

# **Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika in Rotkohl und Möhren - Verbreitungspfade und mögliche Verbraucherrisiken**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften  
Department Sport & Gesundheit  
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation

von Farzana Chowdhury,  
staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin

aus Habiganj, Bangladesh

Paderborn 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2009 bis Dezember 2011 in Kooperation mit der Faethe Labor GmbH an der Universität Paderborn in der Fakultät für Naturwissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote, Department Chemie, angefertigt.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

F. Chowdhury, G. Langenkämper, C. Sprenger, M. Grote; Antibiotika-Kontamination verzehrstarker Gemüse durch Wirtschaftsdünger; 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2010 der Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker; 20.-22. September, Stuttgart-Hohenheim; Tagungsband, 2010, S. 53

F. Chowdhury, G. Langenkämper, C. Sprenger, M. Grote; Antibiotika-Kontamination verzehrstarker Gemüse durch Wirtschaftsdünger; 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2010 der Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker; 20.-22. September, Stuttgart-Hohenheim; Vortrag

M. Grote, F. Chowdhury, C. Sprenger; Antibiotika-Kontamination verzehrstarker Gemüse durch Wirtschaftsdünger; Fortbildung im Rahmen der Gesellschaft Deutscher Chemiker: Fruchtsäfte, fruchtsafthaltige Getränke: Technologie, Untersuchung und Beurteilung; 21.-23. September, Paderborn, 2011

I. Michels, F. Chowdhury, H. Stevens, M. Freitag, M. Grote, A. Friese, U. Rösler; Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus Gülle gedüngtem Boden und mikrobiologische Effekte – Methoden und Ergebnisse der Anbauperiode 2011 - Verbraucherschutz in DART: Forschungserkenntnisse und –perspektiven zu Antibiotikaresistenzen; 22.-23. Mai 2012; BfR Berlin; Poster

M. Grote, D.H. Meric, H. Stevens, F. Chowdhury, I. Michels; Verbraucherrisiken durch Antibiotikaeinsatz in der Landwirtschaft? Forschung im Rahmen der deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie (DART); ForschungsForum Universität Paderborn, Jubiläumsausgabe 15 Jahre; Präsident der Universität Paderborn, Prof. Dr. N. Risch (Hrsg.); Januar 2012

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote

2. Referent: Prof. Dr. H. Hesecker

Eingereicht am: 30.05.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2012

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich sehr herzlich für die überaus interessante Themenstellung dieser Arbeit und seine engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. H. Hesecker danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. C. Sprenger, Geschäftsführer der Faethe Labor GmbH Paderborn, danke ich für die finanzielle und persönliche Unterstützung im Rahmen des Forschungsprojektes.

Herrn Dr. G. Langenkämper und Frau Korff, Max-Rubner-Institut (MRI), Standort Detmold, danke ich für die Betreuung der Hydrokultur-Experimente.

Herrn M. Herbener, Dipl.-Ing., Landwirtschaftskammer NRW, Versuchsleitung/ Beratung, ökol. Landbau für die freundliche Unterstützung während des Feldversuches.

Herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen/-arbeitern des Arbeitskreises, insbesondere bei Dr. Mareike Busse, Anja Demir, Manuel Ewe, Dr. Claudia Heine, Rodica Knaup, Dr. Didem Hanım Meriç, Inga Michels, Annika Sitzer und Dr. Henning Stevens für die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Problemstellung.....	1
1.2	Zielsetzung.....	3
2	Verbrauchergefährdung durch Veterinärantibiotika.....	5
2.1	Antibiotika-Einsatz in der Landwirtschaft .....	5
2.1.1	Verwendung von Veterinärantibiotika in der Nutztierhaltung.....	6
2.1.2	Anwendungsmengen von Veterinärantibiotika in Deutschland und Europa .....	8
2.2	Antibiotika-Resistenzen von human- und veterinärpathogenen Erregern.....	11
2.2.1	Resistenzen und ihre Wirkmechanismen.....	11
2.2.2	Ursachen der Antibiotika-Resistenzentwicklung .....	14
2.2.3	Resistenzen bedeutender humanpathogener Erreger .....	15
2.2.4	Resistenzen bedeutender veterinärpathogener Erreger .....	18
2.3	Verbrauchergefährdung durch resistente Keime in der Lebensmittelkette .....	20
2.3.1	Eintrag von Antibiotikarückständen und resistenten Erregern über die Nahrungsmittelkette in den Menschen.....	24
2.3.2	Lebensmittelrechtliche Aspekte zu Antibiotikarückständen in tierischen Lebensmitteln .....	27
3	Umwelteintrag, Verbreitungspfade und Aufnahme von Veterinärantibiotika in Nutzpflanzen .....	29
3.1	Eintragungspfade von Veterinärantibiotika in die Umwelt .....	29
3.2	Verhalten von Veterinärantibiotika in Boden .....	32
3.3	Eintragungspfade von Veterinärantibiotika in Pflanzen .....	34
3.3.1	Morphologie und Physiologie der pflanzlichen Wurzel .....	34
3.3.2	Pflanzenverfügbarkeit - Aufnahmemodelle .....	37
3.3.3	Metabolismus in Pflanzen.....	39
3.4	Rotkohl und Möhren als Versuchspflanzen.....	41
3.4.1	Anbaufläche und Ertrag in Deutschland.....	41
3.4.2	Botanische Charakterisierung.....	43
4	Eigenschaften der eingesetzten Veterinärantibiotikaklassen .....	47
4.1	Tetracycline.....	47
4.2	Fluorchinolone.....	49
4.3	Beta-Lactame .....	53
4.4	Sulfonamide .....	55
4.5	Ionophore .....	58

5	Methodische Vorgehensweise.....	61
5.1	Entwicklung der rückstandsanalytischen Methode mittels LC/MS.....	64
5.1.1	Entwicklung einer Multimethode zur gleichzeitigen Erfassung von Amoxicillin und seiner Metabolite (Beta-Lactame).....	66
5.1.2	Erprobung der Hausmethode .....	68
5.1.3	Wiederfindungsversuche unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien.....	71
5.1.4	Weitere mögliche Ursachen für die Verluste an AMO .....	81
5.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Methodenentwicklung .....	89
5.2	Validierung .....	90
5.2.1	Wiederfindung .....	91
5.2.2	Messpräzision .....	92
5.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	93
5.2.4	Selektivität.....	94
5.2.5	Matrixeffekte.....	96
5.2.6	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse .....	99
5.3	Antibiotika-Aufnahme in Rotkohl und Möhren unter Hydrokulturbedingungen.....	100
5.3.1	Aufnahmeexperimente mit Rotkohlpflanzen .....	101
5.3.2	Anzucht, Umsetzung auf Hydrokultur und Antibiotikadotierungen der Nährlösung..	101
5.3.3	Ernte und optische Auffälligkeiten der Rotkohlpflanzen .....	103
5.3.4	Ergebnisse und Diskussion der Aufnahmeexperimente in Rotkohl-Hydrokultur .....	105
5.4	Aufnahmeexperimente mit Möhrenpflanzen .....	110
5.4.1	Anzucht, Umsetzung auf Hydrokultur und Antibiotikadotierungen der Nährlösung..	110
5.4.2	Ernte und optische Auffälligkeiten der Möhrenpflanzen .....	112
5.4.3	Ergebnisse und Diskussion der Aufnahmeexperimente in Möhren-Hydrokultur .....	113
5.4.4	Vergleich der Ergebnisse von Hydrokulturexperimenten mit Rotkohl und Möhren (Dotierung: 5 µmol/L).....	115
5.4.5	Vergleich unterschiedlicher Hydrokulturexperimente anhand ausgewählter Ergebnisse .....	118
5.4.6	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur .....	125
5.5	Antibiotika-Aufnahme in Rotkohl unter Feldbedingungen .....	126
5.5.1	Bodenvorbereitungen und Düngung der Versuchspartzellen vor der Pflanzung .....	126
5.5.2	Pflanzung der Rotkohl-Jungpflanzen .....	129
5.5.3	Zwischenernte: Untersuchungen aufgrund von Nematodenbefall .....	131
5.5.4	Haupternte: Untersuchungsergebnisse und Diskussion.....	136
5.6	Rückstandsanalysen in laufender Rotkohlkonserven-Produktion.....	142
5.6.1	Produktionsablauf zur Herstellung von Rotkohlkonserven .....	142
5.6.2	Analysenergebnisse der Rotkohlproben aus der Produktion.....	144

6	Zusammenfassung und Ausblick .....	148
7	Literaturverzeichnis .....	153
	Anhangsverzeichnis .....	A

## Abkürzungsverzeichnis

6-APS:	6-Aminopenicillansäure
7-ACS:	7-Aminocephalosporansäure
AbfKlärV:	Klärschlammverordnung
ADI:	Acceptable Daily Intake
ACN:	Acetonitril
AGTAM:	Arbeitsgruppe Tierarzneimittel
AMA:	Penicilloinsäure von Amoxicillin
AMG:	Arzneimittelgesetz
AMO:	Amoxicillin
AMO-MeOH-Addukt:	Methylester der Penicilloinsäure von Amoxicillin
APCI:	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
ARS:	Antibiotika Resistenz Surveillance
BBCH:	(Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und Chemische Industrie) Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien
BfR:	Bundesinstitut für Risikobewertung
BfT:	Bundesverband für Tiergesundheit
BfT-Germ-Vet:	Resistenzmonitoring (2004-2006) von Isolaten von Hund, Katze, Pferd
BgVV:	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMG:	Bundesministerium für Gesundheit
BTK:	Bundestierärztekammer
BVL:	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CIP:	Ciprofloxacin
CTC:	Chlortetracyclin
Dt:	Dezitonne (1 dt=100 kg)
DART:	Deutsche Antibiotika Resistenzstrategie
DAD:	Dioden-Array-Detektor
DC:	Doxycyclin
DGHM:	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DGI:	Deutsche Gesellschaft für Infektiologie
Diketo:	Diketopiperazin
DIMDI-AMV:	Verordnung über das datengestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für medizinische Dokumentation und Information
DIN:	Deutsches Institut für Normung
DMC:	Demeclocyclin
e-CTC:	4-epi-Chlortetracyclin
e-DC:	epi-Doxycyclin
e-DMC:	epi-Demeclocyclin
e-iso-CTC:	epi-iso-Chlortetracyclin
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
e-e-CTC:	epi-enol-Chlortetracyclin
EHEC:	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
e-k-CTC:	epi-keto-Chlortetracyclin

EMEA-Leitlinie:	Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products
ENR:	Enrofloxacin
e-OTC:	epi-Oxytetracyclin
ESI:	Electrospray-Ionisation
e-TC:	epi-Tetracyclin
EU:	Europäische Union
ENR:	Enrofloxacin
ESBL:	Extended-Spectrum-Beta-Lactamase bildende Erreger
FAL:	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FEDESA:	Fédération Européenne de la Santé Animale (Dachverband für Tiergesundheit)
FG:	Frischgewicht
FLI:	Friedrich-Loeffler-Institut
FMG:	Futtermittelgesetz
GENARS:	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance
GERMAP 2008:	Antibiotika-Resistenzatlas
GERM-Vet:	Nationales Resistenzmonitoring (2006-2007) von Isolaten von Rind, Schwein, Geflügel, Fisch
ha:	Hektar
HPLC:	High-Performance-Liquid-Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
HUS:	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
IFAH-Europe:	International Federation for Animal Health Europe
iso-CTC:	Iso-Chlortetracyclin
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
$K_D$ :	Verteilungskoeffizient Boden/Wasser
$K_f$ :	Adsorptionskoeffizient an Bodenmatrix
$K_{OC}$ :	Verteilungskoeffizient organischer Kohlenstoff/Wasser
$K_{OW}$ :	Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser
$KH_2PO_4$ :	Kaliumdihydrogenphosphat
LFGB:	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)
LUFA NRW:	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt NRW
MHK:	Minimale Hemmkonzentration
Mio:	Million(en)
MON:	Monensin
MRL:	Maximum Residue Limit
MRSA:	Methicillin resistente <i>Staphylokokkus aureus</i>
MS:	Massenspektrometrie
MS/MS:	Tandem Massenspektrometrie
MUNLV:	Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
$NaH_2PO_4$ :	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH:	Natriumhydroxid
n:	Anzahl der Injektionen
N:	Anzahl der Probenaufbereitungen
n.n.:	nicht nachweisbar
n.b.:	nicht bestimmt
NOEL:	No Observed Effect Level

NRZ:	Nationales Resferenzzentrum
N-SFD:	N4-Acetylsulfadiazin
ORSA:	Oxacillin resistente <i>Staphylokokkus aureus</i>
OSSA:	Oxacillin sensible <i>Staphylokokkus aureus</i>
OTC:	Oxytetracyclin
p.a.:	pro analysis
PEG:	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
pK <sub>a</sub> :	Säuredissoziationskonstante
RKI:	Robert-Koch-Institut
Run-Off:	Oberflächenabfluss
SFD:	Sulfadiazin
SPE:	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SRM:	Selective Reaction Monitoring
SRU:	Sachverständigenrat für Umweltfragen
TÄHAV:	Tierärztliche Hausapothekenverordnung
TC:	Tetracyclin
TCA:	Trichloressigsäure
TIC:	Total Ion Current
TM:	Trockenmasse
t <sub>R</sub> :	Retentionszeit
UBA:	Umweltbundesamt
WHO:	World Health Organisation

## **1 Einleitung**

Antibiotika zählen laut Arzneiverordnungs-Report 2011 [1] zu den verordnungstärksten Humanarzneistoffen. Hinter Angiotensinhemmstoffen (Blutdrucksenker) belegen sie den zweiten Rang. Ebenfalls erfolgt eine breite Antibiotikaaanwendung im Bereich der Nutztierhaltung. Pro Jahr ist ein europaweiter Verbrauch von Veterinärantibiotika in Höhe von mehreren tausend Tonnen zu verzeichnen [2-7]. Derzeit liegen weder aktuelle noch einheitliche Daten vor. Nach einer Untersuchung des Dachverbands für Tiergesundheit (FEDESA) wurden im Jahre 1999 ca. 4.700 Tonnen Veterinärantibiotika verordnet [2, 5]. Für das Jahr 2005 wurde die Einsatzmenge von Veterinärantibiotika vom Bundesverband für Tiergesundheit (BfT) auf 784 Tonnen geschätzt [6]. Diese Schätzung wird durch eine Studie (2000-2001) vom Umweltbundesamt (UBA) bestritten; diese gehen von einer jährlichen Einsatzmenge von 2.127 Tonnen aus [8, 9] (vgl. Kapitel 2.1.2).

Die in der Veterinärmedizin eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffe und ihre Metabolite werden über die Tierexkreme Urin und Kot ausgeschieden [10, 11]. Diese können nach Ausscheidung noch pharmakologisch aktiv sein. Tierische Ausscheidungen werden als organische Wirtschaftsdünger verwendet und auf landwirtschaftlich genutzte Anbauflächen aufgebracht [12]. Trotz längerer Lagerung der Exkreme, können diese erheblich hohe Rückstandsmengen von Veterinärantibiotika und deren Metabolite enthalten [2, 12]. Auf diesem Wege gelangen die Antibiotika in den Boden und können in Abhängigkeit von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Bodenbeschaffenheit ins Oberflächen- und Grundwasser gelangen. Somit können sie von Nutzpflanzen (z.B. Getreide) über die Wurzel aufgenommen werden [13-17]. Durch den Verzehr Veterinärantibiotika-haltiger Nutzpflanzen gelangen die Rückstände in den menschlichen und tierischen Organismus und können möglicherweise zur Entwicklung und Verbreitung Antibiotika resistenter Keime beitragen.

### **1.1 Problemstellung**

Die Verbrauchergefährdung durch Veterinärantibiotika ist durch den extensiven Antibiotikaeinsatz aufgrund unsachgemäßer Verordnung und Anwendung in der Tiermast begründet. Dieser hohe Antibiotikaeinsatz hat zur Folge, dass die Resistenzbildung von tier- und humanpathogenen Erregern weltweit steigt [18]. In landwirtschaftlichen Nutztieren (Geflügel, Schweine, Rinder), die zu Lebensmitteln weiterverarbeitet werden, wurden resistente Bakterienstämme nachgewiesen [19-21]. Auffällig war dabei, dass Menschen, die in engem Kontakt zu Nutztieren standen, wie z. B. Landwirte, Veterinäre und Mitarbeiter von Zerlegebetrieben, eine Besiedlungsrate resistenter Keime von 23 –

## 2 | Einleitung

80 % aufwiesen [19, 22]. Für die gesundheitliche Verbrauchergefährdung sind insbesondere Zoonoseerreger von Bedeutung. Dabei handelt es sich um Erreger, die direkt von Tieren zu Menschen oder umgekehrt, sowie indirekt über Lebensmittel übertragen werden können. Durch diesen Übergang besteht die Möglichkeit einer bakteriellen Infektion beim Menschen. Infektionen mit resistenten bakteriellen Erregern verlängern die Behandlungsdauer und können zu erhöhter Mortalität führen. „Im Jahr 2005 infizierten sich rund 3 Mio. Europäer mit Keimen, die gegen die bekannten Antibiotika resistent sind, - 50.000 von ihnen starben daran“, wie berichtet wird [23]. Schätzungen zufolge treten jährlich 400.000 bis 600.000 nosokomiale, d.h. im Krankenhaus erworbene Infektionen auf. Diese fordern 7.500 bis 15.000 Tote. 20 % der Todesfälle basieren auf Infektionen mit resistenten Erregern [19].

Die Bundesregierung hat sich der Bekämpfung von Antibiotika-Resistenzen angenommen und veröffentlichte im Jahre 2008 die Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie (DART). DART ist aus der Zusammenarbeit von 45 verschiedenen nationalen und internationalen Organisationen entstanden. Die Bundesregierung erhofft sich damit, die Entwicklung antimikrobieller Resistenzen in den kommenden Jahren einzudämmen und die Infektionszahl der Patienten und sowie die Resistenzrate vieler pathogener Erreger zu minimieren. Das Bundeskabinett hat im März 2011 einen Entwurf zur Änderung des Infektionsschutzgesetzes und weiterer Gesetze beschlossen. Der Gesetzesentwurf soll dazu führen, dass durch den angemessenen Einsatz von Antibiotika die Resistenzentstehung vermindert wird. Der Entwurf forderte die Bildung einer Kommission „Antiinfektiva, Resistenz und Therapie“, angesiedelt am Robert-Koch-Institut (RKI), welche Leitlinien für den richtigen Gebrauch von Antibiotika erarbeiten soll [24].

Des Weiteren ist die BRD an der europäischen Forschungs koordinierung zum Thema Antibiotika-Resistenz, dem „Joint Programming Antimicrobial Resistance“ [19], beteiligt. Die Wichtigkeit der Resistenzproblematik zeigt sich nicht nur national, sondern auch international, indem die World Health Organisation (WHO) am vorletzten Weltgesundheitsstag (07.04.2011) die bakterielle Resistenz zum zentralen Thema machte [19].

Im Sinne des gesundheitlichen Verbraucherschutzes ergreift die Europäische Union (EU) Maßnahmen zur Verringerung des Gehalts an Kontaminanten in Lebensmitteln, wie z.B. in der „Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 zur Festlegung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln“ (u.a. für Nitrat, Mykotoxine, Schwermetalle, Dioxine, usw.) [37]. Neben dieser gibt es die „Verordnung (EG) 470/2009 über Rückstandshöchstmengen pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“ [174]. Die Antibiotikakontaminationen von Fleisch und Fleischprodukten werden auf Basis dieser Verordnung behördlich überwacht [173, 174]. Zahlreiche Studien belegen eine Aufnahme von Antibiotika bzw. deren Metabolite und Umwandlungsprodukte

durch Gemüse und andere Nutzpflanzen [25-36]. Bezüglich Nutzpflanzen fehlen diese gesetzlichen Regelungen derzeit noch. Inwiefern eine Notwendigkeit zur Festlegung von Antibiotika-Rückstandshöchstgehalten in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs besteht, kann aufgrund geringen Datenmaterials über das Aufnahmevermögen verzehrstarker Gemüse noch nicht beurteilt werden. Allerdings fordert das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in seinem Positionspapier vom März 2007 die Nulltoleranz für antibiotisch wirksame Stoffe in Lebens- und Futtermitteln [38]. Das bedeutet, dass ein Stoff im jeweiligen Lebens- oder Futtermittel nicht vorhanden sein darf, um im Sinne der in Europa gültigen Grundsätze von Gefahrenabwehr und Vorsorge, Mensch und Tier, vor Stoffen mit möglichem Gefährdungspotential, zu schützen [38]. Im Februar 2010 resümierte das BfR, dass „die Frage der Resistenzentwicklung und -ausbreitung unter Einwirkung einzelner oder mehrerer antibiotischer Wirkstoffe gleichzeitig in geringen Konzentrationen und über längere Zeiträume nicht hinreichend wissenschaftlich bearbeitet ist“ [39]. Bislang liegen Nachweise der Antibiotikaaufnahme nur für einige Pflanzenarten vor, wobei sowohl die Versuchsdurchführungen als auch die rückstandsanalytischen Messmethoden variieren und noch nicht vereinheitlicht sind [17, 31, 32, 153, 158, 347-352]. Ebenfalls fehlen systematische Untersuchungen, die eine Verbrauchergefährdung durch Veterinärantibiotikarückstände in pflanzlichen Lebensmitteln erkennen lassen. Gegenwärtig ist das Risiko der Resistenzentstehung humanpathogener bakterieller Erreger durch Langzeitexposition mit geringen Mengen Antibiotika über pflanzliche Nahrungsmittel nicht abschätzbar. Zudem ist ebenfalls der Eintrag und Verbleib solcher Substanzen in pflanzlichen Futter- und Lebensmitteln nicht ausreichend geklärt [39].

