

# **Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften  
Department Chemie  
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemikerin Christine Schwake-Anduschus, geb. Schwake

aus

Hameln

Paderborn 2008

## Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Grote M., Schwake-Anduschus C., Michel R., Stevens H., Heyser W., Langenkämper G., Betsche T., Freitag M. (2007) Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil, Landbauforschung Völkenrode - FAL Agricultural Research 57 (1), 25-32.

Grote M., Schwake-Anduschus C., Michel R., Langenkämper G., Betsche T., Hayen H., Heyser W., Freitag M. (2007) Aufnahme und Transport von Tierarzneistoffen in Nutzpflanzen, in Müncher Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Band 58, Vorträge der 58. Fachtagung „Tierarzneimittel in der Umwelt“, Hrsg. Bayerisches Landesamt für Umwelt, Oldenbourg Industrieverlag GmbH, ISBN 978-3-8356-3135-9, 161-173.

Grote M., Schwake-Anduschus C., Stevens H., Michel R., Betsche T., Freitag M. (2006) Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden – Ergebnisse eines Modellversuchs, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1, 38-50.

## Vorträge

Schwake-Anduschus C., Nettmann E., Betsche T., Langenkämper G., Freitag M., Grote M. (2003) Untersuchungen zur Aufnahme von Veterinärpharmaka verschiedener Nutzpflanzen über die Wurzel, Tagung „Gesunde Umwelt für gesunde Pflanzen“ 9.-10.10.2003, FAL Braunschweig.

Grote M., Schwake-Anduschus C., Yolcu D., Michel R., Heyser W., Hayen H., Langenkämper G., Betsche T., Freitag M. (2008) Incorporation of veterinary antibiotics into wheat, 13th ICC Cereal and Bread Congress, Cerworld 21th, 15.06.-18.06.2008, Madrid, Spain.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2002 bis Dezember 2003 und von Februar 2005 bis Mai 2006 an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie des Departments Chemie der Fakultät für Naturwissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Manfred Grote durchgeführt.

Die Arbeit wurde durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz MUNLV des Landes Nordrhein-Westfalen und durch die Graduiertenkommission der Universität Paderborn gefördert.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Manfred Grote danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und seine engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Heyser (Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien, UFT, Universität Bremen) danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Tracerversuche.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Thomas Betsche und Herrn Dr. Georg Langenkämper (Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Detmold, Max Rubner-Institut MRI) für die Unterstützung bei der Durchführung der Hydrokulturversuche und deren stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Helga Wehrkamp (UFT Bremen) danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Tracer-Versuche am UFT.

Herrn Dr. Heiko Hayen (Institute for Analytical Sciences, ISAS Dortmund) danke ich für die Durchführung der FTICR-Messungen.

Ferner möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises an der Universität Paderborn für ihre kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Des weiteren danke ich allen, die außerhalb des Arbeitskreises zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere meiner Mutter, meinen Schwestern, meinem Bruder, meinem Schwager und meinen Freundinnen und Freunden.

Für die finanzielle Förderung danke ich dem Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz MUNLV des Landes Nordrhein-Westfalen und der Graduiertenkommission der Universität Paderborn.

Bei meinem Ehemann Dr. Martin Anduschus, meinen Kindern Paul-Ole, Camilla und Nina möchte ich mich für die Rücksichtnahme und das andauernde Verständnis sehr herzlich bedanken. Sie haben einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

## Abkürzungen

AB	Antibiotika
ACD/I-LAB	Internet-based service for instant access to chemical databases
B	Blatt
BfEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Detmold, seit 01.2008 Max Rubner-Institut
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit e.V.
Ci	Curie
CTC	Chlortetracyclin
d	Tag / day
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DGI	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNT	Dinitrotoluol
e-CTC	4-Epichlortetracyclin
e-DMC	4-Epidemecloxytetracyclin
e-iso-CTC	4-Epiisochlortetracyclin
e-Oxy-CTC	4-Epioxychlortetracyclin
e-Oxy-TC	4-Epioxytetracyclin
e-TC	4-Epitetracyclin
FEDESA	European Federation of Animal Health Industry
FG	Frischgewicht
FS	Feldsalat
GENARS	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance
GfK	Gesellschaft für Konsumforschung
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
<sup>3</sup> H-SM	(3,5)- <sup>3</sup> H-Sulfamethazin
<sup>3</sup> H-TC	(7)- <sup>3</sup> H-Tetracyclin
IFAH	International Federation for Animal Health
iso-CTC	Isochlortetracyclin
IS	Interner Standard
KBq	Kilobequerel
Kon	Kontrolle
Konz	Konzentration
K <sub>ow</sub> oder P	Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser
KW	Kohlenwasserstoffe
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Nlös	Nährlösung
MRI	Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Standort Detmold
MRL	Maximum Residue Limit
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie von Vorläufer- und Produktionen
MS <sup>2</sup>	Tandem Massenspektrometrie
MUNLV	Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalens
NN	nicht nachweisbar

OTC	Oxytetracyclin
PEG	Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
PCB	Polychlorierte Biphenyle
pKa	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante Ka
PM	Möhrensorte „Pariser Markt“
RR	Möhrensorte „Rote Riesen“
SFD	Sulfadiazin
SMP	Sulfamethoxypyridazin
SMZ	Sulfamethazin
SRM	Single Reaction Modus
TC	Tetracyclin
TIC	Total Ion Current
TM	Trockenmasse
TNT	Trinitrotoluol
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
UFT	Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien, Universität Bremen
Wu	Wurzel
WW	Winterweizen

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>5</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
<b>2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>3 ANTIBIOTIKA .....</b>	<b>14</b>
3.1 Verbrauchsmengen in der Human- und Veterinärmedizin.....	14
3.2 Tetracycline .....	17
3.3 Sulfonamide.....	20
3.4 Verteilung in der Umwelt.....	21
<b>4 PFLANZENPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN ÜBER AUFNAHME UND TRANSPORT VON STOFFEN ÜBER DIE WURZEL .....</b>	<b>23</b>
4.1 Aufbau einer Wurzel .....	23
4.1.1 Xylem.....	26
4.1.2 Phloem .....	26
<b>5 STOFFTRANSPORT DURCH PFLANZLICHE ZELLEN .....</b>	<b>27</b>
5.1 Grundlagen des Stofftransports.....	27
5.2 Stofftransport in Abhängigkeit von physiko-chemischen Eigenschaften .....	28
<b>6 METABOLISMUS IN PFLANZEN.....</b>	<b>31</b>
<b>7 STAND DER FORSCHUNG ZUR AUFNAHME VON ANTIBIOTIKA IN PFLANZEN....</b>	<b>33</b>
<b>8 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>36</b>
8.1 Aufnahmeexperimente.....	36
8.2 Anzucht der Pflanzen .....	37
8.2.1 Vorbemerkung .....	37
8.2.2 Vorbehandlung der Samen.....	37
8.2.3 Keimung der Samen .....	37
8.2.4 Entwicklung der Pflanzen .....	38
8.2.5 Bestimmung der Biomasse der Pflanzen.....	38
8.2.6 Zudotierung der Antibiotika.....	39
8.2.6.1 Aufnahmeexperimente mit unmarkierten Antibiotika.....	39
8.2.6.2 Aufnahmeexperimente mit markierten Antibiotika .....	39

8.2.7 Ernte und Lagerung .....	40
8.3 Analyse der Proben aus Versuchen mit <sup>3</sup> H-markierten Antibiotika .....	40
8.3.1 Flüssig-Szintillationszählung.....	40
8.3.2 Mikroautoradiographie .....	42
8.4 Analyse der Proben aus Versuchen mit unmarkierten Antibiotika .....	42
8.4.1 Bestimmung von Sulfadiazin .....	43
8.4.2 Bestimmung von Chlortetracyclin und iso-Chlortetracyclin .....	44
8.4.3 Untersuchungen zu Metaboliten in Pflanzenproben .....	45
<b>9 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
9.1 Modellrechnungen zur Pflanzenverfügbarkeit von Antibiotika .....	46
9.2 Anzucht von Weizen, Feldsalat und Möhren .....	46
9.2.1 Vorbehandlung der Samen.....	46
9.2.2 Keimung und Entwicklung .....	47
9.3 Aufnahmeexperimente mit Tritium-markierten Antibiotika .....	48
9.3.1 Feldsalat .....	48
9.3.2 Winterweizen .....	49
9.3.3 Ergebnisse der Mikroautoradiographie .....	51
9.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der <sup>3</sup> H-Experimente .....	53
9.4 Entwicklung der Rückstandsanalytik mit LC-MS.....	54
9.4.1 Qualitativer Nachweis von SFD, CTC und iso-CTC mit LC-MS/MS .....	54
9.4.2 Externe Kalibrierung .....	57
9.4.3 Optimierung der Probenaufarbeitung .....	57
9.4.4 Nachweis der Analyten in Pflanzenextrakten.....	59
9.4.5 Wiederfindung .....	60
9.4.6 Signalsuppression .....	61
9.4.7 Anwendung eines Internen Standards zur SFD Bestimmung.....	63
9.4.8 Standardaddition .....	65
9.5 Aufnahmeexperimente mit unmarkierten Antibiotika in Hydrokultur .....	66
9.5.1 Möhren .....	66
9.5.1.1 Aufnahme von SFD .....	66
9.5.1.2 Aufnahme von CTC / iso-CTC .....	68
9.5.2 Feldsalat .....	71
9.5.2.1 Aufnahme von SFD .....	71
9.5.2.2 Aufnahme von CTC / iso-CTC .....	72
9.5.3 Winterweizen .....	74
9.5.3.1 Aufnahme von SFD .....	74
9.5.3.2 Aufnahme von CTC / iso-CTC .....	77
9.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung und der Aufnahmeexperimente mit unmarkierten Antibiotika .....	82
9.6 Metabolisierung von Chlortetracyclin in Pflanzen .....	83
9.6.1 Einführung .....	83
9.6.2 Mögliche Metabolite von CTC.....	83
9.6.3 Nachgewiesene Metabolite von CTC.....	87
9.6.3.1 Nachweis von Metaboliten in Wurzeln des Winterweizen.....	87
9.6.3.2 Nachgewiesene Metabolite in ausgewählten Pflanzenproben.....	93
9.6.3.3 Metabolite in Pflanzen aus einem Freilandversuch .....	94
9.6.4 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse auf Metabolite .....	95

**10 ZUSAMMENFASSUNG ..... 96**

**11 EXPERIMENTELLER TEIL ..... 99**

11.1 Verwendete Geräte und Chemikalien ..... 99  
11.2 Durchführung ..... 104  
11.2.1 Anzucht von Nutzpflanzen auf Hydrokultur mit unmarkierten Arzneistoff-dotierten  
Nährlösungen (BfEL, Detmold) ..... 104  
11.2.2 Anzucht von Nutzpflanzen auf Hydrokultur mit markierten Arzneistoff-dotierten  
Nährlösungen (UFT, Bremen) ..... 108  
11.2.3 Analyse der Arzneistoffrückstände in Pflanzenproben mit LC-MS ..... 111

**12 LITERATUR ..... 114**

**ANHANG ..... 124**

A1 Verwendete Lösungen bei der Anzucht der Pflanzen ..... 124  
A2 Verwendete Lösungen bei der Probenaufbereitung und Analytik ..... 126  
A3 Verwendete Lösungen bei den Versuchen mit Tritium-markierten Antibiotika und die  
ermittelten Gehalte ..... 127  
A3.1 Umrechnung von Radioaktivitätseinheiten ..... 134

# 1 Einleitung

Antibiotika gehören in der Human- und Veterinär-Medizin zu den verordnungstärksten Medikamenten (Sattelberger 1999, Ungemach 1999). In der Europäischen Union einschließlich der Schweiz wurden 1997 10.500 t Antibiotika in der Veterinärmedizin und in der Humanmedizin angewendet (FEDESA 1999), nur zwei Jahre später waren es bereits 13.200 t (FEDESA 2001). Davon entfielen 35% auf Nutztiere und 65% auf Menschen (ebd.). Bei den Nutztieren wurden 92% für die Behandlung von Krankheiten und 6% als Wachstumsförderer mit der Tiernahrung eingesetzt (ebd.).

Die zunehmende Ausbreitung von resistenten Bakterienstämmen führte zum Verbot von Antibiotikagaben zur Leistungsförderung in der Tiermast. Ab 2006 dürfen Antibiotika nur noch nach tierärztlicher Verordnung gemäß VO (EG) 1831/2003 angewendet werden.

Antibiotika werden im Organismus nicht vollständig abgebaut. Vielmehr gelangen bis zu 80% der einem Lebewesen verabreichten Antibiotikadosen wieder in die Umwelt (Sedlak 2001). Nach Behandlung von Tieren gelangen die ausgeschiedenen Wirkstoffe und Abbauprodukte über den Austrag von Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Felder und führen zur Belastung aquatischer und terrestrischer Systeme (Halling-Sørensen 1999, Thiele-Brunn 2003, Hamscher 2002 + 2005, Grote 2005). Doch was passiert dann? Können die Wirkstoffe und Metabolite von Nutzpflanzen aus güllegedüngten Böden aufgenommen, in die menschlichen Nahrungskette gelangen und zur Bildung resistenter Bakterienstämme beitragen?

Die Bildung und Verbreitung resistenter Bakterienstämme birgt für die Gesellschaft erhebliche Risiken und wird deshalb von zahlreichen Forschungsgruppen untersucht (vgl. z.B. das GENARS Projekt „German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance“, [www.GENARS.de](http://www.GENARS.de), die Arbeiten der PEG, Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V. [www.p-e-g.org](http://www.p-e-g.org); der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e. V. (DGI) [www.dgi-net.de](http://www.dgi-net.de); sowie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) [www.dghm.org](http://www.dghm.org)). Heute wird die Bildung und Verbreitung resistenter Bakterienstämme auch im Zusammenhang mit geringen Aufnahmemengen von Antibiotika und deren Metaboliten diskutiert (Langewische und Bottermann 2003, Smith et al. 2005). Für Lebensmittel tierischer Herkunft gibt es bereits Antibiotika-Rückstandshöchstmengen, weil sie einen Beitrag zur Antibiotika-Aufnahme in die Nahrungskette bilden (Vockel 2005). Der Eintragungspfad von Antibiotika über die pflanzliche Nahrungskette ist bisher jedoch nur wenig untersucht. Im ungünstigsten Fall gelangen Antibiotika nach der Verwendung in der Veterinärmedizin wieder über Boden und Pflanzen in die menschliche und tierische

Nahrungskette und tragen, so das „worst case scenario“, zur Bildung und Verbreitung resistenter Bakterienstämme bei. Damit ist das Hauptthema dieser Arbeit genannt: Es soll untersucht werden, ob und in welchem Umfang Nutzpflanzen Antibiotika aufnehmen und ob und in welchem Umfang ggf. für den Menschen toxikologisch relevante Metabolite in Pflanzen gebildet werden.

Das Aufnahmepotenzial von Pflanzen für Antibiotika wurde bereits vor 50 Jahren erkannt (Krasilnikow 1958). Damals wurde der Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft zur Ertragssteigerung und zum Pflanzenschutz untersucht. Penicillin und Streptomycin wurden von Weizen (*Triticum aestivum*), Mais (*Zea mays*) und Feldsalat (*Valerianella locusta*) „assimiliert“ und zeigten dadurch ein verändertes Wachstum. Die Befunde waren allerdings nicht einheitlich und die Wirkungsmechanismen sind weitgehend unbekannt geblieben. Manche Pflanzen reagieren zum Beispiel mit verzögertem Wachstum, wenn sie Antibiotika ausgesetzt werden, andere scheinen gar nicht zu reagieren (Batchelder 1982, Langhammer et al. 1990), während wieder andere durch Antibiotika schneller zu wachsen scheinen. Außerdem wurde festgestellt, dass Pflanzen auch unterschiedlich auf verschiedene Antibiotika reagieren. So können sich z.B. einige Sulfadimethoxine auf Mais toxisch auswirken (Migliore 1998). Im Rahmen dieser Forschungen wurde festgestellt, dass Antibiotika relevante Auswirkungen auf Nutzpflanzen haben können, die Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und Nutzpflanzen blieben jedoch weitestgehend unbekannt (Farkas et al. 2007).

Insgesamt sind weder die Aufnahmewege noch die Aufnahmemengen von Antibiotika in Pflanzen oder ihre Metabolite hinreichend bekannt. Damit ist auch das Risikopotential durch Antibiotika in Nutzpflanzen kaum einschätzbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zur Klärung dieser grundlegenden Fragestellungen leisten. Denn wenn Nutzpflanzen Antibiotika über die Gülle und den Boden aufnehmen, so können diese Antibiotika und ihre Metabolite auch wieder in die Nahrungskette von Mensch und Tier gelangen und somit letztendlich die Ausbreitung resistenter Bakterienstämme fördern.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird der Transfer von Antibiotika vom Boden in Nutzpflanzen untersucht. Sie ist in das Forschungsprojekt „Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“ (Forschungsauftrag MUNLV Düsseldorf IIA5-2038.06.0601-B/T/201 30.August 2001) einzuordnen (Grote 2005). In diesem Forschungsprojekt wurde in einer praxisnahen Modellstudie der Weg der Antibiotika in der Landwirtschaft untersucht, und zwar angefangen bei der kontrollierten Medikation von Schweinen, über die Analyse der Ausscheidungen, dem Ausbringen der Gülle auf Felder, der Analyse des Bodens und dem Anbau und der Analyse von Feldpflanzen. Bis zum Start des Forschungsprojektes war nicht klar, ob und welche Mengen Antibiotika mit dem Wirtschaftsdünger „Gülle“ auf Felder gelangen, welche Belastungen des Bodens sich ergeben und insbesondere, wie und ob die Antibiotika in Pflanzen aufgenommen und transportiert werden und somit wieder in den Nahrungskette von Mensch und Tier gelangen können.

Im Rahmen des genannten Forschungsprojektes waren bis zu Beginn dieser Arbeit bereits die folgenden Ergebnisse erzielt worden: Durch die kontrollierte Medikation von Schweinen mit Chlortetracyclin, Sulfadiazin und Trimethoprim konnte nachgewiesen werden, dass bis zu 90% dieser Antibiotika wieder ausgeschieden werden und in die Gülle gelangen (Grote et al. 2004). In der Gülle wurden unter anderem die eingesetzten Substanzen Chlortetracyclin und Sulfadiazin nachgewiesen. Diese Antibiotika liessen sich dann auch im Boden nachweisen, auf den die Gülle ausgebracht wurde (Grote et al. 2004 und 2005). Diese Ergebnisse legen die Kernfrage der Arbeit nahe: tritt ein Transfer der Antibiotika in die Pflanze auf?

1982 wurden von Batchelder Aufnahmexperimente mit radioaktiv markierten Sulfonamiden durchgeführt (u.a. mit Weizen und Mais) die Hinweise darauf lieferten, dass Nutzpflanzen Antibiotika über die Wurzel aufnehmen. Gesicherte Erkenntnisse lagen aber bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht vor. Um hier zur Klärung beizutragen, sollen Aufnahmeexperimente von Antibiotika durch Nutzpflanzen unter Hydrokulturbedingungen durchgeführt werden. Bei den Nutzpflanzen handelt es sich um Winterweizen, Feldsalat und Möhren; bei den Antibiotika um die in der Veterinärmedizin und deshalb in der Modellstudie eingesetzten Verbindungen Chlortetracyclin (CTC) und Sulfadiazin (SFD) kombiniert mit antibiotisch inaktivem Isochlortetracyclin (iso-CTC), welches neben den eingesetzten Antibiotika als Hauptinhaltsstoff in der Gülle gefunden wurde (Grote et al.

2004). Zusätzlich zu der Frage, ob ein Transfer von Antibiotika aus dem Boden in die Nutzpflanzen und ein Transport innerhalb der Pflanzen erfolgt, werden auch erste Analysen zum weiteren Verbleib von Antibiotika in Nutzpflanzen durchgeführt, also Analysen zu sogenannten Metaboliten. Unter Metaboliten werden Umwandlungsprodukte von Antibiotika verstanden, wobei in dieser Arbeit nur die „pflanzlichen Metabolite“ betrachtet werden, d.h. diejenigen Umwandlungsprodukte, die im pflanzlichen Material vorhanden sind. Dabei wird der Bildungsort der Metaboliten z.B. (a) tierische Metabolite, die ggf. vom Tier ausgeschieden und mit der Gülle auf Felder gelangen könnten, oder (b) im Boden oder in der Rhizosphäre gebildete Metabolite, die als solche in die Pflanzen gelangen könnten, in dieser Arbeit soweit möglich mitbetrachtet.

Die Aufgabenstellungen dieser Arbeit lauten im Einzelnen:

1. Kontrollierte Anzucht und Entwicklung von Weizen, Feldsalat und Möhren in Hydrokultur. Dabei sollen die Pflanzen in der Nährlösung verschiedenen Konzentrationen an Antibiotika ausgesetzt werden.
2. Entwicklung einer LC-MS/MS-basierten Methode zum Nachweis von Antibiotika in den Nutzpflanzen.
3. Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika in den Pflanzen anhand der entwickelten Methode.
4. Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markierten Antibiotika unter vergleichbaren Hydrokulturbedingungen wie unter 1.
5. Identifizierung pflanzlicher Metabolite mit Hilfe der entwickelten LC-MS-Methode.

Um sowohl unbelastete Pflanzen als auch Pflanzen, die antibiotikahaltiger Nährlösung ausgesetzt sind, zur Verfügung zu haben, werden Pflanzen in Hydrokultur, mit und ohne Antibiotika-Zugabe in der Nährlösung angezogen. Als Nutzpflanzen werden Winterweizen, Feldsalat und Möhren gewählt. Sowohl zu Winterweizen als auch zu Feldsalat wird in der landwirtschaftlichen Praxis mit Gülle gedüngt. Möhren wurden gewählt, weil der zum Verzehr geeignete Bereich die Wurzel ist, und durch sie eine Aufnahme von Wasser und darin gelöste Substanzen stattfindet. Mit diesen Pflanzen wird die Entwicklung und Anwendung einer Methode zum Nachweis von Antibiotika in Nutzpflanzen auf Basis LC-MS durchgeführt.

Aufgabenstellung 4, also der Nachweis der Aufnahme von Antibiotika mit Hilfe radioaktiv markierter Stoffe, wurde gewählt, um die Ergebnisse der LC-MS-Methode zu verifizieren.

Des Weiteren lässt sich mit Hilfe von radioaktiv markierten Verbindungen die Lokalisation der Verbindungen innerhalb der Pflanze nachvollziehen.

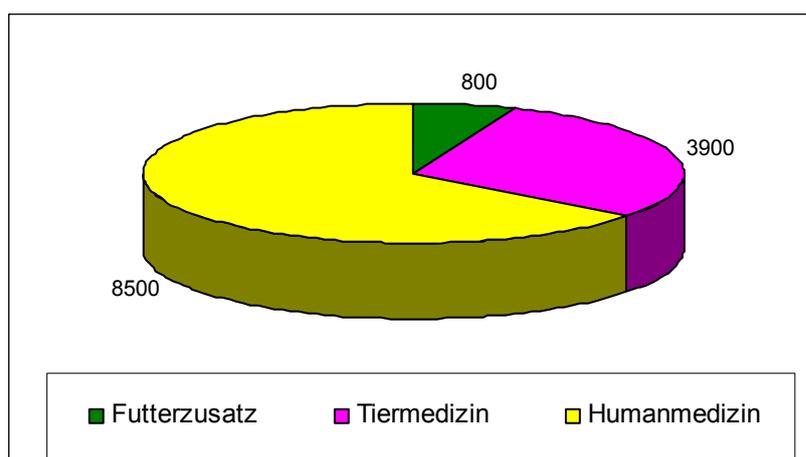
Aufgabenstellung 5 betrachtet Metabolite von den ausgewählten Antibiotika. Diese Aufgabenstellung ist relevant, weil die Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen wenig über den weiteren Verbleib und den Transport der Antibiotika innerhalb der Nutzpflanzen aussagt. Vielmehr ist anzunehmen, dass Abbauprozesse und Umwandlungsprozesse stattfinden. Doch welche Metabolite werden tatsächlich gebildet ?

Zum Einstieg in das Thema dieser Arbeit sind grundlegende Informationen über den Einsatz und die physiko-chemischen Eigenschaften von Antibiotika angebracht.

### 3 Antibiotika

#### 3.1 Verbrauchsmengen in der Human- und Veterinärmedizin

Der Verbrauch an Antibiotika wird in der EU und seinen Mitgliedsstaaten leider nicht grundsätzlich dokumentiert, so dass Verbrauchsdaten nicht umfänglich bekannt sind. Verbrauchsdaten werden in wenigen Ausnahmefällen von verschiedenen Stellen zur Verfügung gestellt (wie die FEDESA, oder der Bundesverband für Tiergesundheit e.V. BfT). Der Gesamtverbrauch von Antibiotika (Human- und Veterinärmedizin) lag demnach 1999 bei 13.200 t in der Europäischen Union (EU) einschließlich der Schweiz. Die Verteilung auf Human- und Veterinärmedizin ist in der Abb.1 dargestellt.



**Abb.1:** Antibiotika-Verbrauch in der EU einschließlich der Schweiz in Tonnen (1999, gesamt 13.200t), Quelle: European Federation of Animal Health Industry (FEDESA) 2001.

Die FEDESA wurde im Jahr 2003 in den Weltverband IFAH (International Federation for Animal Health) integriert. Laut IFAH betrug der Einsatz von Antinfektiva 15,8%, der

Antiparasitika 29% am weltweiten Tierarzneimittelverbrauch (IFAH 2005), der allerdings in Umsatzzahlen, also in US Dollar und nicht in Mengen angegeben ist. Mengenangaben werden von der IFAH nur spärlich veröffentlicht, noch im Jahr 2007 finden sich Zahlenangaben aus 1997.

**Tab. 1:** Abschätzung der Verkaufszahlen antimikrobieller Substanzen für Tiere in der EU 1997, nach Wirkstoffgruppen (Angabe in Tonnen, Annahme: 100% Wirkstoffreinheit) nach IFAH (2007)

Penicilline	322
Tetracycline	2294
Makrolide	424
Aminoglykoside	154
Fluorchinolone	43
Trimethoprim/Sulphate	75
Andere Therapeutika	182
Wachstumsbeschleuniger	1599
Summe	5093

**Tab. 2:** Abgeschätzter jährlicher Verbrauch antimikrobieller Substanzen von Menschen und Tieren in der EU 1997: Angaben in Tonnen, Annahme: 100% Wirkstoffreinheit (IFAH 2007)

In Menschen	- Allgemeinärzte und Krankenhäuser	5400	52%
In Tieren	- therapeutische Verabreichung	3494	33%
In Tieren	- Futtermittelzusätze*	1599	15%
	Summe	10493	100%

\*Kokzidiostatika (Ionophore und ähnliche) sind ausgeschlossen

Für die zum Einsatz kommenden verschiedenen Wirkstoffgruppen der verwendeten Antibiotika werden in der Literatur auch nur spärlich Angaben jüngerer Datums gefunden. Nach Thiele-Bruhn (2003) liegen die Verbrauchsmengen an Tetracyclinen und Sulfonamiden zwischen 20 und 50 Prozent des Gesamtverbrauchs, siehe Tabelle 3.

**Tab.3:** Antibiotika-Jahresverbrauch in der Veterinärmedizin in ausgewählten Ländern der EU (Thiele-Bruhn 2003)

	Dänemark, 1997		Frankreich, 1980		Großbritannien, 2000	
	t	%	t	%	t	%
Tetracycline	13	23	117	19	228	52
Sulfonamide	13	23	139	22	94	22
Aminoglykoside	7,7	14	57	9	12	3
β-Laktame	15	26	50	8	49	11
Makrolide	1,7	3	37	6	41	9
Andere	6,5	11	226	36	12	3
Gesamt	57		625		437	

Für das Jahr 2003 kommt eine Erhebung des BfT (2005) auf eine Gesamtverbrauchsmenge an Antiinfektiva in Deutschland in der Tiermedizin auf 668,8 t. Schätzungen von Schneiderei (2005), auf Grundlage des Veterinärpanel der Gesellschaft für Konsumforschung (GfK), Nürnberg, ergeben für Deutschland ähnliche Werte (Tab. 4).

**Tab. 4:** Antibiotikaeinsatz in Deutschland (Veterinärmedizin) in den Jahren 2003 und 2005, Angaben in t

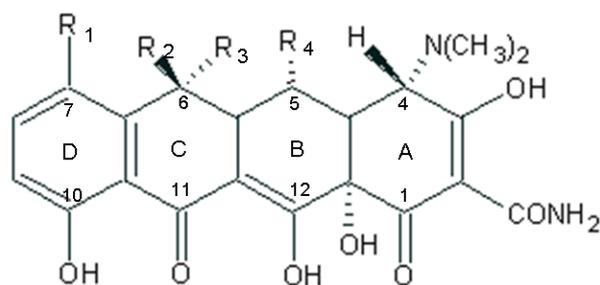
	2003	2005
Antibiotika gesamt	724,2	784,4
Aminoglykoside	27,3	36,3
Beta-Laktame	155,2	199,2
Chinolone	3,5	3,7
Lincosamide	7,5	12,1
Makrolide	38,6	52,6
Phenicole	4,7	4,8
Pleuromutiline	6,8	6,4
Polypeptide	23,4	21,8
Sulfonamide	71,7	97,5
Tetracycline	385,5	350,0

Anhand der Tabellen 3 und 4 kann ein hoher Gebrauch an Tetracyclinen und Sulfonamiden sowohl in Deutschland als auch in anderen Ländern der EU abgelesen werden. Nach einer Untersuchung von Winkler und Grafe (2001) hatten Tetracycline 52%

und Sulfonamide 19% Anteil an den eingesetzten Antibiotika-Wirkstoffgruppen. Das Forschungsprojekt „Antiinfektiva einträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“ (Grote 2005) und die vorliegende Arbeit konzentrieren sich deshalb auf Tetracycline und Sulfonamide, da diese einen Großteil der Antibiotika ausmachen, die in der Tiermedizin verwendet werden. Deshalb werden in den folgenden Unterkapiteln die Eigenschaften von Tetracyclinen und Sulfonamiden rekapituliert, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen relevant sind.

### 3.2 Tetracycline

Tetracycline sind Breitband-Antibiotika, die teilsynthetisch hergestellt werden. Sie wirken gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Chlamydien, Mykoplasmen und andere Keime (Adam & Thoma 1994). Tetracycline wirken bakteriostatisch und hemmen die ribosomale Proteinsynthese der Erreger (Onken 1979). Strukturell bildet das Grundgerüst der Tetracycline ein Naphthacenring-System, der bei verschiedenen Tetracyclinen unterschiedlich substituiert ist (Gräfe 1992) (siehe Abbildung 2). Als Wirkstoffe werden heutzutage Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin (CTC), Doxycyclin (DC) und Oxytetracyclin (OTC) angewendet. Das früher in der Human- und Veterinärmedizin auch verwendete Demeclocyclin (DMC) wurde aufgrund seiner toxischen und teratogenen Eigenschaften 1989 aus dem Handel genommen. Außer in einzelnen Spezialpräparaten, wie z.B. einem in der Zahnmedizin verwendeten Kombinationspräparat „Dentalpulver“, darf es nicht mehr angewendet werden. Demeclocyclin wurde durch Doxycyclin ersetzt (atd 2008).



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

**Abb.2:** Molekülstruktur ausgewählter Tetracycline

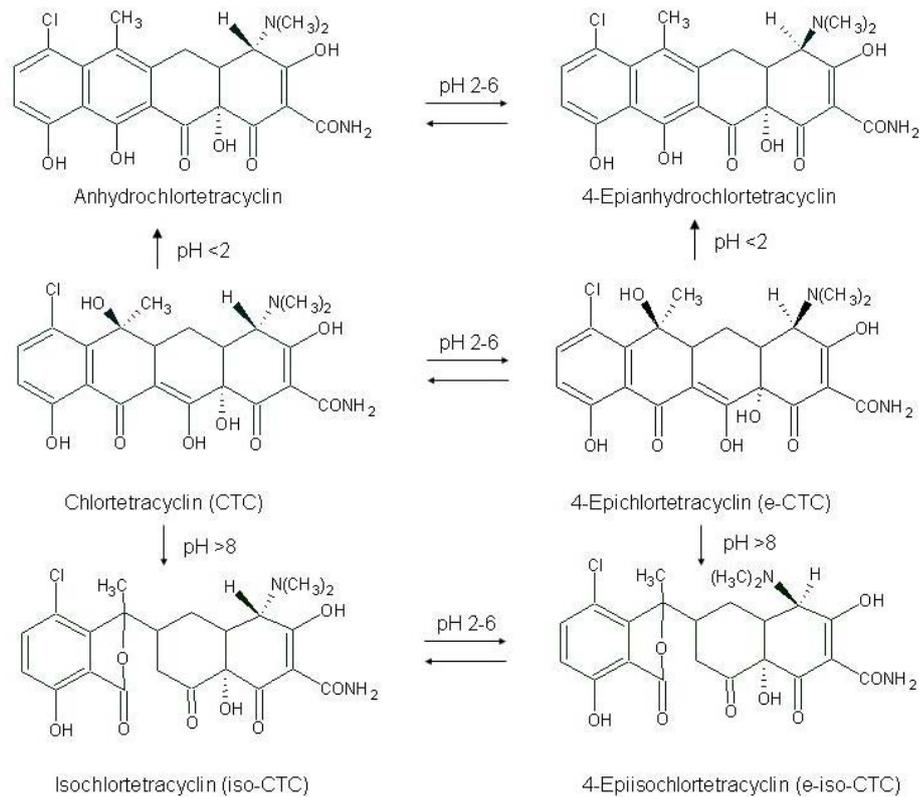
Aufgrund der verschiedenen funktionalen Gruppen im Molekül, liegt es in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich geladen vor. Tetracycline deprotonieren mit einem pKa-Wert von 3,3 an der OH-Gruppe des C3-Atoms. Eine weitere Deprotonierung kann an der phenolischen Diketon-Gruppe des C12-Atoms mit einem pKa-Wert von 7,7 stattfinden. Basische Eigenschaften beruhen auf der protonierbaren Dimethylamino-Gruppe des A-Ringes mit einem pKa-Wert von 9,6 (Claizzi & Klink 1969, Stephens et al. 1956). Im umweltrelevanten pH-Bereich von 4 bis 8 können TCs entweder als Kation (+ 0 0), als Zwitterionen-Spezies (+ - 0) oder als Anion (+ - -) vorkommen (Figuroa et al. 2004, Sassman & Lee 2005), wobei die Zwitterionen-Variante die wahrscheinlichste zu sein scheint. In Wasser sind Tetracycline schwer löslich, ihre Hydrochloride lösen sich jedoch besser (Thiele-Bruhn 2003).

Mit bi- und trivalenten Metallkationen bilden Tetracycline Chelatkomplexe. Außerdem binden sie an Silanolgruppen und Proteine ( Oka et al. 2000).

Tetracycline sind instabil in Abhängigkeit von Lichteinfluss, Temperatur, pH-Wert und Lösemittel. Sie epimerisieren, wobei sich die räumliche Anordnung der Dimethylamino-Gruppe am A-Ring ändert, und isomerisieren sehr leicht ( siehe Abb.3).

Im mäßig sauren Bereich von pH 2-6 epimerisiert CTC reversibel zu e-CTC. Ebenfalls epimerisiert iso-CTC, welches im alkalischen Milieu aus CTC gebildet wird, zu e-iso-CTC.

Unter stark saurem Einfluss spalten Tetracycline im B-Ring Wasser ab und es bilden sich die Anhydroverbindungen. Diese wirken nicht bakteriostatisch sondern bakterizid, im Gegensatz zu den Ausgangssubstanzen, aus denen sie sich durch Wasserabspaltung bildeten, sind sie deshalb wirksam gegen TC-resistente Bakterienstämme (Halling-Sørensen et al. 2002).



**Abb. 3:** Strukturen und Symbole einiger relevanter Umwandlungsprodukte des Chlortetracyclins

Die im Alkalischen irreversibel aus CTC und e-CTC gebildeten Iso-Verbindungen (iso-CTC und e-iso-CTC) zeigten in der Untersuchung von Halling-Sørensen et al. (2002) keine toxische Wirkung auf Bodenbakterien (vgl. dazu auch die Ausführungen in A. Vockel, 2005). Desweiteren wird unter alkalischen Bedingungen die Keto-Enol-Tautomerisation an der Position C11a und C12 begünstigt und es bildet sich aus CTC bzw. e-CTC das Keto-analoge keto-CTC bzw. e-keto-CTC (Naidong et al. 1990, Vockel, 2005).

Im umweltrelevanten pH-Bereich unter 6,5 wurden die in folgender Tabelle dargestellten Verbindungen gefunden.

**Tab.5:** Umwandlungs- und Abbauprodukte von CTC in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Halling-Sørensen et al. 2002, s. Abb.3)

Wirkstoff in wässriger Lösung	pH-Bereich	nachgewiesene Verbindungen
CTC	< 6,5	e-CTC e-Anhydro-CTC keto-CTC
	> 6,5	iso-CTC keto-CTC

Die Tabelle 5 zeigt, dass allein die pH-Wert Änderung einer CTC-haltigen Lösung bewirkt, dass verschiedene Umwandlungsprodukte entstehen können.

### 3.3 Sulfonamide

Sulfonamide wirken bakteriostatisch gegen die meisten grampositiven und viele gram-negative Organismen, wobei sie den Folsäurezyklus blockieren (Gräfe 1992). Oft werden sie mit Trimethoprim verabreicht, welches ebenfalls den Folsäurezyklus des Bakteriums hemmt. Die allgemeine Struktur der Sulfonamide und der hauptsächlich auftretenden N4-Metabolite bei der Passage durch den Organismus sind in der Abbildung 4 dargestellt.



N4-Acetyl-sulfonamid

Sulfonamid	R=Rest	pKa-Werte*	Log P*
Sulfadiazin		6,5 / 1,57	-0,32 +/- 0,64
Sulfamethazin		7,4 / 1,95	0,8, +/- 0,26

**Abb.4:** Allgemeine Strukturen, pKa- und log P-Werte von Sulfonamiden (links) und dem N4-acetylierten Metaboliten (rechts), logP Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser (vgl.5.2), \*:kalkuliert über ACD/I-Lab service

Sulfonamide sind in der Regel schlecht wasserlöslich, ihre Natriumsalze lösen sich dagegen gut. Aufgrund der pKa-Werte für die Aminogruppen sind die meisten Sulfonamide im sauren Bereich positiv, im Bereich pH 2,5 bis 6 neutral und im alkalischen negativ geladen (Haller et al. 2002).

Der Weg dieser Antibiotika von der Aufnahme durch das Tier bis zum Feld und damit die Verteilung der Antibiotika in der Umwelt wird im nächsten Kapitel thematisiert.

### **3.4 Verteilung in der Umwelt**

Durch die Anwendung der Antibiotika in der Veterinärmedizin gelangen Antibiotika und ihre Metabolite in die Exkremate von Tieren und damit auch in den Wirtschaftsdünger, in Oberflächen- und Abwässer. Die Expositionslage und das Umweltverhalten ist ungeklärt und es besteht weiterer Forschungsbedarf (LUA 2007). In den letzten Jahren sind einige Veröffentlichungen zum Thema Antibiotika in der Umwelt erschienen (Grote et al. 2004, Kümmerer 2004, Boxall et al. 2004).

Dabei zeigten Grote et al. in dem mit dieser Arbeit verknüpften Modellversuch unter praxisnahen Bedingungen, dass bis zu 360 mg/kg Frischgewicht Sulfadiazin, 303,7 mg/kg N4-Acetyl-SFD und 87,5 mg/kg Chlortetracycline (Summe aller CTC-Rückstände) in gelagerter Gülle enthalten waren, wobei der Metabolit von SFD (N4-Acetyl-SFD) wieder in aktives SFD zurückgewandelt werden konnte. Auch Langhammer (1989) berichtet über eine Rückführung des Metabolites N4-Acetylsulfamethazin zur Ausgangssubstanz während der Güllelageung.

Analysen von Hamscher et al. (2000 & 2002) ergaben Konzentrationen von Chlortetracyclin und Tetracyclin in Gülleproben von 0,1 bis 4 mg/kg. In einer anderen Gülleuntersuchung wurden in ca. 50 % der Proben Tetracycline mit bis zu 46 mg/kg nachgewiesen. Für Sulfonamide ergaben sich Höchstwerte von 235 mg/kg (Engels 2004). In einem weiteren Untersuchungsprogramm für Gülle als Wirtschaftsdünger zeigte sich mindestens ein nachgewiesenes Antibiotikum in 70,5% der Gülle-Proben (Harms 2006).

Durch die landwirtschaftlich übliche Praxis, Gülle als Dünger zu verwenden, gelangen die Antibiotika auf die Felder und somit in den Boden. Die Belastung von Böden mit Antibiotika-Rückständen in unterschiedlichen Bodentiefen untersuchten Hamscher et al. (2002) und Grote et al. (2006). Obwohl unterschiedliche Methoden der Probenvorbereitung gewählt wurden, wurden in beiden Untersuchungen Chlortetracyclin-Rückstände (bis zu 240 µg/kg) nur in den oberen Bodenschichten bis zu 30 cm Tiefe gefunden, in den unteren Schichten jedoch nicht. Aus den Ergebnissen wird geschlossen,

dass Tetracycline stark an der Bodenmatrix haften und ein Transport über die flüssige Phase in tiefere Schichten sehr unwahrscheinlich ist (Grote et al. 2007c). Bei wiederholter Düngung mit antibiotikahaltiger Gülle tritt eine Konzentrationszunahme in den oberen Bodenschichten auf, wobei innerhalb von 3 Monaten die extrahierbaren Gehalte bis in den Bereich der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sanken (Grote et al. 2006).

