ist 0,14. Somit ist die Identifizierung von ENR in Probe HW-14 des handelsüblichen Weizens mit dem niedrig auflösenden LC-MS-Verfahren nicht hinreichend gesichert. Zur Absicherung war eine zusätzliche Analyse von dieser Weizenprobe mit hochauflösender MS nötig.

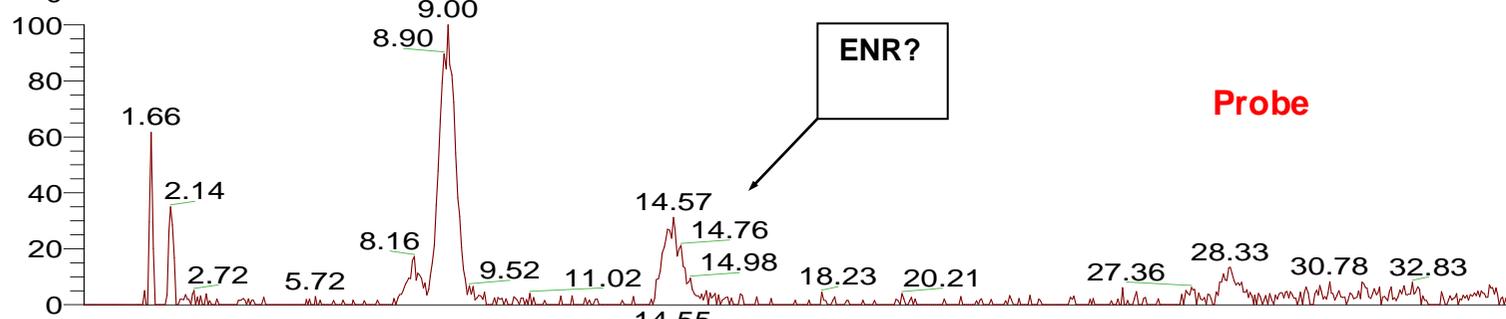
#### ***Bestätigung positiver Befunde mit hochauflösender MS (FTICR-MS)***

In Abb. 42 sind die Massenchromatogramme von ENR in der Probe und im Standard sowie die MS-Spektren des ENR-Signals in der Probe und die berechneten MS-Werte für ENR dargestellt.

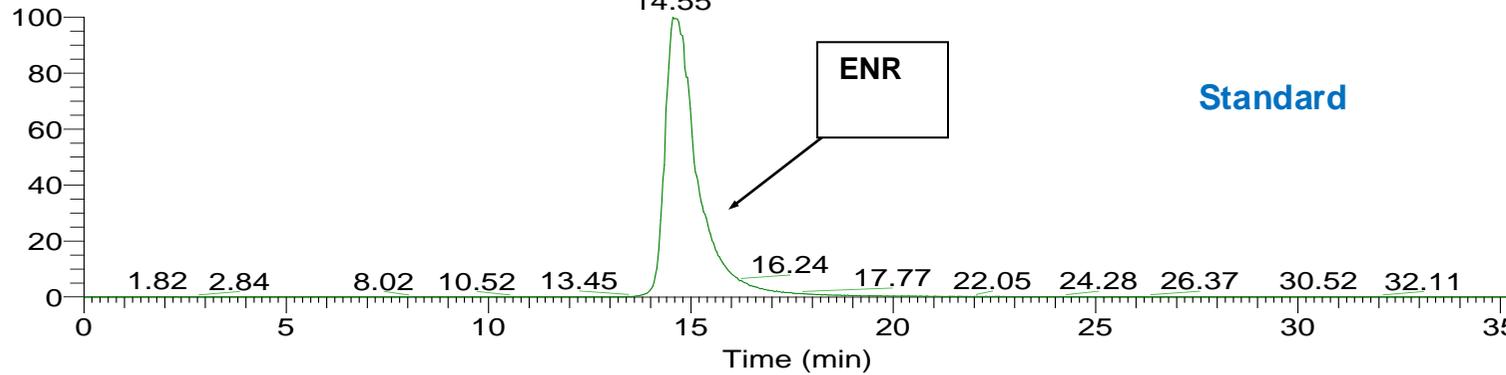
RT: 0.00 - 35.28



NL: 9.16E5  
 TIC F: FTMS + p  
 ESI Full ms  
 [358.00-368.00] MS  
 090617-45

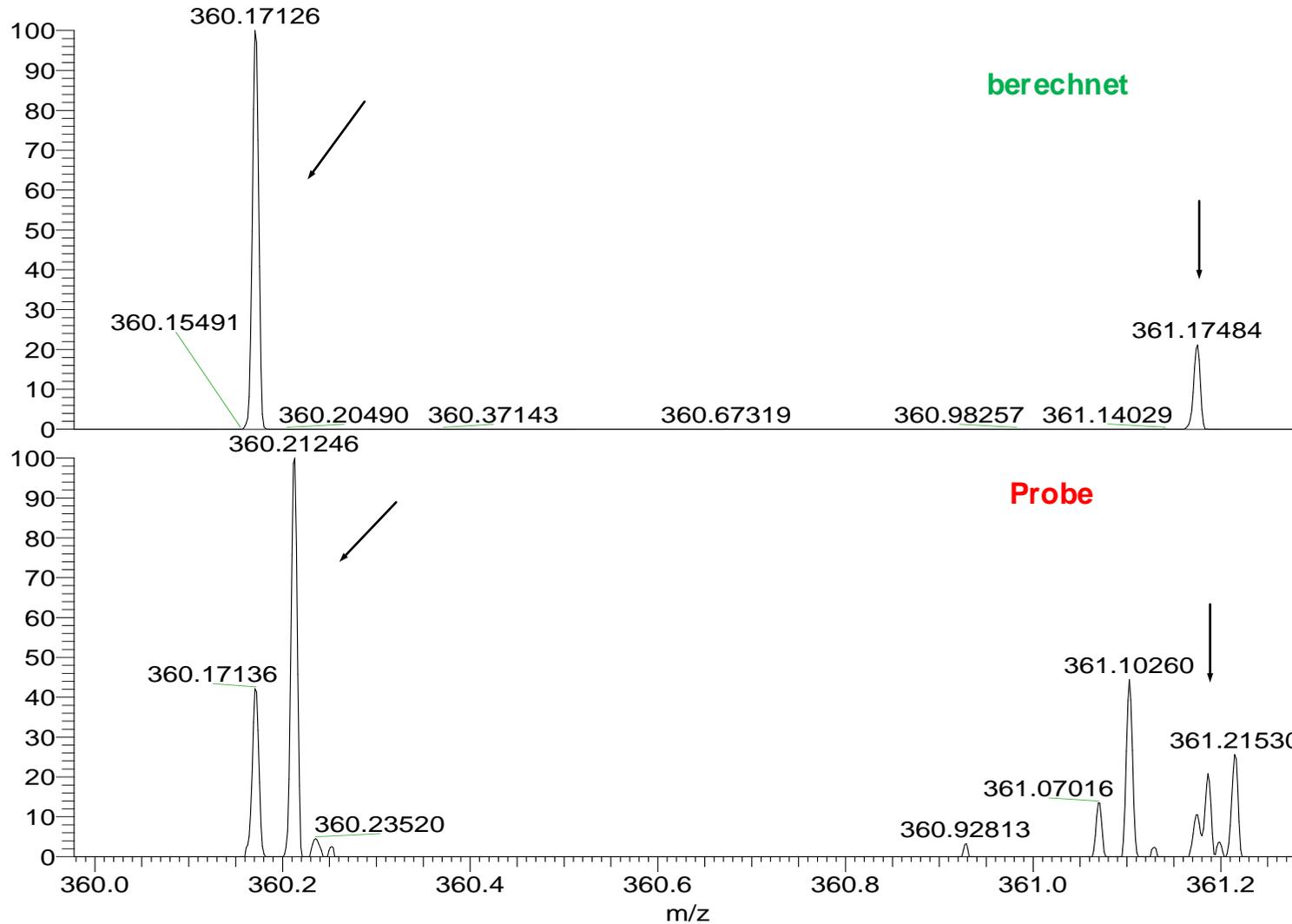


NL: 7.08E3  
 m/z=  
 360.16460-  
 360.17900 F: FTMS  
 + p ESI Full ms  
 [358.00-368.00] MS  
 090617-45



NL: 4.92E5  
 m/z=  
 360.16460-  
 360.17900 F: FTMS  
 + p ESI Full ms  
 [358.00-368.00] MS  
 090617-09

**Abb. 42:** Vergleich der Massenchromatogramme der HW-14-Weizenprobe (oben) mit dem ENR-Standard (unten): FTICR MS (HR-MS), Full Scan



NL: 4.84E5  
 090617-09#503  
 RT: 14.55 AV: 1  
 F: FTMS + p ESI  
 Full ms  
 [358.00-368.00]

NL: 4.46E3  
 090617-45#1089  
 RT: 14.42 AV: 1  
 F: FTMS + p ESI  
 Full ms  
 [358.00-368.00]

**Abb. 43:** Vergleich des gemessenen Massenspektrums der HW-14-Weizenprobe bei 14,42 min (unten) mit dem berechneten Massenspektrum von ENR mit  $m/z = 360,17126$  (oben): FTICR MS (HR-MS), Full Scan

Die Abb. 43 zeigt, dass die Retentionszeit, die exakte Masse sowie die MS/MS Fragmente übereinstimmen. Zusätzliche Signale resultieren aus der in der Ionenfalle ko-isolierten Substanz mit  $m/z=316,21246$ . Somit wurde der positive Befund an ENR in der handelsüblichen Weizenprobe (HW-14) bestätigt.

### 7.5 Zeitliche Veränderung der Antibiotika-Gehalte in belastetem Getreide

Folgende Faktoren können eine Konzentrationsabnahme von Antibiotikawirkstoffen mit der Zeit in Pflanzenproben verursachen [269]:

- chemischer Abbau
- Sorption an Matrixbestandteile

Tetracycline unterliegen in den verschiedenen Umweltkompartimenten (z.B. Gülle, Boden) vorkommenden biotischen und abiotischen Abbauprozessen. Neben diesem Abbau der Wirkstoffe kann zusätzlich auch eine Adsorption an Matrixpartikeln (z.B. an Bodenpartikeln) erfolgen. Dies kann deren nachweisbaren Gehalt im Laufe der Zeit vermindern.

In welchem Umfang Antibiotikawirkstoffe in Getreide (biotisch und abiotisch) abgebaut und/oder an der Matrix sorbiert werden können, ist anhand der Literatur nicht abzuschätzen, da keine Daten vorliegen. Es ist aber bekannt, dass Xenobiotika durch Photolyse und Hydrolyse in der Pflanze abgebaut werden [191, 270, 271]. Abbauprozesse während der Probenlagerung führen zur Bildung weiterer Produkte, was sich im Auftreten neuer Peaks mit anderen Retentionszeiten äußerte. Andererseits können Pflanzenschutzmittel nach der Aufnahme von Pflanzen in der Vakuole gespeichert oder an schwerlösliche Zellbestandteile, insbesondere Lignin, gebunden werden. Dies kann zu gebundenen Rückständen in der Pflanze führen, die nur schwer zu extrahieren und dadurch schwer direkt nachzuweisen sind [272].

#### **Wiederholversuche**

Um zu klären, ob die oben aufgeführten Effekte auch bei den bereits analysierten Getreideproben aufgetreten waren, wurden ausgewählte Proben mit Positiv-Befunden erneut untersucht.

#### *Stabilität von Doxycyclin in Weizenproben*

Hierzu wurde die Analyse der NS1 b)- und NS2-Winterweizenproben aus der Ernte 2006 nach 24 monatiger Lagerung bei RT entsprechend der Arbeitsvorschrift (s. Anh.1.5.2) wiederholt. Bei diesen zwei Winterweizenproben handelt es sich um Proben, in denen DC nachgewiesen wurde (s. Kap.7.1.2.2). In Tab. 31 sind die Ergebnisse dargestellt.

**Tab. 31:** Untersuchung zur Langzeit-Stabilität von Tetracyclinen in NS1 b)- und NS2 Winterweizenproben aus der Ernte 2006 (Lagerung bei RT, Lagerungszeit: 24 Monate)

Probe	Bezeichnung	gemahlen und gesiebt am	aufgearbeitet am	gemessen am	Befunde DC+e-DC
NS1 b)	NS1 b)-1-W	10.06.07	13.06.07	13.06.07	31 µg/kg
	NS1 b)-2-W	10.06.07	28.04.09	28.04.09	< NWG
	NS1 b)-3-W	11.05.09	11.05.09	11.05.09	< NWG
NS2	NS2-1-W	10.06.07	13.06.07	13.06.07	<BG
	NS2-2-W	10.06.07	28.04.09	28.04.09	< NWG
	NS2-3-W	11.05.09	11.05.09	11.05.09	< NWG

Die erste Analyse der Proben NS1 b)-1-W und NS2-1-W zeigte einen positiven DC-Befund. Der Gehalt an DC in der Weizenprobe NS1 b)-1-W liegt bei 31 µg/kg. Demgegenüber sind in dieser Probe nach einer 24-monatigen Lagerung bei Raumtemperatur kein DC und e-DC mehr nachweisbar (<NWG).

#### *Stabilität von Enrofloxacin in Weizenproben*

Im Rahmen dieser Wiederholanalysen wurden vier Kleieproben aus handelsüblichem Winterweizen analysiert. Bei diesen Kleieproben handelt es sich um die Proben mit positivem ENR-Befund (s. Seite 112, Tab. 30).

**Tab. 32:** Untersuchung zur Langzeit-Stabilität von ENR in Winterweizenproben aus handelsüblichen Weizenproben (Lagerung bei RT, Lagerungszeit ca. 5 Woche)

Probe		gemahlen, gesiebt und gemessen am	Befunde an ENR
HW-14	Weizen-1	10.05.09	32,7 µg/kg
	Weizen-2	04.07.09	<BG
HW-12	Weizen-1	10.05.09	30,1 µg/kg
	Weizen-2	04.07.09	<NWG
HW-04	Weizen-1	10.05.09	<BG
	Weizen-2	04.07.09	<NWG
HW-09	Weizen-1	10.05.09	<BG
	Weizen-2	04.07.09	<NWG

Die in Tab. 32 aufgeführten Ergebnisse lassen erkennen, dass ENR bei der ersten Analyse quantifizierbar war (32,7 µg/kg und 30,1 µg/kg). Demgegenüber lag der Gehalt an ENR

bereits nach fünf Wochen unterhalb der Bestimmungsgrenze (15 µg/kg). Eine Konzentrationsabnahme war auch bei den anderen Weizenproben zu beobachten.

Ob die Konzentrationsabnahme der Substanzen DC und ENR in diesen Getreidematrices auf Abbau- und/oder auf Sorptionsprozesse zurückzuführen ist, bleibt zurzeit jedoch ungeklärt.

### **Fazit**

Aus den Analyseergebnissen der handelsüblichen Weizenproben kann vorerst abgeleitet werden, dass ENR und OTC (OTC wurde mit hochauflösender MS nicht bestätigt) bei Getreide nur vereinzelt in geringsten Spuren nachgewiesen wurden. Das zeigt erneut, dass ein Transfer von Tierarzneimittelrückständen über den Pfad Wirtschaftsdünger-Boden in die Nutzpflanze möglich ist. Offensichtlich haben die Lagerungsbedingungen (Dauer, Temperatur) einen Einfluß auf die ursprünglichen Antibiotika-Gehalte des Getreides. So lag der Antibiotika-Gehalt nach fünf Wochen unterhalb der Bestimmungsgrenze im Rahmen des Monitorings. Belastetes Getreide aus der Screening-Studie zeigte nach 24 Monaten auch ein Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze (s. Tab. 31). Ursächlich zu diskutieren sind zeitabhängige Effekte, wie der chemische Abbau der Antibiotikaspuren und Sorption an die Korn-Matrix.

## 8 UNTERSUCHUNG ZUR AUFNAHME VON VETERINÄRANTIBIOTIKA IN GEMÜSE

Bei der Untersuchung zur Aufnahme von Veterinärantibiotika in Gemüse wurde im Sinne des vorsorgenden Verbraucherschutzes im Rahmen dieses „Gemüse-Projektes“ (MUNLV) [220] das Aufnahmepotential von Weißkohl und Porree für verordnungsstarke Wirkstoffe (und ihre Hauptmetabolite) aus der Nutztierhaltung über Dotierungsexperimente in Hydrokultur untersucht. Weiterhin war geplant, rückstandsanalytische Daten über die Belastungssituation von Gemüse zu ermitteln, das in landwirtschaftlicher Praxis angebaut wird.

### 8.1 Aufnahmeexperimente in Hydrokultur

Bei der Durchführung des Antiinfektiva-Vorprojektes [75] hatten sich Experimente in Hydrokultur als methodisch äußerst vorteilhaft erwiesen. Denn dieses relativ einfache System „Hydrokultur“ ist ohne Wechselwirkung mit Bodenpartikeln geeignet, das Potential von Pflanzen zur Aufnahme von Veterinärpharmaka zu zeigen. Andererseits steht mit der Anzucht von Gemüse auf Hydrokultur geeignetes Probenmaterial zur Verfügung, um die Rückstandsanalytik zu entwickeln, zu optimieren und in der Pflanze gebildete Metabolite zu identifizieren. Schließlich sollten die aus den Aufnahmeversuchen in Hydrokultur gewonnenen Erkenntnisse auf die rückstandsanalytischen Untersuchungen der unter Freilandbedingungen gewachsenen Gemüsepflanzen angewendet werden.

Um die Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen analysieren zu können, mussten zuerst geeignete Pflanzen herangezogen werden. Ausgewählt wurden dazu Porree und Weißkohl. Diese Pflanzen entstammen unterschiedlichen Nutzpflanzenarten und decken damit stellvertretend einen großen Teil unserer landwirtschaftlichen Nutzpflanzen ab, die mit Gülle gedüngt werden (s. Kap.2.2).

Bei den Hydrokulturen wurden der Nährlösung verschiedene Antibiotikawirkstoffe in einer Konzentration von 5 µmol/L zugesetzt. Exemplarisch wurden dazu die Wirkstoffe Sulfadiazin (SFD), Enrofloxacin (ENR), Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin (CTC) und Monensin (MON) ausgewählt. Außerdem wurden in jeder Versuchsreihe auch Pflanzen angezogen, die keinen Antibiotika-Zusatz in der Nährlösung erhielten. Diese Kontrollproben wurden bei der Rückstandsanalytik, insbesondere bei den Matrixkalibrierungen und bei den Versuchen zu Wiederfindung benötigt. Nach der Ernte wurden diese Pflanzen analysiert und die aufgenommenen Mengen an Antibiotika ermittelt. Jedoch können die Wirkstoffe, die an die Zellwände der Pflanzenzellen gebunden und damit immobilisiert sind, nicht erfasst werden.

Die Anzucht dieser Versuchspflanzen sowie die Dotierung für diese Aufnahmeexperimente fanden an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel BfEL, Karlsruhe im Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln am Standort Detmold (seit Januar 2008: Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide) unter Leitung von Dr. Langenkämper statt.

Die Entwicklung der Pflanzen wurde visuell und anhand der Biomassen verfolgt. In beiden Aufnahmeexperimenten wurden nach ein- bis zweiwöchigem Wachstum der Pflanzen auf antibiotikahaltiger Nährlösung die Pflanzenproben gewonnen. Diese wurden mit der im Anh. 1.5.3 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels LC-MS (ESI-Ion Trap an der Universität Paderborn) analysiert. Die Bestätigungsanalysen mittels FTICR-MS wurden am ISAS - Dortmund durchgeführt.

### **8.1.1 Anzucht der Pflanzen**

#### ***Keimung und Wachstumbedingungen***

Die Porree- und Weißkohlsamen wurden zur Steigerung der Keimungsrate für 5 bis 10 Tage inkubiert. Die Auskeimung der Samen erfolgte in so genannten „Sandwiches“, die aus zwei äußeren Schaumstoffschichten und zwei inneren Filterpapierschichten bestanden, zwischen denen die Samen in einzelnen Lagen aufgebracht wurden. Bei der Keimung der Samen wurde besonders darauf geachtet, dass sich die bildenden Wurzeln ohne Beschädigungen entwickeln und möglichst nicht verschimmeln können. Keimlinge von Sprosslänge wurden auf Nährlösung in die Pflanzenwuchskammer transferiert. Es wurde sichergestellt, dass die Wurzeln in die Nährlösung eintauchen. Die so größer gewordenen Pflanzen wurden später in einem Pflanzenwuchsschrank angezogen. Diese Nährlösung wurde mit Hilfe von Aquarienpumpen und Silikonschläuchen belüftet. Nähere experimentelle Angaben zur Anzucht und Entwicklung finden sich im Anhang 1.5.3.1.

#### ***Anzucht von Porree***

Die Wuchszeit des gekeimten Porrees (*Allium porrum* L., cv. Shelton, F1, Hild Samen GmbH, Marbach) betrug 50 Tage. Während dieser Zeit wurde die Nährlösung zweimal vollständig gewechselt, ansonsten wurde verbrauchte Nährlösung nachgefüllt. Die Nährlösung und die Wurzeln wurden regelmäßig visuell auf Kontamination durch Pilzbewuchs kontrolliert. Pflanzen mit pilzbefallenen Wurzeln wurden entfernt. Nach 50 Wachstumstagen in der Pflanzenwuchskammer schlossen sich die Dotierungsexperimente mit Antibiotika an.

#### ***Anzucht von Weißkohl***

Gekeimter Weißkohl (*Brassica oleracea*, L., cv. Lennox, F1, Bejo Saaten, Niederlande) wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen angezogen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die äußeren Blätter die maximale Größe erreicht, die Kohlkopfbildung hatte jedoch noch nicht eingesetzt. Während der Aufzuchtphase wurde die Nährlösung einmal vollständig gewechselt, ansonsten wurde verbrauchte Nährlösung nachgefüllt. Eine Kontrolle der Wurzeln auf Pilzbefall wurde wie bei der Porreeaufzucht durchgeführt. Die

Dotierungsexperimente mit Antibiotika erfolgten nach 21 Wachstumstagen in der Pflanzenwuchskammer.

### **8.1.2 Zudotierung der Antibiotika**

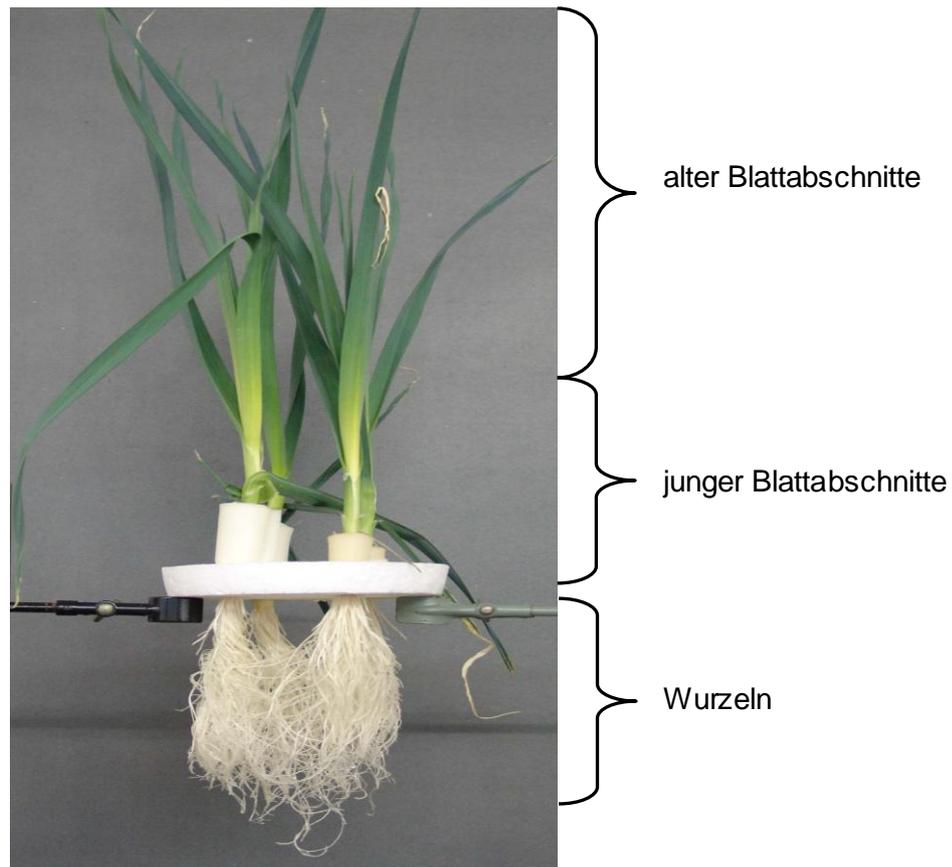
Die Dotierung der Pflanzen erfolgte nach den oben angegebenen Wachstumszeiten bei mittlerem Wachstumsstand durch die Zugabe von Antibiotikum-Stammlösungen zur Nährlösung (s. Anh.1.4). Alle ausgewählten Wirkstoffe wurden einzeln den Nährlösungen zugesetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Nährlösungen alle zwei Tage gewechselt, wobei regelmäßig wieder die entsprechende Menge in die Nährlösung pipettiert wurde. Die Pflanzen wuchsen also bis zur Probennahme in dotierter Nährlösung mit bekannter Antibiotikakonzentration. Es wurden immer parallel Pflanzen mit Antibiotikazusatz und Kontrollpflanzen ohne Antibiotikazusatz herangezogen. Die Zusammenstellung der zugesetzten Mengen an Antibiotika in die Nährlösung findet sich im Anhang 1.5.3.1.

### **8.1.3 Ernte und Lagerung**

Nach ein- bis zweiwöchigem Wuchs auf dotierter Nährlösung wurden die Pflanzen entnommen und alle Teile, die vorher direkten Kontakt mit der dotierten Nährlösung hatten (vor allem die Wurzeln und unteren Stammbereiche) mittels  $K_2SO_4$ -Lösung gründlich abgespült sowie mit Haushaltspapier getrocknet. Die Pflanzen wurden in Blätter und Wurzeln getrennt, wobei der Bereich des Überganges zwischen Wurzeln und Blättern verworfen wurde, um sicherzustellen, dass kein Wurzelmaterial ins Blattmaterial gelangt. Das Pflanzenmaterial wurde in Stücke zerschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die weitere Bioaktivität und somit einen möglichen Abbau sowie mögliche Umwandlungsprozesse der Wirkstoffe zu verhindern. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

**Porree**

Abb. 44 zeigt die Pflanzenteile von Porree, die beprobt wurden.

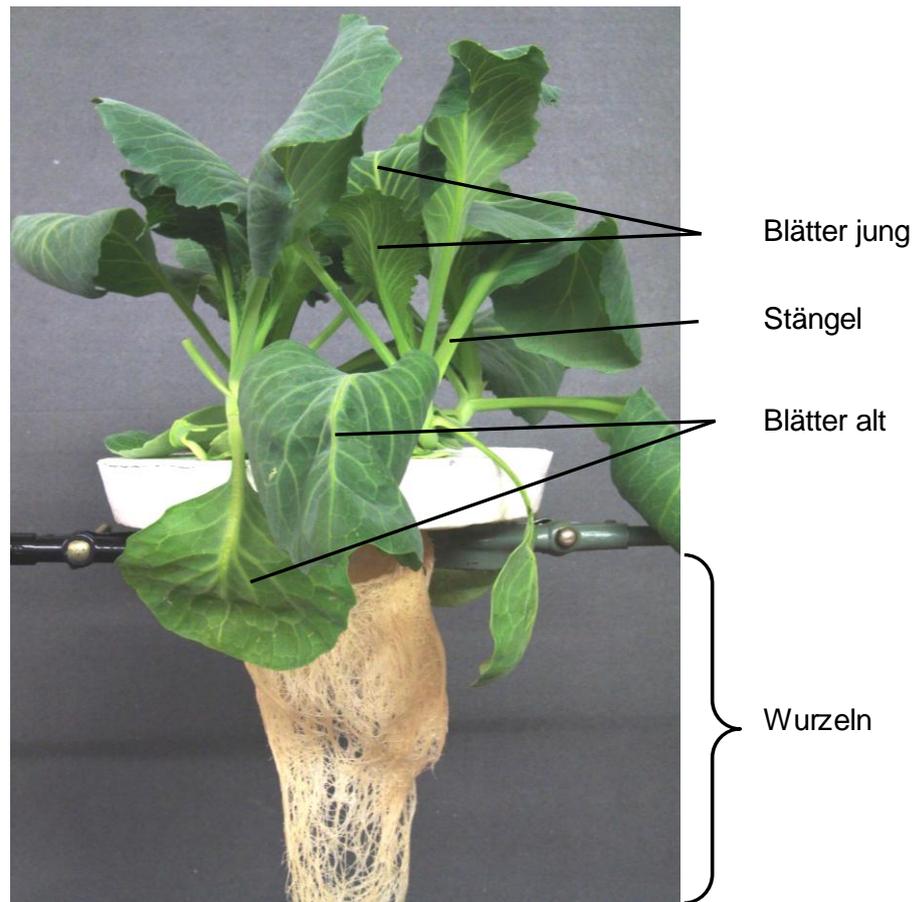


**Abb. 44:** Porreepflanzenteile, die als separate Proben genommen und analysiert wurden (Foto [273])

Zur Unterscheidung von jüngeren und älteren Blattabschnitten sowie Wurzeln wurden diese separat analysiert. Die direkte Übergangszone von ca. 1 cm Stärke zwischen Wurzeln und jungem Blattabschnitt wurde verworfen, um eine Kontamination dieser Blattabschnitte durch die Antibiotika-haltige Nährlösung auszuschließen.

### **Weißkohl**

Die Pflanzenteile von Weißkohl, die separat beprobt wurden, sind in Abb. 45 gezeigt.



**Abb. 45:** Weißkohlpflanzenteile, die als separate Proben genommen und analysiert wurden (Foto [273])

Eine Übergangszone von ca. 3 cm Stärke zwischen Wurzeln und Spross wurde verworfen, um eine Kontamination dieser Blattabschnitte durch die Antibiotika-haltige Nährlösung auszuschließen.

### **8.2 Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur**

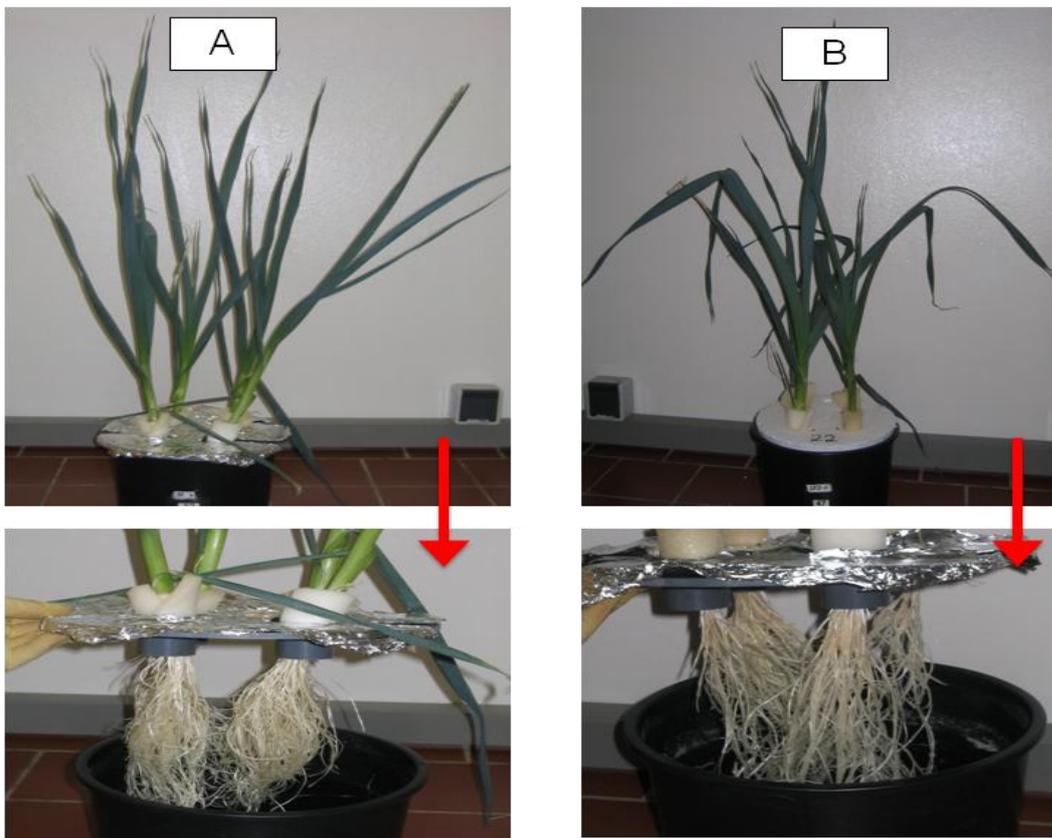
Der jeweilige Verbrauch an Antibiotika-dotierter und undotierter Nährlösung (Kontroll- bzw. Blindprobe) bei der Anzucht der Pflanzen ist im Anhang 4 als Funktion der Zeit graphisch dargestellt. Dabei handelt es sich um den Nährlösungsverbrauch durch die pflanzliche Transpiration. Über einen Kontrolltopf ohne Pflanze wurde die Transpiration von Nährlösung in die Umgebung berücksichtigt. Die Abb. A4 (s. Anh. 4) zeigt, dass die Weißkohlpflanzen mehr Nährlösung verbraucht haben als die Porreepflanzen. Ebenso sind im Anhang 3 die zum Erntezeitpunkt ermittelten Erntegewichte von Weißkohl und Porree aufgeführt.

## 8.2.1 Porree

### 8.2.1.1 Aufnahme von Sulfadiazin

#### *Entwicklung*

Die Kontrollpflanzen sahen vital aus, bildeten viele Wurzeln und die Blattabschnitte wuchsen weiter. Demgegenüber bildeten die Porreepflanzen, welche auf SFD-haltiger Nährlösung weitergezogen wurden, relativ wenig Wurzeln aus. Die Wurzeln waren verschleimt und bekamen eine leicht rosa gefärbte Oberfläche.



**Abb. 46:** Porree 7 Tage nach 50 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

A) Porree-Kontrollversuch, ohne SFD-Dotierung;

B) Porree in 5  $\mu\text{mol/L}$  SFD-haltiger Nährlösung

Wie in Abb. 46 zu sehen ist, schienen die Pflanzen, welche mit SFD dotiert wurden, leicht zu „verkümmern“. Dies machte sich besonders daran bemerkbar, dass sowohl das Pflanzenvolumen, als auch in noch stärkerem Maße der Umfang der Wurzeln stark abnahm und Verfärbungen aufwies. Die hier miteinander verglichenen Pflanzen (Kontrollpflanze und SFD-dotierte Pflanze) zeigen deutliche Unterschiede in Größe und Farbe ihrer Biomasse.

**SFD-Gehalte im Porree**

Die in Porreeproben, welche in dotierter Nährlösung aufwuchsen, gefundenen SFD-Gehalte sind in Tab. 33 angegeben.