#### **1.2 Zielsetzung**

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Forschungs- und Gesetzeslücken soll diese Arbeit einen Beitrag zur Untersuchung der Antibiotikaaufnahme von verzehrstarken Gemüsesorten am Beispiel von Rotkohl und Möhren leisten. Darüber hinaus soll sie dem BfR unter Berücksichtigung weiterer rückstandsanalytischer Ergebnisse von Gemüse eine Abschätzung der daraus resultierenden Verbraucherrisiken ermöglichen.

In einem vorangegangenen Projekt [25, 41] konnte die Aufnahme von Antibiotika in Weißkohl unter Hydrokulturbedingungen nachgewiesen werden. Neben dem Weißkohl zählt der Rotkohl zu den meist verzehrten Kohlarten in Deutschland [40], weswegen es sinnvoll erscheint den Rotkohl auf das Aufnahmevermögen für verschiedene Antibiotika auch unter praxisnahen landwirtschaftlichen Bedingungen zu untersuchen. Es liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund der langen Wachstumszeiten (ca. 4 - 5 Monate) von Kohlarten eine besonders hohe Aufnahme von Veterinärpharmaka aus

güllebeaufschlagten Böden erfolgen kann. Zudem zählt Rotkohl zu den “starken Zehrer”, die besonders viel organischen stickstoffhaltigen Dünger benötigen [42].

Aufbauend auf früheren Untersuchungen von Möhren in Hydrokultur [27] soll im Rahmen dieser Arbeit u.a. die Aufnahme von Antibiotika aus verschiedenen Antibiotikaklassen in Möhren (Hydrokultur) untersucht werden. In Deutschland werden Möhren sehr häufig angebaut (vgl. Kapitel 3.4.1) und oft roh verzehrt und dienen zudem als wichtiger Bestandteil in der Babynahrung, weswegen ihr Antibiotika-Aufnahmepotential von besonderem Interesse ist.

Zur Ermittlung der Antibiotika-Aufnahmen wurden rückstandsanalytische Untersuchungen mittels LC/MS („High Performance Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry“) durchgeführt, wobei zunächst eine Methode für die eingesetzten Antibiotika entwickelt wurde. Die Untersuchungen erfolgten dabei unter verschiedenen Bedingungen:

1. Aufnahmeexperimente von Rotkohl und Möhren unter Hydrokulturbedingungen für verordnungsstarke Veterinärantibiotika (Amoxicillin (AMO), Chlortetracyclin (CTC), Enrofloxacin (ENR), Monensin (MON) und Sulfadiazin (SFD), vgl. Kapitel 4)
2. Untersuchungen des Aufnahmepotentials von Rotkohl für ausgewählte Veterinärantibiotika unter praxisnahen Feldbedingungen (CTC und ENR)
3. Rückstandsanalysen in laufender industrieller Rotkohlkonservenproduktion

Hydrokulturbedingungen haben den Vorteil, dass sie ein relativ einfaches System darstellen. Hier kann es nicht zu Bindungen der Arzneistoffe an Bodenpartikel kommen, zu sogenannten “Bound-Residues“, da die zu der Nährlösung dotierten Antibiotika unmittelbar für die Pflanze bioverfügbar sind. Des Weiteren liefert die Anzucht von Nutzpflanzen in Hydrokultur auch geeignetes Probenmaterial, das frei von anderen Rückständen, wie z.B. Pestiziden ist. Mit diesem Probenmaterial können Methoden für die Rückstandsanalytik von Antibiotika in Gemüsearten weiterentwickelt und optimiert werden.

Die Tatsache, dass das Aufnahmepotential in Porree und Weißkohl für ENR und CTC in bereits abgeschlossenen Hydrokulturrexperimenten [25, 41] signifikant hoch war, führt zu der dringenden Zielsetzung, das Aufnahmepotential von ENR und CTC in Nutzpflanzen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Rotkohl als Versuchspflanze unter Feldbedingungen, d.h. unter Berücksichtigung des Transfers Boden-Pflanze eingesetzt. Sowohl die Dotierungsexperimente in Hydrokultur als auch der Feldversuch haben Modellcharakter. Für die Einschätzung der Verbrauchergefährdung ist es unabdingbar auch Rückstandswerte in der Praxis zu ermitteln. So soll in einem weiteren Untersuchungsansatz die Antibiotikabelastung von Industrie-Rotkohl verschiedener Gemüselieferanten aus der landwirtschaftlichen Praxis untersucht werden. Dabei sollen Antibiotika-Belastungsprofile von der Rohware, direkt nach der Ernte, bis hin zum verarbeiteten, verkaufsfertigen Produkt erstellt werden.

## **2 Verbrauchergefährdung durch Veterinärantibiotika**

### **2.1 Antibiotika-Einsatz in der Landwirtschaft**

Die Bezeichnung Antibiotikum leitet sich von "Antibiose" (vom griechischen anti- „gegen“, bios „Leben“) ab und beschreibt den Zustand, wenn ein Lebewesen im völligen Gegensatz zu einem anderen steht [43]. Im Jahre 1889 prägte Vuillemin die Bezeichnung Antibiose als eine Beziehung zwischen einzelnen Individuen oder Gruppen verschiedener Arten, die für einen der Beteiligten Nachteile mit sich bringt und dessen Wachstum hemmt oder ihn abtötet [44]. Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, Art. 2 j) werden Antibiotika wie folgt definiert: „[A]ntimikrobielle Stoffe, die durch einen Mikroorganismus erzeugt bzw. aus diesem gewonnen werden und andere Mikroorganismen zerstören bzw. deren Wachstum hemmen“ [45]. Antibiotika und ihre Derivate werden als Arzneistoffe, d.h. in einem Arzneimittel, zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt. Arzneimittel werden in der Europäischen Union definiert in den Richtlinien 2001/83/EG (Gemeinschaftskodex für Humanarzneimittel) und 2001/82/EG (Gemeinschaftskodex für Tierarzneimittel) als „Stoffe oder Stoffzusammensetzungen, die als Mittel mit Eigenschaften zur Heilung oder zur Verhütung menschlicher oder tierischer Krankheiten bestimmt sind oder aber im oder am menschlichen oder tierischen Körper verwendet oder einem Menschen bzw. Tier verabreicht werden können, um entweder die menschlichen bzw. tierischen physiologischen Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung wiederherzustellen, zu korrigieren oder zu beeinflussen oder eine medizinische Diagnose zu erstellen“ [46, 47]. Die Arzneimittel-Definition ist mittlerweile sowohl in das deutsche Arzneimittelgesetz als auch in viele andere nationale Arzneimittelgesetze eingeflossen [48]. Im früheren Sinne verstand man unter Antibiotika natürlich gebildete Stoffwechselprodukte von Bakterien und Pilzen. Diese hemmten und töteten das Wachstum von anderen Mikroorganismen. Heutzutage zählt man auch synthetisch oder gentechnisch hergestellte antimikrobielle Arzneistoffe dazu [49].

Der Einsatz von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Tierproduktion lässt sich bezüglich seiner Verwendungsart in drei Bereiche unterteilen: Therapie, Metaphylaxe und Prophylaxe (s. Kapitel 2.1.1). Letztere wird nur in Ausnahmefällen genehmigt. Früher wurden Antibiotika auch zur Leistungsförderung eingesetzt, wobei diese Verwendungsart seit dem Jahr 2006 in der EU verboten ist [50, 51].

Die aktuellen Anwendungsmengen von Veterinärantibiotika in Deutschland sind derzeit noch unbekannt. Gemäß der „Verordnung über das datengestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für medizinische Dokumentation und Information (DIMDI-Arzneimittelverordnung-DIMDI-AMV)“ muss jedoch seit dem Jahre 2011 die Abgabemenge an Veterinärantibiotika dokumentiert werden [52].

Die in der Tiermast eingesetzten Antibiotika oder ihre Metabolite gelangen über verschiedene Verbreitungspfade in die Umwelt, von wo aus sie sogar bis in die Lebensmittelkette des Menschen und Nahrungsmittelkette der Nutztiere gelangen können [12, 13, 54].

### **2.1.1 Verwendung von Veterinärantibiotika in der Nutztierhaltung**

Veterinärantibiotika dienen in der Landwirtschaft zur Therapie und Gesunderhaltung von Nutztieren. In der Regel dürfen sie nur zur Behandlung von bakteriellen Infektionen eingesetzt werden [55]. Die Abgabe und Verwendung von Veterinärantibiotika ist im Arzneimittelgesetz [48] und in der Tierärztlichen Hausapothekenverordnung (TÄHAV) [57] geregelt. Zudem hat die Bundestierärztekammer (BTK) zusammen mit der Arbeitsgruppe Tierarzneimittel (AGTAM) der Ländergemeinschaft Verbraucherschutz im November 2000 (überarbeitete Fassung, Stand Juli 2010) die Leitlinien (mit Erläuterungen) für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln herausgegeben [55]. Laut Oexmann [58] handelt es sich bei den genannten Leitlinien um keine rechtsbindende Vorschrift, dennoch sollen sie als Maßstab für Tierärzte, Überwachungsbehörden und vor Gericht dienen. Gemäß der Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln (2010) wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass „[der] Einsatz von Antibiotika [...] nur in den Fällen gerechtfertigt [ist], bei denen er tatsächlich erforderlich ist und die Auswahl des Wirkstoffs sorgfältig unter Berücksichtigung des Einzelfalls und der hierbei zu beachtenden Anforderungen erfolgt ist“ [55]. Somit ist vor der Verabreichung von Antibiotika eine Alternativbehandlung zu überdenken. Es ist nicht die Aufgabe von Antibiotika, schlechte Haltungs- und Hygienebedingungen der Tierbestände zu kompensieren [59].

Die Abgabe eines Antibiotikums darf nur durch den behandelnden Tierarzt oder aufgrund einer tierärztlichen Verschreibung erfolgen und fällt unter die tierärztliche Aufsichtspflicht [55]. Veterinärantibiotika werden in der konventionellen Landwirtschaft regulär zu therapeutischen, metaphylaktischen und in gesonderten Fällen zu prophylaktischen Zwecken eingesetzt.

#### **1. Therapeutischer Einsatz**

Unter der therapeutischen Anwendung von Antibiotika ist die direkte Behandlung bestehender bakterieller Infektionskrankheiten zu verstehen.

#### **2. Metaphylaktischer Einsatz**

Eine metaphylaktische Anwendung von Antibiotika für den ganzen Tierbestand erfolgt dann, wenn einzelne Tiere eines Bestandes Krankheitssymptome zeigen und eine

entsprechende Ausbreitung der Infektionserreger bei den noch symptomlosen Tieren des Bestands in Kürze zu erwarten ist [51]. Ziel der metaphylaktischen Antibiotikagabe ist die Verminderung der Ansteckung gesunder Tiere im Bestand und dadurch bedingte Tierverluste. Zudem sollen durch eine metaphylaktische Maßnahme die eventuellen Behandlungskosten einer großen Anzahl klinisch erkrankter Tiere reduziert werden [50, 51, 60].

### 3. Prophylaktischer Einsatz

Die Prophylaxe beschreibt eine Verabreichung von Antibiotika, wenn keine klinischen Symptome einer bakteriellen Infektion vorliegen. Sie darf daher nur in besonders begründeten, medizinisch notwendigen Ausnahmefällen beim Einzeltier oder bei Tiergruppen erfolgen. Ein prophylaktischer Antibiotikaeinsatz kann z.B. in Verbindung mit einer Operation oder bei immunsupprimierten Tieren erfolgen [55].

In der ökologischen Landwirtschaft jedoch darf ein Antibiotikaeinsatz gemäß der „Verordnung über die biologische Landwirtschaft und die Kennzeichnung biologisch produzierter Erzeugnisse und Lebensmittel (Bio-Verordnung)“ [61] nur dann erfolgen, wenn eine Krankheit oder eine Verletzung und somit das Leiden der Tiere erfahrungsgemäß mit anderen Mitteln nicht wirksam behandelt werden kann, wobei die präventive Verabreichung von Antibiotika grundsätzlich unzulässig ist.

Jeder Einsatz von Veterinärantibiotika hat unter der „guten veterinärmedizinischen Praxis“ zu erfolgen (s. Anhang A 1.1). So verlangt die Therapie von bakteriellen Infektionskrankheiten tierärztliche Kompetenz, sodass vor Einsatz von Antibiotika eine fachgerechte Diagnostik durchgeführt werden muss. Es werden mikrobiologische Untersuchungen eingeleitet, wobei zunächst nach Erregerisolierung ein Antibiogramm (Labor-Test zur Bestimmung der Empfindlichkeit bzw. Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika-Wirkstoffen) erstellt wird. Dieses Antibiogramm dient zur Absicherung der Diagnose oder einer bekannt niedrigen Resistenz bzw. zur Abklärung der beteiligten Erreger und ihrer Resistenzraten. Sind die Erreger identifiziert und eventuelle Resistenzen erkennbar, so kann gezielt, entsprechend den fachlichen Entscheidungskriterien, ein Veterinärantibiotikum (zugelassene Veterinärantibiotika, s. Anhang A 1.2) ausgewählt werden [55]. In Ausnahmefällen, wenn eine lebensbedrohliche Infektion vorliegt, für die keine anderen wirksamen Antibiotika als Reserve zur Verfügung stehen, muss ein „antibiotisches Reservemittel“ eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um Antibiotika, die als therapeutische Reserve gegen multiresistente Keime restriktiv eingesetzt werden, wie z.B. Fluorchinolone (vgl. Kapitel 4.2). Die Verabreichung von Antibiotika erfolgt parenteral als Injektion, bei lokalen Infektionen oberflächlich oder oral. Bei einer oralen Verabreichung von Antibiotika über das Futter muss eine genaue Dosierung der zu behandelnden Tiere gewährleistet und gleichzeitig eine Medikation nicht

behandlungsbedürftiger Tiere vermieden werden. Die orale Antibiotikaverabreichung über Trinkwasser muss sicherstellen, dass in allen Bereichen der Tränkeeinrichtung eine ausreichende therapeutische Konzentration erreicht wird und zudem, dass die empfohlene Dosis pro kg Körpergewicht über den empfohlenen Behandlungszeitraum vollständig vom Einzeltier aufgenommen werden kann [55].

Seit dem Jahr 2006 gilt nach der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, aufgrund der Gefahr einer Resistenzentwicklung, ein generelles EU-weites Verwendungsverbot für antibiotische Wirkstoffe als Leistungsförderer [62]. Bei den Leistungsförderern handelte es sich um antibiotische Futterzusatzstoffe, auch "Masthilfsmittel" genannt, die in der industriellen Landwirtschaft zum Einsatz kamen. Ziel war es, das Wachstum von Nutztieren durch eine bessere Futterverwertung zu beschleunigen, wobei jedoch keine medizinische Notwendigkeit einer Antibiotikaverabreichung vorlag. Die Verfütterung von Leistungsförderern erfolgte in niedrigen Konzentrationen, d.h. um den Faktor 5-10 unterhalb der therapeutisch wirksamen Dosis [63]. Insbesondere wurden diese in der Geflügel-, Schweine- und Rindermast eingesetzt. Durch Veränderung der Verdauungsvorgänge trugen sie zu einer verbesserten Futterverwertung bei und hemmten zudem die Vermehrung unerwünschter bakterieller Erreger im Darm bzw. Pansen. Trotz pharmakologisch antibiotischer Wirksamkeit unterlagen die Leistungsförderer nicht dem Arzneimittelgesetz, sondern fielen unter das Futtermittelgesetz [64].

Eine Ausnahme des EU-Verbot es ist die Anwendung von antibiotischen Wirkstoffen als Futtermittelzusatzstoff im Anwendungsbereich der Kokzidiostatika. Kokzidien sind intestinale Parasiten, die oft in Geflügelbeständen vorkommen und zu erheblichen Tierverlusten führen. Nur durch die prophylaktische Verabreichung und durch gewissenhafte Anwendung geeigneter hygienischer Maßnahmen sind die Kokzidien zu beherrschen [64, 65]. Die ehemals als Leistungsförderer zugelassenen antimikrobiellen Wirkstoffe Monensin-Natrium und Salinomycin-Natrium sind weiterhin als Kokzidiostatika und damit als Futtermittelzusatzstoffe erlaubt. Gemäß der aktuellen Gesetzeslage ist der Einsatz von Monensin-Natrium als Futtermittelzusatzstoff in der gesamten EU bei Geflügel zulässig [66, 67]. Die Verabreichung von Salinomycin-Natrium ist bei Geflügel [60, 68-74] und Kaninchen [71, 75] erlaubt.

### **2.1.2 Anwendungsmengen von Veterinärantibiotika in Deutschland und Europa**

Aufgrund der fehlenden Dokumentationspflicht in Deutschland des Verbrauchs von Veterinärantibiotika liegen keine aktuellen statistischen Werte über ihre Anwendungsmengen vor. Teilweise gibt es jedoch für bestimmte Jahre Daten aus

Studien, die auf Abschätzungen und Hochrechnungen basieren [76]. Die bislang aktuellsten Datenerhebungen zum Veterinärverbrauch sind für das Jahr 2005 und 2003 veröffentlicht. Gemäß dem Bundesverband für Tiergesundheit (BfT), der Vereinigung der Produzenten für Tierarzneimittel, werden nach Schneidereit für das Jahr 2005 ein Verbrauch von 784,4 Tonnen und für das Jahr 2003 von 724,0 Tonnen Veterinärantibiotika für Deutschland geschätzt [6]. Nach diesen Schätzungen ist innerhalb von zwei Jahren eine Zunahme des Veterinäreinsatzes um 60,4 Tonnen zu registrieren. Die Aufteilung der Veterinärantibiotika-Gesamtmenge von ca. 784 Tonnen (Jahr 2005) in die verschiedenen Wirkstoffgruppen zeigt, dass der mit Abstand größte Anteil auf die Tetracycline (45 %) entfällt, gefolgt von den Beta-Lactamen (25 %), Sulfonamiden (12 %) und Makroliden (7 %). Der Anteil anderer Antibiotikaklassen beträgt 11 % des Gesamtantibiotikaverbrauches, wobei die Fluorchinolone 1 % davon ausmachen (s. Abbildung 1) [6].