Nach Berechnungen von Harms (2006) würden Tetracyclineinträge durch Düngung mit belasteter Gülle von 3 g/ha (im Bereich der Bestimmungsgrenze) bis zu 1,8 kg/ha (gefundene Höchstmenge an Antibiotika in Gülle) führen.

Für Sulfonamide ergab sich ein anderer Befund. Obwohl die ausgebrachte Gülle in dem Modellversuch (Grote et al. 2005) stärker mit Sulfonamid-Komponenten belastet war, fanden sich in den Bodenschichten bis 30 cm maximal 90 µg/kg SFD. Die Ergebnisse belegen die allgemeine Mobilitäts-Tendenz von Sulfonamiden, wonach sie mit dem Bodenwasser in Richtung Grundwassersohle ausgetragen werden.

In Oberflächen- und Grundwässern konnten Human-Pharmazeutika auch bereits nachgewiesen werden (Hirsch et al. 1999, Kümmerer 2001, Hamscher et al. 2002, Thiele-Bruhn 2003, Yang et al. 2005). Im Einlauf einer Kläranlage in den Vereinigten Staaten konnten Yang et al. (2005) 11 Antibiotika, darunter u.a. Tetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Sulfamethazin (SMZ), im Konzentrationsbereich von 0,05 – 1,09 µg/L bestimmen. Im Ablauf derselben Anlage wurden drei Substanzen nachgewiesen: Chlortetracyclin, Doxycylin und Sulfamethoxazol im Bereich von 0,06 bis 0,21 µg/L. Göbel et al. (2007) untersuchten den Abbau von Sulfonamiden, Makroliden und Trimethoprim in verschiedenen Abwasserkläranlagen in der Schweiz. Die angegebenen Substanzen wurden mit den bestehenden Abwasserbehandlungsmaßnahmen nur unvollständig abgebaut. Im Zulauf der Anlagen traten dabei hohe Konzentrationen von Sulfonamiden (60 – 1600 ng/L) auf.

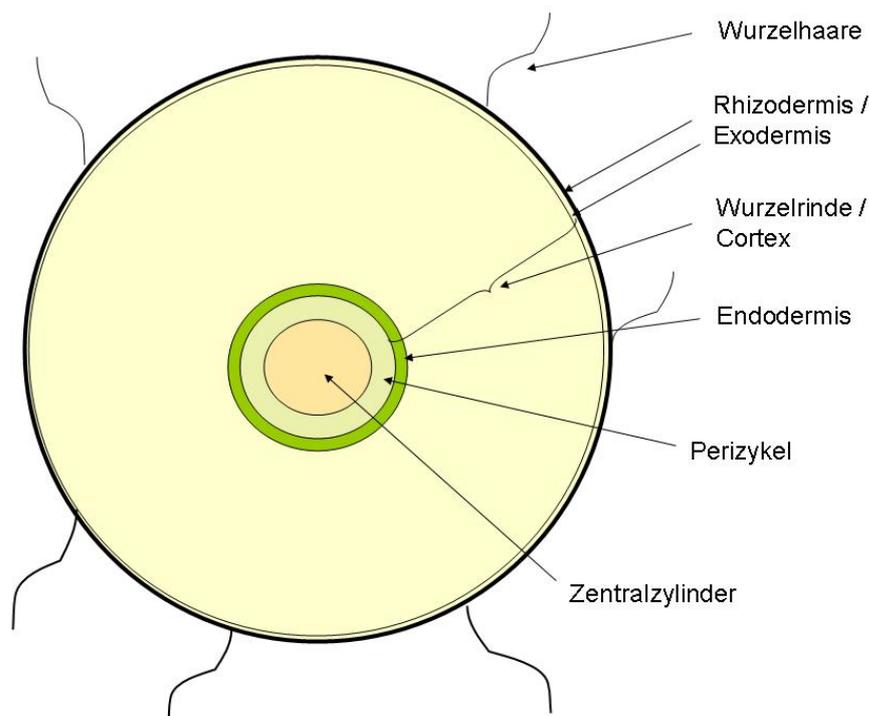
Mit dem Ausbringen von antibiotikahaltigem Wirtschaftsdünger gelangen die Antibiotika auf und in den Boden, so dass eine Aufnahme der Stoffe über die Wurzel prinzipiell möglich ist. Inwieweit Antibiotika in Pflanzen gelangen, ist bisher jedoch wenig untersucht worden (Jjemba 2002). Auf diese Frage konzentriert sich die vorliegende Arbeit. Der nächste Abschnitt führt grundsätzlich in die Nährstoff- und Wasseraufnahme von Pflanzen über die Wurzel ein. Denn als Basis für eine Analyse der Aufnahme von Antibiotika und ihren Metaboliten in Nutzpflanzen ist ein Verständnis der pflanzenphysiologischen Grundlagen unerlässlich.

## 4 Pflanzenphysiologische Grundlagen über Aufnahme und Transport von Stoffen über die Wurzel

Die direkte Aufnahme einer Substanz über die Wurzel gelingt nur, wenn die Substanz im Kontakt mit der Wurzel ist, sei es durch Bodenlösung oder durch umgebendes Wasser (Abwassertechnik oder Hydrokultur). Dabei spielt die Beschaffenheit der Wurzel ebenfalls eine wichtige Rolle, weshalb nachfolgend auf die Physiologie der Wurzel eingegangen wird (Trapp et al. 2001a).

### 4.1 Aufbau einer Wurzel

Wurzeln geben Pflanzen Halt und sind für die Aufnahme von Nährstoffen und Wasser verantwortlich. Man unterscheidet Tiefwurzler und Flachwurzler. Tiefwurzler bilden eine Pfahlwurzel, die u.U. bis zum Grundwasser reicht und von hier die Wasserversorgung gewährleistet. Flachwurzler bilden ein Wurzelgeflecht gleichartiger Wurzeln, welches sich horizontal ausbreitet, und hauptsächlich auf die Aufnahme versickerndes Oberflächenwassers angepasst ist. Neben den Grobwurzeln, die als Transport- und Ankerorgan der Pflanze dienen, bilden sich Feinwurzeln, welche die Nährstoffe und Wasser aufnehmen. Den prinzipiellen Aufbau einer Wurzel zeigt schematisch die Abbildung 5.



**Abb.5:** Schematischer Querschnitt durch eine Wurzel (nach Eschrich 1995)

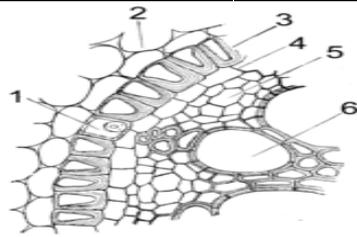
Die äußerste Schicht der Wurzeln bildet die Rhizodermis. Die Rhizodermiszellen besitzen sehr dünne Zellwände, denen eine Kutikula „lateinisch »Häutchen« fehlt, die von Epithelzellen nach außen abgeschiedene Schicht aus einer strukturlosen erhärtenden Substanz (Cutin); bedeckt die Oberfläche vieler... Pflanzen als wirksamer mechanischer Schutz und Verdunstungsschutz“ (Meyers 2007). Aus der Rhizodermis können sich einzelne Zellen in den Boden ausstülpen, bilden somit die Wurzelhaare und erhöhen dadurch die Wurzeloberfläche. Durch sie erfolgt zu einem hohen Anteil die Nährstoff- und Wasseraufnahme (Eschrich 1995).

Weiter zum inneren Teil der Wurzel schließt sich das Rindenparenchym, auch Cortex genannt, an. Durch diese Zellen läuft der Wasser- und Nährstofftransport und in ihnen werden Assimilate gespeichert. Die innerste Rindenschicht, die Endodermis, umschließt den Zentralzylinder und hat durch Einlagerung von Suberin, einem wachsartigen Stoff, imprägnierte Zellwände. Die Einlagerungszone ist wasserundurchlässig und wird Kasparischer Streifen genannt.

Es schließt sich der Zentralzylinder an, in dem die Festigungs- und Leitelemente (Xylem und Phloem) der Wurzel verlaufen. Die äußerste Schicht des Zentralzylinders besteht aus den lange teilungsfähigen Perizykel-Zellen. Aus ihnen werden die Seitenwurzeln gebildet. In der Tabelle 6 sind die einzelnen Wurzelgewebe, ihre Funktionen sowie einzelne Begriffe und ihre Definitionen zusammengestellt.

**Tab.6:** Wurzelgewebearten , Funktionen und Definitionen

Wurzelgewebe	Funktion und Definition
--------------	-------------------------



(Straßburger 1998)

Plasmodesmata (1) / Durchlasszellen	durchlässige Zellen in der Zellmembran, Interzellulärer Transport kann hierüber stattfinden
Cortex/Wurzelparenchym (2)	Füllgewebe der Wurzel, dient zur Speicherung (z.B. Stärke)
Endodermis (3)	innerste Schicht der Wurzelrinde, mit Durchlasszellen (1)
Kasparischer Streifen	wachsartige Ablagerung in den Radialwänden der Endodermiszellen, ermöglicht der Zelle die kontrollierte Wasser und Salzaufnahme
Perizykel (4)	äußerste Schicht des Zentralzylinders, bildet Seitenwurzeln
Phloem / Siebteil (5)	Transport von Assimilaten von den Blättern zur Wurzel
Xylem / Holzteil (6)	Weiterleitung von Nährstoffen und Wasser, von den Wurzeln zum Spross
Rhizodermis mit Wurzelhaaren	äußere Abschlusschicht
Wurzelhaare	nehmen Wasser und Salze auf
Zentralzylinder mit Xylem und Phloem	enthält zentrales Leitbündel zur Nährstoffweiterleitung

**Auftretende Begriffe der Zellebene**

Cytosol	flüssige Bestandteile des Zellplasmas
Plasmalemma	Gesamtheit aller die Zelle nach außen abgrenzenden Membranen, enthält Plasmodesmata
Apoplast	umfasst alle Zellwände und die Zellzwischenräume
Symplast	umfasst ab der Zellmembran alle Kompartimente innerhalb der Zellen
Tonoplast	Gesamtheit aller Membranen, die das Cytosol von der Vakuole trennt

#### 4.1.1 Xylem

Das Xylem besteht aus toten, d.h. abgestorbenen, langgestreckten Zellen, die durchgehende Röhren bilden und den Ferntransport des Wassers sicherstellen. Sie enthalten kein Cytosol mehr. Die Transpiration in den Blättern sorgt für einen osmotisch bedingten Unterdruck in den Xylemgefäßen, so dass ein Sog entsteht. Einmal in die Xylem-Zellen eingedringendes Wasser ist einem geringen Transportwiderstand ausgesetzt. Mit dem sogenannten Transpirationsstrom werden das aufgenommene Wasser und die Nährstoffe von den Wurzeln zu den Blättern transportiert.

Zur Stabilisierung sind in die Zellwände der leitenden Xylemzellen (Tracheen und Tracheiden) holzige Vernetzungen (Lignin) eingebaut. Die Zellen sind untereinander durch „Tüpfeln“ (Poren) verbunden. Dadurch kann das Wasser nicht nur vertikal sondern auch horizontal verteilt werden.

#### 4.1.2 Phloem

Das Phloem besteht bei den untersuchten Pflanzen aus Siebröhren, Geleitzellen, Fasern und Parenchym-Zellen. Die ersteren beiden bilden die Leitbahnen für den Transport der Assimilate und sind im Unterschied zu den Xylem-Zellen lebend, besitzen aber keinen Zellkern und auch keine Vakuole. Die Zellen sind senkrecht untereinander durch viele Siebporen verbunden; durch sie strömt und verteilt sich der Zellsaft. Siebröhren sind mit semipermeablem Plasmalemma umgeben und funktionieren dadurch als osmotische Systeme, was für die Aufnahme und Abgabe von Assimilaten aber auch für die Verteilung von pflanzlich fremden Stoffen, den Xenobiotika, entscheidend ist.

**Xenobiotika** sind Stoffe, die dem betreffenden Organismus fremd sind. Antibiotika sind für Pflanzen Xenobiotika. Nach Trapp (2001) können die Xenobiotika über drei verschiedene Wege in die Pflanze gelangen:

1. Sie werden im Transpirationsstrom gelöst in die Pflanze aufgenommen und über das Xylem verteilt,
2. sie gelangen nach Ausgasen aus dem Boden gasförmig in bodennahe Blätter, oder
3. sie werden partikelgebunden durch Ablagerung von resuspendierenden Bodenpartikeln in die Pflanze, hauptsächlich über die Blätter, aufgenommen.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Aufnahme von gelösten Antibiotika durch die Wurzeln über den Transpirationsstrom, weshalb nachfolgend einige Überlegungen zum Stofftransport durch pflanzliche Zellen beschrieben werden.

## 5 Stofftransport durch pflanzliche Zellen

### 5.1 Grundlagen des Stofftransports

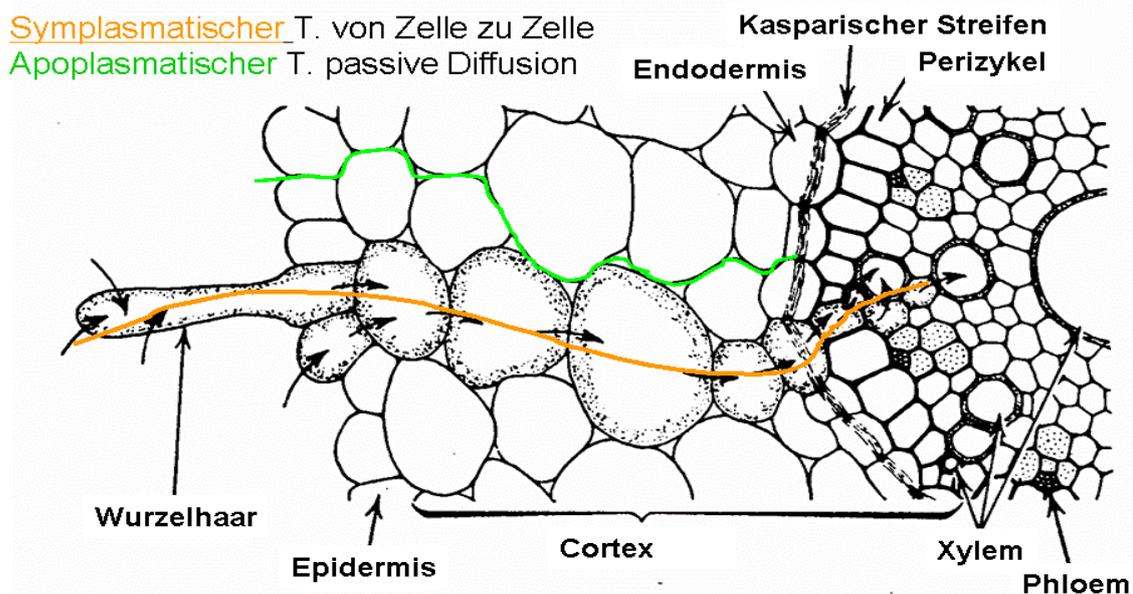
Grundsätzlich können Wasser, Salze und Xenobiotika in der Wurzel über zwei verschiedene Wege zur Endodermis gelangen, apoplastisch oder symplasmatisch (McFarlane 1995):

- a) **Apoplastisch** durch die Zellwände im Rindenparenchym (vgl. Abb. 6):

Die Zellwände des Rindenparenchyms sind auch für größere Moleküle permeabel. In diesen Zellwänden und auch Zwischenräumen können sich Wasser, Salze und Xenobiotika mit der aufgenommenen Bodenlösung verteilen. Sie gelangen durch Diffusion bis zur Endodermis.

- b) **Symplasmatisch** von Zelle zu Zelle (vgl. Abb.6):

Die Zellmembran besitzt hydrophile und hydrophobe Bereiche, wodurch sowohl Wasser als auch lipophilere Substanzen permeieren können (Lüttge 1988). Für Ionen sind spezielle Transportprozesse (Carrier) nötig, da die Salzkonzentrationen in den Wurzelzellen höher sein können als in der umgebenden Bodenlösung. Von den Zellen wird ein Protonengradient aufgebaut und die einzelnen Ionen gelangen über spezifische Transportproteine im Plasmalemma in die Zellen. Nach der Aufnahme der Stoffe in die Zelle erfolgt der Transport von Nährstoffen und Wasser von Zelle zu Zelle durch Tüpfel, symplastische Verbindungen zwischen den Zellen.



**Abb.6:** Apo- und symplastischer Transport in einer Wurzel vom Wurzelhaar bis in das Xylem (verändert nach Mc Farlane 1995)

Durch die mit dem Kasparischen Streifen ausgestattete Endodermis erfolgt der weitere Transport sowohl von Wasser als auch von Ionen und geladenen oder neutralen Xenobiotika in den Zentralzylinder symplastisch.

Gelöste Stoffe gelangen je nach Ladung und Struktur durch Diffusion oder über Carrier bis ins Xylem und werden mit dem Transpirationsstrom in höhere Teile der Pflanze transportiert. Der Transport innerhalb der Pflanze ist gerichtet von der Aufnahme bzw. dem Bildungsort hin zu Verbrauchs- bzw. Einlagerungsorten („from source to sink“).

## 5.2 Stofftransport in Abhängigkeit von physiko-chemischen Eigenschaften

Mit Ausnahme von einigen Pflanzenhormon-ähnlichen Stoffen ist die Aufnahme und der Transport von Xenobiotika nach Trapp (1995) ein passiver Prozess, der einzig durch Diffusion und Löslichkeiten der Stoffe in Membranen und im Wasser erfolgt, wobei die physiko-chemischen Eigenschaften der Stoffe verantwortlich sein sollen.

Sehr polare Stoffe können die Zellmembranen nicht passieren wo hingegen sehr lipophile Substanzen nicht bioverfügbar sind, da sie an der Biomasse im Boden sorbieren. In Hydrokulturen spielt der Einfluss von Bodensorptionen keine Rolle, so dass auch lipophilere Substanzen permeieren können. Eine Aufnahme in Pflanzen sollte für Substanzen mit mittlerer Lipophilizität am besten sein (Trapp 2000). Ein Maß für die Lipophilizität einer Substanz S ist der Verteilungskoeffizient der Substanz  $K_{ow}(S)$  zwischen Oktanol und Wasser:

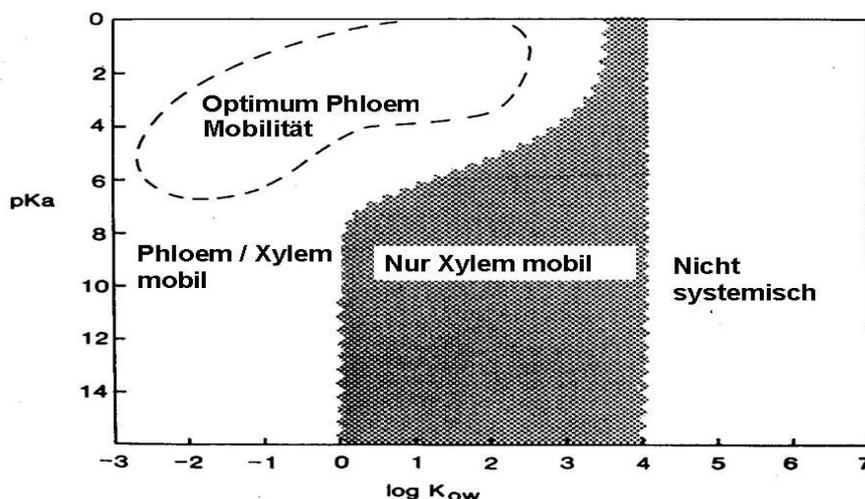
$$K_{ow}(S) = \frac{\text{Konz.}(S) \text{ in Oktanol}}{\text{Konz.}(S) \text{ in Wasser}}$$

Der Verteilungskoeffizient wird aus dem Quotienten der Gleichgewichtskonzentrationen der Substanz S in Oktanol und in Wasser gebildet. Der  $K_{ow}$  –Wert oder sein dekadischer Logarithmus-Wert  $\log K_{ow}$  wird häufig herangezogen, wenn es um die Verteilung von Substanzen in Umwelt-Kompartimenten geht (Sicbaldi 1993, Hawker 1989).

Oktanol besitzt eine polare Kopfgruppe und eine hydrophobe Kette. Diese strukturellen Eigenschaften spiegeln die Eigenschaften von organischer Materie in Boden, in Sediment oder in der Lipidphase (Membranen) lebender Organismen besonders gut wider. Je höher der  $K_{ow}$  ist, desto besser löst sich die Substanz in Oktanol und desto stärker wird sich die

Substanz im lipophilen Gewebe der Pflanze anreichern. Desto weniger ist sie allerdings wasserlöslich, und ihre Konzentration im Transpirationsstrom der Pflanze wird klein sein. Eine Abschätzung der Verteilung von unbekanntem Substanzen allein auf Grund von dem Verteilungskoeffizienten  $K_{ow}$  vorzunehmen, kann nach Goss (2003) zu erheblichen Fehlern führen. Der Ansatz von Goss berücksichtigt zusätzlich auch van-der-Waals- und Wasserstoff-Brücken-Bindungen. Um in einer ersten Näherung Abschätzungen über die Aufnahme von Antibiotika zu erhalten und damit auch den Versuchsaufbau entsprechend steuern zu können, wird in der vorliegenden Arbeit der Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol und Wasser für die verwendeten Antibiotika herangezogen. Die von Goss beobachtete Fehleranfälligkeit dieser Näherung spielte im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit keine entscheidende Rolle, da im Anschluss an theoretische Überlegungen zum Verteilungskoeffizienten empirische Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika stattfanden.

Schnoor et al. (1995) berichten von der effektiven Pflanzenaufnahme von Stoffen mit einem  $\log K_{ow}$  Wert zwischen 0,5 und 3. Substanzen mit  $\log K_{ow} > 3$  sind zu fest an die Wurzeloberfläche gebunden und können nur schwer aufgenommen werden. Während Substanzen mit einem  $\log K_{ow}$  kleiner als 0,5 zu wasserlöslich und nur über Carriersysteme durch die Wurzelmembran transportabel sind. Andere berichten von einer Pflanzenaufnahme über die Wurzel von Substanzen mit  $\log K_{ow} < 4$  (Harvey et al. 2002).



**Abb.7:** Mobilität von nicht ionischen Verbindungen und schwachen Säuren innerhalb der Pflanzen in Abhängigkeit ihrer physiko-chemischen Eigenschaften (nach Bromilow und Chamberlain 1995)

Eine funktionale Beziehung besteht zwischen dem  $\log K_{ow}$  und der Pflanzenaufnahme von Herbiziden, die eine Gauss'sche Normalverteilungskurve mit einem Maximum bei  $\log K_{ow} = 1,8$  besitzt (Briggs 1983). Bromilow und Chamberlain, 1989 haben die Abhängigkeit der

Mobilität von nicht ionischen Verbindungen und schwachen Säuren innerhalb der Pflanze veranschaulicht (Abb. 7).

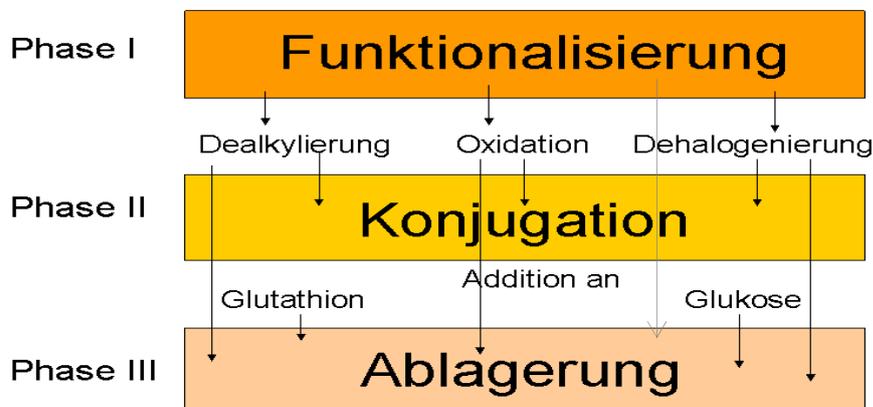
Demnach ist die Mobilität einer Substanz abhängig von ihrem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und ihrer Säuredissoziationskonstanten. Liegt die Substanz wenig dissoziiert vor (hohe pKa-Werte), so sollte sie bis zu einem Verteilungskoeffizienten von null sowohl im Xylem als auch im Phloem mobil sein. Für höhere  $\log K_{ow}$  Werte (bis 4) wird eine ausschließliche Xylemmobilität beschrieben.

Verschiedene mathematische Modelle wurden entwickelt, um die Pflanzenverfügbarkeit von Xenobiotika in Pflanzen abzuschätzen (Ryan et al. 1988, Trapp 1992, Schramm et al. 1990). Sie beruhen alle auf physiko-chemischen Eigenschaften der Substanzen und können nur Näherungen bieten, weil andere Faktoren wie z.B. die Metabolitenbildung, Ablagerung der Substanzen im Gewebe und die Evaporation der Substanz (bei leicht verdampfbaren Substanzen) aus den Blättern nicht berücksichtigt werden. Neben Mechanismen zum Stofftransport muss auch der Metabolismus von Pflanzen betrachtet werden, wenn die Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen geklärt werden soll. Der Metabolismus von Pflanzen wird, so weit im Rahmen dieser Arbeit relevant, im folgenden Kapitel 6 dargestellt.

## 6 Metabolismus in Pflanzen

Der Metabolismus in Pflanzen wurde intensiv untersucht, u.a. um die Aufnahme, Umwandlung und den Abbau von Pflanzenschutzmitteln sowie Bodenkontaminanten in Pflanzen zu untersuchen (Sens 1998). Einmal in die Pflanze aufgenommen, können Substanzen durch enzymatische Prozesse in den pflanzlichen Zellen metabolisiert werden.

Nach Coupland (1991) vollzieht sich der Abbau von Herbiziden in Pflanzen in drei Phasen. In Phase 1 können die Xenobiotika mit Hilfe von Enzymen in reaktivere Verbindungen umgewandelt werden (Funktionalisierungsreaktionen). So können durch Oxidation Hydroxyl-Gruppen im Molekül entstehen. Es können auch Dealkylierungen und Dehalogenierungen auftreten. In Phase 2 können die reaktiven Stellen im Molekül mit Glutathion, Glukose oder Aminosäuren umgesetzt (Konjugationsreaktionen) und diese Verbindungen in Phase 3 in die Vakuolen transportiert werden. Des Weiteren können die Herbizide oder deren Metabolite aus Phase 1 oder 2 als nicht extrahierbare Rückstände (z.B. in Zellwände) eingebunden werden (vgl. Abb.8).



**Abb.8:** Schematische Darstellung des Metabolismus von Herbiziden in Pflanzen (nach Coupland 1991)

Einige Pflanzen nehmen zum Beispiel Herbizide auf und werden geschädigt, während andere Pflanzenarten nicht geschädigt werden. Ein Grund für die unterschiedlichen Auswirkungen der Herbizide auf verschiedene Pflanzen ist die Metabolisierung der Herbizide in den Pflanzen. Während zum Beispiel Atrazin (6-Chlor-N<sup>2</sup>-ethyl-N<sup>4</sup>-isopropyl-1,2,3-triazin-2,4-diamin) in Maispflanzen über verschiedene Reaktionen in eine nicht

phytotoxische Verbindung metabolisiert wird, und deshalb die Maispflanze nicht schädigt, führt Atrazin in Graspflanzen zu starken Schädigungen, so dass diese in einem mit Atrazin behandeltem Maisfeld absterben (Coleman et al. 2002).

Glägen et al. (1999) untersuchten den Metabolismus des Herbizids Isoproturon in Weizen- und Soyabohnenzellen. Als Metabolite traten hier hauptsächlich demethylierte Produkte auf.

Der Metabolismus des selektiven Kontaktpestizids Propanil (3,4-Dichlorpropionsäureanilid) in der Wasserpflanze *Lemna minor* wurde von Mitsou et al. (2006) aufgeklärt. Dabei traten als Metabolite durch Demethylierung und Decarboxylierung das 3,4-Dichloracetanilid und 3,4-Dichloranilin auf.

Harms und Bockern (1994) untersuchten die Aufnahme, den Metabolismus und das Rückstandsverhalten organischer Xenobiotika in Pflanzen. In den Untersuchungen wurden alle eingesetzten Chemikalien, auch unpolare, durch pflanzliche Systeme aufgenommen. Als überwiegende Metabolite wurden polare Konjugate oder oxidierte Derivate gebildet, die zum Teil toxischere Eigenschaften aufwiesen als die Ausgangssubstanz. Ein Teil der Verbindungen und der gebildeten Metabolite wurde in Abhängigkeit von der Pflanzenart in Zellwandkomponenten eingebaut.

Werden Antibiotika in Pflanzen aufgenommen, so ist eine Umsetzung in den Pflanzen prinzipiell möglich (vgl. Kap.7). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Pflanzen auf potentielle Metabolite analysiert. Die dargestellten Abbauprozesse von Herbiziden in Pflanzen dienen dabei zur Hypothesenbildung (in Bezug auf potentielle Antibiotika-Metaboliten). Diese Hypothesen wurden dann einer empirischen Prüfung unterzogen. Vorerst ist jedoch der aktuelle Stand der Forschung in Bezug auf die zum Einsatz kommenden Antibiotika in Pflanzen zu rekapitulieren.

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

Bisher gibt es nur relativ wenige Arbeiten zur Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen. Die vorliegenden Ergebnisse ergeben aber kein einheitliches Bild. Forni et al. (2002) untersuchten in einer Pflanzenkläranlage die Zusammensetzung von antibiotikahaltigem Abwasser vor und nach dem Durchgang der Anlage. Dabei zeigte sich, dass aus den Abwässern Sulfonamide eliminiert wurden. Es wurde aber keine direkte Aufnahme von Sulfonamiden über die Wurzel in Pflanzen nachgewiesen, da das Pflanzenmaterial nicht analysiert wurde. Anders war es bei den Untersuchungen von Migliore et al. (1995). Sie untersuchten den Effekt von Sulfadimethoxin auf drei verschiedene Pflanzen. Das Wachstum aller untersuchten Pflanzen in Agar wurde unter dem Einfluss von Sulfadimethoxin mit unterschiedlichen Ausprägungen vermindert. Die Pflanzen bioakkumulierten an einem Tag von 1,46 µg/g in Blättern von Mais (*Zea mays*) bis 254 µg/g in Wurzeln von Rispen-Hirse (*Panicum miliaceum*). Diese Befunde könnten eine Belastung pflanzlicher Nahrung mit Sulfadimethoxin erwarten lassen, wenn mit Sulfadimethoxin kontaminierte Dünger auf Felder ausgebracht werden, so die Autoren. Migliore et al. (1998) untersuchten weiterhin den Effekt von Sulfadimethoxin auf Gerste und Mais nicht nur in Agar sondern auch beim Wuchs auf kontaminierten Böden. Sie stellten einen verminderten Wuchs und eine Sulfadimethoxin-Aufnahme in Wurzeln und Blätter fest. Dabei war die aufgenommene Menge Sulfadimethoxin in Wurzeln immer höher als in Blättern. Migliore et al. (2003) konnten ferner zeigen, dass Enrofloxazin von verschiedenen Gemüsepflanzen (siehe Tab.7) bei hohen Konzentrationen im Substrat (5 mg/L) aufgenommen wird und sich der Pflanzenwuchs vermindert. Bei niedrigen Enrofloxazinkonzentrationen (50 oder 100 µg/L) war der Wuchs teilweise leicht erhöht (Hormesis) und es wurden Enrofloxazin-Gehalte von 0,03 bis 0,4 µg/g in Pflanzenteilen ermittelt. Gujarathi et al. (2005) untersuchten das Phytoremediationspotential von den Wasserpflanzen Wassersalat (*Myrophyllum aquaticum*) und Papageiefeder (*Pistia stratiotes*) in Bezug auf Tetracyclin und Oxytetracyclin. Sie stellten eine nahezu komplette Metabolisierung der beiden Antibiotika nach ca. 6 Tagen unter dem Einfluss der Pflanzen bzw. ihren Exudaten fest. Bei dieser Untersuchung wurden allerdings die Epi- und Isomerisierungstendenzen der Tetracycline nicht berücksichtigt und ausserdem nicht die Pflanzen selbst, sondern das Wasser in der Kläranlage analysiert. Diese und andere

Untersuchungen der Effekte von Pharmazeutika auf Pflanzen sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tab. 7:** Effekte von Pharmazeutika auf Pflanzen (Literaturübersicht)

Substanz	Pflanze	Medium/ Konzentration	Effekt / Gehalte in der Pflanze	Literaturstelle
Chlortetracyclin/ Oxytetracyclin	Weizen / Rettich/ Mais Gartenbohne	Hydrokultur/ Boden	Wuchs gesteigert, nicht beeinflusst oder vermindert	Batchelder 1981, 1982
Sulfadimethoxin	Mais , Hirse, Erbse, Gerste	Agar/ 300mg/L	Wuchs vermindert / Aufnahme < 254 µg/g	Migliore et. al. 1995, 1998
Enrofloxazin	Gurke, Rettich Gartensalat, Gartenbohne,	Agar / 50, 100, 5000 µg/L	Wuchs gesteigert oder vermindert Aufnahme < 8,1µg/g	Migliore et.al. 2003
Enrofloxazin	Salat	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 2,8 µg/kg	Boxall et al. 2006
Chlortetracyclin	Mais, Zwiebel, Kohl	Boden / 1µg pro Topf	Aufnahme von 10 bis 14,4 ng/g	Kumar et al. 2005
Tylosin	Mais, Zwiebel, Kohl	Boden / 1µg pro Topf	Keine Aufnahme	Kumar et al. 2005
Florfenicol	Salat Möhre	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 15 bzw. 5 µg/kg	Boxall et al. 2006
Trimethoprim	Salat Möhre	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 6 bzw. 5,3 µg/kg	Boxall et al. 2006
Levamisol	Salat	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 170 µg/kg	Boxall et al. 2006
Diazinon	Möhre	Boden/ 1mg/kg	Aufnahme von 13 µg/kg	Boxall et al. 2006
Oxytetracyclin	Luzerne	Hydrokultur / < 0,33 mM/L	Wuchs vermindert / Aufn. 0,35 µmol/g	Kong et al. 2007
Chlortetracyclin	Mais, Bohnen	Boden	Wuchs n. beeinflusst od. verkrüppelt	Farkas et al. 2007
Sulfamethazin	Mais, Salat, Kartoffel	Boden	Aufnahme von 0,1 bis 1,2 mg/kg TM	Dolliver et al. 2007

Die im Jahr 2006 von Boxall veröffentlichte Studie über die Aufnahme von Veterinärpharmazeutika durch Pflanzen zeigt, dass einige der eingesetzten Pharmazeutika in Salatblätter (Lettuce leaves) aufgenommen werden, während andere Stoffe, darunter Oxytetracyclin (OTC) und Sulfadiazin, in pflanzlichen Proben nicht nachweisbar waren (Boxall et al. 2006). In Karotten waren einige andere Substanzen detektierbar als im Salat, jedoch kein OTC und SFD.

Es bleibt festzustellen, dass sich die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen stark unterscheiden und kein einheitliches Bild ergeben. Teilweise ist der Wuchs unter dem Einfluss von Tetracyclinen vermindert, teilweise aber auch erhöht. In manchen Versuchen werden Tetracycline und Sulfonamide in Pflanzenproben nachgewiesen, in anderen sind sie nicht in Pflanzen nachweisbar. Insbesondere in Bezug auf die in der Veterinärmedizin am meisten eingesetzten Antibiotika, die Tetracycline, sind die Ergebnisse nicht einheitlich: So kann Boxall keinen Nachweis in Pflanzen erbringen, während Kumar genau das Gegenteil feststellt (Boxall et al. 2006, Kumar et al. 2007). Diese divergierenden Ergebnisse sind sicherlich auch auf teils sehr unterschiedliche Versuchsbedingungen (z.B. Wachstumsphasen von einigen Tagen oder einigen Wochen) und die Art der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials zurück zu führen. Um so wichtiger ist es, gerade in Bezug auf Tetracycline ein besseres Verständnis ihrer Aufnahme in Pflanzen zu erzielen und Parameter zu bestimmen, von denen die Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen abhängt. Neben Tetracyclinen wurden in dieser Arbeit auch Sulfonamide eingesetzt, da auch diese in erheblichem Umfang in der Veterinärmedizin eingesetzt werden und in Gülle nachgewiesen wurden.

## 8 Material und Methoden

### 8.1 Aufnahmeexperimente

Um die Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen analysieren zu können, mussten zuerst geeignete Pflanzen herangezogen werden. Ausgewählt wurden dazu Feldsalat, Weizen und Möhren. Diese Pflanzen entstammen unterschiedlichen Nutzpflanzenarten und decken damit stellvertretend einen großen Teil unserer landwirtschaftlichen Nutzpflanzen ab, zu denen Gülle gedüngt wird. Außerdem wurden Feldsalat und Weizen in dem mit dieser Arbeit verknüpften Feldversuch angepflanzt (Grote 2005). Möhren wurden gewählt, weil sie eine zum Verzehr geeignete Pfahlwurzel bilden, im Gegensatz zu Weizen und Feldsalat, die Flachwurzler sind.

Die Aufnahmeexperimente in AB-dotierter Nährlösung wurden mit diesen Pflanzen in Hydrokulturen durchgeführt. Die Pflanzen wuchsen dabei direkt in der Nährlösung und kamen nicht, oder nur während des Keimens, mit Boden in Kontakt, um Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix auszuschließen. Mit Möhren wurden darüber hinaus auch Kontrollversuche in Töpfen mit Erde vorgenommen. Diese Möhren wurden dabei mit antibiotikahaltiger Nährlösung gegossen.

Bei den Hydrokulturen wurden der Nährlösung verschiedene Antibiotika (Chlortetracyclin kombiniert mit iso-Chlortetracyclin, Sulfadiazin, (7)-<sup>3</sup>H-Tetracyclin [<sup>3</sup>H-TC] oder (3,5)-<sup>3</sup>H-Sulfamethazin [<sup>3</sup>H-SM]) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Es gab zwei unterschiedliche Aufnahmeexperimente:

1. Den Nährlösungen wurden **unmarkierte Antibiotika** (CTC / iso-CTC / SFD) zugesetzt; diese Versuche fanden am Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, BfEL, heute Max Rubner-Institut (MRI), in Detmold statt.
2. Es wurden **radioaktiv-markierte Antibiotika** verwendet. Tritium-markiertes Tetracyclin (<sup>3</sup>H-TC) oder Sulfamethazin (<sup>3</sup>H-SM) wurden in Kombination mit den **nicht markierten Verbindungen** CTC und SFD derselben Wirkstoffklasse zur Nährlösung gegeben. Diese Versuche fanden am Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien (UFT) der Universität Bremen statt.

Die Entwicklung der Pflanzen wurde visuell und auch anhand der Biomassen verfolgt. In beiden Aufnahmeexperimenten wurden nach ein-, zwei- oder dreiwöchigem Wachstum der Pflanzen auf antibiotikahaltiger Nährlösung die Pflanzenproben genommen und mit unterschiedlichen Methoden analysiert. Für die Aufnahmeexperimente mit den radioaktiv-

markierten Verbindungen wurden Szintillationsmessungen und automikroradiographische Untersuchungen an ausgesuchten Pflanzenkomponenten durchgeführt.

Für die Analyse der Pflanzenproben auf unmarkierte Antibiotika musste eine Methode zum Nachweis von Antibiotika und potentiellen Metaboliten erst entwickelt werden. Mit einem LC-MS-System (ESI-Ion Trap an der Universität Paderborn) wurde dieses verwirklicht. Nachfolgend werden die einzelnen Methoden genauer beschrieben.

## **8.2 Anzucht der Pflanzen**

### **8.2.1 Vorbemerkung**

Die Entwicklung einer geeigneten Analysemethode zur Bestimmung von CTC und SFD in Pflanzenproben mit LC-MS/MS setzte das Vorhandensein von vergleichbaren Pflanzenproben voraus, die sowohl **ohne** als auch **mit** Antibiotika Dotierung unter sonst identischen Bedingungen gewachsen waren. Deshalb wurden in jeder Versuchsreihe auch Pflanzen angezogen, die keinen Antibiotika-Zusatz in der Nährlösung enthielten. Diese Kontrollproben wurden bei der Rückstandsanalytik, insbesondere bei den Versuchen zu Wiederfindungen (siehe Kap. 9.4.6) benötigt.

### **8.2.2 Vorbehandlung der Samen**

Um einen Pilzbefall der Pflanzen möglichst zu vermeiden, wurden die verwendeten Weizenkörner, Sorte Drifter, mit verschiedenen Desinfektionsmitteln behandelt. Getestet wurden Tween® 80-, Natriumhypochlorit- und Wasserstoffperoxid-Lösungen. Feldsalat und Möhren-Samen wurden handelsüblich erworben und nicht weiter vorbehandelt.

### **8.2.3 Keimung der Samen**

Die Keimung der Samen sollte so erfolgen, dass sich erstens die bildenden Wurzeln ohne Beschädigungen entwickeln können und zweitens die Wurzeln möglichst nicht verschimmeln. Unter Feuchtigkeitseinfluss, jedoch nicht zu nass, und ohne Lichteinfluss (Weizen ist ein „Dunkelkeimer“) wurden verschiedene Medien (Filterpapier, Watte, Erde) getestet.