**Tab. 33:** SFD-Gehalte im Porree (Hydrokultur)

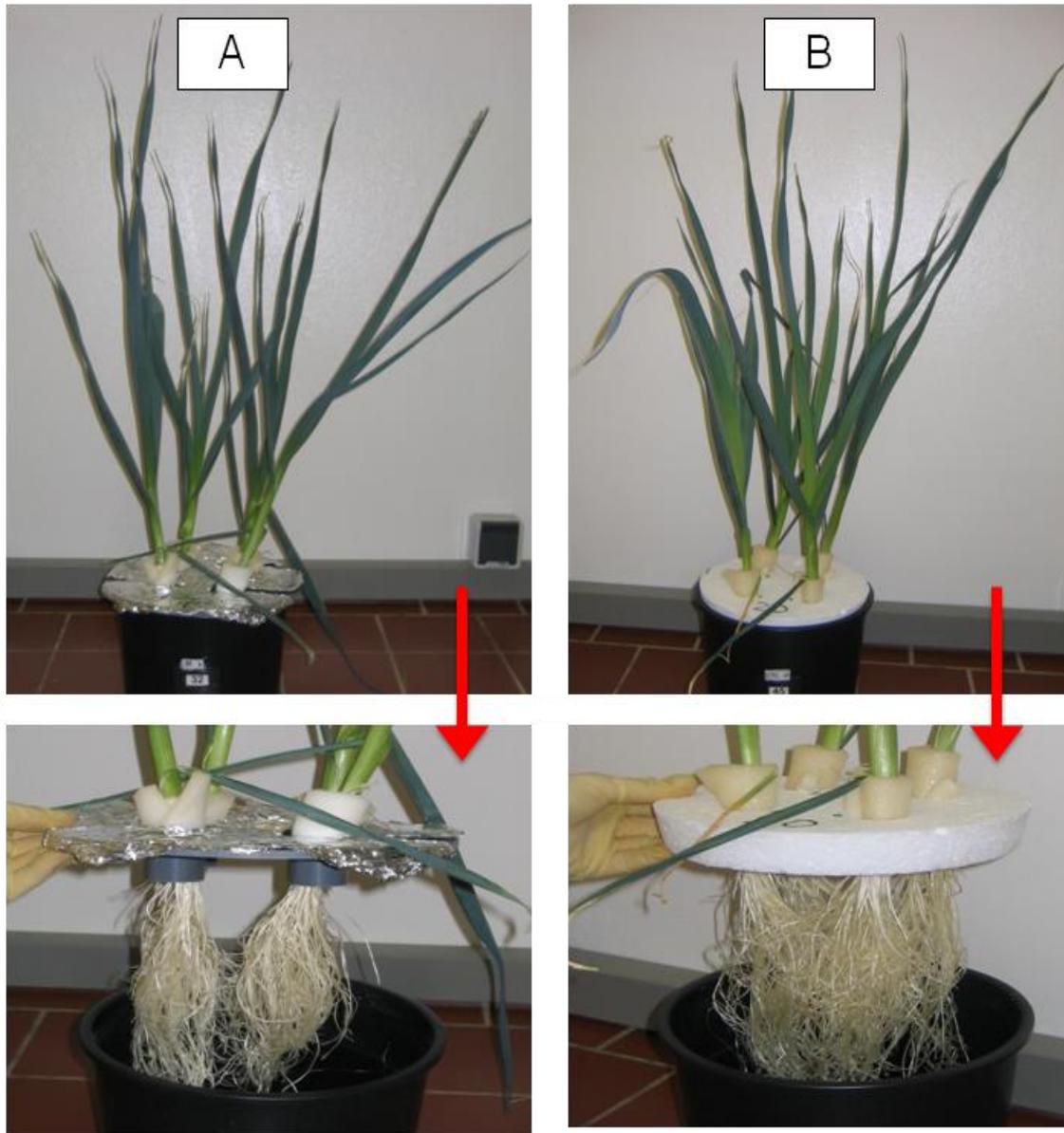
5 µmol/L Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blattabschnitte alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung, n=3, Matrixkalibrierung

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an SFD [µg/kg]
SFD	Blattabschnitte alt	85,1
	Blattabschnitte jung	57,7
	Wurzel	263,6

Es ist festzustellen, dass der Anteil an SFD bezogen auf die verschiedenen Pflanzenteile lediglich in den Wurzeln hoch ist. Scheinbar wurde SFD in den Apoplasten des Porrees festgehalten [186]. Auch dieses lässt sich anhand von Modellrechnungen erklären, da SFD einen  $\log K_{OW}$ -Wert von -0,12 hat (s. Seite 46, Tab. 11).

**8.2.1.2 Aufnahme von Chlortetracyclin****Entwicklung**

Bemerkenswert ist, dass die Porreepflanzen auf CTC-haltiger Nährlösung fast genauso wie die Kontrollpflanzen aussahen. Das heißt, die Porreepflanzen wuchsen auf der CTC-dotierten Nährlösung ebenso in die Länge und bildeten viele Wurzeln. Jedoch war ein schwach ausgeprägter Effekt auf den dotierten Porreepflanzen zu beobachten (Abb. 47).



**Abb. 47:** Porree 7 Tage nach 50 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen  
A) Porree-Kontrollversuch, ohne CTC-Dotierung;  
B) Porree in 5  $\mu\text{mol/L}$  CTC-haltiger Nährlösung

Schwake-Anduschuss beobachtete eine bakterielle Infektion bei Möhrenpflanzen, die auf CTC-dotierter Nährlösung (5  $\mu\text{mol/L}$ ) angezogen wurden [186]. Dieser Effekt war bei den Porreepflanzen nicht zu erkennen.

**CTC-Gehalte im Porree**

In der Tab. 34 sind die ermittelten Gehalte an CTC in den Porreepflanzen aufgeführt.

**Tab. 34:** CTC-Gehalte im Porree (Hydrokultur)

5 µmol/L CTC-Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blattabschnitte alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung, n=3, Matrixkalibrierung. Ergebnisse in µg/kg, **kursiv/fett: mg/kg** FG-Homogenat

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an CTC's						
		CTC	e-keto- CTC	e-enol- CTC	iso- CTC	e-iso- CTC	DMC	e- DMC
CTC	Blattabschnitte alt	125,8	30,1	32,6	38,1	<BG	<BG	<BG
	Blattabschnitte jung	66,2	<BG	<BG	26,7	<BG	<BG	<BG
	Wurzel	<b>14,8</b>	<b>1,9</b>	<b>1,9</b>	<b>1,0</b>	117,8	147,4	39,1

In den Wurzeln des Porrees sind die CTC-Gehalte extrem hoch. In den alten Blattabschnitten sind sie dagegen um Größenordnungen geringer, wobei hier eine „Ablagerung“ in den Apoplastenbereichen (Zellwände) zu vermuten ist (s. Seite 44, Abb. 13) [186].

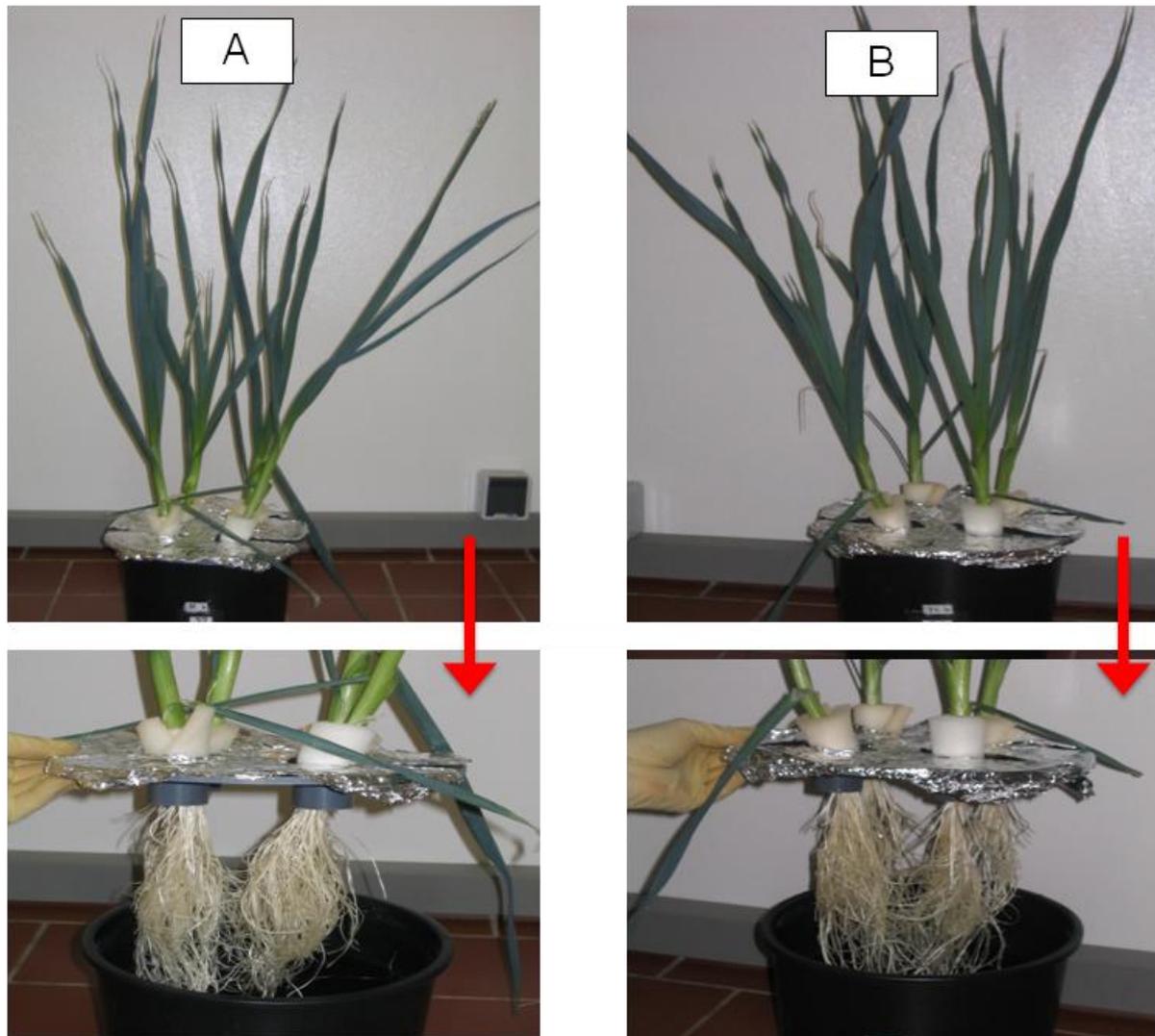
In den jungen Blattabschnitten wurde noch weniger CTC gefunden als in den alten Blattabschnitten. Grote et al. berichteten, dass bei einer Konzentration von 5 µmol/L CTC in der Nährlösung in Stängeln und Blättern von Winterweizen annähernd gleiche Gehalte vorlagen [75]. Dies wurde hier nicht beobachtet.

In den CTC-dotierten Porreepflanzen sind deutlich Anteile von Epimeren und iso-Komponenten sowie Demethylierungsprodukten (DMC, e-DMC) nachweisbar. Der DMC-Gehalt liegt bis auf eine Ausnahme der Wurzelproben immer unter der Bestimmungsgrenze, während CTC im Vergleich zum iso-CTC überwiegt.

### 8.2.1.3 Aufnahme von Tetracyclin

#### Entwicklung

Die Dotierung mit dem TC-Antibiotikum führte nicht zu stark sichtbaren Effekten an den Porreepflanzen (Abb. 48).



**Abb. 48:** Porree 7 Tage nach 50 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

- A) Porree-Kontrollversuch, ohne TC-Dotierung;
- B) Porree in 5 µmol/L TC-haltiger Nährlösung

Es ist allerdings zu beobachten, dass die Blätter der Pflanzen, welche auf TC-haltiger Nährlösung aufwuchsen, verglichen mit den Kontrollpflanzen, einige dunkler grün gefärbte Abschnitte besaßen und auch die Wurzeln sich leicht verfärbt hatten. Ebenfalls waren sie insgesamt in ihrem Wuchs kleiner und bildeten mehr braune Blattspitzen aus als die Kontrollpflanzen.

**TC-Gehalt im Porree**

In den Porreeproben, die mit TC-dotierter Lösung gegossen wurden, wurden die in Tab. 35 angegebenen TC-Gehalte gefunden.

**Tab. 35:** TC-Gehalte im Porree (Hydrokultur)

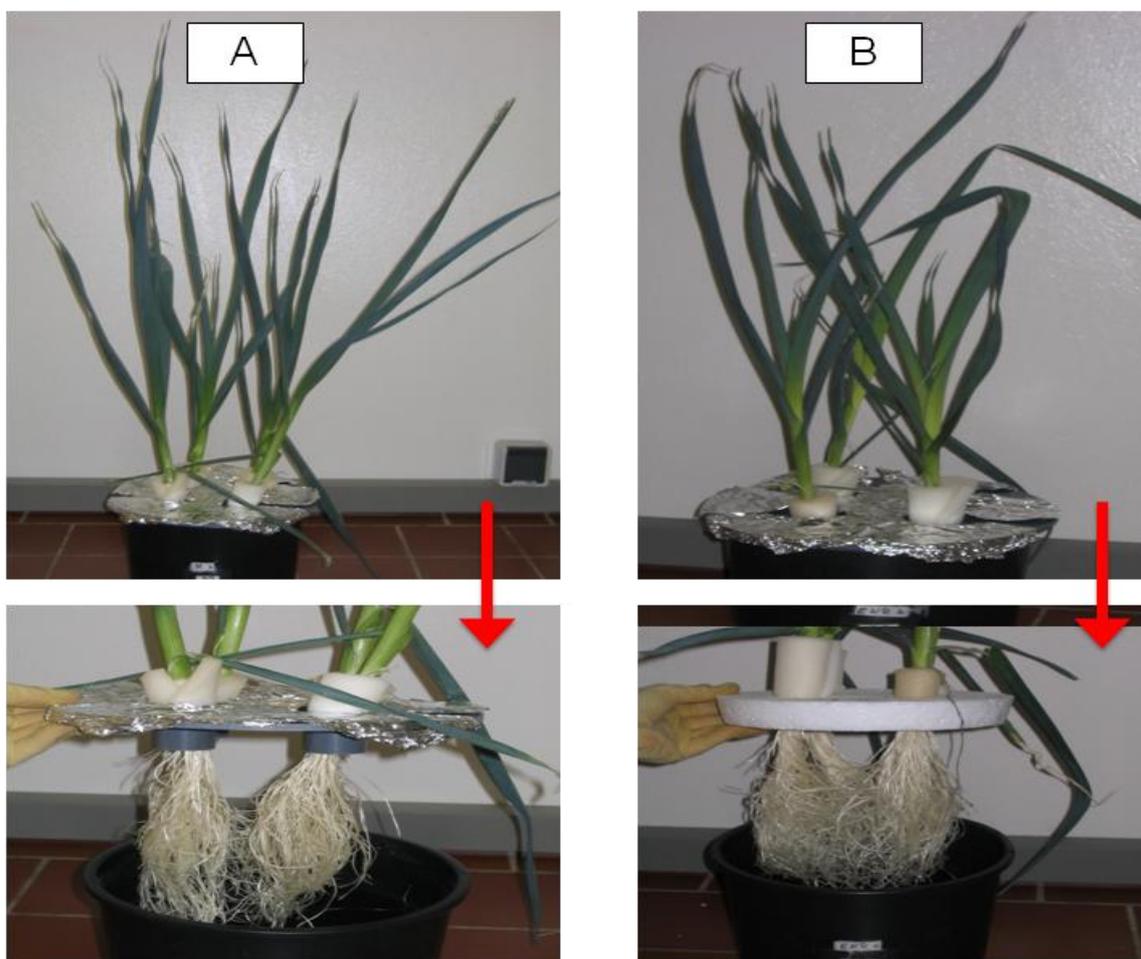
5 µmol/L TC-Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blattabschnitte alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung, n=3, Matrixkalibrierung  
Ergebnisse in µg/kg, **kursiv/fett: mg/kg** FG Homogenat

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an TC`s	
		TC	e-TC
TC	Blattabschnitte alt	47,2	<BG
	Blattabschnitte jung	18,1	<BG
	Wurzel	<b>11,9</b>	<b>3,7</b>

Es ist festzuhalten, dass die TC-Gehalte in den Porreewurzeln höher sind als in den Blattabschnitten. Vermutlich wurde TC im Porree im Apoplasten festgehalten [186].

**8.2.1.4 Aufnahme von Enrofloxacin****Entwicklung**

Die mit ENR dotierten Pflanzen wuchsen zunächst wesentlich stärker als die Kontrollpflanzen und auch als die anderen mit Antibiotika dotierten Pflanzen. Bei den Pflanzen, die mit ENR dotiert wurden, war des Weiteren (vor allem gegen Ende der Dotierphase) eine deutliche Aufhellung der Stängel und unteren Blattbestandteile zu beobachten (Abb. 49).



**Abb. 49:** Porree 7 Tage nach 50 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

- A) Porree-Kontrollversuch, ohne ENR-Dotierung;  
B) Porree in 5 µmol/L ENR-haltiger Nährlösung

Bemerkenswert ist, dass bei den ENR-haltigen Pflanzen ein makroskopisch deutlich sichtbarer Ausbleichungseffekt vor allem bei den jungen Porree-Blattabschnitten zu erkennen war. Auffällig ist bei diesen Pflanzen, dass auch die Pflanzenstängel ausbleichen. In Abb. 49 wird dieses durch die hellgrünen jungen Blattabschnitte im Vergleich zu den nicht dotierten Kontrollpflanzen deutlich.

Worauf diese Beobachtungen aus pflanzenphysiologischer Sicht begründet werden können, ist letztendlich nicht ganz zu klären. In einer Studie über die Phytotoxizität und die Aufnahme von ENR in Nutzpflanzen wie z.B. Gurken, Gartensalat, Bohnen und Rettich konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden [211]. Die Autoren berichten hier ebenfalls von einem bei geringer Konzentration zunächst gesteigertem Wachstum der Pflanzen, während bei höheren Konzentrationen ein offenbar toxischer Effekt auf die Pflanzenzellen beobachtet wurde. Diese phytotoxischen Effekte können auch die Ursachen der eigenen Beobachtungen sein. So wird ein Effekt bei hohen Konzentrationen auch auf das Enzym Topoisomerase II, welches dem bakteriellen Enzym Gyrase analog ist, angenommen. Dies bewirkt, dass die Zellwände der Pflanzenzellen instabil werden und die Zellen schließlich gänzlich aufplatzen.

**ENR-Gehalte im Porree**

Die höchsten Konzentrationen für ENR (und CIP als Hauptmetabolit) ergaben sich in den Porreewurzeln. In allen Pflanzenbestandteilen der mit ENR dotierten Pflanzen konnte auch CIP nachgewiesen werden. ENR wird in extremem Ausmaß in der Porreepflanze transportiert, so dass alte Blattabschnitte ähnlich hohe Gehalte dieses Fluorchinolons aufwiesen, wie die Wurzeln.

**Tab. 36:** ENR-Gehalte im Porree (Hydrokultur)

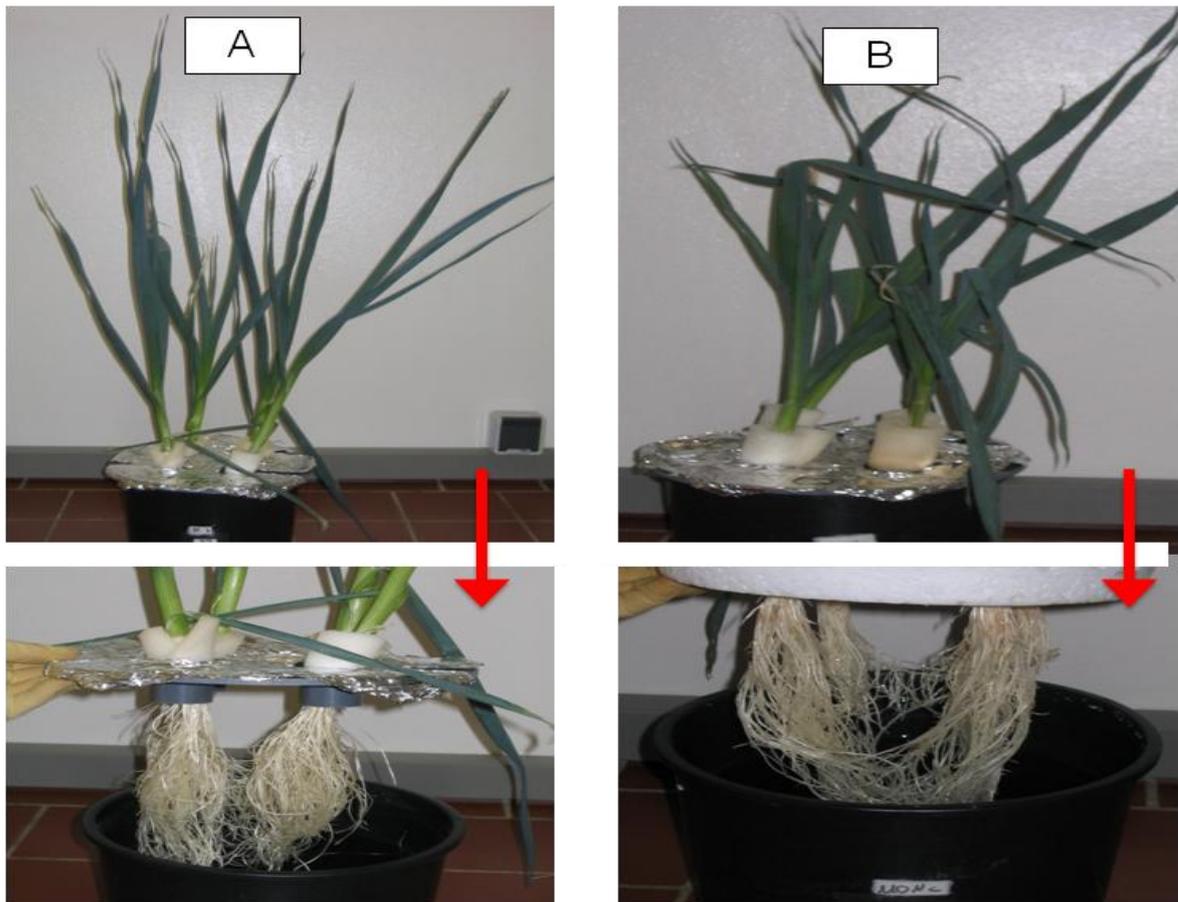
5 µmol/L ENR-Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blattabschnitte alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung, n=3, Matrixkalibrierung, Ergebnisse in µg/kg, **kursiv/fett: mg/kg** FG-Homogenat

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalte an:	
		ENR	CIP
ENR	Blattabschnitte alt	<b>1,0</b>	53,1
	Blattabschnitte jung	358,8	<BG
	Wurzel	<b>7,3</b>	60,6

Interessant scheint in diesem Zusammenhang, dass bei den mit ENR dotierten Pflanzen zwar insgesamt ein wesentlich größerer Rückstand an Wirkstoff in den Blättern gefunden wurde, jedoch die Gehalte in den Wurzeln anderer Antibiotika wie z.B. Tetracyclin, niedriger waren. Vermutlich ist der Transport des ENR-Wirkstoffs mit einer für die Aufnahme in Pflanzen fast „idealen“ Lipophilie wesentlich höher (s. Seite 46, Tab. 11)

**8.2.1.5 Aufnahme von Monensin****Entwicklung**

Die MON-dotierten Pflanzen erschienen stärker zu „verkümmern“, was sich besonders daran bemerkbar machte, dass sowohl das Pflanzenvolumen, als auch in noch stärkerem Maße der Umfang der Wurzeln stark abnahm und Verfärbungen aufwies. Die Wurzeln verfärbten sich über den Zeitraum der Dotierung zunehmend gelblich. Vermutlich wurde die mit MON-dotierte Nährlösung stark von Mikroorganismen besiedelt. Des Weiteren verschleimten vor allen bei den Pflanzen, die mit MON behandelt wurden, die Wurzeln und die Nährlösung. Diese beobachteten Phänomene zeigt Abb. 50.



**Abb. 50:** Porree 7 Tage nach 50 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

- A) Porree-Kontrollversuch, ohne MON-Dotierung;
- B) Porree in 5  $\mu\text{mol/L}$  MON-haltiger Nährlösung

In der Literatur werden ähnliche Beobachtungen dokumentiert, z.B. konnte Brain bei MON-Konzentrationen oberhalb 1 mg/kg einen ähnlichen negativen Effekt festhalten [274]. Auch Gomez und Chrispeels haben beobachtet, dass MON auch in Pflanzenzellen die Sortierung von vacuolären Proteinen hemmt, was wahrscheinlich durch Änderung des pH-Wertes im Golgi-Komplex zur partiellen Sekretion von Proteinen führt und anschließend eine Ausbleichung der Blätter verursacht [275].

### ***MON-Gehalte im Porree***

Während bei allen anderen Wirkstoffen ein deutlicher Unterschied zwischen den Konzentrationen in den jungen und alten Blattabschnitten erfasst wurde, sind bei MON die Gehalte in diesen beiden Pflanzenbestandteilen fast gleich. Im Gegensatz dazu konnten jedoch in den Wurzeln vergleichsweise sehr hohe Gehalte festgestellt werden.

**Tab. 37:** MON-Gehalte im Porree (Hydrokultur)

5 µmol/L Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blattabschnitte alt und jung),  
3 g FG-Homogenat (Wurzel), n=3, Matrixkalibrierung, Ergebnisse in **mg/kg**

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an MON [mg/kg]
MON	Blattabschnitte alt	<BG
	Blattabschnitte jung	<BG
	Wurzel	<b>1,1</b>

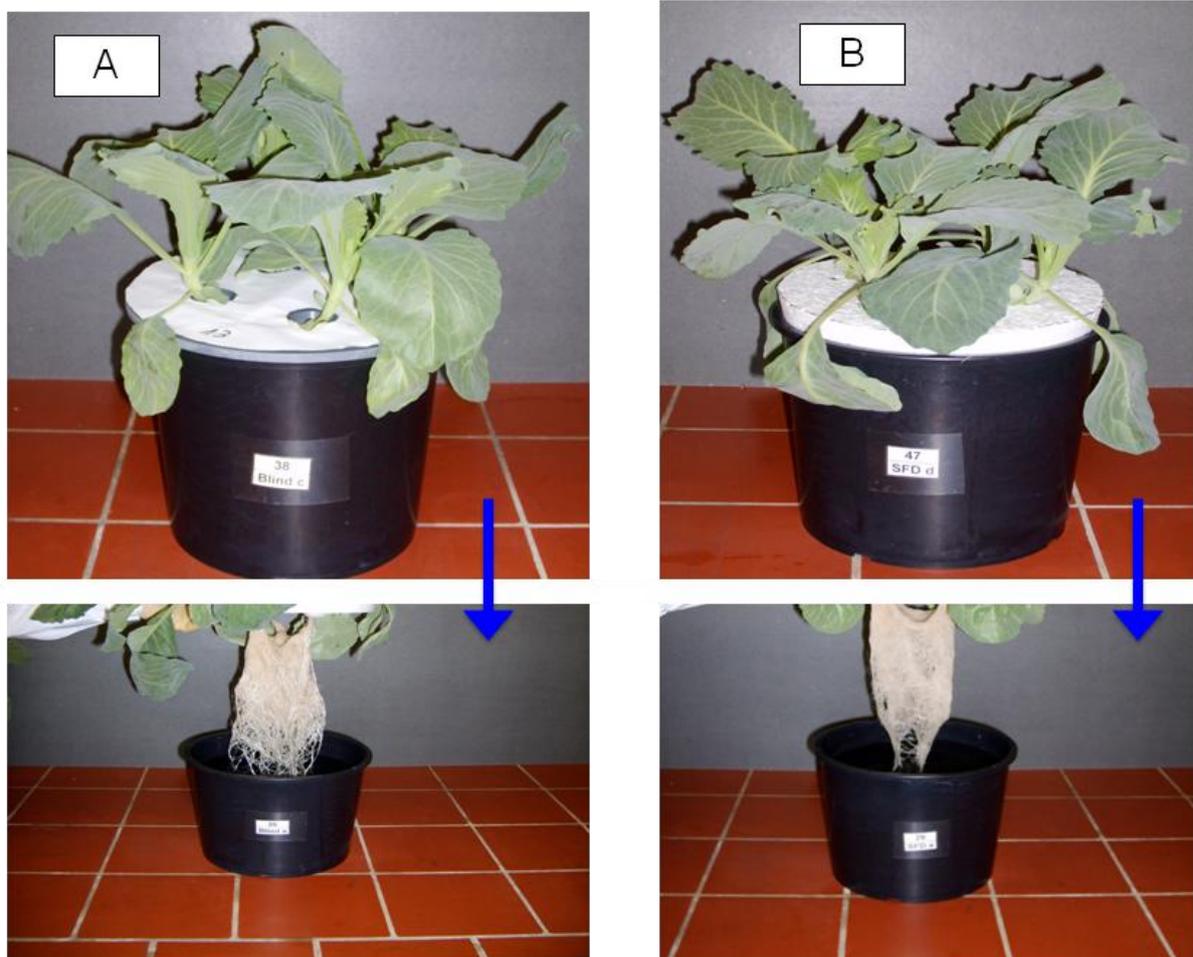
Dieses Phänomen kann ansatzweise so gedeutet werden, dass MON zwar von den Wurzeln aufgenommen wurde, aber der Transport in die äußeren Pflanzenbestandteile im Unterschied zu den anderen Wirkstoffen erst wesentlich später (während der Wachstumsphase) begonnen hat. Somit wäre die Konzentration der Wirkstoffe in den Blattabschnitten „noch“ ungefähr vergleichbar hoch, da noch keine Anlagerung stattfinden konnte.

## 8.2.2 Weißkohl

### 8.2.2.1 Aufnahme von Sulfadiazin

#### **Entwicklung**

Die Weißkohlpflanzen bildeten nach der 1. Wachstumswoche ebenso viele Blattpaare und dieselbe Blattfarbe aus wie die Weißkohlpflanzen, welche auf nicht-dotierter Nährlösung aufwuchsen.



**Abb. 51:** Weißkohl 7 Tage nach 21 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

A) Weißkohl-Kontrollversuch, ohne SFD-Dotierung;

B) Weißkohl in 5  $\mu\text{mol/L}$  SFD-haltiger Nährlösung

Auch bei Weißkohl wurde kein Einfluss von SFD auf die Pflanzenentwicklung festgestellt.

### **SFD-Gehalte im Weißkohl**

In den Weißkohlproben, die in SFD-dotierter Nährlösung aufwuchsen, wurden die in Tab. 38 angegebenen SFD-Gehalte gefunden.

**Tab. 38:** SFD-Gehalte im Weißkohl (Hydrokultur)

5  $\mu\text{mol/L}$  Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blatt alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel), n=3, Matrixkalibrierung, Ergebnisse in  $\mu\text{g/kg}$

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an SFD [ $\mu\text{g/kg}$ ]
SFD	Blatt jung	<BG
	Blatt alt	33,8
	Stängel	<BG
	Wurzel	147,4

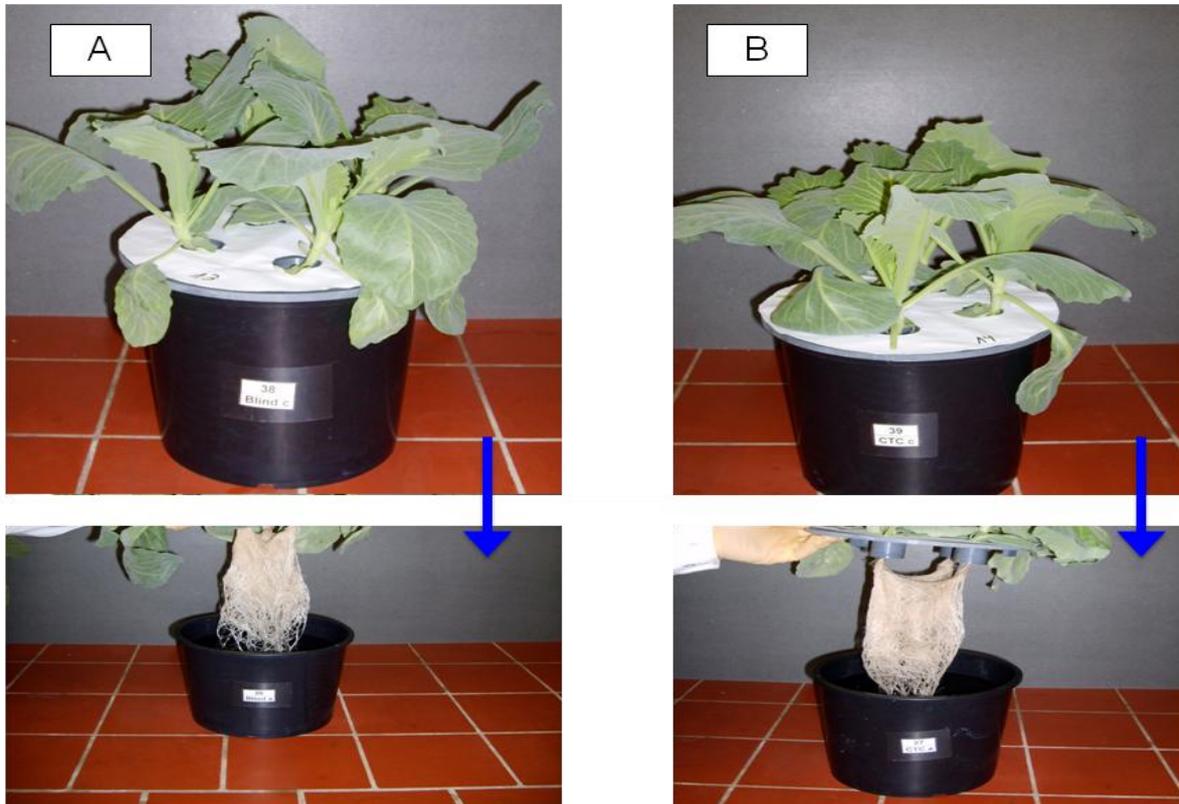
In den analysierten Weißkohlwurzeln wurden höhere Gehalte nachgewiesen. In den analysierten Blättern und Stengeln waren Spuren von SFD nachweisbar, so dass

angenommen werden muss, dass ein Transport von SFD von der Wurzel in die Blätter stattfand.

### 8.2.2.2 Aufnahme von Chlortetracyclin

#### *Entwicklung*

Wie in Abb. 52 zu sehen ist, zeigte der mit CTC dotierte Weißkohl gelbliche Verfärbungen der Leitbahnen.



**Abb. 52:** Weißkohl 7 Tage nach 21 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

A) Weißkohl-Kontrollversuch, ohne CTC-Dotierung;

B) Weißkohl in 5 µmol/L CTC-haltiger Nährlösung

#### ***CTC-Gehalte im Weißkohl***

Die in den Weißkohlproben gefundenen Gehalte an den unterschiedlichen Chlortetracyclinen sind in Tab. 39 zusammengefasst. In den Wurzeln finden sich erheblich höhere CTC-Gehalte als in den Blättern. Bemerkenswert ist, dass die CTC-Gehalte in den jungen und alten Blattabschnitten nicht so unterschiedlich waren.