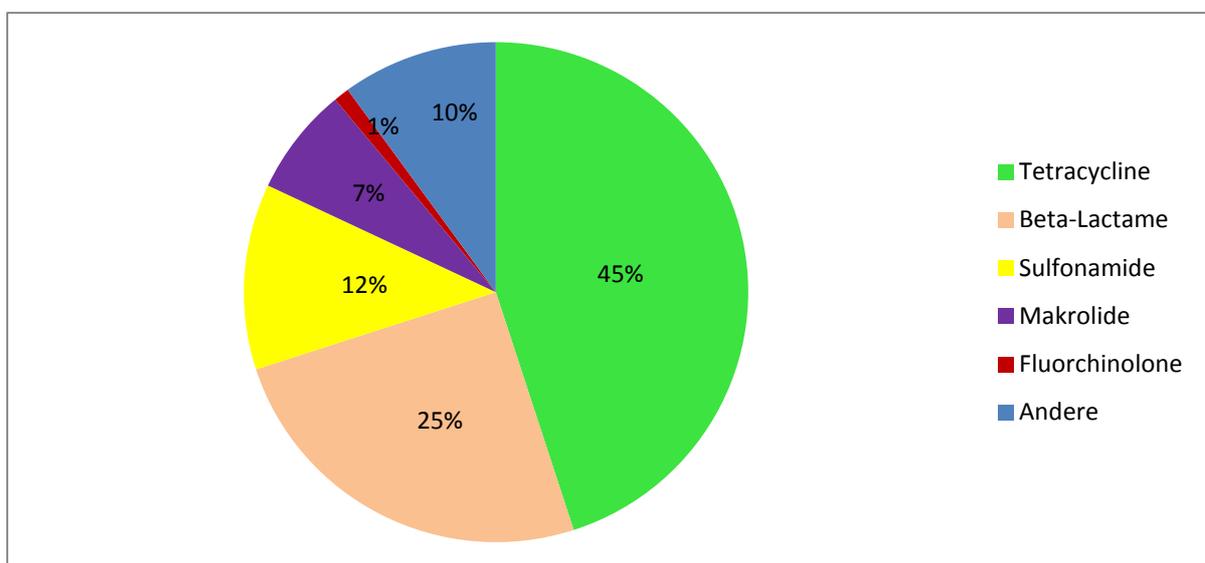


Abbildung 1: Einsatzmengen an Veterinärpharmaka im Jahre 2005 [6]

Der Abschätzung von 784 Tonnen durch das BfT wird jedoch in einer Stellungnahme vom Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU) im Jahre 2007 [77] widersprochen, die auf Grundlage einer Studie vom Umweltbundesamt (UBA) bereits für die Jahre 2000 bis 2001 Daten aus 60 repräsentativen Tierarztpraxen gesammelt haben. Innerhalb dieser Studie konnte mit Hilfe von Hochrechnungen eine Einsatzmenge von jährlich 2.127 Tonnen Veterinärantibiotika geschätzt werden [8, 77]. Diese Einsatzmenge ist dabei fast dreifach so groß wie die vom BfT geschätzten 784 Tonnen. Welche Aussage bezüglich der Einsatzmenge von Veterinärantibiotika die valideste ist, bleibt unbeantwortet. Da es bislang keine aktuellen Verbrauchszahlen für Veterinärantibiotika in Deutschland gibt, wurde vom Gesetzgeber die "Verordnung über das datengestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für medizinische Dokumentation und

Information“ (*DIMDI*-Arzneimittelverordnung-*DIMDI*-AMV) verabschiedet [52]. Diese sieht vor, dass die Abgabemengen von Antibiotika ab dem Jahr 2011 erfasst werden, sodass bereits im Laufe des Jahres 2012 erste, aktuelle Abgabemengen statistisch ermittelt werden können [52].

Für die Niederlande hingegen gibt es aktuelle Zahlen zu Antibiotikaresistenz und -einsatzmengen in der Tiermast. Diese sind veröffentlicht in dem Monitoringbericht “MARAN 2009“ unter Mitwirkung verschiedener wissenschaftlicher Institute und Behörden [78]. Die folgende Tabelle 1 zeigt einen Ausschnitt der dortigen Veterinärantibiotika-Verkaufszahlen von 2007 bis 2009 [78 - 79].

Tabelle 1: Verkaufszahlen von Veterinärantibiotika in den Niederlanden (2007-2009) [78]

	Antibiotikaverkaufszahlen in Tonnen		
	2007	2008	2009
<b>Veterinärantibiotika</b>	590	529	518

So zeigen die Ergebnisse, dass die Verkaufszahlen von 2007 bis 2009 gesunken sind. Eine erste Hochrechnung des Antibiotikaverkaufs für das Jahr 2010 lässt erneut eine 12 % Reduzierung auf schätzungsweise 455 Tonnen erkennen [78]. Um eine Tendenz der Veterinärantibiotika-Verbrauchszahlen von 1997 bis 2005 erkennen zu können, wurden Datenerhebungen des europäischen Dachverbandes “Fédération Européenne de la Santé Animale“ (FEDESA, ab 2003 integriert in die Dachorganisation “International Federation for Animal Health Europe“, IFAH-Europe) für die Jahre 1997 und 1999 herangezogen [5]. Demnach wurden 1997 in der EU inklusive der Schweiz 12.752 Tonnen Antibiotika (reine Wirkstoffmenge) verbraucht. Hiervon kamen 60 % in der Humanmedizin und 40 % in der Veterinärmedizin zum Einsatz. Der Gesamtverbrauch von 40 % (ca. 5.100 Tonnen) für den Tiereinsatz wurde unterteilt in 27,5 % (3.506 Tonnen) für die therapeutische Anwendung und 12,5 % (1.594 Tonnen) dienten zur Verwendung als Futterzusatzstoffe bzw. Leistungsförderer (vgl. Tabelle 2). Bereits zwei Jahre später nahm der europaweite Antibiotika-Gesamtverbrauch um 3,6 % (relative Prozentangabe) zu, wobei die Aufteilung ganz anders war als im Jahre 1997. Demnach stieg die Einsatzmenge in der Veterinärtherapie um 11 % (relative Prozentangabe) an, aber die Verwendung als Leistungsförderer verringerte sich um 50 %. Diese Abnahme liegt darin begründet, dass viele Wirkstoffe innerhalb kurzer Zeitabschnitte als Leistungsförderer verboten wurden, bis zum Totalverbot im Jahr 2006 [5, 80]. Die Gegenüberstellung der Veterinärantibiotika-Einsatzmengen von der EU (inklusive Schweiz) und Deutschland weist für Deutschland einen Anteil von ca. 15 % auf (vgl. Tabelle 2) [81]. Demgegenüber beträgt der Anteil an Humanantibiotika für Deutschland lediglich ca. 4 % [82].

Tabelle 2: Antibiotika-Verbrauchsmengen für die EU (inklusive Schweiz) und Deutschland [65, 66]

Antibiotika-Verbrauch	Europa (inklusive Schweiz) 1997		Deutschland 1997		Europa (inklusive Schweiz) 1999		Deutschland	
	Tonnen/Jahr	[%]	Tonnen/Jahr	[%]	Tonnen/Jahr	[%]	2003	2005
							Tonnen/Jahr	
<b>Total</b>	12.752		743		13.216		k. A.	k. A.
<b>Veterinärtherapie</b>	3.494	27,5	488	45,9	3.902	29	k. A.	k. A.
<b>Leistungsförderer</b>	1.599	12,5	255	24,0	786	6	k. A.	k. A.
<b>Gesamtverbrauch (Tiereinsatz)</b>	5.093	40,0	743	69,9	4.688	35	724	784
<b>Humantherapie</b>	7.659	60,0	*320	30,1	8.528	65	k. A.	k. A.

\* Menge für 1996 nach ABBAS, KRATZ und LINKE (2000) [82]; k. A. = keine Angaben

## 2.2 Antibiotika-Resistenzen von human- und veterinärpathogenen Erregern

### 2.2.1 Resistenzen und ihre Wirkmechanismen

#### *Resistenzen*

Antibiotikaresistenz bedeutet die Unempfindlichkeit von Erregern gegenüber einem antibiotischen Wirkstoff bzw. „die erworbene Widerstandsfähigkeit von Bakterienstämmen gegen ein Antibiotikum, gegen das sie normalerweise empfindlich wären“ verstanden [43]. Dabei wird zwischen intrinsischer (natürlicher, primärer) und extrinsischer (erworbener, sekundärer) Form unterschieden.

Intrinsische Resistenz liegt vor, wenn bereits die native Population einer Bakterienspezies unempfindlich gegenüber einem oder mehreren Antibiotika ist [83]. Intrinsische Resistenzeigenschaften besitzen z.B. gramnegative Bakterien gegen Benzylpenicillin, da dieses die äußere Zellwand dieser Bakterien nicht passieren kann [63]. Dadurch und aufgrund anderer Faktoren entstehen Lücken im Wirkungsspektrum eines Antibiotikums [63]. Extrinsische Resistenz beruht auf der Veränderung des genetischen Materials. Sie wird erworben und ist keine natürliche Resistenzeigenschaft der Bakterien. Das bedeutet, dass die anfänglich antibiotikaempfindlichen Bakterienstämme entweder infolge einer spontanen Mutation oder durch Gentransfer mit oder ohne Antibiotikaeinfluss diese Resistenzeigenschaften erworben haben [83].

Resistenzen können zudem in Kreuz- und Koresistenzen kategorisiert werden. Kreuzresistenz meint die gleichzeitige Unempfindlichkeit einer Bakterienspezies gegen zwei oder mehr Antibiotika der gleichen Wirkstoffklasse. Die Wirkstoffe einer Klasse sind strukturell verwandt und besitzen den gleichen Resistenzmechanismus und können daher Kreuzresistenzen verursachen [84]. Für die Wirkstoffe Tetracyclin, Oxytetracyclin, und Chlortetracyclin, die der Wirkstoffklasse der Tetracycline angehören, wird in der Literatur eine vollständige Kreuzresistenz beschrieben [12, 85-87]. Koresistenz meint hingegen eine Unempfindlichkeit der Bakterienstämme gegenüber Antibiotika aus verschiedenen Wirkstoffklassen. Diese werden durch den Transfer von mobilen Transposons erworben [88], [89]. Untersuchungen von Deflaun und Levy [90] haben gezeigt, dass *Pseudomonas spp.* ein Plasmid mit Resistenzeigenschaften gegen drei unterschiedliche Antibiotika (Chloramphenicol, Spectinomycin und Tetracyclin) tragen können.

### *Resistenzmechanismen*

Die Wirksamkeit eines Antibiotikums kann durch unterschiedliche Resistenzmechanismen verhindert werden. Zum einen kann ein Umbaumechanismus der Bakterienzellwand dazu führen, dass diese für Antibiotika nicht mehr permeabel ist. Somit gelangen die Antibiotika nicht mehr in die Erreger und können diese nicht unschädlich machen. Zum anderen können Effluxpumpen die eingedrungenen Antibiotika wieder hinausbefördern. Dadurch können sich die Antibiotika nicht im Erreger anreichern und bleiben unwirksam. Des Weiteren kann eine enzymatische Inaktivierung der Antibiotika stattfinden, sodass die Bakterien sich ungestört weiter vermehren können, wie im Fall von "Extended-Spectrum-Beta-Lactamase" bildenden Erregern (ESBL) (vgl. Kapitel 2.3). Es gibt noch weitere Resistenzmechanismen, wobei nach Lunke [91] die oben genannten Resistenzmechanismen am häufigsten vorkommen.

Die Resistenzinformationen der Bakterien sind in Form von Genen auf den Chromosomen der Bakterien-DNA oder auf extrachromosomalen Erbinformationsträgern (Plasmiden) gespeichert. Werden diese Gene an die Nachkommen der Bakterien übertragen, so handelt es sich um einen "vertikalen Gentransfer". Der Plasmidaustausch zwischen nicht verwandten Bakterien verschiedener Klassifizierungen wird als "horizontaler Gentransfer" bezeichnet.

Haben Bakterien Resistenzeigenschaften erworben, entweder durch Spontanmutation oder durch Aufnahme fremder genetischer Elemente, können sie diese auf unterschiedliche Weise auf andere Bakterien (innerhalb und außerhalb einer Bakteriengruppe) transferieren [92]. Der Transfer kann über verschiedene Wege erfolgen:

- Konjugation:

Die Konjugation beschreibt den horizontalen Gentransfer über direkten Zellkontakt via Sexpili (Proteinröhrchen), mit denen sich Bakterien verbinden und über eine Plasmabrücke die DNA von einer zur anderen Zelle übertragen [63, 93-97]. Die Konjugation kann auch über Plasmide erfolgen. Plasmide sind extrachromosomal lokalisierte Elemente, die in mehreren Kopien im Cytoplasma vorliegen können und verschiedene Funktionen haben, wie z. B., dass sie ihren eigenen Transfer durch Zell-zu-Zell-Kontakt mittels Ausbildung von Fertilitäspili ermöglichen [63]. Die Plasmide sind nicht von der Bakterien-Zellteilung abhängig.

- Transposition:

Die Transposition ist eine Übertragungsform der Resistenzgene mittels Plasmide bzw. Transposons. Dabei handelt es sich um bewegliche DNA-Fragmente, die sich selbst von einer Donorzelle auf eine Rezipientenzelle übertragen können. Sie können auf Plasmiden sitzen und zu Chromosomen wandern. Trifft ein Transposon in die Rezipientenzelle, so wird sie dort entweder in vorhandene Plasmide oder in die Chromosomen eingebaut. Die Transposition von Genen bei Salmonellen konnte von Dunne [98] beobachtet werden.

- Transduktion

Bei der Transduktion erfolgt die Weitergabe der Resistenzgene über Vektoren, wie z.B. Bakteriophagen. Bakteriophagen sind Viren, die sich auf Bakterien als Wirtszelle spezialisiert haben. Die Transduktion genetischer Elemente bei Salmonellen wurde von Schmieger und Schickmaier beschrieben [99].

- Transformation

Ein Transfer von Resistenzgenen kann ebenfalls durch Transformation, d.h. durch die Aufnahme isolierter DNA erfolgen. Transformationen sind zum Teil natürliche Umbildungsprozesse der DNA, wie sie z.B. bei Pneumokokken geschehen [63].

Resistente Keime können sich nach Anwendung von Antibiotika durch Selektionsdruck Wachstumsvorteile verschaffen, weswegen eine Antibiotikaverabreichung die Resistenzentwicklung fördert [100-106]. Neben der Einzel- und Kreuzresistenz gibt es eine Reihe von Multiresistenzen, wie z.B. bei *Staphylococcus aureus*. Zunächst waren die Erreger empfindlich gegenüber Penicillin, aber ab dem Jahr 1961 gab es erste Veröffentlichungen über *in-vitro* Resistenzerscheinungen gegen Methicillin [107-109]. Daher stammt auch der Name "MRSA", der für "Methicillin resistente *Staphylococcus aureus*", steht. Es liegt die Vermutung nahe, dass sich MRSA im Jahre 1961 von England ausgehend in weitere Teile Europas ausbreitete [110-113]. Mittlerweile wird Methicillin weder für therapeutische Zwecke eingesetzt noch hergestellt. Dennoch ist die

Bezeichnung MRSA, aufgrund seiner Historie geblieben. Einige Jahre später wurden diese Erreger unempfindlich gegen Oxacillin und werden auch derzeit auf Oxacillin-Empfindlichkeit bzw. -Resistenz getestet, weswegen auch die Bezeichnung Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (ORSA) anstelle der Bezeichnung MRSA eingesetzt wird [84, 109]. Sensible *S. aureus*-Stämme werden hingegen als Methicillin- bzw. Oxacillin-sensible *S. aureus* (MSSA bzw. OSSA) bezeichnet [109]. Mittlerweile sind bei *Staphylococcus aureus* Resistenzen gegenüber weiteren Antibiotikaklassen zu verzeichnen, wie beispielsweise gegen Chinolone, Tetracycline, Sulfonamide, Erythromycin und andere [85].

### 2.2.2 Ursachen der Antibiotika-Resistenzentwicklung

Noch immer sind Antibiotika die wichtigsten Medikamente zur Therapie bakterieller Infektionen, aber ihre Wirksamkeit ist durch das Vorkommen resistenter und multiresistenter Keime gefährdet [84, 86-87]. Die Ursache der ansteigenden Resistenzrate liegt an dem übermäßigen Antibiotikaeinsatz bei Mensch und Tier [88]. Dabei spielt die Konzentration der Antibiotika und die Dauer ihrer Anwendung eine große Rolle [89-90]. Es wurde beobachtet, dass bei einer hohen Anwendungsmenge eines Antibiotikums eine Resistenzzunahme von Bakterien gegenüber diesem eingesetzten Antibiotikum vorlag. Die Feststellung der Korrelation wird ebenfalls dadurch bestärkt, dass bei Verminderung des Antibiotikaeinsatzes eine Rücknahme der Resistenz zu verzeichnen war [114-117]. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits Antibiotikakonzentrationen, die unterhalb der Hemmwirkung von Bakterien liegen (subinhibitorisch) zur Entstehung und Selektion von Resistenzen führen können [118-119]. Die Ausbreitung von Resistenzen kann regionalabhängig sein, d.h. bei einer häufigen Anwendung eines bestimmten Antibiotikums in einer Region, kann dort sehr schnell eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum entstehen [120].

Ein weiterer Aspekt für die Resistenzentwicklung ist die Tatsache, dass die gleichen Antibiotikaklassen sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin angewendet werden [121, 122]. Dazu zählen u.a. Aminoglykoside, Cephalosporine, Chloramphenicol, Fluorchinolone, Lincosamide, Makrolide, Nitrofurane, Nitroimidazole, Penicilline, Sulfonamide, Tetracycline und Trimethoprim [123]. Somit können Kreuzresistenzen gegenüber veterinärmedizinischen Antibiotika auf humanmedizinische Antibiotika übertragen werden [124]. So zeigten Untersuchungen, dass die Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen beim Menschen aus dem Selektionsdruck durch veterinärmedizinische Verwendung entstanden waren [114, 125-126].

Eine Resistenzausbreitung kann auch durch Wirtschaftsdünger erfolgen, der bereits resistente Keime und/oder Antibiotikarückstände enthält und auf landwirtschaftliche Nutzflächen aufgebracht wird [127]. Ein weiterer Beitrag zur Resistenzausbreitung erfolgt nach Kamphues et al. durch Tierarzneimittel, die über das Futter verabreicht werden (Fütterungsarzneimittel) [128]. Denn bei der Herstellung von Mischfutter kann es aus technischen Gründen zu einer Arzneimittelverschleppung kommen, wenn sowohl für antibiotikahaltiges als auch für antibiotikafreies Mischfutter derselbe Mischer (trotz Reinigung) verwendet wird. Diese potentielle Wirkstoffverschleppung hätte zur Folge, dass ebenfalls unbehandelte Tiere Antibiotikagehalte unterhalb der therapeutischen Wirkstoffkonzentration (subtherapeutisch) verabreicht bekämen [129, 130].

### **2.2.3 Resistenzen bedeutender humanpathogener Erreger**

Bereits kurze Zeit nach Einführung der ersten Antibiotika in die Medizin konnten Mikroorganismen beobachtet werden, die in Gegenwart von bisher hemmenden oder abtötenden Wirkstoffen nicht mehr in ihrem Wachstum beeinflusst wurden. So wurde Penicillin ab dem Jahre 1940 angewandt, jedoch bereits nach drei Jahren klinischer Anwendung wurden erste Resistenzen entdeckt (vgl. Tabelle 3). Diese Erreger hatten vielfältige Gegenstrategien (Resistenzen) entwickelt, um unempfindlich gegenüber diesen Wirkstoffen zu werden [131]. Damit bestand ein Zusammenhang zwischen Antibiotika-Entdeckung und Resistenzentwicklung, der bereits 1945 von A. Fleming anlässlich seiner Rede zur Nobelpreisverleihung, angedeutet wurde. Er mahnte bereits damals einen sorgsamem und verantwortungsbewußten Umgang mit Penicillin an [132]. Im Jahre 1969 warnten zudem britische Wissenschaftler im sogenannten Swann-Report [133] davor, dass unangemessener Antibiotikaeinsatz in der Tierbehandlung zu Resistenzen beim Menschen führen würde. Die resistenten bakteriellen Erreger würden sich in den behandelten Tieren anreichern und können auf den Menschen übertragen werden.

Mit Blick auf den zeitlichen Zusammenhang zwischen Entdeckung eines Antibiotikums, der klinischen Anwendung und der Resistenzentwicklung wird deutlich, dass wenige Jahre nach der klinischen Anwendung bereits eine Resistenzentwicklung zu verzeichnen war (s. Tabelle 3) [134]. Teilweise trat eine Resistenz bereits im Jahr der klinischen Anwendung oder kurz danach ein, teilweise lagen drei bis vier Jahre dazwischen. Im Fall von Vancomycin waren Resistenzen erst 15 Jahre nach der ersten klinischen Anwendung entstanden.

Tabelle 3: Zeitliche Abfolge von der Antibiotikaentdeckung, über die klinische Anwendung bis zur Resistenzentwicklung [134]

Antibiotikum	Entdeckung	Klinische Anwendung	Resistenz
Penicillin	1940	1940	1943 (Methicillin 1965)
Streptomycin	1944	1947	1947
Tetracyclin	1948	1952	1956
Erythromycin	1952	1955	1956
Vancomycin	1956	1972	1987
Gentamicin	1963	1967	1970

Aktuelle Resistenzdaten aus der Human- und Veterinärmedizin sind in dem „Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland“, auch „GERMAP 2008“ genannt, veröffentlicht [85]. Ferner macht die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG) Angaben zum aktuellen Stand der Antibiotika-Resistenzen [135]. Weiteres Datenmaterial zur Bestimmung der Resistenzhäufigkeiten stammt aus den Erhebungen des „German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance“ (GENARS). GENARS wurde im Jahre 1999 als Netzwerk mikrobiologischer Labore von Universitätskliniken mit Unterstützung der Fachgesellschaften Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), PEG und Deutsche Gesellschaft für Infektiologie (DGI) gegründet und wird heute durch das Robert-Koch-Institut (RKI) koordiniert. Die Aufgabe dieses Netzwerkes besteht in der kontinuierlichen Datenerhebung von Resistenzen für klinisch relevante Erreger [136].

Im Folgenden wird die Resistenlage zwei wichtiger humanpathogener Erreger: „*Staphylokokkus aureus*“ und „*Escherichia coli*“ beschrieben.