Weizen-



Feldsalatkeimlinge

**Abb. 9:** Keimlinge von Weizen und Feldsalat

#### 8.2.4 Entwicklung der Pflanzen

Die Feldsalat- und Möhrenpflanzen wurden nach dem Keimen solange in Anzuchterde belassen, bis sich robuste Pflanzen entwickelt hatten. Anschließend wurden die Pflanzen teilweise aus der Erde genommen, die Wurzeln von Erde befreit und auf Hydrokultur umgesetzt. Möhrenpflanzen wurden teilweise auch in der Erde belassen und mit Nährlösung gegossen. Weizenpflanzen wuchsen in Sieben in Hydrokultur. Der Einfluss des pH-Wertes der Nährlösung auf die Entwicklung der Pflanzen wurde berücksichtigt.

Die Pflanzen wurden während ihrer Entwicklung entweder im Wachstumsschrank (Phytotron) bei kontrollierten Bedingungen belassen (siehe Kap. 11), oder sie wuchsen unter Laborbedingungen ( $^3\text{H}$ -Experimente). Die Versuchsparemeter finden sich im Anhang.



Weizen



Feldsalat



Möhren

**Abb. 10:** Weizen, Feldsalat- und Möhrenpflanzen

#### 8.2.5 Bestimmung der Biomasse der Pflanzen

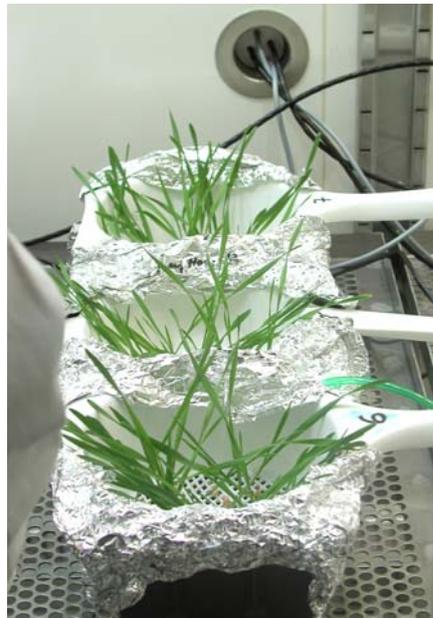
Die Biomasse der Pflanzen einiger Versuchsreihen wurde durch Differenzwägung (Anzucht-Apparatur mit und ohne Bepflanzung) bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet,

dass anhaftende Nährlösung an den Wurzeln nicht zur Verfälschung der Ergebnisse führt. Bei Aufnahmeexperimenten von Möhren in Erde konnte die tägliche Zunahme der Biomasse nicht bestimmt werden.

## 8.2.6 Zudotierung der Antibiotika

### 8.2.6.1 Aufnahmeexperimente mit unmarkierten Antibiotika

CTC wurde zusammen mit iso-CTC oder SFD wurde den Nährlösungen zugesetzt. Beim Wechsel der Nährlösungen alle zwei bis drei Tage wurde die entsprechende Menge an Antibiotika -Stammlösung (siehe Anhang) in die Nährlösung pipettiert. 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.



**Abb.11:** Weizenpflanzen in Sieben auf Hydrokultur in konventionellen Blumenkästen mit unmarkierten Antibiotika im Wachstumsschrank

### 8.2.6.2 Aufnahmeexperimente mit markierten Antibiotika

Es wurden den Nährlösungen, die analog zu den oben erwähnten Ansätzen unmarkierte Antibiotika enthielten, zusätzlich  $^3\text{H}$ -markiertes Sulfamethazin ( $^3\text{H}$ -SM) für SFD-haltige Nährlösungen oder  $^3\text{H}$ -markiertes Tetracyclin ( $^3\text{H}$ -TC) für CTC / iso-CTC-haltige Nährlösungen zugesetzt. Die Gesamtkonzentrationen aller eingesetzten Antibiotika wurden in den verschiedenen Experimentserien gleich eingestellt. Der Aufbau der Versuche war prinzipiell ähnlich zu den Versuchen in Hydrokultur. Auf Grund der geringen

zur Verfügung stehenden Mengen an  $^3\text{H}$ -markierten Antibiotika und zur Vermeidung von Entsorgungsproblemen aus Gründen des Strahlenschutzes, wurde die Nährlösung jedoch nicht im 2-3 Tagesrythmus gewechselt. Vielmehr wurden die Pflanzen über die gesamte Wachstumszeit in der ursprünglich angesetzten Nährlösung belassen.



**Abb.12** : Weizenpflanzen in Hydrokultur mit markierten Antibiotika

### **8.2.7 Ernte und Lagerung**

Nach ein- bis dreiwöchigem Wuchs auf dotierter Nährlösung wurden die Pflanzen entnommen und unter fließendem Wasser gründlich gesäubert und 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 in Blattmaterial gelangt. Das Pflanzenmaterial wurde in Stücke zerschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine genaue Durchführungsbeschreibung befindet sich im Anhang.

Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben im Falle der Versuche mit markierten Antibiotika bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Pflanzenmaterial aus den Versuchen mit nichtmarkierten Antibiotika wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **8.3 Analyse der Proben aus Versuchen mit $^3\text{H}$ -markierten Antibiotika**

### **8.3.1 Flüssig-Szintillationszählung**

Die aus den Versuchen mit markierten Antibiotika geernteten Pflanzenproben wurden durch Zusatz verschiedener Reagenzien (siehe Experimenteller Teil und Anhang) vorbereitet (s.u.) und im Szintillationszähler gemessen. Durch den radioaktiven Zerfall werden bestimmte Bestandteile der Szintillationslösung angeregt und dabei Strahlung emittiert, die dann als counts per minute (cpm) im Szintillationszähler registriert wird. Die

Umrechnungen mit Hilfe der spezifischen Aktivität der eingesetzten radioaktiven Verbindungen erlauben eine Berechnung der aufgenommenen Menge an Antibiotika. Im folgenden Abschnitt wird die Szintillationsmessung genauer beschrieben:

Nur wenige Lösungsmittel zeigen nach dem Beschuss mit radioaktiver Strahlung eine Fluoreszenz, bei der Licht sehr kurzer Wellenlängen emittiert wird, was über einen Photomultiplier im Szintillationsmessgerät mit geringer Effektivität detektiert werden kann. Der zu analysierenden Pflanzenprobelösung wird deswegen ein Fluorophor (primärer Szintillator, z.B. 2,5-Diphenyloxazol PPO) zugesetzt, welcher die Energie aufnehmen kann und selbst bei größerer Wellenlänge fluoresziert. Allerdings ist die Zählrohrbeute hier auch noch relativ gering, weshalb ein sekundärer Szintillator („wavelength shifter“) z.B. 1,4-Di-[2-(5-phenyl-oxazol)]-benzol POPOP zugesetzt wird (Wilson und Golding 1990). Der sekundäre Szintillator emittiert Licht bei einer Wellenlänge, die die beste Zählrohrbeute im Photomultiplier erlaubt, also bei maximaler Empfindlichkeit. Jedoch ist ein primärer Szintillator nötig, sonst kann keine Energieübertragung vom Lösungsmittel auf den sekundären Szintillator stattfinden. Die Energieübertragung findet in der folgenden Reihenfolge statt:

**Radioaktive Strahlung => angeregtes Lösungsmittel => angeregter primärer Szintillator => angeregter sek. Szintillator => Licht [Registrierung am Photomultiplier]**

Um die radioaktiven Pflanzenproben im Szintillationszähler vermessen zu können, müssen ihnen dem obigen Abschnitt zufolge verschiedene andere Lösungen (z.B. prim., sek. Szintillator, Gewebeauflöser) zugesetzt werden. Diese anderen Bestandteile der zu vermessenden Lösung können selbst auch Strahlung aufnehmen (schlucken, engl. „to quench“), wodurch die Intensität vermindert wird. Restgehalte an Wasser und anderen Komponenten der Zellbestandteile sind weitere Quenchursachen. Um dennoch zu einem korrekten Ergebnis zu gelangen, müssen so genannte Quenchfaktoren eingeführt und in der Auswertung berücksichtigt werden. Dazu wird jede einzelne Lösung mit definiertem Volumen bekannter Aktivität versetzt und gemessen, zu wie viel „counts per minute“ der Zusatz in dieser Lösung führt. Es wird ein „Quench-Faktor“ ermittelt, mit dem die Probenergebnisse multipliziert werden (siehe Anhang A3.1).

Normalerweise führt ein Quench zu niedrigeren Strahlenausbeuten. Es kann aber vorkommen, dass Moleküle vorhanden sind, die selbst fluoreszieren und damit die Lichtausbeute am Photomultiplier erhöhen. Somit würde ein Quench-Faktor ermittelt

werden, der kleiner als eins ist. Chlorophyll z.B. ist ein Molekül, das fluoresziert, wenn es mit blauem Licht bestrahlt wird (Jensen et al. 1994). Das war auch bei den hier durchgeführten Versuchen teilweise festzustellen.

### **8.3.2 Mikroautoradiographie**

Ergänzend wurden an ausgewählten Proben mikroautoradiographische Untersuchungen durchgeführt, um genaue Informationen über den Ablagerungsort von Antibiotika in Pflanzen zu erhalten. Dazu wurden von ausgewählten Pflanzenproben sehr dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte der Pflanzen wurden auf optisch empfindlichen Filmen über eine längere Zeit (2 Wochen bis 3 Monate) fixiert. Findet in den pflanzlichen Proben ein radioaktiver Zerfall statt, so erfolgt eine Registrierung. Einlagerungsorte von radioaktiven Verbindungen werden so sichtbar. Diese Untersuchungen führten zu Aussagen über die Lokalisation der eingelagerten Antibiotika in die verschiedenen Gewebe der untersuchten Pflanzenteile. Die Lokalisation ist auf zellulärer Ebene möglich, so dass gegebenenfalls auch Einlagerungen in Zellkompartimente detektiert werden können (Durchführung siehe Kapitel 11.2.2).

### **8.4 Analyse der Proben aus Versuchen mit unmarkierten Antibiotika**

Um die Pflanzenproben mit HPLC rückstandsanalytisch zu untersuchen, müssen die zu bestimmenden Verbindungen (Analyten) in Lösung vorliegen. Das heißt, sie müssen aus den pflanzlichen Kompartimenten extrahiert werden. Als erstes hat die Zerkleinerung (Homogenisierung) der Proben einen Einfluss auf die Effektivität der Extraktion. Deshalb wurde ein Ultra-Turrax® im Eiswasserbad und die mechanische Zerkleinerung im Mörser unter Stickstoffkühlung getestet. Auch die Wahl des Extraktionsmittels ist von Bedeutung. Erprobt wurden verschiedene Lösungsmittel wie McIlvaine-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang), Methanol und Acetonitril in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen im Ultraschallbad. Es wurden z.B. auch gute Erfahrungen mit McIlvaine-Puffer gemacht, um Tetracycline aus Schlachtproben oder Boden zu extrahieren (Hamscher 2002, Vockel 2005). Der Pflanzenextrakt ist, bevor er der HPLC-MS Messung zugeführt wird, mit Hilfe der Festphasenextraktion noch weiter aufzureinigen und aufzukonzentrieren (Clean up). Dazu gibt man den Extrakt über eine zuvor konditionierte und äquilibrierte Festphase. Die Analyten adsorbieren an der Festphase und können nach dem Waschen der Festphase mit einem Elutionsmittel wieder in Lösung gebracht werden. Eventuelle Störkomponenten

werden idealerweise abgetrennt, da sie nicht mit der Festphase wechselwirken. Getestet wurden unterschiedliche Kartuschen-Größen.

### **Nachweis der Analyten mit HPLC-MS<sup>n</sup>**

Durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Packungsmaterial der Chromatographiesäule werden die Bestandteile der injizierten Probelösung aufgetrennt. Die von der Säule bei unterschiedlichen Retentionszeiten ( $t_R$ ) eluierenden Komponenten werden im Detektor registriert. Um ein Massenspektrometer als Detektor verwenden zu können, muss das MS-Gerät zuvor mit den zu bestimmenden Analyten optimiert werden („tunen“). Im Massenspektrometer werden die Analyten dann aufgrund ihres Masse zu Ladungsverhältnisses registriert. Es wurde ein niedrig auflösendes Massenspektrometer Finnigan LTQ Ion-Trap mit Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet (genaue Geräteparameter siehe 11.1.4). Zur Untersuchung auf Metabolite der Antibiotika in Pflanzenproben wurden zusätzlich zu den Analysen mit dem niedrig auflösenden Massenspektrometer zur Bestätigung und Identifizierung auch das hoch auflösende FTICR-Massenspektrometer des ISAS in Dortmund eingesetzt (siehe 11.1.4). Mit den Untersuchungen der Proben an dem hochauflösenden Gerät können bis zu MS<sup>4</sup> Stoßexperimente durchgeführt werden, die in Bezug auf die Strukturaufklärung von unbekanntem Metaboliten herangezogen werden.

Zur quantitativen Bestimmung der Analyten mit LC-MS muss das System zuvor kalibriert werden. Durch Injektion einer Standardlösung (Analyt in Laufmittel) mit einer Konzentration von 10 mg/L wurde das System zur Kalibrierung vorbereitet (die Einstellungen der optimierten Geräteparameter finden sich unter 11.1.4). Vorläufer- und Produktionsstufen dienen zur Identifizierung und Quantifizierung in Kombination mit den Retentionszeiten.

#### **8.4.1 Bestimmung von Sulfadiazin**

##### **Externe Kalibrierung - Matrixeffekte**

In der Regel wurde eine externe Kalibrierung durchgeführt, wobei sich die Matrix der Standardlösungen (organisches Lösungsmittelgemisch) von der Matrix der Meßprobe (Extrakt) unterscheidet.

Für die SFD-Bestimmung wurde der Einfluss von koeluierenden Matrixbestandteilen auf die Signale untersucht. Dazu wurden verschieden konzentrierte Lösungen von Standards

in Laufmittel oder in Matrixlösung gemessen. Die Signalintensitäten mit und ohne Matrix wurden miteinander verglichen.

### **Verwendung eines Internen Standards**

Die Bestimmung mit Internem Standard (IS) ist eine Technik, in der eine Standardverbindung direkt in die analytische Probe gegeben und mit ihr in einem Lauf analysiert wird. Messsignalschwankungen hervorgerufen durch z.B. unterschiedliche Injektionsvolumina oder unterschiedliche Ionisierungsgrade in der Quelle werden ausgeglichen, in dem der Analyt relativ zum IS ausgewertet wird.

Ein Interner Standard sollte eine ähnliche Retentionszeit und Empfindlichkeit wie der Analyt besitzen. Er muss in der Matrix stabil sein, darf kein Bestandteil der Probe sein und sollte adäquate chromatographische Peaks hervorrufen.

Sulfamethoxypyridazol (SMP, Struktur siehe Abb.20) wurde als Interner Standard für die SFD Bestimmung getestet. Es wurde eine Kalibrierung unter Verwendung von SMP durchgeführt und SFD-Gehalte ausgewählter Proben damit bestimmt.

### **Standardaddition**

Um Matrixeffekte auszugleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit an ausgewählten Proben Standardadditionen durchgeführt. Dazu wurde die zu analysierende Mess-Probe geteilt und mit unterschiedlichen Mengen an Standardlösung versetzt. Messsignalschwankungen hervorgerufen durch koeluisierende Matrix sollten in jeder Probe ähnlich sein. Es wurde eine Kalibriergerade aufgenommen, die in der negativen Verlängerung über den Nullwert der x-Achse hinaus die x-Achse schneidet. Am Schnittpunkt wurde der Betrag der Konzentration des Analyten in der Probe abgelesen. Die Ergebnisse, mit unterschiedlichen Auswerteverfahren berechnet (externe Kalibrierung, interne Kalibrierung und Standardaddition), wurden verglichen.

## **8.4.2 Bestimmung von Chlortetracyclin und iso-Chlortetracyclin**

### **Externe Kalibrierung - Matrixeffekte**

Auch hier wurde der Versuch unternommen, den Einfluss koeluisierender Matrixbestandteile auf die Signalintensität zu evaluieren. Dazu wurden gleich konzentrierte Standard-Lösungen in Laufmittel und in Standard-Matrix (lt. Anhang A3) vermessen und die Signalintensitäten verglichen.

### 8.4.3 Untersuchungen zu Metaboliten in Pflanzenproben

Ausgewählte aufgearbeitete Extrakte von verschiedenen Pflanzenproben wurden auf mögliche Metabolite von CTC untersucht. Dazu wurden die Proben mit LC-MS/MS (niedrigauflösend) und bei positiven (oder unsicherem) Befund zur Bestätigung mit einem hochauflösenden LC-MS<sup>n</sup> (FTICR-MS) am ISAS, Dortmund, analysiert.

Die Fourier Transform Ionen Cyclotron Resonanz-Massenspektrometrie (FTICR-MS) ist die leistungsfähigste MS-Technik in Bezug auf Auflösungsvermögen (> 1.000.000) und Massengenauigkeit. Die relative Massenabweichung zum theoretisch berechneten Wert wird in ppm angegeben und kann weniger als 1 ppm betragen. Demzufolge kann die Messung eines Ions mit 1000 Masseneinheiten bis auf die 3. Nachkommastelle genau erfolgen. Im Gegensatz dazu sind bei niedrigauflösenden MS (z.B. Quadrupol-Massenfilter oder Quadrupol-Ionenfalle) Auflösungen von 2000 und eine Massengenauigkeit von 0,2 Masseneinheiten üblich.

Der FTICR-MS liegen zwei physikalische Effekte zugrunde: Einerseits wird ein geladenes Teilchen in einem homogenen mehrere Tesla starken Magnetfeld entlang einer Magnetfeldlinie auf einer kreisförmigen Bahn bewegt. Diese Zyklotronbewegung ermöglicht es, Ionen in einem definierten Volumen zu halten. Andererseits absorbiert jede einzelne Ionenmasse eine spezifische Radiofrequenz und tritt mit ihr in Resonanz. Sind die mit Hilfe der charakteristischen Radiofrequenz ausgewählten Ionen auf einer größeren Kreisbahn, induzieren diese durch die Ionenbewegung eine Wechselspannung an zwei gegenüberliegenden Detektorplatten. Um Ionen unterschiedlicher Masse/ Ladungszahl gleichzeitig zu erfassen, werden alle Ionen gleichzeitig mit Hilfe eines Breitband-Radiofrequenzsignals angeregt. Nach der Anwendung einer Fourier Transformation (FT) werden die zeitabhängigen Rohsignale in frequenzabhängige Signale umgewandelt. Daraus wird dann ein Massenspektrum generiert.

## 9 Ergebnisse und Diskussion

### 9.1 Modellrechnungen zur Pflanzenverfügbarkeit von Antibiotika

Die auf struktur- und physikochemischen Parametern beruhende Berechnung der Lipophilie ( $pK_{ow}$ -Werte: Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser), erlaubt wie in den Kapiteln 4.3 und 4.4 beschrieben, eine Abschätzung der Aufnahme und Verteilung von Xenobiotika in Pflanzen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Tetracycline und Sulfonamide über mehrere acide bzw. basische Substituenten verfügen. Die Berechnungen nach „ACD/I-Lab service“ ergaben folgende Verteilungskoeffizienten:

**Tab.8:** Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der verwendeten Antibiotika (berechnet nach logP v.6.0 ACD/I-Lab service [www.acdi-lab.com](http://www.acdi-lab.com))

Substanz	Log $K_{ow}$
SFD	- 0,32 +/- 0,64
CTC	- 0,04 +/- 0,75
iso-CTC	1,35 +/- 0,75
TC	- 0,06 +/- 0,78
SMZ	0,80 +/- 0,26

Die kalkulierten  $\log K_{ow}$ -Werte des Sulfadiazins und der Chlortetracycline liegen im Bereich von 0 bis 2 (vgl. Kap. 5.2), wobei die relativ höchsten Werte für iso-CTC ermittelt wurden. Aufgrund der  $\log K_{ow}$ -Werte kann grundsätzlich eine Aufnahme dieser Verbindungen von Pflanzen über die Wurzel erwartet werden. Die aufgeführten Verbindungen sind nach Bromilow und Chamberlain (1995) des Weiteren als Xylem- und / oder Phloem-mobil zu klassifizieren.

Erste experimentelle Hinweise auf eine geringe Aufnahme von Sulfonamiden in die Pflanzenwurzel hatten Langhammer et al. (1989) durch Tracerstudien erhalten.

### 9.2 Anzucht von Weizen, Feldsalat und Möhren

#### 9.2.1 Vorbehandlung der Samen

Bei Weizen ergaben sich am wenigsten Verschimmelungen, wenn die Körner nacheinander mit Tween® 80-, Natriumhypochlorit- und Wasserstoffperoxid-Lösungen

gewaschen wurden. Zwischen den „Waschungen“ wurde jeweils zweimal mit bidestilliertem Wasser gespült. Feldsalat und Möhren Samen wurden handelsüblich erworben und nicht weiter behandelt.

### **9.2.2 Keimung und Entwicklung**

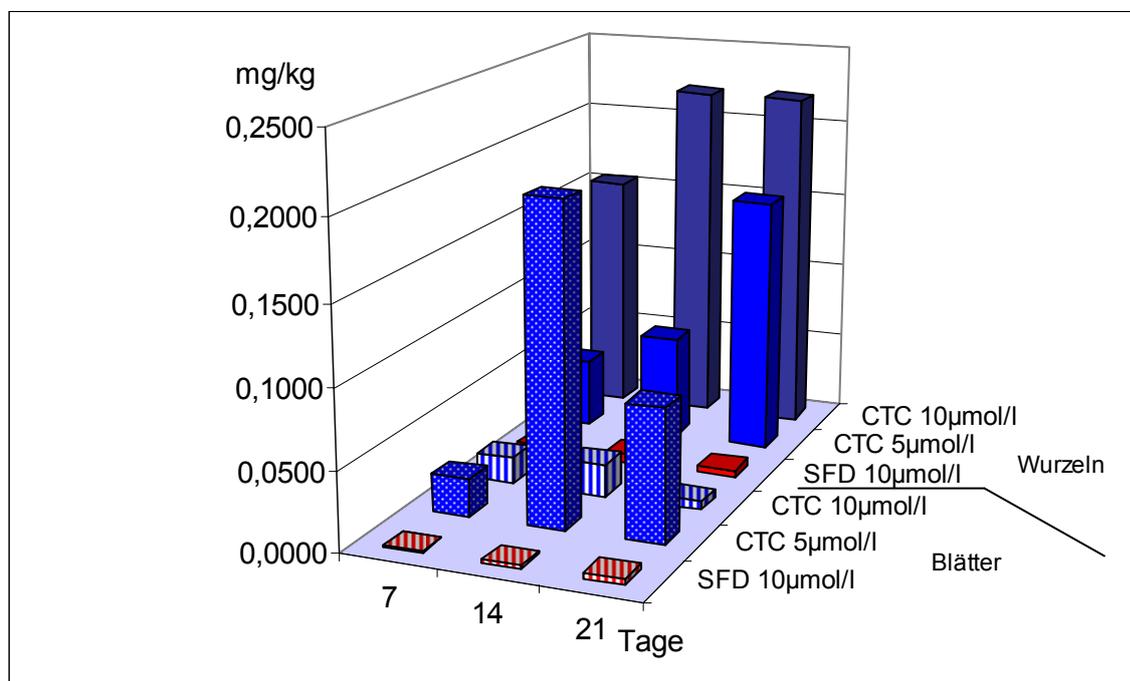
Mit Feldsalat und Möhren gelang die beste Keimung in Erde. Weizen hingegen keimte sehr gut auf feuchtem Filterpapier im Dunkeln. Die beste Entwicklung in Hydrokultur wurde für Weizen und Möhren bei einem pH-Wert von 4,7 erreicht. Dieser Wert stellte sich nach dem Ansetzen der Nährlösung ein. Für Feldsalat wurde die Entwicklung in Nährlösung bei einem pH-Wert von 6 durchgeführt. Dieser wurde durch Zusatz von Kaliumhydroxid-Lösung zur Nährlösung mit einem pH-Meter eingestellt und erwies sich in Vorversuchen als geeignet. Nähere experimentelle Angaben zur Anzucht und Entwicklung finden sich im experimentellen Teil (Kapitel 11).

*Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse der Aufnahmeexperimente mit markierten und unmarkierten Antibiotika in der Nährlösung entsprechen nicht der chronologischen Reihenfolge der Durchführung der Experimente. Vielmehr wurden thematisch zusammengehörige Versuche in Blöcken dargestellt.*

## 9.3 Aufnahmeexperimente mit Tritium-markierten Antibiotika

### 9.3.1 Feldsalat

Die Ergebnisse zur Antibiotika-Aufnahme des Feldsalates sind in Abb.13 graphisch dargestellt. Feldsalat wuchs in Nährlösung, die sowohl  $^3\text{H}$ -markiertes Antibiotikum als auch das nicht markierte Antibiotikum derselben Wirkstoffklasse enthielt. Wie erkennbar, sind in allen Feldsalatproben Sulfonamid- und Tetracyclinaktivitäten ermittelt worden, wobei generell die Aufnahme an Tetracyclinen erheblich ausgeprägter ist. In den Wurzeln wurden, bis auf eine Ausnahme (14 Tage,  $5\mu\text{mol/L}$  CTC), deutlich höhere Werte gefunden als in den Blättern des jeweiligen Wachstumsstadiums.



**Abb. 13:** Verteilung der Antibiotika (mg/kg FG) im Feldsalat in Abhängigkeit von Wachstumszeit und Konzentration in der Nährlösung (SFD/ $^3\text{H}$ -SMZ und CTC/iso-CTC/ $^3\text{H}$ -TC-Dotierung)

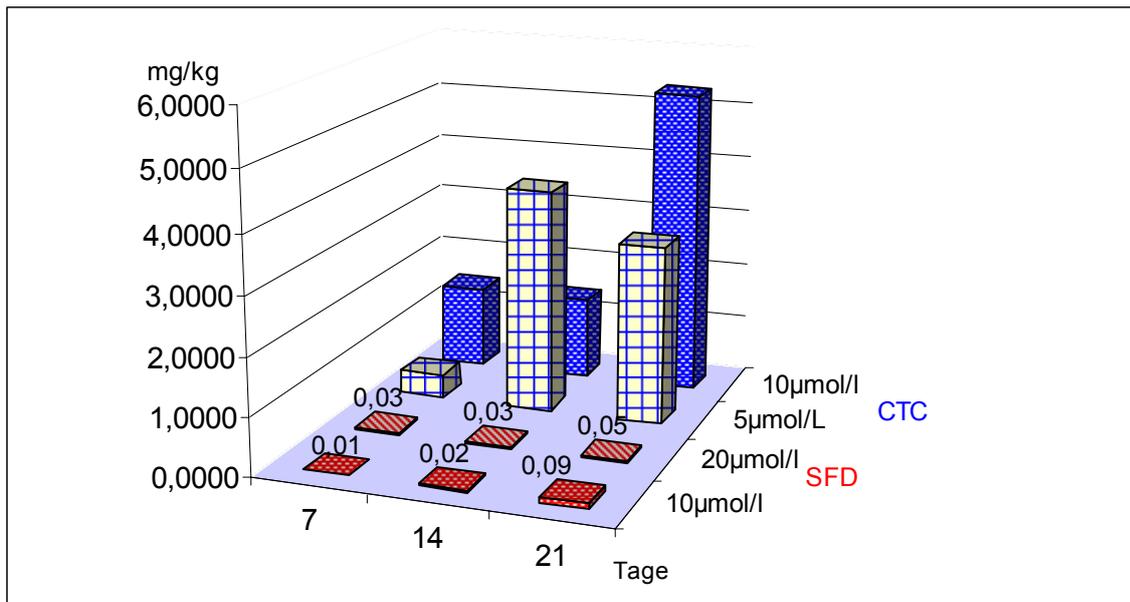
Die ermittelten Einlagerungsaktivitäten zeigen signifikant höhere Einlagerungswerte für Tetracycline als für die Sulfonamide, was prinzipiell auch mit den ermittelten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten übereinstimmt, denn für Sulfadiazin wurde der kleinste  $K_{ow}$ -Wert ermittelt (vgl. 9.1).

### 9.3.2 Winterweizen

#### Wurzeln

In den Wurzeln von Winterweizen wurden die in Abbildung 13 dargestellten Antibiotika-Gehalte nachgewiesen. Nach 7, 14 und 21 Tagen fanden sich jeweils nur geringe Einlagerungen an Sulfonamiden, aber relativ höhere Werte für CTC bzw.  $^3\text{H}$ -TC, welche die Aufnahmemengen in Feldsalatwurzeln erheblich überschreiten.

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$  SFD in der Nährlösung nahm die Aktivität in der Wurzel mit der Zeit geringfügig zu. Gegenüber den 7 Tage-Werten zeigten die anderen Wurzelproben im Laufe der Wachstumszeit ebenfalls eine Zunahme, jedoch ist bei den Tetracyclinen kein eindeutiger linearer Zusammenhang zwischen Einlagerungsintensität, Wachstumszeit und Antibiotikakonzentration zu erkennen. So bleiben die Werte nach 14 Tagen nahezu gleich (SFD 20  $\mu\text{mol/L}$  und CTC 10  $\mu\text{mol/L}$ ) oder nehmen überproportional zu (CTC 5  $\mu\text{mol/L}$ ).



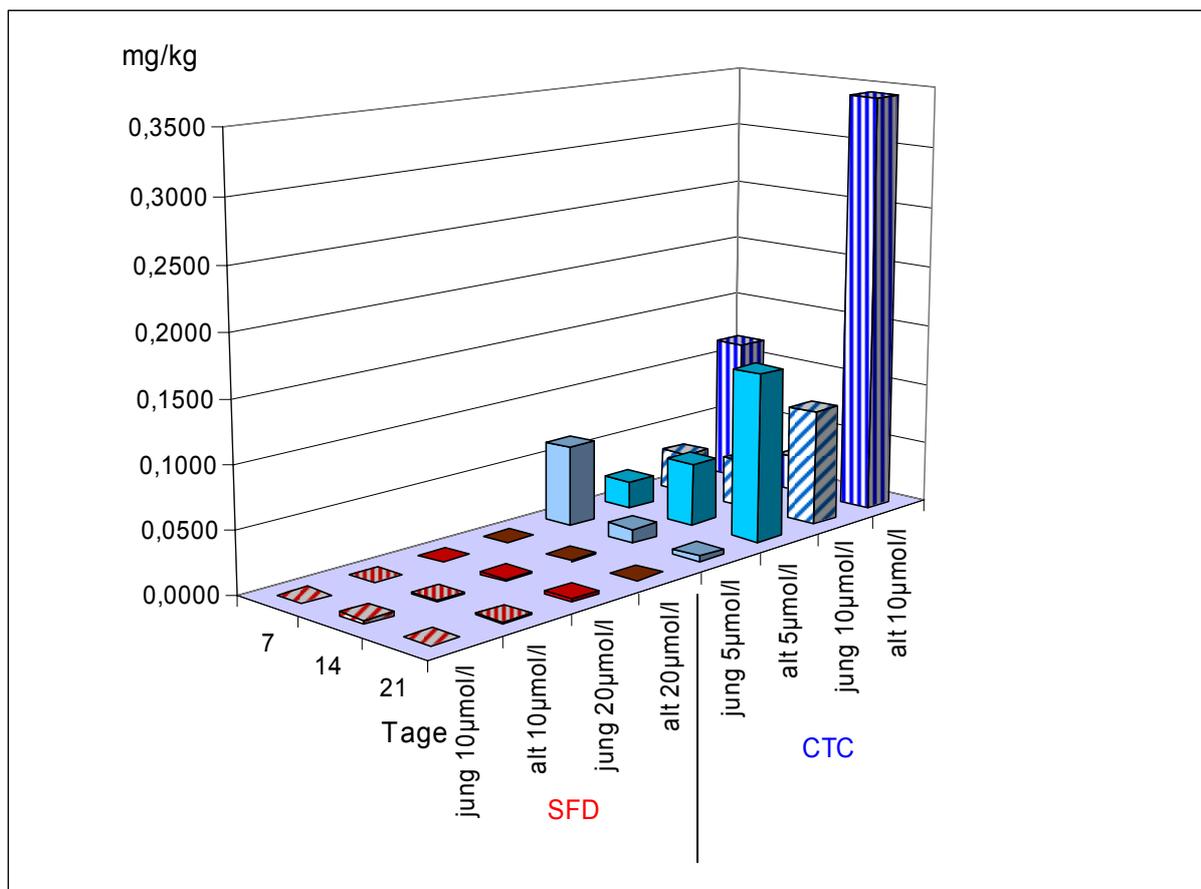
**Abb. 14:** Antibiotika-Gehalte in Wurzeln von Winterweizen (mg/kg FG) in Abhängigkeit von Wachstumszeit und Konzentration in der Nährlösung (SFD/ $^3\text{H}$ -SMZ und CTC/ $^3\text{H}$ -TC-Dotierung)

Neben unterschiedlichen, pflanzenphysiologisch bedingten Entwicklungsmöglichkeiten der einzelnen Pflanzen, könnten zu diesen Effekten auch nicht-konstante Wachstumsbedingungen beigetragen haben (z.B. Schwankungen von Bestrahlungsintensität, Lufttemperatur und Feuchtigkeit), die schwankende Photosyntheseleistungen

zur Folge hätten. Weitere Einflüsse hatte vermutlich auch das Algenwachstum, was sporadisch in den Hydrokulturen auftrat.

## Blätter

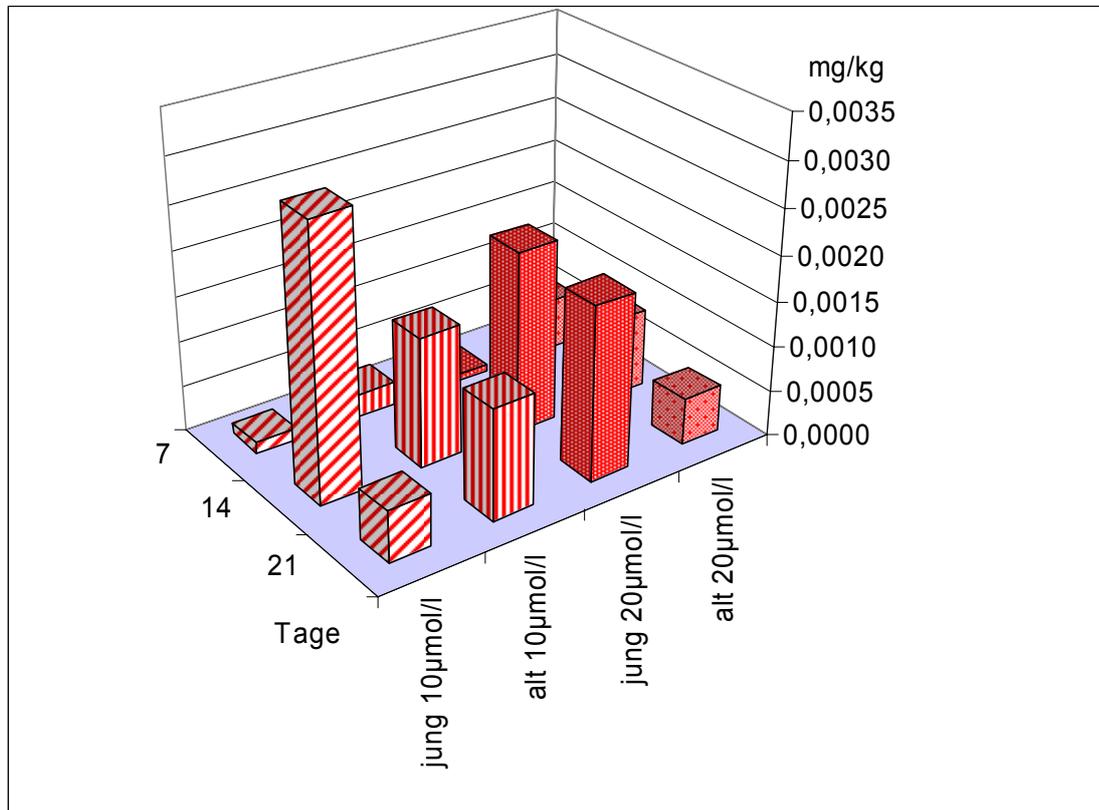
Von den Blättern der Weizenpflanzen wurden nach ein bis drei Wochen Wachstum die in Abb. 15 im Überblick dargestellten Antibiotikamengen aufgenommen. Erneut wird deutlich, dass erheblich mehr CTC in die Blätter transportiert wird als SFD, was mit dem oben genannten unterschiedlichen Aufnahmevermögen der Weizenwurzeln korreliert (Abb. 13).



**Abb. 15:** Antibiotika-Gehalte junger und alter Weizenblätter (mg/kg FG) in Abhängigkeit von Wachstumszeit und Konzentration in der Nährlösung (SFD /  $^3\text{H}$ -SMZ und CTC / iso-CTC /  $^3\text{H}$ -TC-Dotierung)

In alten, vollentwickelten Blättern wurden generell mehr Tetracycline als in jungen Blättern gefunden; hier zeigt sich ebenfalls eine Steigerung der Transportrate mit höherer Chlortetracyclin-Konzentration in Nährlösung. Dementsprechend wurde der höchste Werte für „alte Blätter“ nach 21 Tagen Wachstum bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/L}$  CTC / iso-CTC in der Nährlösung erhalten.

Die Sulfonamid-Einlagerung in Weizenblätter wird zur besseren Veranschaulichung gesondert in Abb. 16 gezeigt. Zwischen den ermittelten niedrigen Werten für die SFD bzw.  $^3\text{H}$ -SMZ-Aufnahme und den Versuchsparametern (Konzentration, Zeit) sind Abhängigkeiten nicht erkennbar.

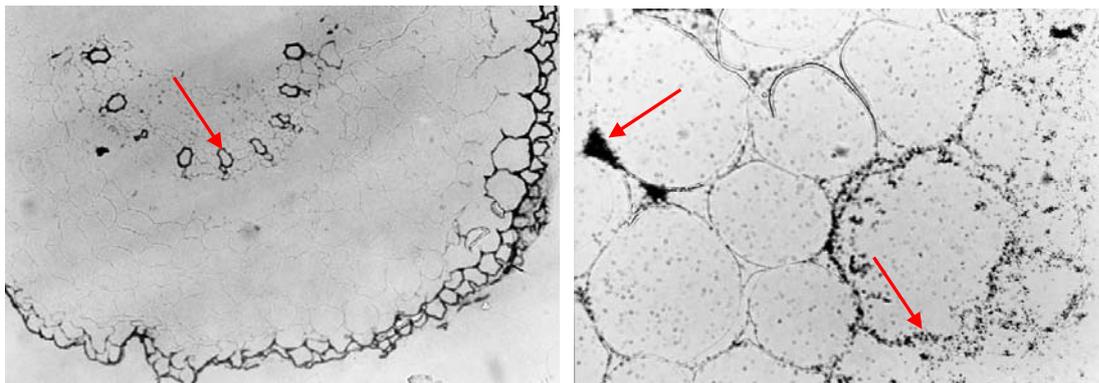


**Abb. 16:** Sulfonamid-Gehalte junger und alter Weizenblätter (mg/kg FG) in Abhängigkeit von Wachstumszeit und Konzentration in der Nährlösung (SFD/ $^3\text{H}$ -SMZ und CTC/iso-CTC/ $^3\text{H}$ -TC-Dotierung)

### 9.3.3 Ergebnisse der Mikroautoradiographie

Die zuvor dargestellten Ergebnisse sind Summenwerte der Antibiotika-Gehalte in verschiedenen Pflanzenteilen. Unklar bleibt z.B. bei Betrachtung der Wurzel, ob die Antibiotika vornehmlich an der Rhizodermis adsorbiert vorliegen, ob es besondere Einlagerungsorte gibt oder ob sie gleichmäßig verteilt in den Wurzelgeweben vorliegen. Mit der mikroautoradiographischen Untersuchungstechnik ließ sich die Aufnahme der Tritium-markierten Antibiotika  $^3\text{H}$ -SMZ und  $^3\text{H}$ -TC über die Wurzeln von Winterweizen und Feldsalat auch auf zellulärer Ebene an Hand der Einlagerungsorte detailliert verfolgen.

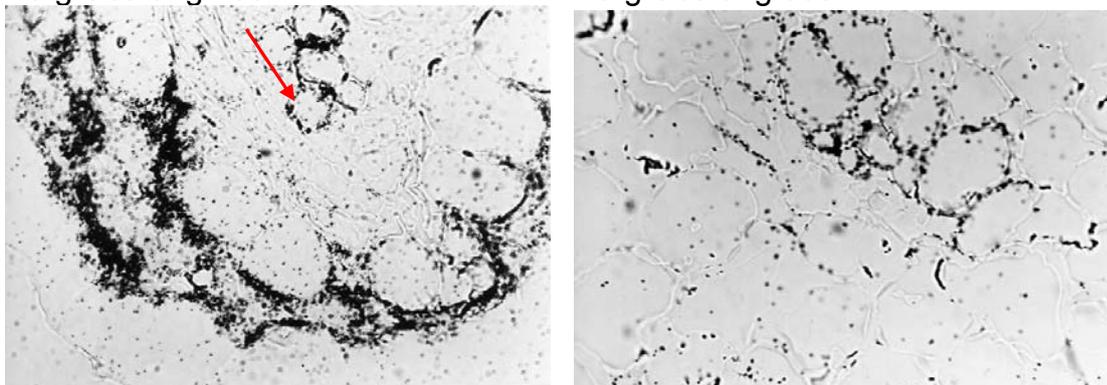
Das schwächer vergrößerte Bild 17a zeigt einen Wurzelquerschnitt des Weizens, aus dem sehr deutlich die Haupteinlagerungsorte von markiertem Sulfonamid (Dotierung 10µmol/L SFD) hervorgehen. Es ist der Apoplast (Zellwände) der Rhizodermis und der ersten Rindenlage (Exodermis). In diesem Bereich oder in noch jüngeren Teilen der Wurzel erfolgt wahrscheinlich eine Aufnahme in die Zellen und ein Weitertransport in das Leitgewebe. Sehr deutlich ist auch die Markierung in den Xylemgefäßen (Abb. 17a roter Pfeil) zu erkennen, über die das Sulfonamid und/oder mögliche <sup>3</sup>H-Metabolite dann in den Spross und die Blätter transportiert werden. Das stärker vergrößerte Bild (630x) zeigt die Einlagerung des <sup>3</sup>H-Tetracyclins (Dotierung 5 µmol/L CTC + iso-CTC) bzw. entsprechender Umlagerungsprodukte. Es ist der Bereich der Rhizodermis und der äußeren Wurzelrinde (Exodermis) dargestellt, mit relativ starker Markierung, die in anderen, hier nicht gezeigten Aufnahmen, oft viel diffuser erscheint. Sehr deutlich zu erkennen ist, dass auch bei diesem Antibiotikum der Apoplast d.h. die Zellwände und Interzellularenbereiche Haupteinlagerungsorte (Abb 17 b rote Pfeile) sind.