**Tab. 39:** CTC-Gehalte im Weißkohl (Hydrokultur)

5 µmol/L CTC-Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blatt alt und jung),  
3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung, n=3, Matrixkalibrierung  
Ergebnisse in µg/kg, **kursiv/fett: mg/kg** FG-Homogenat

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an CTC's						
		CTC	e-keto-CTC	e-enol-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	DMC	e-DMC
CTC	Blatt alt	86,3	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG
	Blatt jung	98,6	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG
	Stängel	71,8	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG
	Wurzel	<b>6,7</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	675,6	107,9	209,8	70,1

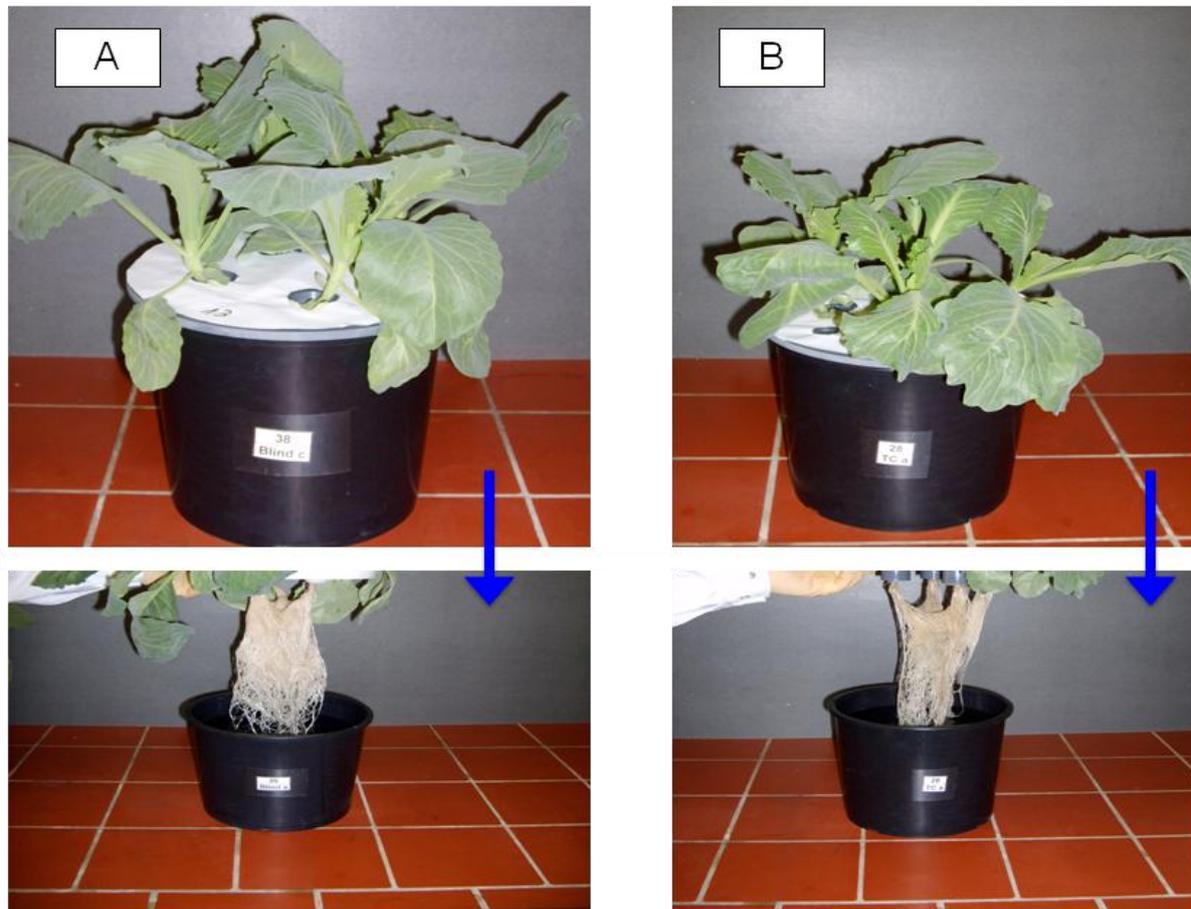
Besonders auffällig sind die Gehalte an iso-CTC in den Wurzeln der Weißkohlpflanzen. Für iso-CTC wurde der höchste log  $K_{ow}$ -Wert (-0,74) der Chlortetracycline berechnet (s. Seite 46, Tab. 11). Die größere Lipophilie erleichtert den symplasmatischen Transport, wodurch diese Komponente über die Endodermis in höhere Pflanzenteile transportiert werden kann. Deshalb stimmen die Befunde mit den Erwartungen aus den Berechnungen des Oktanol-Verteilungskoeffizienten überein.

Hinzu kommt eine mögliche Isomerisierungs-, Epimerisierungs- sowie Demethylierungstendenz von CTC. Um zu prüfen, ob diese Umwandlungs- und Metabolisierungsprodukte von CTC in der Pflanze und/oder in der Nährlösung entstanden sind, wurde die CTC-haltige Nährlösung 2 Tage nach der Dotierung auf Metabolite analysiert. Umwandlungs- sowie Metabolisierungsprodukte (DMC, e-DMC) wurden in den Nährlösungen nachgewiesen.

### 8.2.2.3 Aufnahme von Tetracyclin

#### **Entwicklung**

Die wuchsen auf TC-haltiger Nährlösung ohne Unterschied zu der nicht-dotierten Nährlösung. Das gilt auch für die Blätter, die grün und vital aussahen.



**Abb. 53:** Weißkohl 7 Tage nach 21 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen  
 A) Weißkohl-Kontrollversuch, ohne TC-Dotierung;  
 B) Weißkohl in 5  $\mu\text{mol/L}$  TC-haltiger Nährlösung

### **TC-Gehalte im Weißkohl**

Die TC-Gehalte in den Weißkohlpflanzen sind in Tab. 40 aufgeführt.

**Tab. 40:** TC-Gehalte im Weißkohl (Hydrokultur)

5  $\mu\text{mol/L}$  TC-Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blatt alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung,  $n=3$ , Matrixkalibrierung, Ergebnisse in  $\mu\text{g/kg}$ , ***kursiv/fett: mg/kg*** FG-Homogenat

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an TC's	
		TC	e-TC
TC	Blatt alt	91,9	25,0
	Blatt jung	112,5	28,9
	Stängel	34,2	<BG
	Wurzel	<b>6,53</b>	<b>2,5</b>

TC und e-TC wurden in allen Pflanzenbestandteilen nachgewiesen. Auffällig war, dass mehr TC im Bestandteil "Blatt jung" zu finden war als im "Blatt alt". Dies war bei anderen Antibiotika nicht der Fall.

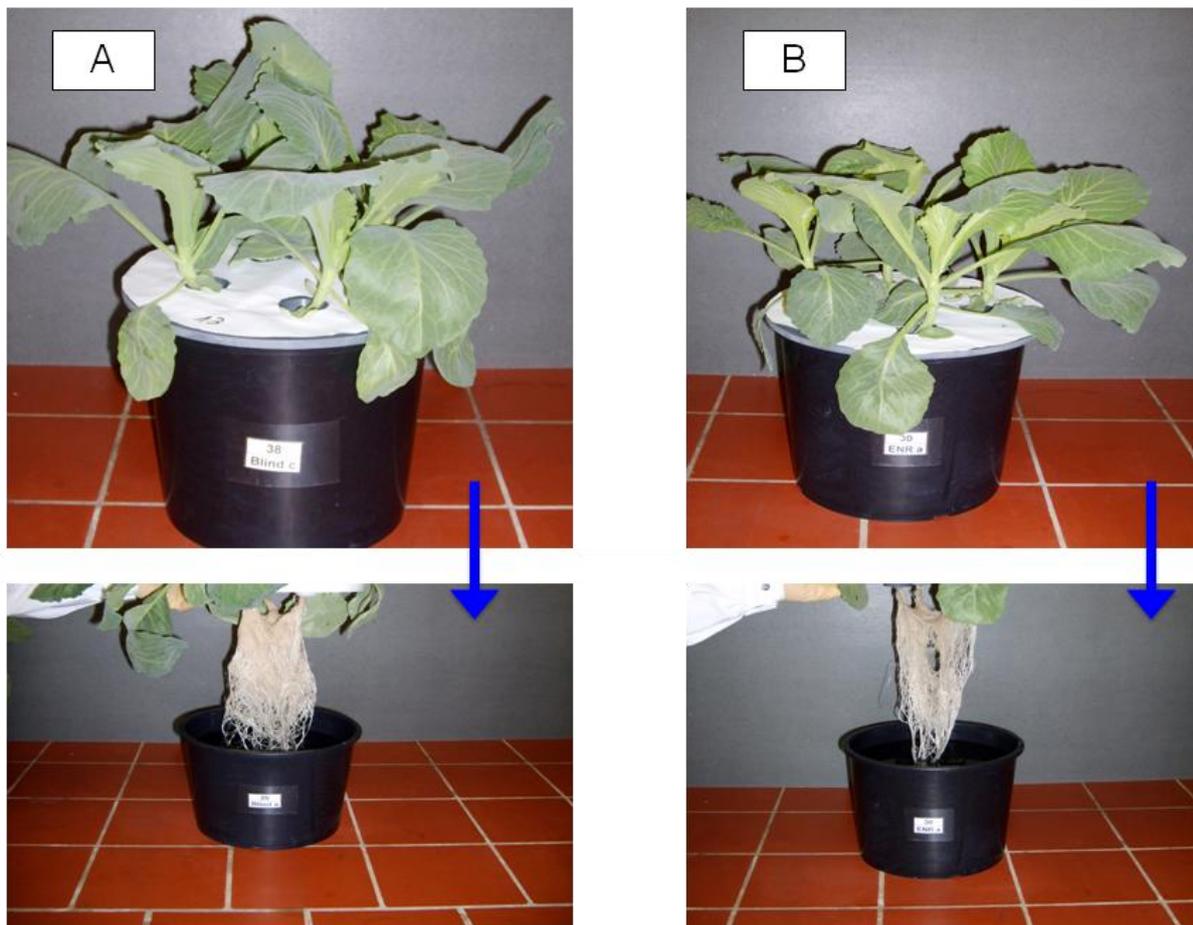
Gerade für die Tetracycline bleibt zu sagen, dass hier die Konzentrationen in den Wurzeln extrem hoch waren. Ein Transport in die weiteren Pflanzenbestandteile scheint jedoch nur mäßig stattzufinden. Wenn man die Ergebnisse für TC und CTC vergleicht, so sieht man, dass die CTC-Gehalte gerade in den Blättern und Stängel etwas höher sind als diejenigen von TC. Dies war ebenfalls anhand der Höhe der  $\log K_{OW}$ -Werte zu erwarten, denn diese zeigen, dass TC ( $\log K_{OW}$ -Wert = -1,47) hydrophiler als CTC ( $\log K_{OW}$ -Wert = -0,33) ist (s. Seite 46, Tab. 11).

#### 8.2.2.4 Aufnahme von Enrofloxacin

##### *Entwicklung*

Die Weißkohlpflanzen, die auf ENR-dotierter Nährlösung wuchsen, bildeten im Vergleich zu den Kontrollproben mehr Wurzeln. Dagegen waren die (phytotoxischen) Wirkungen von ENR auf die Weißkohlpflanzen wesentlich ausgeprägter.

In den Weißkohlpflanzen wurden durch den Einfluss von ENR starke Ausbleichungseffekte in allen Blattabschnitten beobachtet.



**Abb.54:** Weißkohl 7 Tage nach 21 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

- A) Weißkohl-Kontrollversuch, ohne ENR-Dotierung;
- B) Weißkohl in 5 µmol/L ENR-haltiger Nährlösung

**ENR-Gehalte im Weißkohl**

Die in den Weißkohlproben gefundenen ENR-Gehalte sind in Tab. 41 zusammengefasst.

**Tab. 41:** ENR-Gehalte im Weißkohl (Hydrokultur)

5 µmol/L ENR-Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blatt alt und jung),  
3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung, n=3, Matrixkalibrierung,  
Ergebnisse in µg/kg, **kursiv/fett: mg/kg** FG-Homogenat

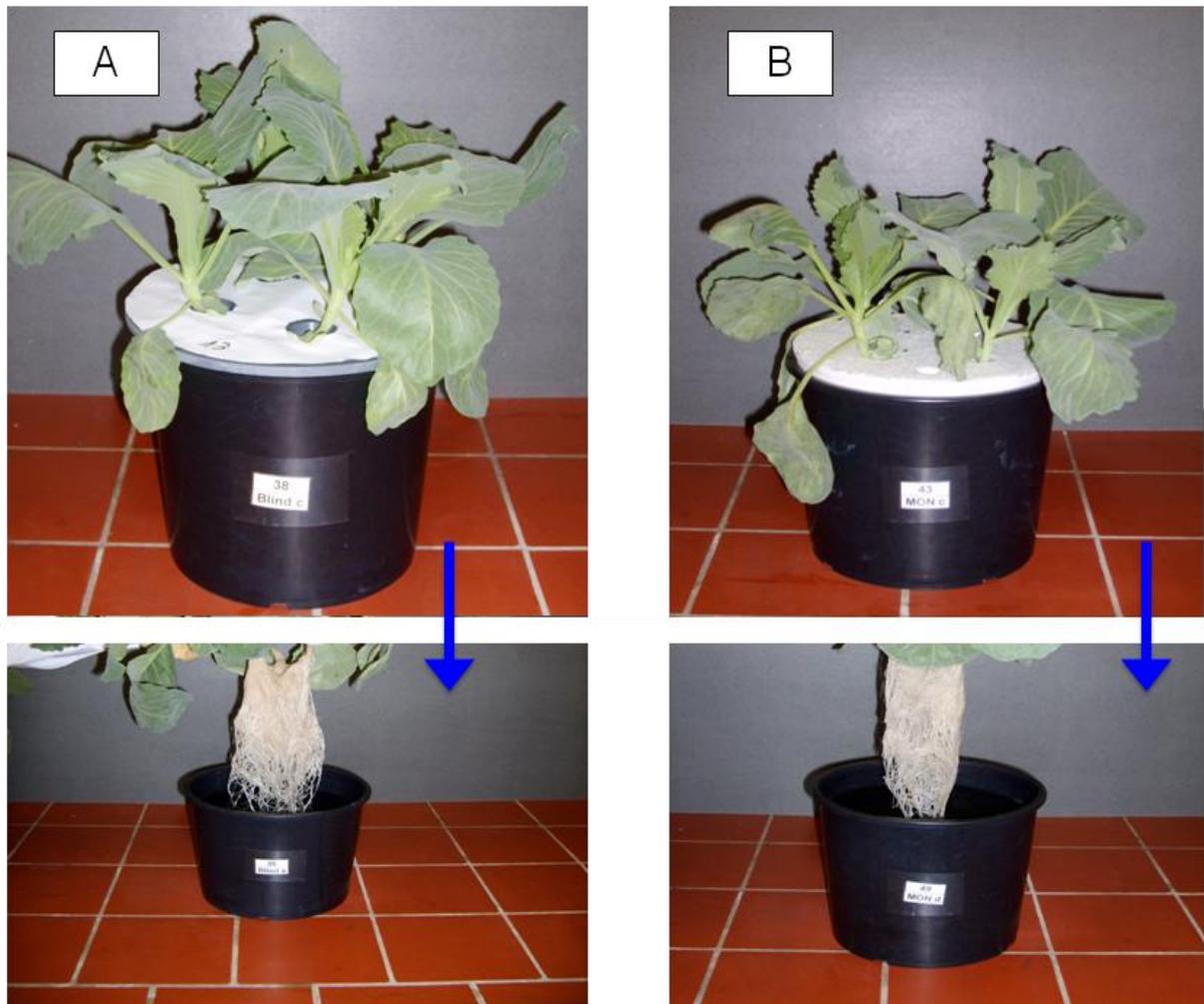
Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalte an:	
		ENR	CIP
ENR	Blatt alt	<b>7,1</b>	62,5
	Blatt jung	<b>6,0</b>	48,3
	Stängel	<b>2,5</b>	<BG
	Wurzel	<b>12,0</b>	59,1

In den Wurzeln sowie in den Stängeln und Blättern (jung und alt) des Weißkohls wurden ENR und der Metabolit CIP nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen von ENR wurden in den Wurzeln erreicht, wobei dieses in geringen Anteilen zum CIP metabolisierte. ENR wurde in extremem Ausmaß in der Weißkohlpflanze transportiert, so dass alte Weißkohlblätter ähnlich hohe ENR-Gehalte aufwiesen wie die Wurzeln.

Insgesamt dominiert ENR in den Wurzeln, da sowohl von MON als auch SFD zwar in diesem Bereich hohe Anteile (< 100 µg/kg) gefunden wurden, diese jedoch längst nicht an den Anteil von ENR in den Wurzeln herankamen.

**8.2.2.5 Aufnahme von Monensin****Entwicklung**

Nach 2 wöchigem Wachstum auf dotierter Nährlösung setzte eine Verschleimung der Wurzeln ein und die Blätter bildeten braune Blattränder. Die Weißkohlpflanzen bildeten nicht mehr so viele neue Blattpaare wie die Kontrollpflanzen und die Blätter verkümmerten. Nach dreiwöchigem Wachstum auf MON-haltiger Nährlösung sahen die Weißkohlpflanzen geschädigt aus (Abb. 55).



**Abb. 55:** Weißkohl 7 Tage nach 21 Wachstumstagen in Nährlösung angezogen

A) Weißkohl-Kontrollversuch, ohne MON-Dotierung;

B) Weißkohl in 5  $\mu\text{mol/L}$  MON-haltiger Nährlösung

### **MON-Gehalte im Weißkohl**

MON wurde im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen in deutlich niedrigeren Konzentrationen in den Weißkohlpflanzen vorgefunden (Tab. 42).

**Tab. 42:** MON-Gehalte im Weißkohl (Hydrokultur)

5  $\mu\text{mol/L}$  Dotierung, Einwaagen: 5 g FG-Homogenat (Blattabschnitte alt und jung), 3 g FG-Homogenat (Wurzel); Doppelbestimmung,  $n=3$ , Matrixkalibrierung, Ergebnisse in  $\mu\text{g/kg}$

Nährlösung dotiert:	Pflanzenteile	Gehalt an MON [ $\mu\text{g/kg}$ ]
MON	Blatt alt	158,9
	Blatt jung	53,7
	Stängel	<BG
	Wurzel	567,2

---

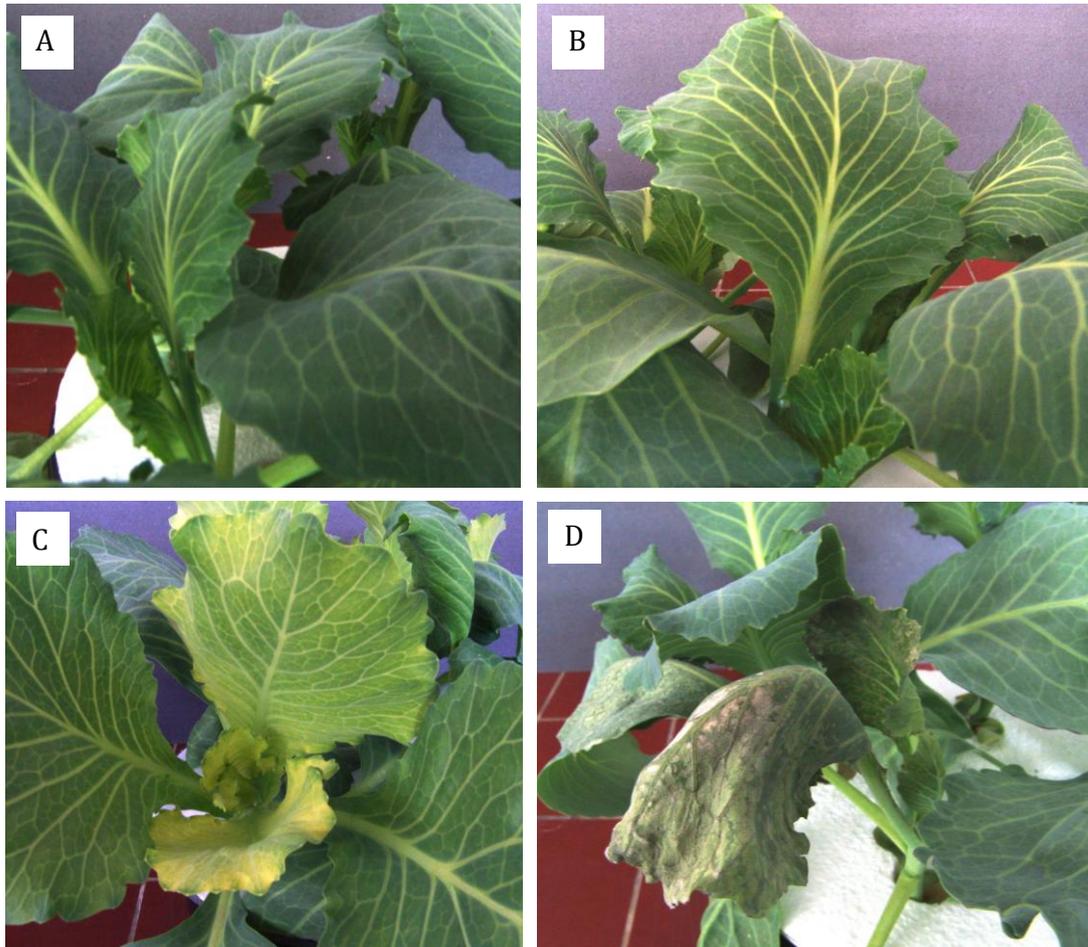
In den alten Weißkohlblättern wurde aber erheblich mehr MON (158 µg/kg) vorgefunden als in den alten Blattabschnitten des Porrees (<BG).

### **8.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Aufnahmeexperimente**

#### ***Entwicklung***

Die makroskopischen Wirkungen der Antibiotika auf die in Hydrokultur angezogenen Gemüsepflanzen waren sehr unterschiedlich: Sie reichten beim Porree von nicht erkennbaren Effekten (MON, SFD), schwach ausgeprägten Ausbleichungseffekten in jungen Blattabschnitten (CTC), bis zu starken Effekten durch den Einfluss von ENR. In Abb. 46-49 wird dieses durch die hellgrünen jungen Blattabschnitte der Porreepflanzen im Vergleich zu den nicht-dotierten Kontrollpflanzen deutlich. Ein ähnlicher, aber insgesamt schwächer ausgeprägter Effekt war bei der Dotierung von CTC zu beobachten.

Die (phytotoxischen) Wirkungen der Antibiotika auf die Weißkohlpflanzen waren wesentlich ausgeprägter. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 56 A) zeigte der mit CTC dotierte Weißkohl gelbliche Verfärbungen der Leitbahnen (Abb. 56 B). Bei Dotierung mit ENR war eine fast vollständige Ausbleichung der jungen Blätter festzustellen (Abb. 56 C). MON führte an einigen Blättern zu Läsionen und schließlich zum Welken (Abb. 56 D).



**Abb. 56:** Weißkohl: 27 Tage in Nährlösung angezogen,  
(Dotierung jeweils für 8 Tage mit 5  $\mu\text{mol/L}$  Antibiotikum)  
A) Kontrollpflanzen      B) Dotierung mit CTC,  
C) Dotierung mit ENR      D) Dotierung mit MON

Bei der Dotierung mit ENR war eine fast vollständige Ausbleichung der jungen Blätter festzustellen. Auch bei Gurken, Feldsalat, Bohnen und Rettich wurden phytotoxische Wirkungen von ENR in einer Studie beschrieben. Die Autoren berichten, dass eine geringe ENR-Konzentration (50-100  $\mu\text{g/L}$ ) das Wachstum der Pflanzen positiv beeinflusste, während bei hohen Konzentrationen (5 mg/L) verminderter Pflanzenwuchs auftrat [211]. Wie der Literatúrauswahl (Tab. 12) zu entnehmen ist, sind zahlreiche Nutzpflanzen in der Lage, Veterinärpharmaka unterschiedlicher Wirkstoffgruppen über die Wurzel aufzunehmen, was zu Wachstumsstörungen u.a. toxischen Effekten führen kann [211].

Ähnliche Tendenzen ließen sich auch in dieser Studie insbesondere bei den Pflanzen erkennen, die mit den Wirkstoffen ENR, MON und SFD dotiert wurden. Während die mit ENR dotierten Pflanzen zunächst wesentlich stärker wuchsen als die anderen Pflanzen, schienen besonders die mit SFD und MON dotierten Pflanzen stärker zu „verkümmern“, was besonders daran bemerkbar machte, dass sowohl das Pflanzenvolumen, als auch in noch

stärkerem Maße der Umfang der Wurzeln stark abnahm und Verfärbungen der Wurzeln aufwies.

### **Gehalte an Antibiotika in Pflanzen**

Die dotierten Antibiotikawirkstoffe sowie Umwandlungsprodukte und Metaboliten wurden separat in den Pflanzenteilen von Porree (Wurzel, junge und alte Blattabschnitte) sowie Weißkohl (Wurzel, Stängel, junge und alte Blätter) identifiziert und quantifiziert. Je nach Wirkstoff, Gemüseart und Pflanzenteil umfassten die ermittelten Arzneistoffrückstände mehrere Größenordnungen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  bis  $\text{mg}/\text{kg}$ -Bereich). Die höchsten Konzentrationen wurden in den Wurzeln beider Gemüsearten mit Chlortetracyclin, Tetracyclin (Weißkohl: ca. 10  $\text{mg}/\text{kg}$  FG, Porree: ca. 20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) und ENR (Weißkohl: ca. 12  $\text{mg}/\text{kg}$ ) erreicht, das in geringen Anteilen zum CIP metabolisierte. ENR wurde in extremem Ausmaß in der Weißkohlpflanze transportiert, so dass alte Weißkohlblätter ähnlich hohe ENR-Gehalte (ca. 7  $\text{mg}/\text{kg}$  FG) enthielten wie die Wurzeln. In den Stängeln und Blättern (jung und alt) des Weißkohls sowie den jungen und alten Blattabschnitten des Porrees wurden alle dotierten Wirkstoffe nachgewiesen. Dabei dominieren ENR und CTC (einschließlich seiner Umwandlungsprodukte wie z.B. DMC und TC), während SFD und MON in deutlich niedrigeren Konzentrationen vorgefunden wurden ( $< 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). SFD wurde von den Pflanzen im Vergleich mit den anderen Wirkstoffen am wenigsten aufgenommen. Trotzdem wird aber ein relativ großer Anteil der aufgenommenen Wirkstoffe bis in die Blätter weiter transportiert. Das Verhältnis zwischen den Gehalten in Wurzeln und Blättern beträgt ca. 3:1 während es z.B. bei TC ca. 230:1 oder bei ENR 7:1 ist. Auch dieses lässt sich Anhand der Tab. 11 begründen, da SFD einen  $\log K_{\text{OW}}$ -Wert (s. Seite 46, Tab. 11) kleiner als 0,5 hat (-0,12). Das bedeutet, dass SFD wasserlöslich und nur über Carriersysteme durch die Wurzelmembran transportabel ist.

Zusammenfassend ist festzustellen:

#### **Blatt**

In den alten Blättern des Weißkohls werden die höchsten Konzentrationen an ENR ( $\sim 7 \text{ mg}/\text{kg}$  FG) nachgewiesen. Anders war dieses jedoch in den alten Blattabschnitten des Porrees, wo deutlich weniger ENR nachgewiesen werden konnte ( $\sim 1 \text{ mg}/\text{kg}$ ), jeweils begleitet von geringen Anteilen des Metaboliten CIP. Die Summengehalte an CTC-Komponenten liegen im Porree mit 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  im Vergleich zu den Weißkohlblättern höher ( $\sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), die der anderen Wirkstoffe (TC, SFD, MON) darunter. In den alten Weißkohlblättern wurde aber deutlich mehr MON (150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) vorgefunden als in den alten Blattabschnitten des Porrees, die wiederum relativ betrachtet mehr SFD enthalten.

Vergleicht man die Rückstandsgehalte an Veterinärpharmaka zwischen den älteren Blattbereichen und den jungen Blattabschnitten (Porree) und Blättern (Weißkohl), dargestellt

in Abb. 57 und Abb. 58, fallen Ähnlichkeiten aber auch einige markante Unterschiede auf. So sind die Konzentrationsverhältnisse für ENR in den jungen Blättern bzw. Blattabschnitten im Vergleich zu den älteren sehr ähnlich. Die jungen Blattabschnitte des Porrees enthalten aber nur etwa halb so viel an  $\Sigma$ CTC-Komponenten ( $\sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) wie die alten Blätter. Dagegen sind bei jungen und alten Weißkohlblättern die Summengehalte an Chlortetracyclinen in etwa gleich. Auffällig sind die doppelt so hohen Tetracyclin-Gehalte in den jungen Blattabschnitten des Porrees im Vergleich zu den älteren. Die jungen und alten Blattabschnitte des Porrees enthalten im Vergleich zu den Blättern des Weißkohls ca. doppelt so hohe Mengen an SFD ( $\sim 58\text{--}85 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Ältere Weißkohlblättern lagerten dagegen dreifach so viel MON ( $\sim 160 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) ein wie die jüngeren. Die Werte sind dabei deutlich höher als in den entsprechenden Blattabschnitten des Porrees.

#### *Stängel*

Die Antibiotika-Gehalte in den Stängeln des Weißkohls sind erheblich niedriger als in den Wurzeln und liegen unterhalb des in den Blättern erreichten Konzentrationsniveaus. Extremwerte wurden mit  $2,5 \text{ mg}/\text{kg}$  bei ENR erreicht (zum Vergleich: Wurzel:  $12 \text{ mg}/\text{kg}$ , altes Blatt:  $7 \text{ mg}/\text{kg}$ ).

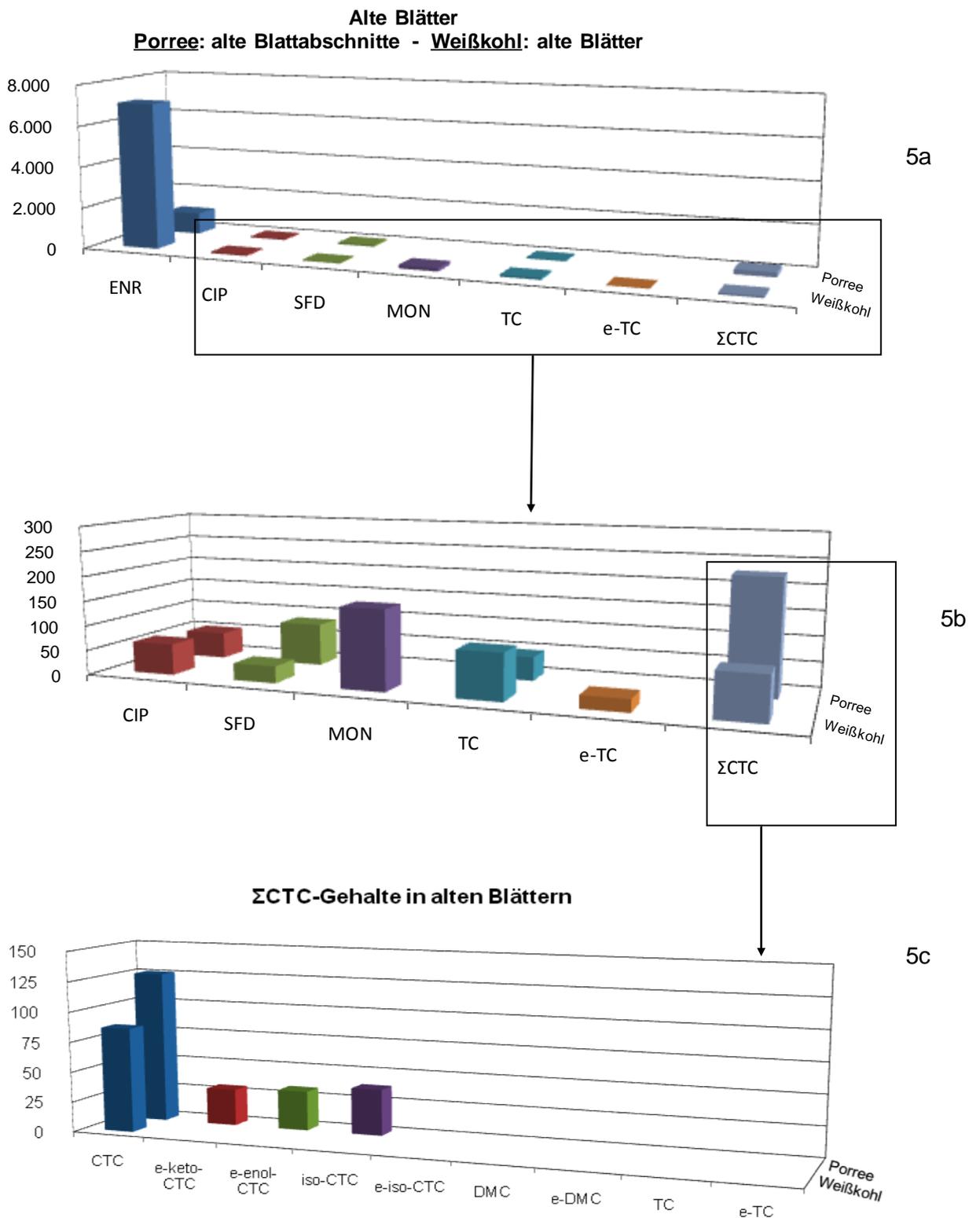
#### *Wurzel*

In den Wurzeln der Gemüsepflanzen liegt CTC mit ca.  $20 \text{ mg}/\text{kg}$  ( $\Sigma$ CTC beim Porree) in der höchsten Konzentration vor (Weißkohl: ca.  $10 \text{ mg}/\text{kg}$ ). Dabei ist zu berücksichtigen, dass trotz intensiven Spülens der Wurzelmasse nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Anteil der nachgewiesenen Antibiotika an den Wurzeln bzw. der Rhizodermis haftete.