#### *Staphylokokkus aureus*

*Staphylokokkus aureus* siedelt sich auf der Haut sowie auf der Nasen- und Rachenschleimhaut des Menschen an. Durch sie bewirkte Erkrankungen lassen sich in lokale, generalisierte und toxinvermittelte Infektionen unterteilen [137]. Häufige Lokalinfectionen sind eitrige Hautentzündungen, Wundinfektionen, Nasennebenhöhlen- und Ohrenentzündungen. Tiefergehende Entzündungen befinden sich in der Ohrspeicheldrüse oder im Knochenmark. Ebenfalls können Pneumonien nach einer Grippe-Infektion oder als nosokomiale Pneumonie bei Beatmungspatienten auftreten [138, 139]. MRSA zählt zu einem der wichtigsten nosokomialen, sehr häufig multiresistenten Infektionserregern. Im Jahr 2008 war MRSA gefolgt von ESBL die häufigste nosokomiale (d.h. im Krankenhaus erworbene) Infektion, wobei seit 2009 ESBL führend ist. Der Vergleich von Resistenzraten für MRSA-Keime der Jahre 2004 zu 2007 ist in Abbildung 2 dargestellt.

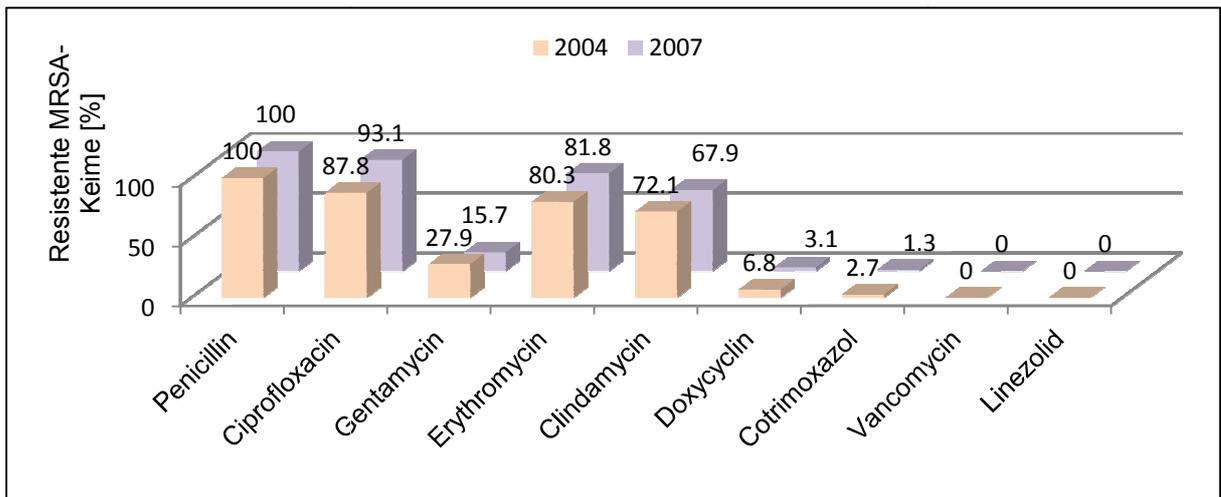


Abbildung 2: Resistenzsituation von MRSA in den Jahren 2004 und 2007 [135]

Der Vergleich lässt erkennen, dass schon im Jahre 2004 eine 100 %-ige Resistenz gegenüber Penicillin vorlag und im Jahre 2007 noch immer bestand. Eine Resistenzzunahme von 2004 zu 2007 konnte bei Ciprofloxacin und Erythromycin festgestellt werden, wohingegen Resistenzabnahmen gegen die Antibiotika Cotrimoxal, Doxycyclin, Clindamycin und Gentamicin zu verzeichnen waren. Die Wirkstoffe Vancomycin und Linezolid waren in den Jahren 2004 und 2007 gegenüber MRSA-Keimen wirksam.

Die zeitliche Entwicklung der Resistenzlage von *Staphylokokkus aureus* am Beispiel von Ciprofloxacin [135] verdeutlicht eine Resistenzzunahme von 1995 bis 2007. Die im Jahre 1995 vorliegende Resistenzrate von ca. 15 % stieg zunächst kontinuierlich bis 1998 an, anschließend folgte eine sprunghafte Zunahme auf ca. 23 %. Im Zeitraum von 2001 bis 2004 blieb die Resistenzrate konstant und stieg bis 2007 auf ca. 27 % an (s. Abbildung 3).

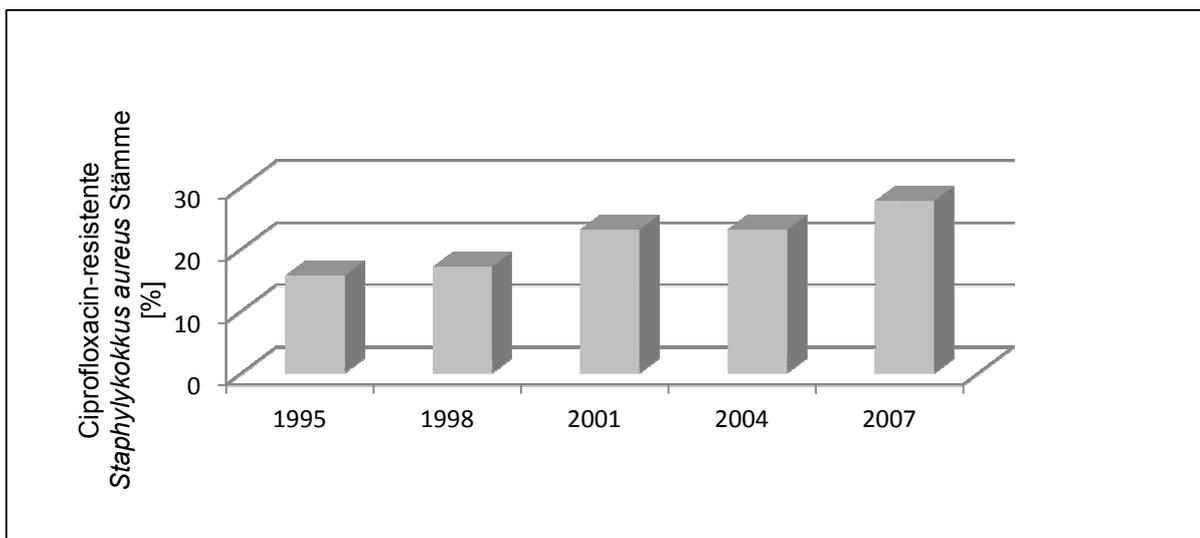


Abbildung 3: Resistenzentwicklung von *Staphylokokkus aureus* gegen Ciprofloxacin (1995-2007) [135]

*Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist der häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen und Verursacher für 15 % der nosokomialen Bakteriämien. Desweiteren werden Infektionen des Bauchraumes, Wundinfektionen, Beatmungspneumonien und Hirnhautentzündungen durch sie verursacht [139]. Die "PEG-Resistenzstudie 2007" zeigt die Resistenzentwicklung der *Escherichia coli* im Zeitraum von 1995 bis 2007 gegen unten aufgeführte Antibiotika (s. Tabelle 4) [135]:

Tabelle 4: Resistenzraten [%] von *Escherichia coli* (1995-2007) [135], n=Anzahl der Proben

Antibiotikum	1995 (n=783)	1998 (n=783)	2001 (n=619)	2004 (n=745)	2007 (n=648)	Zunahme 1995-2007
Cefuroxim	4,6	4,1	6,3	12,1	15,3	10,7 %
Cefotaxim	0,8	0,8	2,6	5,4	10,3	9,5 %
Piperacillin/ Tazobactam	1,4	1,8	4,5	3,4	5,6	4,2 %
Meropenem	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 %
Ciprofloxacin	5,5	7,8	15,0	22,3	26,4	20,9 %
Gentamicin	6,1	5,1	6,3	8,2	10,3	4,2 %
ESBL- Phänotyp	1,0	1,0	1,8	5,1	10,3	9,3 %

Die Ergebnisse verdeutlichen eine brisante Resistenzzunahme von *E. coli* gegen viele Antibiotika mit Ausnahme von Meropenem. Eine differenzierte Betrachtung erlaubt die Feststellung, dass der starke Resistenzanstieg erst ab dem Jahr 1998 erfolgte, sodass sich die Resistenzrate gegen fast alle aufgeführten Antibiotika verdoppelt hatte. Die signifikanteste Resistenzzunahme von 1998 bis 2001, um das 3,3-fache, ist gegen Cefotaxim zu verzeichnen. Die schnelle Resistenzzunahme konnte auch weiter im Zeitraum von 2001 bis 2004 beobachtet werden. So hat sich die Resistenz gegenüber dem ESBL-Phänotyp nahezu verdreifacht und gegen die Antibiotika Cefuroxim und Cefotaxim verdoppelt. Jedoch konnte eine Resistenzabnahme von Piperacillin/Tazobactam festgestellt werden, wobei bis zum Jahre 2007 erneut eine Resistenzzunahme erfolgte. In fast allen Jahren war die Resistenzrate am größten gegen Ciprofloxacin, die von 1995 bis 2007 um ca. 21 % angestiegen war. Eine Resistenz gegen Meropenem liegt laut "PEG-Resistenzstudie 2007" nicht vor [135].

#### 2.2.4 Resistenzen bedeutender veterinärpathogener Erreger

Im Gegensatz zu der Datenbasis von Antibiotikaresistenzen gegenüber humanpathogenen Erregern ist die der veterinärpathogenen Erreger sehr schmal [90]. Da

aber ein Transfer der Resistenzinformationen von veterinärpathogenen Keimen auch auf humanpathogene möglich ist, sind diese ebenfalls von großer Bedeutung. Die nachfolgenden Resistenzdaten basieren zum einen auf den Ergebnissen und Daten des nationalen Resistenzmonitorings GERM-Vet [353] für die Jahre 2006 bis 2007, durchgeführt vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in Berlin, zum anderen auf Daten des Resistenzmonitorings BfT-GermVet (2004-2006) [140, 141], durchgeführt von einem Konsortium, bestehend aus verschiedensten Instituten. GERM-Vet legte hierbei seinen Fokus auf die Tierarten: Rind, Schwein, Geflügel und Fische, wohingegen das Monitoringprogramm BfT-GermVet als Komplementärprogramm schwerpunktmäßig Untersuchungen von Isolaten der Tierarten Hund, Katze und Pferd durchführte. Insgesamt wurden in jeder Studie 24 Wirkstoffe/Kombinationen getestet. Das Resistenzverhalten der Bakterien unterscheidet sich abhängig von der Bakterienart, den Tierarten und den Krankheitsprozessen, sodass die Resistenzenuntersuchungen differenziert vorgenommen und ausgewertet wurden.

Die Anzahl der Isolate lag bei 100-300 pro Erreger/Tierart/Krankheit im Germ-Vet bzw. 80-100 bei BfT-Germ-Vet. Auf dieser Grundlage konnte ein Resistenzstatus bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber Antibiotika in Deutschland erfasst werden [140, 141]. Die nachfolgende Tabelle 5 zeigt die Resistenzraten von Staphylokokken, Streptokokken und *E. coli*.

Tabelle 5: Resistenzraten [%] veterinärpathogener Staphylokokken, Streptokokken und *E. coli* für den Zeitraum 2004-2007, [140]

Veterinärpathogene Erreger	Antibiotika	Häufigste Resistenzen [%]
Staphylokokken	Penicillin G	53-77
	Tetracyclin	33-52
	Erythromycin	13-27
	Sulfamethoxazol	2-30
	Chloramphenicol	4-22
	Trimethoprim/Sulfadiazin	2-13
	Oxacillin	2,8
Streptokokken	Sulfamethoxazol	20-78
	Tetracyclin	17-93
	Gentamicin	14-79
	Erythromycin	0-33
<i>E. coli</i>	Sulfamethoxazol	15-59
	Ampicillin	14-39
	Tetracyclin	14-54
	Sulfadiazin/Trimethoprim	9-41

Staphylokokken-, Streptokokken- und *E. coli*-Isolate aus dem Tier zeigen hohe Resistenzraten gegen die Antibiotika Tetracyclin, Sulfamethoxazol und Sulfadiazin/Trimethoprim. Die häufigste Resistenz der Staphylokokken liegt gegen Penicillin G, gefolgt von Tetracyclin, vor. Die Streptokokken zeigen höchste Resistenz

gegen Tetracyclin (17-93 %), Sulfamethoxazol (20-78 %) und Gentamicin (14-79 %), wobei zwischen den Werten eine sehr große Spannbreite liegt, für Tetracyclin sogar 76 %. Die durchschnittlichen Resistenzraten von *E. coli* liegen für o.g. Wirkstoffe bei 13-48 %.

### 2.3 Verbrauchergefährdung durch resistente Keime in der Lebensmittelkette

#### *Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette tierischen Ursprungs*

In den Jahren 2000-2008 wurden in den nationalen Referenzlaboratorien für Salmonellen und für Antibiotikaresistenz am BfR Salmonella-Isolate auf Antibiotikaresistenzen getestet und nach epidemiologischen Kriterien bewertet [142]. Hierbei handelte es sich insbesondere um Isolate von Tieren, aber auch aus Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. Die Untersuchungen von 33.625 Salmonella-Isolaten zeigten, dass 48 % resistent gegen mindestens eine und 35 % sogar resistent gegen mehr als eine Antibiotikaklasse waren. Ein Vergleich der Isolate ließ erkennen, dass die Resistenzraten bei den Isolaten von Nutztieren und aus Lebensmitteln wesentlich höher waren. Untersuchungen haben ergeben, dass sogar Resistenzen von Salmonellen gegen besonders wichtige Antibiotikagruppen vorlagen. So wiesen die Serovare *Salmonella Paratyphi B dT+* vom Huhn und aus Hühnerfleisch und *Salmonella Saintpaul* aus der Pute und aus Putenfleisch Resistenzen gegenüber Wirkstoffen der Fluorchinolon- und Chinolon-Gruppe auf. Die Resistenzrate betrug hierbei 60-85 %. Zudem zeigten 74 % aller Isolate vom Schwein und 72 % aller Isolate aus Putenfleisch eine Mehrfachresistenz [142]. Die Untersuchungsergebnisse der Resistenztestung von *Salmonella enterica subsp. enterica*-Isolate sind in dem BfR-Bericht "Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette-DARLink" veröffentlicht (208).

Ein darauf folgendes Resistenzmonitoring verschiedener Erreger im Jahr 2009 ergab ein ähnliches Resistenzverhalten wie bei Salmonellen (Jahre 2000-2008) für *E. coli* und *Campylobacter*. Resistenzen bei Isolaten gegenüber Fluorchinolone wurden dabei insbesondere bei Salmonellen und *E. coli* vom Hähnchen, aber auch beim *Campylobacter* vom Hähnchen und Mastkalb bis zu zwei Drittel nachgewiesen. Zudem konnten in über 5 % der *E. coli*-Isolate vom Masthähnchen Resistenzen gegenüber Cephalosporine der dritten Generation nachgewiesen werden. Die Resistenzuntersuchungen auf verschiedenen Stufen der Lebensmittelkette zeigten vergleichbare Resistenzmuster bei Isolaten von Tieren und aus dem Fleisch der Tiere. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Erreger bei der Fleischgewinnung in das Fleisch gelangen können, wodurch resistente Keime wiederum bis zum Verbraucher am Ende der Lebensmittelkette durchdringen.

Gemäß dem Präsidenten des BfR, Prof. Dr. Dr. A. Hensel sind: „Resistenzen bei Krankheitserregern in Tieren und auf Lebensmitteln [...] ein gravierendes Problem im gesundheitlichen Verbraucherschutz“ [142]. Demnach können die Folgen von Infektionen mit resistenten Erregern lebensbedrohlich werden. Zur Vermeidung der Resistenzzunahme rät das BfR, den Antibiotikaeinsatz sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin auf ein notwendiges Mindestmaß zu begrenzen. Die Überwachung und die Minimierung des Antibiotikaeinsatzes bei Tieren und in der Lebensmittelkette sind Bestandteil der „Deutschen Antibiotika Resistenzstrategie, (DART)“ der Bundesregierung [142].

#### *Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette pflanzlichen Ursprungs*

Neben Antibiotikaresistenzen von tierischen Lebensmitteln gibt es wenige Untersuchungen von pflanzlichen [175, 351]. Im Vergleich zur Anwendungsmenge von antimikrobiellen Wirkstoffen in Human- und Veterinärtherapie (ca. 30 Antibiotika aus 14 Antibiotikaklassen) ist die Anwendung im Pflanzenanbau nur sehr gering [367]. Gemäß der „European and Mediterranean Plant Protection Organization“ (EPPO) [368], die dem internationalen Pflanzenschutzübereinkommen („International Plant Protection Convention“, IPPC) [369] unterliegt, darf lediglich Streptomycin als einziger antibiotischer Wirkstoff zur Behandlung von Feuerbrand (gefährliche, schnell ausbreitende Pflanzenkrankheit durch *Erwinia amylovora*-Bakterien, die bevorzugt Kernobstgewächse befallen) an Äpfel- und Birnenbäumen in der Europäischen Gemeinschaft eingesetzt werden. Die Ausbreitung von resistenten Bakterien wird im landwirtschaftlichen Pflanzenanbau daher hauptsächlich durch Bewässerung mit kontaminiertem Wasser verursacht [342, 351].

Aufgrund der geringen Daten bezüglich der Antibiotikaresistenzen von Bakterien auf Gemüse, haben Schwaiger et al. [362] 1001 Nutzpflanzen (verschiedene Gemüsepflanzen, Wurzel- und Zwiebelgewächse, Salate und Getreide) aus Bayern auf eventuelle Resistenzen untersucht, wobei sie zwischen Gemüse aus Supermärkten und direktem Feld unterschieden haben. Tatsächlich konnten hohe Resistenzraten u.a. gegen Doxycyclin (23 %), Cefaclor (41 % und 29%), Rifampicin (65 %) ermittelt werden, wobei bei frischem Gemüse aus Supermärkten die Raten geringer waren als bei Gemüse direkt vom Feld [362]. Es gilt die Empfehlung rohes Gemüse zu waschen und abzuschälen, um an der Oberfläche haftende pathogene und Antibiotika-resistente Bakterien zu entfernen [362].

Ebenfalls haben Fernández-Fuentes et al. [363] Resistenzraten von Bakterien in organischen Lebensmitteln (Gemüse und Obst) gegenüber Antibiotika und Bioziden untersucht. Die Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass organische Lebensmittel als

Reservoir für Antibiotika-resistente Bakterien dienen können. Zudem können die hohen Resistenzen gegenüber Bioziden die Verbreitung Antibiotika-resistenter Stämme in der Lebensmittelindustrie fördern.

*Gefährdungspotential durch resistente Mikroorganismen - Aktuelle Problematik durch "Extended-Spectrum-Beta-Lactamase" bildende Erreger (ESBL)*

Bei der Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen stellen insbesondere ESBL-bildende multiresistente Erreger aus der Familie der *Enterobacteriaceae* ein großes Risiko für den Menschen dar. Enterobakterien gehören in der Regel zur menschlichen Keimflora des Darms. Es handelt sich hierbei um Stämme von *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und andere, die normalerweise für immunstarke Menschen keine Infektionsgefahr darstellen. Jedoch können sie riskant für abwehrgeschwächte Patienten oder Patienten mit chronischen Wunden sein. Die Hauptreservoirs der ESBL-bildenden Bakterien sind neben der menschlichen Darmflora die Atemwege. Im Gegensatz zu den bisher häufiger anzutreffenden grampositiven MRSA und Vancomycin-resistenten Enterokokken handelt es sich bei ESBL um gramnegative Keime. Die Übertragung von ESBL-bildenden Bakterien von einer Person auf eine weitere ist im Vergleich zur Ausbreitung von MRSA viel schwieriger. Übertragungen entstehen durch Schmier- und Kontaktinfektionen (direkter oder indirekter Kontakt mit Stuhl, über infizierte Wunden oder erregerhaltige Sekrete). Darüber hinaus wird vermutet, dass sie über Tröpfchen in Form von Aerosolen, z.B. beim Husten, übertragen werden können. Die dadurch entstehenden Erkrankungen sind Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen und Lungenentzündungen. Die Gefahr der Resistenzentwicklung von ESBL-bildenden Bakterien liegt darin, dass sie nahezu alle Beta-Lactam-Antibiotika durch Hydrolyse inaktivieren können, insbesondere die in der Therapie häufig eingesetzten Cephalosporine der dritten Gruppe. Aufgrund dieser Eigenschaft sind ESBL-Bildner einer antibiotischen Therapie schwer zugänglich. Die ESBL-Gene, die über ein Integron eingebettet sind, können über Transposons (codierende DNA-Sequenzen, die ihren Standort innerhalb der DNA wechseln können) und über konjugative Plasmide übertragen werden. Ein Plasmid kann mehrere Transposons mit Genen, die Resistenz gegenüber Antibiotika verschiedener Wirkstoffklassen vermitteln, enthalten. Durch die Übertragung dieser Mehrfachresistenz-Transposons auf andere Spezies entstehen multiresistente Erreger, die sehr schwer therapierbar sind. Im Rahmen eines über das Bundesministerium für Gesundheit (BMG) geförderten Projektes "Antibiotika Resistenz Surveillance" (ARS) wurden die molekularen Grundlagen der zunehmenden Resistenz von Enterobakterien gegen moderne Beta-Lactam-Antibiotika an 163 nosokomiale Erkrankungen verursachenden *Enterobacteriaceae* untersucht. Aufgefallen ist dabei die Kopplung von Beta-Lactam- und

Fluorchinolonresistenz, was auf den intensiven Einsatz dieser Antibiotika in der Therapie zurückzuführen ist [144-146].