**Abb. 17: Mikroautographien der Wurzelquerschnitte des Winterweizens**

**a) <sup>3</sup>H-SMZ in 10 µmol/L SFD, 14 d**  
Vergrößerung 160x

**b) <sup>3</sup>H-TC in 5 µmol/L CTC/iso-CTC, 14d**  
Vergrößerung 630x



**Abb. 18:** Mikroautoradiographie

**Abb. 19:** Mikroautoradiographie

**Wurzelquerschnitt Feldsalatwurzel**

<sup>3</sup>H-SMZ in 10 µmol/L SFD, 14 d  
Vergrößerung 630x

**Junges Blatt – Weizen**

<sup>3</sup>H-SMZ in 10 µmol/L SFD, 7 d  
Vergrößerung 1000x

Pfeile deuten auf die Haupteinlagerungsorte (nähere Erläuterungen im Text)

In Abb. 18 treten auch in der äußeren Wurzelrinde des Feldsalates starke Einlagerungen von  $^3\text{H}$ -SMZ in  $10\ \mu\text{mol/L}$  SFD wie auch im Xylem des Leitbündels auf. Das junge Blatt des Weizens lässt nach 7-tägiger Einwirkung des markierten Sulfonamids in  $10\ \mu\text{mol/L}$  SFD, 1000fach vergrößert, im Blattmesophyll mit Leitbündeln – hier auch im Xylemteil des Leitbündels und benachbarter Zellen - deutlich apoplastische Einlagerungen erkennen (Abb. 19).

Die unterschiedlichen Intensitäten der Einlagerungen geben einen Hinweis auf eine stärkere Immobilisierung des markierten Sulfonamids im Wurzelbereich im Vergleich zum Tetracyclin, dessen diffusere Verteilung mit der durch die Tracerstudien vorgefundenen größeren Mobilität bzw. höheren Transportraten in der Pflanze korreliert (vgl. Abb. 14 u.15).

#### **9.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der $^3\text{H}$ -Experimente**

Die Tracerstudien und mikroautoradiographischen Untersuchungen mit Tritium-markiertem Tetracyclin und Sulfamethazin zeigen, dass in Hydrokultur Feldsalat und Winterweizen Antibiotika als solche oder metabolisiert, was hiermit nicht entschieden werden kann, über die Wurzel aufnehmen und auch in der Pflanze mit dem Xylemsaft transportieren. Das Sulfonamid wird im Vergleich zu den (Chlor-) Tetracyclinen von beiden Pflanzen in einem erheblich geringeren Maße aufgenommen und in der Pflanze transportiert, was tendentiell mit den geringeren  $\text{pKow}$ -Werten des Sulfonamids korreliert. Auch die in den Mikroautoradiographien trotz geringerer Gesamtaufnahme des Sulfonamids stark erscheinende Markierung in den Apoplastenbereichen sind im Einklang damit zu sehen. Das Aufnahmevermögen der Wurzeln des Winterweizens ist für beide Antibiotika signifikant höher als das der Feldsalatwurzeln:

Während beim Feldsalat in den Wurzeln eine Chlortetracyclin-Aufnahme bis maximal  $0,22\ \text{mg/kg}$  FG erreicht wurde, lagen in den Weizenwurzeln die CTC-Gehalte um den Faktor 20 höher.

Ebenso fällt auf, dass im Gegensatz zum Winterweizen beim Feldsalat die Unterschiede zwischen Wurzel- und Blattgehalten gering sind. In Weizen-Blättern wurden im Vergleich zum Feldsalat erheblich höhere Einlagerungswerte von Tetracyclinen (CTC/iso-CTC /  $^3\text{H}$ -TC) als von Sulfonamiden (SFD /  $^3\text{H}$ -SMZ) ermittelt, wobei die älteren Weizenblätter stets mehr Tetracycline enthielten als die noch nicht voll entwickelten jüngeren Blätter, was ein

Hinweis auf eine stärkere Transpirationsleistung älterer Blätter ist. Die Verteilung der Antibiotika in der Pflanze erfolgt mit dem Xylemtransport.

Die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente mit  $^3\text{H}$ -markierten Antibiotika entsprechen, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, den rückstandsanalytischen Befunden mit der neu entwickelten LC-MS-Methode.

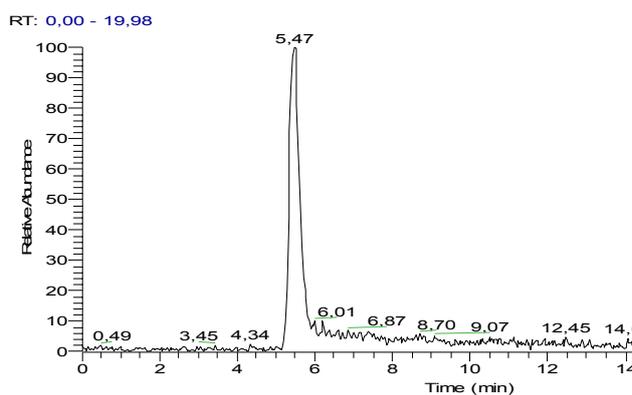
## 9.4 Entwicklung der Rückstandsanalytik mit LC-MS

Zu Beginn der Untersuchungen stand aus der Literatur keine analytische Methode zur Bestimmung von Antibiotika in pflanzlichen Proben zur Verfügung. Jedoch hatte sich bereits bei der Bestimmung von verschiedenen Antibiotika in tierischen Proben, Boden und Gülle eine LC-MS-Methode bewährt (Grote 2004). Es lag deshalb nahe, diese Methode auch als Grundlage für die Bestimmung von Antibiotika in pflanzlichen Proben zu verwenden, d.h. auf die Analyse von Pflanzenproben anzupassen und zu erweitern. Die chromatographischen Bedingungen finden sich unter 11.1.4.

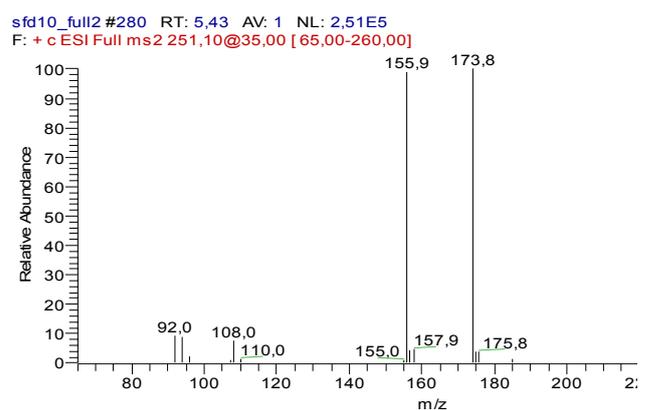
### 9.4.1 Qualitativer Nachweis von SFD, CTC und iso-CTC mit LC-MS/MS

Die Ionisierung der Analyt-Moleküle erfolgte durch Elektrospray-Ionisation im positiv Modus (ESI+). Die Geräte-Parameter wurden durch Einstellen (Tunen) des Gerätes mit einer Standard-Lösung des 10 mg/L Standards optimiert. Vorläufer- und Produktionen dienten zur Identifizierung und Quantifizierung in Kombination mit den Retentionszeiten.

Für die ausgewählten Antibiotika ergaben die massenspektrometrischen Untersuchungen des jeweiligen Standards im Laufmittel die in den folgenden Abbildungen (Abb. 20 bis Abb. 25) dargestellten Chromatogramme und MS/MS Spektren.

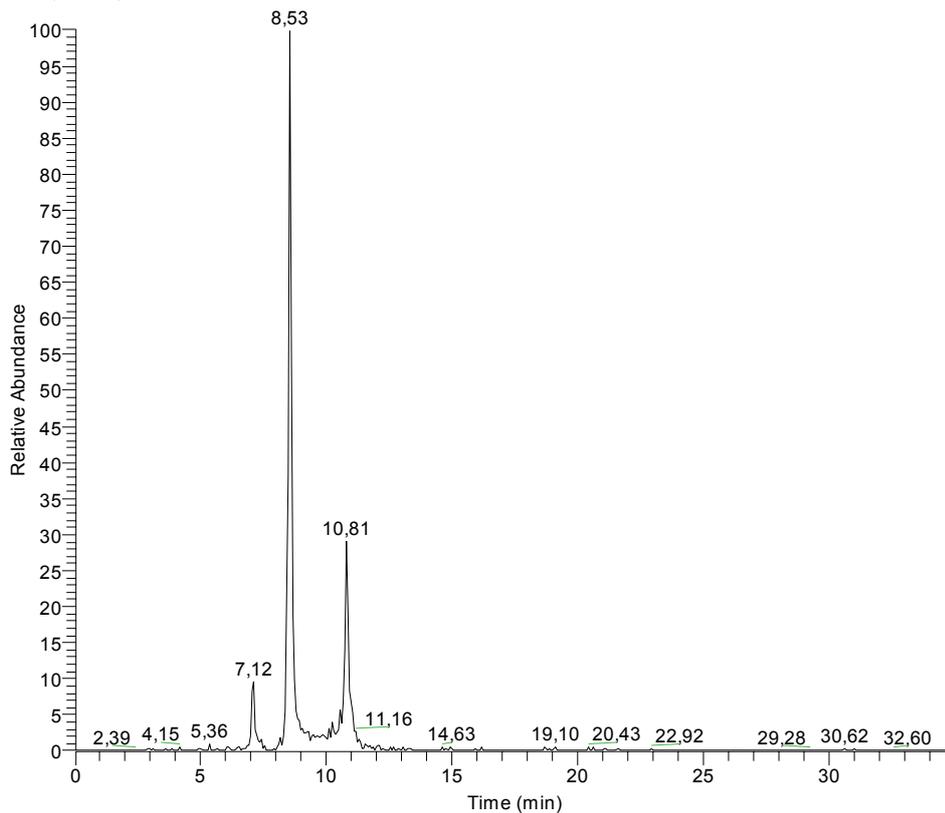


**Abb.20:** Chromatogramm der Massenspur 251,1 m/z einer SFD-Standard-Lösung ( $\beta=10\text{mg/L}$ ), Synergi® Säule, Gradient „SFD“



**Abb.21:** MS/MS-Spektrum von SFD, fullscan (Vorläuferion 251,1 m/z) einer SFD-Standard-Lösung ( $\beta=10\text{mg/L}$ ), niedrig auflösendes MS

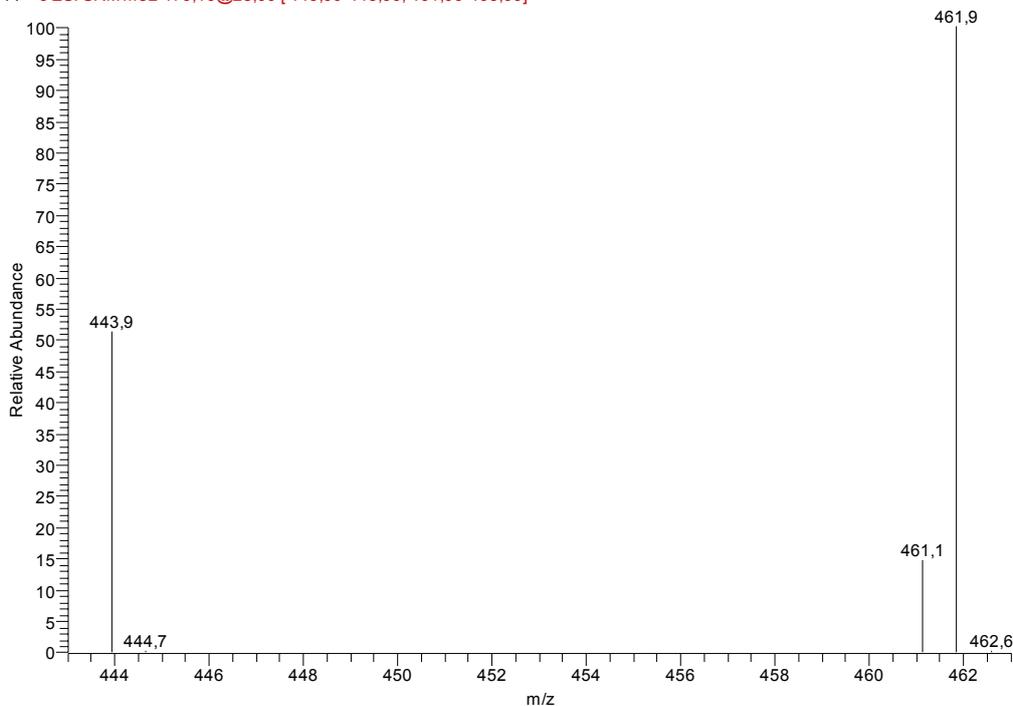
RT: 0,00 - 35,00



NL: 2,55E6  
m/z= 442,0-463,0 F: +  
c ESI SRMms2  
479,10@28,00 [  
443,00-445,00;  
460,90-462,90] MS  
Std 1o02

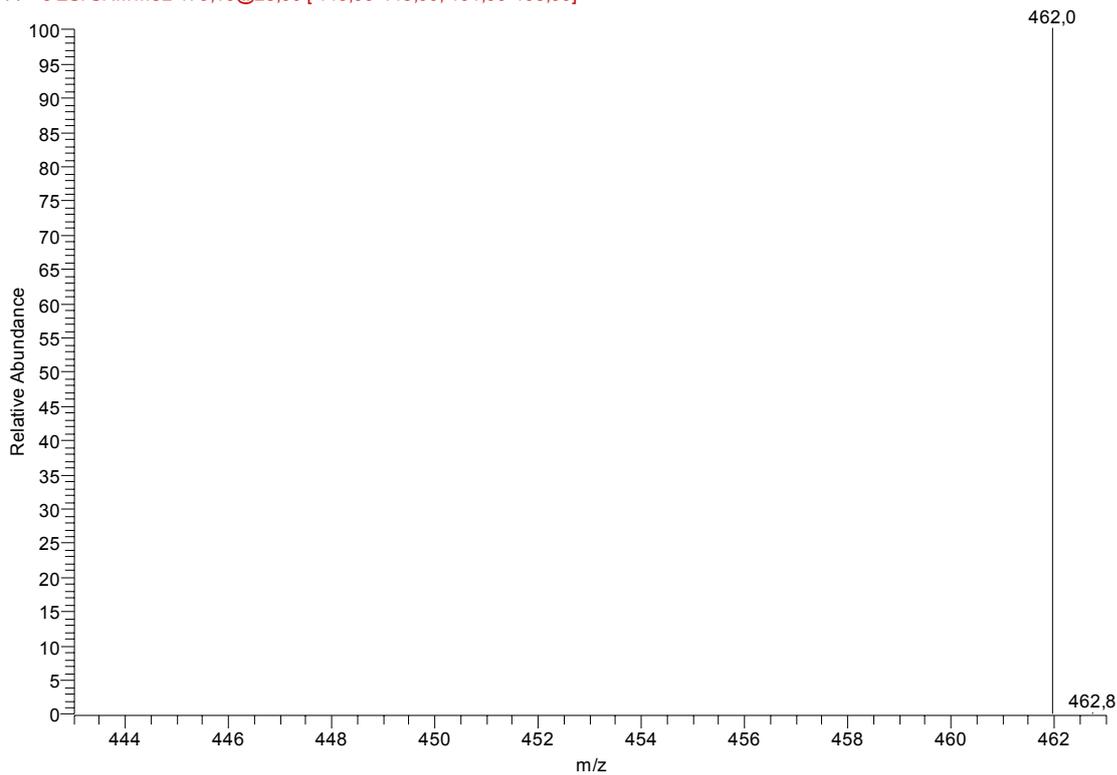
**Abb.22:** Chromatogramm der Massenspur 479,1 m/z einer CTC / iso-CTC – Standard-Lösung ( $\beta=10\text{mg/L}$ ), 1. Peak  $t_R=7,12$  : e-iso-CTC, 2. Peak  $t_R=8,53$ : iso-CTC, 3. Peak  $t_R=10,81$ : CTC, Säule (s.Abb.20), Gradient „CTC“

CTC-Stand5\_060419141116 #510 RT: 10,20 AV: 1 NL: 1,35E6  
F: + c ESI SRMms2 479,10@28,00 [ 443,00-445,00; 461,00-463,00]



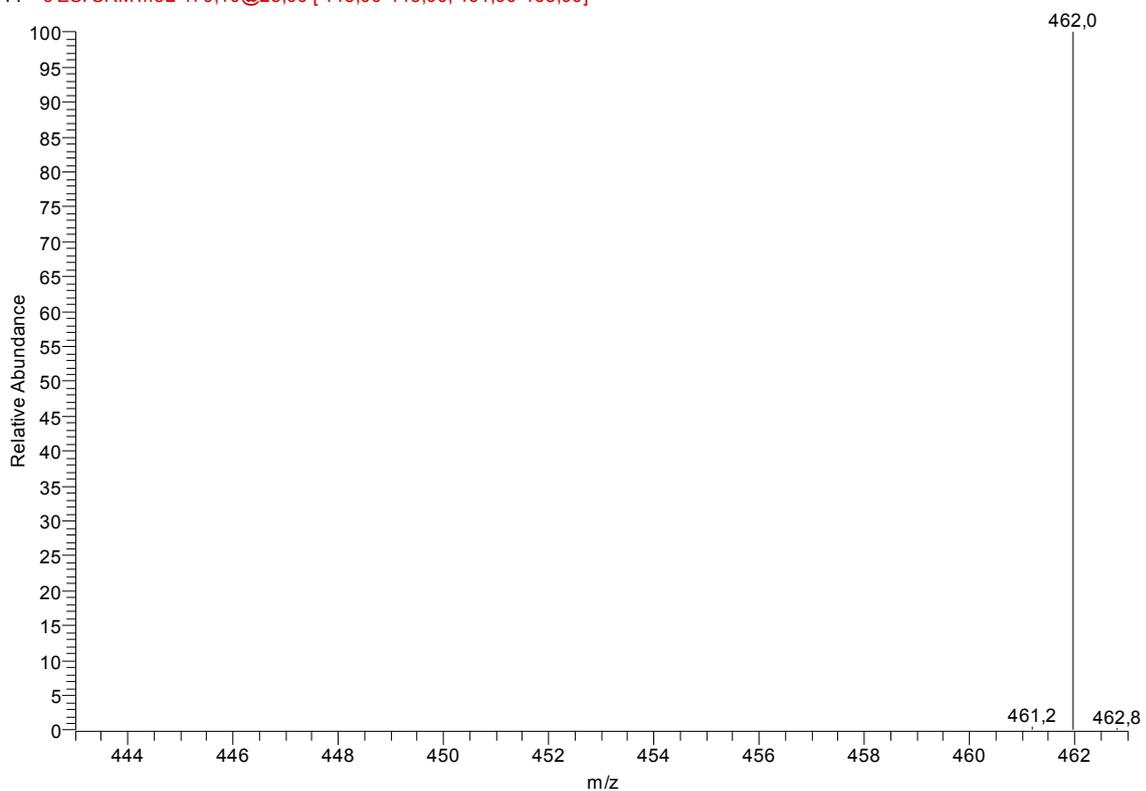
**Abb 23:** MS/MS Spektrum von CTC, SRM-scan, Vorläuferion 479,1m/z: Produktionen 461,9 und 443,9 m/z

CTC-Stand5\_060419141116 #394 RT: 7,88 AV: 1 NL: 4,43E6  
F: + c ESI SRM ms2 479,10@28,00 [ 443,00-445,00; 461,00-463,00]



**Abb.24:** MS/MS-Spektrum von iso-CTC, SRM-scan, Vorläuferion 479,1 m/z: Produktion 462,0 m/z

CTC-Stand5\_060419141116 #318 RT: 6,36 AV: 1 NL: 3,68E6  
F: + c ESI SRM ms2 479,10@28,00 [ 443,00-445,00; 461,00-463,00]



**Abb.25:** MS/MS-Spektrum von e-iso-CTC, SRM-scan, Vorläuferion 479,1 m/z : Produktion 462,0 m/z

In der folgenden Tabelle sind die massenspektroskopischen Kenngrößen der Analyten aus den Abb.20-25 zusammengefasst.

**Tab.6:** Massenspektroskopische Kenngrößen der Analyten (ermittelt mit 10 mg/L Standardlösungen), niedrig auflösendes MS, chromatografisches System: Synergi® Säule, Gradient „CTC“

Analyt	M [g/mol]	[M+H] <sup>+</sup> gemessen	Stoß- energie	Produktionen (rel. Häufigkeit in %)	Retentionszeit [min]
SFD	251,06	251,1	35 %	155,9 (84 -100) 173,9 (80 -100)	5,5
CTC	478,89	479,1	40 %	444,0 (60 – 85) 461,9 (100)	10,8
e-CTC	478,89	479,1	40 %	444,0 (50 – 80) 461,9 (100)	8,6
iso-CTC	478,89	479,1	40 %	462,0 (100)	8,5
e-iso-CTC	478,89	479,1	40 %	462,0 (100)	7,1

#### 9.4.2 Externe Kalibrierung

Mit den Daten verschieden konzentrierter Standardlösungen an SFD und CTC wurden Kalibriergeraden hergestellt (Konzentrationsbereiche von 0,1 bis 7 mg/L). Aus der erhaltenen Funktion wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für SFD und CTC nach DIN 32645 berechnet. In der Tabelle 7 sind die Validierungsparameter zusammengefasst.

Die Aufarbeitung der Proben und die Methode konnten nun im nächsten Schritt optimiert werden, so dass ein empfindlicher Nachweis der Analyten in Extrakten von pflanzlichen Proben möglich war.

#### 9.4.3 Optimierung der Probenaufarbeitung

Die Zerkleinerung der Pflanzen mit einem Ultra-turrax® wurde im Eiswasserbad getestet. Bei der Extraktion zeigte sich eine schlechte Ausbeute und diese war nicht reproduzierbar. Vermutlich werden mit dieser Zerkleinerungstechnik nicht alle Zellorganellen zerstört, so dass nur eine unvollständige Extraktion resultiert. Als geeignete Methode erwies sich die Zerkleinerung der pflanzlichen Proben durch Mörsern in flüssigem Stickstoff. Damit und bei der nachfolgenden Anwendung von Ultraschall werden Zellorganellen zerstört und die nicht an Zellwände gebundenen, freien Antibiotika Rückstände können extrahiert werden.

**Tab.7:** Validierungsparameter für die Bestimmung von SFD und CTC in Pflanzenproben; Nachweisgrenze NWG und Bestimmungsgrenze BG berechnet mit dem Programm „Valoo“ [www.analytik-software.de/valoo.html]

	SFD		CTC	
Linearer Bereich [mg/L]	0,1 - 1	0,5 – 2,5	0,1-2	1-7
Kalibrierfunktion: funktionaler Zusammenhang zwischen Konzentration und Messsignal (Peakfläche)	$y=-3642+2820977,5x$	$y=-841338+5277388,2x$	$y=209223,5+6483277,12x$	$y=714435 + 6255572,9x$
Korrelationskoeffizient $r^2$	0,986	0,993	0,999	0,996
Nachweisgrenze [mg/L] nach DIN 32645	0,2	0,28	0,12	0,7
Bestimmungsgrenze [mg/L] nach DIN 32645	0,68	0,8	0,4	2,23
Messpräzision [% $s_{rel}$ ] über den Arbeitsbereich	16,1	8,3	4,4	6,2

Durch Vorversuche bei der Wahl des Extraktionsmittels, stellte sich der McIlvaine-Citratpuffer als am geeignetsten heraus. Diese Citronensäure-Phosphat-Pufferlösung wird auch zur Extraktion von Antibiotika aus Boden- und Fleischproben verwendet (Hamscher 2002, Vockel 2005). Getestet wurden ebenfalls Lösungen mit 1 bis 5 % Zusatz an Methanol (v/v) oder Acetonitril, welche keine signifikante Verbesserung der Extraktionen brachte.

Die besten Ergebnisse der anschließenden Festphasenextraktion lieferte die Verwendung von „OASIS HLB 60 mg“-Kartuschen. Über diese Phase wurde dann auch das gesamte Extrakt aufgereinigt. Der Durchbruch der 60 mg-Kartuschen wurde bei 70 mL Extraktionslösung (einer Winterweizenblattprobe mit 10 µmol/L CTC/iso-CTC in der Nährlösung) festgestellt. Bei einer üblichen Extraktion fallen etwa 35 bis 40 mL Volumen an, so dass ein Verlust des Analyten durch Durchbrechen der SPE-Phase weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Die optimierte Aufarbeitungsmethode kann dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit entnommen werden (Kap. 11.2.3).

#### 9.4.4 Nachweis der Analyten in Pflanzenextrakten

Die Retentionszeiten der Analyten waren abhängig von der Extraktmatrix. In Standardlösungen wurden meistens die relativ höchsten Retentionszeiten gefunden. In den aufgearbeiteten Probelösungen der Wurzelextrakte verkürzen sich die Retentionszeiten aller Analyten. Dieser Effekt war in Probelösungen aus Blattproben noch stärker ausgeprägt (vgl. Tab. 8).

**Tab.8:** Retentionszeiten [min] der Analyte in Standardlösungen sowie in Probelösungen (Wurzel- und Blattextrakten nach der Festphasenextraktion SPE), Säule Synergi®, Gradient CTC

Analyt	Standardlösung	Probelösung Wurzelextrakt	Probelösung Blattextrakt
SFD	5,5	5,2 - 5,5	5,3 - 5,8
CTC	10,8	10,7 - 11,0	10,1 - 11,1
e-CTC	8,6	8,2 - 8,5	7,9 - 8,2
iso-CTC	8,5	8,2 - 8,4	7,8 - 8,0
e-iso-CTC	7,1	6,9 - 7,1	6,4 - 6,6

### 9.4.5 Wiederfindung

Zu ca. 5 g nicht dotierter Kontrollpflanzenprobe wurden definierte Mengen an SFD, SMP, CTC und iso-CTC zugegeben. Diese Proben wurden nach entwickelter Analysenvorschrift aufgearbeitet und der Gehalt bestimmt. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse.

**Tab.9:** Wiederfindungen in Winterweizenblattproben

Komponente	Zugesetzte Menge µg / 5g	Gefundene Menge µg / 5g	Wiederfindung in %
SFD	1	NN	-
SFD	1	NN	-
SFD	2	0,12	5,8
SFD	2	0,05	2,7
SMP*	1	0,75	75,0
SMP*	1	0,68	68,0
CTC	1	0,67	67,0
CTC	1	0,56	56,0
CTC	2	1,30	65,0
CTC	2	1,20	60,0
iso-CTC	1	0,39	39,0
iso-CTC	1	0,31	31,4
iso-CTC	2	0,69	34,8
iso-CTC	2	0,71	35,5

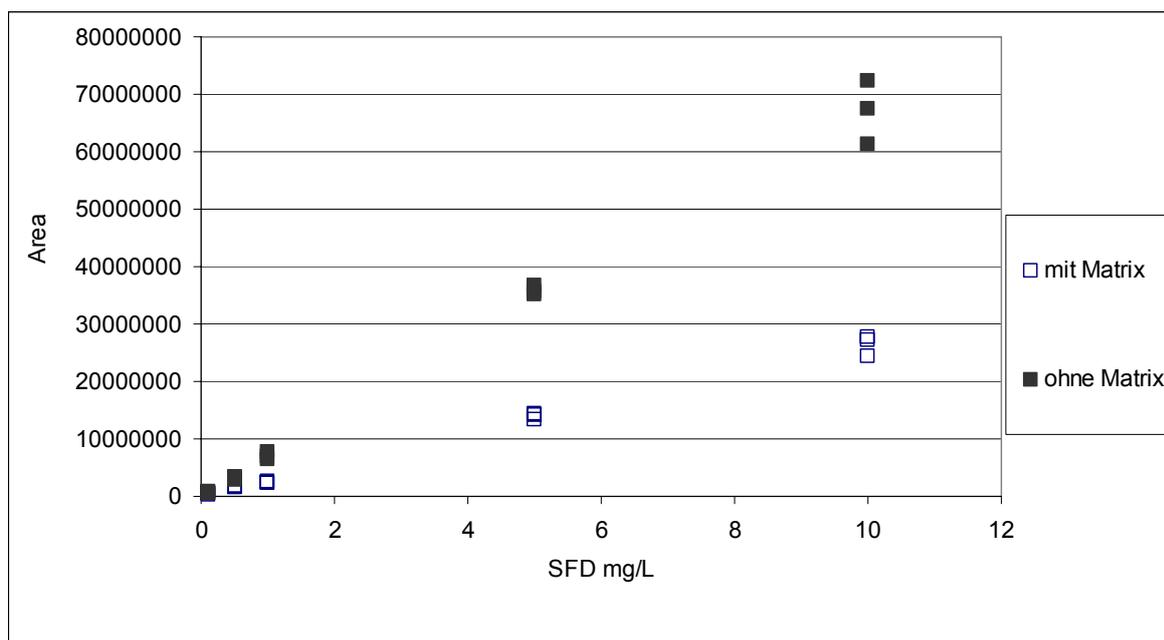
NN: nicht nachweisbar, \*SMP wurde im weiteren Verlauf der Analytik als IS verwendet und hier mit untersucht.

Die Wiederfindungen für SMP und CTC liegen zwischen 56 und 75 % und damit im akzeptablen Bereich.

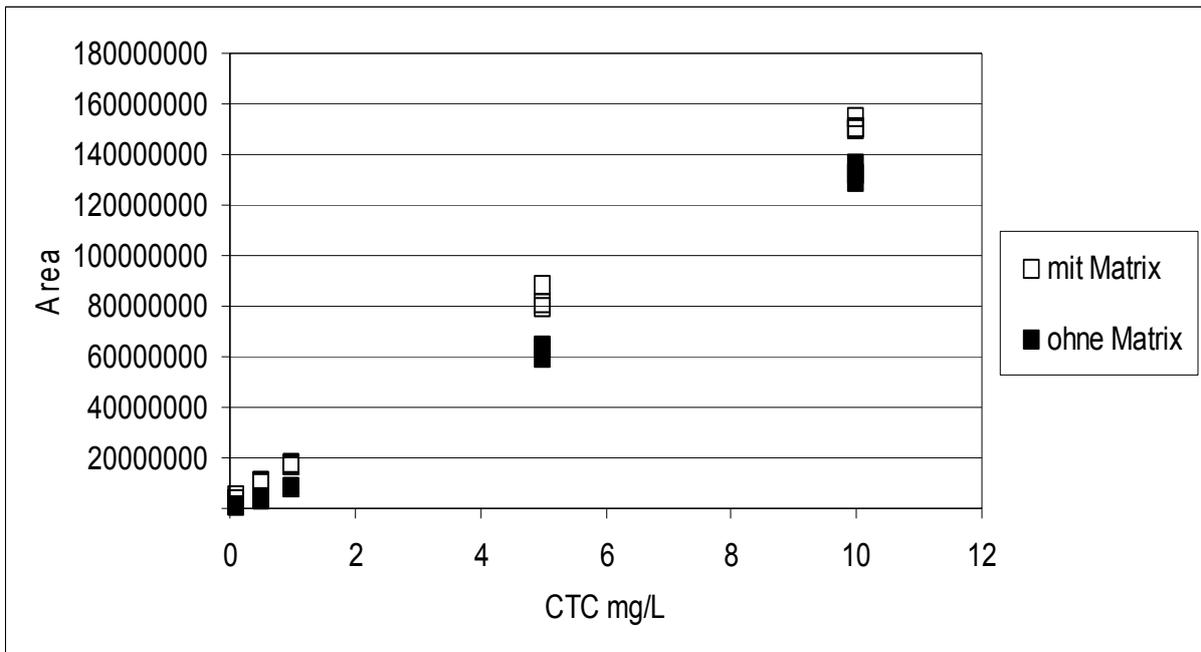
Iso-CTC wird nur zu ca. 35 % wiedergefunden. Es findet sich im Chromatogramm jeder Probe, zu der iso-CTC zudosiert wurde, auch ein Signal für epi-iso-CTC, welches ca. 40% des Signals für iso-CTC entspricht. Dieser Befund, der auch für CTC gilt, zeigt, dass im Laufe der Probenaufarbeitung ca. 40% iso-CTC zu epi-iso-CTC umgewandelt wird. Die Gesamt-Wiederfindung (Summe iso-CTC und epi-iso-CTC) beträgt somit ca. 50%. Die Wiederfindung für SFD beträgt bei einem Zusatz von 2 µg SFD pro 5 g Pflanzenprobe nur ca. 2,6 bis 5,7 %. Bei geringerer Zudosierung konnte gar kein SFD wiedergefunden werden. Ursachen werden in einer Signalsuppression vermutet, was im nächsten Kapitel 9.4.6 näher erläutert wird.

### 9.4.6 Signalsuppression

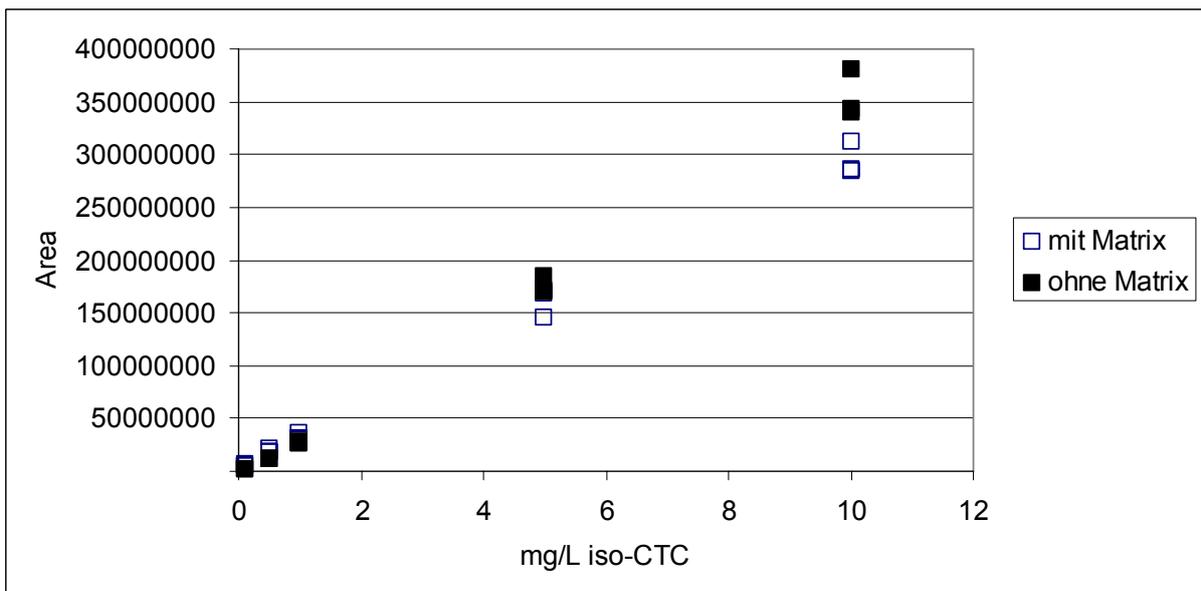
Matrixbestandteile in einer Messprobe können die Ionisierung in der ESI-Quelle des Massenspektrometers beeinflussen und damit die Quantifizierung verfälschen (Hajslova und Zrostlikova 2003, Yang et al. 2005). Um diese Effekte in Bezug auf das entwickelte LC-MS Verfahren zu überprüfen, wurden Extrakte von Kontroll-Pflanzenproben nach der Aufarbeitung zu einer Lösung vereinigt. Diese „standardisierte Matrix-Lösung“ (genaue Herstellung siehe Anhang A2) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an SFD, CTC oder iso-CTC versetzt und analysiert. Die erhaltenen MS-Signalfächen für die Komponenten sind in den folgenden Abbildungen 26 bis 28 dargestellt.



**Abb.26:** MS-Signalfächen des SFD-Peaks (SRM-Scan) in Abhängigkeit vom SFD-Gehalt in standardisierter Pflanzen-Matrix und in Standard-Lösung (ohne Matrix), Mittelwerte aus 2 Messinjektionen bei 3 Wiederholproben.



**Abb.27:** MS-Signalfächen des CTC-Peaks (SRM-scan) in Abhängigkeit vom CTC-Gehalt in standardisierter Pflanzen-Matrix und in Standard-Lösung (ohne Matrix), Mittelwerte aus 2 Messinjektionen bei 3 Wiederholproben.



**Abb.28:** MS-Signalfächen des iso-CTC-Peaks (SRM-scan) in Abhängigkeit vom iso-CTC-Gehalt in standardisierter Pflanzen-Matrix und in Standard-Lösung (ohne Matrix), Mittelwerte aus 2 Messinjektionen bei 3 Wiederholproben.

Für CTC wurde keine Signalunterdrückung in der ESI-Quelle gefunden, sondern ca. 10-20% höhere Signale für CTC mit Matrix (Konzentrationsbereich 0,1 bis 10mg/L). Solche Signal-Verstärkungseffekte sind ebenso wie Suppressionseffekte in der Literatur beschrieben (z.B. Kloepfer et al. 2005).

Für iso-CTC lagen die Signalwerte mit Matrix in den niedrigeren Konzentrationsbereichen über denen ohne Matrix, während in den höher konzentrierten Proben eine Signalsuppression auftrat. Allerdings muss dabei auch die temperaturabhängige Umwandlungstendenz des iso-CTCs in e-iso-CTC, sowie von CTC zu e-CTC, berücksichtigt werden. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben und in der Abbildung 2 dargestellt, epimerisieren alle Tetracycline im pH-Bereich 2-8. Diese Epimerisierung setzt in jeder Probe ein. Neben dem eigentlichen Analyten, wie z.B. iso-CTC, wird immer auch e-iso-CTC zu finden sein. Bei der Quantifizierung sollte deshalb die Summe der beiden Verbindungen zu Grunde gelegt werden. Die verminderten Flächen von iso-CTC könnten auch auf eine verstärkt stattfindende Epimerisierung zurückzuführen sein, was im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

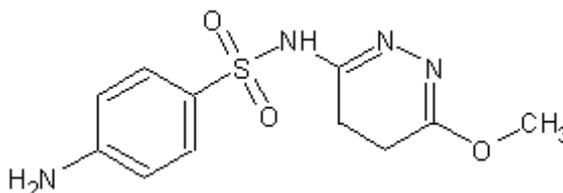
Zur Bestimmung von CTC und iso-CTC wurde die externe Kalibrierung über die Summe aller Epimere als akzeptable Methode angewendet.

Für SFD wurden starke Signal-Suppressionseffekte nachgewiesen mit bis zu 50 bis 70% schwächeren Signalen in Probenmatrix, was zu einem Minderbefund in den analysierten Pflanzenproben führt.

Die auch hier festgestellten Probleme bei der Quantifizierung in der LC-MS Technik sind ein viel beachtetes Problem (Willoughby 2002). Es gibt verschiedene Möglichkeiten trotz Signalsuppression zu einem „korrekten“ Ergebnis zu kommen (Stüber und Reemtsma 2004). Hier wurde die Verwendung eines geeigneten Internen Standards und die Standardaddition zur SFD- Bestimmung getestet.

#### 9.4.7 Anwendung eines Internen Standards zur SFD Bestimmung

Sulfamethoxypyridazin, SMP (4-Amino-N-(6-methoxy-3-pyridazinyl)-benzolsulfonamid) besitzt eine ähnliche Retentionszeit wie SFD, stört die chromatographische Trennung nicht, ist chemisch stabil und ruft adäquate chromatographische Peaks hervor. Damit ist SMP geeignet, als interner Standard für Sulfonamide zu fungieren (Willoughby 2002).



**Abb.29:** Struktur von Sulfamethoxypyridazol (SMP)

**Tab.10:** Physikalische und LC-MS/MS Daten von SMP

<b>Summenformel</b>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S
<b>Molmasse</b>	280,3 g / mol
<b>Retentionszeit</b> C18-Synergy-Säule	~ 8 – 8,5 min
<b>MH<sup>+</sup></b>	<b>281,3 m/z</b>
Cap.Temperatur	200 °C
Cap.Spannung	32,00 V
Cap.Lense	55,00
Sheat Gas	30
Vorläufer-Ion	281,3 m/z
Produkt-Ion	156 m/z
<b>% Coll.energy</b>	<b>35</b>

Sowohl Signalsuppressionen als auch Schwankungen der Retentionszeiten ( $t_R$ ) bei der Analytbestimmung werden durch die relative Auswertung mit dem Internen Standard rechnerisch ausgeglichen. Die Signalunterdrückung und Retentionszeitverschiebungen betreffen nicht nur den Analyten sondern auch den Internen Standard, so dass sich auch dessen  $t_R$  verschiebt. Der Quotient ( $t_R$  SMP/  $t_R$  SFD) aus der Retentionszeit des IS (SMP) und der Retentionszeit des Analyten (SFD) unterliegt geringeren Abweichungen (vgl.Tab.11) als die Retentionszeiten der einzelnen Analyte. Die Identifizierung der Analyte in Realproben wird durch die Anwendung eines Internen Standards damit erleichtert, denn in Proben unbekannter Matrix wird oft eine Retentionszeitverschiebung beobachtet (vgl. Tab. 11).