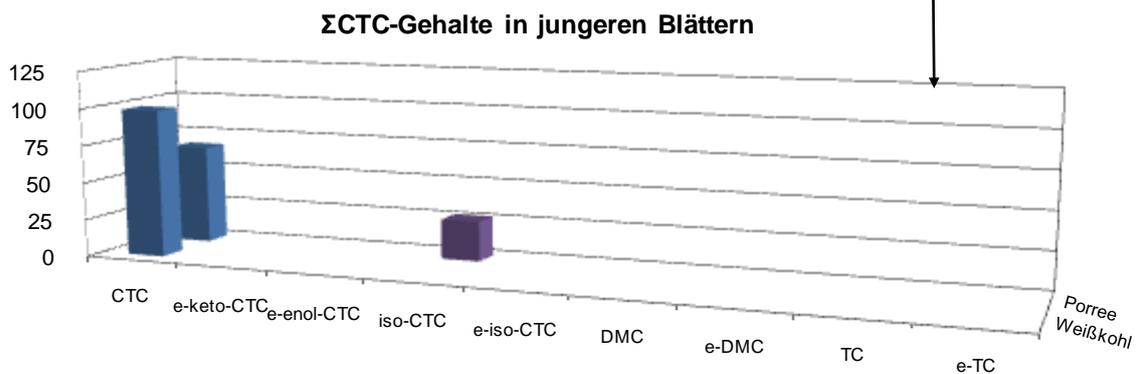
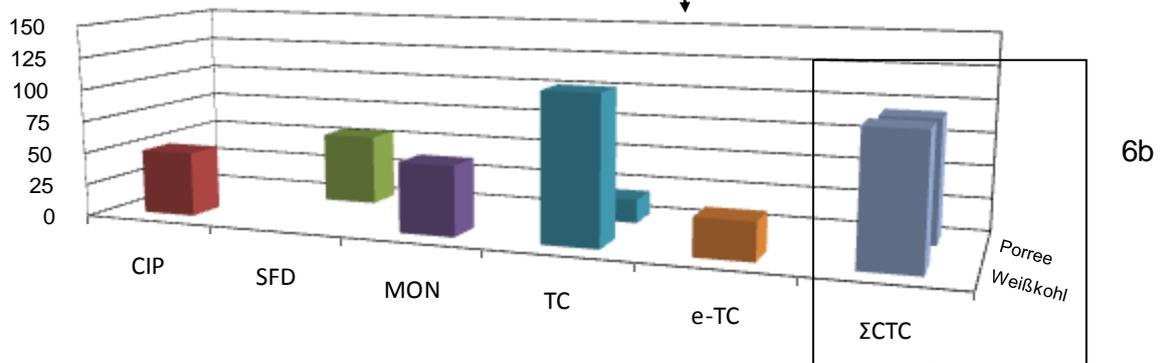
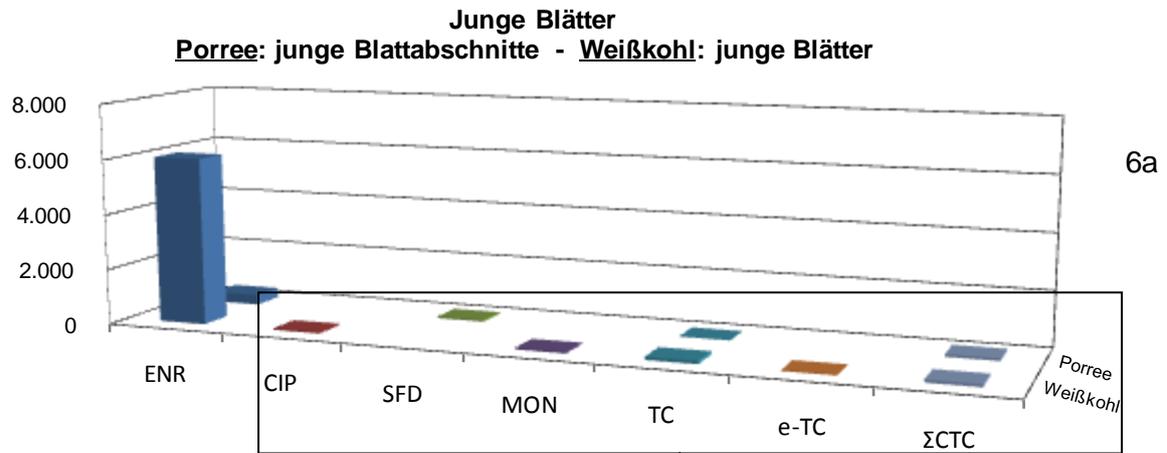
Im Vergleich zu den CTC-Gehalten in den Wurzeln von Porree und Weißkohl wurden die anderen Wirkstoffe bzw. „Metabolite“ in folgender Abstufung nachgewiesen:

Porree:  $\Sigma$ CTC > TC + e-TC > ENR + CIP > MON > SFD

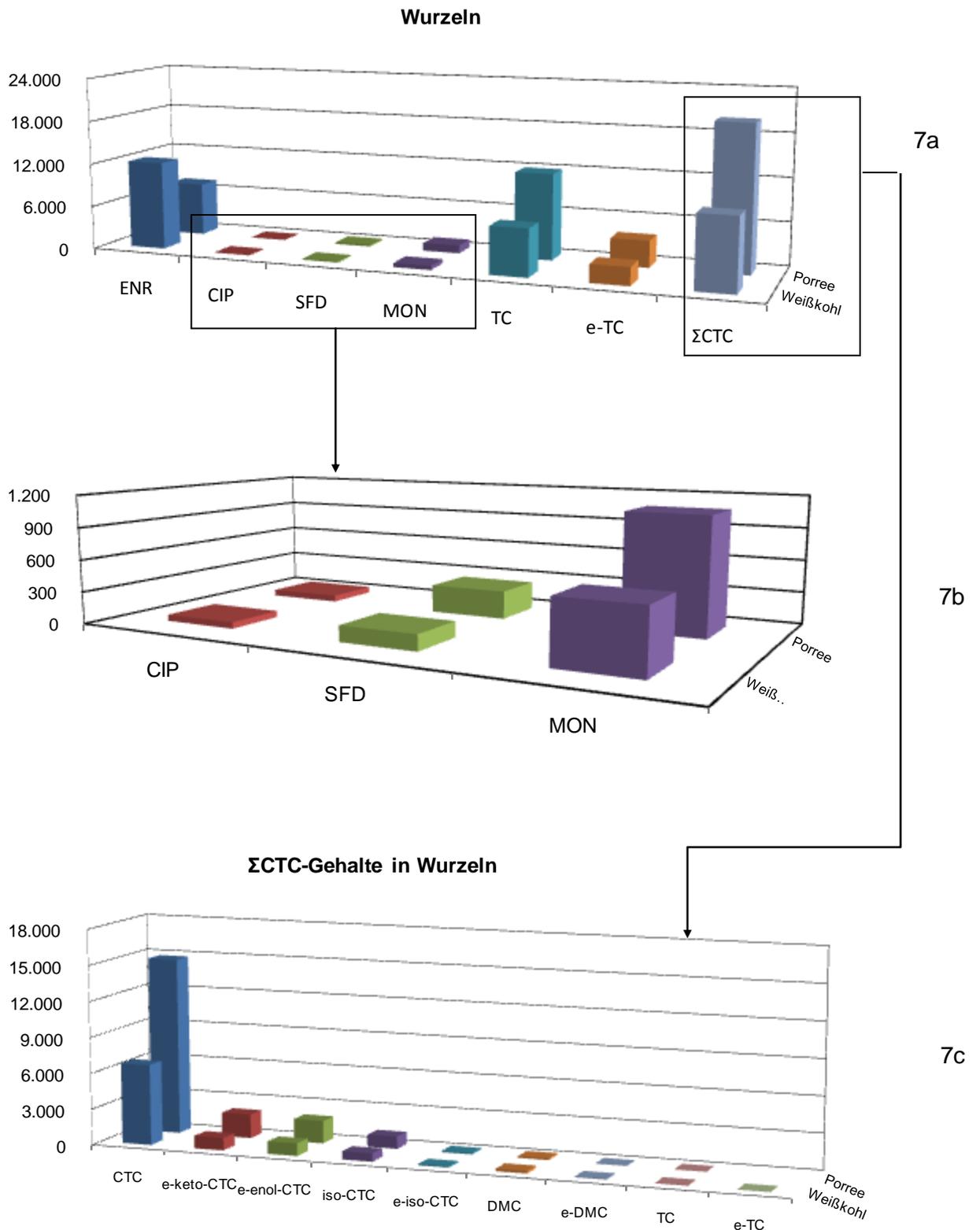
Weißkohl: ENR + CIP >  $\Sigma$ CTC > TC + eTC > MON > SFD



**Abb. 57:** Gehalte an Antibiotikawirkstoffe in alten Blättern von Porree und Weißkohl



**Abb. 58:** Gehalte an Antibiotikawirkstoffe in jungen Blättern von Porree und Weißkohl



**Abb. 59:** Gehalte an Antibiotikawirkstoffe in Wurzeln von Porree und Weißkohl

Nach der Aufnahme über die Wurzel dominiert schließlich in den Gemüsepflanzen bei dem Transport in die Blattbereiche das ENR, insbesondere beim Weißkohl. Dagegen werden Tetracycline (TC, CTC) in einem erheblich geringeren Maße transportiert, so dass sich das ursprüngliche Massenverhältnis in den Wurzeln an aufgenommenen und metabolisierten Fluorchinolonen und Tetracyclinen nach dem Transport in die Blätter bzw. Blattabschnitte (BA) umgekehrt hat:

Porree (BA jung und alt): ENR + CIP >>>  $\sum$ CTC > SFD > TC + e-TC > MON

Weißkohl (Blatt alt): ENR + CIP > MON > TC + eTC >  $\sum$ CTC > SFD

Weißkohl (Blatt jung): ENR + CIP > TC + eTC >  $\sum$ CTC > MON > SFD

Die konkreten Ergebnisse konnten die Annahmen zur Lipophilie und somit zum Aufnahmepotenzial der Pflanzen bezüglich der Wirkstoffe über die Berechnungen der log  $K_{OW}$ -Werte bestätigen und auch dementsprechend gedeutet werden. Ebenfalls konnten Metabolite der eigentlich eingesetzten Wirkstoffe in den Pflanzen festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese im Pflanzenorganismus gebildet wurden.

Eine weitere Auswertung der Ergebnisse bezog sich auf mögliche Metabolite in den Pflanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass neben den dotierten Wirkstoffen einige Metabolite qualitativ nachgewiesen wurden. In allen Pflanzenbestandteilen der mit ENR dotierten Pflanzen konnte so z.B. auch CIP nachgewiesen werden. Genauso konnte in allen Bestandteilen der mit CTC-dotierten Pflanzen auch DMC nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gerade in diesen mit CTC-dotierten Pflanzen in einigen Teilen auch dechloriertes CTC (also TC) nachgewiesen werden. Dieses gilt jedoch nicht für die Stängel. Weitere Metabolite wie z.B. DC oder OTC bei den Tetracyclinen oder auch Metabolite von SFD konnten nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse geben einen ersten Überblick über die Metabolisierungsreaktionen innerhalb der Pflanzen. Wie und vor allem in welchen Pflanzenbestandteilen bzw. Zellkompartimente diese Reaktionen ablaufen oder in welche Pflanzenbestandteile auch die Metaboliten dann wieder transportiert werden, kann jedoch anhand dieser Ergebnisse nicht gedeutet werden.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird deutlich, dass alle Wirkstoffe in allen Pflanzenbestandteilen der jeweils dotierten Pflanzen enthalten waren und nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis bestätigt also, dass Pflanzen Antibiotika nicht nur aufnehmen, sondern auch bis in ihre äußersten Bestandteile (die Blätter) transportieren können. Des Weiteren wird sofort deutlich, dass die ermittelten Gehalte der einzelnen Wirkstoffe sehr unterschiedlich sind, aber dennoch Tendenzen erkennen lassen. So muss z.B. festgehalten werden, dass in den Wurzeln, wie schon bemerkt wurde, wesentlich höhere Gehalte von allen Wirkstoffen erzielt werden konnten, als in den anderen Pflanzenbestandteilen. Ebenfalls ist der Rückstand der Wirkstoffe in den Blättern höher als in

den Stängeln der Pflanzen. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die Wurzeln sowohl Aufnahme als auch Ablagerungsort für die Wirkstoffe zugleich sein können, während die Stängel scheinbar nur als „Transportweg“ dienen, um die Wirkstoffe schließlich in den Blättern abzulagern. Die Ergebnisse stimmen mit anderen Studien z.B. Hydrokulturversuche mit Weizen- und Möhrenpflanzen [75] überein und wurden auch hier dementsprechend gedeutet.

Zweifelsfrei belegen die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur ein enormes Aufnahmepotential von Weißkohl und Porree für einige Veterinärpharmaka, insbesondere für Tetracycline und Enrofloxacin. Die Dringlichkeit ist offenkundig, Feldpflanzen systematisch auf Versuchsflächen und (langjährig) Gülle-gedüngten Verdachtsflächen zu beproben und rückstandsanalytisch zu untersuchen.

### 8.3 Analyse von Gemüse aus landwirtschaftlichen Betrieben

Die relativ langen Wachstumszeiten einiger Gemüsearten können den möglichen Transfer eines breiten Spektrums von Veterinärpharmaka aus dem güllebeaufschlagten Boden über die Wurzel in die Gemüsepflanzen begünstigen. Jedoch konnten durch die Hydrokulturversuche nur theoretische Aufnahmepotenziale unter optimalen Bedingungen untersucht werden aber letztendlich keinerlei Rückschlüsse auf vielleicht in handelsüblichem Gemüse enthaltene Konzentrationen an Wirkstoffen gezogen werden. Hinweise diesbezüglich könnten nur durch Analysen von Feldproben erhalten werden.

Daher wurden Porree und Weißkohl in der mit dieser Arbeit verknüpften Beprobung aus landwirtschaftlichen Betrieben durchgeführt. Anschließend wurden die aus den Aufnahmeversuchen in Hydrokultur gewonnenen Erkenntnisse auf die rückstandsanalytischen Untersuchungen der unter Freilandbedingungen gewachsenen Gemüsepflanzen angewendet.

#### **Probenahme**

Es war geplant, Weißkohl und Porree in Hauptanbaugebieten zu beproben. Leider wurde von fast allen der angesprochenen Betriebe und mit Gemüsebau befassten Organisationen eine Probenahme abgelehnt. Daher standen nur wenige Weißkohlköpfe von einem Feld im Raum Krefeld sowie Porreestangen und Chinakohl aus dem Raum Brüggen zur Verfügung.

**Tab. 43:** Feldproben: Probenahmegebiete und Probenbezeichnung

Probenart	Probenbezeichnung	Probenahmegebiet	Probenmenge	Düngung
Weißkohl	WK-Kre	Krefeld	2 Köpfe	keine Angaben
Porree	P-Brü	Brüggen	3 Stangen	Schweinegülle
Chinakohl	CK-Brü	Brüggen	3 Köpfe	Putenmist

Wie oben erwähnt, konnten nur wenige Weißkohlköpfe sowie Porreestangen und ergänzend Chinakohlköpfe beprobt und analysiert werden. Es lagen so gut wie keine Informationen über die Produktionsbedingungen, wie z.B. Bodenart und Gülleausbringung vor.

### ***Ergebnisse der Analysen von Feldproben***

Im Weißkohl aus dem Raum Krefeld wurden keine Veterinärpharmaka-Spuren entdeckt. Wie den Angaben in Tab. 44 zu entnehmen ist, liegen Verdachtsbefunde für Porree und Chinakohl aus dem Raum Brüggen vor, in dem Schweinegülle und Putenmist zur Düngung verwendet worden ist.

Mit dem LC-MS/MS (LCQ) konnten die Antibiotikarückstände in den Feldpflanzen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Es war keine weitere Absicherung der Identifizierung mittels hochauflösenden FTICR-MS möglich, da die Intensitäten der Signale sehr gering waren. Fragmentierungsexperimente bzw. MS-Experimente, welche zur Bestätigung der positiven Befunde notwendig wären, konnten daher nicht durchgeführt werden.

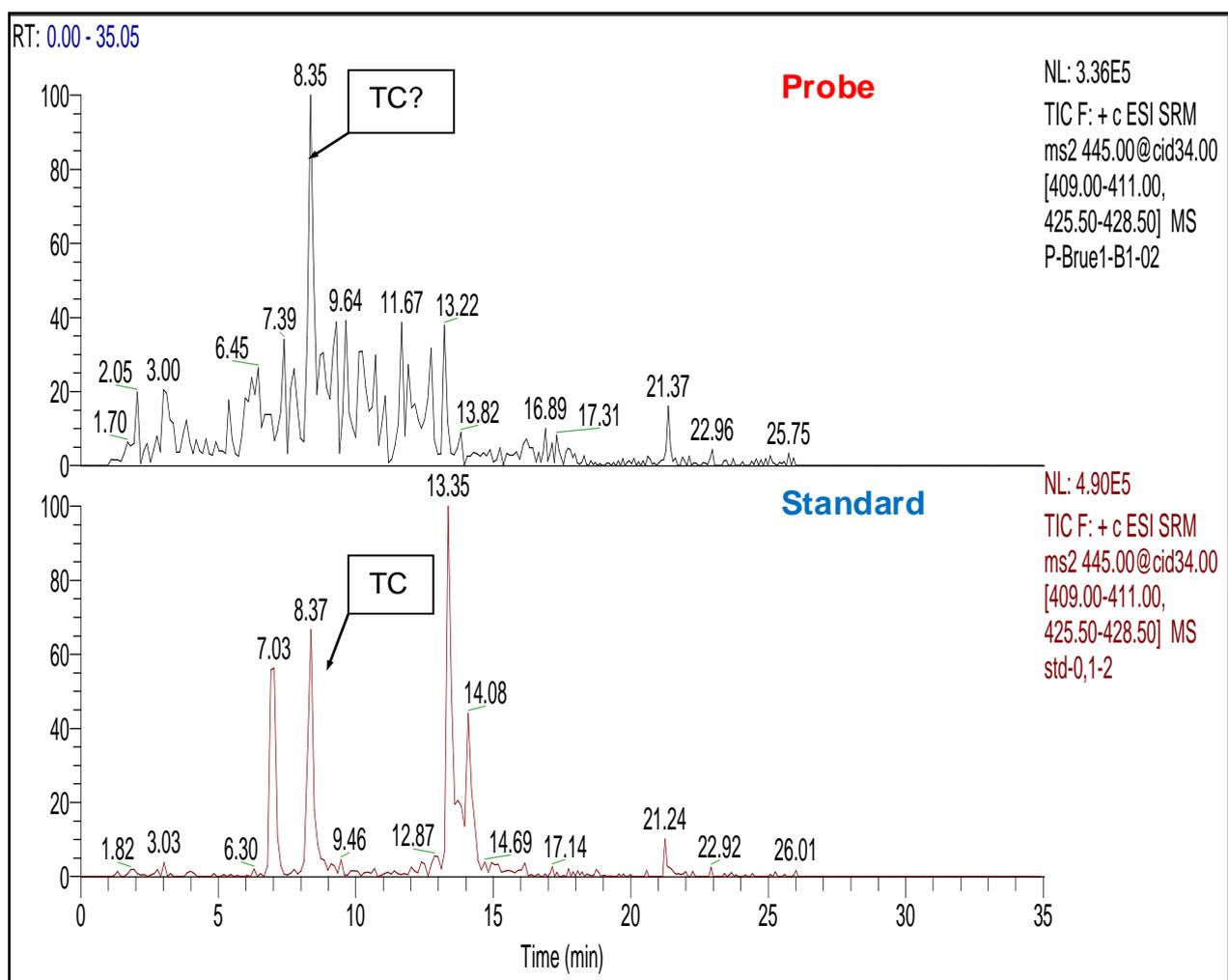
**Tab. 44:** Verdachtsbefunde in Feldproben: Porree (P), Weißkohl (WK) und Chinakohl (CK)  
 - negativer Befund (-) und (+‡) positiver Verdachtsbefund mit niedrigauflösender und hochauflösender MS

Probe	TC	e-TC	DC	OTC	N-DDM- OTC	DMC	CTC	e- CTC	iso- CTC	SFD	ENR	CIP	MON
<b>Brüggen</b>													
P-Brü-Blatt	-	(+‡)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+‡)	-
P-Brü-Stengel	(+‡)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+‡)	-
<b>CK-Brü-Blatt</b>													
CK-Brü-Blatt	(+‡)	-	-	-	(+‡)	-	-	-	-	-	-	-	-
CK-Brü-Stengel	-	-	-	-	(+‡)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Krefeld</b>													
WK-Kre-Blatt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WK-Kre-Stengel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

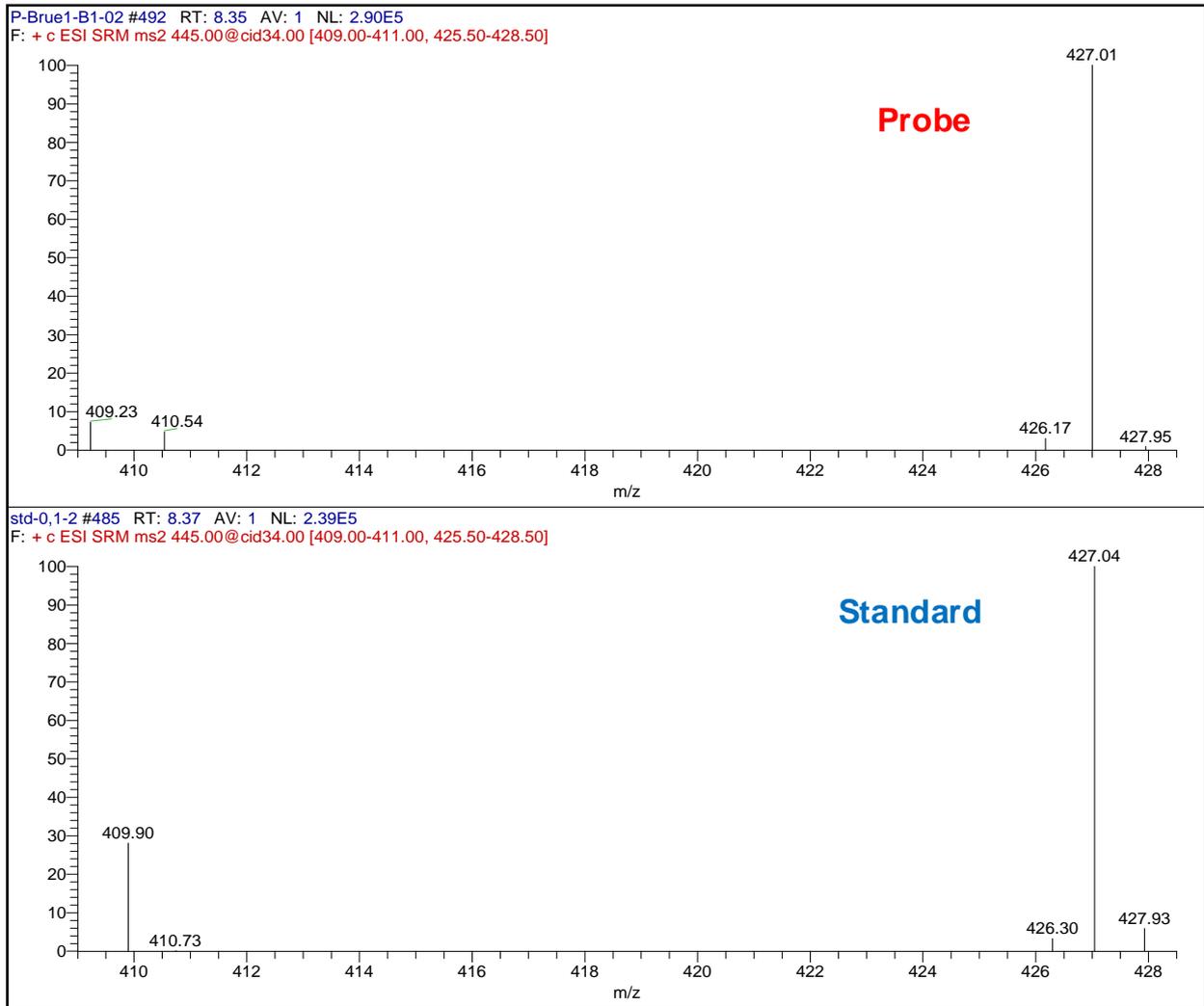
**Verdachtsbefund auf Tetracyclin***Identifizierung mit niedrigauflösender MS*

Die Analyseergebnisse mit niedrigauflösender MS haben gezeigt, dass die Peaks (entsprechend ihrer m/z-Werte und Retentionszeiten) von TC in der Porreeprobe (P-Brü-Blatt) eine gute Übereinstimmung im Vergleich mit dem TC-Standard besitzen (Abb. 60).

Mit dem LC-MS/MS konnte das TC in der Feldpflanze (P-Brü-Blatt) jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, da die detektierten massenchromatographischen TC-Signale von geringer Intensität (im Bereich der Nachweisgrenzen) sind. Deshalb war eine weitere Absicherung der Identifizierung mittels hochauflösenden FTICR-MS nötig.



**Abb. 60a:** Vergleich der Massenchromatogramme der P-Brü-Blatt-Porreeprobe (oben) mit dem TC-Standard (unten): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

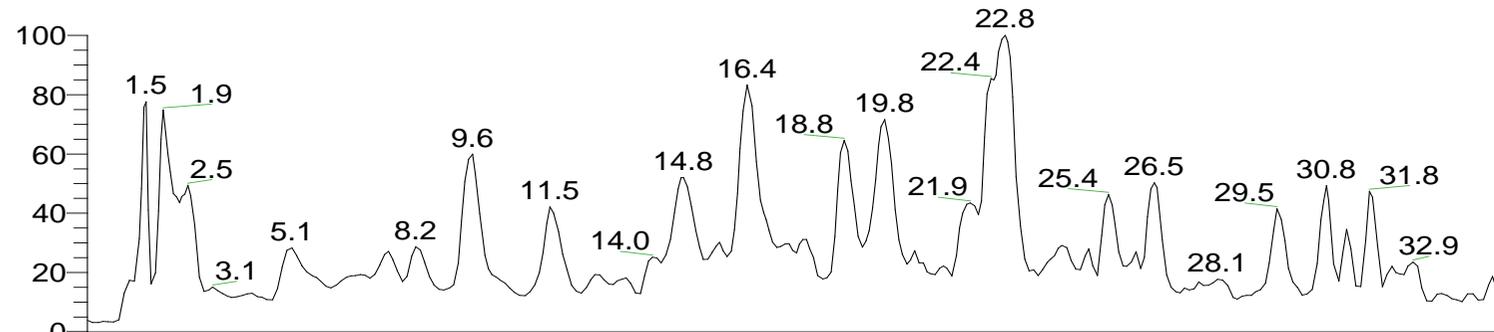


**Abb. 60b:** Vergleich der Massenspektren der P-Brü-Blatt-Porreeprobe (oben) mit dem TC-Standard (unten): LC-MS/MS (LR-MS), SRM-Modus

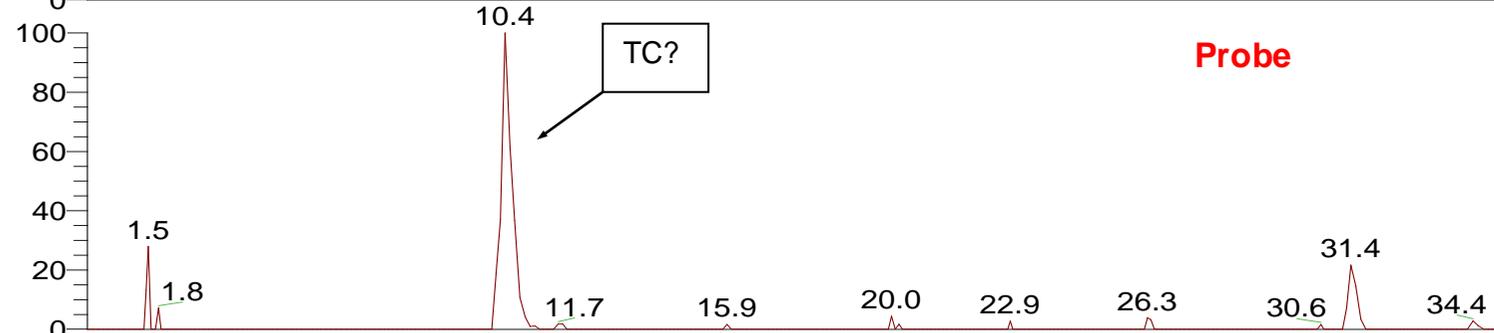
### **Bestätigung mit hochauflösender MS**

Die Abb. 61 zeigt die mit FTICR-MS gemessenen Massenchromatogramme der P-Brü-Blatt-Probe und des TC-Standard.

RT: 0.0 - 35.0

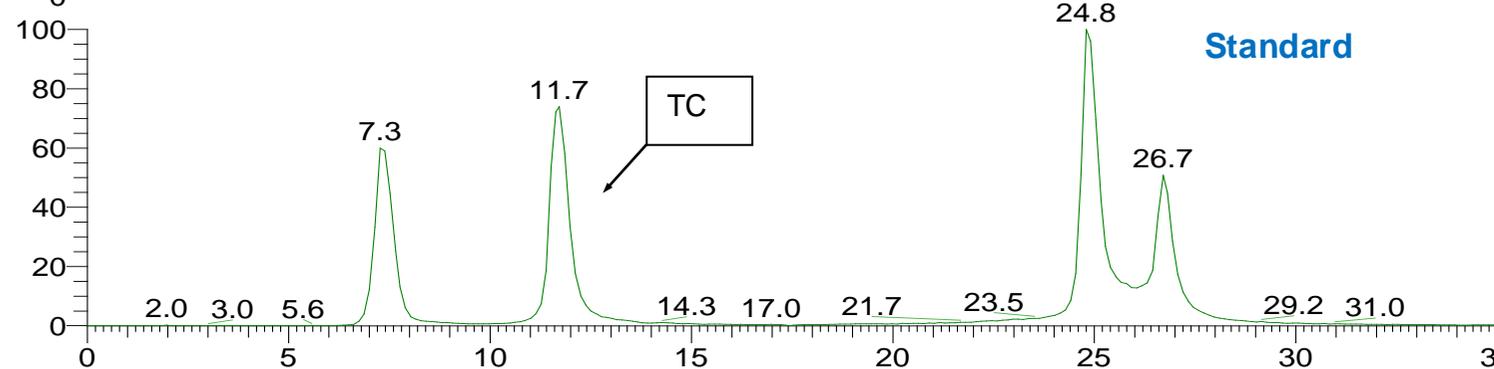


NL: 9.02E6  
 TIC F: FTMS + p  
 ESI Full ms  
 [200.00-500.00] MS  
 080415-89



Probe

NL: 1.81E4  
 m/z=  
 445.15386-  
 445.16722 F: FTMS  
 + p ESI Full ms  
 [200.00-500.00] MS  
 080415-89

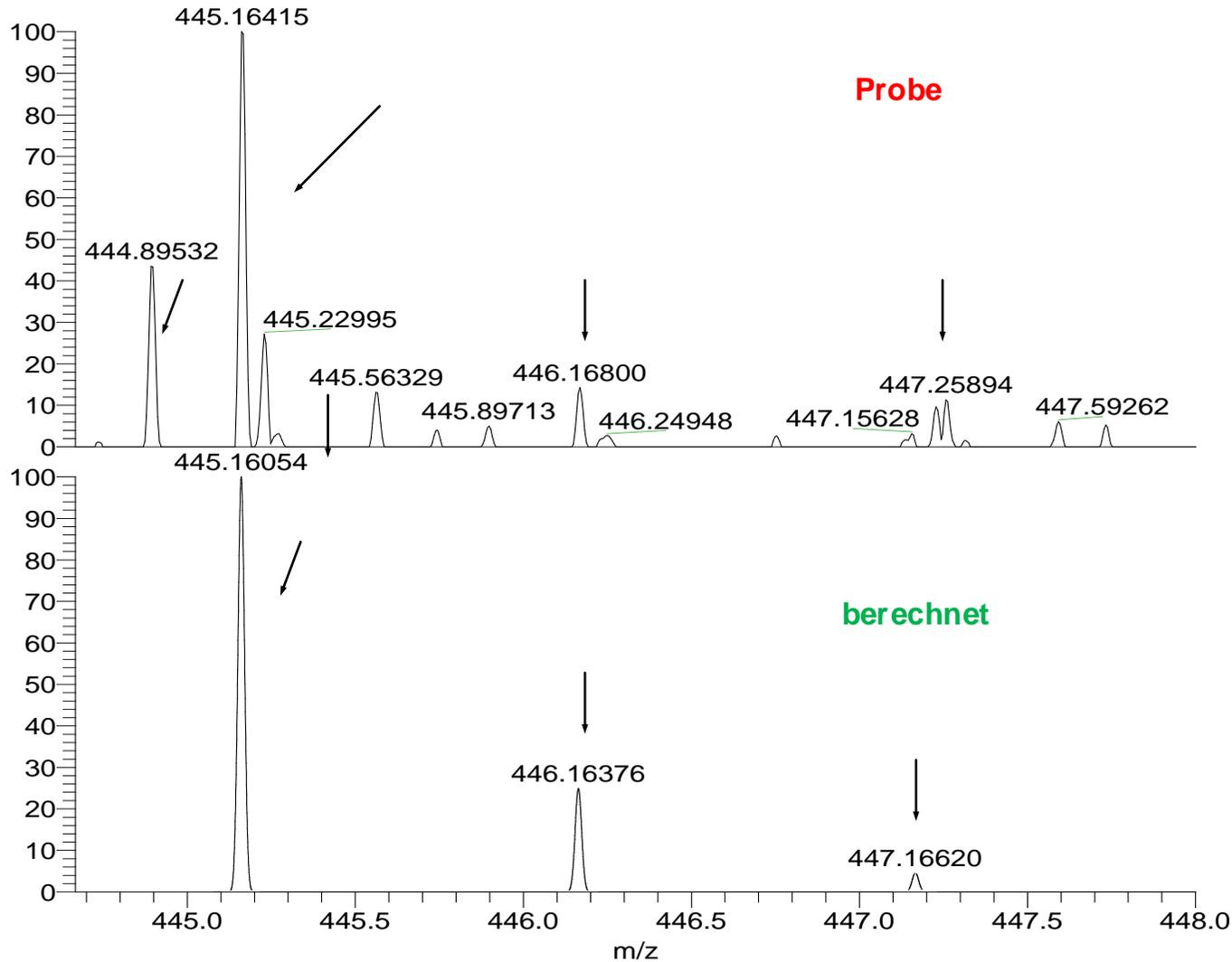


Standard

NL: 5.19E5  
 m/z=  
 445.15386-  
 445.16722 F: FTMS  
 + p ESI Full ms  
 [200.00-500.00] MS  
 080415-05

Time (min)

**Abb. 61:** Vergleich der Massenchromatogramme der P-Brü-Blatt-Porreprobe (oben) mit dem TC-Standard (unten): FTICR MS (HR-MS), Full Scan



NL:  
1.76E4  
080415-89#851 RT: 10.37  
AV: 1 F: FTMS + p ESI Full  
ms [200.00-500.00]

NL:  
1.80E4  
C<sub>22</sub> H<sub>25</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub>:  
C<sub>22</sub> H<sub>25</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub>  
p (gss, s /p:40) Chrg 1  
R: 20000 Res .Pwr . @FWHM

**Abb. 62:** Vergleich des gemessenen Massenspektrums der P-Brü-Blatt-Porreeprobe bei 10,37 min (oben) mit dem berechneten Massenspektrum von TC mit m/z = 445,16054 (unten): FTICR-MS (HR-MS), Full Scan

In der Abb. 62 ist zu sehen, dass die Retentionszeit im Vergleich zum Standard übereinstimmt. Jedoch liegt die Abweichung der exakten Masse im Full Scan im Vergleich zum Standard im Grenzbereich (Abweichung 10,3 ppm, Toleranz <1 ppm, s. Seite 60, Kap.6.3.2.2). Es wurden keine weiteren MS-Experimente durchgeführt. Daher konnte eine abschließende Zuordnung aufgrund der Daten nicht erfolgen.

#### *Fazit*

Aufgrund der niedrigen Probenanzahl ist der Aussagewert der Analyseergebnisse gering. Jedoch geben die detektierten massenchromatographischen Signale im niedrig- und insbesondere im hochauflösenden MS-Modus qualitative Hinweise auf Tetracyclin, sowie einem Didesmethyl-Derivat des Oxytetracyclins (N-DDM-OC) und Ciprofloxacin in Gemüseproben. Dabei stellte sich heraus, dass für weitere Untersuchungsreihen noch Optimierungsbedarf besteht, insbesondere beim Weißkohl.