Zurzeit sind mehr als 150 verschiedene ESBL-Varianten bekannt und aufgrund neuer Mutationen kommt es zu einer stetigen Zunahme. Die neuen Varianten der ESBL-Stämme unterscheiden sich von den Urtypen durch Aminosäure-Austausch-Mutation [144]. Dadurch erweitern sie ihr Substratspektrum und führen zu Resistenzen gegen neue Antibiotika-Generationen. Mittlerweile gibt es Varianten, die auch Resistenzen gegenüber dem Antibiotikum zugesetzten Inhibitor, wie z.B. Clavulansäure, aufweisen. Seit Ende der neunziger Jahre werden zunehmend sowohl innerhalb als auch außerhalb von Krankenhäusern resistente ESBL-Stämme beschrieben. Herkömmliche phänotypische Screeningverfahren, die im Krankenhaus durchgeführt werden, können diese Stämme nur schwer erfassen [147]. Zusätzliche mikrobiologische Diagnostikverfahren sind sehr zeitaufwendig, weswegen in dieser Zeit den Patienten sehr häufig Breitbandantibiotika verschrieben werden. Dies hat zur Folge, dass oft mehr Breitbandantibiotika verschrieben werden als eigentlich notwendig und dies wiederum die Förderung neuer Resistenzverbreitungen bewirken kann. Eine präzise und schnelle Testmethode ist der genotypische Nachweis von ESBL-Stämmen mittels Mikroarray-Technologie, der auch relevante Mutationen und verschiedene Typen erkennen lässt [148]. Durch die frühzeitige spezifische Identifizierung kann der Einsatz von Antibiotika effektiver erfolgen, sodass die Anwendung von Breitbandantibiotika auf schwere Infektionen beschränkt bleibt [147].

#### *Verbrauchergefährdung durch aggressive Enterohämorrhagische E. coli (EHEC) in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs*

EHEC's, die in der tierischen Darmflora vorkommen, für diese aber nicht pathogen sind, können durch direkten Tierkontakt oder durch die Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel auf den menschlichen Körper übertragen werden. So kam es im Jahr 2011, nach Angaben des BfR durch EHEC kontaminierte Bockshornkleesamen aus Ägypten, zu einer deutschlandweiten EHEC-Epidemie, die sich auch bis in andere europäische Länder ausweitete. Im schlimmsten Fall löst eine EHEC-Infektion das Hämolytisch-Urämische-Syndrom (HUS) aus, das durch Nierenversagen zum Tode führen kann. Die rasante Ausbreitung ist vor allem dadurch bedingt, dass die EHEC-Erreger über Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch übertragbar sind [149]. Nach Angaben des RKI forderten EHEC und HUS insgesamt 38 Todesfälle in Deutschland. Laut der gemeinsamen Pressemitteilung (05.07.2011) vom BfR, BVL und dem RKI ist der „[d]erzeitige EHEC-Ausbruch [...] das größte HUS/EHEC-Ausbruchsgeschehen, das in Deutschland je beschrieben wurde“ [149]. Demnach können pflanzliche Lebensmittel als Übertragungsquelle von endophytischen Bakterien (Bakterien, die im inneren des

Vegetationskörpers einer Pflanze leben und von ihrer Oberfläche nicht abgespült werden können) eine große Gefahrenquelle für den Menschen bedeuten [246].

### **2.3.1 Eintrag von Antibiotikarückständen und resistenten Erregern über die Nahrungsmittelkette in den Menschen**

Zur Beurteilung der Verbrauchergefährdung bezüglich der Resistenzentwicklung ist es notwendig, die Beeinflussungen und Interaktionen zwischen Mensch, Tier und Umwelt zu berücksichtigen. Untersuchungen haben gezeigt, dass Zusammenhänge zwischen Infektionskrankheiten beim Menschen und resistenten, vom Tier stammenden Erregern, bestehen [150, 151].

Eine Resistenzentwicklung beim Menschen durch Anwendung von Veterinärantibiotika in der landwirtschaftlichen Tierhaltung ist auf zwei Wegen möglich. Zum einen durch direkte Übertragung resistenter Mikroorganismen durch direkten Tierkontakt oder durch tierische oder/und pflanzliche Lebensmittel, die resistente Erreger enthalten. Diese Erreger sind bereits resistent, bevor sie in den Menschen gelangen und haben aufgrund ihrer bereits erworbenen Resistenz einen Selektionsvorteil bei anschließender Antibiotikaverabreichung. Zum anderen können durch Verzehr von tierischen Lebensmitteln (Fleisch, Milch, Ei) und Nutzpflanzen Antibiotikarückstände aufgenommen werden, die wiederum zu einer Resistenzentwicklung im Körper des Menschen führen können [152, 153] (s. Anhang A. 1.3).

#### *Stand der Forschung zur Aufnahme von Antibiotika in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft*

Grote et al. untersuchten erstmalig zwischen 2002 und 2005 das Aufnahmepotential von Nutzpflanzen unter Feld- und Hydrokulturbedingungen. So wurden im Rahmen einer Studie [14, 26] unter praxisnahen landwirtschaftlichen Bedingungen Ferkel mit Chlortetracyclin, Sulfadiazin und Trimethoprim kontrolliert medikamentiert. Die von diesen Tieren gewonnene Gülle wurde auf Versuchspartzen aufgebracht, auf denen Winterweizen und Feldsalat gepflanzt wurden. Anschließende Untersuchungen der geernteten Pflanzen zeigten eine Aufnahme über die Wurzel und einen Transport von CTC bis ins Winterweizenkorn [26]. Ebenfalls wurde ein Getreide-Screening im konventionellen Anbau in viehstarken Gebieten in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen (Ernte 2005 und 2006) durchgeführt. Für das Jahr 2005 lagen Positivbefunde, insbesondere für Tetracycline im Winterweizen (Doxycyclin (DC): ~ 30 µg/kg; Chlortetracyclin (CTC): ~ 60 µg/kg) vor, wobei iso-CTC mit maximal ~ 95 µg/kg FG nachgewiesen wurde [41].

Neben diesem Screening wurde das Aufnahmepotential von Weißkohl und Porree für verordnungstarke Wirkstoffe aus der Nutztierhaltung über Dotierungsexperimente in Hydrokultur geprüft [25, 41]. Die Ergebnisse wiesen die Aufnahme und den Transfer von

Antibiotika über die Wurzel in die verschiedenen Bestandteile der Pflanzen nach. In beiden Pflanzen dominierten die Wirkstoffe CTC und Enrofloxacin (ENR) (Weißkohlwurzel CTC: max. ~10 mg/kg FG, Porreewurzel CTC: ~20 mg/kg FG, äußere Weißkohlblätter ENR: max. ~7 mg/kg FG) [25, 41]. Weitere Aufnahmeexperimente in Hydrokultur wurden mit Feldsalat, Winterweizen und Möhren durchgeführt [27, 153]. Die Ergebnisse zeigen, dass CTC vermehrt, aber teilweise auch SFD und ihre Metabolite von den drei Pflanzenarten aufgenommen und innerhalb der Pflanzen weiter transportiert wurden. Tracerstudien mit Tritium-markiertem Sulfamethazin und Tetracyclin unter Hydrokulturbedingungen (vgl. Abbildung 4) belegen die Abhängigkeit der Aufnahme, des Transportes und der Verteilung der Antibiotika von der dotierten Antibiotikakonzentration und der Wachstumszeit der Pflanzen. Mikroautoradiographische Untersuchungen an Wurzelquerschnitten von Weizenpflanzen ließen die Lokalisation der Antibiotikaeinlagerungen erkennen. Hiernach stellen die Apoplasten der Rhizodermis und die erste Rindenlage die Haupteinlagerungsorte der Antibiotika in der Wurzel dar [153, 154].

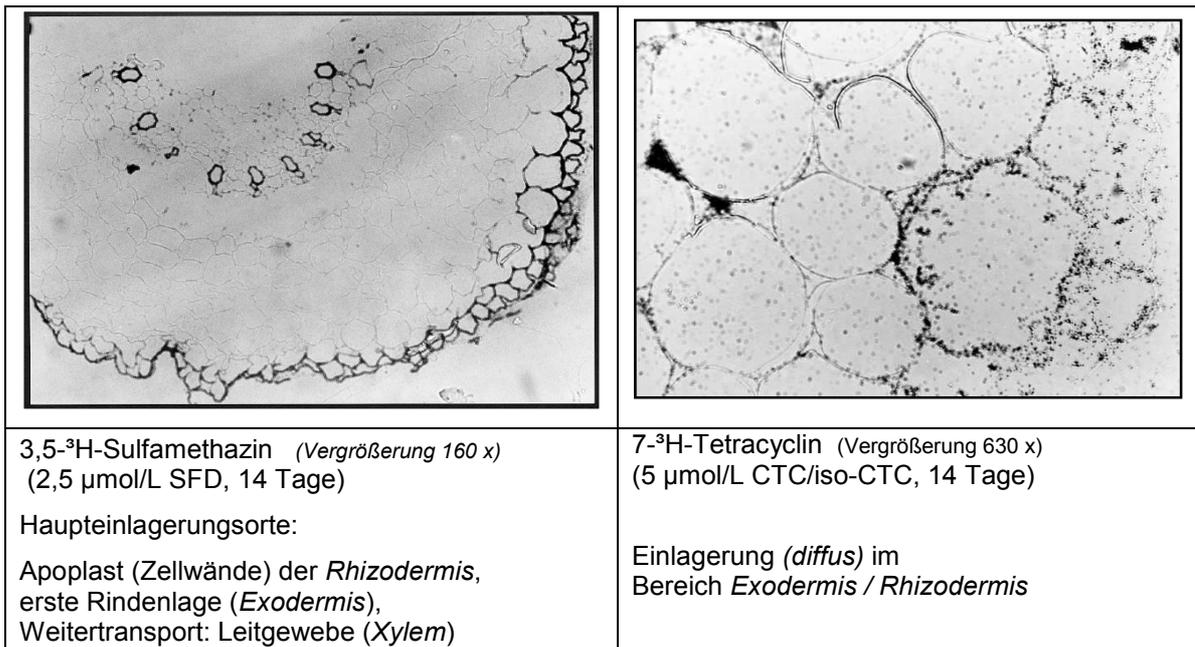


Abbildung 4: Mikroautoradiographische Fotos der Weizenwurzeln aus dem Hydrokulturexperiment (gebundene Rückstände) [27, 153, 154]

Neben den Untersuchungen von Grote et al. haben sich inzwischen andere Arbeitskreise ebenfalls mit der Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen beschäftigt und zahlreiche Nachweise des Transfers und Transportes erbracht [27-34]. Tabelle 6 zeigt Literaturdaten zur Aufnahme von CTC und ENR in Pflanzen, wobei die Anzuchtbedingungen variieren (Boden, Agar, Hydrokultur), die einen Einfluss auf die Pflanzenverfügbarkeit (vgl. Kapitel 3.3.2) haben.

Tabelle 6: Untersuchungen zur Aufnahme von CTC und ENR in Pflanzen

Wirkstoff	Pflanzenart	Anzuchtbedingung	Ergebnisse (Effekte/Aufnahme)
CTC	Mais, Zwiebel, Kohl	Boden 1 µg pro Pflanztopf	Aufnahme von 10 bis 14,4 ng/g [155]
	Möhre, Weizen, Feldsalat	Hydrokultur 5-20 µmol/L	Aufnahme von 0,9 bis 338 mg/kg [154], [156]
	Mais	Boden	kein Effekt [157]
ENR	Gurke, Rettich, Gartensalat, Gartenbohne	Agar 50, 100, 5000 µg/L	Wuchs gesteigert oder vermindert, Aufnahme < 8,1 µg/g [158]
	Kopfsalat	Boden 1 mg/kg	Aufnahme von 2,8 µg/kg [159]

Der hier beschriebene Forschungsstand belegt, dass Nutzpflanzen ein Aufnahmepotential für Veterinärpharmaka besitzen, sogar in einem Konzentrationsbereich von mg/kg FG. Somit könnte der Verbraucher aufgrund des Vorkommens von Antibiotika in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft und den daraus möglichen Folgen der Resistenzentstehung ausgesetzt sein.

Neuere Untersuchungen aus der Stadt Guangzhou in China [364, 365] (2010) haben ergeben, dass 96 % der in dieser Region untersuchten Gemüseproben Chinolon-Rückstände (1 bis 1631 µg/kg FG) enthalten. In einer weiteren Studie [365] (2011) wurden dort erneut 90 % Chinolon-kontaminierte Gemüseproben festgestellt, wobei die Gehalte zwischen 10,16 und 193,25 µg/kg TM variierten.

#### *Stand der Forschung zur Aufnahme von Antibiotika in Lebensmitteln tierischer Herkunft*

In vielen Untersuchungen von Hühnern, Kälbern und Schweinen konnte der Eintrag von Antibiotikarückständen in Fleischproben, insbesondere der Wirkstoffklassen Tetracycline, Sulfonamide und Aminoglykoside, nachgewiesen werden [160]. Des Weiteren können in Geflügelfleisch vermehrt Ionophore, die als Kokzidiostatika eingesetzt werden, rückstandsanalytisch erfasst werden [161]. Grote et al. wiesen in einer Modellstudie den Verbleib von CTC, nach bestimmungsgemäßer Anwendung, im Schlachtkörper von Schweinen nach [162]. Tetracycline haben eine hohe Affinität zu multivalenten Metallkationen und bilden u.a. mit Calcium aus dem Knochengewebe stabile Chelate, die unter UV-Licht fluoreszieren. Diese Chelate werden dort in die Mineralisierungszone eingelagert. Somit lassen sich Tetracycline in hoher Konzentration im Knochengewebe mittels Fluoreszenz nachweisen [162]. Neben Fleisch können auch andere tierische Produkte, wie z.B. Milch, Eier [163] und Honig [164-166] Antibiotikarückstände enthalten.

### 2.3.2 Lebensmittelrechtliche Aspekte zu Antibiotikarückständen in tierischen Lebensmitteln

Nach §10 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) ist es verboten „vom Tier gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind“ [173]. Die Umsetzung der Forderung erfolgt gemäß Verordnung (EG) 470/2009 [174]. Diese beinhaltet folgende Kerninhalte:

- Verfahrensregelungen zur Festsetzung von Höchstmengen für pharmakologisch wirksame Stoffe in Lebensmitteln tierischer Herkunft,
- Anwendungsverbote für als gesundheitsgefährdend eingestufte Stoffe für Tiere, die der Lebensmittelgewinnung dienen,
- Lebensmittelkontrolle unter Berücksichtigung der Rückstandshöchstmengen und Referenzwerte sowie
- Vermarktungsverbot belasteter Lebensmittel tierischer Herkunft.

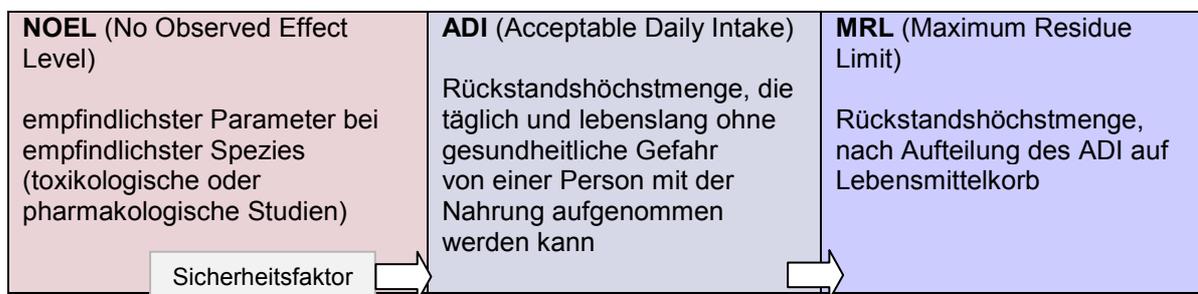
Bei den pharmakologisch wirksamen Stoffen, für die eine Rückstandshöchstmenge festsetzung erforderlich ist, handelt es sich u.a. um Stoffe, die innerhalb der EU für zugelassene Tierarzneimittel verwendet werden. Zudem beinhaltet es Stoffe, die in besonderen Arzneimitteln, d.h. in Arzneimitteln für den sogenannten „Therapienotstand“ und in Tierarzneimitteln aus Drittländern angewandt werden. Therapienotstand in der Tiermedizin bedeutet, dass insbesondere für seltenere oder wirtschaftlich weniger bedeutsame Tierarten aufgrund der hohen Anforderungen an eine Arzneimittelzulassung keine zugelassenen wirksamen Arzneimittel zur Verfügung stehen [175]. Der Therapienotstand wird in Deutschland durch § 56 a, Abs. 2 des Arzneimittelgesetzes (AMG) geregelt [48]. Hierbei dürfen pharmakologisch wirksame Stoffe bei Tieren eingesetzt werden, auch wenn diese keine Zulassung für die jeweilige Tierart oder Indikation besitzen. Voraussetzung dafür ist, dass eine Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier nicht zu erwarten ist.

Rückstandshöchstmengen werden des Weiteren festgesetzt für Inhaltsstoffe von Bioziden (Biozide sind Schädlingsbekämpfungsmittel im nicht-agrarischen Bereich), welche in der Tierhaltung eingesetzt werden [174]. In Verbindung mit Verordnung 470/2009 steht eine weitere Verordnung (EU) Nr. 37/2010 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs [176]. Darin sind die erlaubten Wirkstoffe mit den entsprechenden Rückstandsinformationen und die verbotenen Wirkstoffe aufgeführt. Alle

Veterinärantibiotika werden im Rahmen ihres Zulassungsverfahrens auf ihre Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt geprüft. Im Sinne des Verbraucherschutzes wurden Grenzwerte für antibiotische Wirkstoffe, die "Maximum Residue Limit" (MRL)-Werte für Lebensmittel tierischen Ursprungs (Fleisch, Leber, Niere, Fett, Milch, Eier und Honig) festgelegt [176]. Dabei handelt es sich um die maximal zugelassene Höchstmenge eines Stoffes, die bei durchschnittlichen Essgewohnheiten zu keiner gesundheitlichen Gefährdung des Menschen führt [177]. Der MRL-Wert gewährleistet, dass bei täglicher Aufnahme von Veterinärantibiotika-Rückständen bis zur Höhe dieses MRL-Wertes keine Verbrauchergefährdung zu erwarten ist (vgl. Tabelle 7, Berechnung von MRL-Werten). Die gesetzlich festgelegten MRL-Werte, der in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotika, entstammen der Verordnung 37/2010 (s. Anhang A. 1.4).

Auf Grundlage der "No Observed Effect Level" (NOEL)- und "Acceptable Daily Intake" (ADI)-Werte werden maximale Rückstandshöchstmengen, die MRL-Werte für tierische Lebensmittel errechnet. Bislang gibt es jedoch noch keine Grenzwerte für die Antibiotikabelastung von Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs. Daher besteht die Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit darin, Informationen und Daten zu sammeln, um erkennen zu können, ob und wie notwendig Grenzwertfestlegungen für pflanzliche Lebensmittel oder ihre Produkte sind.

Tabelle 7: Festlegung von Grenzwerten (MRL-Werte) in Lebensmitteln [178]



### **3 Umwelteintrag, Verbreitungspfade und Aufnahme von Veterinärantibiotika in Nutzpflanzen**

Die in der Landwirtschaft eingesetzten Antibiotika können über verschiedene Eintragungspfade in die Umwelt gelangen, z.B. direkt über tierische Ausscheidungen, Anwendung von Wirtschaftsdünger, über Klärschlamm oder Stallstaub. Diese möglichen Eintragungspfade sind im Folgenden näher beschrieben:

#### **3.1 Eintragungspfade von Veterinärantibiotika in die Umwelt**

##### *Eintragungspfad über direkte tierische Ausscheidung oder in Form von Wirtschaftsdünger*

Im Gegensatz zu den Humanarzneimitteln, die hauptsächlich über Kläranlagenabflüsse [179, 180] in die Umwelt gelangen, erfolgt der Eintrag von Veterinärpharmaka zum größten Teil über die Ausscheidungsprodukte der Nutztiere. Diese gelangen entweder direkt beim Weidegang der Tiere oder indirekt in Form von Gülle oder Festmist auf die landwirtschaftlichen Nutzflächen [54, 181, 182]. Rinder- und Schweinegülle, Rinderdung, sowie Mist und Trockenkot aus der Geflügelhaltung werden in Form von Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftliche Nutzflächen ausgebracht.