**Tab.11:** Vergleich der Retentionszeiten von SFD und SMP in Pflanzenmatrix und Standardlösung und den Quotienten der Retentionszeiten ( $t_R$  SMP/  $t_R$  SFD)

Konzentration [mg/L]	$t_R$ SFD[min]		$t_R$ SMP[min]		$t_R$ SMP/ $t_R$ SFD	
	ohne Matrix	mit Matrix	ohne Matrix	mit Matrix	ohne Matrix	mit Matrix
0,1	5,46	5,53	8,48	8,69	1,55	1,57
	5,50	5,53	8,65	8,70	1,57	1,57
	5,51	5,53	8,74	8,70	1,59	1,57
0,5	5,52	5,54	8,68	8,78	1,57	1,58
	5,52	5,54	8,69	8,78	1,57	1,58
	5,52	5,61	8,70	8,78	1,57	1,57
1	5,53	5,62	8,70	8,86	1,57	1,58
	5,46	5,62	8,71	8,79	1,59	1,56
	5,54	5,56	8,71	8,87	1,57	1,60
5	5,52	5,56	8,71	8,83	1,58	1,59
	5,53	5,56	8,66	8,77	1,57	1,58
	5,52	5,65	8,71	8,76	1,58	1,58
10	5,52	5,55	8,68	8,74	1,57	1,57
	5,53	5,56	8,69	8,75	1,57	1,57
	5,53	5,56	8,69	8,81	1,57	1,59
<b>Größter Unterschied</b>	<b>0,08</b>	<b>0,12</b>	<b>0,26</b>	<b>0,18</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>

Die beschriebene Methode zur Bestimmung von SFD unter Verwendung des internen Standards SMP wurde wegen der gefundenen Signalsuppression des Weiteren auch auf die Quantifizierung ausgewählter Proben angewendet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 12.

#### 9.4.8 Standardaddition

Bei starken Matrixeffekten und niedrigen Analytgehalten, die bei der externen Kalibrierung im Bereich der Bestimmungsgrenze liegen, kann die Anwendung der Standardaddition zur korrekten Quantifizierung führen. Für die Bestimmung von SFD wurde die Standardadditions-Methode auf die Pflanzenproben angewendet, die auch mit IS gemessen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tab.12:** Vergleich der SFD-Gehalte in Pflanzen nach externer Kalibrierung, mit Internem Standard und Standardaddition, RR Möhrensorte „Rote Riesen“, PM Möhrensorte „Pariser Markt“

		SFD Gehalt [mg/kg]		
		Auswertung über		
Probe	Einwaage [g]	Standard-Addition	Interner Standard	Externe Kalibrierung
FB11 Feldsalat Blatt	5,15	<b>0,15</b> +/- 0,03	<b>0,097</b> +/-0,008	< BG
MB11 Möhre RR Blatt	5,16	<b>0,17</b> +/- 0,03	<b>0,052</b> +/- 0,002	< BG
MB 2 Möhre PM Blatt	5,19	<b>0,54</b> +/-0,19	<b>0,04*</b> +/- 0,003	< BG
MR 1 Möhre Rübe	5,17	<b>0,33</b> +/- 0,12	<b>0,21</b> +/- 0,04	< BG

\* Störung im LC-MS-System

Die SFD Gehalte der getesteten Proben sind mit der externen Kalibrierung nicht quantifizierbar, weil die Messwerte kleiner als die Bestimmungsgrenzen sind. Bei Anwendung der Standardaddition wurden vergleichsweise höhere Werte erhalten, als unter Verwendung eines internen Standards. Die Unterschiede liegen, mit einer Ausnahme (Möhre Blatt MB2 – bei der Messung trat eine Störung im MS-System auf), jedoch im akzeptablen Bereich. Die Standardabweichungen bei dem Additionsverfahren

sind im Vergleich mit den Fehlergrenzen bei der Anwendung eines Internen Standards größer. Bis zu 25 % höhere Gehalte werden bei der Anwendung des Standardadditionsverfahrens im Vergleich mit der externen Kalibrierung auch von Stüber und Reemtsma (2004) erhalten.

In der Routine eines Analysenlabors mit hohem Probendurchsatz wird das Standardadditions-Verfahren nur an ausgewählten Proben durchgeführt werden können, bei denen eine exakte Quantifizierung besonders wichtig ist, z.B. bei der Einhaltung von Grenzwerten in der Lebensmittelüberwachung. Denn die Durchführung des Verfahrens erfordert einen erheblichen Mehraufwand an Probenvorbereitung, Material und Messzeit. Einmal etabliert wird ein Bestimmungsverfahren mit Verwendung eines Internen Standards vermutlich ähnlich anwendbar sein, wie eine externe Kalibrierung.

Mit der beschriebenen Probenaufarbeitung bestehend aus ultraschallunterstützter Extraktion, Zentrifugation, Festphasenextraktion und einer externen Kalibrierung konnten nun die unterschiedlichen Pflanzenproben aufgearbeitet und mit der LC-MS-Rückstandsanalytik analysiert werden.

## **9.5 Aufnahmeexperimente mit unmarkierten Antibiotika in Hydrokultur**

### **9.5.1 Möhren**

#### **9.5.1.1 Aufnahme von SFD**

##### **Entwicklung**

Möhren wuchsen zufriedenstellend sowohl in Hydrokultur als auch in Erde, die mit dotierter Nährlösung gegossen wurde. In allen Kulturmedien wurden Rüben gebildet, wenn auch teils in kleiner Größe. In Hydrokultur bildeten die Möhren sehr viele Seitenwurzeln aus (Abb. 30 und 31 ).



**Abb. 30:**  
Möhren „Rote Riesen“: nach einer Woche  
in 2,5 mg/L SFD haltiger Nährlösung



**Abb. 31:**  
Möhren „Pariser Markt“: nach 2 Wochen: *links*  
Kontrolle, *rechts* mit 2,5 mg/L SFD in  
Nährlösung

### SFD-Gehalte in Möhren

In den Möhrenproben der Sorten „Rote Riesen“ und „Pariser Markt“, die bei unterschiedlichen Bedingungen (in dotierter Nährlösung und in Erde, die mit dotierter Nährlösung gegossen wurde) aufwuchsen, wurden die in Tab. 13a und b angegebenen SFD-Gehalte gefunden.

**Tab. 13a:** SFD-Gehalte in Möhren (Hydrokultur)

Gehalt SFD [mg/kg]		Pflanzenorgan	Zeit in Nährlösung [Tage]	Gehalt SFD in Nährlösung [mg/L]
Rote Riesen				
0,27	0,19	Wurzel	14	2,5
<NWG	<NWG	Blatt/Halm	14	2,5
<NWG	<NWG	Blatt/Halm	14	2,5
Pariser Markt				
	0,21	Wurzel	7	2,5
	3,39	Seitenwurzeln	7	2,5
	<NWG	Blatt/Halm	7	2,5

**Tab. 13b:** SFD-Gehalte in Möhren (Wuchs auf Erde, dotierte Gießlösung)

Gehalt SFD [mg/kg]		Pflanzenorgan	Gießzeit mit Nährlösung [Tage]	Gehalt SFD in Nährlösung [mg/L]
Rote Riesen				
<NWG	< BG	Blatt/Halm	21	2,5
<NWG	<NWG	Blatt/Halm	21	2,5
< BG	< BG	Rübe	21	2,5
< BG	< BG	Rübe	21	2,5
Pariser Markt				
	<NWG	Blatt/Halm	7	2,5
	<NWG	Blatt/Halm	21	2,5

Es ist festzustellen, dass mit Ausnahme der in Hydrokultur ausgebildeten Seitenwurzeln (Tab. 13a) die SFD-Aufnahme durch die anderen Pflanzenteile der Möhren äußerst gering ist. Vermutlich wird SFD in den Möhren im Apoplasten festgehalten (Heyser 2008).

### 9.5.1.2 Aufnahme von CTC / iso-CTC

#### Entwicklung

Die Kontrollmöhren sahen vital aus, bildeten viele Seitenwurzeln, neue Blätter und die Rüben wuchsen weiter. Beide Sorten, „Rote Riesen“ und „Pariser Markt“, bildeten auf 5 µmol/L CTC/iso-CTC haltiger Nährlösung relativ wenig Seitenwurzeln aus und die Rübe nahm nicht an Dicke zu. Es bildeten sich dennoch teilweise neue Blätter. Die Wurzeln waren verschleimt mit schwarzer Oberfläche und wirkten „krank“.

Erstaunlicherweise entwickelten sich die Rüben beider Sorten auf 10 µmol/L CTC/iso-CTC haltiger Nährlösung besser, als die Möhren aus den niedriger dotierten Ansätzen. Sie hatten weniger Seitenwurzeln gebildet als die Kontrollmöhren, jedoch mehr als bei 5 µmol/L. Auch nahmen die Rüben an Dicke zu und es bildeten sich neue Blätter. Möglicherweise hatten die Möhren aus den Hydrokulturversuchen mit 5 µmol/L CTC eine bakterielle Infektion, die bei höheren Antibiotika-Gehalten in der Nährlösung behoben war (Langenkämper 2006).

## CTC-Gehalte in Möhren

In den Seitenwurzeln der Möhren sind die Chlortetracyclin-Gehalte extrem hoch (Tab. 14), in den Rüben dagegen um Größenordnungen geringer (auch hier ist wieder eine „Ablagerung“ in Apoplastenbereichen zu vermuten). In den Blättern wird noch weniger Gesamt-CTC gefunden als in den Rüben. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{mol/L}$  CTC / iso-CTC in der Nährlösung lagen in Rüben und Blättern annähernd gleiche Gehalte vor. Deutliche Anteile von Epimeren und Iso-Komponenten sind ab 10  $\mu\text{mol/L}$  CTC/iso-CTC in den Möhrenproben nachweisbar. Der e-CTC-Gehalt bildet bis auf eine Ausnahme immer den geringsten Anteil am Gesamt-CTC-Gehalt, während CTC – auch im Vergleich zum iso-CTC – überwiegt.

Insgesamt sind Abhängigkeiten zwischen Antibiotikadotierung, Wachstumszeit und CTC-Gehalten in den einzelnen Pflanzenteilen festzustellen. Diese sind aber nicht einfach proportional, d.h. mit zunehmender Dotierung und Laufzeit nimmt der nachweisbare Gehalt an Antibiotika nicht automatisch weiter zu. Bei Blättern, Rübe und Rübenseitenwurzeln ergab sich das folgende Bild:

- Nur in den Blättern von Möhren, die auf 10  $\mu\text{mol/L}$  CTC/iso-CTC haltiger Hydrokultur wuchsen, nimmt der Gesamt-CTC-Gehalt mit der Wachstumszeit zu. Dieser Effekt beruht auf der Zunahme der iso- und e-iso-CTC-Gehalte, während sich die Gehalte an e-CTC und CTC verringern.
- In den Rüben und Seitenwurzeln von Möhren, die auf 10  $\mu\text{mol/L}$  CTC/iso-CTC haltiger Hydrokultur wuchsen, nimmt der Gesamt-CTC-Gehalt mit der Wachstumszeit erst zu und dann wieder ab. Dieser Befund könnte auf Metabolisierungsprozesse in den entsprechenden Pflanzenteilen hinweisen.
- Dagegen nehmen bei Wurzeln und Seitenwurzeln sowie den Blättern der 5  $\mu\text{mol/L}$ -Ansätze die Gesamt-CTC-Gehalte mit der weiteren Entwicklung der Möhren ab.

**Tab. 14:** CTC-Gehalte in Möhren, Sorte *Pariser Markt* (Hydrokultur mit unmarkierten Antibiotika) [mg/kg FG]

Organ	Dotierung [µmol/L]	Zeit [Wochen]	CTC	e-CTC	Summe CTC+ e-CTC	iso- CTC	e-iso- CTC	Summe iso + e-iso- CTC	Summe CTC total
<b>Blatt</b>	5	1	NN	0,24	0,24	NN	NN		<b>0,24</b>
		2	NN	0,17	0,17	NN	NN		<b>0,17</b>
<b>Blatt</b>	10	1	0,18	0,09	0,27	0,23	0,18	<b>0,41</b>	<b>0,68</b>
		2	0,10	0,07	0,17	0,39	0,40	<b>0,79</b>	<b>0,96</b>
<b>Rübe</b>	5	1	NN	0,24	0,24	NN	NN		<b>0,24</b>
		2	NN	0,20	0,20	NN	NN		<b>0,20</b>
<b>Rübe</b>	10	1	2,48	0,56	3,04	0,57	0,47	<b>1,04</b>	<b>4,08</b>
		2	0,56	0,15	0,71	0,41	0,29	<b>0,70</b>	<b>1,41</b>
<b>Seiten- Wurzel</b>	5	1	22,5	9,68	32,2	8,04	4,77	<b>12,81</b>	<b>45,0</b>
		2	4,30	NN.	4,30	1,40	0,84	<b>2,24</b>	<b>6,54</b>
<b>Seiten- Wurzel</b>	10	1	>400	6,17	>400	60,1	36,3	<b>96,37</b>	<b>&gt;500</b>
		2	181,1	2,30	183,4	22,2	12,9	<b>35,11</b>	<b>218,5</b>

Diese Effekte sollten insgesamt nicht überinterpretiert werden, da wegen teilweise geringer Mengen des inhomogenen Pflanzenmaterials nur eine begrenzte Repräsentativität der Probenzusammensetzung erreichbar war. Ebenso ist unklar, welche Anteile der einzelnen Epimeren und Isomeren des Chlortetracyclins im Pflanzenstoffwechsel oder als Artefakte der Probenvorbereitung zuzuordnen sind oder über die Wurzel tatsächlich aufgenommen wurden. Aufgrund der Ergebnisse mit der entwickelten LC-MS Methode konnte jedoch eindeutig festgestellt werden, dass Möhren Antibiotika aufnehmen. Diese Befunde weisen auch darauf hin, dass Antibiotika in den einzelnen Pflanzenteilen von Möhren unterschiedlich umgesetzt werden.

## 9.5.2 Feldsalat

### 9.5.2.1 Aufnahme von SFD

#### Entwicklung

Die Feldsalatpflanzen unterschieden sich in den ersten 2 Wochen Wachstum augenscheinlich nicht auf dotierter Nährlösung und nicht-dotierter Nährlösung. Sie bildeten ebenso viele Blattpaare und die Blattfarbe war ebenfalls ähnlich. Nach 2 wöchigem Wachstum auf dotierter Nährlösung setzte Verschleimung der Wurzeln ein, und die Blätter bildeten braune Blattränder. Die Feldsalatpflanzen bildeten nicht mehr so viele neue Blattpaare wie die Kontrollpflanzen und die Blattfarbe änderte sich von grün zu gelb-grün. Nach dreiwöchigem Wachstum auf SFD-haltiger Nährlösung sahen die Feldsalat-Pflanzen geschädigt aus (Abb. 32).



**Abb. 32:**  
Feldsalat nach 2 Wochen auf 2,5 mg/L  
SFD –haltiger Nährlösung



**Abb. 33:**  
Feldsalat nach 3 Wochen: *oben* mit 2,5  
mg/L SFD-haltiger Nährlösung, *unten*:  
ohne SFD-Dotierung; Kontrollversuch

In anderen Versuchen wurde jedoch kein Einfluss von Sulfadiazin auf die Pflanzenentwicklung von z.B. Kopfsalat festgestellt (Boxall et al. 2006).

#### SFD-Gehalte in Feldsalat

In den analysierten Feldsalatproben wurden deutlich höhere Gehalte in den Wurzeln als in den Blättern nachgewiesen (Tab. 15).

**Tab. 15:** SFD-Gehalte in Feldsalat (Hydrokultur), zwei Proben, Mittelwerte aus zwei Injektionen

Gehalt SFD [mg/kg FG]		Pflanzenorgan	Zeit [Tage]	Gehalt SFD in Nährlösung [mg/L]
Probe 1	Probe 2			
0,69	n.a.	Wurzel	7	2,5
0,06	0,01	Blatt	7	2,5

n.a.: nicht auswertbar, da Retentionszeitverschiebung > 2 min

Über Abhängigkeiten der SFD-Aufnahme von der Dotierungskonzentration sind auf Grund der geringen Probenzahl keine Aussagen zu treffen.

### 9.5.2.2 Aufnahme von CTC / iso-CTC

#### Entwicklung

Feldsalat wuchs auf CTC / iso-CTC-haltiger Nährlösung ohne Unterschied zu nicht-dotierter Nährlösung. Das gilt für Wurzeln und Blätter, die grün und vital aussahen. Visuell war kein Unterschied zu den Kontrollpflanzen festzustellen.

#### CTC / iso-CTC -Gehalte in Feldsalat

Die in den Feldsalatproben gefunden Gehalte an den unterschiedlichen Chlortetracyclinen sind in Tab. 16 zusammengefaßt und ergänzend in Abb. 13 dargestellt. Die Analysendaten belegen, dass der dotierte Wirkstoff CTC und die iso-Form während des Wachstums der Feldsalatpflanzen nachgewiesen werden. In den Wurzeln finden sich erheblich höhere CTC/iso-CTC- Gehalte als in den Blättern.

Mit zunehmender Zeit auf dotierter Nährlösung und mit der Konzentration an Chlortetracyclinen nehmen die CTC/iso-CTC-Gehalte in den Wurzeln zu.

**Tab. 16:** CTC-Gehalte in Feldsalat (Hydrokultur)[mg/kg FG]

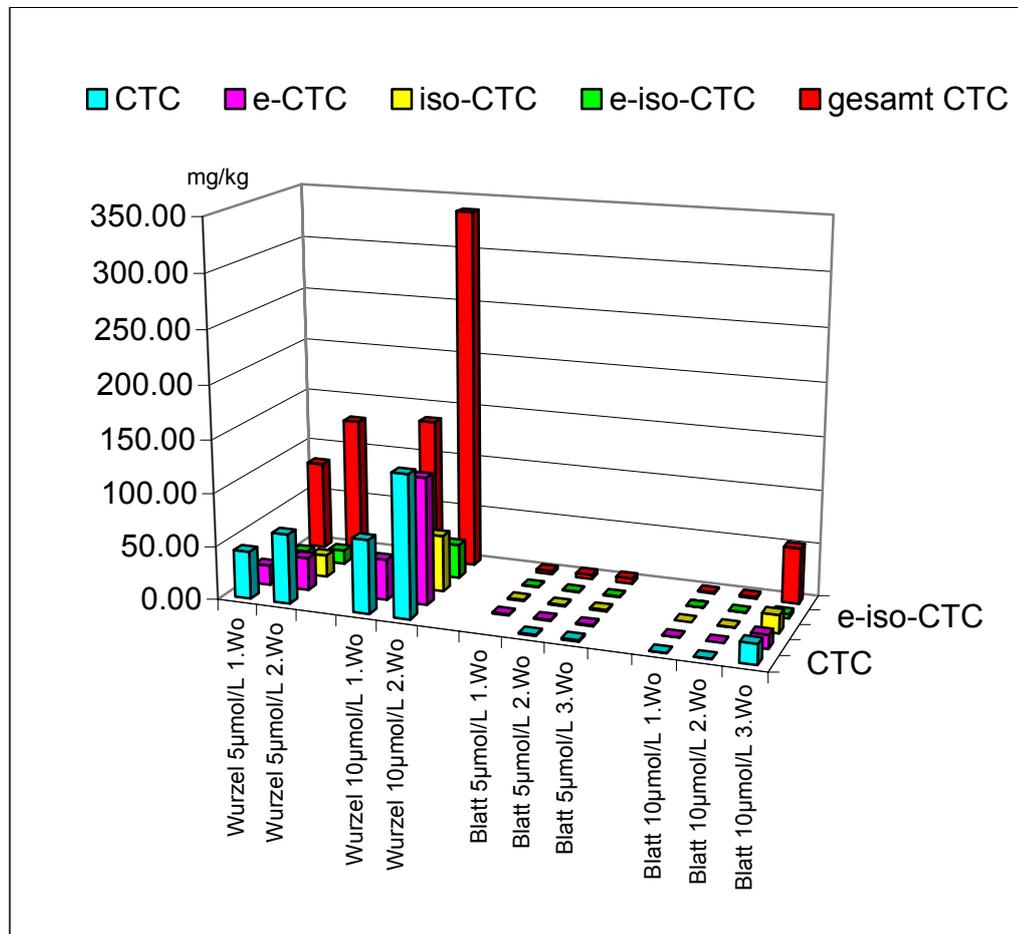
Organ	Dotierung [µmol/L]	Zeit [Woche]	CTC	e-CTC	Summe CTC+ e-CTC	iso- CTC	e-iso- CTC	Summe iso-CTC + e-iso- CTC	Summe CTC total	Verhältnis $\frac{\text{CTC}}{\text{iso-CTC}}$
<b>Blatt</b>	5	1	NN	1,05	1,05	1,31	0,74	2,05	<b>3,10</b>	0,51
		2	1,27	0,96	2,23	1,19	0,67	1,86	<b>4,09</b>	1,2
		3	1,5	1,18	2,72	1,50	0,85	2,35	<b>5,07</b>	1,16
<b>Blatt</b>	10	1	0,35	0,20	0,55	0,21	0,18	0,39	<b>0,94</b>	1,41
		2	0,40	0,20	0,60	0,45	0,45	0,90	<b>1,50</b>	0,67
		3	18,9	12,7	31,7	16,7	3,90	20,7	<b>52,3</b>	1,53
<b>Wurzel</b>	5	1	44,6	18,8	63,5	12,8	7,6	20,3	<b>83,8</b>	3,15
		2	65,5	30,5	96,0	20,6	13,1	33,8	<b>129,8</b>	2,85
		3	n.a.	n.a.		>11,4	>8,00			
<b>Wurzel</b>	10	1	69,2	38,2	107,4	11,2	17,9	29,1	<b>136,5</b>	3,7
		2	133,8	119,3	253,1	52,8	32,10	84,9	<b>338,0</b>	3,0
		3	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.			

n.a.: nicht auswertbar, charakteristische Peaks bei stark verschobenen Retentionszeiten >2 min.

Innerhalb der dreiwöchigen Wachstumszeit auf mit 5 µmol/L CTC/iso-CTC-dotierter Nährlösung erhöht sich stetig der CTC / iso-CTC Gehalt in den Blättern. Dieses gilt auch bei verdoppelter Konzentration, allerdings nicht in linearem Verhältnis. Ob der sprunghafte Anstieg der Gehalte in den Blättern nach der dritten Woche um den Faktor 35 physiologisch bedingt ist, oder ein analytischer Artefakt, ist nicht entscheidbar.

Auffällig ist, dass sich der Quotient der Massenanteile (CTC : iso-CTC) während des Transportes von den Wurzeln (ca. 3) in die Blätter (ca. 1) deutlich zu Gunsten des iso-CTC's verschiebt. Möglicherweise isomerisiert CTC während des Transportes in die Blätter zu iso-CTC, oder es wird tatsächlich, wie anhand des höheren Oktanol/Wasserverteilungskoeffizienten zu erwarten wäre, mehr iso-CTC in höhere Pflanzenteile

transportiert. Dieses kann hier nicht entschieden und nur durch weitere Untersuchungen herausgefunden werden.



**Abb. 34:** Chlortetracyclin-Gehalte in Feldsalat als Funktion des Pflanzenorgans, der Zeit und CTC/iso-CTC-Dotierung

## 9.5.3 Winterweizen

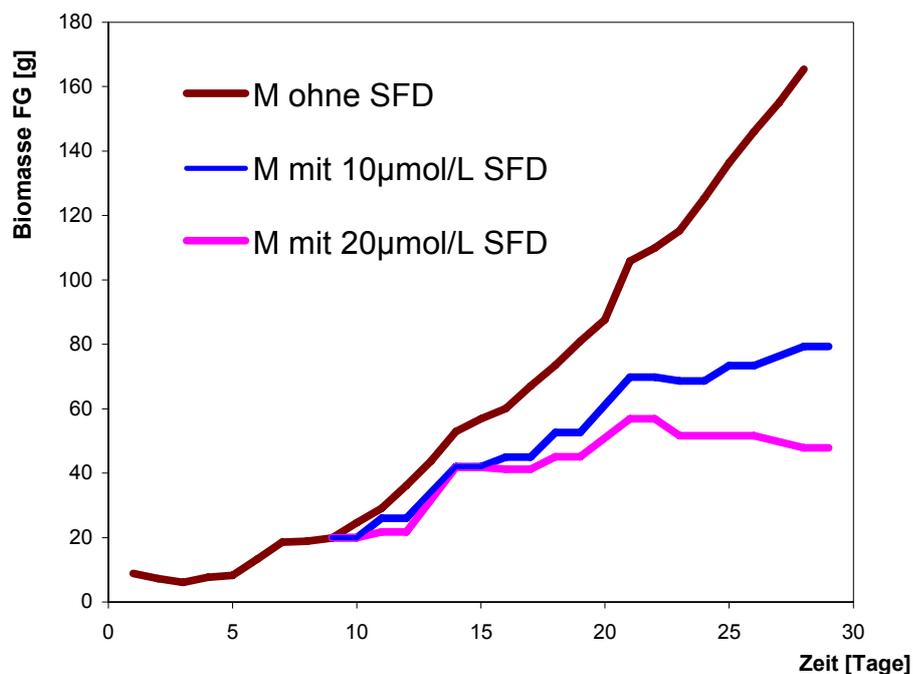
### 9.5.3.1 Aufnahme von SFD

#### Entwicklung

Die Weizenpflanzen, die auf SFD-dotierter Nährlösung wuchsen, sehen im Vergleich zu Kontrollproben dunkler grün aus und bilden mehr braune Blattspitzen. Je höher die SFD-Konzentration in der Nährlösung, desto mehr braune Blattspitzen wurden gebildet und desto dunkler erschienen die Pflanzen. Die Größe der Pflanzen war dabei vermindert (Abb. 35).



**Abb 35:** Winterweizenpflanzen nach 2 Wochen in SFD-dotierter Nährlösung, links: kein SFD, Mitte: 2,5 mg/L SFD, rechts: 5 mg/L SFD  
Diese Beobachtungen korrelieren positiv mit der in Abb.36 gezeigten Entwicklung der Biomasse (Frischgewicht) der Winterweizenpflanzen über einen Zeitraum von 30 Tagen. Die Dotierung der Nährlösung mit SFD erfolgte am 8. Tag in zwei Konzentrationen: 10µmol/L entsprechend 2,5 mg/L und 20 µmol/L entsprechend 5 mg/L.



**Abb. 36:** Biomasseentwicklung von Winterweizen auf SFD- dotierter Nährlösung  
Pflanzen, die in dotierter Nährlösung wuchsen, nahmen im Vergleich zu den Kontrollproben in Abhängigkeit von der SFD-Konzentration weniger an Biomasse zu.

### SFD-Gehalte in Winterweizen

In Wurzeln des Winterweizens, der auf dotierter Nährlösung wuchs, wurde Sulfadiazin nachgewiesen (Tab. 17). Mit länger andauernder Wachstumszeit steigen die SFD-Gehalte

der Pflanzenproben. Eine ähnliche Wirkung erzeugt die Erhöhung der Wirkstoff-Konzentration.

**Tab. 17:** SFD-Gehalte in Wurzeln von Winterweizen

Gehalt SFD [mg/kg FG]		Zeit [Tage]	Gehalt SFD in Nährlösung [mg/L]
Probe 1	Probe 2		
2,27	-	14	2,5
3,17	3,35	21	2,5
6,58	5,92	14	5
10,3	8,36	21	5
9,56	-	7	7,5
9,0	-	14	7,5
18,3	-	21	7,5
7,1	-	7	10
10,4	-	14	10

In den analysierten Blatt- bzw. Halmproben sind Spuren von SFD nachweisbar, so dass angenommen werden muss, dass ein Transport von SFD von der Wurzel in die Blätter stattfand. Erneut zeigt sich, wie bei den Wurzeln, eine Zunahme des SFD-Gehaltes mit der Zeit und mit der Konzentration in der Nährlösung (Tab. 18).

**Tab. 18:** SFD-Gehalte in Halm/Blatt-Proben von Winterweizen

Gehalt SFD [mg/kg FG]				Zeit [Tage]	Gehalt SFD in Nährlösung [mg/L]
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4		
0,01	0,02	0,02	0,02	7	2,5
0,04	0,03	0,03	0,04	14	2,5
0,03	0,08	0,15	0,05	21	2,5
0,07	0,06	-	-	7	5
0,16	0,18	0,12	-	14	5
0,22	-	-	-	21	5

### 9.5.3.2 Aufnahme von CTC / iso-CTC

#### Entwicklung

Die Blätter der Pflanzen, die auf CTC/iso-CTC-haltiger Nährlösung wachsen, sehen vergleichsweise dunkler grün aus, sind im Wuchs kleiner und bilden mehr braune Blattspitzen (Abb. 37) als die Kontrollpflanzen.

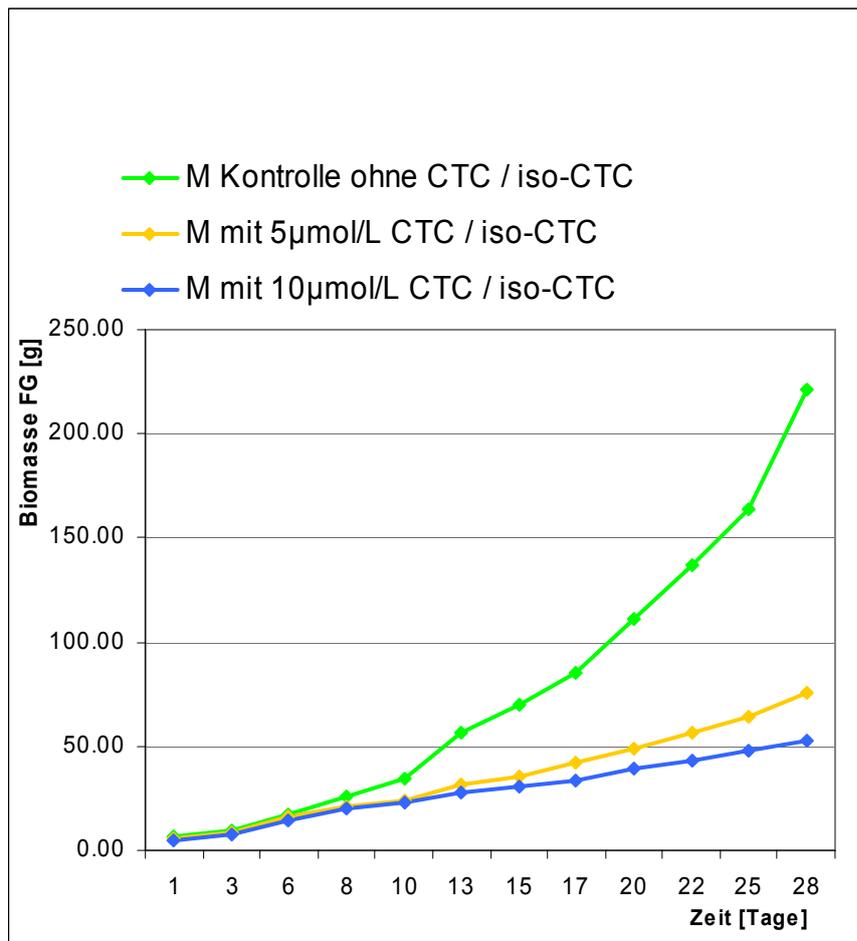


**Abb. 37:** Winterweizen, nach 2 Wochen in CTC/-iso-CTC-dotierter Nährlösung, rechts: Kontrolle, links: 5 µmol/L CTC / iso-CTC.

Die Wurzeln der arzneistoff-dotiert in Hydrokultur aufgewachsenen Pflanzen sind im Vergleich zu den Wurzeln der Kontrollpflanzen dunkler und gelb verfärbt. Die Pflanzen bilden anscheinend weniger Wurzelmasse aus.

Die Abbildung 38 zeigt die Entwicklung der Biomasse von Winterweizenpflanzen (Frischgewicht, FG) über 30 Tage ohne Dotierung der Nährlösung und nach Dotierung am 7. Tag. Die Zusätze an CTC und iso-CTC lagen bei 5 und 10 µmol/L.

Der Zusammenhang zwischen reduziertem Wachstum und Chlortetracyclin-Konzentration ist ähnlich deutlich ausgeprägt wie beim Sulfonamid (Abb. 36). Von einem vermindertem Wachstum von Möhren und Kopfsalat in Topfexperimenten unter dem Einfluss von Phenylbutazon, Oxytetracyclin und Enrofloxacin wird auch von Boxall et al. (2006) berichtet.



**Abb. 38:** Biomasseentwicklung von Winterweizen auf CTC/iso-CTC- dotierter Nährlösung

### CTC-Gehalte in Winterweizenpflanzen

Die ermittelten Gehalte an CTC-Komponenten in Pflanzenbestandteilen des Winterweizens, der auf CTC/iso-CTC-haltiger Nährlösung wuchs, sind in Tab. 19 zusammengestellt.

**Tab. 19:** CTC-Gehalte in Wurzeln und Blättern von Winterweizen (Hydrokultur) [mg/kg FG]

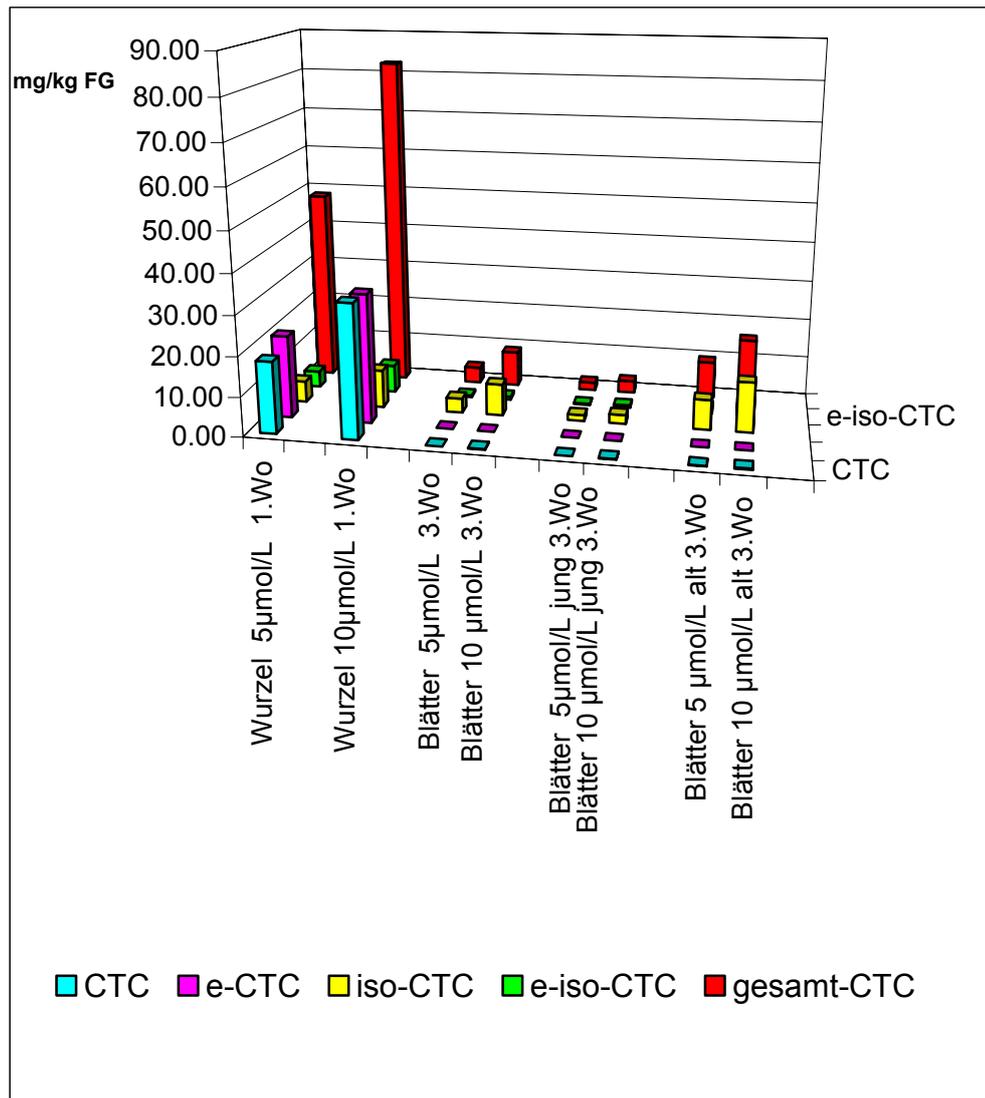
Organ	Dotierung [µmol/L]	Zeit [Wo]	CTC	e-CTC	Summe CTC+e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	Summe iso+e-iso-CTC	Summe CTC total	Verhältnis $\frac{\text{CTC}}{\text{iso-CTC}}$
<b>Wurzeln</b>	5	1	18,1	20,7	38,8	5,3	4,12	9,42	<b>48,3</b>	4,1
<b>Wurzeln</b>	10	1	33,6	32,5	66,1	9,6	7,04	16,6	<b>82,7</b>	3,9
<b>Blätter</b>	5	3	NN	NN	NN	3,6	0,42	4,0	<b>4,03</b>	< 0,1

**Fortsetzung Tab. 19: CTC-Gehalte in Wurzeln und Blättern von Winterweizen**

(Hydrokultur) [mg/kg]

Organ	Dotierung [μmol/L]	Zeit [Wo]	CTC	e- CTC	Summe CTC+ e-CTC	iso- CTC	e-iso CTC	Summe iso- CTC+e- iso-CTC	Summe CTC total	Verhältnis <u>CTC</u> iso-CTC
<b>Blätter</b>	10	3	0,14	NN	0,14	7,9	0,81	8,8	<b>8,91</b>	< 0,1
										Verhältnis <u>iso-CTC</u> CTC
<b>Blätter jung</b>	5	3	~0,1	NN	0,10	1,5	0,34	1,87	<b>1,97</b>	18,7
<b>Blätter jung</b>	10	3	0,15	NN	0,15	2,2	0,62	2,86	<b>3,01</b>	19,1
<b>Blätter alt</b>	5	3	0,12	NN	0,12	7,5	1,76	9,33	<b>9,45</b>	77,8
<b>Blätter alt</b>	10	3	0,30	NN	0,30	12,7	2,89	15,6	<b>15,8</b>	51,9

Die mehrfach gefundene Abhängigkeit zwischen Konzentration und Aufnahme von Arzneistoffen durch die Pflanze findet sich erneut bei den vorgefundenen Chlortetracyclin-Belastungen in Wurzeln und Blättern von Winterweizen bestätigt. Im Vergleich zu den SFD-Dotierungen ist die Aufnahme an Chlortetracyclinen erheblich höher (vergl. Tab. 17 und 18).



**Abb. 39:** Chlortetracyclin-Gehalte in Winterweizen als Funktion des Pflanzenorgans, der Zeit und CTC/iso-CTC-Dotierung

Besonders auffällig sind die unterschiedlichen Gehalte an CTC und iso-CTC in den einzelnen Organen der Weizenpflanzen (Abb. 39). In den Wurzeln findet sich mehr CTC als iso-CTC. Nach einer Woche Entwicklungszeit auf dotierter Nährlösung beträgt das Verhältnis CTC zu iso-CTC in Wurzeln etwa 4, wobei dieser Wert bei beiden, unterschiedlich dotierten Nährlösungen (5 und 10 µmol/L) gefunden wird.

In den Blättern von Winterweizen wurde im Unterschied zu den Wurzeln mehr iso-CTC als CTC nachgewiesen. Nach drei Wochen Wachstum auf dotierter Nährlösung beträgt das Verhältnis iso-CTC zu CTC in jungen Blättern ca. 19 (bei 5 und 10 µmol/L CTC/iso-CTC). In älteren Blättern wurde sogar die 52 bis 78-fache Menge an iso-CTC vorgefunden.

Diese Befunde stehen mit den Modellrechnungen auf Basis des Oktanolverteilungskoeffizienten im Einklang. Danach wurde für iso-CTC der höchste  $pK_{ow}$ -Wert berechnet. Die größere Lipophilie erleichtert den symplasmatischen Transport, wodurch diese Komponente im Vergleich zu den anderen Arzneistoffen vermehrt über die Endodermis in höhere Pflanzenteile transportiert werden kann.

Hinzu kommt eine mögliche Isomerisierungstendenz von CTC, wonach pflanzenintern eine Umwandlung von CTC in iso-CTC denkbar ist, aber nicht umgekehrt. Welcher Anteil an dem höheren iso-CTC-Gehalt in Blättern aus der möglichen höheren Transportrate und welcher Anteil möglicherweise pflanzenintern als Ergebnis durch Umlagerungen von CTC, resultiert, kann hier nicht entschieden werden.

Insgesamt konnte aufgrund mit der entwickelten LC-MS Methode nachgewiesen werden, dass Winterweizen Antibiotika aufnimmt. Dabei konnte eine denkbar einfache Korrelation zwischen Antibiotikakontamination der Nährlösung, Wachstumszeit und Antibiotikaaufnahme festgestellt werden: je mehr Antibiotika sich in der Nährlösung befanden und je länger die Pflanze in der Nährlösung verblieb, desto mehr Antibiotika nahm die Pflanze auch auf. Dieser Befund ergab sich sowohl in Bezug auf die Wurzeln, als auch in Bezug auf das entwickelte Blattmaterial. Ob sich diese Korrelation auch bei noch längeren Zeiträumen und Kontaminationen fortsetzt, oder ob die Antibiotikamengen in der Pflanze bei längeren Wachstumszeiten und höheren Kontaminationen ggf. durch Metabolisierung wieder abnehmen, ist noch nicht untersucht (vgl. die entsprechenden Befunde bei Möhren).