## 9 ZUSAMMENFASSUNG

Viele Studien belegen das hohe Aufnahme- und Transportpotenzial zahlreicher Nutzpflanzen, die in der Lage sind, Veterinärpharmaka unterschiedlicher Wirkstoffgruppen über die Wurzel aufzunehmen. Weiterhin wurde ein Transfer von Antibiotika aus Güllebeaufschlagtem Boden in den als Nahrungs- und Futtermittel genutzten Teil des Getreides, das Korn, nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass allgemein mit einem Transfer antibiotisch aktiver Pharmaka-Rückständen aus Wirtschaftsdüngern in pflanzliche Lebens- und Futtermittel zu rechnen ist. Unklar ist jedoch, ob dieser Transfer auch in der Praxis der konventionellen Landwirtschaft von Bedeutung ist. Daher wurde im Rahmen eines Screenings überprüft, ob Antibiotika in Getreide nachgewiesen werden, wenn der Anbau in einer Region mit intensiver Schweinehaltung auf langjährig mit Gülle gedüngten Böden erfolgt. Des Weiteren wurden handelsübliche Weizenproben aus Niedersachsen untersucht, um sowohl in Getreide als auch Getreidemahlerzeugnissen die Rückstandssituation von Antibiotika zu überprüfen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Aufnahmeexperimente durchgeführt, um nähere Erkenntnisse über die Aufnahme der Antibiotika von Gemüse zu gewinnen. Die zentrale Zielsetzung dieser Experimente bestand darin, das Aufnahmepotential von Weißkohl und Porree für verordnungsstarke Wirkstoffe aus der Nutztierhaltung über Dotierungsexperimente in Hydrokultur zu erkennen. Anschließend sollten Feldpflanzen beprobt und analysiert werden, um rückstandsanalytische Daten über die Belastungssituation von Gemüse aus landwirtschaftlicher Praxis zu gewinnen.

Zu Beginn der Arbeit wurde eine LC-MS/MS basierte Methode zur Bestimmung von Antibiotikawirkstoffen und ihrer Umwandlungsprodukte in Pflanzen entwickelt. Dabei wurde die im Vorprojekt entwickelte Methode auf zusätzliche Wirkstoffgruppen und (pflanzliche) Metabolite erweitert und optimiert. Die Vorgehensweise zur Optimierung der Probenvorbereitung konzentrierte sich auf die Extraktion des gemahlten Korns und des homogenisierten Gemüses mit Citratpuffer und die nachfolgende Festphasenextraktion (SPE, Solid Phase Extraction).

Bei der Optimierung der Fest-Flüssig-Extraktion wurden verschiedene Extraktionsverfahren getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz der Mikrowellentechnik zu einer niedrigeren Wiederfindung führte. Bei der Accelerated-Solvent-Extraction (ASE) war die Wiederfindung höher als bei der Mikrowellentechnik. Allerdings wurde in den MS-Chromatogrammen eine Intensitätssteigerung der Untergrundsignale beobachtet. Daher wurde die ursprüngliche Ultraschall-gestützte Extraktion bei Raumtemperatur beibehalten.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Stoffe wurde ein HPLC-Komplettsystem (Thermo Finnigan/Thermo Electron) mit dem massenselektiven Detektor LCQ-Advantage ESI-Ion-

Trap verwendet. Zur Bestätigung der Stoffidentifizierung wurden bei den Pflanzenproben mit positiven Befunden weitere Analysen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (FTICR-MS Fourier Transform Ionencyclotron Resonanz-Massenspektrometrie) durchgeführt.

Die umfassende Validierung der LC-MS<sup>n</sup>-Verfahren erfolgte nach EU-Richtlinien. Es wurden die Validierungsparameter Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Selektivität, Präzision und Matrixeffekte bestimmt. Die ermittelten Wiederfindungen liegen beispielsweise für Tetracycline bei 54,5-107,0 % und für SFD bei 38,3-50,3 %. Für die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen ergaben sich Höchstwerte von 11,9 % für SFD und Minimalwerte von 2,3 % für TC. Die mit der MS/MS-Detektion ermittelten Nachweisgrenzen für Getreide betragen 2,4-8,0 µg/kg und die Bestimmungsgrenzen 8,3-54,3 µg/kg. Für Gemüse wurden Nachweisgrenzen im Bereich von 8,1-47,8 µg/kg und Bestimmungsgrenzen von 8,1-41,0 µg/kg ermittelt. Die Untersuchungen auf Matrixeffekte zeigten für SFD eine deutliche Suppression der Signale durch Matrixbestandteile über den gesamten Kalibrationsbereich. Für TC und ENR war nur eine sehr leichte Suppression des Messsignals durch Matrixbestandteile festzustellen.

Die Analyse von Getreideproben der Ernten aus den Jahren 2005 und 2006, die Gebieten mit hohem Viehbesatz entstammen, führte zu sicher identifizierten positiven Befunden über das Vorkommen von Tetracyclinen (TC, CTC einschließlich Epimeren und Tautomeren, iso-CTC sowie DC und DMC) überwiegend im Winterweizen aus dem Jahre 2005. Die ermittelten Gehalte lagen vielfach unter der jeweiligen Bestimmungsgrenze (~8-18mg/kg FG) oder, in seltenen Fällen im Bereich zwischen ~30 (iso-CTC, DC), ~60 (DMC, CTC) und maximal ~95 mg/kg FG (iso-CTC). Ein deutlicher Zusammenhang zwischen angegebener Medikamentierung der Viehbestände mit Tetracyclinen und nachgewiesenen Tetracyclin-Gehalten in Boden und Korn war nicht erkennbar. Im Getreide der Ernte des Jahres 2006, das den Kreisen Borken und Coesfeld entstammt, wurden keine positiven Tetracyclin-Befunde festgestellt. Dies ist möglicherweise auf der Wurzelung des Getreides in tieferen Bodenschichten aufgrund der extremen Trockenheit während der Wachstumsperiode zurückzuführen. Ungeklärt bleiben sowohl die relativ hohen Gehalte an DMC im Winterweizen der Ernte des Jahres 2005 aus dem Kreis Borken als auch die Gehalte an DC in drei Proben aus Niedersachsen. Ob Metabolisierung in Boden und Pflanze die Ursache sein kann, ist in weiteren Untersuchungen zu klären. Die ermittelte, sehr heterogene Kontamination des Getreides der beiden Getreide-Ernten aus den Jahren 2005 und 2006 kann möglicherweise besser erklärt werden, sobald mehr Informationen über nicht bekannte Kenngrößen und Daten, wie z.B. zu Güllebelastung und Witterungseinflüssen, zur Verfügung stehen. Ein hoher und langfristiger Einsatz von Tetracyclinen wird zweifellos diesen Transfer begünstigen. Anzeichen für eine flächendeckende Belastung des Getreides durch Antibiotika-haltige Gülle in Gebieten mit hohem Viehbesatz ergaben sich bislang nicht.

Nach den Ergebnissen der Screeningstudie ist offensichtlich, dass auch in der landwirtschaftlichen Praxis in viehstarken Gebieten ein Antibiotikatransfer aus dem Boden bis in das Getreidekorn möglich ist. In der Tat kann ein derartiger Transfereffekt unter bestimmten, noch nicht definierbaren Bedingungen auftreten. Zweifellos wird ein hoher und langjähriger Einsatz von Tetracyclinen der dominierende Faktor sein. Es besteht nach der jetzigen, noch sehr schmalen Datenbasis aber kein Grund zur Annahme, dass in viehstarken Gebieten mit einer flächendeckenden Belastung des Getreides mit Antibiotika aus Gülle zu rechnen ist.

Andererseits wurden bestimmte Signale der Massenchromatogramme ( $MS^1$  und  $MS^2$ -Modus) des LCQ-Systems zunächst dem Tetracyclin zugeordnet, was sich aber in der Hochauflösung (FTICR-MS) nicht bestätigen ließ. Offensichtlich überlagern mehrfach geladene Peptidfragmente  $[M+H]^{n+}$  ( $n=1-7$ ) den Quasi-Molekülonenbereich des Tetracyclins, was die Ursache falsch positiver Befunde mit der niedrigauflösenden LC-MS-Methode sein kann. Peptide könnten durch enzymatische Proteolyse während der Extraktion des Getreides mit Citratpuffer gebildet werden. Deshalb wurden verschiedene Varianten der Inkubationsmethode (mit Protease-inhibitor-Cocktail) erprobt und anschließend die Wiederfindungen ermittelt. Jedoch konnten Wiederfindungswerte nicht für alle Analyte ermittelt werden, da in den Chromatogrammen der mit Protease-Inhibitor dotierten Extrakte Zusatzpeaks auftraten. Insbesondere im  $m/z$ -Bereich der Tetracycline überlagerten diese zusätzlichen Peaks die eigentlichen TC-Peaks. Daher wurden die Getreideextrakte bei noch folgenden Probenaufarbeitungen nicht mit Protease-Inhibitor-Cocktail behandelt. Deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Extraktion selektiver zu gestalten. Als Alternative ist der Einsatz einer multidimensionalen Festphasenextraktion (MD-SPE) denkbar, um eine Störung durch die Peptide als Matrixbestandteil in Pflanzen zu reduzieren. Im weiteren Teil dieser Arbeit wurden handelsübliche Weizenproben aus Niedersachsen untersucht. Von den insgesamt 46 der analysierten handelsüblichen Getreideproben (Korn, Mehl, Kleie) wurden in drei Weizenproben (Korn) ENR (max. 32,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) und in einer Weizenprobe (Korn) OTC oberhalb der Nachweisgrenze detektiert. Die detektierten massenchromatographischen Signale sind zwar von geringer Intensität, geben aber im niedrig- und insbesondere im hochauflösenden MS quantitative Hinweise auf ENR.

Um die Zeiteffekte bezogen auf die Stabilität der Antibiotikawirkstoffe in Getreide festzustellen, wurde die Analyse der Getreideproben wiederholt. Zuerst wurden die Weizenproben aus der Ernte 2006 nach 24 monatiger Lagerung bei Raumtemperatur entsprechend der Arbeitsvorschrift analysiert. Bei diesen zwei Winterweizenproben handelte es sich um Proben, in denen DC nachgewiesen wurde. Demgegenüber ist in diesen Proben nach einer 24-monatigen Lagerung bei Raumtemperatur kein DC und e-DC mehr nachweisbar. Ebenfalls wurden zusätzlich vier Weizenproben der handelsüblichen

Winterweizen analysiert. Bei diesen Proben handelt es sich um die Weizenproben mit positivem ENR-Befund (32,7 µg/kg und 30,1 µg/kg). Demgegenüber lag der Gehalt an ENR bereits nach fünf Wochen unterhalb der Bestimmungsgrenze (15 µg/kg). Diese Ergebnisse lassen auf Abbaureaktionen und/oder Sorptionvorgänge schließen, welche zu einer verminderten Extrahierbarkeit und somit zur Reduzierung der nachweisbaren Analytengehalte in Getreideproben führen.

Für die Aufnahmeexperimente wurden im ersten Schritt Weißkohl, die in Deutschland am meisten verzehrte Kohllart, und Porree kontrolliert angezogen und anschließend auf Hydrokultur umgesetzt. Den Nährlösungen wurden verschiedene Antibiotika (SFD, ENR, TC, CTC und MON) zugesetzt. Nach ein bis dreiwöchigem Wuchs auf den dotierten Nährlösungen wurden Pflanzenproben genommen und dann jeweils analysiert.

Die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente zeigen, dass die makroskopischen Wirkungen der Antibiotika auf die in Hydrokultur angezogenen Gemüsepflanzen (Dotierungskonzentration der Nährlösung: 5 µmol/L je Antibiotikum) sehr unterschiedlich waren. Sie reichten beim Porree von nicht erkennbaren Effekten (MON, SFD) und schwach ausgeprägten Ausbleichungseffekten in jungen Blattabschnitten (CTC), bis zu starken Effekten durch den Einfluss von ENR. Die (phytotoxischen) Wirkungen der Antibiotika auf die Weißkohlpflanzen waren wesentlich ausgeprägter. So zeigte der mit CTC dotierte Weißkohl gelbliche Verfärbungen der Leitbahnen. MON führte an einigen Blättern zu Läsionen und schließlich zum Welken. Bei Dotierung mit ENR war eine fast vollständige Ausbleichung der jungen Blätter festzustellen.

Mit LC-MS/MS-Methoden (niedrig- und hochauflösende MS) wurden die dotierten Antibiotikawirkstoffe sowie Umwandlungsprodukte und Metaboliten separat in den Pflanzenteilen von Porree (Wurzel, junge und alte Blattabschnitte) sowie Weißkohl (Wurzel, Stängel, junge und alte Blätter) identifiziert und quantifiziert. Je nach Wirkstoff, Gemüseart und Pflanzenteil umfassten die ermittelten Arzneistoffrückstände mehrere Größenordnungen (µg/kg bis mg/kg-Bereich). Die höchsten Konzentrationen wurden in den Wurzeln bei den Gemüsepflanzen mit CTC, TC (Weißkohl: ca. 10 mg/kg FG, Porree: ca. 20 mg/kg) und ENR (Weißkohl: ca. 12 mg/kg) erreicht, das in geringen Anteilen zum CIP metabolisiert. ENR wurde in extremem Ausmaß in der Weißkohlpflanze transportiert, so dass alte Weißkohlblätter ähnlich hohe ENR-Gehalte (ca. 7 mg/kg FG) enthielten wie die Wurzeln. In den Stängeln und Blättern (jung und alt) des Weißkohls sowie den jungen und alten Blattabschnitten des Porrees wurden alle dotierten Wirkstoffe nachgewiesen. Dabei dominieren ENR und CTC (einschließlich seiner Umwandlungsprodukte wie z.B. DMC und TC), während SFD und MON in deutlich niedrigeren Konzentrationen vorgefunden wurden (< 100 µg/kg).

Im Rahmen des Gemüse-Projektes war geplant, Weißkohl und Porree aus landwirtschaftlicher Praxis zu beproben und auf mögliche Antibiotikarückstände zu analysieren. Da von fast allen der angesprochenen Betriebe und mit Gemüsebau befassten Organisationen eine Probenahme abgelehnt worden war, konnten leider nur wenige Feldpflanzen (Weißkohlköpfe, Porreestangen, Chinakohlköpfe) beprobt und analysiert werden, bei denen sich einige Verdachtsbefunde (TC, CTC-Metabolite, CIP) ergaben. Zweifelsfrei belegen aber die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur ein enormes Aufnahmepotential von Weißkohl und Porree für einige Veterinärpharmaka, insbesondere für TC und ENR.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der o.g. Studien (Screeningstudien in konventioneller Landwirtschaft, Hydrokulturversuche), dass neben Lebensmitteln tierischen Ursprungs, ein weiterer Eintragspfad für Antibiotika in die Lebensmittelkette über Nutzpflanzen möglich ist, da Antibiotika aus Gülle-beaufschlagten Böden von Nutzpflanzen (Getreide, Gemüse) aufgenommen werden. Diese Nutzpflanzen können antibiotisch wirksame Substanzen über die Wurzel aufnehmen, diese einlagern, innerhalb der Pflanze in verschiedene Kompartimente transportieren und metabolisieren. Die Metabolisierung der Substanzen in Pflanzen kann zum Auftreten anderer Metabolite führen. Das Verhalten der Wirkstoffe in einer Pflanzenart ist nicht direkt auf das Verhalten in anderen Pflanzenarten übertragbar. Zudem stellen die Güllebelastung, Bodenparameter sowie Witterungsverhältnisse weitere Einflussfaktoren dar.

In der Fachliteratur publizierte Ergebnisse von Aufnahmeversuchen unter Gewächshausbedingungen bestärken die aus den o.g. Studien gefolgerten Ergebnisse. Um weitere Abschätzungen vornehmen zu können, müssen Feldversuchen durchgeführt werden. Daher ist die Dringlichkeit offenkundig, Feldpflanzen systematisch auf Versuchsflächen und (langjährig) Gülle-gedüngten Verdachtsflächen zu beproben und rückstandsanalytisch zu untersuchen.

Außerdem kann bislang keine Aussage darüber getroffen werden, welcher Anteil der im begüllten Boden enthaltenen Tierarzneimittelrückstände tatsächlich durch die Pflanze aufgenommen wird. Des Weiteren liegen keine Erkenntnisse darüber vor, in welchem Maße die in der Pflanze vorhandenen Rückstände nach Aufnahme durch den Menschen bioverfügbar sind. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig. Erst dann wäre das Verbraucherrisiko durch den möglichen Antibiotika-Eintragspfad „Nutzpflanze“ in die Nahrungsmittelkette abschätzbar.

---

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] J. Bauer; *Schweinegülle – Quelle für potentiell unerwünschte Stoffe (Boden, Wasser, Pflanze)?*; Einführung Tagungsband, 5. Kulturlandschaftstag, 4. Mai 2006, Freising-Weißenstephan, Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft; ISSN 1611-4159, **2006**, 12-15
- [2] B. Halling-Sørensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützholt, S.E. Jørgensen; *Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A Review*, Chemosphere 36, **1998**, 357-393
- [3] G. Hamscher, H.T. Pawelzick, H. Höper, H. Nau; *Different Behavior of Tetracyclines and Sulfonamides in Sandy Soils after Repeated Fertilization with Liquid Manure*; Environ. Toxicol. Chem. 24, **2005**, 861-868
- [4] M. Schneidereit; *Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen*; Bundesverband für Tiergesundheit (BfT), Vortrag, Bonn, 14. September **2006**  
[http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz\\_in\\_der\\_veterinaermedizin\\_folien.pdf](http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf)
- [5] K. Kümmerer; *Antibiotics in the aquatic environment; A review - Part 1*, Chemosphere 75, **2009** a, 417-434.
- [6] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag, Fresenius Environmental Bulletin – FEB, **2004**, 13: 1216-1224.
- [7] GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (Hrsg.), Kommunikation FLUGS-Fachinformationsdienst. *Antibiotika und Antibiotikaresistenzen*. Neuherberg, **2007**, 1-14.
- [8] N.A. Krasilnikov, Soil, microorganisms and higher plants, in: Academy of Sciences of the USSR (Hrsg); *Interaction between soil microorganisms and plants*, Part IV, Moskau; **1958**, Übersetzung von 1961. Washington .D.C.: The national science foundation.
- [9] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden - Ergebnisse eines Modellversuchs*; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1, **2006**, 38 – 50
- [10] A.B.A. Boxall, P. Johnson, E.J. Smith, C.J. Sinclair, E. Sturr, L.S. Lew; *Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants*; J. Agric. Food Chem. 54, **2006**, 2288-2297
- [11] N. P. Gujarathi, J. B. Haney, J. C. Linden; *Phytoremediation potential of Myriophyllum aquaticum and Pistia stratiotes to modify antibiotic growth promoters, tetracycline and oxytetracycline, in aqueous wastewater systems*; Internat J Phytoremed 7, **2007**, 99–112.
- [12] K. Kumar, S.C. Gupta, S.K. Baidoo, Y. Chander, C. Rosen; *Antibiotics uptake by plants from soil fertilised with animal manure*; J. Environ. Qual. 34, **2005**, 2082-2085
- [13] Agrarstrukturerhebung 2005, Heft 4, *Viehhaltung Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft*, C IV 9.4 – j / 05, Statistische Berichte Niedersachsen Landesbetrieb für Statistik und Kommunikationstechnologie Niedersachsen, **2009**
- [14] *Gülle-Festmist-Jauche-Silagesickersaft-Gärreste Gewässerschutz* (JGS-Anlagen), Umweltministerium Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum, Merkblatt, Baden-Württemberg, **2008**
- [15] ATV-DVWK; *Beeinflussung der Grundwasserqualität durch Wirtschaftsdünger und Sekundärstoffe unter besonderer Berücksichtigung problematischer Stoffgruppen*. Teilprojekt: Bestandsaufnahme des derzeitigen Kenntnisstandes und Bewertung unter besonderer Berücksichtigung des Grundwasserschutzes. ATV-DVWK - Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V., Arbeitsgruppe GB-6.2, Arbeitsbericht, ISBN 3-935669-71-2, **2001**
- [16] *Wirtschaftsdünger und Gewässerschutz Lagerung und Ausbringung von Wirtschaftsdüngern in der Landwirtschaft*, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), **2009**

- [17] P. Gurrath; *Landwirtschaft in Deutschland und der Europäischen Union*; Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Online-Dokument, [www.destatis.de](http://www.destatis.de), letzter Zugriff am 05.05.2010, **2009**
- [18] *Bodennutzung und Ernte 2007*, Statistische Berichte Niedersachsen, Landesbetrieb für Statistik und Kommunikationstechnologie Niedersachsen (LSKN); online Dokument, <http://www.lskn.niedersachsen.de>, **2007**
- [19] Merkblatt zur Düngeverordnung, *Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen* (Düngeverordnung-DüV) vom 10. Januar 2006, BGBl. I 2006, Nr. 2, S. 20 - 29, Neufassung der Düngeverordnung vom 27. Februar 2007, BGBl. I 2007, Nr. 7, S. 221 - 240
- [20] O. Rühlmann; *Wirtschaftsdünger, effektiv und umweltschonend lagern und einsetzen*; LUFA Sachsen-Anhalt, **2000**
- [21] D. Fritz, J.Habben; *Der Einfluß von ökologischen Faktoren, Düngung und Anbautechnik auf die Qualität von Gemüse für die Konserven-industrie*; in Einfluß von Standort, Düngung und Anbautechnik auf die Qualität von Gemüse, Technischen Universität Münschen, **1972**
- [22] O. Hördemann; *Untersuchungen zur Gülleverträglichkeit von Grünlandgräsern, dargestellt am Beispiel des Deutschen Weidelgrases (Lolium perenne)*. Jahrestagung AG Grünland und Futterbau, Kleve, 108 – 125, **1987**, letzter Zugriff am 05.05.2010  
[http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1174997\\_I3/index.html](http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1174997_I3/index.html)
- [23] *Nährstoffvergleich und Humusbilanzierung im Ökologischen Landbau*, <http://www.mugv.brandenburg.de/cms/detail.php/lbm1.c.211496.de>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [24] *Ökolandbau-Portal*, Online-Dokument, <http://orgprints.org/2925/9/lichtenhahn-koller-2004-gemuese-kohl.pdf>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [25] R. Sattelberger; *Arzneimittelrückstände in der Umwelt - Bestandsaufnahme und Problemdarstellung*; Bericht des Umweltbundesamtes; Wien; **1999**
- [26] R. Sattelberger, O. Gans, E. Martínez; *Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*; Umweltbundesamt, Bericht, ISBN 3-85457-775-3, **2005**
- [27] S. Schwarz, E. Chaslus-Dancla; Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance; *Vet. Res.* 32, **2001**, 201-225
- [28] T. Christian; *Antibiotika in Oberflächengewässern Nordrhein-Westfalens*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2004**; [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online/math\\_nat\\_fak/2004/christian\\_thorsten/0476.pdf](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2004/christian_thorsten/0476.pdf), Zugriffen am 05.05.2010
- [29] S. Schwarz, C. Kehrenberg, T.R. Walsh; *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*; *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, **2001**, 431-437
- [30] S. Schwarz, C. Werckenthin; *Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*; *Chemotherapie Journal* 6, **2001**, 197-202
- [31] H. Bentz; *Veterinärmedizinische Pharmakologie. Antibiotika. Antiparasitika*; 1. Aufl. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 461-503 und 524-534, **1982**
- [32] F. Bager; *Danmap 2000 – Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*; Danish Veterinary&Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark, ISSN 1600-2032, **2001**
- [33] R. Kroker, R. Scherkl, F.R. Ungemach; *Chemotherapie bakterieller Infektionen*; in Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2. Aufl. Enke Berlin, 353-394, **2002**
- [34] VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung; *ABl. L* 268 vom 18.10. **2003**
- [35] A. Richter, W. Löscher; *Zusatzstoffe mit pharmakologischer Wirkung*; In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. H.H. Frey, W. Löscher (Hrsg.), 2. Aufl. Enke Berlin, **2002**, 592-597

- [36] A. Richter, W. Löscher, W. Witte, W; *Leistungsförderer mit antimikrobieller Wirkung: Probleme aus pharmakologisch-toxikologischer und mikrobiologischer Sicht*; Praktischer Tierarzt, 7, 603-622, **1996**
- [37] R. Helmuth; *Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin - Zum Stand der Diskussion*; Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz 42, **1999**, 26-34.
- [38] D. Müller-Bahrdt; *Entwicklung des Einsatzes antimikrobiell wirksamer Tierarzneimittel in Fütterungsarzneimitteln in Sachsen-Anhalt in den Quartalen 03/2000, 01/2001, 03/2001 und 01/2002 und einer ausgewählten Großtierpraxis im 1. Quartal 2002*; Dissertation, Universität Leipzig, **2004**
- [39] BGVV – Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin; *BgVV fordert zu zurückhaltendem und sorgsamem Umgang mit Tierarzneimitteln und Futterzusatzstoffen auf*; Pressemitteilung 07/1997 (14.4.1997)
- [40] Verordnung (EG) Nr.2821/98 des Rates vom 17. Dezember 1998 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung; ABl. L 351 vom 29.12. **1998**
- [41] Germap 2008; *Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, **2008**, ISBN 978-3-00-025097-2
- [42] K. S. Lauen; *Erhebungen zum Arzneimitteleinsatz durch bayerische Tierärzte bei Lebensmittel liefernden Tieren*; Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2006**
- [43] EMEA: *Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic use of Veterinary Medicines Report and Qualitative Risk Assessment. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products*. www.emea.eu.int/care: blinded, randomised controlled trial of patient information leaflet. BMJ 324, **1999**, 91-94; Medizinisches Wissensnetzwerk der Universität Witten/Herdecke
- [44] F. Ungemach; *Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation*; Acta agriculturæ scandinavica supply 93, **2000**, 89–97
- [45] M. Boatman; *Survey of antimicrobial usage in animal health in the European Union 1998*; Boatman Consulting by order of Fedesa, **1998**
- [46] R. Brunner, A. Rank, K. Riedl; in: *Die Antibiotica*, Band 1 (Die großen Antibiotika), Teil 2 (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline); Verlag Hans Carl, Nürnberg, **1962**, 311-625
- [47] H. Muxfeldt; *Synthesen in der Tetracyclin-Reihe*; Angew Chem **1962**; 74: 443-78.
- [48] H. Auerhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje; in: *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart; 13. Aufl., **1994**, 741-795
- [49] R.A. Fernandez, S. A. Dassie; *Transfer of tetracyclines across the H<sub>2</sub>O/1,2-dichloroethane interface: Analysis of degraded products in strong acid and alkaline solutions*, Journal of electroanalytical chemistry 585, **2005**, 240-249
- [50] L.A. Syed; *Tetracycline Hydrochloride*, Analytical profiles of drugs, 13, 597-653, **1984**
- [51] W. Dürckheimer; *Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungsbeziehungen*; Angew. Chem. 87, **1975**, 751-784
- [52] C.R. Stephens, K. Murai, K.J. Brunings, R.B. Woodward; *Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics*; J. Am. Chem. Soc. 78, **1956**, 4155-4158
- [53] J.M. Wessels, W.E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider; *The Complexation of Tetracycline and Anhydrotetracycline with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>: A Spectroscopic Study*; J. Phys. Chem. B 102, **1998**, 9323-9331
- [54] H.A. Duarte, S. Carvalho, E.B. Paniago, A.M. Simas; *Importance of Tautomers in the Chemical Behavior of Tetracyclines*; J. Pharm. Sci. 88, **1999**, 111-120
- [55] .O. G. Othersen, H. Lanig, and T. Clark; *Systematic surface scan of the most favorable interaction sites of magnesium ions with tetracycline*. J. Med. Chem., 46, **2003**, 5571-5574.

- [56] J. M. Wessels, W. E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider; *The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>: A spectroscopic Study*; J.Phys. Chem. B, 102, **1998**, 9323-9331.
- [57] Y. Liang, B. Denton, R.B. Baters, *Stability studies of tetracycline in methanol solution*; journal of Chromatography A, 827, **1998**, 45-55
- [58] J. Zhu, D.D. Snow, D.A. Cassada., S.J. Monson, R.F. Spalding, *Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 928, **2001**, 177-186
- [59] J.R.D. McCormick, S.M. Fox, L.L. Smith, B.A. Bitler, J. Reichenthal, V.E. Origoni, W.H. Muller, R. Winterbottom, A.P. Doerschuk; *Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines*; J. Am. Chem. Soc. 79, **1957**, 2849-2858
- [60] A. Vockel; *Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS – Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien*; Dissertation, Universität Paderborn, **2005**
- [61] D.A. Hussar, P.J. Niedergall, E.T. Sugita, J.T. Doluisio; *Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives*; J. Pharm. Pharmacol., 20, **1968**, 539-546
- [62] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, S.A. Hewitt, J.D.G. McEvoy; *Metabolism of chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg*; Analyst 123, **1998**, 2443-2447
- [63] J. Diana, L. Vandenbosch, B. De Spiegeleer, J. Hoogmartens, E. Adams; *Evaluation of the stability of chlortetracycline in granular premixes by monitoring its conversion into degradation products*; J. Pharm. Biomed. Anal. 36, **2005**, 523-530
- [64] H. J. Roth, H. Fenner; *Pharmazeutische Chemie III: Arzneistoffe Struktur -Bioreaktivität - Wirkungsbezogene Eigenschaften*. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, **1988**, 39-90.
- [65] D. Schnappinger, W. Hillen; *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*; Arch. Microbiol. 165, **1996**, 359-369
- [66] H. Pawelzick; *Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten – Untersuchungen von Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie*; Dissertation, Universität Hannover, **2005**
- [67] G. Domagk; *Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen*; Dtsch. Med. Wschr. 7, **1935**, 250-256
- [68] C. Hartig; *Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt*; Dissertation, Technische Universität Berlin, **2000**
- [69] J.W. Spoo, J.E. Riviere; *Sulfonamides*; in: H.R. Adams (Hrsg.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Iowa State University Press, Ames (USA), 8. Edition, 796-817, **2001**
- [70] S. Thiele-Bruhn; *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review*, J. Plant Nutr. Soil Sci. 166, **2003**, 145-167
- [71] W. Tappe, C. Zarfl, S. Kummer, P. Burauel, H. Vereecken, J. Groeneweg; *Growth-inhibitory effects of sulfonamides at different pH: Dissimilar susceptibility patterns of a soil bacterium and a test bacterium used for antibiotic assays*; Chemosphere 72, **2008**, 836-843
- [72] J.L. Woolley, C.W. Sigel; *Metabolism and disposition by the rat of sulfadiazine-S-35 alone and in the presence of trimethoprim*; Drug Metabolism and Disposition 7, **1979**, 94-99
- [73] P. Duelli; *Untersuchungen zum Vorkommen von Antiinfektiva in bayerischer Konsum- und Tankmilch*, Universität München, **2008**
- [74] M. Clara, O. Gans, F. Humer, S. Weiß, I. Zieritz; *Antibiotika Im Grundwasser*; Sondermessprogramm im Rahmen der Gewässerzustandsüberwachungsverordnung, Report REP-0258, ISBN 978-3-99004-059-1, Wien, **2010**

- [75] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; *Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente*; Abschlußbericht vom 14.01.2005 des Forschungsauftrages IIA5 – 2038.06.06.01 – B/T /01“; Ministerium für Verbraucherschutz des Landes NRW, **2005**
- [76] H.-H. Frey, W. Löscher; *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*; 1. Aufl., Enke Verlag, **1995**, Stuttgart
- [77] F. R. Althaus; *Antimikrobielle Wirkstoffe und Entzündungshemmer*, Universität Zürich, **2004**, [http://www.vetpharm.unizh.ch/script/pdf\\_data/abcs.pdf](http://www.vetpharm.unizh.ch/script/pdf_data/abcs.pdf)
- [78] W. Löscher; *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren Parey*, **2006** zitiert in Literatur [71]
- [79] European Agency for the Evaluation of Medical Products, Committee for veterinary medical products Summary report, **2002**, <http://www.emea.eu.int>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [80] *Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin)*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Chemotherapie Journal H, 3, 8, **1999**, 89-109; <http://www.p-e-g.org/publikationen/ctj/0399/UEBER.PDF>; letzter Zugriff am 05.05.2010.
- [81] O. Robak, W. Graninger; *Chinolone in der Veterinärmedizin*; Antibiotika Monitor, tom. XXII, 6, **2006**, 91-96; [http://www.antibiotikamonitor.at/06\\_6/pdf/06\\_6\\_03.pdf](http://www.antibiotikamonitor.at/06_6/pdf/06_6_03.pdf); letzter Zugriff am 05.05.2010
- [82] G. Hamscher; *Entwicklung und Einsatz neuer rückstandsanalytischer Nachweisverfahren für Antibiotika und Antiparasitika in Umwelt- und Lebensmittelproben*, Tierärztlichen Hochschule Hannover, Habilitation, **2003**
- [83] J. E. Renew, C.-H. Huang; *Simultaneous determination of fluorquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 1042, **2004**, 113-121
- [84] R. M. Evans; *The chemistry of the antibiotics used in medicine*; Pergamon Press Ltd., Oxford, **1965**
- [85] Tolls, J.; *Sorptions of veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review*; Environmental Science&Technology, 35, 17, **2001**, 3397-3406
- [86] Z. H. Yuan, J. H. Duan, S. X. Fan, K. Kong; *Comparison of an ELISA and a HPLC for determination of ciprofloxacin residues in pork*; Food Agric. Immun. 13(3), **2001**, 199-204
- [87] Online Dokument, <http://www.gifte.de/Antidote/ciprobay.htm>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [88] T. Köhler, *Untersuchungen zum Einfluß von antibiotischen Leistungsförderern und ionophoren Antikozidien auf die Inzidenz der Clostridium perfringens-Enterotoxämie des Huhnes nach experimenteller Infektion*, Dissertation, Universität Leipzig, **2000**
- [89] J. W. Westley; *Polyether Antibiotics*; Biology, Marcel Dekker Inc., 1, **1982**.
- [90] LC-Technik, Applikationsnote, *Polyetherantibiotika*; **2008**, Online-Dokument, [www.lctech.de/.../264-LCTech-Applikation-Polyetherantibiotika.html](http://www.lctech.de/.../264-LCTech-Applikation-Polyetherantibiotika.html), letzter Zugriff am 05.05.2010
- [91] A.J. Ferdous , S. D. Bennefield, M. Singh; *A modified HPLC method for monensin analysis in liposomes and nanocapsules and its comparison with spectrophotometric and radioactive methods*, J Pharm Biomed Anal. Jul;15(11), **1997**; 1775-80
- [92] J. W. Westley; *Polyether Antibiotics* Vol. I: Biology, Marcel Dekker Inc., New York **1982**.
- [93] A.L. Donoho; *Biochemical studies on the fate of monensin in animals and the environment*. J. Anim. Sci. 58, **1984**, 1528-1539
- [94] EFSA, *Zusammenfassung des Gutachtens des Wissenschaftlichen Gremiums für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tiernahrung über die erneute Beurteilung des Kokzidiostatikums Elancoban auf Ersuchen der Kommission entsprechend Artikel 9G der Richtlinie 70/524/EWG des Rates*, EFSA-Q-2003-0045; **2003**
- [95] F. Gerlach, *Kokzidiose beim Dromedar (Camelus dromedarius)*; Dissertation, Universität Berlin, **2008**
- [96] F.D. Todd., N.R. Bagg; *Use of ionophores in lactating dairy cattle: a review*, Can Vet j: 41, **2000**, 388-394.