Der Begriff Wirtschaftsdünger wird im Düngegesetz § 2.2 [56] folgendermaßen definiert:

„Wirtschaftsdünger: Düngemittel, die

a) als tierische Ausscheidungen

aa) bei der Haltung von Tieren zur Erzeugung von Lebensmitteln oder

bb) bei der sonstigen Haltung von Tieren in der Landwirtschaft oder

b) als pflanzliche Stoffe im Rahmen der pflanzlichen Erzeugung oder in der Landwirtschaft

auch in Mischungen untereinander oder nach aerober oder anaerober Behandlung anfallen oder erzeugt werden“ [56].

Im selben Paragraphen werden Düngemittel definiert. Sie werden demnach zur Nährstoffzuführung, zum Wachstum, zur Ertragssteigerung und zur Qualitätsverbesserung von Nutzpflanzen eingesetzt. Zudem soll durch ihren Einsatz die Bodenfruchtbarkeit erhalten bzw. verbessert werden. Der Einsatz von Düngemitteln muss streng geregelt werden, damit von ihnen keine Gefahren für die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt ausgehen. Das o.g. Düngegesetz hat gemäß § 1.3 den Zweck: „Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sowie für den Naturhaushalt vorzubeugen oder abzuwenden, die durch das Herstellen, in Verkehr bringen oder die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Pflanzenhilfsmitteln sowie Kultursubstrate oder durch andere Maßnahmen des Düngens entstehen können [...]“ [56].

Die Ausführung des Düngegesetzes ist geregelt in der „Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln -Düngemittelverordnung (DüMV)“ [183].

Antibiotika, insbesondere Tetracycline, werden im tierischen Organismus nur geringfügig abgebaut bzw. metabolisiert und gelangen in hohen Anteilen der applizierten Mengen (bis 90 %) in die Gülle, die als Wirtschaftsdünger genutzt wird [7]. Modellrechnungen zeigen, dass Mastschweinegülle bei einer Behandlung der Tiere über 10 Tage zwischen 23 und 52 g/m<sup>3</sup> Tetracyclin enthalten kann [184]. Untersuchungen in 181 Schweinegülleproben in verschiedenen Mastanlagen ergaben Positivbefunde in 24 % der Fälle, wobei in dieser Screening-Studie maximal 66 mg/kg Tetracyclin gefunden werden konnte [185, 186]. Viehstarke Gebiete sind besonders betroffen, wenn für die Ausbringung und Entsorgung von Gülle, Trockenkot und Mist nicht genügend landwirtschaftliche Nutzflächen zur Verfügung stehen. Nach Angaben von Focke [187] wurde zahlreichen Betrieben die Auflage gemacht, überschüssige Gülle in Nachbarkreise zu fahren und dort auszubringen. Die Antibiotikagehalte in den Wirtschaftsdüngern unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Gülleart, den antibiotischen Wirkstoffen und den Lagerungsbedingungen der Gülle. In der Literatur sind Antibiotikagehalte vom µg/kg- bis in den mg/kg-Bereich genannt [2, 188-192]. Die Tabelle 8 enthält ausgewählte Literaturdaten zu den Wirkstoffen CTC, ENR und CIP in tierischen Ausscheidungen und in Böden, da die Daten für diese Arbeit von besonderer Relevanz sind.

Tabelle 8: Daten zu Wirkstoffgehalten ausgewählter Antibiotika in Gülle, Mist und Boden

Chlortetracyclin (CTC)		Enrofloxacin (ENR)		Ciprofloxacin (CIP)	
<b>Schweinegülle/ Gülle</b>					
Gehalt	Lit.	Gehalt	Lit.	Gehalt	Lit.
0,1 - 46 mg/kg TM max. 112 mg/kg 0,005 - 3,66 mg/kg max. 331 mg/kg max. 62,5 mg/kg	[7] [189] [188] [190] [191]	0,13 - 0,75 mg/kg TM max. 116 µg/L	[7] [189]	max. 0,18 mg/kg TM max. 28 µg/L	[7] [189]
<b>Hühnermist</b>					
max. 0,36 mg/kg TM 1,7 mg/kg TM	[192] [7]	max. 2,8 mg/kg TM	[7]	max. 1,2 mg/kg TM	[7]
<b>Putenmist</b>					
max. 1,7 mg/kg TM	[7]	max. 8,3 mg/kg TM	[7] [189]	max. 2,9 mg/kg TM	[7]
<b>Boden</b>					
max. 0,81 mg/kg max. 27 µg/kg	[189] [190]	0,1 mg/kg ENR+CIP: max. 0,20 mg/kg TM max. 0,2 mg/kg	[192] [7] [189]	0,1 mg/kg ENR+CIP: max. 0,37 mg/ kg TM	[192] [7]

\*wenn TM nicht angegeben, dann bezieht sich das Ergebnis auf FG

### *Eintrag in Oberflächengewässer und Grundwasser*

Der Eintrag von Veterinärantibiotika und Metaboliten aus dem Boden in den Wasserpfad ist vor allem abhängig von ihrer Mobilität, die von der Wasserlöslichkeit abhängt, sowie von dem pH-Wert des Bodens. Hierbei spielen zudem Matrixwechselwirkungen (Komplexbildung, Ionenaustauschreaktion und Wasserstoffbrückenbindung) eine Rolle. Infolge von hohen Niederschlagsmengen ("Starkregen"- bzw. "Platzregenereignisse") können die Veterinärantibiotika durch "Run-Off" (Oberflächenabfluss) in Oberflächengewässer (z.B. Flüsse, Seen) gelangen [30, 188, 193-196, 200]. Heberer [188] wies in Oberflächenwasser maximale Tetracyclin-Konzentrationen von 1 µg/L nach, wobei die dortige Bodenbelastung durch Tetracycline nur < 2 µg/kg betrug. Neben dem "Run-Off" können die Antibiotika aus der Bodenschicht ebenfalls mit dem Sickerwasser, durch Auswaschen des Bodens, vertikal in tiefere Bodenregionen transportiert werden und bis ins Grundwasser gelangen [197, 198]. Aufgrund der geringen Datenbasis von Antibiotikakontaminationen in Grundwässern gestaltet sich ein Vergleich mit Oberflächenwässern schwierig, wobei sich jedoch eine größere Verlagerungstendenz durch horizontalen Transport in Oberflächengewässer andeutet [199]. Grote et al. führten Experimente mit Regensimulationen zur Klärung des Transportverhaltens von Arzneistoffen am Beispiel von SFD und CTC im Boden durch. Diese Modelluntersuchungen [200] haben ergeben, dass Antibiotika bis ins Grundwasser gelangen können.

### *Eintragungspfad über Klärschlamm als Düngemittel*

Klärschlamm bezeichnet als Oberbegriff alle in der biologischen Abwasserreinigung entstehenden Schlämme. Aufgrund des hohen Nährstoffgehaltes von Klärschlamm wird dieser ebenfalls als Düngemittel genutzt. Somit stellt die Verwendung von Klärschlamm als Düngemittel neben der Anwendung von Gülle einen zusätzlichen Eintragungspfad von Antibiotika in die Umwelt dar. Die Verwertung von Klärschlamm als Düngemittel in der Landwirtschaft unterliegt in Deutschland der Klärschlammverordnung (AbfKlärV) [201]. Gemäß § 4.2 ist das Aufbringen von Klärschlamm auf Gemüse- und Obstanbauflächen verboten [201]. Der Eintragungspfad über Klärschlamm ist grundsätzlich nur für Humanantibiotika von Bedeutung.

### *Eintragungspfad über Stallstaub*

Neuere Studien belegen, dass luftgetragene antibiotikahaltige partikuläre Emissionen aus agrar-industriellen Tierhaltungssystemen, in Form von Stallstäuben ebenfalls zum Eintrag von Antibiotika in die Umwelt beitragen [184, 202-205]. Stallstäube enthalten neben

Mykotoxinen, Viren oder Milbenpartikel getrocknete Güllereste und Tierfutterbestandteile, die über die Abluftschächte der Ställe in die Umwelt gelangen. Gemäß Pawelzick [196]. konnten im Stallstaub Tylosin (12,18 mg/kg), Sulfamethazin (2,90 mg/kg) und Tetracycline (5,18 mg/kg) nachgewiesen werden. Diese antibiotikakontaminierten Stallstäube können sich auf Nutzpflanzen absetzen und durch pflanzliche Transportwege in diese gelangen (vgl. Kapitel 3.3). Durch Verzehr dieser Nutzpflanzen haben Antibiotika die Möglichkeit in den Organismus von Mensch und Tier einzudringen.

### 3.2 Verhalten von Veterinärantibiotika in Boden

Das Verhalten der Veterinärantibiotika und ihre Wechselwirkungen mit dem Boden sind abhängig von den spezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften der eingesetzten Antibiotika sowie den Bedingungen des hochkomplexen Systems Boden in Zusammenhang mit Umwelteinflüssen. Da nicht alle Faktoren im Hinblick auf die Wechselwirkungen berücksichtigt werden können, werden im nachfolgenden beispielhaft allgemeine Prozesse beschrieben, die nach Eintrag von Antibiotika in den Boden ablaufen:

- Chemische abiotische und mikrobielle biotische Abbauprozesse

In Boden gelangte Antibiotika unterliegen in Abhängigkeit von der Bodenbeschaffenheit zahlreichen Ab- und Umbauprozessen (chemischer und mikrobieller Abbau) [206, 207]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Antibiotika, die an der Bodenoberfläche sorbiert sind, durch Sonneneinstrahlung photochemisch abgebaut werden [208].

- Reversible und irreversible Sorption an Bodenbestandteile

Antibiotika können sich an die Bodenmatrix binden, wobei zwischen reversibler und irreversibler Sorption unterschieden wird. Anhand der stoffabhängigen Sorptionsneigung (ausgedrückt in Adsorptionskoeffizienten an die Bodenmatrix ( $K_f$ ), vgl. Tabelle 9) kann ein Stoff als mobil oder immobil klassifiziert werden. Hiernach werden Tetracyclin, Chlortetracyclin und Fluorchinolone, wie Enrofloxacin und Ciprofloxacin (Strukturformeln s. Kapitel 4), als immobil eingestuft. Im Vergleich dazu hat Sulfadiazin einen Adsorptionskoeffizienten ( $K_f$ ) zwischen 2,0 und 2,5 mL/g und wird als mobil klassifiziert. Monensin weist mit einem  $K_f$ -Wert von 5-50 mL/g eine mittlere Sorptionsneigung auf. Experimente haben jedoch gezeigt, dass unter bestimmten Umständen, z.B. beim Abbau der Huminstoffe, die irreversibel gebundenen Substanzen wieder remobilisiert werden können [3, 208 - 214].

Tabelle 9: Adsorptionskoeffizienten  $K_f$  für die eingesetzten Antibiotika

Wirkstoff	$K_f$ (mL/g)	Literatur
Sulfadiazin	2-2,5	[192]
Tetracyclin	>400-1.620	[192, 214]
Chlortetracyclin	282-2.608	[214]
Enrofloxacin	260-6.310 260-5.612 (Lehm/ lehmiger Sand)	[214] [192]
Ciprofloxacin	430 417	[214] [213]
Amoxicillin	1,06	[215]
Monensin	5-50	[216]

Der Streubereich der  $K_f$ -Werte resultiert aus der unterschiedlichen Bodenzusammensetzung und dem unterschiedlichen pH-Wert des Bodens. Dieser hat wiederum Einfluss auf die chemische Form des Antibiotikums (kationisch, zwitterionisch, anionisch). So zeigten Untersuchungen, gemessen in verschiedenen Böden, dass TC in kationischen und zwitterionischen Formen einen höheren Sorptionsgrad an die Bodenmatrix aufweisen als anionische [213].

- Persistenz und Akkumulation im Boden

Insbesondere als persistent eingestufte Antibiotika, wie die Tetracycline, können in der Bodenschicht mehrere Jahre verbleiben und akkumulieren [217, 218]. Zudem können Fluorchinolonrückstände im Boden persistieren [192, 219].

- Sequestrierung nicht extrahierbarer Rückstände

Nicht extrahierbare Rückstände sind irreversibel gebunden und können daher mit organischen und wässrigen Lösungsmitteln nicht aus der Bodenmatrix extrahiert werden. Die Entstehung nicht extrahierbarer Rückstände beruht auf adsorptive Prozesse. Dazu zählen kovalente Bindungen an Huminstoffe, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Bindungen [220]. Gelangen Xenobiotika, wie z.B. Antibiotika, in die Hohlräume organischer Bodensubstanzen, die eine adsorptiv wirksame innere Oberfläche besitzen, so werden diese dort eingekapselt und zurückgehalten. Dieser Prozess wird als "Sequestrierung" bezeichnet und wurde bereits bei Herbiziden und auch für Antibiotika nachgewiesen [220-223]. Infolge der Sequestrierung gelangen diese Antibiotika nicht in tiefere Bodenregionen und nur zu geringen Anteilen ins Bodenwasser, was ihre biologische Wirksamkeit, ihren mikrobiellen Abbau und eine Aufnahme in die Pflanzen stark beschränkt.

Derzeit existieren auf internationaler Ebene keine gültigen Grenzwerte für Veterinärantibiotikarückstände im Boden, jedoch hat die EMEA-Leitlinie ("Environmental

risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products“ (EMA/CVMP/055/96-FINAL)) einen Schwellenwert (Phase 1) von 0,1 mg/kg für Rückstände von Veterinärarzneimitteln im Boden festgelegt (Neufassung: CVMP/VICH/592/98-FINAL) [224].

### **3.3 Eintragspfade von Veterinärantibiotika in Pflanzen**

Für die Aufnahme von Antibiotika in die Pflanze gibt es prinzipiell zwei Eintragspfade [225-228]:

- Eintrag über den Verschmutzungspfad:

Bei diesem Pfad handelt es sich um eine bodennahe Oberflächenkontamination der Pflanzenabschnitte mit Veterinärantibiotika, die eventuell an Partikel aus dem Boden gebunden sind. So kann durch antibiotikakontaminiertem Wirtschaftsdünger, der an der Oberfläche der Pflanze haftet, ein Eintrag in die Pflanze erfolgen. Ebenfalls können auf diesem Weg antibiotikahaltige Stallstäube für einen Eintrag sorgen.

- Eintrag über den systemischen Pfad:

Der systemische Pfad beschreibt den Transport von Veterinärantibiotika aus dem Boden bzw. aus dem Bodenwasser über die Wurzel in die Pflanze [229]. Dazu müssen die Antibiotika mobil sein und sich im Bodenwasser befinden, das in direktem Kontakt mit der Pflanzenwurzel steht. So könnten Antibiotika über Wirtschaftsdünger und Boden in die Bodenlösung gelangen und von dort aus über die Pflanzenwurzel in die Pflanze transportiert werden. Dieser Pfad der Antibiotikaaufnahme in die Pflanzen ist von besonderer Relevanz, da die Antibiotika hauptsächlich über die Pflanzenwurzel eindringen [239].

#### **3.3.1 Morphologie und Physiologie der pflanzlichen Wurzel**

Die Wurzel ist neben Sprossachse und Blatt eines der drei Grundorgane der höheren Pflanzen (Kormus). Die Aufgaben der Wurzeln bestehen in der Aufnahme von Wasser und den darin gelösten Mineralstoffen, der Befestigung der Pflanze an ihrem Standort und der Speicherung von Reservestoffen. Wurzeln (s. Abbildung 5) besitzen an ihrer Wurzelspitze teilungsfähiges Bildungsgewebe, das sogenannte Meristem, das die Keimwurzel verlängert und senkrecht in den Boden wächst (Primärwurzel). Das Meristem ist durch die Wurzelhaube (Calyptra), bestehend aus parenchymatischen Zellen, geschützt. Die äußere Fläche der Wurzel bildet die Rhizodermis. Die nach innen an die

Rhizodermis anschließende Zellschicht wird als hypodermale Zellschicht bezeichnet. Unter ihr befindet sich das Rindenparenchym. Die innerste Rindenschicht, auch Endodermis bezeichnet, besteht aus fest aneinandergefügten Zellen, deren radiale Zellwände casparysche Streifen tragen. An die Endodermis schließt sich die äußerste, auch Perikambium genannte, Zellschicht des Zentralzylinders an. Im Zentralzylinder befinden sich die Transportelemente Xylem und Phloem. Das Xylem ist verantwortlich für den Transport von Wasser und Nährsalzen, das Phloem für die in den Blättern durch Photosynthese gebildeten Assimilate [230-232].

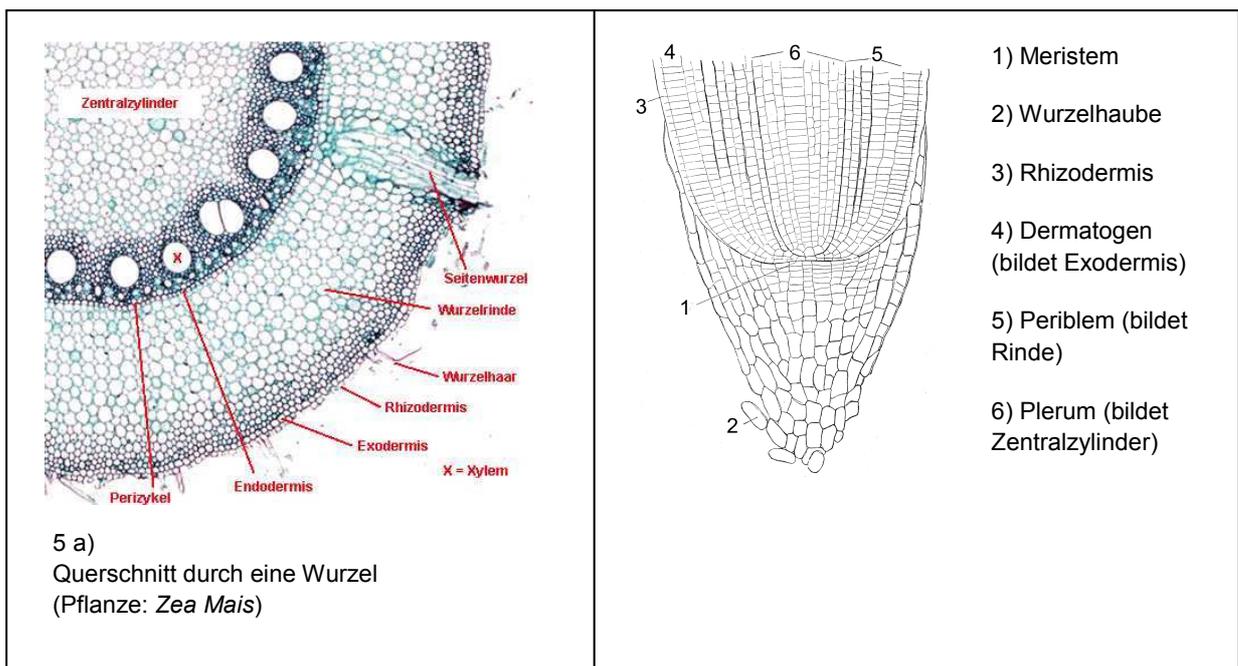


Abbildung 5: Morphologie der Pflanzenwurzel (Abb. a: [232], Abb. b: verändert nach [354])

Der von den Wurzeln beeinflusste Bereich des Bodens (3 mm Abstand von der Wurzel) wird als Rhizosphäre bezeichnet, der in drei Zonen unterteilt wird [233, 234]:

- **Zone 1:** Ectorhizosphäre ist der Teil des Bodens, der die Pflanze direkt umgibt. Dazu gehören die Wurzelhaube, der Schleim, der die Wurzel umgibt sowie abgestreifte Wurzelkappenzellen.
- **Zone 2:** Rhizoplane, die die Wurzeloberfläche darstellt.
- **Zone 3:** Endorhizosphäre beinhaltet den Wurzelstiel mit der Endo- und Epidermis, die Cortex (s. Abbildung 6) und die Wurzelkappe. Diese Zone kann von Bakterien besiedelt werden.

Die gegenseitige Beeinflussung des Bodens, der Pflanzenwurzeln und der Organismen bestimmen die Bedingungen in der Rhizosphäre, wobei die Wechselwirkungen von Rhizosphären-Mikroorganismen und Pflanzen fördernd, neutral oder schädlich für die

Pflanze sein können. So spielt die Rhizosphäre eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit von Veterinärantibiotika bei Pflanzen, wenn sie über die Wurzeln, d.h. über den systemischen Pfad, aufgenommen werden. Die Stoffaufnahme durch die Wurzel erfolgt an der Wurzelspitze der Rhizodermis. Durch die Ausbildung von Wurzelhaaren verfügt die Wurzel über eine größere Oberfläche, was die Stoffaufnahme begünstigt. Die Bodenlösung und darin gelöste Stoffe werden weiter durch das Rindenparenchym transportiert, bis sie die innere Rindenschicht, die Endodermis, erreicht. Die Endodermis umhüllt den Zentralzylinder, der das Phloem und Xylem enthält. Das Xylem nimmt das Wasser und die darin gelösten Stoffe auf und transportiert diesen Xylemsaft weiter in Richtung Sprossspitze.