## **9.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung und der Aufnahmeexperimente mit unmarkierten Antibiotika**

Zielsetzung der Arbeit war insbesondere die Entwicklung einer Analysenmethode zum Nachweis von Antibiotika in Nutzpflanzen und die Anwendung dieser Methode auf ausgewählte Nutzpflanzen, die unter Laborbedingungen gezogen worden waren. Im Rahmen des „Antiinfektiva-Projektes“ (Grote et al. 2005) wurden mit dieser Methode auch Feldpflanzen analysiert. In den vorhergehenden Kapiteln 8 und 9 wurde diese Methode beschrieben und die Ergebnisse der Anwendung auf Winterweizen (Wurzeln und Grünanteile) sowie Möhren und Feldsalat dargestellt.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass alle unter Hydrokulturbedingungen entwickelten Nutzpflanzen Antibiotika aufgenommen haben. Das in der Landwirtschaft besonders häufig eingesetzte Antibiotikum CTC wird dabei im Vergleich zum SFD stärker über die Wurzel aufgenommen. Bei den untersuchten Pflanzen und Pflanzenteilen wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Im Gegensatz zu Möhren, wirken sich Antibiotika unter den gewählten Hydrokulturbedingungen bei Winterweizen und Feldsalat negativ auf die Pflanzenentwicklung aus. Diese Pflanzen haben sich mit Antibiotika schlechter entwickelt als ohne Antibiotika. Bei ihnen gilt auch die folgende Faustformel: Je höher die Dotierungskonzentrationen waren und je länger die Pflanzen den Antibiotika ausgesetzt waren, desto mehr haben sie auch über die Wurzel aufgenommen und in der Pflanze transportiert, so dass Grünanteile, sowie junge und alte Blätter, von Winterweizen und Feldsalat entsprechend höhere Gehalte an Antibiotika aufwiesen. Bei Möhren wurde dieser Zusammenhang nur bei den Blättern festgestellt. Bei den Rüben und Seitenwurzeln der Möhre wurde dem gegenüber bei verlängerter Wachstumsphase in Antibiotika-Nährlösung niedrigere Gehalte analysiert. Dieser Befund könnte auf verstärkt stattfindende Metabolisierungen innerhalb dieser Pflanzenteile hinweisen.

Ausgewählte Pflanzen wurden deshalb auf Metabolite analysiert, was im folgenden Kapitel beschrieben wird.

## 9.6 Metabolisierung von Chlortetracyclin in Pflanzen

### 9.6.1 Einführung

Da CTC von allen untersuchten Pflanzen in deutlich höherem Maße aufgenommen wurde als SFD, konzentrierte sich der Nachweis von Metaboliten aus analytischem Grunde auf mögliche CTC-Metabolite. Die Suche nach Metaboliten wurde auf Grundlage der entwickelten HPLC-MS-Methode durchgeführt. An ausgewählten Proben mit positiven Befunden wurden zur Absicherung MS<sup>n</sup> Experimente mit einem hochauflösenden FTICR-MS des ISAS, Institute of Analytical Science, Dortmund, durchgeführt.

### 9.6.2 Mögliche Metabolite von CTC

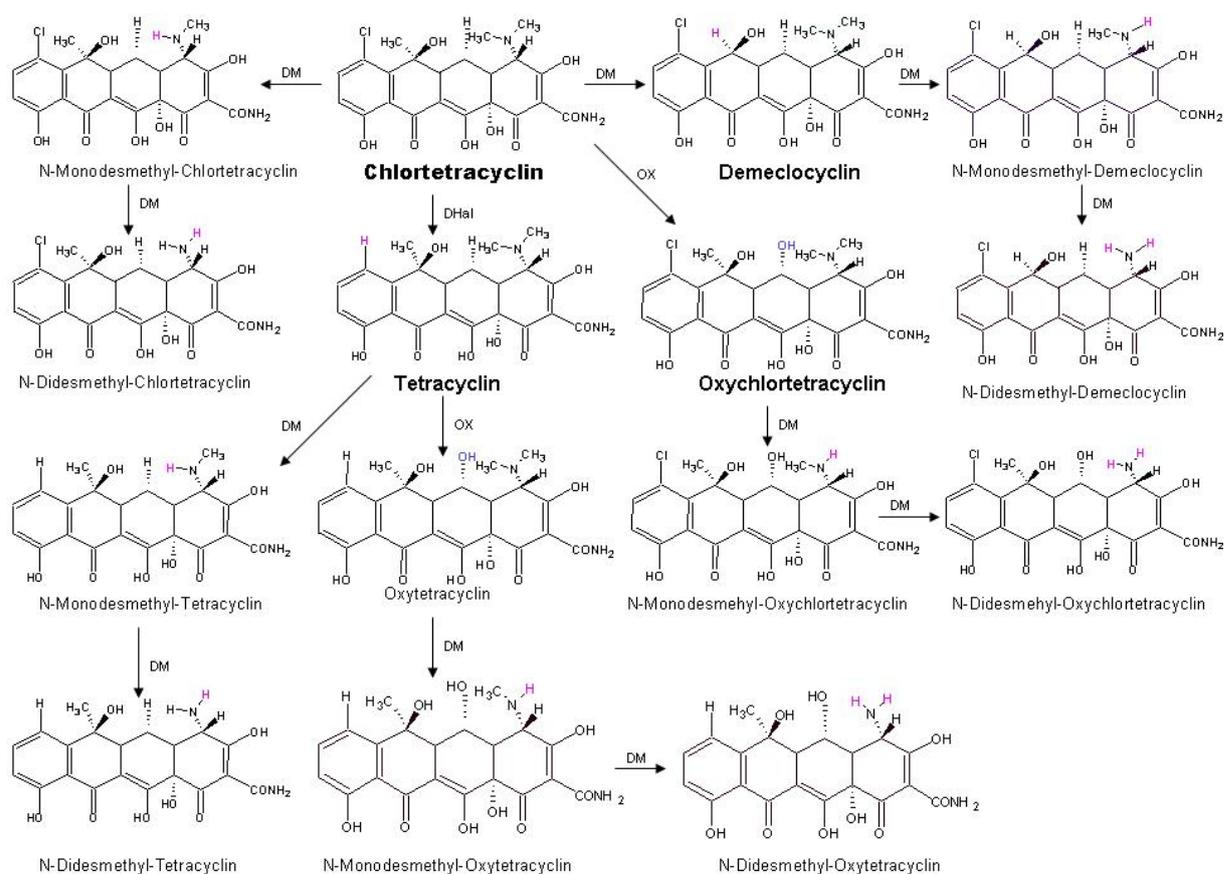
Pflanzen besitzen kein Ausscheidungsorgan. Einmal in die Pflanze aufgenommen, unterliegen Xenobiotika verschiedenen Transformationen (vgl. Abb. 8). Sie oder ihre Umsetzungsprodukte können in Zellkompartimente (Zellwände) eingebaut oder metabolisiert werden. Dabei werden sie in der Pflanze durch oxidative und reduktive enzymatische Prozesse umgesetzt. Als Beispiel sei hier der Abbau von Trichlorethylen in Weiden (*Hybrid popular*) erwähnt. Die am meisten auftretenden Produkte sind das oxidativ entstandene Trichlorethanol, Trichloressigsäure und die Dichloressigsäure (Newman 1997), vgl. auch Kapitel 6.

Aus Chlortetracyclin können sich grundsätzlich verschiedene Produkte durch Oxidation, Demethylierung und Dehalogenierung bilden (Coupland 1991), (Abb.8). Weil im Molekül nur ein Chloratom vorhanden ist, kann auch nur *ein dehalogeniertes Produkt* auftreten, nämlich Tetracyclin. Anders sind die Verhältnisse bei einer möglichen Demethylierung. Im Molekül sind mehrere Methylgruppen vorhanden, deshalb könnten auch mehrere einfach demethylierte Metabolite (s.u.) auftreten. Denkbar sind auch mehrfach demethylierte Produkte (vgl. Abb.40). Durch *Oxidation* könnte aus CTC primär ein oxydiertes Molekül mit einem Sauerstoffatom mehr als beim CTC entstehen. Weitere mögliche Oxidationen können zu Keto-, Aldehyd- und Säurefunktionen führen (Korte 2000).

Durch Oxidation, Demethylierung und Dehalogenierung von CTC ist hypothetisch die Bildung der in Abb. 40 dargestellten Verbindungen denkbar. CTC kann an zwei Stellen *demethyliert* werden: Am C-Ring oder am Stickstoff der Aminogruppe des A-Ringes. Es würden daraus Demeclocyclin oder N-Monodesmethyl-CTC entstehen. Weitere *Demethylierungen* könnten stattfinden zu N-Monodesmethyl-Demeclocyclin oder N-Didesmethyl-CTC.

Die *Oxidation* von Chlortetracyclin muss nicht zwangsläufig zu einer OH-Gruppe am B-Ring führen (vgl. Abb. 2), prinzipiell sind alle primären, sekundären und tertiären C-Atome des Chlortetracyclin oxidierbar. Die durch Oxidation oder Dehalogenierung von CTC entstehenden Verbindungen Oxy-CTC oder TC können ebenfalls wieder demethyliert werden.

Weiterhin können neben den in der Abb. 40 dargestellten Metaboliten auch deren Epimere (räumliche Anordnung von  $-H$  und  $-N(CH_3)_2$  am A-Ring-System unterschiedlich) und Tautomere (keto- / enol-Verbindungen) auftreten.

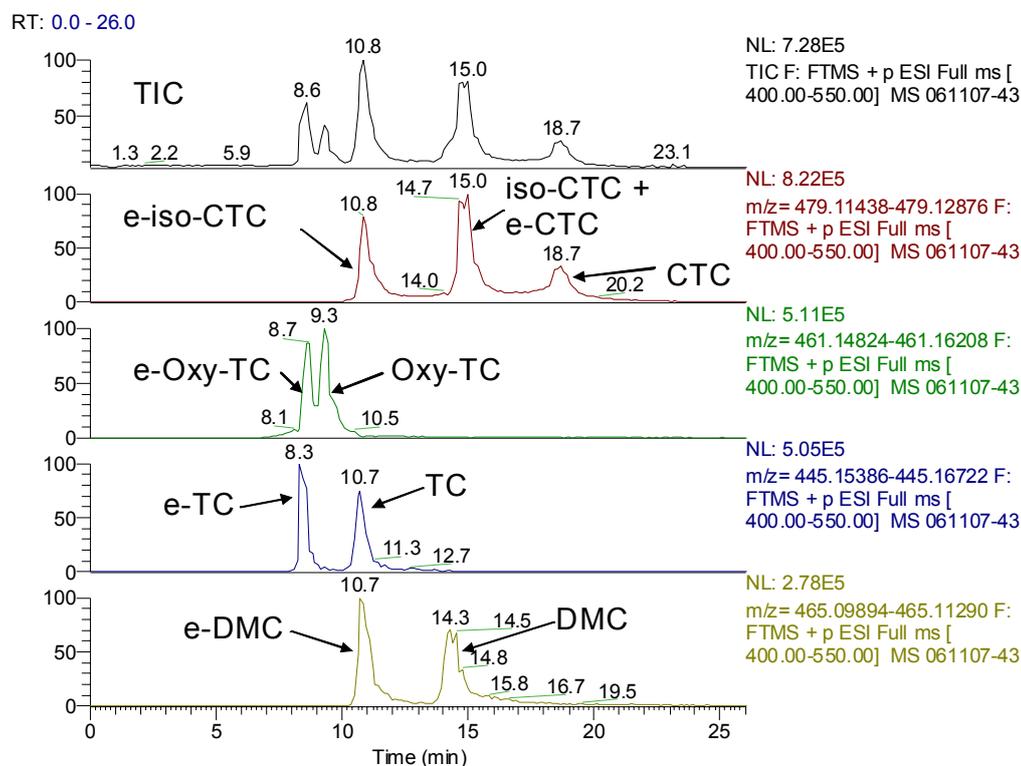


**Abb. 40:** Ausgewählte, mögliche Metabolite von CTC (oben 2. v.li.) durch Dehalogenierung (DHal), Demethylierung (DM) und Oxidation (OX). (Weitere Produkte sind möglich, insbesondere weitere oxidierte Produkte).

Es sind somit eine Vielzahl von Metaboliten möglich, die teilweise exakt gleiche Molekülmassen besitzen (z.B. Demeclocyclin und N-Monodesmethyl-CTC).

Um eine Identifizierung der Metabolite von CTC in pflanzlichen Proben vornehmen zu können, ist der Vergleich mit Chromatogrammen und mit MS-Spektren der Referenzsubstanzen nötig. Die Chromatogramme der zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen sind in der Abb. 41 dargestellt. Für die am Stickstoff demethylierten

Verbindungen N-Desmethyl-CTC und N-Didesmethyl-CTC sowie dem Oxidationsprodukt Oxy-CTC stehen aber keine Standards zur Verfügung.



**Abb.41:** Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) und die einzelnen Massenspektren einer Standard-Mischung von CTC, iso-CTC, e-iso-CTC, Oxy-TC, TC und DMC mit einer Konzentration von jeweils 1mg/L in Acetonitril (FTICR-MS).

Es ist anzunehmen, dass Oxy-CTC und N-Monodesmethyl-CTC, ebenso wie andere Tetracycline unter  $\text{NH}_3$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Abspaltung fragmentieren (Zurhelle 2000 und 2000a). Außerdem sollten die Retentionszeiten denen der anderen Tetracycline ähneln. Auf Grund einer Polaritätszunahme beim Oxy-TC im Vergleich mit dem TC müsste sich zum Beispiel die Retention zu kürzeren Zeiten verschieben, welches in der Abb.41 zu sehen ist. Die mit dem zugehörigen Kalkulationsprogramm des FTICR-MS-Gerätes kalkulierten exakten Massen der möglichen Metabolite von CTC sind in der Tabelle 20 aufgelistet.

**Tab. 20:** Berechnete exakte Massen der Metabolite von CTC

Verbindung	Abkürzung	Summenformel	m/z [M] Monoisotope n-masse	m/z [M+H] <sup>+</sup> Quasimolekül- ion
Oxychlortetracyclin	Oxy-CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	494.1092078	495.1164844
Chlortetracyclin	CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	478.1142932	479.1215698
Oxytetracyclin	Oxy-TC	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	460.1481801	461.1554567
Tetracyclin	TC	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	444.1532655	445.1605421
N-Monodesmethyl- Oxychlortetracyclin		C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	480.0935577	481.1008343
Demeclocyclin	DMC	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	464.0986431	465.1059197
N-Monodesmethyl- Chlortetracyclin	N- Monodesmethyl -CTC	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	464.0986431	465.1059197
N-Monodesmethyl- Tetracyclin		C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	430.1376155	431.1448921
N-Monodesmethyl- Oxytetracyclin		C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	446.1325301	447.1398067
N-Didesmethyl- Oxychlortetracyclin		C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	466.0779077	467.0851843
N-Monodesmethyl- Demeclocyclin		C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	450.0829931	451.0902697
N-Didesmethyl- Chlortetracyclin	N-Didesmethyl- CTC	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	450.0829931	451.0902697
N-Didesmethyl- Oxytetracyclin		C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	432.1168800	433.1241566
N-Didesmethyl- Tetracyclin		C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	416.1219654	417.1292420
N-Didesmethyl- Demeclocyclin		C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	436.0673430	437.0746196

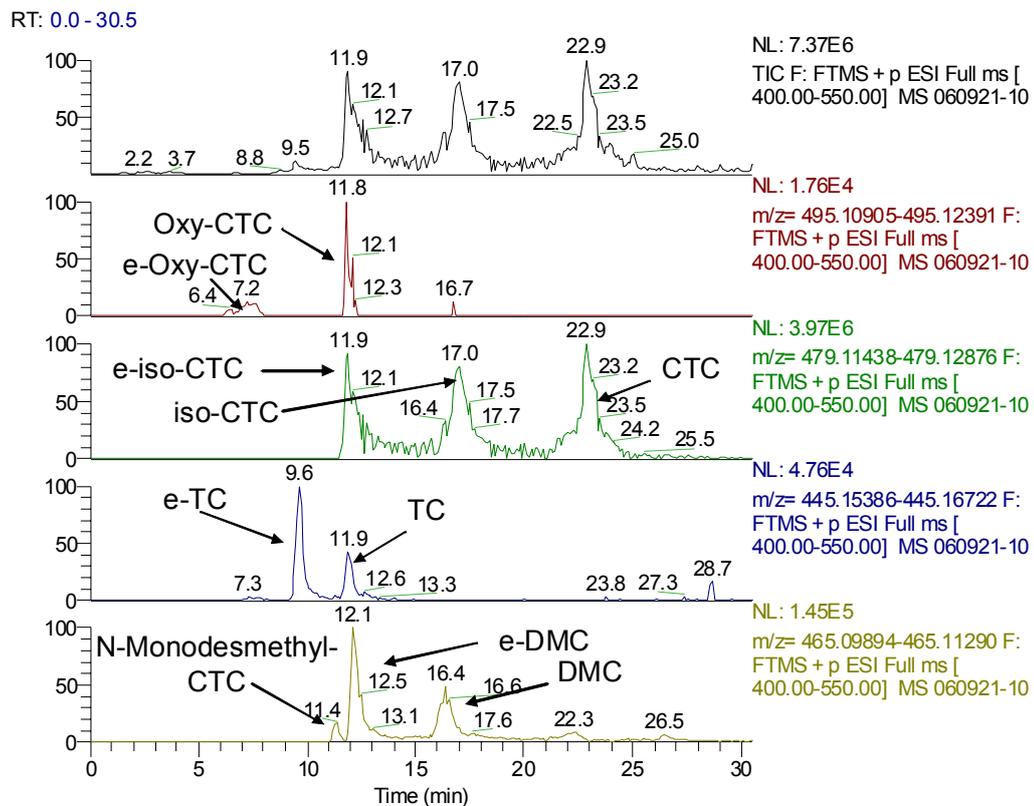
Die exakten Massen der Verbindungen (Monoisotopenpeak) sind berechnet worden mit dem jeweils häufigsten Isotop der beteiligten Elemente, im Unterschied zu mittleren Molmassen, die unter Berücksichtigung der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente berechnet werden.

### 9.6.3 Nachgewiesene Metabolite von CTC

Die Ergebnisse werden im ersten Teil dieses Kapitels anhand einer Wurzelprobe von Weizen exemplarisch im Detail dargestellt. Im nächsten Abschnitt findet sich dann eine Übersicht über die Ergebnisse aller untersuchten Proben auf Metabolite.

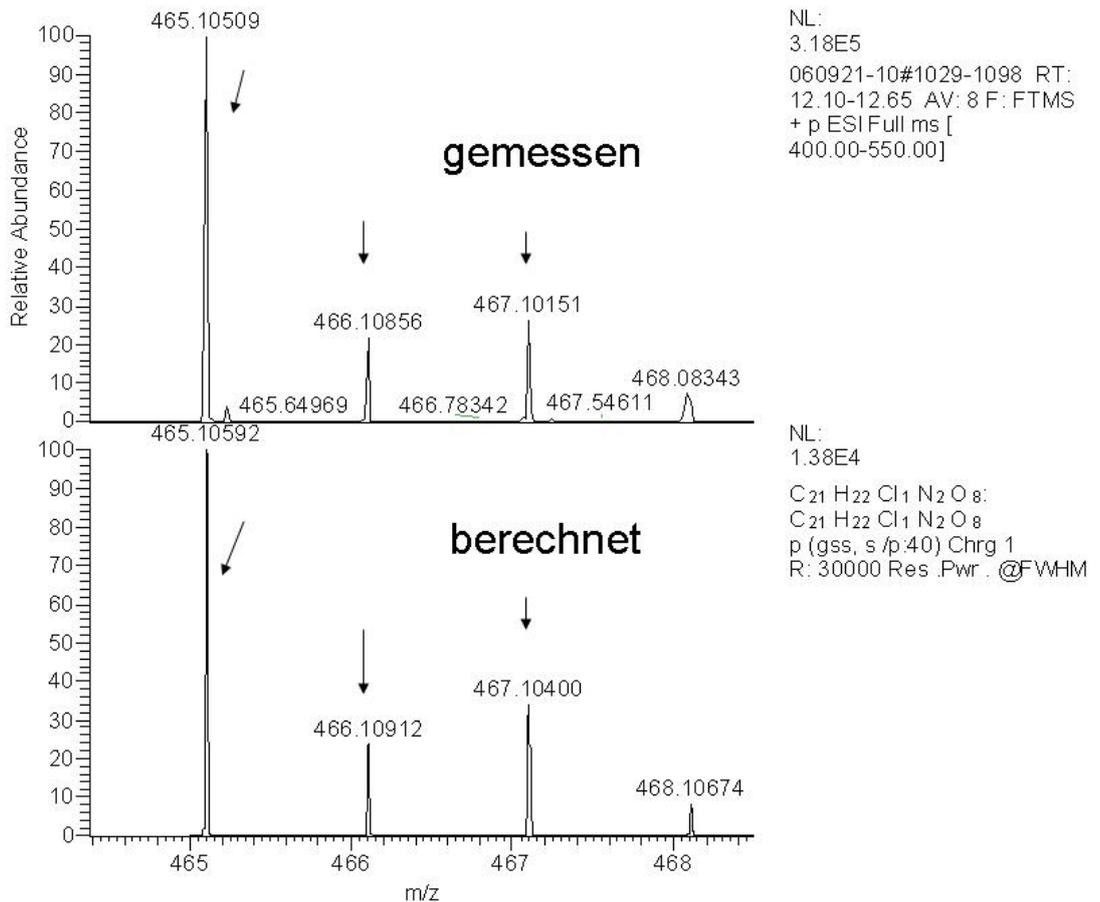
#### 9.6.3.1 Nachweis von Metaboliten in Wurzeln des Winterweizen

Eine Winterweizen-Wurzel Probe, nach 2 Wochen Wachstum in 5  $\mu\text{mol/L}$  CTC / iso-CTC haltiger Nährlösung, liefert folgendes Chromatogramm (Abb. 42)



**Abb. 42:** MS-Total-Ionenstrom-Chromatogramm TIC (oben) und Massenspuren einer Winterweizen-Wurzel-Probe nach 2 Wochen Wachstum auf Hydrokultur (5  $\mu\text{mol/L}$  CTC/ iso-CTC in der Nährlösung), FTICR-MS

Für jeden einzelnen Peak lassen sich die gemessenen exakten Massen (hochauflösend) mit den berechneten Massen vergleichen. Die erhaltenen Massenspuren sind in der nachfolgenden Abbildung 43 exemplarisch für Demeclocyclin dargestellt.



**Abb.43:** Vergleich des gemessenen Massenspektrums einer Winterweizen-Wurzel-Probe (vgl. Abb. 42) bei 12,1 – 12,65 min (oben) mit dem berechneten Massenspektrum von e-DMC mit  $m/z = 465,010592$  (unten)

Für jeden Peak aus dem Chromatogramm lassen sich die gemessenen exakten monoisotopischen Massen der Fragmente mit den berechneten Werten vergleichen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 21 zusammengefasst.

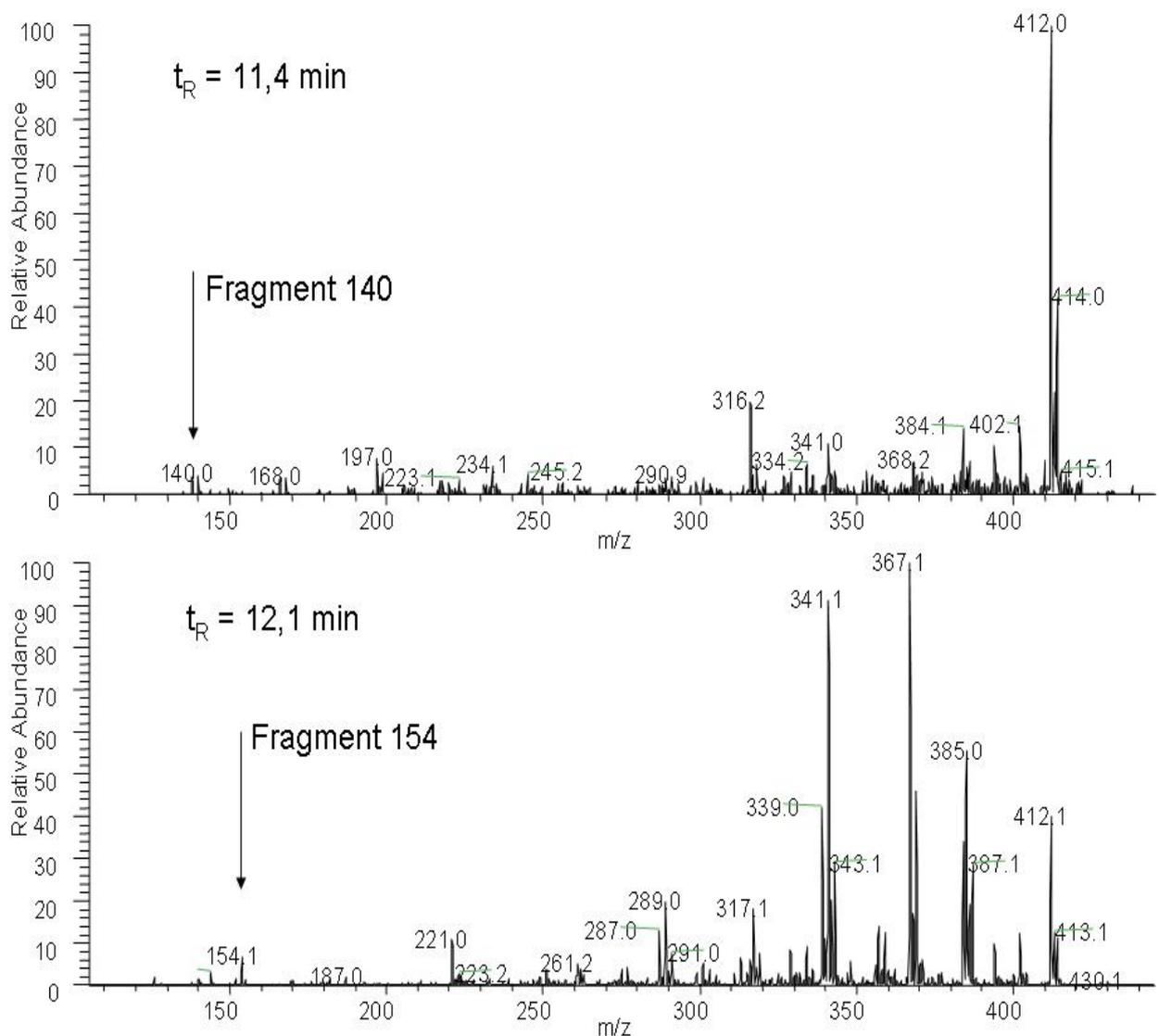
**Tab. 21:** Vergleich der gemessenen und berechneten m/z-Werte der Vorläuferionen (MS<sup>1</sup>), und Produkt-Ionen (des jeweils intensivsten Vorläuferions) von CTC und ausgewählten Metaboliten der WW-Probe (vgl. Abb. 42), (<sup>^</sup>hochauflösendes MS, \*niedrigauflösendes MS)

Verbindung	<sup>^</sup> MS <sup>1</sup>	Ab- weich- ung [ppm]	<sup>*</sup> MS <sup>2</sup>	<sup>*</sup> MS <sup>3</sup>	t <sub>R</sub> [min]
	m/z [M+H] <sup>+</sup> berechnet gemessen		m/z [M-NH <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup> gemessen	m/z [M-NH <sub>3</sub> - H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> gemessen	
CTC	<u>479,12157</u> 479,12167	0,1	462,0 (100%) 444,1 ( 40%)	444,1	22,9
iso-CTC	<u>479,12157</u> 479,12124	0,33	462,1 (100%)	444,1	17,0
e-iso-CTC	<u>479,12157</u> 479,12134	0,23	462,0 (100%)	444,1	11,9
TC	<u>445,16054</u> 445,16040	0,14	428,1 (100%) 410,1 ( 30%)	410,1	11,9
e-TC	<u>445,16054</u> 445,16030	0,24	427,1 (100%) 410,2 ( 30%)	410,2	9,6
Oxy-CTC	<u>495,11648</u> 495,11667	0,19	478,1 (100%) 477,2 ( 80%)	460,2	11,8
e-Oxy-CTC	<u>495,11667</u> 495,11667	0	478,1 (100%) 477,2 ( 80%)	460,2	7,2
DMC	<u>465,10592</u> 465,10602	0,1	448,1 (100%)	430,0	16,4
e-DMC	<u>465,10592</u> 465,10509	0,83	448,1 (100%)	430,0	12,1
N- Monodesmethyl -CTC	<u>465,10592</u> 465,10494	0,98	448,1 (100%)	430,0	11,4

Die im Chromatogramm (Abb. 42) angegebenen Verbindungen CTC, e-iso-CTC, iso-CTC, e-TC, TC, DMC und e-DMC konnten über die MS-Spektren und den Vergleich mit den Standards identifiziert werden. Für Oxy-CTC und N-Monodesmethyl-CTC belegen die niedrigeren Retentionszeiten eine Polaritätszunahme im Vergleich zu CTC und DMC. Daraus und aus den charakteristischen Fragmentierungen (Verlust von NH<sub>3</sub> und Verlust von Wasser aus dem [M+H]<sup>+</sup>) kann angenommen werden, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die angegebenen Verbindungen handelt. Eine weitere Absicherung der Identifizierung ist über den Vergleich der berechneten exakten Massen mit den

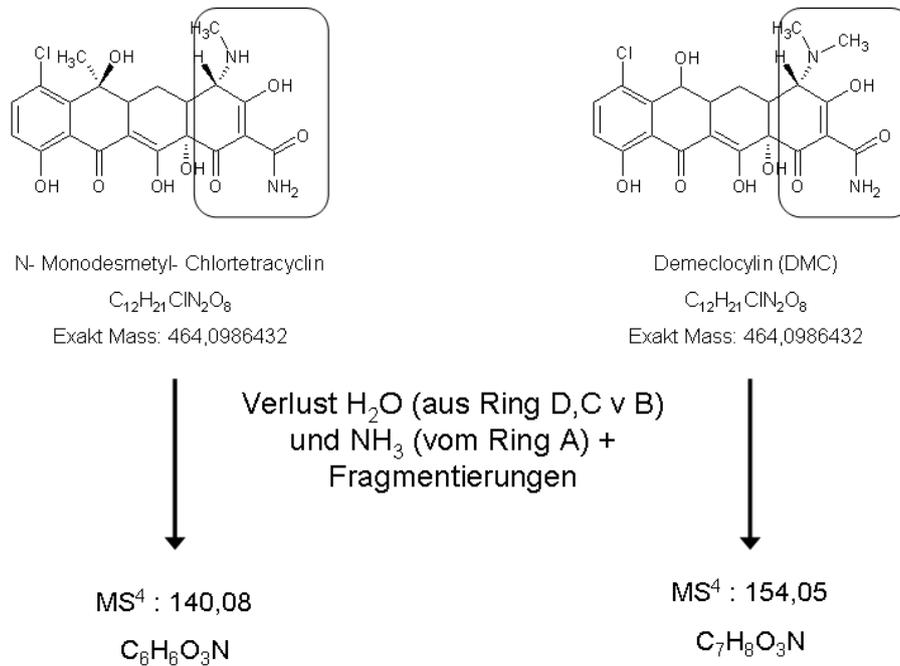
gemessenen Massen im hochauflösenden FTICR-MS möglich. Laut Hayen (2006) läßt eine Massenabweichung zwischen berechneter und gemessener Masse von  $\leq 2$  ppm eine eindeutige Identifizierung der Substanz zu. Die in der Tabelle 21 angegebenen Substanzen sind somit als Metabolite von CTC in Weizenwurzeln sicher identifiziert.

Zur Unterscheidung der exakt massengleichen Verbindungen Demeclocyclin und N-Monodesmethyl-Chlortetracyclin wurden die  $MS^n$ -Spektren der jeweils intensivsten Vorläuferionen bis zu den  $MS^4$  Experimenten miteinander verglichen. Die FTICR- $MS^n$ -Spektren unterscheiden sich erstmals im  $MS^4$ -Scan(vgl. Abb.44).



**Abb.44:** Vergleich der gemessenen Fragmentspektren  $MS^4$  der WW-Wurzel-Probe (Abb. 42) bei 11,4 min und 12,1 min zur Unterscheidung von N-Monodesmethyl-CTC (oben) und e-DMC (unten). Die Fragmentierungen entsprechen einem Verlust von  $NH_3$  ( $MS^2$ ; m/z 465 nach m/z 448) und einer Abspaltung von  $H_2O$  ( $MS^3$ ; m/z 448 nach m/z 430)

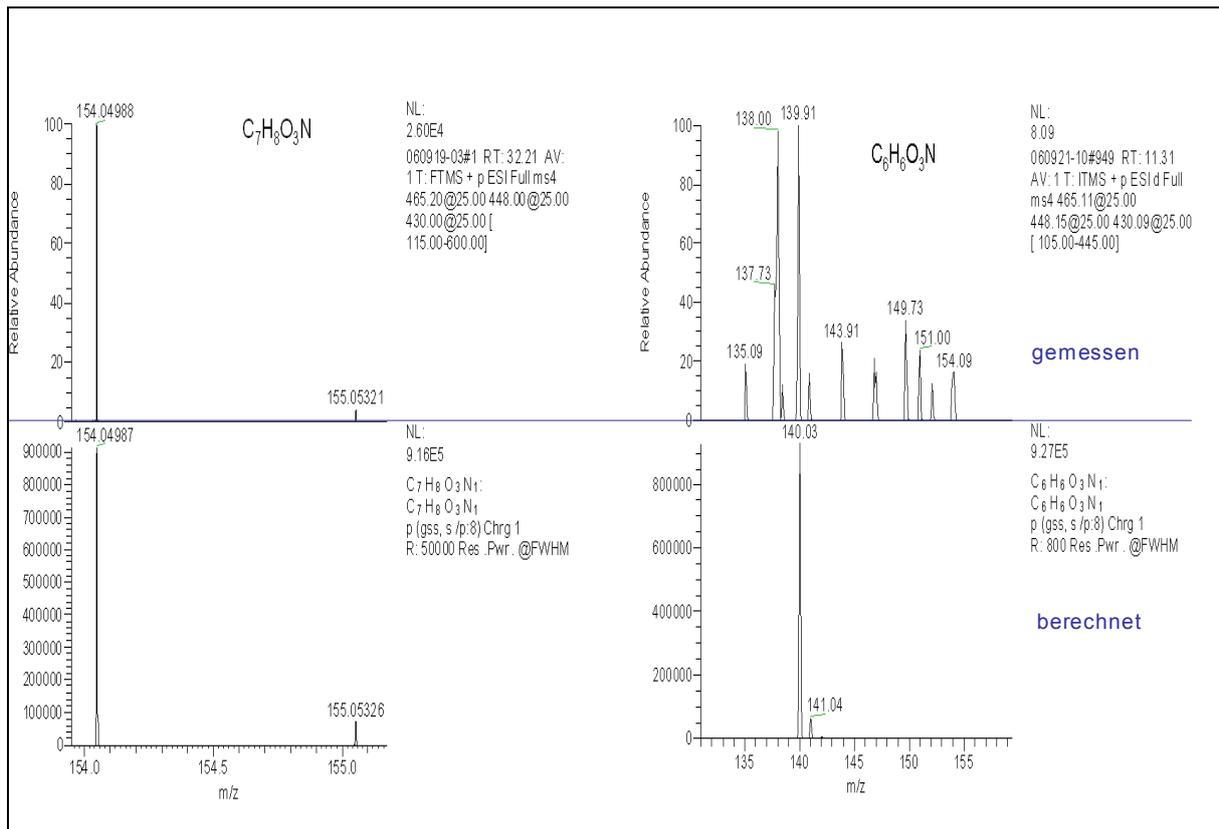
Für Demeclocyclin tritt im MS<sup>4</sup>-Scan ein Fragment mit m/z 154,0 auf, während für N-Monodesmethyl-CTC m/z 140 auftritt. Eine Vermutung, wie diese Fragmente gebildet werden liefert die Abbildung 45. Nach der Wasser- und Ammoniakabspaltung liefern die gestoßenen Molekülonen unterschiedliche Fragmente.



**Abb. 45:** Vorgeschlagene hypothetische Bildung der Fragmente mit m/z 140,0 und m/z 154,0 im MS<sup>4</sup> zur Unterscheidung von Demeclocyclin und N-Monodesmethyl-CTC (nach H. Hayen, ISAS)

Bei den angegebenen Fragmenten handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Fragmente mit den Summenformeln  $C_7H_8O_3N$  und  $C_6H_6O_3N$ , weil die berechneten Isotopenpeaks mit den gemessenen sehr gut übereinstimmen (Abb.46).

Bei einer Retentionszeit von 11,3 min wird im MS<sup>4</sup> das Fragment m/z 140,0 registriert (Abb. 44). Bei dem gleichen Peak taucht auch das Fragment m/z 154,0 auf, jedoch in erheblich geringerer Intensität. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lässt sich daraus auf die Anwesenheit von N-Desmethyl-CTC schließen. Vermutlich koeluiert es mit einem DMC-Epimer und anderen Matrixbestandteilen, weil noch weitere Peaks auftreten.



**Abb.46:** MS<sup>4</sup> Spektren einer Weizen-Wurzel-Probe (m/z 465 auf 448 auf m/z 430); links Fragment 154 Summenformel  $C_7H_8O_3N$ , rechts Fragment m/z 140 Summenformel  $C_6H_6O_3N$ , oben gemessene, unten berechnete Fragmentspektren, zur Unterscheidung von DMC und N-Monodesmethyl-CTC (vgl. Abb. 44 und 45)

Das Chromatogramm (Abb. 42) liefert anhand der Peakintensitäten bzw. Flächen auch eine Einschätzung der Quantität der auftretenden Metabolite. Die der Nährlösung zugegebenen Chlortetracyclin-Verbindungen (CTC und iso-CTC) wurden in den Wurzeln von Weizen am intensivsten nachgewiesen. Die Peakintensitäten der auftretenden Metabolite folgen der Reihe:

CTC / iso-CTC >>> DMC > TC > Oxy-CTC

### 9.6.3.2 Nachgewiesene Metabolite in ausgewählten Pflanzenproben

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse von Proben, die auf Metabolite untersucht worden sind, zeigt die Tabelle 22.

**Tab. 22: Ergebnisse der Analyse auf Metabolite von CTC in Pflanzenproben**

- negativer Befund

+ positiver Befund niedrig auflösende LC/MS<sup>2</sup>; ++ Bestätigung hochauflösende MS

Pflanze / Probe	Interne Proben-Bez.	Einwaage[g] - Antibiotika / Konz. In Nährlösung	Identifizierte (qualitativ nachgewiesene) Antibiotika und Metabolite			
			CTC/ iso-CTC	Oxy-CTC	Demethylierte CTC's	TC
Möhre Rübe, RR	MD1	5 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	+	-	-
Möhre Rübe, RR	MD2	5 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	+	-	-
Möhre Rübe, RR	MD3	5 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	+	-	-
Möhre Rübe, RR	MD4	5 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	+	-	-
Möhre Rübe, PM	MD5	4,40 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	+	-	-
Möhre Rübe, RR	MD6	5 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	+	+	+ DMC	-
Möhre Rübe, PM	MD7	5 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	+	+	-	-
WW, jüngere Blätter	BD1	4,35 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	+	+	-	-
WW, ältere Blätter	BD2	4,20 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	+	+	-	-
WW, jüngere Blätter	WD1	2,88 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	-	+	-
WW, jüngere Blätter	WD2	2,78 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	-	+	-
WW, Halm Blatt	WD4	1,83 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	-	+	-
WW Wurzel	WD5	4,04 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	++	++	+ DMC ++	++
WW Wurzel	WD6	4,27 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	++	++	+ DMC	++
WW, Halm	WD10	5 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	++	++	+ DMC ++	++
WW, Halm	WD11	5 - CTC/iso-CTC 10 µmol/L	+	+	+ DMC	+
WW, Blatt/Stängel	WD12	5 - CTC/iso-CTC 5µmol/L	+	+	+ DMC	+
WW, Blatt/Stängel	WD13	5 - CTC/iso-CTC 10µmol/L	+	+	-	+

In Wurzel-, Blatt- oder Halmproben von Winterweizen aus Hydrokultur werden die folgenden Metabolite gefunden: Demethylierte (Demeclocyclin und andere), oxidierte und dehalogenierte Chlortetracycline. In Wurzelproben konnten alle Metabolite im Fullscan-Modus nachgewiesen werden, während die Konzentrationen der Metabolite in den Blattproben geringer waren, und nur im Single Reaction Modus (srm) sicher nachweisbar waren (LC/MS<sup>2</sup> niedrig auflösend).

In Möhren konnten Chlortetracycline und oxidierte Chlortetracycline nachgewiesen werden. Es fanden sich in einer Probe Hinweise auf demethylierte Chlortetracycline. In allen anderen Möhrenproben konnten keine Demethylierungsprodukte und auch keine dehalogenierten Produkte nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob die nachgewiesenen Metabolite tatsächlich in der Pflanze und nicht in der Nährlösung entstanden sind, wurden zwei Proben von unterschiedlichen Nährlösungen (nach zwei Tagen Kulturzeit und 5 bzw. 10 µmol/L CTC/iso-CTC in der Nährlösung) auf Metabolite analysiert. Es konnten sowohl im Fullscan als auch im empfindlicheren srm-Modus keine Metabolite nachgewiesen werden.