- [97] M. Hinrichs; *Auswirkungen von Enterococcus faecium als Futterzusatzstoff auf die Keimflora und Zusammensetzung des Darminhalts sowie auf die Leistung von Broilern bei gleichzeitigem Einsatz eines Kokzidiostatikums*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, **2005**
- [98] U. Gräfe, R. Schlegel, M. Bergholz; *Polyether-Antibiotika*, Pharmazie 10, **1984**, 661-670
- [99] *Regierung von Unterfranken-Wasser für Unterfranken*; Broschüre der Regierung von Unterfranken, Aktion Grundwasserschutz, **2006**  
<http://www.aktiongrundwasserschutz.de/informationen/loesungswege/landwirtschaft/index.htm#>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [100] A. Grudzinski; *Umweltrelevanz von Antibiotika in der Landwirtschaft*; Christian-Albrecht-Universität Kiel, **2006**
- [101] J. Lewandowski, S. Leitschuh, V. Koß; *Schadstoffe im Boden*; ISBN: 3-540-62643-3, **1997**
- [102] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil.*, Landbauforschung Völkenrode - FAL Agricultural Research 57, **2007**, 25-32
- [103] O. Gans; *Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden in Österreich*, Online-Dokument, [http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/leistungen/Umweltanalytik/Veterin\\_rantibiotika\\_in\\_Wirtschaftsd\\_nger.pdf](http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/leistungen/Umweltanalytik/Veterin_rantibiotika_in_Wirtschaftsd_nger.pdf), letzte Zugriff am 05.05.2010
- [104] G. Henkelmann, K. Mosandl; *Sorption und Abbau von Tetracyclinen und Sulfonamiden im Boden*; Online-Dokument, **2006**  
<http://www.stmugv.bayern.de/umwelt/boden/download/doc/mbodentage2006/seite112.pdf>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [105] A. Eschenbach, H. Mescher, R. Wienberg, B. Mahro; *Humifizierung von Schadstoffen*; in J. Michels, T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Fachredaktion), Umweltbundesamt (Hrsg.): Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grün-Weiße Reihe des BMBF, **2001**, 147-190,
- [106] U. Schulte-Ebbert, U. Schöttler; *Transport polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) bei der Untergrundpassage. Einfluss organischer und anorganischer mobiler Festphasen auf die Mobilität von PAK*; Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH, Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 62, **2003**
- [107] *Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grundlagen der biologischen Bodensanierung*, Umweltbundesamt Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF.
- [108] K. Smalla, C.T.T. Binh, C. Kopmann, H. Heuer; *Effekte von Veterinärantibiotika auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden*; Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 60, **2008**, 236
- [109] C. Pfeiffer, C. Emmerling, D. Schröder, J. Niemeyer; *Antibiotika (Ivermectin, Monensin) und Endokrine Umweltchemikalien (Nonylphenol, Ethinylöstradiol) im Boden*, UWSF-Umweltchem.Ökotox. 10, **1998**, 3
- [110] M. Grote, B. Kuhlmann, G. Preuß, U. Schulte-Ebbert, H. Stevens und N. Zullei-Seibert; *Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes*; Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH Dortmund, Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 66, **2007**
- [111] H. Stevens; *Untersuchungen zum Verhalten von Veterinärpharmaka im Boden*; Dissertation, Universität Paderborn, **2009**
- [112] S.E. Allaire, J.D. Castillo, V. Juneau; *Sorption kinetics of chlortetracycline and tylosin on sandy loam and heavy clay soils*; J. Environm. Qual. 35, **2006**, 969-972
- [113] C. Winckler, H. Engels, K. Hund-Rinke, T. Luckow, M. Simon, G. Steffens; *Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden (Wirkung von Tetrazyklinen und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion)*; Umweltbundesamt, Forschungsbericht 200 73 248, UBA-FB 000630, **2004**
- [114] M. Burkhardt, C. Stamm; *Depth Distribution of Sulfonamide Antibiotics in Pore Water of an Undisturbed Loamy Grassland Soil*; J. Environ. Qual. 36, **2007**, 588–596

- [115] T. Heberer, H.-J. Stan; *Arzneimittelrückstände im aquatischen System*; Wasser & Boden 50, **1998**, 20-25
- [116] *Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie*, LANUV-Fachbericht 2, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen Recklinghausen **2007**, ISSN: 1864-3930 Fachberichte
- [117] S.D. Aga.; *Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems*; ISBN: 978-1-4200-5232-9, **2008**
- [118] C. Winckler, A. Grafe A.; *Use of veterinary drugs in intensive animal production - Evidence for persistence of tetracyclines in pig slurry*; Journal of Soils and Sediments 2, **2001**, 66-70
- [119] A. Batt, D.S. Aga; *Simultaneous Analysis of multiple classes of Antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination*, Analytical chemistry, **2005**
- [120] S.-C. Kim, K. Carlson; *Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed*; Water Research, 40, **2006**, 2549-2560
- [121] J. Hartung; *Staubbelastung in der Nutztierhaltung*; Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie, 47, 2, **1997**, 65-72
- [122] S. Pedersen, M. Nonnenmann, R. Rautiainen, T.G. Demmers, T. Banhazi, M. Lyngbye; *Dust in pig buildings*; J Agric Saf Health 6, **2000**, 261–274.
- [123] J. Seedorf, J. Hartung; *Dust and micro-organisms in animal housing*; KTBL Schrift 393, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, **2002**
- [124] J. Hartung; *Gas- und partikelförmige Emissionen aus Ställen der Tierproduktion*; DtschTierärztl Wochenschr 102, **1995**, 283–288
- [125] G. Hamscher; *Tierarzneimittel in der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von Stallstäuben*, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 3, 2 / Mai **2008**
- [126] H. Pawelzick; *Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten – Untersuchungen zu Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie*, Dissertation, **2005**
- [127] K. Smalla, C.T.T. Binh, C. Kopmann, H. Heuer; *Effekte von Veterinärantibiotika auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden*; Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 60, **2008**, 236
- [128] Y. Chander, K. Kumar, S.M. Goyal, S.C. Gupta; *Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics*; J. Environm. Qual. 34, **2005**, 1952-1957
- [129] O. Mikes, P. Cupr, S. Trapp, J. Klanova; *Uptake of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides from soil and air into radishes (Raphanus sativus)*; Environmental Pollution 157, **2009**, 488-496
- [130] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs; ABl. L 224 vom 18.8.1990
- [131] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Investigation on the fate of antibiotics used in Pig farming in food chain and environment (Part 1)*; Fresenius Environmental Bulletin - FEB 13, **2004**, 1216-1224
- [132] B. Zierenberg; *Ausgewählte Ergebnisse im Verbraucherschutz und in der Tiergesundheit*, Verbraucherschutz und Tiergesundheit, Online-Dokument, [http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C47830161\\_L20.pdf](http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C47830161_L20.pdf), letzter Zugriff am 05.05.2010
- [133] A. Vockel, M. Grote, A. Mehlich; *Bestimmung von Chlortetracyclin in Schlachtproben: Methodenentwicklung und Validierung*; Laborpraxis, Juli/August, **2005**, 19-21
- [134] G. Zurhelle; *Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen*; Dissertation, Bergische Universität-Gesamt-hochschule Wuppertal, **2000**
- [135] R. Michel; *Entwicklung eines Monitoring-Systems zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte in Honig*; Universität Paderborn, Dissertation, **2010**

- [136] V. Potthast; *Nulltoleranz-Realität oder Wunschdenken*; 2. DVT-Jahrestagung, Futtermittel in Lebensmittelqualität - zwischen Theorie und Praxis, **2002**, Online-Dokument, [www.dvtiernahrung.de/img/medien/Lang-Potthast.pdf](http://www.dvtiernahrung.de/img/medien/Lang-Potthast.pdf), letzter Zugriff am 05.05.2010
- [137] M. Dettenkoffer, M. Ackermann, M. Eikenberg, H. Merkel; *Auswirkungen des Einsatzes von Antibiotika und Substanzen mit antibiotischer Wirkung in der Landwirtschaft und im Lebensmittelsektor*; Ein Literatur-Review. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Freiburg, **2004**
- [138] A. Leitner, P. Zöllner, W. Lindner; *Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 939, **2001**, 49-58
- [139] BfR: *Jahresbericht 2008 zum Nationalen Rückstandskontrollplan*. Online-Dokument, [http://www.bvl.bund.de/cln\\_027/nn\\_493680/DE/01\\_\\_Lebensmittel/01\\_\\_Sicherheit\\_\\_Kontrollen/04\\_\\_NRKP/01\\_\\_berichte\\_\\_nrkp/03\\_\\_NRKP\\_\\_ErgaenzendeDokumente\\_\\_2008/nrkp\\_\\_bericht\\_\\_2008.html#doc1330186bodyText15](http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_493680/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/01__berichte__nrkp/03__NRKP__ErgaenzendeDokumente__2008/nrkp__bericht__2008.html#doc1330186bodyText15); letzter Zugriff am 05.05.2010.
- [140] Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates - Erklärung der Kommission, *ABl. L 106 vom 17.4.2001*, S. 1–39
- [141] M. Grote; *Antibiotika in der Umwelt und in Nahrungsmitteln. Ein Risiko für Konsumenten?*; *internist.prax.* 47, **2007**, 919-926
- [142] K.J. Netter, J.E. Bueld-Kleiner; *Lebensmittel und Gesundheit*; Deutsche Forschungsgemeinschaft, ISBN: 3-527-27581-9, **1998**
- [143] EMEA/CVMP/234/01; Revised guideline on the safety evaluation of antimicrobial substances regarding the effects on human gut flora, **2002**
- [144] H.-H. Frey, W. Löscher; *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*; 1. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, **1996**, 681-696
- [145] *Rückstände von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft*; Information Nr. 019/2010 des BfR vom 15. Februar **2010**
- [146] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Amtsbl. der EG Nr. L 224/1*
- [147] F. Schulze; *Verbleib in Knochen gebundener Rückstände von Tetracyclinen während der Herstellung von Gelatine mit dem sauren Aufschlussverfahren*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, **2003**
- [148] CVMP (COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS ) (1996): Doxycycline Hyclate, Summary Report in: EMEA (Hrsg.)/MRL/101/96-FINAL, <http://www.eudra.org>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [149] Verordnung über Tierärztliche Hausapotheken – TÄHAV, in der Fassung vom 20. Dezember 2006; *Bundesgesetzblatt I.S.* 3456
- [150] W. Witte, I. Klare; *Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern*; *Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 42, **1999**, 8-16
- [151] G. Flindell; *Genetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz bei Salmonella Enteritidis Isolatene der Jahre 1986-1995*; Dissertation, Universität Berlin, **1998**
- [152] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim; 5. Aufl.; **1988**; 580-715
- [153] H.-G. Classen, H.-J. Hapke; *Fremdstoffe in Lebensmittel: Zusätze, Verunreinigungen und Rückstände*; ISBN: 3-7776-0774-6, **1997**
- [154] I. Stock, B. W. Wiedemann; *Die Bestimmung der natürlichen Antibiotikaempfindlichkeit*; *Chemotherapie Journal* 7, **1998**, 127-135
- [155] M.F. DeFlaun, S.B. Lew; *Genes and their varied hosts*; In: S.B. Lew, R.V. Miller: *Gene Transfer in the Environment*, New York, Donnelly and Sons, **1989**

- [156] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim; 5. Aufl.; **1988**; 580-715
- [157] P.M. Shah; *The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline?*; *Clinical Microbiology and Infection* 11, **2005**, 36–42
- [158] U. Gräfe; *Biochemie der Antibiotika*; 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, **1992**
- [159] A. Alonso, E. Campanario, J.L. Martinez; *Environmental selection of antibiotic resistance genes*; *Environmental Microbiology* 3, **2001**, 1-10
- [160] B. Berger-Bächi; *Mechanismen der Antibiotika-Resistenzbildung in Bakterien*; *Mitt. Lebensm. Hyg.* 92, **2001**, 3–9
- [161] D. Schnappinger, W. Hillen; *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*; *Arch. Microbiol.* 165, **1996**, 359–369
- [162] A. Brakhage; , *Antibiotika*; *Angewandte Mikrobiologie*, **2005**, .409-425, ISBN: 978-3-540-24083-9
- [163] M.J.B. Mengelers, E.R. van Gogh, M.B.M. Huveneers, P.E. Hougee, H.A. Kuiper, A. Pijpers, J.H.M. Verheijden, A.S.J.P.A.M. van Miert; *Pharmacokinetics of Sulfadimethoxine and Sulfamethoxazole in Combination with Trimethoprim after Oral Single- and Multiple-Dose Administration to Healthy Pigs*; *Veterinary Research Communications* 25, **2001**, 461-481
- [164] R. M. Evans; *The chemistry of the antibiotics used in medicine*; Pergamon Press Ltd., Oxford, **1965**
- [165] M. Kühne, G. Hamscher, U. Körner, D. Schedl, S. Wenzel; *Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline*; *Food Chemistry* 75, **2001**, 423–429
- [166] RICHTLINIE 94/65/EG DES RATES vom 14. Dezember 1994, zur Festlegung von Vorschriften für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Hackfleisch/Faschierem und Fleischzubereitungen, **1994**
- [167] M.A. Schouten, A. Voss, J.A. Hoogkamp-Korstanje; *VRE and meat*; *The Lancet* 349, **1997**, 1258
- [168] Helmholtzzentrum München; *Antibiotika und Antibiotikaresistenzen*. FLUGS Fachinformationsdienst, Neuherberg, **2007**, Online-Dokument, <http://www.helmholtz-muenchen.de/flugs>
- [169] A. Abbott; *Medics braced for fresh superbug*; *Nature* 436, **2005**, 758
- [170] R.J. Bywater, M. Casewell; *An assessment of the impact of antibiotic resistance in different bacterial species and of the contribution of animal sources to resistance in human infections*; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, **2000**, 643-645
- [171] D. Großklaus; *Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln*; Verlag Paul Parey Berlin, 1. Aufl., **1989**, 35-39
- [172] L.J. Piddock; *Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?*; *J. Antimicrob. Chemother.* 38, **1996**, 1-3
- [173] GERMAP 2008; *Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch*; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.), 1. Auflage, **2008**
- [174] N.D. Kristof; *Pathogens in Our Pork*; *The New York Times*, 15.März 2009, Online-Dokument, <http://www.nytimes.com/2009/03/15/opinion/15kristof.html>, Zuletzt zugegriffen am 05.05.2009
- [175] *Wie oft MRSA Vorkommt*; Online-Dokument, [http://www.mrsa-net.nl/de/answers.php?type=1&answer\\_id=65](http://www.mrsa-net.nl/de/answers.php?type=1&answer_id=65), letzter Zugriff Am 05.05.2010
- [176] T. Khanna; *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*. *Vet. Microbiol.* In Press, Accepted Manuscript, Available online 16 October **2007** doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006

- [177] P. Much; *MRSA–eine neue Gefahr?*; Vortrag-Präsentation, Online-Dokument, [http://www.ages.at/uploads/media/16\\_Much.pdf](http://www.ages.at/uploads/media/16_Much.pdf), letzter Zugriff am 05.05.2010
- [178] M. Corrente, G. Normanno, V. Martella, A.L. Bellacicco, N.C. Quaglia, A. Dambrosio, D. Buonavoglia, M. D'Abramo, C. Buonavoglia; *Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates from food products*; Letters in Applied Microbiology 45, **2007**, 535–539
- [179] Y. Chander, K. Kumar, S.M. Goyal, S.C. Gupta; *Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics*; J. Environm. Qual. 34, **2005**, 1952-1957
- [180] R.L. Mach, A.H. Farnleitner; *Antibiotika und Resistenzproblematik*; in: H. Kroiß (Hrsg.), *Arzneimittel in der aquatischen Umwelt*, Wiener Mitteilungen 178, **2002**, 151-178
- [181] M.T. Brandl; *Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety*; Annual Review of Phytopathology, 44, **2006**, 367-392
- [182] S. Boehme, G. Werner, I. Klare, R. Reissbrodt and W. Witte; *Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs*; Mol. Nutr. Food Res. 48, **2004**, 522 – 531
- [183] J. De Vries, W. Wachernagel; *Detection of nptII (kanamycin genes) in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation*; Mol. Gen. Genet. 257, **1998**, 606-613
- [184] Bezanson, G.S., Khakhria, R. and Bollegraaf, E.; *Nosocomial outbreak caused by antibiotic resistant strain of Salmonella typhimurium acquired from dairy cattle*. Can. Med. Assoc. J., 128, **1983**, 426–427.
- [185] K.M. Shea; *Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics*; Pediatrics, 114, **2004**, 862-868
- [186] C. Schwake-Anduschus; *Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen*; Dissertation, Universität Paderborn, **2008**
- [187] Dekant W., S. Vamvakas; *Toxikologie*; ISBN:3-86025-218-6, **1995**
- [188] *Bewertung von Rückständen in Getreide*; Deutsche Forschungsgemeinschaft, ISBN:3-7646-1801-9, **1980**
- [189] S. Trapp, M. Larsen, H. Christiansen; *Experimente zum Verbleib von Cyanid nach Aufnahme in Pflanzen*; Umweltchem. Ökotox 13 (1), **2001**, 29-37.
- [190] N. Feldwisch; *Handlungsempfehlungen zur Gefahrenabwehr bei schädlichen Bodenveränderungen in der Landwirtschaft*; Vortrag auf dem BEW-Seminar „Bodenschutz in der Landwirtschaft“ am 23.03.2006 in Essen, **2006**
- [191] S. Trapp, M. Matthies, B. Reiter; *Überprüfung und Fortentwicklung der Bodenwerte für den Boden-Pflanze-Pfad, Transferfaktoren Boden-Pflanze*; Forschungsbericht 296 71 005, UBA-FB, **2001**, 98-114, ISSN0722-186X
- [192] S. Trapp, M. Matthies; *Modeling Volatilisation of PCDD/F from Soil and Uptake into Vegetation*; Environmental Science and Technology 31 (1), **1997**, 71-74.
- [193] S. Trapp; *Model für Uptake for Xenobiotika into Plants, Plant Contamination modeling und simulation of organic chemical processes*; **1995**, ISBN:0-56670-078-7.
- [194] Y. Gao, L. Zhu, W. Ling; *Application of the partition-limited model for plant uptake of organic chemicals from soil and water*; Science of the total environment 336, **2005**, 171-182
- [195] R. Danova-Alt; *Die Wirkung von xenobiotischem Phosphit auf die Phosphatmangelantwort und den Stoffwechsel von Pflanzen*; **2008**
- [196] U. Lüttge; *Stofftransport der Pflanzen*; ISBN:3-540-06230-0, **1973**
- [197] A. Hüser; *Untersuchungen zum Stoffwechsel der Aminosäuren Aspartat und Glutamat, sowie ihrer Amide in Pseudomonas: Klonierung und Charakterisierung von Amidohydrolase-Genen. Konstruktion und Analyse von Transposon-Mutanten*; Dissertation, Universität Marburg, **1999**
- [198] H. Parlar, D. Angerhöfer; *Chemische Ökotoxikologie*; Springer Verlag, ISBN: 3-540-53625-6, **1991**

- [199] E. Steudle; *Aufnahme und Transport des Wassers in Pflanzen*; Nova Acta Leopoldina NF, 2002. 85 (323), **2002**, 251-278.
- [200] U. Lüttge, M. Kluge, G. Bauer G.; *Botanik*; ein grundlegendes Lehrbuch. VCH, Weinheim, **1998**
- [201] G. Briggs, G. Geoffrey; *Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor*; Journal of Agricultural and Food Chemistr: 29(5), **1981**, 1050-1059.
- [202] S. Trapp; *Plant uptake and transport models for neutral und ionic Chemicals*; Environ. Sci.&Pollut.Res 11, **2004**, 33-39
- [203] G. Briggs, G. Geoffrey, Bromilow, H. Richard, A. Evans, A. Avis; M. Williams; *Relationships between lipophilicity and the distribution of non-ionised chemicals in barley shoots following uptake by the roots*; Pesticide Sci. 14, **1983**, 492 - 500
- [204] ACD/I-Lab service; ACD/pKa v6.0 und ACD/Log P v6.0, www.acdlabs.com
- [205] D. Coupland; *Detoxification of herbicides in plants*; in Caseley J.C., Cussan G.W., Atkin R.K. (Herausgeber): *Herbicide resistance in weeds and crops*. Wiley, New York, **1991**, 263-278.
- [206] J. Breuer; *Aufnahme, Metabolismus und Bildung nicht extrahierbare Rückstände aus 4-Nitrophenol in Soja und Weizen*; Dissertation, Ein Vergleich verschiedener In-vitro-Systeme, Rheinisch-Westfälischen Hochschule Aachen, **2001**
- [207] K. Levsen., H.-M. Schiebel, B. Behnke., R. Dötzer, W. Dreher, M. Elend, H. Thiele; *Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview*; Journal of Chromatography A, 1067, **2005**, 55-72
- [208] A.R. Batchelder; *Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems*. *Journal of environmental quality*: 11 (4), **1982**, 675-678.
- [209] L. Migliore, G. Brambilla, S. Cozzolino, L. Gaudio; *Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming ( Panicum miliaceum, Pisum sativum and Zea mays)*; Agriculture, Ecosystems and Environment: 52, **1995**, 103-110.
- [210] L. Migliore, C. Civitareale, S. Cozzolino, P. Casoria, G. Brambilla, L. Gaudio; *Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants*; Chemosphere 37, **1998**, 2957-2961.
- [211] L. Migliore, S. Cozzolino, M. Fiori; *Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants*.; Chemosphere 52, **2003**, 1233-1244.
- [212] K. Kumar, S.C. Gupta, S.K. Baidoo, Y. Chander, C.J. Rosen; *Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure*; J. Environ. Qual. 34, **2005**, 2082 – 2085
- [213] A.B.A. Boxall, P. Johnson, E.J. Smith, C.J. Sinclair, E. Stutt, L.S. Lewy; *Uptake of veterinary medicines from soils into plants*; J. Agric. Food Chem.: 54, **2006**, 2288-2297.
- [214] J.P. Langhammer, F. Führ, H. Büning-Pfaue; *Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanze*; Lebensmittelchem. Gerichtl Chem 44, 93, **1990**
- [215] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, W. Heyser, H. Hayen, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag *Aufnahme und Transport von Tierarzneistoffen in Nutzpflanzen*; In Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Band 58, Vorträge der 58. Fachtagung "Tierarzneimittel in der Umwelt", Hrsg. Bayrisches Landesamt für Umwelt, Oldenbourg Industrieverlag GmbH, ISBN 978-3-8356-3135-9, 161-173, **2007**
- [216] D. Larry, L.M. King, J. Safley, W.S. Jerry; *A greenhouse study on the response of corn (Zea mays L.) to manure from beef cattle fed antibiotics*; Agricultural Wastes, 8 (3), **1983**, 185-190
- [217] H. Dolliver, K. Kumar, S. Gupta; *Sulfamethazine uptake by plants from manure amended soil*; J Environ Qual 36, **2007**, 1224– 1230
- [218] P.P. Maia, E. Clarete da Silva, S. Rath, F. Guillermo Reyes; *Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse*. Food Control 20, **2009**, 11–16
- [219] M.H. Farkas, J.O. Berry, D.S. Aga; *Chlortetracycline Detoxification in Maize via Induction of Glutathione S-Transferase after Antibiotic Exposure*; Environmental Science and Technology, 41 (4), **2007**, 1450-1456.

- [220] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; *Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Gemüse – Porree und Weißkohl*; Abschlußbericht vom 11.06.2008 des Forschungsauftrages ZV-2.1 – 07/080, Vergabe-Nr. 07/080, MUNLV, Ministerium für Verbraucherschutz des Landes NRW, **2008**
- [221] W.D. Kong, Y.G. Zhu, Y.C. Liang, J. Zhang, F.A. Smith, M. Yang M.; *Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (medicago sativa L.)*; Environmental Pollution 147, **2007**, 187-193
- [222] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; *Screening zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Getreide in viehstarken Regionen in Nordrhein-Westfalen*; Abschlußbericht des Zuweisungserlasses II 1–F60.2006.01 vom 12.03./29.06.2006. Ministerium für Verbraucherschutz des Landes NRW, **2007**
- [223] T. Fujisawa, M. Kurosawa, T. Katagi; *Uptake and Transformation of Pesticide Metabolites by Duckweed (Lemna gibba)*; J. Agric. Food Chem., 54 (17), **2006**, 6286–6293
- [224] G. Zurhelle, E. Müller-Seitz, M. Petz; *Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system*; Journal of Chromatography B 739, **2000**, 191-203.
- [225] B. Halling-Sørensen, A. Lykkberg, F. Ingerslev, P. Blackwell, J. Tjornelund; *Charakterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS*; Chemosphere, 50, **2003**, 1331-1342,
- [226] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto; *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*; J. Chromatogr. A 882, **2000**, 109–133
- [227] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese; *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*; Trends in Analytical Chemistry, 24 (7), **2005**, 704-733.
- [228] O. Ballesteros, V. Sanz-Nebot, A. Navalón, J. L. Vilchez, J. Barbosa; *Determination of a series of quinolone antibiotic using liquid chromatography-mass-spectrometry*; Chromatographia, 59(9/10), **2004**, 543-550.
- [229] A. M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S. Honoré Hansen; *Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 1038 (1-2), **2004**, 157-170
- [230] V. Camel; *Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples*; TrAC Trends in Analytical Chemistry, 19 (4), **2000**, 229-248
- [231] M.A. Rostagnoa, M. Palma, C.G. Barrosoa; *Microwave assisted extraction of soy isoflavones*; Analytica Chimica Acta, 588 (2), **2007**, 274-282
- [232] H. Wollersen; *Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DAD-MS/MS*; Dissertation, Universität Paderborn, **2004**
- [233] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote; *Ultrasound-assisted preparation of liquid samples*; Talanta, 72 (2), **2007**, 321-334
- [234] F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, *Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70 (2), **2007**, 299-310
- [235] M. H. Gey; *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*; ISBN:978-3-540-73803-9, **2008**
- [236] K. Gückel; *Untersuchungen zur Extrahierbarkeit von Antibiotikarückständen aus Getreide*; Bachelor-Arbeit, Universität Paderborn, **2007**
- [237] J.H. Knox, J. Jurand; *Mechanism of reversed-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography*; J. Chromatogr.; 186, **1979**, 763-782
- [238] C.M. Lock, L. Chen, D.A. Volmer; *Rapid Analysis of Tetracycline Antibiotics by Combined Solid Phase Microextraction/High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*; Rapid. Commun. Mass. Spectrom.; 13, **1999**, 1744-1754
- [239] A.M. Kamel, P.R. Brown, B. Munson; *Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetracycline, Oxytetracycline, Chlorotetracycline, Minocycline, and Methacycline*; Anal. Chem., 71, **1999**, 968-977

- [240] H.Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, K.-I. Harada, M. Uchiyama, H. Asukabe, M. Suzuki; *Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography*; J. Chromatogr.; 393, **1987**, 285-296
- [241] S. Horii; *Liquid chromatographic Determination of Oxytetracycline and Chlortetracycline; Residues in Animal Tissues*; J. Liquid Chromatogr.; 17 (1), **1994**, 213-221
- [242] P. Kay, P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall; *Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land*; Chemosphere 60, **2005**, 497–507
- [243] P.A. Blackwell, H. Holten Lützhøft, H. Ma, B. Halling-Sørensen, A.B.A. Boxall, P. Kay; *Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection*; Talanta 64, **2004**, 1058–1064
- [244] D.S. Aga, S. O'Connor, S. Ensley, J.O Payero, D. Snow, D. Tarkalson; *Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and their Degradates in Manure-Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; J. Agric. Food Chem. 53, **2005**, 7165-7171
- [245] S. Boleas, C. Alonso, J. Pro, C. Fernandez, G. Carbonell, J.V. Tarazona; *Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS-3) and influence of manure co-addition*; Journal of Hazardous Materials 122, **2005**, 233–241
- [246] N. Van Eeckhout, J. Castro Perez, J. Cllaereboudt, R. Vandeputte, C. Van Peteghem; *Determination of tetracyclines in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and clean-up*; Rapid. Commun. Mass. Spectrom.; 14, **2000**, 280-285
- [247] H. Oka, Y. Ito, Y. Ikai, T. Kagami, K. Harada; *Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods*; J. Chromatogr. A; 812, **1998**, 309-319
- [248] S. Kromidas; *Validierung in der Analytik*; WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim; 1. Aufl.; **1999**
- [249] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert; *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*; VCH-Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim; 1. Aufl.; **1992**
- [250] Valoo Software Programm, [www.analytik-software.de/valoo.html](http://www.analytik-software.de/valoo.html), letzter Zugriff am 05.05.2010
- [251] S. Kromidas; *Qualität im analytischen Labor*. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, **1995**
- [252] Official Journal of the European Union; amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (2004/25/EC); **2004**
- [253] R. Lindberg, P. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind; *Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards*; Chemosphere 57, **2004**, 1479–1488
- [254] M. Stüber, T. Reemtsma; *Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS*; Anal. Bioanal. Chem. 378, **2004**, 910–916
- [255] A. Kloepper, J.B. Quintana, T. Reemtsma; *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples*; Journal of Chromatography A 1067, **2005**, 153–160
- [256] R. Lindberg, P.-A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Hohansson, M. Tysklind; *Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards*, Chemosphere 57, **2004**, 1479-1488,
- [257] EU-Richtlinie 2002/657/EG; Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 221; *Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*; **2002**
- [258] Viehstarke Gebiete in NRW, Online-Dokument, <http://www.lanuv.nrw.de/landwirtschaft/tierhaltung/tierhaltung.htm>, letzter Zugriff am 05.05.2010
- [259] NRW-Karte, Online-Dokument,

<http://www2.fh-gelsenkirchen.de/FH-Sites/FH-Main/index.php?id=468>, letzter Zugriff am 05.05.2010

[260] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften; Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, (2002/657/EG), 12. August 2002

[261] M. Wehovsky; *Struktureinflüsse auf das Fragmentierungsverhalten von Peptiden bei PSD-MALDI-Massenspektrometrie*; Dissertation, Universität Justus-Liebig Gießen, **2001**

[262] U. Bahr, M. Karas; *Massenspektrometrie Tutorial*; Universität Frankfurt, Online-Dokument, [http://www.google.de/#hl=de&q=peptid+fragmentierung+fticr&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs\\_rfai=&fp=48bb631c7c314f0c](http://www.google.de/#hl=de&q=peptid+fragmentierung+fticr&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs_rfai=&fp=48bb631c7c314f0c)

[263] W.D. Lehmann; *Massenspektrometrie in der Biochemie*; Spektrum Verlag, ISBN: 3-86025-094-9, **1996**

[264] C. Schley; *Mehrdimensionale chromatographische Trenntechniken für die Proteomanalyse*; Dissertation Universität Saarland, **2006**

[265] K. Hyun-Seok, Kerry C. Huber; *Channels within soft wheat starch A- and B-type granules*; Journal of Cereal Science 48, **2008**, 159–172

[266] R.F. Tester, R. Yousuf, J. Karkalas, B. Kettlitz, H. Röper; *Properties of protease-treated maize starches*; Food Chemistry 109, **2008**, 257–263

[267] Z.L. Liu, S.H. Ho, S. H. Goh; *Effect of fraxinellone on growth and digestive physiology of Asian corn borer, Ostrinia furnacalis Guenee*; Pesticide Biochemistry and Physiology 91, **2008**, 122–127

[268] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften; Entscheidung der Kommission, *Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*; (2002/657/EG), 12. August **2002**

[269] R. Kreuzig, S. Höltge, J. Heise, M. Kolb, N. Berenzen, T. Hahn, St. Jergentz, J. Wogram, R. Schulz; *Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide*; UBA-Texte 24/07, Forschungsbericht 202 67 435, Umweltbundesamt, **2007**

[270] C. Sens; *Metabolisierung und Lokalisierung von 14C-TNT in Phaseolus vulgaris und Triticum aestivum*; Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **1998**

[271] S. Thiele-Bruhn, D. Peters, B. Halling-Sørensen, P. Leinweber; *Photodegradation and ageing of antibiotic Pharmaceuticals on soil surfaces*; Posterpräsentation, Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern, **2008**

[272] K. Haider, A. Schäfer; *Umwandlung und Abbau von Pflanzenschutzmitteln in Böden*; ISBN: 3-13-125441-6, **2000**

[273] G. Langenkämper, *Fotos von Hyrokulturpflanzen*, Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide, Detmold

[274] R. A. Brain, D. J. Johnson, S. M. Richards, M. L. Hanson, H. Sanderson, M. W. Lam, C. Young, S. A. Mabury, P. K. Sibley, K. R. Solomon; *Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes Lemna gibba and Myriophyllum sibiricum*; Aquatic Toxicology 70, 1, **2004**, 23-40

[275] L. Gomez, M. J. Chrispeels; *Tonoplast and Soluble Vacuolar Proteins Are Targeted by Different Mechanisms*; The Plant Cell, 5, 9, **1993**, 1113-1124.

**ANHANGVERZEICHNIS**

<b>A.1 EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>2</b>
<b>A.1.1 Chemikalien</b> .....	<b>2</b>
<b>A.1.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>2</b>
<b>A.1.3 Geräte</b> .....	<b>3</b>
A.1.3.1 HPLC-MS/MS-System (LCQ dreidimensionale Iontrap) .....	3
A.1.3.2 FTICR-MS-System (LTQ, Linear Trap Quadrupole).....	4
A.1.3.3 Sonstige Laborgeräte .....	6
<b>A.1.4 Lösungen</b> .....	<b>6</b>
<b>A.1.5 Durchführung</b> .....	<b>9</b>
A.1.5.1 Vorbehandlung der Labor-und Glasgeräte, Einmalmaterialien .....	9
A.1.5.2 Aufarbeitung der Getreideproben .....	9
A.1.5.2.1 Probenahme.....	9
A.1.5.2.2 Mahlen und Sieben .....	10
A.1.5.2.3 Fest-Flüssig-Extraktion .....	10
A.1.5.2.4 Festphasenextraktion (SPE).....	10
A.1.5.2.5 Messprobe .....	11
A.1.5.3 Aufarbeitung der Gemüseproben .....	11
A.1.5.3.1 Anzucht von Nutzpflanzen auf Hydrokultur .....	11
A.1.5.3.2 Probenahme.....	12
A.1.5.3.3 Homogenisierung .....	13
A.1.5.3.4 Fest-Flüssig-Extraktion .....	13
A.1.5.3.5 Festphasenextraktion.....	14
A.1.5.3.6 Messprobe .....	16
<b>A.1.6 Protease-Inhibitor-Cocktail Behandlung</b> .....	<b>16</b>
<b>A.1.7 Methodvalidierung</b> .....	<b>17</b>
<b>A.2 ANGABEN ZU DEN PRODUKTIONSBEDINGUNGEN DER BEPROBTEN LANDWIRTSCHAFTLICHEN BETRIEBE, ERNTE 2005, 2006</b> .....	<b>20</b>
<b>A.3 ERMITTELTE ERNTEGEWICHTE VON WEIßKOHL UND PORREE</b> .....	<b>25</b>
<b>A.4 VERBRAUCH AN NÄHRLÖSUNG IN HYDROKULTUR</b> .....	<b>26</b>

## A.1 EXPERIMENTELLER TEIL

### A.1.1 Chemikalien

Aceton (p.a.; Merck/Darmstadt)

Acetonitril (HPLC Grade; Merck)

Ameisensäure reinst. 98-100 % (Merck)

Chlortetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)

Citronensäure-Monohydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)

Demeclocyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)

Doxycyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

Enrofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)

4-Epichlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))

4-Epidemeclocyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))

Epichlortetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

6-Epidoxycyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))

4-Epioxytetracyclin (Acros Organics/Geel (Belgien))

4-Epitetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))

Titriplex III, Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat EDTA (p.a.) Merck

Flüssiger Stickstoff

Isochlortetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

Koffein (Sigma-Aldrich/Steinheim)

Methanol (Chromasolv; Sigma-Aldrich/Steinheim)

Natriumcarbonat (wasserfrei; Merck/Darmstadt)

Natriumhydroxid (p.a.; Merck/Darmstadt) Methanol (p.a.; Merck)

Oxytetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97$  % (Acros)

Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (Sigma)

Salzsäure, 25 % (w/w; p.a.; Merck)

Sulfadiazin min. 99 % (Sigma-Aldrich)

Tetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

Ultramark (Alfa Aesar Lancaster/Pelham (Great Britain))

Wasser (bidestilliert über Quarzglas mit Destamat Bidest von Heraeus/Hanau)

### A.1.2 Verbrauchsmaterialien

Polymerphasen-Kartuschen: Oasis HLB 3cc (Waters, Art.Nr.: WAT094226)

Analytische Trennsäule, YMC ODS-AM 5  $\mu\text{m}$  150 x 3 mm und YMC ODS-AM 5  $\mu\text{m}$  150 x 1 mm (YMC Europe GmbH/Dinslaken)

Analytische Vorsäule, YMC ODS-AM 5  $\mu\text{m}$  20 x 3 mm (YMC Europe GmbH/Dinslaken)

Glaswatte (reinst, silanisiert) (Serva Feinbiochemica)  
 Messkolben 10 mL, Duran-Glas (VWR, Brand)  
 Probenbeutel 540 mL (VWR, Twist-Seal)  
 Probenröhrchen 50 mL (VWR, Falcon Tubes)  
 Zentrifugengläser 50 mL (VWR, Duran-Glas)  
 Einweg Spritzen 20 mL (VWR, ONCE-Spritze - Luer 1)  
 Pasteurpipetten (VWR, Brand)  
 Deckel für Probenvials (RSC)  
 Pasteurpipetten, (VWR)  
 Probenvials, (VWR)  
 Reagenzgläser, (RSC)

### A.1.3 Geräte

#### A.1.3.1 HPLC-MS/MS-System (LCQ dreidimensionale Iontrap)

##### *HPLC (Spectra)*

Degasser: SCM 1000 Vakuum Membrane Degasser

Pumpe: P 4000 Gradient Pumpe

Injektionseinheit: AS 3000, Autosampler gekühlt (10°C) mit integriertem

Säulenofen (temperiert auf 30°C)

Trennsäule: YMC-Pack ODS-AM, 150 x 3,0 i.d., S 5µm

Injektionsvolumen: 20 µL

Säulenschaltventil: STUW-Trapping

Bei der HPLC wurde ein Gradientenprogramm verwendet.