Der Transport der Bodenlösung und der darin enthaltenen Veterinärantibiotika über die Pflanzenwurzel geschieht prinzipiell nach drei verschiedenen Stoffaufnahmewegen (s. Abbildung 6): Apoplastischer, symplastischer und transzellulärer Weg [229, 233-235]:

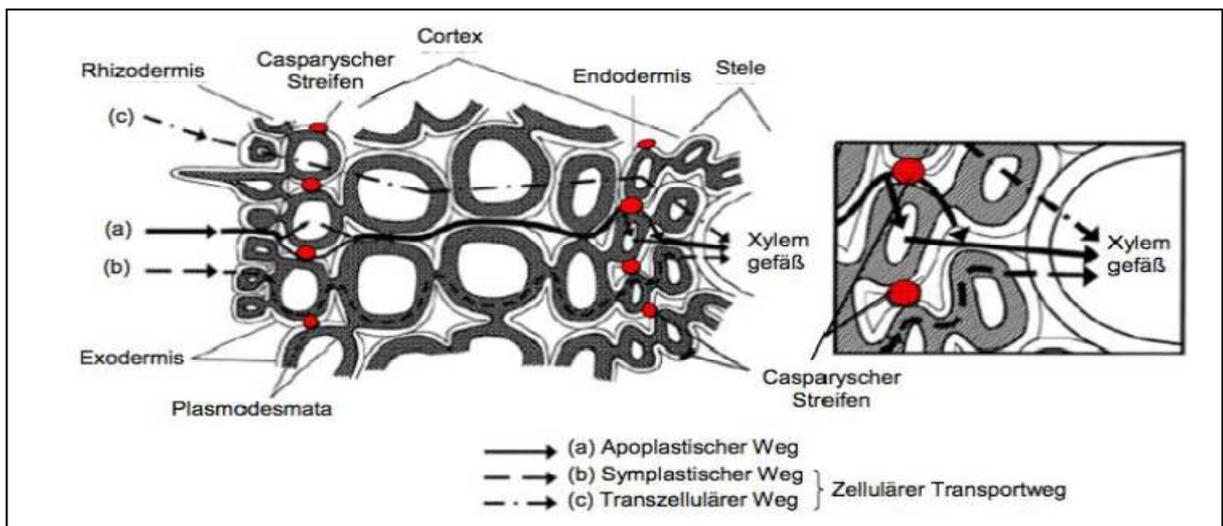


Abbildung 6: Aufnahmewege von Xenobiotika (Veterinärantibiotika) über die Wurzel in schematischer Darstellung [235]

- Apoplastischer Aufnahmeweg:

Die Aufnahme der Xenobiotika (fremde Stoffe in natürlichen Ökosystemen, wie z.B. Veterinärantibiotika) erfolgt durch Diffusion. Hierbei erfolgt eine passive Aufnahme in die Zellwände der Wurzelhaare und in die Wurzelrindenzellen, auch Apoplast genannt. Voraussetzung hierfür ist zum einen, dass die Xenobiotika in einer mobilen Form in der Bodenlösung vorliegen und zum anderen, dass eine Konzentrationsdifferenz der Substanz zwischen Bodenlösung und der Lösung im Apoplast vorherrscht. Infolge dessen ist ein Einströmen der Xenobiotika als passive Diffusion in den Apoplast und weiter in das Symplast möglich.

- Symplastischer Aufnahmeweg:

Der symplastische Aufnahmeweg beschreibt den Übergang über Plasmodesmen. Dabei handelt es sich um dünne Plasmastränge, die durch die Zellwand einer Pflanzenzelle eine Verbindung zur Nachbarzelle schaffen.

- Transzellulärer Aufnahmeweg:

Bei dem transzellulären Aufnahmeweg handelt es sich, wie der Name es besagt, um einen Transport der Xenobiotika von Zelle zu Zelle, wobei auch die Vakuolen passiert werden.

Alle drei Aufnahmewege sind für Xenobiotika von Bedeutung, um die Endodermis zu erreichen. Die Endodermis enthält eine wasserabweisende Inkrustation in der Zellwand, den Casparyschen Streifen, der den apoplastischen Transport unterbricht. Diese Transportsperre ermöglicht der Pflanze eine selektive Stoffaufnahme. Bei einigen Pflanzen befindet sich der Casparysche Streifen bereits in der Exodermis, sodass bereits dort eine Barriere für den apoplastischen Transport besteht [231, 235].

### **3.3.2 Pflanzenverfügbarkeit - Aufnahmemodelle**

Die Pflanzenverfügbarkeit ist eine Messgröße, die die Verfügbarkeit der Nährstoffe für Pflanzen festsetzt [238]. Sie ist gegeben bei mobilen Substanzen, die in wasserlöslicher Form in der Bodenlösung vorhanden sind, jedoch auch für austauschbare, reversibel an Bodenpartikel sorbierte Substanzen. Liegen Substanzen in immobilisierter Form vor oder sind irreversibel an Bodenpartikel gebunden, so sind sie für die Pflanzen nicht verfügbar. Die Pflanzenverfügbarkeit für ein Antibiotikum im Boden hängt nach Rein [239] von vielen Einflussfaktoren ab, u.a. von bodenbedingten Faktoren, der Pflanzenart, den Eigenschaften der Antibiotika und den Witterungsverhältnissen. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein dynamisches Pflanzenaufnahme-Modell mit Transport über Xylem und Phloem in weitere Pflanzenorgane (s. Abbildung 7):

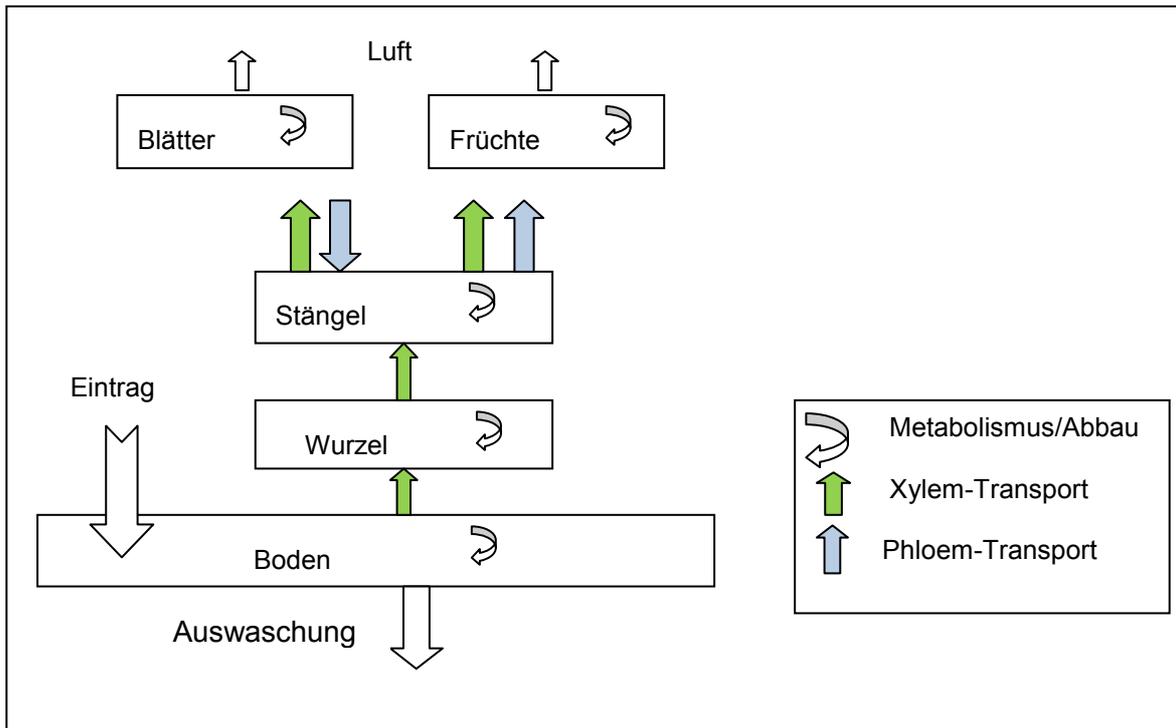


Abbildung 7: Dynamisches Pflanzenaufnahme-Modell in Anlehnung an [239]

- Bodenbedingte Faktoren

Als bodenbedingte Faktoren sind anzuführen: Bodenart (Sand-, Lehm-, Schluffboden), Humusanteil und Gehalt an Tonmineralien, pH-Wert, Belastungsgrad durch vorhandene Xenobiotika (vgl. Kapitel 3.2). Antibiotika können im Boden biochemisch abgebaut werden (Mineralisierung) oder an der Bodenmatrix sorbieren. In diesen Fällen sind die Antibiotika für die Pflanze entweder schwer bzw. nicht verfügbar. Bei der Sorption unterscheidet man zwischen einer Anlagerung an Bodenpartikel (Adsorption) und der Aufnahme in organische Bestandteile des Bodens (Absorption) [208]. Sorptionen an Bodenbestandteile erfolgen über Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, hydrophobe Bindungen, Wasserstoffbrücken-bindungen, kovalente Bindungen oder durch Ionenaustausch [240]. Adsorbierte Wirkstoffe können sich jedoch beim Abbau von Huminstoffen remobilisieren und damit wieder pflanzenverfügbar werden [241].

- Physikalisch-chemische Eigenschaften von Antibiotika

Die physiko-chemischen Eigenschaften eines Antibiotikums sind für die Abschätzung eines Aufnahmevermögens in die Pflanze nach Trapp [242] entscheidend. Dazu zählen die Parameter: Lipophilie (Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient,  $\log K_{OW}$ ), Verdampfungstendenz (Luft/Wasser-Verteilungskoeffizient,  $\log K_{AW}$ ), Säurekonstante ( $pK_a$ ) und pH-Wert. So gelten stark lipophile Substanzen als nicht pflanzenverfügbar, da sie besonders stark an organische Partikel sorbieren. Ebenfalls sind hydrophile Antibiotika sehr gering pflanzenverfügbar, da sie die Zellmembranen der Wurzelzellen nicht bzw. nur

mit Hilfe von speziellen Transportproteinen passieren können [231]. Die größte Pflanzenverfügbarkeit besteht folglich für mittel-lipophile Substanzen [243]. Somit dient der Verteilungskoeffizient  $\log K_{OW}$  als Maß für die Pflanzenverfügbarkeit. Gemäß Schnoor et al. [244] ist die effektive Pflanzenaufnahme von Stoffen mit einem  $\log K_{OW}$ -Wert zwischen 0,5 und 3,0 gegeben. Substanzen mit einem  $\log K_{OW}$ -Wert  $> 3$  werden zu fest an der Wurzeloberfläche gebunden und können nur schwer in die Pflanze aufgenommen werden. Die  $\log K_{OW}$ -Werte der eingesetzten Antibiotika sind mittels Spezialsoftware "ACD/log P v.6.02" [245] berechenbar (s. Anhang A. 1.5).

- Witterungsverhältnisse

Witterungsverhältnisse beeinflussen ebenfalls die Pflanzenverfügbarkeit. So können Stark- oder Platzregen, wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, einen "Run-Off" der Antibiotika bewirken und sind somit nicht mehr für die Pflanze verfügbar [193]. Ebenfalls reduziert ein vertikaler Transport der Antibiotika in tiefere Bodenschichten die Pflanzenverfügbarkeit, da die Antibiotika nicht mehr in direkter Reichweite zur Pflanzenwurzel stehen. Sonnenstrahlen können auch einen Einfluss auf die Pflanzenverfügbarkeit haben, da sie einen photochemischen Abbau der Antibiotika an der Bodenoberfläche bewirken [355].

- Pflanzenart

Das Aufnahmepotential für Antibiotika ist abhängig von der Pflanzenart und kann nicht grundsätzlich auf alle Pflanzenarten übertragen werden (Stellungnahme BfR) [39]. So gibt es Pflanzen, die als "Starkzehrer" bezeichnet werden und viele Nährstoffe aus dem Boden ziehen, wie es auch "Schwachzehrer" gibt. Es kann vermutet werden, dass die Aufnahme von Antibiotika durch "Starkzehrer" größer ist als durch "Schwachzehrer", wenn eine Korrelation zwischen Nährstoff- und Antibiotikaaufnahme besteht. Des Weiteren besitzen Pflanzen unterschiedliche Entgiftungs- bzw. Abbaureaktionswege von Xenobiotika [227], wie im folgenden Kapitel beschrieben.

### 3.3.3 Metabolismus in Pflanzen

Gelangen Xenobiotika in die pflanzliche Zelle, so werden diese von den Pflanzen durch Aktivierungs- und Deaktivierungsreaktionen umgewandelt und durch enzymatische Reaktionen aktiviert [227, 246, 247]. Diese Aktivierung des Moleküls führt dazu, dass funktionelle Gruppen des Xenobiotikamoleküls (z.B. Hydroxyl-, und Aminogruppen) für eine nachfolgende Konjugation mit pflanzlichen Inhaltsstoffen wie Glutathion, Carbonsäuren, verschiedenen Zuckern oder Aminosäuren vorhanden sind (Mögliche Konjugationsreaktionen, s. Tabelle 10). Nach der Konjugation erfolgen

Kompartimentierungs- und Speicherprozesse. Bei dem pflanzlichen Metabolismus handelt es sich um ein sehr komplexes Geschehen, was vereinfacht in einem dreiphasigen Reaktionsschema abgebildet werden kann (s. Abbildung 8) [227]:

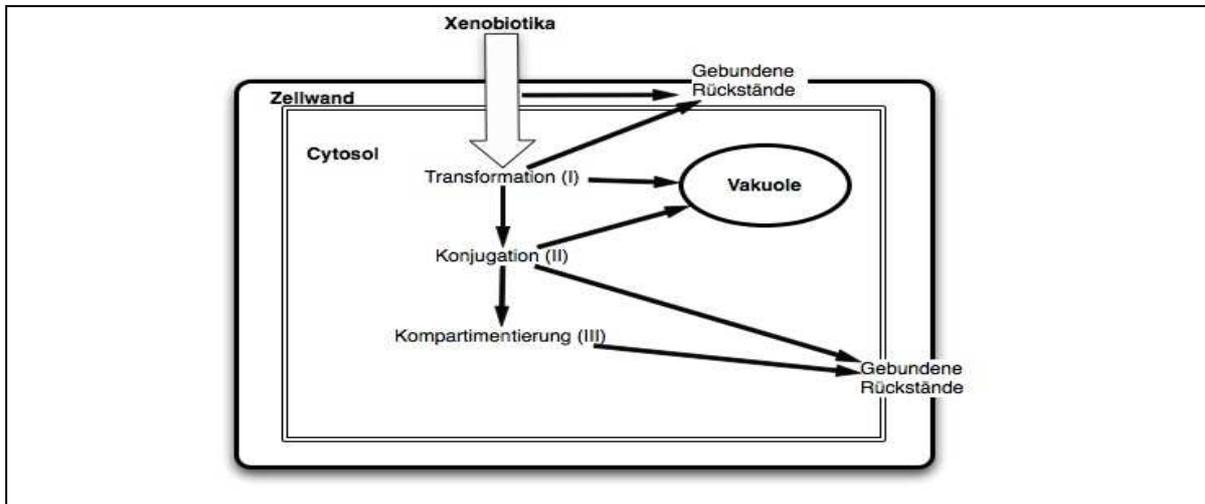


Abbildung 8: Metabolismus von Xenobiotika in pflanzlichen Zellen in Anlehnung an Breuer [227]

Die drei Phasen bestehen aus stufenweisen Transformations-, Konjugations- und Kompartimentierungsreaktionen, die im Folgenden erläutert werden:

- Phase I: Transformationsreaktionen:

Zu den Reaktionen der Phase I zählen Isomerisierungen, Reduktionen, Oxidationen und Hydrolysen. Die transformierten Metabolite weisen eine erhöhte Polarität, eine gesteigerte Aktivität für weitere Reaktionsschritte und eine geringere Mobilität auf.

- Phase II: Konjugationsreaktionen

Die Phase I- Metabolite werden durch Konjugation (s. Tabelle 10) zu löslichen Phase II- Metaboliten umgesetzt. Aufgrund der Konjugation mit pflanzeigenen Inhaltsstoffen (z.B. Glukose, Glutathion, Aminosäuren) geht die ursprüngliche Phytotoxizität der Xenobiotika verloren. Des Weiteren wird die Mobilität in der Pflanze eingeschränkt.

Tabelle 10: Häufige Konjugationsreaktionen zwischen Xenobiotika und endogenen Pflanzeninhaltsstoffen [248]

Konjugations-Reaktionen	Endogene Konjugations-substanz	Funktionsgruppen der Xenobiotika	Verantwortliche Enzyme
Methylierung	S-Adenosyl-Methionin	-NH <sub>2</sub> , =NH, -SH, -OH	O-Methyltransferase
Acetylierung	Acetyl-SCoA	-NH <sub>2</sub> (in Aminen, Hydrazinen, Aminosäuren)	Arylamin-N-Acetyltransferase
Glucose-Konjugation	Uridindiphosphat (UDP)-Glucose	-OH, -NH <sub>2</sub> , -SH	O-/N-/S-Glucosyltransferase
GSH-Konjugation	Glutathion	Substitution von Halogeniden, -NO <sub>2</sub> , Addition an Epoxide / Alkene	Glutathion-S-Transferase (GST)

\*GSH: Glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) ist ein Tripeptid aus L-Glutamat, Glycin und L-Cystein [249]

- Phase III: Kompartimentierungsreaktionen

In der Phase III werden die Phase II- Metabolite in bestimmte pflanzliche Kompartimente transportiert und dort abgelagert. So werden u.a. die  $\beta$ -D-Glucoside und insbesondere die Glutathion-Konjugate verschiedener Xenobiotika in der großen Zellvakuole der pflanzlichen Zelle, im extrazellulären Raum oder in der Zellwandmatrix, als sogenannte "gebundene Rückstände", gespeichert (intra- und extracytoplasmatische Speicherung). Annahmen zur Folge handelt es sich hierbei in den meisten Fällen um eine irreversible Ablagerung bzw. Speicherung der metabolisierten Xenobiotika [250]. Die Detoxifikation besteht darin, dass die cytosolischen pflanzlichen Enzyme nicht mehr in Kontakt zu der phytotoxischen Ausgangssubstanz treten können, um diese wieder zu remobilisieren.

Der allgemeine Metabolismus in Pflanzen gilt auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten verzehrstarken Pflanzen: Rotkohl und Möhren. Das folgende Kapitel beinhaltet Anbauflächen und Ertrag, sowie die botanischen Charakterisierungen beider Gemüsepflanzen.

### 3.4 Rotkohl und Möhren als Versuchspflanzen

#### 3.4.1 Anbaufläche und Ertrag in Deutschland

Das Statistische Bundesamt in Wiesbaden hat für das Jahr 2010 Daten zu Gemüseanbauflächen erhoben [251]. Aus diesen Angaben lassen sich relativen Verhältnisse zwischen der Gesamtgemüseanbaufläche zu den Anbauflächen von Kohlgemüse (z.B. Rotkohl) und Knollengemüse (z.B. Möhren) ermitteln (s. Tabelle 11). Demnach wurden ca. 20 % der Gesamtgemüseanbaufläche für den Anbau von Kohlgemüse und ca. 2 % für Rotkohl benötigt. Im Vergleich zu den Anbauflächen der

verschiedenen Kohlsorten nahm Weißkohl eine maximale Anbaufläche von 29 % ein. Blumenkohl folgte mit 21 %, Rotkohl und Kohlrabi, an dritter Position, mit je 11 % [251]. Die Anbaufläche von Knollengemüse im Verhältnis zum Gesamtgemüseanbau machte ca. 17 % aus, wobei 58 % davon (Knollengemüseanbau) für den Möhrenanbau belegt wurden. Die Anbaufläche für Möhren war um das Fünffache größer als die für Rotkohl.

Tabelle 11: Gemüseanbaufläche von Kohl- und Knollengemüse im Jahr 2010 in Deutschland nach [251]

Gemüseart	Anbaufläche	
	Im Freiland (ha)	Anteil zur Gesamt-Gemüseanbaufläche (%)
<b>Gesamtgemüse</b>	106.186	-
<b>Kohlgemüse</b>	20.992	ca. 20
<b>Rotkohl</b>	2.213	ca. 2
<b>Knollengemüse</b>	17.980	ca. 17
<b>Möhren</b>	10.367	ca. 10

Mit Blick auf die Anbauflächen von Rotkohl und Möhren im Jahr 2010 ist festzustellen, dass der Möhrenanbau in allen Bundesländern den Rotkohlanbau übersteigt (Abbildung 9) [251]. Der intensivste Anbau von Möhren erfolgt in Nordrhein-Westfalen (NRW), Niedersachsen und Rheinland-Pfalz, während die größten Anbauflächen für Rotkohl vor allem in Nordrhein-Westfalen, Bayern und Schleswig-Holstein vorliegen. Beide Gemüsearten werden somit in NRW am meisten (bezogen auf die Anbaufläche) angebaut.