#### **9.6.3.3 Metabolite in Pflanzen aus einem Freilandversuch**

Die Metabolitensuche wurde auch auf ausgewählte Proben aus dem Freiland des Modellversuchs „Antiinfektiva einträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“ angewendet. Es wurden zwei Feldproben von Feld 2, was zweifach mit Gülle gedüngt worden war, analysiert. Dabei wurden in beiden Proben Tetracyclin und demethylierte Chlortetracycline nachgewiesen. Tetracyclin konnte eindeutig identifiziert werden (hochauflösende MS). DMC konnte über den Vergleich mit dem Standard im niedrig auflösenden LC-MS<sup>2</sup> identifiziert werden. Es traten noch weitere Peaks in derselben Massenspur auf. Es könnte sich dabei um N-Monodesmethyl-CTC handeln. Die Retentionszeit lag bei 4,5 min. Damit zeigt sich, dass die Verbindung deutlich polarer ist, was auf dieser analytischen Säule zu kürzeren Retentionszeiten führt. Mit dem FTICR-MS konnten die demethylierten Produkte von CTC in den Feldpflanzen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, so dass eine letzte Bestätigung hier ausbleibt.

In der Literatur finden sich nur sehr wenige Arbeiten zum Thema „Metabolite von Antibiotika in Pflanzen“. Die Aufnahme von CTC wirkt sich zum Beispiel auf Mais und

Bohnen auf Grund des Metabolismus von CTC in den Pflanzen sehr unterschiedlich aus (Farkas et al. 2007). Mais-Pflanzen können das CTC über ein gebildetes CTC-Gluthathion-Konjugat entgiften, während CTC auf die Bohnen (Pinto-beans) phytotoxisch wirkt, so die Autoren.

#### **9.6.4 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse auf Metabolite**

Die Analysen mit Hilfe der niedrigauflösenden LC- und der hochauflösenden FTICR-MS zeigen, dass in den untersuchten Weizen- und Möhren-Pflanzen tatsächlich Metabolite aus Oxidation, Demethylierung und Dehalogenierung aus Chlortetracyclin entstehen.

Insbesondere das Auftreten des Demeclocyclin als Metabolit ist zu beachten. Demeclocyclin wurde früher auch als Wirkstoff in der Humanmedizin eingesetzt, jedoch darf es aufgrund seiner Toxikologie heute als Wirkstoff nur noch in speziellen Präparaten eingesetzt werden. Als Tierarzneiwirkstoff ist Demeclocyclin nicht zugelassen. In weiteren Projekten der Arbeitsgruppe von Prof. Grote wurden auf Grund dieser Ergebnisse auch nach Demeclocyclin und weiteren Metaboliten in Getreideproben gesucht. In dem „Screening Projekt“ wurden positive Befunde von Tetracyclinen (CTC, iso-CTC, DMC, DC) auch in Getreide von Feldpflanzen, die unter landwirtschaftlich üblicher Praxis wuchsen, gefunden (Freitag et al. 2008).

## 10 Zusammenfassung

Erhebliche Mengen von Antibiotika gelangen nach veterinärmedizinischer Anwendung über den Austrag von Gülle auf landwirtschaftliche Nutzflächen. Werden diese Antibiotika von Nutzpflanzen aufgenommen? Entstehen in den Pflanzen für den Menschen gefährliche Metabolite? Und könnten diese Antibiotika und Metabolite somit in die pflanzliche Nahrungskette gelangen? In der vorliegenden Arbeit werden diese Fragen am Beispiel von Feldsalat, Winterweizen und Möhren behandelt.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit lautete im Einzelnen:

1. Kontrollierte Anzucht und Entwicklung von Weizen, Feldsalat und Möhren in Hydrokultur. Dabei sollten die Pflanzen in der Nährlösung verschiedenen Konzentrationen an Antibiotika ausgesetzt werden.
2. Entwicklung einer LC-MS/MS-basierten Methode zum Nachweis von Antibiotika in den Nutzpflanzen.
3. Nachweis und Bestimmung von Antibiotika-Gehalten in den Pflanzen anhand der entwickelten Methode.
4. Aufnahmeexperimente in Hydrokultur mit radioaktiv markierten Antibiotika.
5. Identifizierung von Metaboliten, die in den Pflanzen aus den Antibiotika gebildet werden, mit Hilfe der entwickelten LC-MS-Methode.

Im ersten Schritt wurden Pflanzen kontrolliert angezogen und anschließend auf Hydrokultur umgesetzt. Den Nährlösungen wurden verschiedene Tritium-markierte oder nicht-markierte Antibiotika zugesetzt. Nach ein bis dreiwöchigem Wuchs auf den dotierten Nährlösungen wurden Pflanzenproben genommen und dann jeweils analysiert.

Die durchgeführten Tracerstudien und mikroautoradiographischen Untersuchungen mit Tritium-markiertem  $^3\text{H}$ -Tetracyclin und  $^3\text{H}$ -Sulfamethazin zeigen, dass in Hydrokultur Feldsalat und Winterweizen Antibiotika über die Wurzel aufnehmen und in der Pflanze transportieren. Das Sulfonamid wird von beiden Pflanzen in geringerem Maß aufgenommen als die (Chlor-) Tetracycline. Die Antibiotikagehalte in verschiedenen Pflanzenteilen (zum Beispiel Wurzeln und Blätter) unterscheiden sich bei den untersuchten Pflanzenarten erheblich voneinander. Die mikroautoradiographischen Untersuchungen an Wurzelquerschnitten von Weizenpflanzen lassen deutlich die Haupteinlagerungsorte der Antibiotika im Apoplast der Rhizodermis und der ersten

Rindenlage erkennen. Auch im Mesophyll der Blätter zeigen sich apoplastische Einlagerungen.

Es wurde eine LC-MS basierte Methode zum Nachweis von Antibiotika und ihren Metaboliten in pflanzlichen Proben entwickelt. Die entwickelte Methode basiert auf ultraschallunterstützter Extraktion der zerkleinerten Pflanzenprobe mit anschließender Festphasenextraktion und der Bestimmung der Analyten mit flüssigchromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion. Mit der Methode gelang es, Sulfadiazin (SFD) und Chlortetracyclin (CTC), sowie die Epi- und Isomere von CTC, in pflanzlichen Proben nachzuweisen und zu quantifizieren.

Als Ergebnis der Analyse in Hydrokultur gewachsener Pflanzen mit der LC-MS Methode kann folgendes festgestellt werden:

- Über die Wurzeln von Feldsalat, Möhren und Weizen werden Sulfadiazin, Chlortetracyclin und iso-Chlortetracyclin aufgenommen.
- CTC und iso-CTC werden in höherer Menge aufgenommen als SFD.
- Der Transport der drei Wirkstoffe in der Pflanze ist abhängig von der Pflanzenart. Während für Feldsalat und Weizen Antibiotika auch in den Blättern nachweisbar sind, wurden in den Blättern von Möhren kein Sulfadiazin gefunden.
- Chlortetracyclin und iso-Chlortetracyclin wird in allen drei Nutzpflanzen gefunden.

Die in allen Pflanzen gefundenen niedrigeren Sulfadiazin-Gehalte sind möglicherweise auch auf eine verminderte Nachweisempfindlichkeit von SFD in pflanzlichen Proben zurückzuführen. In der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die SFD-Ionenbildung durch Matrixbestandteile stark unterdrückt. Die SFD-Bestimmung über eine Standardaddition wurde an einigen ausgewählten Proben angewendet und lieferte höhere Gehalte an SFD als mit der Auswertung über die externe Kalibrierung.

Auch eine stärkere Bindung von SFD an Zellwandkomponenten im Aufnahmebereich der Wurzeln hat einen geringeren SFD-Transport in der Pflanze zur Folge und führt damit zu niedrigeren Gesamtkonzentrationen im Pflanzenmaterial.

Die entwickelte LC-MS-Methode wurde auch bereits für die Bestimmung von Antibiotika in Feldpflanzen genutzt, die unter praxisnahen Bedingungen im Freiland wuchsen (vgl. auch Projekt „Antiinfektiva-Einträge aus der Tierhaltung in aquatische und terrestrische Kompartimente“). Insgesamt zeigten sich dabei mit der entwickelten Methode ähnliche Befunde wie bei Pflanzen, die unter Laborbedingungen aufwuchsen (Grote et al. 2005):

- Feldsalat und Weizen nehmen über die Wurzel Sulfadiazin und Chlortetracyclin aus mit güllebeaufschlagtem Boden auf.
- Sulfadiazin wird im Vergleich mit CTC in geringerem Maß aufgenommen.

Tendenziell stimmen die Ergebnisse der Aufnahmeversuche mit markierten Antibiotika mit den rückstandsanalytischen Daten der in Hydrokultur mit unmarkierten Antibiotika-Dotierungen gewachsenen Nutzpflanzen überein. Vergleichbare Befunde wurden auch aus den untersuchten Pflanzen, die auf gülle-beaufschlagten Versuchsfeldern gewachsen waren, erhalten (Grote et al. 2006). Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nach längerem Kontakt zu antibiotikahaltiger Nährlösung sowie mit höherem CTC Angebot in der Nährlösung auch die CTC-Gehalte in Wurzeln und Blättern von Feldsalat und Weizen ansteigen. Bei Möhren stagniert der CTC-Gehalt mit längerer Wachstumszeit auf dotierter Nährlösung bzw. nimmt er sogar ab. Möglicherweise wird das aufgenommene CTC in der Pflanze metabolisiert, oder in nicht extrahierbare Zellwandkomponenten eingelagert, was in weiteren Projekten untersucht werden könnte.

Als viertes sollte untersucht werden, ob Metabolite von Chlortetracyclin in den untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden können. Dazu wurden zusätzlich mit der entwickelten LC-MS-Methode auch an einem hochauflösenden Massenspektrometer (FTICR-MS) Untersuchungen durchgeführt. Es konnten in den Hydrokultur-Pflanzen extrahierbare Metabolite von Chlortetracyclin nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um oxidierte, demethylierte und dehalogenierte Produkte des Chlortetracyclins. Je nach Pflanzenart treten unterschiedliche Metabolite auf.

Insbesondere das nach Demethylierung entstehende Demeclocyclin (DMC) ist toxikologisch relevant. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde in einem „Screening-Projekt“ (Grote 2007b), in dem Getreide aus der konventionellen Landwirtschaft in viehstarken Gebieten beprobt wurde, auch Demeclocyclin in das Analysenprogramm mit aufgenommen und in einigen Proben auch nachgewiesen. Da DMC nicht mehr zugelassen ist, wird appliziertes CTC, das im Boden oder Pflanze metabolisiert wurde, als DMC-Quelle vermutet (Freitag et al. 2008).

Ein Transfer von antibiotisch wirksamen Stoffen über pflanzliche Nahrungs- und Futtermittel zum Mensch und zum Tier ist somit grundsätzlich möglich. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die tatsächliche Belastungssituation von Getreide und anderen Nutzpflanzen zu erfassen und eine Risikobewertung durchführen zu können.

# 11 Experimenteller Teil

## 11.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

### Anzucht der Pflanzen

Geräte / Sonstiges	Chemikalien
Hydrokultur	
Kunststoff-Siebe mit einem Innendurchmesser von 15 bis 17cm	Hoagland-Nährlösung (lt. Anhang) und Hoagland-Nährlösung pH6 (lt. Anhang)
Kunststoff-Töpfe passend zu den Sieben, Curver, Volumen 2,5L, ID 17cm	Sulfadiazin (SFD), Heumann, Germany
Filterpapier, Schleicher und Schüll 300105, d=150mm, Weisband	Sulfadiazin-Stammlösung I mit 2,25 g/L SFD, pH 8,5 (lt. Anhang)
Blumenkästen [60 cm x 14 cm x 15 cm (B/H/T)], Ebert Gartendesign Anr.7760	Sulfadiazin-Stammlösung II mit 1,125 g/L SFD, pH 8,5 (lt. Anhang)
Aquarium-Durchlüfter Elite 800 A-10033	Chlortetracyclin (CTC), Acros 26824
Silikon-Schläuche (Innendurchmesser von 4 mm)	Isochlortetracyclin (iso-CTC), Acros 26821
Pflanzenwuchsschrank VB1514, Vötsch	Chlortetracyclin-Stammlösung mit 1,372 g/L CTC entspricht 2,86 mmol/L CTC (lt. Anhang)
Anzuchtschalen, Werga (30cm x 50 cm)	Chlortetracyclin / Isochlortetracyclin Stammlösung mit 8,68 mmol/L CTC und 8,46 mmol/L iso-CTC (lt. Anhang)
Styroporplatten ( 60cm x 14cm x 18mm)	Tween 80, zur Synthese, Merck 8.22187
Schaumstoff-Streifen, PU, 1,5cm x 15cm	Wasserstoffperoxid 35% (w/w), Merck 1.08600
Blumenkästen [60cm x 14cm x 15cm (L/B/T)], Ebert Gartendesign Anr.7760	
Feldsalat-Samen, Sorte „Vit.g.S.“	
Blumentöpfe, TEKU Container 20 cm	

(d = 20 cm, Höhe = 19 cm)	
Styroporplatten d =22 cm mit Löchern	
Möhren-Samen, Sorten: „Rote Riesen“ (RR), „Pariser Markt“ (PM)	
Anzuchterde, Florigard: Kräuter- und Aussaaterde	
Haushalts-Klarsichtfrischhalte-Folie	
<b>Tracer-Versuche</b>	
Aussaatschalen	(3,5)- <sup>3</sup> H-Sulfamethazin, Moravec, USA
Blumenerde	(7)- <sup>3</sup> H-Tetracyclin Moravec, USA
Weizen-Körner, Sorte Drifter	Quicksafe A
Feldsalatsamen, Sorte Vit g.S.	Biolute S

### Probennahme

Geräte	Chemikalien
Messer	Flüssiger Stickstoff
Holz-Brettchen	
Falcons-Kunststoffzentrifugengefäße, Merck	
Mörser und Pistill	
Waage	
Dewar-Gefäße	

### Aufarbeitung

Geräte	Chemikalien
Zentrifuge, Zentrifugengläser	Citratpuffer-Lösung (lt. Anhang)
Pipetten	Methanol
Ultraschallbad, Rotifix 32, Hettich	Methanol / Wasser ( 5% / 95%, v/v)
Waters Oasis HLB 3cc (60mg) Festphasenkartusche	Glaswatte, reinst, silanisiert, SERVA 22367
Absaugeinheit für Kartuschen	Acetonitril

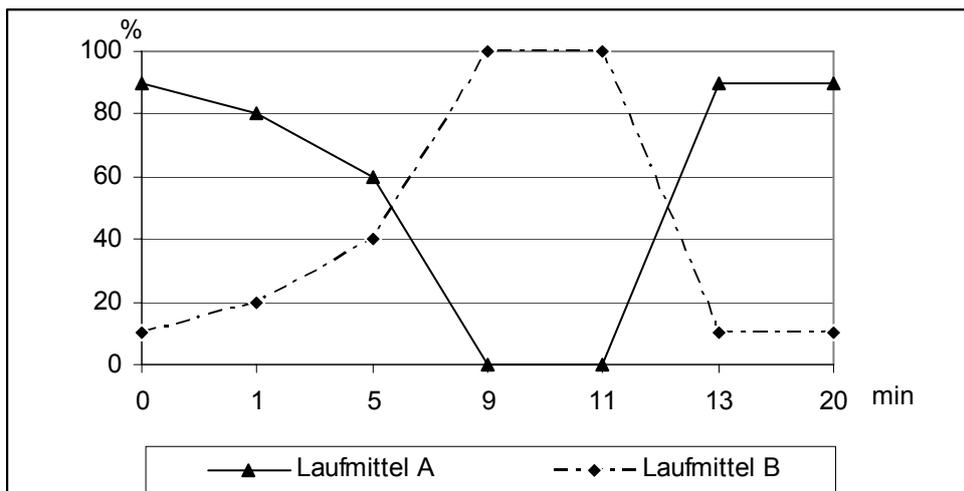
### 11.1.4 Analyse

#### HPLC-System (Spectra):

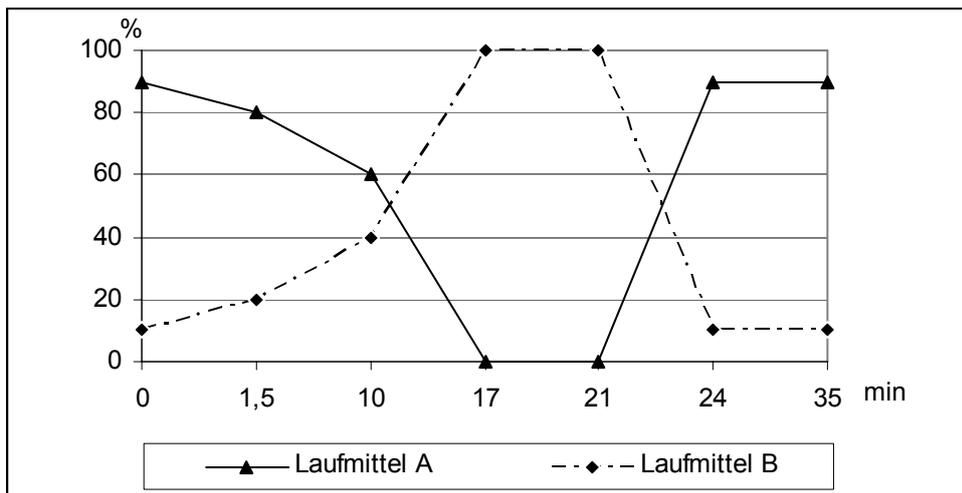
Degasser:	SCM 1000 Vakuum Membrane Degasser
Pumpe:	P 4000 Gradient Pumpe
Injektionseinheit:	AS 3000, Autosampler gekühlt (10°C) mit integriertem Säulenofen (temperiert auf 30°C)
Trennsäule:	Synergie 4µ Hydro-RP, 250 x 2,0 mm, Phenomenex oder YMC-Pack ODS-AM, 150 x 3,0 i.d., S 5µm
UV-Detektor:	UV 6000 LP
Messbereich:	190 – 800 nm
Detektionswellenlänge:	267 nm
Injektionsvolumen:	20 µL

Bei der HPLC wurden je nach zu bestimmenden Antibiotikum verschiedene Gradientenprogramme verwendet (Abb. 47 und Abb. 48). Wurden SFD und CTC in einem Lauf bestimmt wurde der „CTC-Gradient“ verwendet.

Flussrate:	0,4 mL/min
Laufmittel:	A: Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 10/89,9/0,1 % (v/v/v)
	B: Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 59,9/40/0,1 % (v/v/v)



**Abb. 47:** Gradientenprogramm für die SFD-Bestimmung, „SFD-Gradient“



**Abb.48:** Gradientenprogramm für die Bestimmung von CTC / iso-CTC, „CTC-Gradient“

**LQT-Advantage Ion-Trap (Thermo Electron):** Ionisierungsmethode: ESI+ Electro-Spray-Ionisation, positiv Mode  $[M+H]^+$  Bestätigung durch MS/MS-Stoßexperimente mit He, Vorläufer- und Produkt-Ionen.

**Geräteparameter:**

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]

**LQT FTICR-Fourier- Transformations- Ionen- Cyclotron- Resonance- Hybrid-Massenspektrometer (Thermo Electron)**

**ISAS –Institute for Analytical Sciences- Dortmund**

**HPLC-System**

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: 5µL  
 Flussrate: 0,1mL/min  
 Fließmittel: A : Wasser / Acetonitril / Ameisensäure 95/5/0,1 (v/v/v)  
 B : Acetonitril / Ameisensäure 100/0,1 (v/v)

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,01	100	0
2	100	0
45	70	30
50	5	95
60	5	95

#### FTICR-MS:

Ionisierungsmethode: ESI, positiv Mode  $[M+H]^+$  und  $MS^n$  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 Temperature: 300°C  
 Collision Energy: 25%

kombiniert mit einem 7.0 Tesla supraleitfähigem Magneten wurde eingesetzt um ausgewählte Proben auf Metabolite zu untersuchen. Diese Versuche wurden am ISAS in Dortmund durchgeführt und die Methode war ähnlich zu der beschrieben von Olsen et al. (2004).

## 11.2 Durchführung

### 11.2.1 Anzucht von Nutzpflanzen auf Hydrokultur mit unmarkierten Arzneistoff-dotierten Nährlösungen (BfEL, Detmold)

#### Winterweizen

#### Entkeimung und Entwicklung

Um die Oberfläche der Weizenkörner (Sorte Drifter) zu entkeimen, werden die eine Stunde in Wasser vorgequellten Weizenkörner nacheinander mit

- 0,1 %iger wässriger Tween 80 Lösung (w/w),
- 0,5 %iger wässriger Natriumhypochlorit-Lösung (w/w),
- 0,75 %iger wässriger Wasserstoffperoxid Lösung (w/w) behandelt.

Zwischen den einzelnen Schritten werden die Körner jeweils 2 mal mit destilliertem Wasser gespült. Die so behandelten Weizenkörner werden noch eine Nacht in destilliertem Wasser gequollen.

Die Samen werden anschließend auf feuchtes Filterpapier ausgelegt und zum Auskeimen über das Wochenende im Dunkeln stehen gelassen. Das Filterpapier liegt in einem Sieb, welches auf einem Kunststoffbehälter plaziert ist. Der Kunststoffbehälter ist mit Wasser so befüllt, dass der Siebboden die Wasseroberfläche erreicht und damit das Filterpapier feucht gehalten wird (1.-3.Tag).

Nach dem Keimen werden die Keimlinge auf Siebe ohne Filterpapier überführt, wobei mindestens zwei Wurzeln eines Keimlinges durch die Siebbodenlöcher die Lösung in dem Kunststoffbehälter erreichen.

Jeweils 3 Siebe werden in einen konventionellen Blumenkasten gesetzt (vgl. Abb. 11). In den Kasten werden 4,5 L Hoagland-Nährlösung gegeben, so dass die Wurzeln in der Flüssigkeit hängen der Siebboden aber trocken bleibt, um Schimmelbildung zu minimieren. Eine Pumpe sorgt über einen Silikon-Schlauch durch einen gleichmäßigen Luftstrom für die Durchmischung und Belüftung der Nährlösung.

Die Kästen mit den Sieben werden in einen Pflanzenwuchsschrank (Phytotron VB1514) gestellt, wobei nicht durch Siebfläche bedeckte Kastenoberfläche mit Aluminiumfolie abgedeckt wird (Abdunkeln der Nährlösung um Algenbildung zu minimieren). Die Pflanzen wachsen anschließend unter folgendem Wachstumsprogramm:

**Tab. 23** Phytotronbedingungen für die Weizen-Anzucht

Zeit	Temperatur [°C]	relative Feuchte [%]	Bestrahlungs- stärke [%]
00:00	16	55	0
05:30	18	55	30
06:00	22	65	70
22:00	18	55	30
22:30	16	55	0

Der Wuchs der Pflanzen wird täglich kontrolliert und das Gewicht notiert. Eventuell fehlende Nährlösung wird bis zur 4,5 L Marke des Blumenkastens aufgefüllt. Verschimmelte Pflanzenteile oder ganze Pflanzen werden entfernt. Die Nährlösung wird montags, mittwochs und freitags durch frisch angesetzte Hoagland-Lösung ersetzt. An diesen Tagen werden die Blumenkästen nach einem bestimmten Schema innerhalb des Phytotrons umgestellt (Rotation). Ungleichmäßige Wachstumsbedingungen innerhalb des Wachstumsschrankes werden durch diese Maßnahme ausgeglichen.

#### Zudotierung der Arzneistoffe

Am 13. Tag werden die Hoagland-Lösungen durch Zugabe von Antibiotikum-Stammlösung (lt. Anhang A1) dotiert (siehe Tabelle).

**Tab.24:** Antibiotika-Zusätze in die Nährlösung bei der Weizen-Anzucht

Antibiotikum	Zusatz an Stammlösung	Konzentration in Nährlösung
SFD in 4,5 L Nährlösung	5 mL SFD-Stammlsg I	2,5 mg/L = 10 µmol/L
	10 mL SFD-Stammlsg I	5 mg/L = 20 µmol/L
	15 mL SFD-Stammlsg I	7,5 mg/L = 30 µmol/L
	20 mL SFD-Stammlsg I	10 mg/L = 40 µmol/L
SFD in 1,7 L Nährlösung	3,8 mL SFD-Stammlsg II	2,5 mg/L = 10 µmol/L
	7,6 mL SFD-Stammlsg II	5 mg/L = 20 µmol/L
CTC in 1,7 L Nährsg	3 mL Stammlsg CTC	5 µmol/L
	3 mL Stammlsg CTC	5 µmol/L (pH 3)
CTC / iso-CTC in 1,7 L Nährlösung	979,2 µL Stammlsg CTC / iso-CTC	5 µmol/L CTC / 4,9 µmol/L iso-CTC
	1958,4 µL Stammlsg CTC / iso-CTC	10 µmol/L CTC / 9,7 µmol/L iso-CTC

Die Pflanzen wachsen bis zur Probennahme in dotierter Nährlösung bekannter Antibiotika-Konzentration, die alle zwei Tage gewechselt wird.

## Feldsalat

### Aussaat und Keimung

Feldsalat-Samen werden in Anzuchtschalen auf Anzuchterde ausgesät (die Samen werden nur mit wenig Erde bedeckt, ca. 2mm) und mit Wasser angefeuchtet. Die Haube der Anzuchtschale wird auf der Schale belassen, so lange bis sich in den meisten Parzellen Keimblätter zeigen. Danach wird die Haube entfernt und die Erde immer gut feucht gehalten. Die Keimlinge werden wöchentlich vereinzelt, so dass sich pro Parzelle eine Pflanze entwickelt.

Die Pflanzen wachsen in dem Phytotron unter folgenden Bedingungen:

**Tab.25:** Phytotronbedingungen bei der Feldsalat-Anzucht

Zeit	Temperatur [°C]	relative Feuchte [%]	Bestrahlungs- stärke [%]
Feldsalat mit Sulfadiazin-Dotierung			
00:00	15	55	0
06:00	20	65	65
20:00	15	55	0
Feldsalat mit CTC / iso-CTC -Dotierung			
0:00	18	55	0
06:00	22	70	70
22:00	18	55	0

### Umsetzen auf Hydrokultur

Nach 35 Tagen werden die Feldsalat Pflanzen aus den Schalen genommen. Die Erde wird erst trocken abgeschüttelt, anschließend wird sie von den Wurzeln mit Wasser vorsichtig abgespült. Die Pflanzen werden unterhalb des Blattansatzes mit Schaumstoff umwickelt und in die Löcher der Styroporplatte gesetzt. Die Wurzeln sollten zum größten Teil in die in dem Blumenkasten befindliche Hoagland-Nährlösung pH 6 eintauchen, während die Styroporplatte von der Nährlösung nicht benetzt werden sollte. In die Lösung wird über einen Silikonschlauch, der ca. 1cm in die Flüssigkeit eintaucht und mit einer Pumpe verbunden ist, Luft zugeführt.

## Zudotierung der Arzneistoffe

Nach 4 bis 5 Tagen Akklimatisierung auf Hydrokultur werden die Nährlösungen mit Antibiotikum dotiert. Alle 2 Tage werden die Nährlösungen gewechselt, wobei konstante Mengen Antibiotika zugesetzt werden.

**Tab.26:** Antibiotika-Zusätze in die Nährlösung bei der Feldsalat-Anzucht

Antibiotikum	Zusatz an Stammlösung	Konzentration in Nährlösung
SFD in 6 L Nährlösung	13,3 mL SFD-Stammlsg II	10µmol/L SFD
CTC + iso-CTC in 6 L Nährlösung	3,5 mL CTC / iso-CTC - Stammlösung	5 µmol/L CTC / 4,9 µmol/L iso-CTC
	7 mL CTC / iso-CTC - Stammlösung	10 µmol/L CTC / 9,7 µmol/L iso-CTC

## Möhren

### Aussaat und Keimung

In die Blumentöpfe wird bis ca. 2 cm unter den Rand Anzuchterde gefüllt. Die Möhren-Samen werden darauf gleichmäßig verteilt und mit Erde bedeckt (ca. 1cm). Die Erde wird mit Wasser befeuchtet. Die Blumentöpfe werden mit Frischhaltefolie bedeckt und in den Wachstumsschrank gestellt.

Die weitere Entwicklung erfolgt im Phytotron nach folgendem Programm.

**Tab. 27:** Bedingungen im Wachstumsschrank bei der Möhren-Anzucht

Zeit	Temperatur [°C]	relative Feuchte [%]	Bestrahlungsstärke [%]
00:00	15	55	0
06:00	20	65	65
20:00	15	55	0

Sobald sich ein Großteil der Keimblätter zeigen, wird die Folie entfernt. Zu dicht stehende Pflanzen werden von Zeit zu Zeit vereinzelt. Jede einzelne Pflanze benötigt zur optimalen

Entwicklung einen etwa fingerdicken Abstand zu der nächsten Pflanze. Die Erde wird durch Giessen, anfangs von unten, mäßig feucht gehalten.

### Weitere Entwicklung

#### a) In Erde

Ab dem 56.ten Tag werden die Möhren alle 2 Tage mit dotierter Nährlösung gegossen, die 10 µmol Antibiotikum ( 2,5 mg/L SFD) pro Liter enthält. Das Volumen beträgt ca. 1000 mL alle 2 Tage.

#### b) Auf Hydrokultur

Nach 50 Tagen werden die Möhren aus der Erde genommen und die Erde gründlich durch Waschen mit Wasser entfernt. Die Pflanzen werden in eine Styropor-Unterstützung überführt, welche auf einen Kunststoff-Topf gesetzt wird, so dass die Rübe in die Nährlösung gelangt. Die Blätter der Pflanzen dürfen keinen Kontakt mit der Nährlösung haben. Eine Pumpe sorgt über einen gleichmäßigen Luftstrom für die Belüftung der Nährlösung. Alle zwei Tage wird die Nährlösung gegen frisch angesetzte getauscht.

#### Zudotierung

Nach 6 Tagen Entwicklung auf Hydrokultur wird der Nährlösung Antibiotikum zugesetzt. Folgende Konzentrationen wurden durch Zusatz von Stammlösung in der Nährlösung erhalten.

**Tab.28:** Antibiotika-Zusatz in die Nährlösung bei der Möhren-Anzucht

Antibiotikum	Zusatz an Stammlösung	Konzentration in Nährlösung
SFD in 2 L Nährlösung	4,5 mL SFD-Stammlsg II	10 µmol/L SFD
CTC / iso-CTC in 2 L Nährlösung	1,152 mL Stammlsg CTC	5 µmol/L CTC / 4,9 µmol/L iso-CTC
	2,304 mL Stammlsg CTC	10 µmol/L CTC / 9,7 µmol/L iso-CTC

### 11.2.2 Anzucht von Nutzpflanzen auf Hydrokultur mit markierten Arzneistoff-dotierten Nährlösungen (UFT, Bremen)

Feldsalatsamen und Winterweizenkörner (Sorte Drifter) wurden auf konventioneller Blumenerde unter Klarsichtfolie ausgesät. Die Erde wurde feucht gehalten. Sobald sich die

Keimblätter zeigten, wurde die Folie entfernt. Man wartete mehrere Tage, bis sich kleine Pflanzen entwickelt hatten. Diese wurden der Erde entnommen, die Wurzeln vorsichtig unter fließendem Wasser abgespült und in ein Glasgefäß mit Nährlösung überführt, so dass die Wurzeln eintauchten. Jedes Gefäß enthielt 10 mL Hoagland-Nährlösung mit einem Zusatz an CTC / iso-CTC (5 oder 10  $\mu\text{mol/L}$ ) oder SFD (10 oder 20  $\mu\text{mol/L}$ ). Die Chlortetracyclin-haltigen Ansätze wurden zusätzlich mit 740 KBq (7)- $^3\text{H}$  Tetracyclin, die Sulfonamid-haltigen mit 740 KBq (3,5)- $^3\text{H}$ -Sulfamethazine (Moravec Biochemicals, USA) dotiert.

Nach 7, 14 oder 21-tägiger Wachstumszeit wurden von Feldsalatpflanzen Wurzel- und Blattproben, von den Weizenpflanzen Wurzel-, Stängel- und Blattproben genommen, schockgefrostet und lyophilisiert. Bei den 7 Tage-Experimenten erhielten die Nährlösungen einen doppelten Belastungsimpuls von 40  $\mu\text{Ci}$ , welcher in der Auswertung berücksichtigt wurde.

Eingewogene Pflanzenproben wurden mit 0,5 mL *Tissue-solubiliser* („Biolute S“) versetzt, so dass sich das Pflanzengewebe nach mehreren Wochen auflöste. Die erhaltenen Lösungen wurden mit 3 mL einer Szintillationsmischung („Quicksafe A“) versetzt, geschüttelt und abermals eine Woche stehengelassen. Danach hatten sich die Proben stabilisiert und konnten im Flüssig-Szintillationszähler vermessen werden.

Die aufgeführten Antibiotika-Aufnahmen beruhen auf der Auswertung Quenchkorrigierter Einlagerungsaktivitäten (s. Anhang) unter Verwendung der spezifischen Aktivitäten der verwendeten  $^3\text{H}$ -markierten Verbindungen.<sup>1</sup>

In der folgenden Tabelle 29 sind die Zusätze in der Nährlösung aufgeführt.

---

<sup>1</sup> Die experimentellen Bedingungen bei den Versuchsreihen in Hydrokultur mit markierten und unmarkierten Antibiotika waren ähnlich, aber nicht identisch:

Im Unterschied zu den Hydrokulturen mit unmarkierten Antibiotika-Zusätzen, konnten bei den Tracerexperimenten die Nährlösungen nicht alle 2 Tage durch frisch angesetzte, in diesem Fall  $^3\text{H}$ -TC bzw.  $^3\text{H}$ -SMZ-haltige Nährlösungen, ausgetauscht werden. Deshalb standen über die Wachstumszeit den Feldsalat- und Winterweizenpflanzen in beiden Versuchsreihen – trotz gleicher Ausgangskonzentrationen – nicht identische Mengen an Antibiotika zur Verfügung. Außerdem wurde in einigen Gefäßen der Tracerstudie Algenwachstum beobachtet, was einen zusätzlichen Einfluss auf die gemessenen Einlagerungsaktivitäten ausgeübt haben könnte. Daher ist ein Vergleich der in beiden Versuchsreihen ermittelten Antibiotika-Aufnahmen nur bedingt möglich.

**Tab.29:** Konzentrationen der angegebenen Antibiotika in der Tracer-Nährlösung

Pflanze	Zusatz AB kalt und heiß	
	Konz. AB kalt	Konz. AB heiß
<b>Weizen</b>	<b>CTC / iso-CTC</b>	<b><sup>3</sup>H-TC</b>
	5 oder 10 µmol/L	740 oder 1480 kBq
	<b>SFD</b>	<b><sup>3</sup>H-SMZ</b>
	10 oder 20 µmol/L	740 oder 1480 kBq
<b>Feldsalat</b>	<b>CTC / iso-CTC</b>	<b><sup>3</sup>H-TC</b>
	5 oder 10µmol/L	740 oder 1480 kBq
	<b>SFD</b>	<b><sup>3</sup>H-SMZ</b>
	10 µmol/L	740 oder 1480 kBq

### Probennahme und Analyse

Die Pflanzenprobe wird eingewogen und mit 0,5 mL Tissue-solubiliser (Biolute S) versetzt. Man wartet mehrere Wochen bis sich das Gewebe aufgelöst hat. Dann werden 3 mL Scintillationslösung (Quicksafe A) zugesetzt, geschüttelt und abermals eine Woche stehengelassen. Danach hat sich die Probe stabilisiert und kann im Szintillationsmeßgerät vermessen werden.

### Mikroautoradiografie

Zum Versuchsende wurden aus ausgewählten Regionen der Wurzeln, der Stängel und der Blätter kleine Gewebeproben ausgeschnitten und schlagartig in schmelzendem Stickstoff (-210°C) eingefroren. Die markierten Proben wurden in einer Hochvakuumgefrieretrockenanlage (LEIKA EM CFD) nach einem erprobten Schema im Verlauf von 286 Stunden gefrieretrocknet, nach der Trocknung gegebenenfalls zurechtgetrimmt und dann einer Druckeinbettung mit Kunststoff (Spurr) unterzogen. Nach der Polymerisation des Kunststoffes wurden am Ultramikrotom trocken Schnitte von ca. 900 nm hergestellt und auf beschichtete Objektträger geklebt. Bei Dunkelkammerlicht erfolgte dann der Auftrag der Photoemulsion (Ilford L4, Gelform, Korngröße 0,11 Mikrometer). Nach sorgfältiger Trocknung erfolgte die Exposition in lichtdichten Boxen entweder im Kühlschrank bei 4°C oder in der Tiefkühltruhe bei -22°C. Nach der Exposition von ca. 14 Tagen bis 3 Monaten wurden die Schnitte mit dem Feinkornentwickler D19 A/S entwickelt. Nach der Fixierung und Trocknung erfolgte die Auswertung an einem Zeiss Universalmikroskop mit Fotoeinrichtung.

### **11.2.3 Analyse der Arzneistoffrückstände in Pflanzenproben mit LC-MS**

#### **Probennahme**

##### **Winterweizen**

Nach 7, 14 oder 21 Tagen Zudotierung werden die Pflanzen aus je einem Sieb in Wurzeln und Halme getrennt. Etwa 1 cm des Bereiches des Wurzel-Halm-Überganges wird verworfen, um sicherzustellen, daß kein Wurzelmaterial in Halmproben gelangt. Die Wurzeln werden gründlich mit Wasser gespült und trockengetupft. Das Pflanzenmaterial wird mit Hilfe eines Messers oder einer Schere in ca. 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Jeweils 5-7g des zerschnittenen Materials werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls in flüssigem Stickstoff gemörsert.

##### **Feldsalat**

Nach 7, 14 oder 21 Tagen Wachstum auf dotierter Nährlösung werden 5 bis 6 Pflanzen aus der Styroporunterstützung herausgenommen, der Schaumstoff wird entfernt und die Wurzeln gründlich mit Wasser gespült. Die Pflanzen werden in Wurzeln und Blättern getrennt, wobei ca. 0,5 cm des Bereiches zwischen Wurzel und Blatt verworfen wird. Das Pflanzenmaterial wird in kleine Stücke geschnitten, gewogen und unter Stickstoff gemörsert.

##### **Möhren**

Drei bis vier Pflanzen werden nach 7, 14 oder 21 Tagen Wachstum auf dotierter Nährlösung aus der Nährlösung genommen und gründlich mit Wasser abgespült. Die Pflanzen werden in Blätter mit Stiel, Rübe und Seitenwurzel zerlegt. Das Pflanzenmaterial wird in 1-2 mm<sup>3</sup> Stücke zerschnitten, gewogen und mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert.

Bis zur weiteren Aufarbeitung werden die pulverisierten Proben bei -80 °C gelagert.

#### **Probenaufarbeitung**

Die zerkleinerten und unter flüssigem Stickstoff pulverisierten Proben werden in einem Zentrifugenglas mit 15-30 mL Citratpuffer (lt. Anhang A2) übergossen, so dass der Feststoff vollständig mit Flüssigkeit bedeckt ist, und 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die Proben werden zentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wird nochmals mit 5 mL Citratpuffer aufgeschlämmt, 1 min im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt und über

eine mit 3 mL Methanol konditionierte und mit 3 mL Wasser äquilibrierte Festphasen-Kartusche gegeben. Nach dem Waschen der Festphase mit 3 mL Wasser und 3 mL Methanol / Wasser -Gemisch (5% Methanol v/v) wird mit 3 mL Methanol eluiert. Das Eluat wird im Thermoblock bei 30°C mit Luft bis zur Trockne vaporisiert. Der Rückstand wird in 1 mL Laufmittel A (lt. Anhang A3) aufgenommen und 15 sek. auf einem Rüttler geschüttelt. Sollte die Lösung trübe sein, wird über silanisierte Glaswatte filtriert. Dazu wird etwas Watte zu einem lockeren Propfen gerollt und in eine Pasteurpipette eingeführt. Durch die so vorbereitete Pipette wird die Probenlösung gegeben. Die aufgearbeitete Probe wird bis zur LC-MS-Messung bei -20°C gelagert.

### Standardaddition

Die Probe wird gemäß der obigen Pflanzenaufarbeitungsvorschrift aufgearbeitet und nach dem Abdampfen des Elutionsmittels Methanol in 2 mL Laufmittel A aufgenommen. Aus dieser Lösung werden 5 gleiche Teile à 300 µL abpipettiert. Zu den Lösungen werden die in der Tabelle zusammengestellten Lösungen pipettiert.

**Tab.30:** Verwendete Volumina für eine Standardaddition

Bezeichnung	Volumina			
	Probenlösung	SFD-Lösung β = 100 µg/mL	Laufmittel A	ISTD SMP-Lösung β = 100 µg/mL
Probe +0	300µL	-	5µL	15µL
Probe +5	300µL	5µL	15µL	0
Probe + 10	300µL	10µL	10µL	0
Probe + 15	300µL	15µL	5µL	0
Probe + 20	300µL	20µL	0	0

### Verwendung eines Internen Standards

Generell werden zu jeder vermessenden Lösung (Standards und Probe) eine bestimmte Menge an IS zugesetzt. Es wird eine Kalibrierkurve aufgenommen, in der die Kalibrierstandards immer die gleiche Konzentration an IS enthalten. Schwankungen aufgrund von unterschiedlicher Injektionsvolumina oder unterschiedlicher Ionisierung in

der Quelle betreffen beide Substanzen, sowohl die zu bestimmende Substanz SFD als auch den zugesetzten Internen Standard, und werden somit eliminiert.