Flussrate: 0,4 mL/min

Fließmittel: A: Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 10/89,9/0,1 % (v/v/v)

B: Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 59,9/40/0,1 % (v/v/v)

C: Methanol

**Tab. A 1:** Verwendetes HPLC-Gradientenprogramm (HPLC-LCQ-System)

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Fließmittel C [%]
0,0	90	10	0
1,5	80	20	0
10,0	60	40	0
12,0	0	100	0
12,5	0	0	100
25,0	0	0	100
26,0	90	10	0
35,0	90	10	0

**Massenspektrometer**

LCQ-Advantage Ionenfallen-Massenspektrometer (Fa. Thermo Finnigan/Egelsbach)



**Abb. A 1:** LCQ-Advantage: Dreidimensionale Ionenfalle (Iontrap)

Ionisierungsmethode: Electrospray Ionization (ESI), positiv-Mode  $[M+H]^+$ , Bestätigung durch MS/MS-Stoßexperimente (He), Precursor- und Produkt-Ionen

Tune-Page-Parameter:

Mass Range:	80 – 2000 [m/z]
Sheat Gas Flow Rate:	47 [arb]
Auxillary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	250 [°C]
Capillary Voltage:	9 [V]
Tube Lens Offset:	- 5,0 [V]
Multipole 1 Offset:	- 1,5 [V]
Lens Voltage:	- 32 [V]
Multipole 2 Offset:	- 5,5 [V]

**A.1.3.2 FTICR-MS-System (LTQ, Linear Trap Quadrupole)**

FTICR-MS:Fourier-Transformations-Ionen-Cyclotron-Resonance-Hybrid-Massenspektrometer (Thermo Electron)

ISAS –Institute for Analytical Sciences- Dortmund

**HPLC**

HPLC-System (Thermo Electron, San Jose, CA, USA)

Degasser:	Surveyor Entgaser
Pumpe:	Surveyor MS Pumpe
Injektionsautomat:	Surveyor Autosampler
Trennsäule:	YMC-Pack ODS-AM, 150 x 1,0 mm ID., S 5µm
Vorsäule:	YMC-Pack ODS-AM, 10 x 1,0 mm ID., S 5µm
Injektionsvolumen:	5 µL
Flussrate:	0,1 mL/min
Fließmittel A:	Wasser / Acetonitril / Ameisensäure 95/5 /0,1 (v/v)
Fließmittel B:	Acetonitril / Ameisensäure 100/0,1 (v/v)

**Tab. A 2:** Verwendetes HPLC-Gradientenprogramm (HPLC-FTICR-MS)

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,01	100	0
2	100	0
45	70	30
50	5	95
60	5	95

**Massenspektrometer**Ionisierungsmethode: ESI, positiv Mode [M+H]<sup>+</sup> und MS<sup>n</sup> Experimente

Spray Voltage:	3.8 [kV]
Sheath Gas Flow Rate:	38 [arb]
Auxiliary Gas Flow Rate:	4 [arb]
Sweep Gas Flow Rate:	2 [arb]
Ionen Transfer Tube Temperatur:	300°C
Collision Energy:	35%

Das FTICR-MS ist mit einem 7,0 Tesla aktiv geschirmten supraleitenden Magneten und einer Electrospray-Ionenquelle ausgestattet. Das Gerät wurde im positiven Ionisationsmodus mit datenabhängiger Aquisition verwendet: Dabei wechselt das LTQ-FT automatisch zwischen MS- und MS<sup>n</sup>-Experimenten. Übersichtsmassenspektren im Bereich m/z 400–500 wurden im FTICR mit einer Auflösung von  $r = 25.000$  (bei m/z 400) aufgenommen. Die zwei intensivsten Ionen wurden dann nacheinander für exakte Massenbestimmungen mit einem FTICR-SIM-Scan (Scan im kleinen m/z-Bereich von  $\pm 5$  amu,  $r = 50.000$ ) verwendet. Stoßinduzierte Fragmentierung (MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup>; optional MS<sup>4</sup>) wurde in der linearen Ionenfalle durchgeführt.

Ausgewählte Vorläuferionen für MS<sup>n</sup> wurden für einen Zeitraum von 45 Sekunden ausgeschlossen, um von möglichst vielen Ionen-Fragmentspektren zu erhalten. Somit dauert ein Zyklus etwa 7 s.

### **A.1.3.3 Sonstige Laborgeräte**

Handelsübliche Labor- und Glasgeräte Zentrifuge, Hettich Rotofix 32

SPE-Vakuumblock, Merck LiChrolut

Ultraschallbad, Bandelin Sonorex

Thermostat, VLM EC 1

Analytische Siebmaschine, Retsch

Schüttler, IKA Vibrax VXE basic

Gefriertrocknungsanlage, Christ alpha 1-4

Labor-Mörsermühle, Pulverisette 2 Fritsch

Trockenschrank, Heraeus T 5042

Magnetrührer, IKA RH basic 2

Opi (Overpressure-Injection), RSC Chromatographie

Analysenwaage, CP 622 Sartorius und Handy Sartorius

Schwingmühle Retsch MM 200

### **A.1.4 Lösungen**

#### ***Mobile Phasen***

Fließmittel A (Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 10/89,9/0,1 (v/v/v))

In einem Becherglas werden 200 mL Acetonitril, 1,8 L bidestilliertes Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Fließmittel B (Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 60/39,9/0,1 (v/v/v))

In einem Becherglas werden 1,2 L Acetonitril, 800 mL bidestilliertes Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

#### ***Antibiotika-Stammlösungen***

##### *Stammlösungen*

Es werden 10 mg des entsprechenden Antibiotikums in einen 10 mL-Messkolben eingewogen, mit Methanol (für Ciprofloxazin mit 2 % Ameisensäure in Acetonitril) aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung tiefgekühlt gelagert (-32°C). Die Stammlösungen dürfen nicht häufig aufgetaut und eingefroren werden. Maximale Lagerzeit bei -32 °C ist 6 Monate.

Da das e-iso-CTC nicht kommerziell erhältlich ist, wird es in Lösung durch Epimerisierung von iso-CTC hergestellt. Dazu werden 2 mL iso-CTC-Stammlösung (1000 mg/L), 3 mL Methanol und 5 mL Laufmittel A im Reagenzglas über 1 h bei 60 °C erwärmt. Die

Konzentration der Epimere wird indirekt durch Differenzbildung (iso-CTC-Konzentration vor und nach der Erwärmung) bestimmt (LC-MS).

#### *Standardlösungen (Mischstandard / Kalibrierlösungen)*

Zur Methodenoptimierung wurde in der Anfangsphase des Projektes das LC-MS-System *extern* kalibriert. Dazu wurden Mischstandards im Konzentrationsbereich von 0,05 mg/L bis 5 mg/L verwendet, zum Tunen des MS-Systems 10 mg/L. Diese Mischstandards erhält man, indem entsprechende Aliquote der jeweiligen Stammlösung in einen 10 mL- Messkolben pipettiert und mit Fließmittel A bis zur Kalibriermarke aufgefüllt werden.

Für die externe *Matrixkalibration* des LC-MS-Systems werden die nach der beschriebenen Methode erhaltenen, bis fast zur Trockne eingedampften SPE-Eluate der Hydrokultur-Blindproben mit 1000 µL Fließmittel A versetzt und Aliquote der jeweiligen Mischstandardlösung dotiert, so dass ein Konzentrationsbereich von 1 bis 100 µg/kg FG erreicht wird.

#### *Indirekte Quantifizierung der Keto-Enol-Tautomere des epi-Chlortetracyclins (e-CTC)*

Der e-CTC Standard liegt als Gemisch der beiden Tautomere e-keto-CTC und e-enol-CTC vor. Unter der (vereinfachenden) Annahme gleicher Ionenausbeute und Response-Faktoren dieser Spezies, wird zur Quantifizierung die Fläche der beiden Tautomerenpeaks addiert. Die erhaltene Fläche entspricht der Gesamtfläche des e-CTC (Gleichung 1). Die Gehalte der einzelnen Tautomere werden über deren prozentualen Anteil an der Gesamtfläche des e-CTC bestimmt (Gleichung 2). Man kann nun wie bei den übrigen Analyten die Flächen der Signale der Tautomere mit der ermittelten Konzentration (Gleichung 3) der Tautomere korrelieren, um die zugehörige lineare Kalibrierfunktion (Gleichung 4) zu erhalten.

Die Gleichungen sind beispielhaft für das Enol-Tautomer formuliert; die Kalibrierfunktion für das Keto-Tautomer wird analog ermittelt.

$a_{Ket} + a_{En} = a_{ges}$ (Gleichung 1)	$\frac{a_{En}}{a_{ges}} = x_{En}$ (Gleichung 2)
$c_{St} * x_{En} = c_{En}$ (Gleichung 3)	$a_{En} = m * c_{En} + x$ (Gleichung 4)

- $a_{En}$  = Peakfläche des Enols (e-enol-CTC)  
 $c_{En}$  = Konzentration des Enols  
 $x_{En}$  = Anteil an der Gesamtfläche entspricht dem Konzentrationsanteil  
 $a_{ges}$  = Gesamtfläche e- CTC (Summe der Flächen der Tautomerensignale)  
 $c_{St}$  = Konzentration des e-CTC-Standards  
 $m$  = Steigung  
 $x$  = x-Achsenabschnitt  
 (Index *En*: e-enol-CTC, *Ket*: e-keto-CTC)

Hinweis: Infolge der instabilen Gleichgewichtslage der Keto-Enol-Tautomere (u.a. sind Änderungen der Tautomeren-Konzentrationen während der Aufarbeitung und des chromatographischen Laufs möglich) ist die Bestimmung der Keto-Enol-Epimere semiquantitativ.

### **Pufferlösung**

EDTA/Citratpuffer (pH 4,1)

In einem Becherglas werden 620 mL 0,1 mol/L Citronensäure mit 380 mL einer 0,2 mol/L Natriumhydrogenphosphatlösung gemischt. In dieser Lösung wird 37,244 g Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat (0,1 mol/L) gelöst.

0,1 mol/L Citronensäure: 21,014 g Citronensäure Monohydrat wird in 1000 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

0,2 mol/L Natriumhydrogenphosphat: 35,6 g Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat wird in 1000 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

### **Hoagland-Nährlösung**

Die Versuchspflanzen werden in einer modifizierten Hoagland-Nährlösung in Hydrokultur angezogen.

Die Nährlösung für **Porree** hat die folgende Zusammensetzung an Makronährstoffen:

0,5 mmol/L  $MgSO_4$ , 2,55 mmol/L  $KNO_3$ , 1 mmol/L  $NH_4H_2PO_4$ , 1,5 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 2 mmol/L  $Ca(NO_3)_2$  und an Mikronährstoffen: 100  $\mu mol/L$  Fe-EDTA, 46,2  $\mu mol/L$   $H_3BO_3$ , 9,1  $\mu mol/L$   $MnCl_2$ , 0,9  $\mu mol/L$   $ZnSO_4$ , 0,3  $\mu mol/L$   $CuSO_4$ , 0,1  $\mu mol/L$   $CoCl_2$ , 0,1  $\mu mol/L$   $KAl(SO_4)_2$ , 1  $\mu mol/L$   $Na_2MoO_4$  und ca. 0,2  $\mu mol/L$   $Na_2Si_3O_7$ . Der pH-Wert der Nährlösung wurde mit  $HNO_3$  auf 6,8 eingestellt.

Die Nährlösung für den **Weißkohl** hat die folgende Zusammensetzung an Makronährstoffen:

1 mmol/L  $MgSO_4$ , 5,1 mmol/L  $KNO_3$ , 2 mmol/L  $NH_4H_2PO_4$ , 1,5 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 4 mmol/L  $Ca(NO_3)_2$  und an Mikronährstoffen: 100  $\mu mol/L$  Fe-EDTA, 46,2  $\mu mol/L$   $H_3BO_3$ , 9,1  $\mu mol/L$   $MnCl_2$ , 0,9  $\mu mol/L$   $ZnSO_4$ , 0,3  $\mu mol/L$   $CuSO_4$ , 0,1  $\mu mol/L$   $CoCl_2$ , 0,1  $\mu mol/L$   $KAl(SO_4)_2$ , 1  $\mu mol/L$   $Na_2MoO_4$  und ca. 0,2  $\mu mol/L$   $Na_2Si_3O_7$ . Der pH-Wert der Nährlösung beträgt ca. 6,6 und wird nicht eingestellt.

### **Dotierlösungen für die Hydrokulturversuche**

Chlortetracyclin (CTC) - Stammlösung:

0,3006 g Chlortetracyclinhydrochlorid werden in ca. 10 mL Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit destilliertem Wasser auf 200 mL aufgefüllt. Die Lösung enthält 1,3967 g/L CTC und zur Lagerung wird sie in den Kühlschrank (5-8 °C) gestellt.

Tetracyclin (TC) Stammlösung:

0,2806 g Tetracyclin hydrochlorid werden in ca. 10 mL Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit destilliertem Wasser auf 200 mL aufgefüllt. Die Lösung enthält 1,2962 g/L TC und zur Lagerung wird sie in den Kühlschrank (5-8 °C) gestellt.

Sulfadiazin (SFD) Stammlösung:

0,1460 g Sulfadiazin werden in Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit destilliertem Wasser auf 200 mL aufgefüllt (50/150 mL, v/v bidest. Wasser/Methanol). Die Lösung enthält 0,7299 g/L SFD und zur Lagerung wird sie in den Kühlschrank (5-8 °C) gestellt.

Enrofloxacin (ENR) Stammlösung:

0,2096 g Enrofloxacin werden in 50 mL Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit Methanol auf 200 mL aufgefüllt. Die Lösung enthält 1,0482 g/L ENR und zur Lagerung wird sie in den Kühlschrank (5-8 °C) gestellt.

Monensin (MON) Stammlösung:

0,3468 g Monensin Natriumsalz werden in ca. 100 mL Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit Methanol auf 250 mL aufgefüllt. Die Lösung enthält 1,3045 g/L MON und zur Lagerung wird sie in den Kühlschrank (5-8 °C) gestellt.

**A.1.5 Durchführung****A.1.5.1 Vorbehandlung der Labor- und Glasgeräte, Einmalmaterialien**

Alle verwendeten Glasgeräte, die direkt mit dem Probenmaterial in Kontakt getreten sind (z.B. Zentrifugengläser, 10 mL-Messkolben, Glasstäbe), werden zunächst mit Methanol und bidest. Wasser gereinigt, anschließend über Nacht im Königswasserbad (konz. HCl: konz. HNO<sub>3</sub> = 3:1 v/v, 60°C) behandelt, gründlich mit bidest. Wasser gespült und im Trockenschrank (40°C) getrocknet.

Bei der Festphasenextraktion werden Pasteurpipetten, 10 mL-Reagenzgläser und SPE-Kartuschen als Einmalmaterialien verwendet. Besonders sorgfältig sind die Kanülen des SPE-Blocks zu reinigen (Ultraschallbad, bidest. Wasser und Methanol).

**A.1.5.2 Aufarbeitung der Getreideproben****A.1.5.2.1 Probenahme**

Von erntereifem Getreide wurden an vier unterschiedlichen Stellen des Ackerschlags ganze Ähren vom Halm getrennt, in beschriftete Gefrierbeutel verpackt und in einem Kühlbehälter zum Fachbereich Agrarwirtschaft, Soest transportiert. Im Labor wurden die Körner mechanisch aus den Ähren gelöst und alle Körner eines Schlags in einem Beutel vereinigt. Dieser wurde bis zur Analyse bei -18°C gelagert.

Im Erntejahr 2006 war aufgrund der extrem hohen Junitemperaturen in einigen Betrieben eine vorzeitige Ernte notwendig geworden. In diesem Fall wurde während des

Dreschprozesses vom Betriebsleiter aus dem Korntank eine Getreideprobe gewonnen und sofort eingefroren. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand zunächst nach Soest transportiert und schließlich für die Durchführung der Analysen zur Universität Paderborn.

#### **A.1.5.2.2 Mahlen und Sieben**

Die Kornproben (ca. 100 g) werden mit Hilfe einer automatischen Mörsermühle gemahlen (für 10 min bei 3 mm Hauptzustellungsrichtung in Achsrichtung des Pistills und 2. Ring sichtbar (entspricht ~27,3 daN (kg)) bei Zustellung des Pistills gegen die Mörserwand). Die Korngrößen-Fraktionierung des Mahlgutes erfolgt in einer analytischen Siebmaschine. Die Fraktion mit einer Korngröße von  $d < 0,106$  mm wird zur Analyse verwendet.

#### **A.1.5.2.3 Fest-Flüssig-Extraktion**

##### *1. Extraktionsstufe*

Es werden jeweils zwei Einwaagen a' 1 g parallel aufgearbeitet. Das Probenmaterial wird im 50 mL-Zentrifugenglas mit 20 mL MeOH/Citrat-EDTA-Pufferlösung versetzt und mit einem Glasstab aufgeschlämmt. Die Suspension wird 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und danach 10 min bei 4000 U/min (entsprechend einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 2325 g) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres 50 mL-Zentrifugenglas überführt.

##### *2. Extraktionsstufe*

Der verbleibende Rückstand wird mit 10 mL Pufferlösung erneut aufgeschlämmt, 5 min im Ultraschallbad behandelt und danach 10 min zentrifugiert (4000 U/min). Der Überstand der 2. Stufe wird mit dem Überstand der 1. Stufe zum Gesamtüberstand vereinigt. Dieser Gesamtextrakt wird zur Festphasenextraktion eingesetzt.

#### **A.1.5.2.4 Festphasenextraktion (SPE)**

##### *Konditionierung*

Die SPE-Kartusche wird mit 3 mL Methanol und anschließend mit 3 mL MeOH/Citrat-EDTA-Pufferlösung konditioniert. Die Kartusche darf nicht trockengesaugt werden.

##### *Extraktaufgabe*

Der Extrakt wird mit einer Pasteurpipette auf die Kartusche gegeben und sofort nach der Konditionierung langsam (35-40 Tropfen pro Minute) durch die Festphasenkartusche gesaugt. Danach wird die Kartusche einmal mit 3 mL MeOH/Wasser (5/95 v/v) und einmal mit 3 mL MeOH/Citrat-EDTA-Pufferlösung nachgespült und anschließend kurz trockengezogen.

##### *Elution*

Die langsame, tropfenweise Elution der Analyten erfolgt pro Kartusche mit 3 mL Methanol. Die Eluate der Extrakte aus beiden Einwaagen werden nacheinander in einem 10 mL-

Einmalreagenzglas als Gesamteluat (~6 mL) aufgefangen bis die Kartusche trocken gesaugt ist.

#### **A.1.5.2.5 Messprobe**

Das Gesamteluat wird im Reagenzglas bei 30°C Badtemperatur unter leichtem Luftstrom bis fast zur Trockene eingeengt (Metallblock-Thermostat). Dieser Extraktückstand wird in 500 µL Fließmittel A aufgenommen, in Autosamplervials (braune Rollrandflaschen mit integriertem Glaseinsatz, 500 µL Volumen) umgefüllt, mit einer Aluminiumkappe (integriertes Septum) verschlossen und chromatographiert. Erfolgt keine sofortige Analyse, wird die Messprobe bei -32°C in Eppendorf-Vials gelagert. Zur Messung werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, auf einem Schüttler homogenisiert und wie oben beschrieben, zur LC-MS-Analyse vorbereitet.

### **A.1.5.3 Aufarbeitung der Gemüseproben**

#### **A.1.5.3.1 Anzucht von Nutzpflanzen auf Hydrokultur**

##### ***Keimung und Wachstumsbedingungen***

Die Porree- und Weißkohlsamen werden zur Steigerung der Keimungsrate für 5 bis 10 Tage bei 4-6°C in 1 mmol/L CaSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert. Die Auskeimung der Samen erfolgt bei Raumtemperatur (17 bis 20°C) in so genannten „Sandwiches“, die mit 1 mmol/L CaSO<sub>4</sub>-Lösung getränkt waren. Die „Sandwiches“ bestehen aus zwei äußeren Schaumstoffschichten und zwei inneren Filterpapierschichten, auf denen die Samen lagen. Keimlinge von mindestens 3 cm Sprosslänge werden auf Nährlösung in die Pflanzenwuchskammer transferiert. Dazu werden die Sprosse mit Hilfe einer Schaumstoffumwicklung in Lochschablonen fixiert. Die Lochschablonen dienen gleichzeitig als Deckel für die Pflanztöpfe, die mit ca. 3,75 L Nährlösung gefüllt waren. Es wird sichergestellt, dass die Wurzeln in die Nährlösung eintauchen. Die Nährlösung wird mit Hilfe von Aquariumpumpen und Silikonschläuchen belüftet. Jeder Pflanztopf wird mit 4 Pflanzen bestückt.

Die Pflanzen werden in einem Pflanzenwuchsschrank (Modell VB1514, Vötsch) bei einer 17-stündigen Fotoperiode pro 24 Stunden angezogen. Während der Fotoperiode beträgt die Temperatur 20°C und die relative Luftfeuchte 65% und während der Dunkelheit wird die Temperatur auf 16°C und die relative Luftfeuchte auf 55% eingestellt.

##### ***Anzucht von Porree (Sorte Shelton)***

Die Wuchszeit des gekeimten Porrees (*Allium porrum* L., cv. Shelton, F1, Hild Samen GmbH, Marbach) beträgt 50 Tage bis zu Pflanzen mit einem Durchmesser der jüngeren Blattabschnitte zwischen 0,5 und 1,5 cm. Während dieser Zeit wird die Nährlösung zweimal vollständig gewechselt, ansonsten wird verbrauchte Nährlösung nachgefüllt. Die Nährlösung und die Wurzeln werden regelmäßig auf Kontamination durch Pilzbewuchs visuell

kontrolliert. Pflanzen mit pilzbefallenen Wurzeln werden entfernt. Die Dotierungsexperimente mit Antibiotika erfolgen nach 50 Wachstumstagen in der Pflanzenwuchskammer.

### **Anzucht von Weißkohl (Sorte Lennox)**

Gekeimter Weißkohl (*Brassica oleracea*, L., cv. Lennox, F1, Bejo Saaten, Niederlande) werden über einen Zeitraum von 21 Tagen angezogen. Zu diesem Zeitpunkt haben die äußeren Blätter die maximale Größe erreicht, die Kohlkopfbildung hat jedoch noch nicht eingesetzt. Während der Aufzuchtphase wird die Nährlösung einmal vollständig gewechselt, ansonsten wird verbrauchte Nährlösung nachgefüllt. Kontrolle der Wurzeln auf Pilzbefall erfolgt wie bei der Porreeaufzucht. Die Dotierungsexperimente mit Antibiotika erfolgen nach 21 Wachstumstagen in der Pflanzenwuchskammer.

### **Zudotierung der Antibiotika**

Als die Pflanzen einen gewissen mittleren Wachstumsstand erreichen, werden die Hoagland-Lösungen durch Zugabe von Antibiotikum-Stammlösung dotiert (Tab. A 3).

**Tab. A 3:** Zugabe von Antibiotikum-Stammlösung

Antibiotikum (Bruttoformel)	Bezugs- firma	MW [g/mol]	Reinheit [%]	Konzentration Stammlösung [g/L]	Zusatz zur Stammlösung [mL]	Konzentration Nährlösung [mg/L] (entspr. 5 µmol/L)
CTC (C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .HCl)	Acros	515,34	≥99	1,3967	6	2,3944
TC (C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .HCl)	Acros	480,90	≥99	1,2962	6	2,2222
SFD (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S)	Sigma	250,28	≥99	0,7299	6	1,2514
ENR (C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma	359,39	≥99	1,0482	6	1,7970
MON (C <sub>36</sub> H <sub>61</sub> O <sub>11</sub> Na)	Dr.Ehrens- torfer	692.85	≥98	1,3045	9	3,3543

Die Pflanzen wachsen bis zur Probenahme in dotierter Nährlösung bekannter Antibiotika-Konzentration, die alle zwei Tage gewechselt wird.

### **A.1.5.3.2 Probenahme**

#### **Pflanzen aus Hydrokultur**

##### *Porree*

Nach 10 Tagen Zudotierung werden die Pflanzen in alte Blattabschnitte, junge Blattabschnitte und Wurzeln getrennt. Etwa 1 cm des Bereiches des Wurzel-Blattabschnitt-Überganges wird verworfen, um sicherzustellen, dass kein Wurzelmaterial in die

Blattabschnittsproben gelangt. Die Wurzeln werden gründlich mit  $K_2SO_4$  (0,1 mmol/L) gespült und trockengetupft. Das Pflanzenmaterial wird mit Hilfe eines Messers in ca. 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Jeweils 10-15 g des zerschnittenen Materials werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### *Weißkohl*

Nach 8 Tagen Zudotierung werden die Pflanzen in Blatt (Blatt-jung und Blatt-alt), Stängel und Wurzeln getrennt, wobei der ca. 1 cm Übergang zwischen Wurzel und Stängel verworfen wird. Weil die Wurzeln des Weißkohls viel feiner als die des Porrees sind, wird eine effektivere Art des Spülens gewählt. Die Wurzeln des Weißkohls werden in  $K_2SO_4$  (0,1 mmol/L)-Lösung eingetaucht und eine Minute lang vorsichtig geschwenkt und trockengetupft. Das Pflanzenmaterial wird mit Hilfe eines Messers in ca. 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Jeweils 10-15 g des zerschnittenen Materials werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### *Pflanzen aus Freilandversuchen*

Nach der Ernte werden Weißkohl, Chinakohl und Porree tiefgefroren. Da die Pflanzen nach der Ernte nicht sofort gewaschen worden sind, werden sie vor dem Zerkleinern abgeschält, um Bodenreste und andere Verunreinigungen zu entfernen.

### **A.1.5.3.3 Homogenisierung**

#### *Pflanzen aus Hydrokulturlpflanzen*

Das gelagerte tiefgekühlte (-80 °C) Probenmaterial wird vor der Extraktion mit Hilfe einer Schwingmühle (~5 g Einwaage FG, für 10 min bei 25 Hz) homogenisiert.

#### *Pflanzen aus Freilandversuchen*

Das gelagerte tiefgekühlte (-80 °C) Probenmaterial wird vor der Extraktion manuell zerkleinert und mit Hilfe einer Mörsermühle (~30 g Einwaage FG, für 5 min bei 1,5 mm Hauptzustellungsrichtung in Achsrichtung des Pistills und 2. Ring sichtbar (entspricht ~20 daN (kg)) bei Zustellung des Pistills gegen die Mörserwand) homogenisiert.

### **A.1.5.3.4 Fest-Flüssig-Extraktion**

#### *1. Extraktionsstufe*

Es werden jeweils zwei Einwaagen à 5 g (Blatt und Stängel) und 3 g (Wurzel) parallel aufgearbeitet. Das Probenmaterial wird im 50 mL-Zentrifugenglas mit 20 mL Citrat-EDTA-Pufferlösung versetzt und mit einem Glasstab aufgeschlämmt. Die Suspension wird 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und danach 10 min bei 4000 U/min (entsprechend einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 2325 g) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres 50 mL-Zentrifugenglas überführt.

## *2. Extraktionsstufe*

Der verbleibende Rückstand wird mit 10 mL Pufferlösung erneut aufgeschlämmt, 5 min im Ultraschallbad behandelt und danach 10 min zentrifugiert (4000 U/min). Der Überstand der 2. Stufe wird mit dem Überstand der 1. Stufe zum Gesamtüberstand vereinigt und für 10 min zentrifugiert. Dieser Gesamtextrakt wird zur Festphasenextraktion eingesetzt.

### **A.1.5.3.5 Festphasenextraktion**

Für die Festphasenextraktion wird sowohl eine klassische manuelle SPE-Einheit verwendet als auch – für einige Pflanzenextrakte - der Prototyp eines OPI-SPE (Over Pressure inline Solid Phase Extraction)-Systems.

#### ***Manuelle SPE - Einheit***

##### *Konditionierung*

Die SPE-Kartusche wird mit 3 mL Methanol und anschließend mit 3 mL bidest.Wasser konditioniert. Die Kartusche darf nicht trockengesaugt werden.

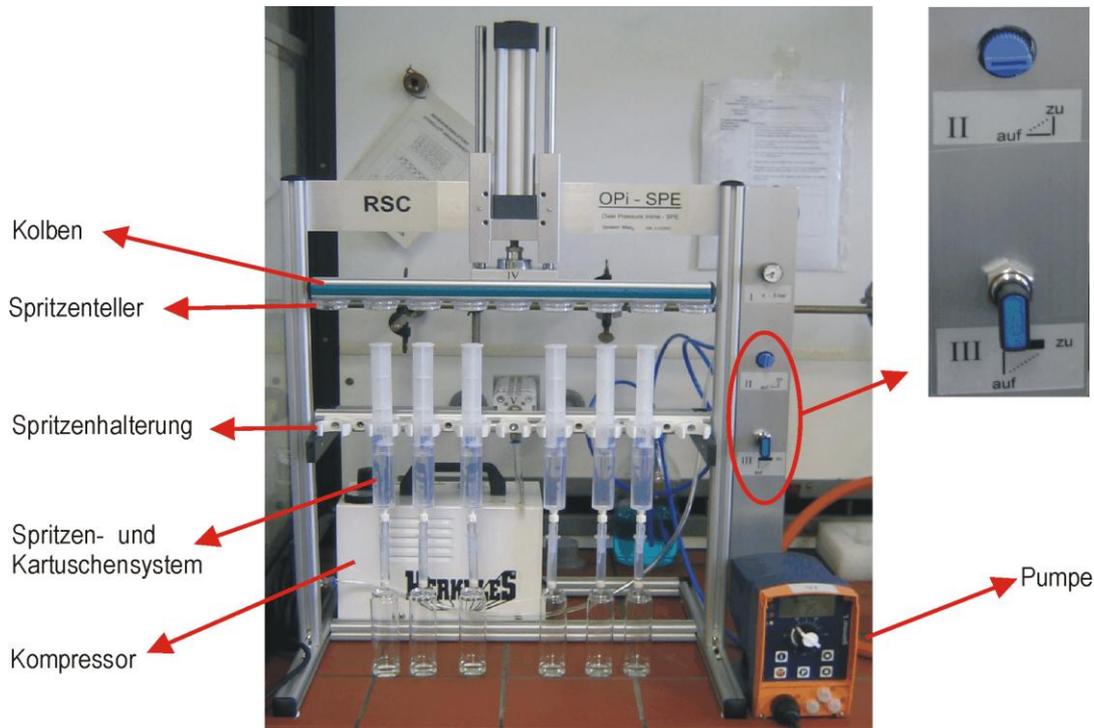
##### *Extraktaufgabe*

Der Extrakt wird mit einer Pasteurpipette auf die Kartusche gegeben und sofort nach der Konditionierung langsam (35-40 Tropfen pro Minute) durch die Festphasenkartusche gesaugt. Danach wird die Kartusche einmal mit 3 mL MeOH und einmal mit 3 mL MeOH/bidest.Wasser (5/95 v/v) nachgespült und anschließend kurz trockengezogen.

##### *Elution*

Die langsame, tropfenweise Elution der Analyten erfolgt pro Kartusche mit 3 mL Methanol. Bei den Hydrokulturlpflanzen werden die Eluate der Extrakte in jeweils einem 10 mL-Einmalreagenzglas als Gesamteluat (~3 mL), bei den Freilandpflanzen aus beiden Einwaagen nacheinander in einem 10 mL-Einmalreagenzglas als Gesamteluat (~6 mL) aufgefangen bis die Kartusche trocken gesaugt ist.

### ***OPI-SPE-System (Over Pressure inline Solid Phase Extraction)***



**Abb. A 2:** OPI-SPE-System

Durch einen Kompressor und eine Pumpe wird ein hydraulisches System betrieben, das dafür sorgt, dass ein Kolben mit konstanter Geschwindigkeit nach unten gefahren wird. Des Weiteren besteht das System aus Halterungen, in die man die Kartuschen, die mit 30 mL Einwegspritzen verbunden sind, einhängen kann. Der Kolben drückt nun von oben auf die Spritzkolben und fährt diese somit mit ebenfalls konstanter Geschwindigkeit nach unten. Durch ein hydraulisches Polster von 5 mL Luft, was bei jeder Probeneingabe in die Spritzen zusätzlich aufgezogen wird, wird sichergestellt, dass sich auch in den Spritzen, bzw. Kartuschen ein hydraulisches System ausbildet, sodass die Proben parallel mit der gleichen Tropfgeschwindigkeit durch die Kartuschen laufen können und keine der Kartuschen voll- oder sogar überlaufen kann. In den Kartuschen baut sich schließlich ein Überdruck auf, sodass die Probenflüssigkeit durch die Kartuschen gedrückt wird. Durch die Schalter II und III kann die Arretierung der Spritzkolben in den Kolbentellern ein- bzw. ausgestellt werden sowie nach einem Durchlauf der Druck vom hydraulischen System wieder abgelassen werden. Die gesamte Probenaufgabe auf die Kartuschen läuft nach der Vorbereitung automatisch. Des Weiteren ist natürlich durch die Einstellung der Pumpe eine exakte Frequenz und damit ein gleichmäßiger Druck einstellbar.