Die SFD-Peakflächen der Standards werden durch die SMP-Peakfläche IS dividiert. Der gebildete Quotient wird gegen den Quotienten von Konzentration SFD durch Konzentration SMP aufgetragen (siehe Abb. ). Als Steigung der Geraden ergibt sich der Relative Response Factor RRF (Gl. 3).

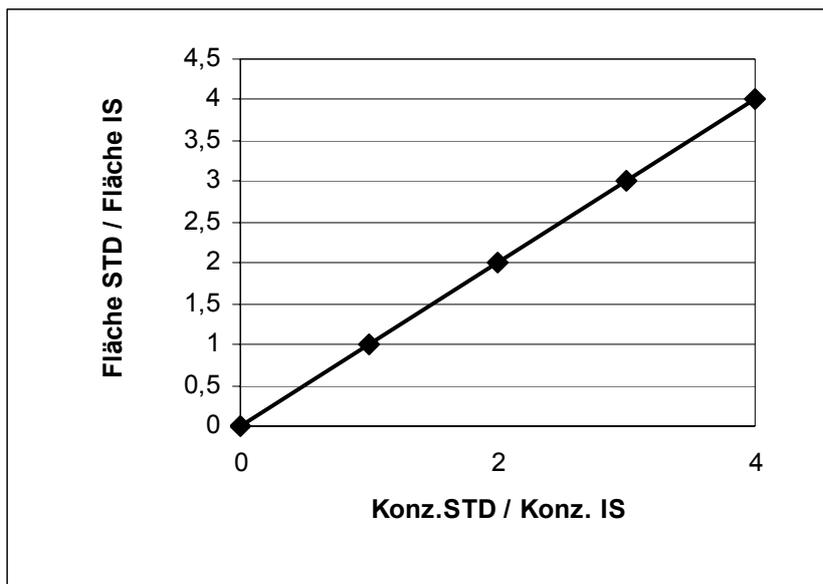
$$\text{Gl.2} \quad y = m * X$$

$$\text{Gl.3} \quad \text{Fläche STD} / \text{Fläche IS} = \text{RRF} * \text{Konz. STD} / \text{Konz. IS}$$

$$\text{Gl.4} \quad \text{RRF} = (\text{Fläche STD} / \text{Fläche IS}) * (\text{Konz. IS} / \text{Konz. STD})$$

Die Konzentrationsberechnung einer unbekannt Probe ergibt sich aus folgender Gleichung :

$$\text{Gl.5} \quad \text{Konz. Probe} = (\text{Fläche Probe} / \text{Fläche IS}) * (\text{Konz. IS} / \text{RRF})$$



**Abb.49:** Grafische Darstellung einer idealen Funktion zur Auswertung mit einem Internem Standard STD = Standard der zu analysierenden Substanz, IS = Interner Standard

## 12 Literatur

- ACD/I-Lab service; ACD/pKa v6.0 und ACD/Log P v6.0, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com).
- Adam D.**, Thoma K. (1994) Antibiotika: neuere Wirkstoffe und Darreichungsformen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Arthur E.**, Rice Pam., Rice Pat., Anderson T., Baladi S., Henderson K., Coats J. (2005) Critical reviews in plant sciences: 24(2), 109-122.
- atd 2008**, [www.arznei-telegramm.de/demeclocyclin-HCl](http://www.arznei-telegramm.de/demeclocyclin-HCl).
- Batchelder A.R.** (1981) Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in liquid cultures. Journal of environmental quality: 10, 515-518.
- Batchelder A.R.** (1982) Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems. Journal of environmental quality:11 (4), 675-678.
- BfT Bundesverband für Tiergesundheit e.V.** (2005) Arzneimittel in der Umwelt. Tiergesundheit – Berichte aus der Tiergesundheitsindustrie in Europa: 47.
- Bowles D.**, Isayenkova J., Lim E., Poppenberger B. (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. Current Opinion in Plant Biology: 8, 254-263.
- Boxall A.**, Fogg L., Blackwell P., Kay P., Pemberton E., Croxford A. (2004) Veterinary medicines in the environment. Reviews of environ. contam. and tox.: 180, 1-91.
- Boxall A.B.A.**, Johnson P., Smith E.J., Sinclair C.J., Stutt E., Levy L.S. (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. J. Agric. Food Chem.: 54, 2288-2297.
- Briggs Geoffrey G.** (1981) 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), 1050-1059.
- Briggs G.G.**, Bromilow R.H. (1983) Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. Pesticide Sci: 14 (5), 492.
- Bromilow R.H.**, Chamberlain K. (1995) Principles governing uptake and transport of chemicals. In: Trapp S., McFarlane J.C. (Hrsg.) Plant Contamination : modelling and simulation of organic chemical processes. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bromilow R.H.**, Chamberlain K. (1989) Mechanisms and regulation of transport processes. In Atkin R.K., Clifford D.R. (eds) Monogr. 18, British plant growth regulation group.
- Claizzi J.L.**, Klink P.R. (1969) pH-Partition behavior of tetracyclines. J. Pharm. Sci.: 58, 1184-1189.

- Coleman J. O. D., Frova C., Schröder P., Tissut M. (2002)** Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides. *ESPR – Environ Sci & Pollut Res*: 9 (1), 18-28.
- Coupland D. (1991)** 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, 263-278.
- DIN 32633 (1998)** Chemische Analytik, Verfahren der Standardaddition, Verfahren, Auswertung. Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin.
- DIN 32645 (1994)** Chemische Analytik, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung. Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin. Deutsches Institut für Normierung e.V.
- DIN 38402 (1986)** Teil 52: Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen. 16. Auflage, Berlin.
- Dolliver H., Kumar K., Gupta S. (2007)** Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of environmental quality*: 36 (4), 1224-1230.
- Edwards R., Dixon D.P., Walbot V. (2000)** Plant glutathione S-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science*: 5(5), 193-198.
- Engels H. (2004)** Verhalten von ausgewählten Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und Boden. *Forschungsbericht Agrartechnik 427*, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Eschrich, W. (1995)** Funktionelle Pflanzenanatomie. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Farkas M.H., Berry J.O., Aga D.S. (2007)** Chlortetracycline Detoxification in Maize via Induction of Glutathione S-Transferase after Antibiotic Exposure. *Environmental Science and Technology*: 41 (4), 1450-1456.
- FEDESA (1999)** Antibiotics for Animals. A FEDESA perspective on Antibiotics, Animal Health and the Resistance Debate. Brüssel, [www.fedesa.be](http://www.fedesa.be).
- FEDESA (2001)** Antibiotic use in farm animals does not threaten human health, a new study suggests. [www.fedesa.be](http://www.fedesa.be)
- Freitag M., Yolcu D.Y., Michel R., Hayen H., Grote M. (2008)** Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3, 174-184.

- Gachon C.M.M., Langlois-Meurinne M., Saindrenan P. (2005)** Plant secondary metabolism glycosyltransferase : the emerging functional analysis. Trends in Plant Science: 10 (10), 542-549.
- Glägen W.E., Komoßa D., Bohnenkamper O., Haas M., Hertkorn N., May R.G., Szymezak W., Sandermann H. Jr (1999)** Metabolism of the Herbicide Isoproturon in Wheat and Soybean Cell Suspension Cultures. Pesticide Biochemistry and Physiology: 63, 97-113.
- Giglio V.E., Cilento G. (1993)** Light emission accompanies oxygen uptake during the peroxidative metabolism of tetracyclines. Photochem. and Photobio.: 58 (3), 446-449.
- Göbel A., McArdell C.S., Joss A., Siegrist H., Giger W. (2007)** Fate of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. Science of the total environment 372, 361-371.
- Goss K.U (2003)** Der Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient – Das Allheilmittel der Umweltchemie?. 15 UWSF (4), 273-279.
- Gräfe u. (1992)** Biochemie der Antibiotika: Struktur – Biosynthese – Wirkmechanismus. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Grote M., Vockel A., Schwarze D., Mehlich A., Freitag M. (2004)** Fate of antibiotics in food chain and environment originating from pigfattening (part 1). Fres. Environm. Bull. 13 (11b), 1216-1224.
- Grote M., Betsche T., Freitag M. (2005)** „Antiinfektiva einträge 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.
- Grote M., Schwake-Anduschus C., Stevens H., Michel R., Betsche T., Freitag M. (2006)** Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1, 40-52.
- Grote M., Schwake-Anduschus C., Michel R., Stevens H., Heyser W., Langenkämper G., Betsche T., Freitag M. (2007)** Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. Landbauforschung Völkenrode 1 (57), 25-32.
- Grote M., Schwake-Anduschus C., Michel R., Langenkämper G., Betsche T., Hayen H., Heyser W., Freitag M. (2007a)** Aufnahme und Transport von Tierarzneistoffen in Nutzpflanzen. In: Müncher Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Band 58, Vorträge der 58. Fachtagung „Tierarzneimittel in der Umwelt“, Hrsg. Bayrisches Landesamt für Umwelt, Oldenbourg Industrieverlag GmbH, 161-173.

- Grote M., Betsche T., Freitag M. (2007b)** „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
- Grote M., Kuhlmann, B., Preuß, G., Schulte-Ebbert, U., Stevens, H. und Zullei-Seibert, N.** Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes (2007c) Institut für Wasserforschung GmbH, Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Heft 66.
- Gujarathi N.P., Haney B.J., Linden J.C. (2005)** Phytoremediation potential of *Myriophyllum aquaticum* and *pistia stratiotes* to modify antibiotic growth promoters, tetracycline and oxytetracycline in aqueous wastewater systems. *International Journal of Phytoremediation*: 7, 99-112.
- Haller M.Y., Muller S.R., McArdell C.S., Alder A.C., Suter M.J.F. (2002)** Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamids and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A* 952, 111-120.
- Halling-Sørensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten-Lützhof H.C., Jørgensen (1998)** Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Halling-Sørensen B., Sengelov G., Tjornelund J. (2002)** Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 263-271.
- Hamscher G., Sczesny S., Abu-Quare A., Höper H., Nau H. (2000)** Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden. *Deutsche tierärztl. Wochenschrift* 107 (8), 332-334.
- Hamscher G., Sczesny S., Höper H., Nau H. (2002)** Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74, 1509 – 1518.
- Hamscher G., Pawelzick H.T., Höper H., Nau H. (2005)** Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilisation with liquid manure. *Environ Toxicol Chem* 24, 861-868.
- Harms, H. (1994)** Phytotoxizität, Metabolismus und Persistenz org, Xenobiotika aus kommunalen und industriellen Abfällen in Pflanzen. In : Alev, K., Fiedler, H., Hutzinger,

- O. (Hrsg) ECOINFORMA `94 Vol.5, Umweltmonitoring und Bioindikation, Wien, S. 217-228.
- Harms H., Bockern M., Kolb M., Bock C. (1994)** Uptake, metabolismn and persistence of xenobiotics in different plant systems. Plant uptake and metabolismn of organic pollutants. Conference session 2, Vienna.
- Harms S.K. (2006)** Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Antibiotika und deren Metaboliten in Schweinegülle. Dissertation, Technische Universität München.
- Harvey P.J. et al. (2002)** Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 9, 29–47 .
- Hawker D. (1989)** The relationship between octan-1-ol/water partition coefficient and aqueous solubility in terms of solvatochromic parameters. Chemosphere 19, 1585-1593.
- Hayen H. (2006)** mündliche Mitteilung.
- Heyser W. (2008)** mündliche Mitteilung.
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L. (1999)** Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The science of the total environment 225, 109-118.
- IFAH 2007**, International Federation for Animal health, Antibiotics and Animals, Fast Facts, <http://www.ifahsec.org>.
- Jensen J.E., Madsen K.H., Nielsen S.O., Streibig J.C. (1994)** Chlorophyll fluorescence – a rapid method for quantification of herbicide effects. SP Rapport: 6, 251-260.
- Jjemba P.K (2002)** The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. Agriculture, Ecosystems and Environment 93, 267 – 278.
- Kloepfer A., Quintana J.B., Reemtsma T. (2005)** Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. J.Chrom.A 1067, 153-160.
- Köhler H. (1960)** Anwendung der Antibiotika im Pflanzenschutz, unter besonderer Berücksichtigung ihrer Aufnahme, Weiterleitung und ihres Verbleibs in der höheren Pflanze. J Pest Sci 33, 25-27.
- Kong W.D., Zhu Y.G., Liang Y.C., Zhang J., Smith F.A., Yang M. (2007)** Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (medicago sativa L.). Environmental Pollution 147, 187-193.

- Korte F.**, Kvesitadze G., Ugrekhelidze D., Gordeziani M., Khatishashvili G., Buadze O., Zaalishvili G., Coulston F. (2000) Organic Toxicants and Plants, Review, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 1-26.
- Krämer U.** (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 133-141.
- Krasilnikow N.A.** (1958) Soil, microorganisms and higher plants, part IV, interaction between soils microorganisms and plants, Moskau, Academy of Sciences of the USSR. Hrsg., Übersetzung (1961), The national science foundation, Washington DC.
- Kümmerer K.** (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (2), 311-320.
- Kumar K.**, Gupta S.C., Baidoo S.K., Chander Y., Rosen C.J. (2005) Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 34, 2082 – 2085.
- Langenkämper G.** persönliche Mitteilung (2006).
- Langewische M.E.**, Bottermann H. (2003) Bedeutung von Arzneimittelrückständen für das Resistenzgeschehen und die Expression von Virulenzfaktoren unterhalb der MRL-Werte/subinhibitorischer Konzentrationen antimikrobieller Wirkstoffe. *Amtsärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 10, 300-309.
- Langhammer J.P.**, (1989) Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Fr.-W.-Universität Bonn, Dissertation.
- Langhammer J.P.**, Führ F., Büning-Pfaue H. (1990) Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanze. *Lebensmittelchemie* 44, 93.
- LANUV 2007** Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen: [www.lanuv.nrw.de](http://www.lanuv.nrw.de)
- Lüttge U.**, Kluge M., Bauer G. (1988) *Botanik : ein grundlegendes Lehrbuch.* VCH, Weinheim.
- Mc Farlane J.C.** (1995) Anatomy and physiology of plant conductive systems. In Trapp S., McFarlane J.C. (Hrsg.) *Plant Contamination : modelling and simulation of organic chemical processes.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Meyers (2007)** Meyers Lexikonverlag Herausgeber: Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, <http://lexikon.meyers.de/index.php?title=Kutikula&oldid=181010>.

- Migliore L., Brambilla G., Cozzolino S., Gaudio L. (1995)** Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming ( *Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*: 52, 103-110.
- Migliore L., Civitareale C., Cozzolino S., Casoria P., Brambilla G., Gaudio L. (1998)** Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. *Chemosphere* 37, 2957 – 2961.
- Migliore L., Cozzolino S., Fiori M. (2003)** Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52, 1233 – 1244.
- Naidong W., Roets E., Busson R., Hoogmartens J. (1990)** Separation of keto-enol tautomers of chlortetracycline and 4 epichlortetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divenylbenzene)copolymer. *J Pharm Biomed Anal* 8, 881-889.
- Newman L.A., Strand S.E., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruszaj M., Shurtleff B.B., Wilmoth J., Heilman P., Gordon M.P. (1997)** Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environ.Sci.Technol.* 31(4), 1062-1067.
- Olsen J. V., Ong S. E., Mann M. (2004)** Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell Proteomics* 3, 608–614.
- Onken D. (1979)** *Antibiotika, Chemie und Anwendung*. Akademie-Verlag, Berlin.
- Ryan J. A., Bell R. M., Davidson J. M., O'Connor G. A. (1988)** Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils. *Chemosphere* 17 (12), 2299-2323.
- Sattelberger, R. (1999)** *Arzneimittelrückstände in der Umwelt – Bestandsaufnahme und Problemdarstellung*. Bericht des Umweltbundesamtes, Wien.
- Schneiderei, M. (2005)** *Antibiotika-Einsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredlungsregionen*. 20.Jahrestagung RE Ges. Symposium II.
- Schnoor J.L., Light L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. (1995)** Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29 (7), 318A-323A.
- Schramm K.W., Hutzinger O. (1990)** UNITTree: a model to estimate the fate of organic chemicals in plants. *Toxicol. Environ. Chem.* (26), 61.
- Schwake-Anduschus C., Nettmann E., Betsche T., Langenkämper G., Freitag M., Grote M. (2003)**, Untersuchungen zur Aufnahme von Veterinärpharmaka verschiedener Nutzpflanzen über die Wurzeln, Symposium "Gesunde Umwelt für gesunde Pflanzen - Pflanzentoxikologie zwischen Prozessverständnis und Risikobewertung" Abstract, Braunschweig 9.-10.10.2003.

- Sedlak D. L.**; Pinkston, K. E. (2001) Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *J. Contemp. Water Res. Educ.* 1, 56-65.
- Sens, C.** (1998) Metabolisierung und Lokalisierung von <sup>14</sup>C-TNT in *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum*. Dissertation Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie.
- Shang T.Q.**, Doty S.L., Wilson A.M., Howald W.N., Gordon M.P. (2001), Trichloroethylene oxidative metabolism in plants: the trichloroethanol pathway. *Phytochemistry* 58, 1055-1065.
- Shang T.Q.**, Newman L.A., Gordon M.P. (2003) Fate of trichloroethylene in terrestrial plants, McChutcheon S.C., Schnoor J.L. (Herausgeber) *Phytoremediation*. John Wiley & Sons, 529-560.
- Sicbaldi F.**, Del Re A. A. M. (1993) Relationships of pesticide octanol/water partition coefficients to their physicochemical properties. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 133, 59-93.
- Smith DL**, Dushoff J., Morris G.jr. (2005) Agricultural Antibiotics and human health. *Plos Med* 2, 731-735.
- Sokolova L.I.**, Chernyaev A.P. (2001) Determination of benzylpenicillin, levomycetin (Chloramphenicol), and tetracycline in food products by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* 56 (11), 1032-1034.
- Stephens C.R.**, Murai K., Brunings K.J., Woodward R.B. (1956) Acidity constants of the tetracycline antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 78 (16), 4155-4158.
- Stoop K.**, Schmitt H., Wanner M. (2007) Antibiotikaeinsatz in der Landwirtschaft – Folgen für die Umwelt. *EAWAG News* 1-63.
- Strasburger E.**, Noll F., Schenck H., Schimper A.F.W. (1998) *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 34. Aufl., Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, G. Fischer Verlag.
- Stüber M.** und **Reemtsma T.** (2004) Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 378, 910-916.
- Thiele-Bruhn S.** (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr Soil Sci* 166, 145-167.
- Thiele-Bruhn S.**, Beck I.-C. (2005) Effects of sulphonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457- 465.
- Trapp S.**, Matthies M., Scheunert I., Topp E.M. (1992) Modeling the bioconcentration of organic chemicals in plants. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1246.

- Trapp S. (1995)** Model for uptake of xenobiotics into plants. In: Trapp S., McFarlane J.C. (Hrsg.), Plant Contamination : modelling and simulation of organic chemical processes. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Trapp S. (2000)** Aspects of the phytoremediation of organic pollutants (series). Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung 12(5), 246-255.
- Trapp S., Larsen M., Christiansen H. (2001)** Experimente zum Verbleib von Cyanid nach Aufnahme in Pflanzen. Z UmweltchemÖkotox 13 (1), 29-37.
- Trapp S., Matthies M., Reiter B. (2001a)** Überprüfung und Fortentwicklung der Bodenwerte für den Boden-Pflanze-Pfad. Teilbericht I, Texte 55/01 Umweltbundesamt Berlin, Berichtsnummer 98-114, ISSN 0722-186X.
- Ungemach F.R. (1999)** Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang. Tierärztl. Prax. 27, 335-340.
- Vockel A., Röwer K., Vogel K., Mehlich A., Stolz M., Brand B., Grote M. (2004)** Sonderprogramm Verbraucherschutz 2000-2002, Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW (Hrsg.), Düsseldorf, Abschlußbericht: Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung.
- Vockel A. (2005)** Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-MS/MS – Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien. Dissertation Universität Paderborn.
- Willoughby R., Sheehan E., Mitrovich S. (2002)** 2nd Ed. A global view of LC/MS. Global View Publishing, Pittsburgh USA.
- Wilson und Goulding (1990)** Methoden der Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart - New York.
- Winckler C., Grafe A. (2001)** Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt LUFA Oldenburg der Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Forschungsbericht 29733911UBA-FB 000074.
- Yang S., Cha J., Carlson K. (2005)** Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chrom. A 1097, 40-53.

**Zurhelle G., Müller-Seitz E., Petz M. (2000)** 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, 191-203.

**Zurhelle G.(2000a)** Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen. Dissertation, Bergische Universität- Gesamthochschule Wuppertal.

# Anhang

## A 1 Verwendete Lösungen bei der Anzucht der Pflanzen

### Chlortetracyclin-Stammlösung

0,0738 g CTC x HCl werden in ca. 10 mL Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Die Lösung enthält 1,372 g/L CTC und wird im Kühlschrank gelagert.

### Chlortetracyclin-Lösung / Isochlortetracyclin-Stammlösung

0,4475 g CTC x HCl und 0,4362 g iso-CTC x-HCl werden in 50mL Methanol gelöst (Ultraschallbad) und mit Methanol auf 100 mL aufgefüllt. 1 mL dieser Lösung enthält 8,68 µmol CTC und 8,46 µmol iso-CTC. Zur Lagerung wird sie in den Kühlschrank gestellt.

### Hoagland-Nährlösung

Die Nährlösung nach Hoagland wird durch Verdünnen dreier Stammlösungen hergestellt. Je 50 mL der Stammlösungen I, II und III werden in einen 5 L Meßkolben pipettiert und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Die Stammlösungen werden durch Einwaage folgender Salze jeweils in einem 2 L Meßkolben hergestellt:

#### Stammlösung I:

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ <i>Magnesiumsulfat-Heptahydrat</i> , p.A., Merck 123386	49,296 g / 2 L Wasser
$KNO_3$ <i>Kaliumnitrat</i> , p.A., Merck 5063	103,132 g / 2 L Wasser
$NH_4H_2PO_4$ <i>Ammoniumdihydrogenphosphat(V)</i> , p.A., Merck 1126	46,012 g / 2 L Wasser

#### Stammlösung II:

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ <i>Calciumnitrat-Tetrahydrat</i> , p.A., Merck 2121	188,921 g / 2 L Wasser
--	------------------------

### Stammlösung III:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat, p.A., Merck 1.03943	0,5406 g / 2 L Wasser
$\text{H}_3\text{BO}_3$ Borsäure, zur Analyse, Riedel-de-Haen 31146	0,5713 g / 2 L Wasser
$\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Mangan-(II)-chlorid-Dihydrat, p.A., Merck 1.05934	0,2290 g / 2 L Wasser
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Zinksulfat-Heptahydrat, p.A., Merck 1.08883	0,0500 g / 2 L Wasser
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ Kupfersulfat- Pentahydrat, p.A., Merck 2790	0,0160 g / 2 L Wasser
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Natriummolybdat-Dihydrat, p.A., Merck 1.146809	0,0498 g / 2 L Wasser
$\text{Na}_2\text{SiO}_4$ Natriumsilikat, Riedel-de-Haen 13726	0,0138 g / 2 L Wasser
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ Kobaltchlorid-Hexahydrat,p.A., Merck 2539	0,0026 g / 2 L Wasser
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ KaliumAluminiumsulfat- Dodekahydrat, p.A., Merck1047	0,0095 g / 2 L Wasser

Spuren von Nickel ist aus Verunreinigungen ausreichend vorhanden und muss nicht extra zugesetzt werden..

Die Stammlösungen I, II, III sind ca. 6 Wochen im Kühlschrank bei 4°C haltbar.

Die aus den Stammlösungen hergestellte Hoagland-Nährlösung hat einen pH-Wert von 4,7. Wird ein anderer pH-Wert benötigt (für Feldsalat pH 6), wird dieser durch tropfenweisen Zusatz von ca. 2 mL 7% iger KOH-Lösung (w / w) eingestellt. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte mit einer pH-Elektrode.

### Natriumhypochlorit-Lösung, 0,5% (w / w)

33,3 mL 3% ige NaOCl-Lösung werden mit 166,7 mL Wasser gemischt.

### Sulfadiazin-Stammlösungen

I : 0,45 g SFD werden in 100 mL Wasser aufgeschlämmt und mit 1 mL 3 M NaOH tropfenweise versetzt, bis eine klare Lösung entsteht. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit ca. 0,5 mL 1 M HCl auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und auf 200 mL aufgefüllt.

**II** : 0,225 g SFD werden in 100 mL Wasser aufgeschlämmt und tropfenweise mit 2 mL 7% iger Kalilauge (w / w) versetzt bis eine klare Lösung entsteht. Mit eine pH-Elektrode wird der pH-Wert der Lösung gemessen und mit 1,5 mL einer 1M Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Die Lösung wird auf 200 mL mit Wasser aufgefüllt. Sie hat eine Konzentration von 1,125 mg SFD pro mL.

#### **Tween 80 - Lösung, 0,1% (w/w)**

0,2g Tween 80 (Merck 822187) werden in 199,8g Wasser gelöst.

#### **Wasserstoffperoxid-Lösung, 0,75 % (w/w)**

5g 30% ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung werden in 195g Wasser gelöst

## **A2 Verwendete Lösungen bei der Probenaufbereitung und Analytik**

#### **Laufmittel A** (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 89,9%/10%/0,1%, v/v/v)

1800 mL bidest. Wasser werden mit 200 mL Acetonitril und 2 mL Ameisensäure in einem Becherglas gemischt.

#### **Laufmittel B** (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 40%/59,9%/0,1%, v/v/v)

800 mL Acetonitril werden mit 1200 mL bidestilliertem Wasser und 2 mL Ameisensäure in einem Becherglas gemischt.

#### **Mcllvain-Puffer = Citratpuffer**

310 mL 0,1 M Citronensäure (Acros 124910010) – Lösung in Wasser

190 mL 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 1.06580) – Lösung in Wasser

18,6 g EDTA / Titriplex (Merck 1.008418)

Die Lösungen werden in einem 1 L-Becherglas mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt und das EDTA löffelweise zugesetzt. Zum besseren Lösen kann etwas erhitzt werden. Nach dem vollständigen Lösen wird der pH-Wert mit ca. 10 mL 1 M Salzsäure auf 4,1 eingestellt.

#### **Standard-Matrix**

10 Kontrollproben, die kein AB enthalten, wurden gemäß der Vorschrift (siehe 11.2.3) aufgearbeitet. Nach dem Abdampfen des Methanols aus der Elution der Festphasenkartouche wurden die Rückstände in je 1 mL Laufmittel A aufgenommen und anschließend vereinigt. Diese Lösung wird *Standard-Matrix* genannt.

Mit ihr wurden die Versuche in Matrix durch Zupipettieren der verschiedenen SFD Standard-Lösungen durchgeführt.

### A3 Verwendete Lösungen bei den Versuchen mit Tritium-markierten Antibiotika und die ermittelten Gehalte

Tab. 31: Antibiotika-Gehalte in Feldsalat und Weizen in mg/kg FG

Antibiotikum	Konz. in Nährlösung	Zeit	Pflanzenteil	Feldsalat	Weizen	
	[ $\mu\text{mol/L}$ ]				[d]	
SFD	10	7	Wurzel	0,004	0,008	
SFD	10	14	Wurzel	0,006	0,024	
SFD	10	21	Wurzel	0,005	0,090	
*CTC	5	7	Wurzel	0,044	0,422	
CTC	5	14	Wurzel	0,066	3,901	
CTC	5	21	Wurzel	0,164	3,110	
CTC	10	7	Wurzel	0,154	1,451	
CTC	10	14	Wurzel	0,221	1,434	
CTC	10	21	Wurzel	0,221	5,321	
			Blatt		jung	alt
SFD	10	7	Blatt	0,007	0,0001	0,0003
SFD	10	14	Blatt	0,002	0,003	0,001
SFD	10	21	Blatt	0,003	0,001	0,001
CTC	5	7	Blatt	0,024	0,066	0,023
CTC	5	14	Blatt	0,202	0,011	0,051
CTC	5	21	Blatt	0,084	0,004	0,137
CTC	10	7	Blatt	0,017	0,033	0,118
CTC	10	14	Blatt	0,021	0,038	0,029
CTC	10	21	Blatt	0,005	0,094	0,343

\* CTC: jeweils äquimolare Mischung aus CTC und iso-CTC

**Tab. 32: Verwendete Tritium-markierte Antibiotika und Reagenzien**

			Bezeichnung
3,5- <sup>3</sup> H-Sulfamethazine	1 mCi in 1mL Ethanol	0,74 MBq (20 µCi) oder 1,48 MBq (40 µCi) in 10 mL Hoagland-Nährlösung	<sup>3</sup> H-SFD
7- <sup>3</sup> H(N)-Tetracycline	1 mCi als Salz in 1mL Methanol gelöst	0,74 MBq (20µCi) oder 1,48 MBq (40µCi) in 10mL Hoagland-Nährlösung	<sup>3</sup> H-CTC
Zur Quenchkorrektur gemessene Lösungen			
	100 µL <sup>3</sup> H-SFD	+900 µL Biolute S	Stammlösung SFD
	100 µL <sup>3</sup> H-CTC	+900 µL Biolute S	Stammlösung CTC
Quenchlösungen	10 µL Stammlösung SFD	3 mL Quicksafe A	
	10 µL Stammlösung CTC	3 mL Quicksafe A	
12 Experimente	10 µL Stammlösung CTC		
5 Experimente	10 µL Stammlösung SFD		
3 Experimente a	50 µL Stammlösung SFD		

**Tab. 33: Szintillationsmessungen: Experimentelle Bedingungen und Ergebnisse**

Pflanze	Antibiotikum	Zeit [d]	Gewicht [g]	Aktivität (n=2) CPM	Aktivität [CPM / mg]	Quench- Korrektur [CPM / mg]
Salat/Wurzel	SFD(II) 2,5mg/l	7	0,0215	12570	584,6	576,6
Salat/Blatt	SFD(II) 2,5mg/l	7	0,0112	943	84,2	74,9
Salat/Wurzel	CTC+iso-CTC 5µmol/l	7	0,0275	4661	169,5	161,4
Salat/Blatt	CTC+iso-CTC 5µmol/l	7	0,0147	1075	73,1	63,8
Salat/Wurzel	CTC+iso-CTC 10µmol/l	7	0,0175	5856	334,6	326,6
Salat/Blatt	CTC+iso-CTC 10µmol/l	7	0,0157	560	35,6	26,4
Salat/Wurzel	SFD(II) 2,5mg/l	14	0,0222	8135	366,4	358,4
Salat/Blatt	SFD(II) 2,5mg/l	14	0,0124	751	60,6	51,3
Salat/Wurzel	CTC+iso-CTC 5µmol/l	14	0,0229	1795	78,4	70,4
Salat/Blatt	CTC+iso-CTC 5µmol/l	14	0,0157	2609	166,1	156,9
Salat/Wurzel	CTC+iso-CTC 10µmol/l	14	0,0169	2292	135,6	127,6
Salat/Blatt	CTC+iso-CTC 10µmol/l	14	0,0203	367	18,1	8,8
Salat/Wurzel	SFD(II) 2,5mg/l	21	0,0235	4673	198,8	190,8
Salat/Blatt	SFD(II) 2,5mg/l	21	0,0155	1683	108,6	99,3
Salat/Wurzel	CTC+iso-CTC 5µmol/l	21	0,0214	3889	181,7	173,7
Salat/Blatt	CTC+iso-CTC 5µmol/l	21	0,0165	1236	74,9	65,6
Salat/Wurzel	CTC+iso-CTC 10µmol/l	21	0,0162	2198	135,6	127,6
Salat/Blatt	CTC+iso-CTC 10µmol/l	21	0,016	186	11,6	2,3
Salat/Wurzel	Kontrolle		0,0225	155	6,9	8,0
Salat/Blatt	Kontrolle		0,0128	143	11,2	
Salat/Blatt	Kontrolle		0,0174	213	12,2	
Salat 2.1/Blatt alt	Kontrolle		0,0153	109	7,1	
Salat 2.1/Blatt jung			0,0151	101	6,7	9,3
Salat 2.1/Wurzel	Kontrolle		0,0238	219	9,2	
Weizen/Wurzel	SFD 2,5mg/l	21	0,0123	43101	3504,1	3504,15
Weizen/Blatt alt	SFD 2,5mg/l	21	0,0158	671	42,5	35,83
Weizen/Blatt jung	SFD 2,5mg/l	21	0,0114	313	27,5	15,22
Weizen/Wurzel	CTC+iso-CTC 5µmol/l	21	0,01112	30451	2738,4	2738,35

**Fortsetzung**

**Tab. 33**

<b>Pflanze</b>	<b>Antibiotikum</b>	<b>Zeit [d]</b>	<b>Gewicht [g]</b>	<b>Aktivität (n=2) [CPM]</b>	<b>Aktivität [CPM / mg]</b>	<b>Quench- Korrektur [CPM / mg]</b>
Weizen/Blatt alt	CTC+iso-CTC 5µmol/l	21	0,0122	1041	85,3	78,6
Weizen/Blatt jung	CTC+iso-CTC 5µmol/l	21	0,0173	289	16,7	4,4
Weizen/Wurzel	SFD 2,5mg/l	14	0,0357	33791	946,5	946,5
Weizen/Blatt alt	SFD 2,5mg/l	14	0,016	777	48,5	41,9
Weizen/Blatt jung	SFD 2,5mg/l	14	0,0113	903	79,9	79,9
Weizen/Wurzel	SFD 5mg/l	14	0,0197	14544	738,2	738,2
Weizen/Blatt alt	SFD 5mg/l	14	0,0199	410	20,6	13,9
Weizen/Blatt jung	SFD 5mg/l	14	0,0142	584	41,1	28,9
Weizen/Wurzel	CTC+iso-CTC 5µmol/l	14	0,0115	39509	3435,6	3435,6
Weizen/Blatt alt	CTC+iso-CTC 5µmol/l	14	0,0149	531	35,6	29,0
Weizen/Blatt jung	CTC+iso-CTC 5µmol/l	14	0,0128	316	24,6	12,4
Weizen/Wurzel	CTC+iso-CTC 10µmol/l	14	0,0221	15143	685,2	685,2
Weizen/Blatt alt	CTC+iso-CTC 10µmol/l	14	0,0196	306	15,6	8,9
Weizen/Blatt jung	CTC+iso-CTC 10µmol/l	14	0,0133	467	35,1	22,9
Weizen/Wurzel	SFD 2,5mg/l	7	0,0266	13857	520,9	520,9
Weizen/Blatt alt	SFD 2,5mg/l	7	0,0231	444	19,2	12,6
Weizen/Blatt jung	SFD 2,5mg/l	7	0,014	246	17,6	5,3
Weizen/Wurzel	SFD 5mg/l	7	0,0166	22067	1329,3	1329,3
Weizen/Blatt alt	SFD 5mg/l	7	0,0163	382	23,4	16,8
Weizen/Blatt jung	SFD 5mg/l	7	0,0206	208	10,1	-2,2
Weizen/Wurzel	CTC+iso-CTC 5µmol/l	7	0,0212	13634	643,1	643,1
Weizen/Blatt alt	CTC+iso-CTC 5µmol/l	7	0,0147	426	29,0	22,3
Weizen/Blatt jung	CTC+iso-CTC 5µmol/l	7	0,0161	2208	137,1	124,9
Weizen/Wurzel	CTC+iso-CTC 10µmol/l	7	0,0154	19952	1295,6	1277,7
Weizen/Blatt alt	CTC+iso-CTC 10µmol/l	7	0,0163	1207	74,0	67,4
Weizen/Blatt jung	CTC+iso-CTC 10µmol/l	7	0,0149	718	48,2	35,9

**Fortsetzung  
Tab. 33**

<b>Pflanze</b>	<b>Antibiotikum</b>	<b>Zeit [d]</b>	<b>Gewicht [g]</b>	<b>Aktivität (n=2) [CPM]</b>	<b>Aktivität [CPM / mg]</b>	<b>Quench- Korrektur [CPM / mg]</b>
Weizen/Wurzel	SFD 5mg/l	21	0,0275	29322	1066,3	1048,4
Weizen/Blatt alt	SFD 5mg/l	21	0,0217	323	14,9	8,2
Weizen/Blatt jung	SFD 5mg/l	21	0,0125	501	40,0	27,8
Weizen/Wurzel	CTC+iso-CTC 10µmol/l	21	0,0138	35323	2559,6	2541,7
Weizen/Blatt alt	CTC+iso-CTC 10µmol/l	21	0,0172	1946	113,1	106,5
Weizen/Blatt jung	CTC+iso-CTC 10µmol/l	21	0,0131	898	68,5	56,3
Weizen/Wurzel	Kontrolle		0,0129	231	17,9	
Weizen/Blatt jung	Kontrolle		0,0132	162	12,2	
Weizen/Blatt alt	Kontrolle		0,0186	124	6,6	

**Tab. 34: Quenchfaktoren**

<b>Probenbestandteile</b>	<b>Aktivität [CPM]</b>	<b>Quenchfaktor</b>	<b>Matrix</b>
Quicksafe A+10µL CTC	4468		
QA+BioS+10µLCTC	1560	2,864	Biolute S und CTC
Quicksafe A+10µL SFD	7629		
QA+BioS+10µLSFD	1871	4,077	Biolute S und SFD
QA+BioS+10µLCTC	1560		
FS,Kon,Wu, +10µLCTC	1987	0,785*	FS Wurzel für CTC
QA+BioS+10µLCTC	1560		
FS,Kon,Ba+10µLCTC	1619	0,964*	FS Blatt alt für CTC
QA+BioS+10µLCTC	1560		
FS,Kon,Bj+10µLCTC	1324	1,178	FS Blatt jung für CTC

<b>Fortsetzung Tab. 34</b>			
FS, Blatt, Mittelwert		1,071	FS Blatt für CTC
QA+BioS+10µLSFD	1871		
FS,Kon,Wu+10µLSFD	1733	1,08	FS Wurzel für SFD
QA+BioS+10µLSFD	1871		
FS,Kon,Ba+10µLSFD	1300	1,439	FS Blatt alt für SFD
QA+BioS+10µLSFD	1871		
FS,Kon,Bj+10µLSFD	1182	1,583	FS Blatt jung für SFD
FS, Kon Blatt Mittelwert		1,511	FS Blatt für SFD
QA+BioS+10µLCTC	1560		
WW,Kon,Wu +10µLCTC	1757	0,888*	WW Wurzel f. CTC
QA+BioS+10µLCTC	1560		
WW,Kon,Ba +10µLCTC	1141	1,367	WW Blatt alt f. CTC
QA+BioS+10µLCTC	1560		
WW,Kon,Bj + 10µLCTC	2200	0,709*	WW Blatt jung f. CTC
Quicksafe A+10µL CTC	4468		
FS, NLös, 5µmol, +10 µL CTC	1992 – 103 = 1889	2,365	FS Nährlösung CTC 5µmol/L für CTC
Quicksafe A+ 10µL CTC	4468		

<b>Fortsetzung Tab. 34:</b>			
FS, NLös, 10µmol, +10 µL CTC	913 – 89= 824	5,422	FS Nährlösung CTC 10µmol/L für CTC
Quicksafe A+ 10µL SFD	7629		
FS, NLös, 2,5mg/L SFD, +50 µL SFD	2175 / 5= 435 – 98 = 337	22,638	FS Nährlösung SFD 2,5 mg/L (10µmol/L) für SFD
Quicksafe A+ 10µL SFD	7629		
WW, NLös, 2,5mg/L SFD, +50 µL SFD	1960 / 5= 392 – 148= 244	31,266	WW Nährlösung SFD 2,5 mg/L (10µmol/L) für SFD
Quicksafe A+ 10µL CTC	4468		
WW, NLös, 5µmol, +10 µL CTC	1570 – 155 = 1415	3,158	WW Nährlösung CTC 5µmol/L für CTC
Quicksafe A+ 10µL CTC	4468		
WW, NLös, 10µmol, +10 µL CTC	2918 – 102= 2816	1,587	WW Nährlösung CTC 10µmol/L für CTC

\* Faktor <1 Mögliche Ursache: Fluoreszierende Proben-Bestandteile

### Verwendete Abkürzungen

B	Blatt
BioS	Biolute S = Gewebeauflöser
CPM	counts per minute
DPM	disintegrations per minute
FS	Feldsalat
Kon	Kontrolle
NLös	Nährlösung
QA	Quicksafe A = Szintillationslösung
Wu	Wurzel
WW	Winterweizen

### A 3.1 Umrechnung von Radioaktivitätseinheiten

#### Berechnung der Chemischen Konzentration anhand der radioaktiven Konzentration und der spezifischen Aktivität:

Chem.Konz. [mmol/mL] = Radioaktive Konz. [mCi/mL] / Spezifische Aktivität [mCi/mmol]

#### Einheiten:

Ci [Curie]	Bq [Bequerel] = 1/sec	Cpm [Counts per minute]
1	$3,7 \times 10^{10}$	
$2,7 \times 10^{-11}$	1	
$4,51 \times 10^{-11}$	1,67	100

#### Anfangswerte für Nährlösungen :

- In 10mL Hoagland-Nährlösung werden 20 $\mu$ Ci (20 $\mu$ L der  $^3$ H-Ausgangslösung) gelöst. Das sind 20  $\mu$ Ci X 100Cpm /  $4,51 \times 10^{-5}$  = 44 345 898 Cpm in 10 mL Hoaglandlsg ohne Quench. Oder
- 2 217 294,9 Cpm in 0,5mL

#### Stammlösung zum Quenchen:

- 100 $\mu$ Ci + 900 $\mu$ L Biolute S, 10 $\mu$ L davon (= 1 $\mu$ Ci) werden mit 3mL Quicksafe A gelöst (=3010 $\mu$ L Lösung)
- Davon sind 10 $\mu$ L : 0,00332  $\mu$ Ci = 7361,4 Cpm