Die Einstellung der Tropfgeschwindigkeit durch die Kartuschen erfolgt beim OPI-SPE-System indirekt über die Einstellung der Pumpe und somit über den Druck, den der Kolben

auf die Spritzenkolben überträgt. Die Tropfgeschwindigkeit wurde dabei so eingestellt, dass sie mit ca. 38 Tropfen pro Minute der idealen Tropfgeschwindigkeit des SPE-Block-Systems entspricht, da angenommen werden durfte, dass so eine maximale Vergleichbarkeit der beiden Systeme erzielt würde.

#### **A.1.5.3.6 Messprobe**

Das Gesamteluat wird im Reagenzglas bei 30°C Badtemperatur unter leichtem Luftstrom bis fast zur Trockne eingengt (Metallblock-Thermostat). Dieser Extraktückstand wird in 1000 µL Fließmittel A aufgenommen, in Autosamplervials (braune Rollrandflaschen ohne Glaseinsatz, 1000 µL Volumen) umgefüllt, mit einer Aluminiumkappe (integriertes Septum) verschlossen und chromatographiert. Erfolgt keine sofortige Analyse, wird die Messprobe bei -32°C in Eppendorf-Vials gelagert. Zur Messung werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, auf einem Schüttler homogenisiert und wie oben beschrieben, zur LC-MS-Analyse vorbereitet.

#### **A.1.6 Protease-Inhibitor-Cocktail Behandlung**

Das Probenmaterial wird im 50 mL-Zentrifugenglas eingewogen, mit 20 mL Extraktionsmittel versetzt und mit einem Glasstab aufgeschlämmt. Als Extraktionsmittel wird MeOH/Citrat-EDTA-Puffer pH 4,1 (5/95 v/v) / Protease-Cocktail-Inhibitor im Verhältnis von 100/1 v/v verwendet (100 mL MeOH/Citrat-EDTA-Puffer mit 1 mL Protease-Cocktail-Inhibitor versetzt). Danach wird die Suspension mit Hilfe einem Schüttler (Schüttler IKA Vibrax VXE basic) inkubiert. Die Inkubationsparameter sind in der Tab. A 4 dargestellt.

**Tab. A 4:** Versuchsparameter für die Optimierung der Inkubation

Versuch Nr.	Inkubationsbedingungen		Probenbehandlung
	Temperatur [C°]	Zeit [min]	
1	25	10	5 min schütteln, 5 min stehen lassen
2		20	10 min schütteln, 10 min stehen lassen
3		30	10 min schütteln, 10 min stehen lassen danach wieder 10 min schütteln

Nach der Inkubation wird die Suspension 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und danach 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres 50 mL-Zentrifugenglas überführt. Der verbleibende Rückstand wird mit 10 mL Extraktionsmittel 2 erneut aufgeschlämmt, 5 min im Ultraschallbad behandelt und danach 10 min zentrifugiert (4000 U/min). Der Überstand wird mit dem Überstand der 1. Stufe zum Gesamtüberstand vereinigt. Dieser Gesamtextrakt wird zur Festphasenextraktion eingesetzt und weiter aufgearbeitet.

### A.1.7 Methodenvalidierung

#### **Wiederfindung**

Zur Bestimmung der Wiederfindungen werden BSA-Winterweizen und Kontrollproben von Porree- und Weißkohlpflanzen-Hydrokultur mit Mischstandard dotiert (50 µg/kg FG). Nach 15 Minuten Einwirkzeit werden die Proben nach der Probenaufarbeitungsvorschrift aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS analysiert. Die erhaltenen Messproben werden jeweils sechsfach injiziert. Die Auswertung erfolgt mit Matrixkalibrierung. Alle Tetracycline werden als Summe von Epimeren ermittelt. CTC wird dabei als Summe von e-iso-CTC und iso-CTC bestimmt.

Die Wiederfindung lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100\%$$

W= Wiederfindung, %

$\bar{x}$  = gemessener Mittelwert

$x_R$ = richtiger Wert, entspricht der zugesetzten Konzentration/Menge

#### **Präzision**

Zur Bestimmung der Präzision wird Winterweizen (BSA) und Kontrollproben von Porree- und Weißkohlpflanzen-Hydrokultur mit Mischstandard dotiert (50 µg/kg), nach 15 Minuten Einwirkzeit werden die Proben nach der Probenaufarbeitungsvorschrift aufgearbeitet und die erhaltenen Messproben jeweils sechsfach injiziert. Die Aufarbeitung (Citrat-Puffer-Extraktion, SPE) und Analyse einer gemahlene 1-g-Einwaage erfolgt sowohl einzeln als auch mit zwei parallel aufgearbeiteten Proben, deren SPE-Extrakte vereinigt worden sind.

Anschließend werden die relativen Standardabweichungen wie folgt berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \qquad s_{rel} = \frac{s}{\bar{y}} \cdot 100\%$$

s= Standardabweichung

$s_{rel}$ = relative Standardabweichung

$y_i$ = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

y= Peakfläche

$\bar{y}$  = Mittelwert der Peakflächen (Detektorsignal)

#### **Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 werden mit Antibiotika dotierter Winterweizen (BSA) sowie Kontrollproben von Porree- und

Weißkohlpflanzen-Hydrokultur jeweils sechsfach analysiert (Matrixkalibrierung). Die Dotierungen liegen im Bereich von 1 bis 80 µg/kg. Die Auswertung der Messergebnisse wird unter Zuhilfenahme des Softwareprogramms "Valoo" durchgeführt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze lassen sich nach folgender berechnen:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y_1}}{b}$$

$$s_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

$$\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$$

$$X_{NWG} = s_{x_0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

$$X_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k \cdot X_{NWG} - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

$s_{x_0}$  = Verfahrensstandardabweichung

$s_{y_1}$  = Reststandardabweichung

$X_i$  = Mittelwert der experimentell ermittelten Konzentration

$a$  = Ordinatenabschnitt

$b$  = Geradensteigung

$y_i$  = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

$\hat{y}_i$  = zu  $y_i$  gehöriger Schätzwert aus der Regressfunktion

$X_{NWG}$  = Nachweisgrenze

$X_{BG}$  = Bestimmungsgrenze

$t_{f;\alpha}$  = Quantil der t-Verteilung (einseitiges Prognoseintervall)

$f$  =  $n-2$  (mit  $f$  = Anzahl der Freiheitsgrade)

$\alpha$  = Signifikanzniveau

$m$  = Anzahl der Messungen an der Analysenprobe

$n$  = Anzahl der Proben

### **Selektivität**

Hierzu werden sowohl eine Winterweizenproben (BSA-Proben) als auch Kontrollpflanzen (Porree und Weißkohl) aus Hydrokultur aufgearbeitet und 250 µg/kg mit Mischstandardlösung dotiert. Anschließend wird vergleichend mit einer Mischstandardlösung ( $\beta=1\text{mg/L}$ ) der Wirkstoffe vermessen ( $n=3$ ).

**Matrixeffekte**

Zur Untersuchung von Matrixeffekten auf die massenspektrometrische Detektion wird aus 1,00 g unbelasteten Getreide (BSA-Weizenprobe) nach der Probenaufarbeitungsvorschrift je eine Matrixprobe gewonnen. Jeweils drei Matrixproben werden mit Kalibrierlösungen der Konzentrationen 100 µg/L; 200 µg/L; 500 µg/L; 750 µg/L; 1000 µg/L; 2000 µg/L und 5000 µg/L aufgenommen. Als Vergleichsproben dienen die jeweiligen Kalibrierungslösungen der jeweiligen Konzentrationen. Jede Probe (mit und ohne Matrix) wird dreimal mittels HPLC-MS/MS analysiert und der Mittelwert der erhaltenen Messsignale (Peakflächen) pro Analyt und Konzentration gebildet.

## A.2 ANGABEN ZU DEN PRODUKTIONSBEDINGUNGEN DER BEPROBTEN LANDWIRTSCHAFTLICHEN BETRIEBE, ERNTE 2005, 2006

Tab. A 5a: Ernte 2005 (Winterweizen) - Angaben zu den Produktionsbedingungen

Probe	Produktionssystem	Viehbestand			*Medikation	Gülleausbringung		
		Mastplätze	Sauen	Ferkel/Jahr	Antibiotika	Bodenart	m <sup>3</sup> /ha	Einarbeitung
<b>Kreis Coesfeld</b>								
K-S-1	Ferkelaufzucht, Schweinemast	900		600	<b>**Chlortetracyclin,</b> Lincomycin	sandiger Lehm	22 (Januar 05)	Kopfdüngung, Schleppschlauch
K-S-2	Schweinemast	680			Amoxicillin, Lincomycin, Penicillin	Sand	20 (März 05)	Kopfdüngung, Schleppschlauch
K-S-3	Ferkelaufzucht, Schweinemast	250		1000	<b>Tetracyclin,</b> Amoxicillin, Neomycin	sandiger Lehm	20 + 20 (vor Saat, Frühjahr 05)	Schleppschlauch
K-S-4	Ferkelaufzucht, Schweinemast	1000		750	<b>Tetracyclin,</b> Amoxicillin, Lincomycin	Lehm	15,5 (März 05)	Kopfdüngung, Schleppschlauch
K-S-5	Ferkelaufzucht			7000	<b>Tetracyclin,</b> Amoxicillin, Colistin	sandiger Lehm	30 (Januar 05)	Kopfdüngung, Schleppschlauch
<b>Kreis Warendorf</b>								
K-B-1	Ferkelaufzucht, Schweinemast	1200		1000	<b>Chlortetracyclin,</b> Amoxicillin, Colistin	sandiger Lehm, lehmiger Ton	20 (Februar 05)	Schleppschlauch
K-M-1	Schweinemast	2200			<b>Chlortetracyclin</b>	lehmiger Ton, Ton	25 (Februar 05)	Schleppschlauch
K-M-2	Schweinemast	1200			<b>Chlortetracyclin</b>	sandiger Lehm	18 (März 05)	Querverteiler

Tab. A 5b: Ernte 2005 (Winterweizen) - Angaben zu den Produktionsbedingungen

Probe	Produktionssystem	Viehbestand			Medikation	Gülleausbringung		
		Schweinehaltung	Mastplätze	Sauen		Ferkel/Jahr	Antibiotika	Bodenart
<b>Kreis Borken</b>								
<b>K-H-1</b>	Ferkelaufzucht			4000	<b>Tetracyclin,</b> Amoxicillin,	Sand, lehmiger Sand	60 kg N (Februar 05)	Kopfdüngung
<b>K-H-2</b>	Ferkelaufzucht, Schweinemast	700	200		Ampicillin	humoser Sand	24 (Februar 05)	Schleppschlauch
<b>K-H-3</b>	geschlossenes System Schweinemast	1200	150		Procylin, Tylan	sandiger Lehm	20 (Februar 05)	Schleppschlauch
<b>K-H-4</b>	Schweinemast (60 Bullen)	1450			<b>Tetracyclin</b>	sandiger Lehm	12 + 15 (März 05)	Schleppschlauch
<b>K-H-5</b>	geschlossenes System	300	135	450	Ampicillin, Colistin	Sand	24 (März 05)	Prallteller
<b>K-H-6</b>	Ferkelproduktion		900		<b>Chlortetracyclin,</b> Amoxicillin	sandiger Lehm	30 (Februar 05)	Schleppschlauch

**Kreis Borken****Tab. A 6a:** Ernte 2006 (Triticale, Gerste, Weizen) - Angaben zu den Produktionsbedingungen

Probe	Produktionssystem	Viehbestand			Medikation		Gülleausbringung	
		Mastplätze	Sauen	Ferkel/Jahr	Verfahren	Antibiotika	Bodenart	m <sup>3</sup> /ha
<b>B1 T</b>	geschlossenes Syst.	400	170	4000	Einzeltier, Tränke, Futter	<b>Oxytetracyclin,</b> Amoxicillin	Sand	10 (Frühjahr 06)
<b>B1 G</b>							Sand	16 + 16 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>B2 G</b>	Sauenbestand mit Ferkelaufzucht		230	5800	Einzeltier, Tränke, Futter	Amoxicillin, Colistin, Baytril (Enrofloxacin)	Sand	28 (Frühjahr 06)
<b>B2 W</b>							Sand	
<b>B3 G</b>	Sauenhaltung, Jungsauenvermehrung	*2400	517		Einzeltier, Futter	<b>Tetracyclin,</b> Trimethoprim (Grippe), Amoxicillin	Sand-Lehm	30 + 25 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>B3 W</b>							Sand	
<b>B4 G</b>	geschlossenes Syst.	550	85	1750	Einzeltier, Futter	Amoxicillin, Colistin, Baytril Draxxin (Prophylaxe)	lehmiger Sand	20 + 30 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>B4 W</b>							lehmiger Sand	
<b>B5 T</b>	Sauenhaltung, Ferkel		260	6000	Einzeltier	Hostamox (Amoxicillin), Langzeitpenicillin (keine Prophylaxe)	Sand	20 + 20 (Frühjahr 06)
<b>B5 W</b>							Sand	
<b>B6 G</b>	geschlossenes Syst. (ca. 40 Kühe, Rinder, Bullen)	700	200	4200		Baytril (keine Prophylaxe)	humoser Sand	10 + 25 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>B6 W</b>							humoser Sand	
<b>B6 T</b>							humoser Sand	

**Kreis Coesfeld****Tab. A 6b:** Ernte 2006 - Angaben zu den Produktionsbedingungen

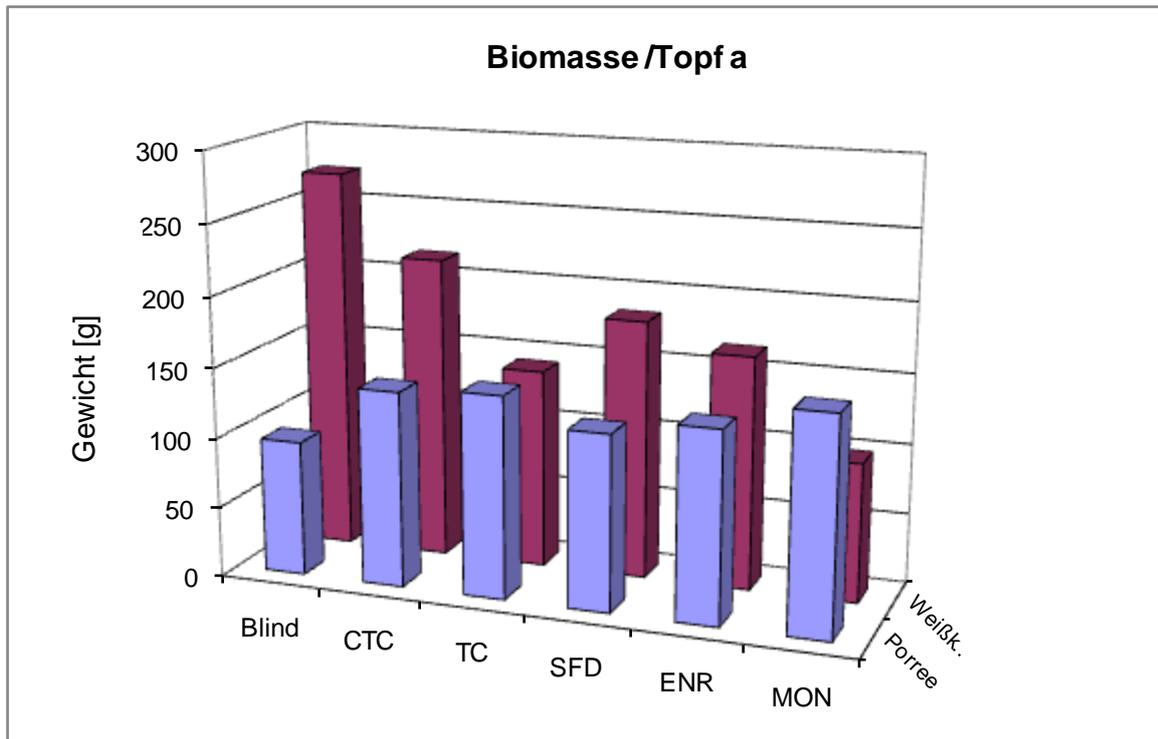
Probe	Produktionssystem	Viehbestand			Medikation		Gülleausbringung	
		Mastplätze	Sauen	Ferkel/Jahr	Verfahren	Antibiotika (Auswahl)	Bodenart	m <sup>3</sup> /ha
<b>Coe1 W</b>	Babyferkelaufzucht, Schweinemast	1050		4200	Einzel-tier, Tränke, Futter (Einstallprophylaxe)	<b>Tetracyclin</b> , *Amoxicillin, Sulfonamide/Trimethoprim (*Medikam.-Aufwand hoch)	schluffiger Lehm	14 + 15 (Frühjahr 06)
<b>Coe2 W</b>	Sauenhaltung, Ferkelaufzucht		500	10.000	keine Ang.	keine Angaben	lehmiger Sand	20 (Frühjahr 06)
<b>Coe3 W</b>	Sauenhaltung, Ferkelaufzucht		500	12000	Einzel-tier	Amoxicillin, Baytril	sandiger Lehm	10 + 25 + 20 (Herbst 05, 2xFrühjahr 06)
<b>Coe4 W</b>	Babyferkelaufzucht, Schweinemast (100 Mastbullen)	1000		4000	oral: Einstallprophylaxe Abteilbehandlung	<b>Tetracyclin</b> , Amoxicillin, Colistin	sandiger Lehm	35 (Frühjahr 06)
<b>Coe5 W</b>	geschlossenes Syst.	2000	500	12000	Einzel-tier, Futter	<b>Tetracyclin</b> , Amoxicillin	Lehm	28 (Frühjahr 06)
<b>Coe7 W</b>	geschlossenes Syst.	1800	200	4800	Einzel-tier, Tränke, *Futter	<b>Terramycin</b> (Oxytetracyclin), * <b>Tetracyclin</b> ,	sandiger Lehm	25 (Frühjahr 06)
<b>Coe8 W</b>	geschlossenes Syst.	400	120	2640	Tränke	Amoxicillin, Colistin	sandiger Lehm	24 (Frühjahr 06)
<b>Coe9 W</b>	geschlossenes Syst.	300	140	2800	Flüssigfütterung (*Absetzprophylaxe)	* <b>Chlortetracyclin</b> , Amoxicillin	lehmiger Sand	18 (Frühjahr 06)
<b>Coe10 W</b>	Babyferkelaufzucht, Vormast			2500 (Aufzucht)	Futter	<b>Tetracyclin</b> , Amoxicillin	k. A.	20 + 30 (Herbst 05, Frühjahr 06)

Niedersachsen / Emsland

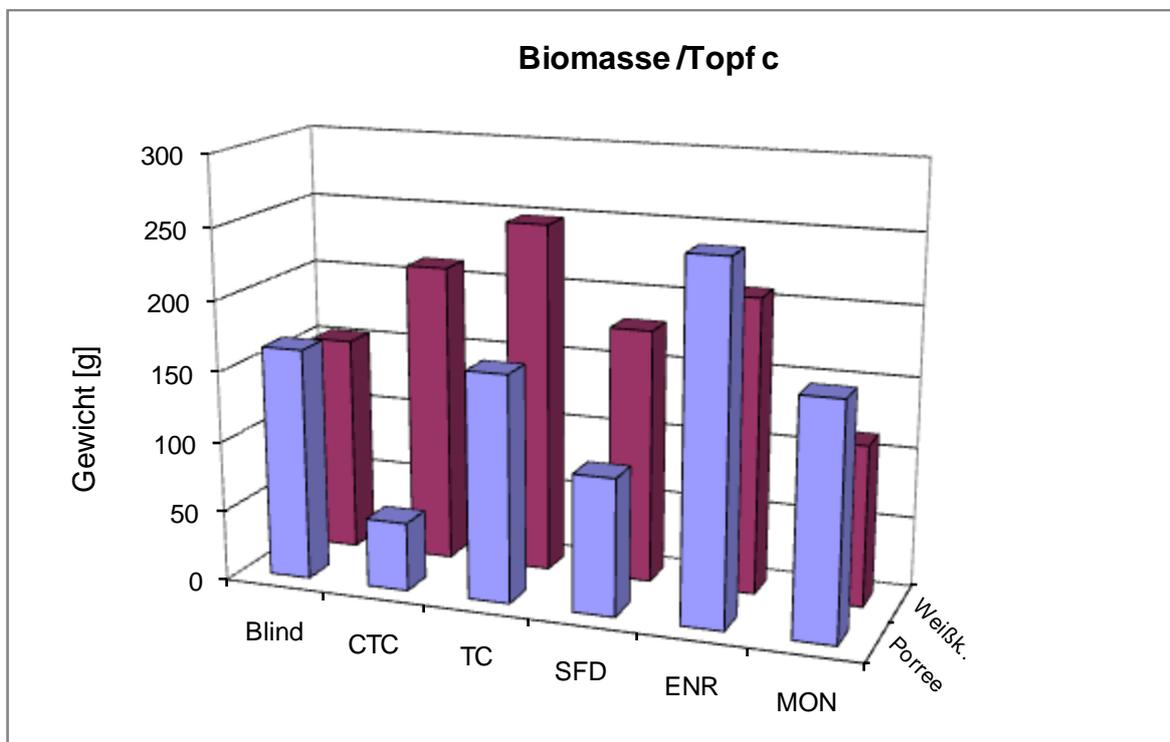
Tab. A 6c: Ernte 2006 - Angaben zu den Produktionsbedingungen

Probe	Produktionssystem	Viehbestand			*Medikation		Gülleausbringung	
		Mastplätze	Sauen	Ferkel/Jahr	Verfahren	Antibiotika	Bodenart	m <sup>3</sup> /ha
<b>NS1 W a)</b>	Schweinehaltung Ferkelerzeugung		250	5400	Einzeltier (keine Absetzprophylaxe)	<b>Chlortetracyclin</b> Langzeitpenicillin	lehmiger Sand	35 (Herbst 05)
<b>NS1 W b)</b>							Sand	
<b>NS2 W</b>	geschlossenes Syst.	700	120		Einzeltier,*Tränke (keine Absetzprophylaxe)	* <b>Tetracyclin</b> , *Amoxicillin	Sand	20 + 20 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>NS3 W</b>	Ferkelerzeugung, Aufzucht		170	3800	Einzeltier, (Futter)	<b>Terramycin</b> (Oxytetracyclin), Penicillin	humoser Sand	18 + 20 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>NS4 W</b>	geschlossenes Syst.	700	100	2000	Futter (keine Absetzprophylaxe)	<b>Chlortetracyclin</b> , <b>Terramycin</b> , Penicillin	Sand	25 (Frühjahr 06)
<b>NS5 W</b>	geschlossenes Syst.	650	110	12000	Einzeltier (keine Absetzprophylaxe)	Penicillin, Baytril	humoser Sand	25 (Frühjahr 06)
<b>NS6 W</b>	Sauenhaltung		230	5000	Einzeltier, (Tränke)	Amoxicillin, Colistin, Penicillin	schwach hum. Sand	35 (Herbst 05)
<b>NS7 W</b>	geschlossenes Syst.	950	160	3500	Einzeltier (Absetzprophylaxe)	Langzeitpenicillin	Sand	20 + 15 (Herbst 05, Frühjahr 06)
<b>NS8 W</b>	Ferkelerzeugung	30	220	4500	Einzeltier (Absetzprophylaxe)	<b>Chlortetracyclin</b> , Amoxicillin	Sand	20 (Herbst 05)

## A.3 ERMITTELTE ERNTEGEWICHTE VON WEIßKOHL UND PORREE



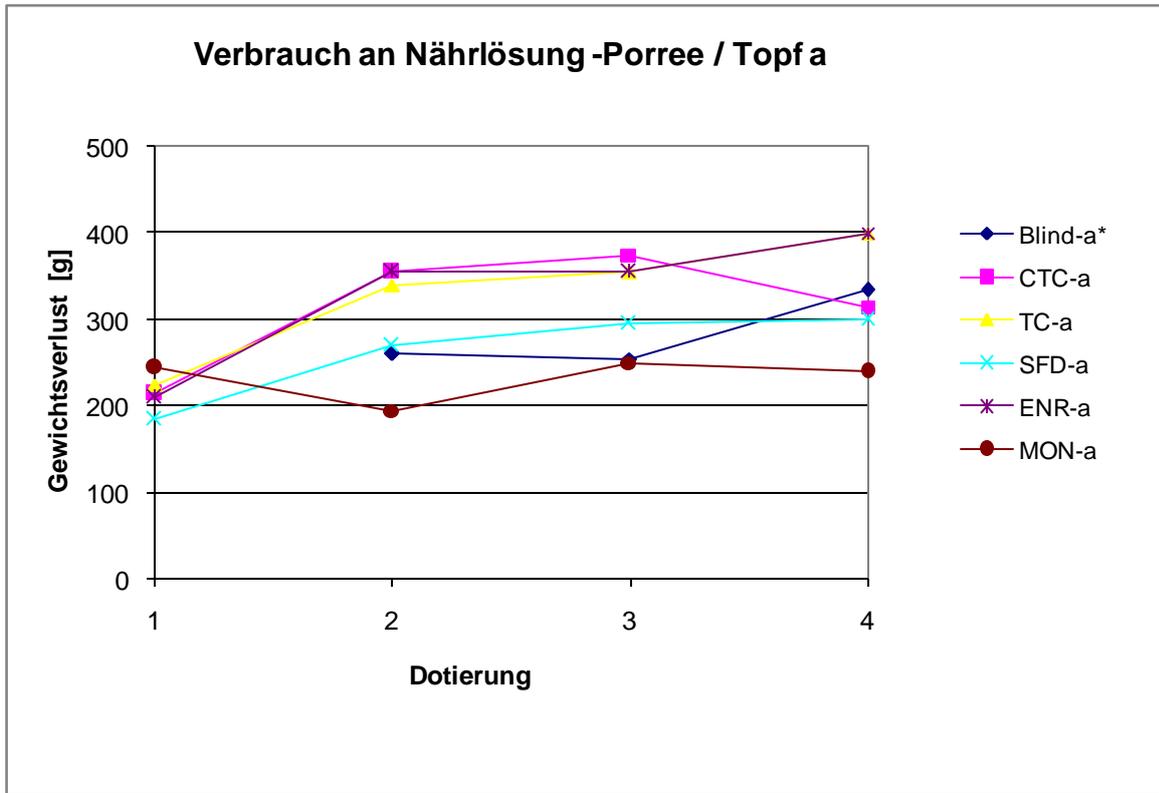
a)



b)

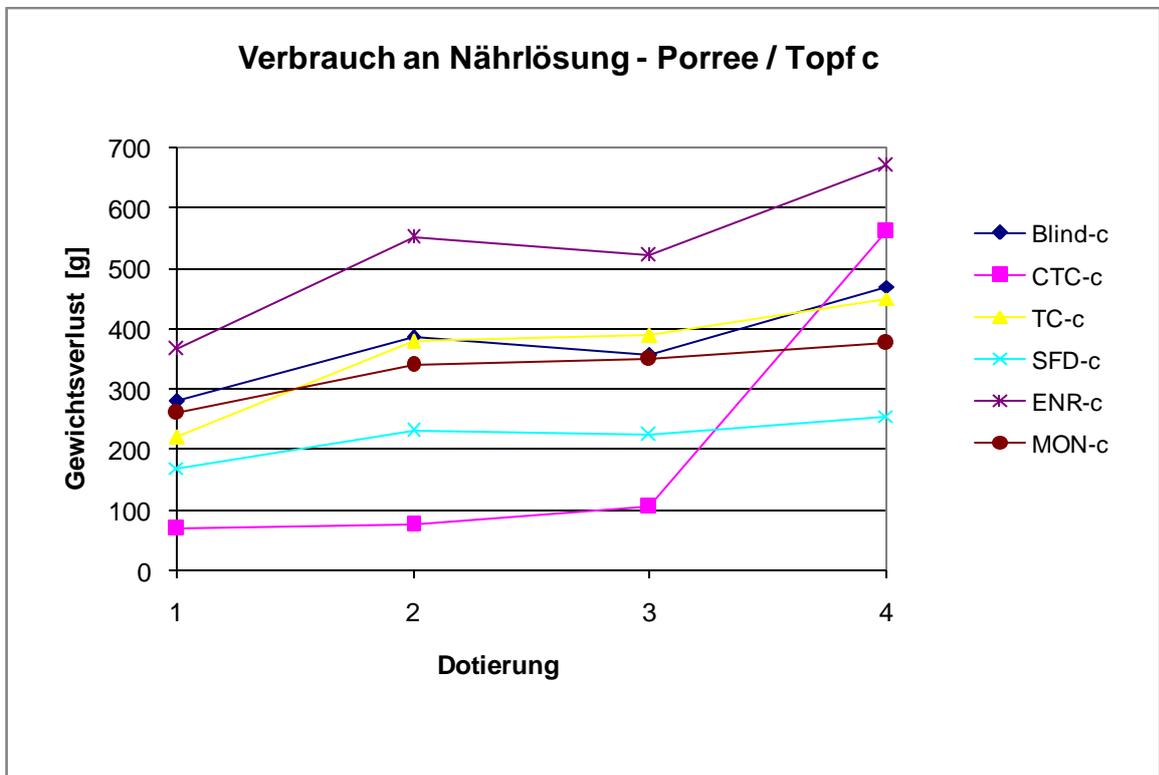
**Abb. A 3** : Erntegewichte von Weißkohl und Porree zum Erntezeitpunkt in Antibiotika-dotierter Nährlösung

**A.4 VERBRAUCH AN NÄHRLÖSUNG IN HYDROKULTUR**

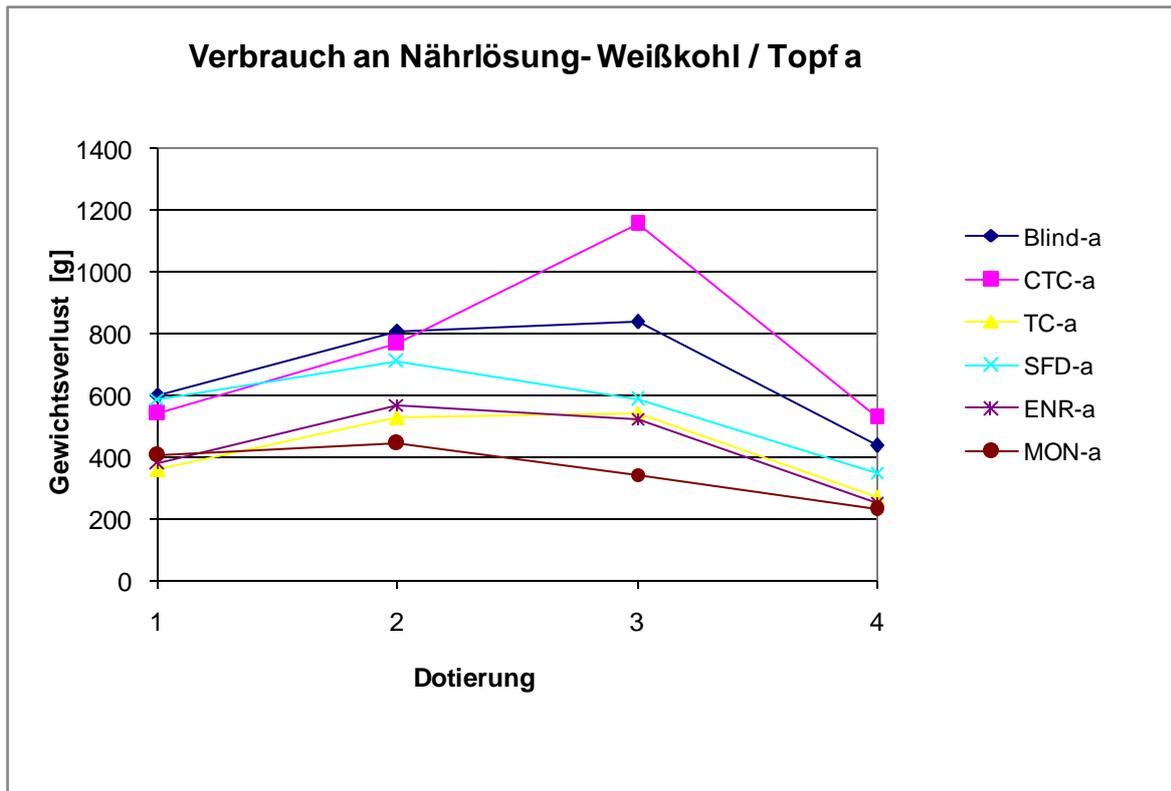


\*Datenverlust

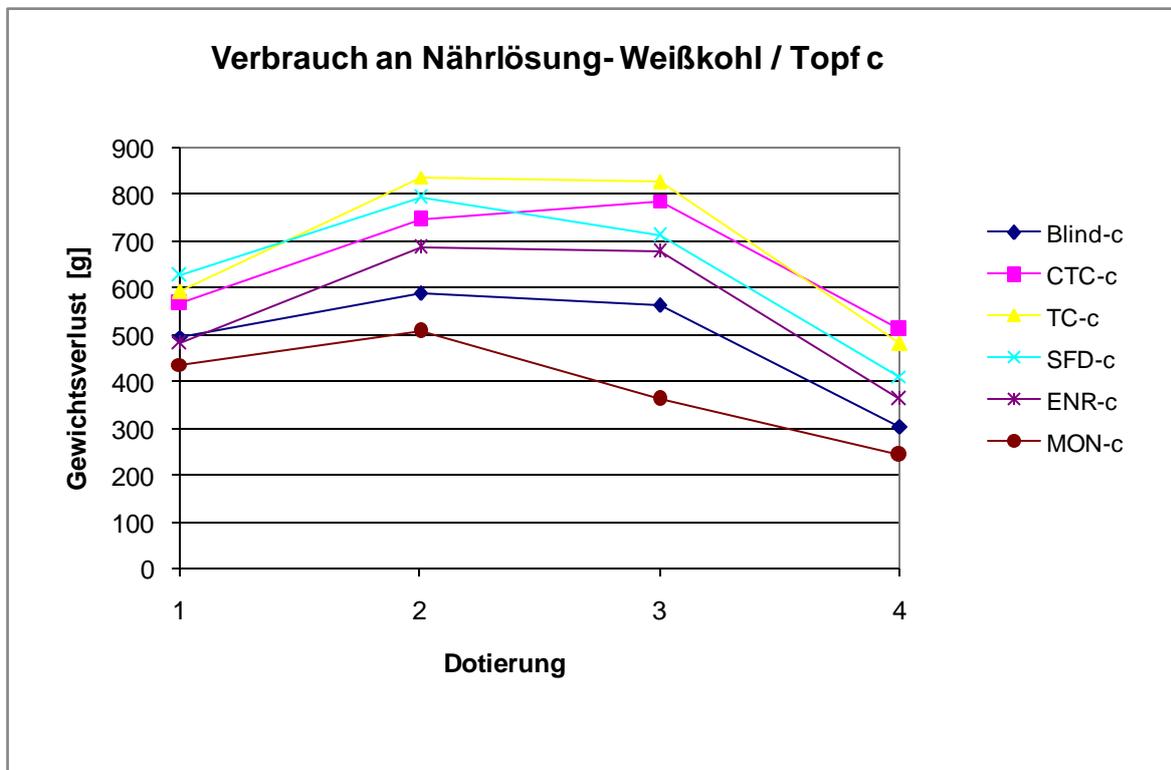
**a)**



**b)**



c)



d)

**Abb. A 4 :** Verbrauch an Nährlösung bei der Anzucht von Porree und Weißkohl als Funktion der Zeit und Antibiotika-Dotierung (Dotierungsintervalle: 2 Tage)