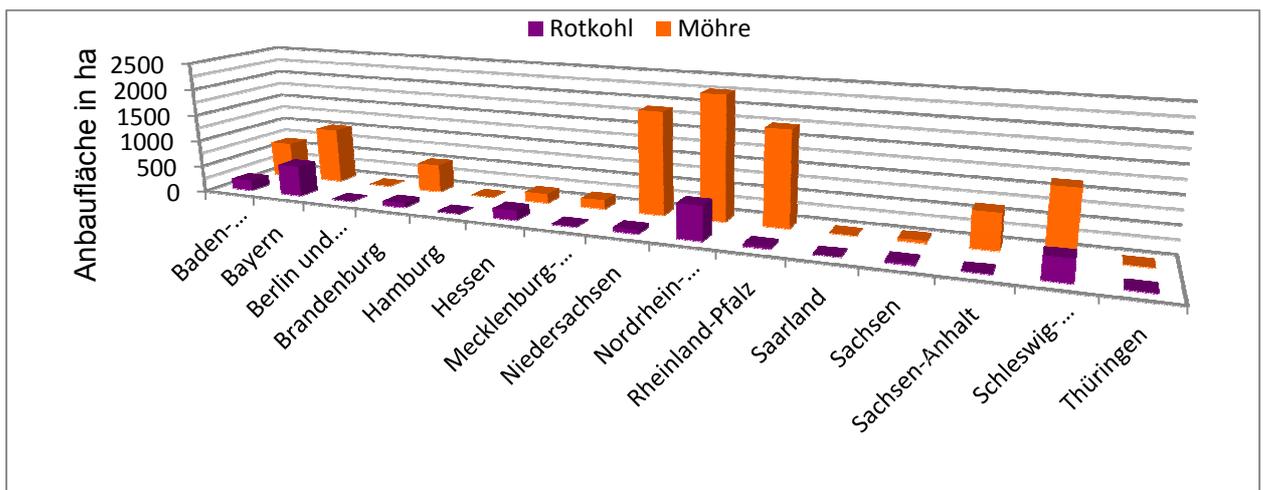


Abbildung 9: Rotkohl- und Möhrenanbaufläche in den Bundesländern (2010), (erstellt nach [251])

Des Weiteren hat das Statistische Bundesamt in Wiesbaden Daten für die Ernteschätzungen (Deutschland, 2010) für Rotkohl und Möhren erhoben. Diese Angaben sind

gegliedert in die Parameter: "Ernte in Fläche (ha)", "Ertrag je ha" sowie "Erntemenge in dt" [252]. Auffallend hierbei ist, dass der Ertrag je ha (dt) von Rotkohl über dem von Möhren liegt.

Tabelle 12: Ernte-Schätzungen für Rotkohl und Möhren, Deutschland 2010 [252]

Ernte-Schätzungen (2010)	Rotkohl	Möhren
Ernte in Fläche (ha)	2.213	10.367
Ertrag je ha (dt)	599,1	534,3
Erntemenge (dt)	1.325.899	5.539.718

### 3.4.2 Botanische Charakterisierung

#### Rotkohl

Unter allen Blattgemüsen sind die Kopf- und Blattkohle nach den Tomaten die weltweit wichtigsten Gemüsepflanzen (s. Tabelle 13) [253].

Tabelle 13: Produktionsmengen von Gemüse- und Salatarten in der weltweiten Produktion im Jahr 2004 [253]

Gemüse oder Salat	Produktion in Mio. t/Jahr (2004)
Tomaten	124,4
Kohlsorten ( <i>Brassica oleracea ohne conv. botrytis</i> )	68,1
Zwiebeln und Scharlotten	56,9
Gurken	40,9
Auberginen	30,1
Gemüsepaprika	24,7
Möhren	24,5

Die Erscheinungsformen der Kohlsorten sind unterschiedlich, dennoch gehören alle europäischen Sorten einer einzigen Art, der "*Brassica oleraceae L.*" an [253].

Rotkohl, auch "*Brassica oleracea convar. capitata var. capitata f. rubra*" genannt, ist eine Ableitung der Wildart "*Brassica oleracea ssp. oleracea*", die in den Mittelmeerländern und an der atlantischen Westküste Europas bis nach Südengland beheimatet ist. Der Kohlanbau begann im 4. Jh. v. Chr. in Griechenland und Italien, wobei der Anbau von Kopfkohl nördlich der Alpen seit dem 12. Jahrhundert dokumentiert ist [253].

Bei Rotkohl handelt es sich um "Bienn-hapaxanthe Rosettenpflanzen" mit gestauchten Achsen und breiten, sich nicht entfaltenden Blättern. Rosettenpflanzen sind Pflanzen, bei denen die Stängelinternodien (Spross) gestauht bleiben, sodass die Blätter in Form einer dichten Rosette angeordnet sind (s. Abbildung 9). Der Strunk ist aufgrund eines medullären primären Dickenwachstums verdickt. Die Köpfe des Rotkohls sind fest umschlossen.

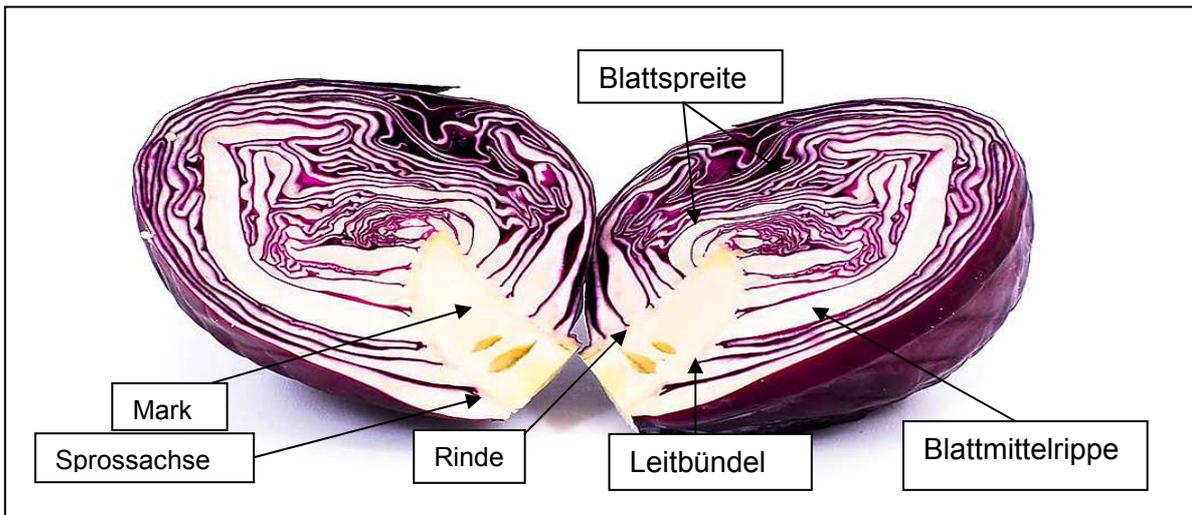


Abbildung 9: Rotkohl im Längsschnitt [253] (Foto Lit. [356])

Rotkohl, wie alle Kohlsorten, sind zweijährige Pflanzen. Er bildet im zweiten Jahr unter Auflösen der Rosetten eine "Infloreszenz" (Sproßsysteme im Blütenbereich, die mehrere Blüten tragen) mit gelben Blüten. Er zählt zum Wintergemüse, d.h. die Aussaat erfolgt im Frühjahr und die Ernte im Spätherbst. Die Nährwerte von Rotkohl unterscheiden sich nur gering von Weißkohl (vgl. Tabelle 14) [253].

Tabelle 14: Inhaltsstoffe von Rotkohl-, Weißkohl- und Möhengemüse in 100 g essbarem Anteil [253]

Bestandteile [g]	Rotkohl	Weißkohl	Möhren
<b>Wasser</b>	91,8	90,5	88,2
<b>Eiweiß</b>	1,50	1,37	0,98
<b>Fett</b>	0,18	0,20	0,20
<b>Kohlenhydrate</b>	3,54	4,16	4,80
<b>Ballaststoffe</b>	2,50	2,96	3,63
<b>Mineralstoffe</b>	0,67	0,59	0,86
<b>Vitamine [mg]</b>			
<b>β-Carotin</b>	0,02	0,07	7,8
<b>Vitamin B<sub>1</sub></b>	0,07	0,05	0,069
<b>Vitamin B<sub>2</sub></b>	0,05	0,04	0,053
<b>Vitamin B<sub>3</sub></b>	0,43	0,32	0,58
<b>Vitamin C</b>	50,0	45,2	7,0
<b>Vitamin K<sub>1</sub></b>	0,02	0,08	0,069

Charakteristische Inhaltsstoffe des Rotkohls sind Senfölglykoside, Sinnigrin, Gluconapin und andere, die bei Gewebeerstörung in Senföle gespalten werden [254]. Die Rotfärbung ist bedingt durch Anthocyane, die ein hohes antioxidatives Potential besitzen [253]. Rotkohl ist ein ausgeprägter Starkzehrer, noch ausgeprägter als Weißkohl und

benötigt zum Wachstum sehr viel organischen Stalldung bzw. Stickstoffdünger sowie Wasser [255].

### Möhren

Die Weltproduktion von Möhren beträgt mehr als 20 Mio. Tonnen im Jahr. Sie zählen international betrachtet zu den zehn wichtigsten Gemüsepflanzen [253]. Möhren, "*Daucus carota L. ssp. Sativus*", gehören zur Familie "*Apiaceae*". In Mitteleuropa kommt die Möhre als Wildpflanze vor. Diese bildet eine relativ dünne, weißliche, verholzende Pfahlwurzel aus. Die hier beheimateten Gartenmöhren, so wird angenommen, sind aus einer Kreuzung der wilden Möhre mit der im Mittelmeergebiet anzutreffenden Riesenmöhre "*Daucus maximus*" entstanden [253]. Die aus dieser Kreuzung entstandene Rübe ist gelb bis orangerot und fleischig verdickt. Die Möhre ist eine zweijährige Pflanze, die im ersten Jahr eine Rosette aus doppelt bis dreifach gefiederten Blättern erzeugt und die Assimilate in der fleischigen Bastrübe speichert. Die Bastrübe besteht aus einem kurzen Hypokotylabschnitt und der Hauptwurzel. Ihre Erstarkung beruht auf einem kambialen sekundären Dickenwachstum. Morphologisch wird zwischen dem härteren zentralen Holzteil, auch "Herz" genannt, und dem zarteren Bast unterschieden (s. Abbildung 10) [253].

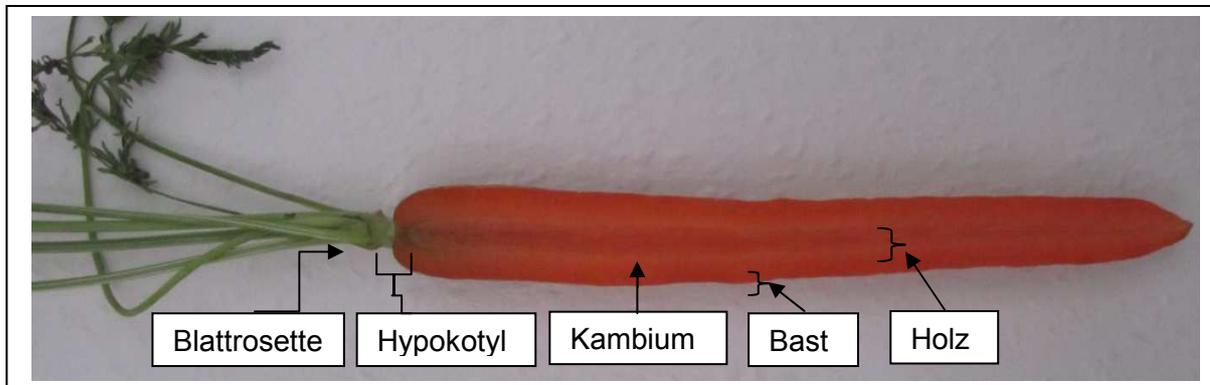


Abbildung 10: Längsschnitt einer Möhrenrübe, in Anlehnung an [253] (Foto: F. Chowdhury)

Zu Speisezwecken wird die Möhrenrübe im ersten Jahr geerntet. Ohne Ernte wächst der Sproß im zweiten Jahr unter Auflösung der Rosette zu einem mehrfach verzweigten beblätterten Infloreszenzspross unter Verbrauch der in der Rübe gespeicherten Stoffe empor.

Die Nährwerte der Möhre (Mittelwerte) sind in Tabelle 14 zusammengefasst, wobei als besonders wertgebende Bestandteile, mit 7,8 mg/100 g, die  $\beta$ -Carotinoide zu nennen sind, die eine Quelle für Provitamin A darstellen. Bis Ende der 1940er Jahre wurden Möhren auch angebaut, um  $\beta$ -Carotin zu extrahieren, welches mittlerweile für die Lebensmittelindustrie in technischem Maßstab synthetisiert wird [253].

Im Vergleich zu den Kohlsorten haben Möhren, die sandigen humusreichen Boden bevorzugen, einen geringeren Düngebedarf [256]. Jedoch zeigten Versuchsreihen landwirtschaftlicher Forschungsinstitute, dass Mistdüngung (u.a. Rottemist, d.h. Stallmist mit hohem Strohanteil, Rottezeit: 3 Monate) kombiniert mit Gülle bei Möhren zu einer längeren Haltbarkeit führen [381]. Der Zeitraum der Aussaat kann, abhängig vom Möhrentyp, von April bis Juni sein. Die Erntezeit ist von Juli bis Mitte November [253].

## 4 Eigenschaften der eingesetzten Veterinärantibiotikaklassen

### 4.1 Tetracycline

Tetracycline zählen seit der Entdeckung im Jahre 1944 zu den in der Therapie von Infektionskrankheiten am häufigsten eingesetzten Veterinärantibiotika [258]. Dabei dominieren die natürlichen und partialsynthetischen Tetracycline. Dahingegen haben sich totalsynthetische Tetracycline, wie das Anhydro-Chlortetracyclin, aufgrund des vergleichsmäßig hohen Aufwandes bei der industriellen Herstellung nicht durchgesetzt [7], [259, 260]. Jedoch wird der totalsynthetisch hergestellte Wirkstoff Thiatetracyclin gegen tetracyclinresistente Bakterien eingesetzt, da er eine höhere Wirksamkeit aufweist [258]. Zu den natürlich vorkommenden Tetracyclinen, gewonnen aus Streptomyceten, zählen das Chlortetracyclin, welches als erstes aus der Wirkstoffgruppe der Tetracycline entdeckt wurde, sowie das Tetracyclin und das Oxytetracyclin. Diese sind Produkte von Streptomyceten der Arten *S.aureofaciens* und *S. rimosus*. Neben den natürlichen Tetracyclinen sind sehr viele partialsynthetische Tetracyclinderivate bekannt, wobei zur veterinärmedizinischen Anwendung Tetracyclin, Chlortetra-, Oxytetracyclin und Doxycyclin eingesetzt werden [63].

#### *Struktur, physikalische und chemische Eigenschaften der Tetracycline*

Die chemische Grundstruktur der Tetracycline besteht aus vier linear kondensierten Sechseringen, dem so genannten Naphthacen-Grundgerüst [7, 261, 262]. Die verschiedenen Derivate unterscheiden sich lediglich in ihren Substituenten ( $R_1$ - $R_4$ ) an den Positionen 5, 6 und 7 (vgl. Abbildung 12).

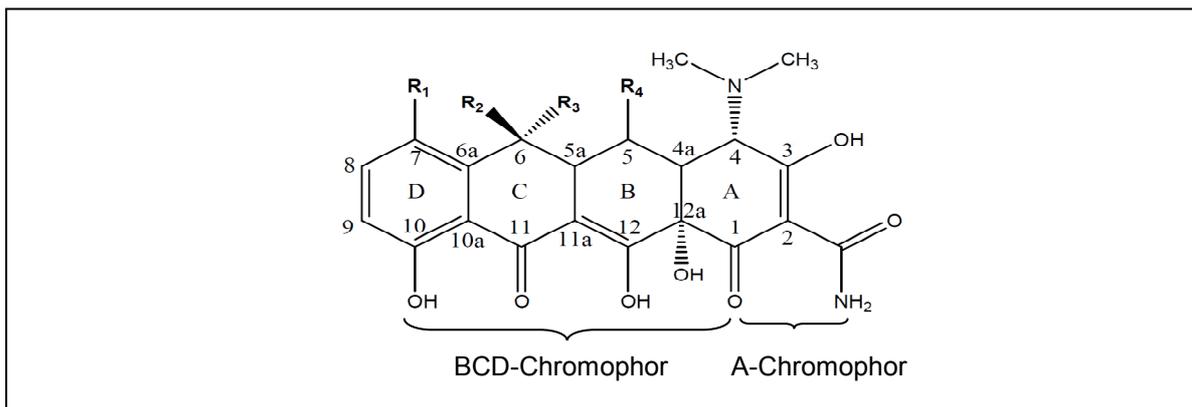


Abbildung 12: Naphthacen-Grundgerüst von Tetracyclin-Wirkstoffen [261, 262]

Der Grundkörper der Tetracycline wird in zwei chromophore Bereiche, A und BCD, unterteilt. Der A-Chromophor absorbiert bei 260 nm. Der BCD-Chromophor besitzt Absorptionsmaxima bei 225, 285, 320 und 360 nm [263, 264]. Die antibiotische Wirksamkeit ist durch die lineare Anordnung der vier Ringe und die beiden chromophoren

Keto-Enol-Systeme im Ring A und den Ringen BCD gegeben. Somit sind alle Derivate, die aus weniger als vier Ringen bestehen, antibiotisch wirkungslos [258]. Durch Substitution des Naphthacen-Grundgerüsts entstehen die verschiedenen Tetracycline. Die nachfolgende Tabelle 15 zeigt die für den Markt zugelassenen Veterinärantibiotika der Wirkstoffklasse der Tetracycline mit ihren dazugehörigen Substituenten.

Tabelle 15: Substituenten zugelassener Tetracycline für veterinärmedizinische Anwendungen [261, 262] (vgl. Abbildung 12)

Substanz	Abkürzung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>Tetracyclin</b>	TC	H	OH	CH <sub>3</sub>	H
<b>Chlortetracyclin</b>	CTC	Cl	OH	CH <sub>3</sub>	H
<b>Oxytetracyclin</b>	OTC	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH
<b>Doxycyclin</b>	DC	H	H	CH <sub>3</sub>	OH

Tetracycline sind gelbe kristalline, geruchlose und lichtempfindliche Substanzen. Die UV-Spektren der Tetracycline sind charakteristisch ( $\lambda_{\max}$  bei 270 und 365 nm [357]) und vom pH-Wert abhängig. Zudem sind sie starke Komplexbildner, d.h. sie bilden Chelate mit mehrwertigen Metallkationen und besitzen eine hohe Affinität zu Silanolgruppen [265, 266]. In Kombination mit Säuren und Basen bilden sie in Wasser lösliche stabile Salze und sind in Alkoholen gut löslich. Die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln hingegen ist sehr gering [262-264]. In wässriger Lösung besitzen die freien Basen der Tetracycline mit ca. 1 mg/L lediglich eine geringe Löslichkeit [262-264], wobei gemäß Sattelberger die Löslichkeit für Tetracyclin-Hydrochlorid in Wasser 50-100 mg/L beträgt [2]. Tetracycline haben aufgrund ihrer sauren Gruppen und dem basischen Dimethylamino-Rest einen amphoteren Charakter. Die vier Säurekonstanten begründen sich durch die OH-Gruppe an Position C-3 als Säure mit einem  $pK_{a1}$ -Wert von 3,3 [262, 267]. Eine zweite Deprotonierung kann an der OH-Gruppe der vinylogenen Carbonsäurestruktur an Position C-12 erfolgen ( $pK_{a2}$ -Wert=7,6). Die basischen Eigenschaften der Tetracycline beruhen auf dem Dimethylamino-Rest an Position C-4, wobei der dritte  $pK_{a3}$ -Wert von 9,7 dem protoniertem Stickstoffatom des Restes zugeordnet wird [241, 268]. Die letzte Säurekonstante  $pK_{a4}$ =12,0 wird der phenolischen OH-Gruppe an Position C-10 zugeordnet [269].

#### *Pharmakodynamik/-kinetik und Indikation*

Tetracycline werden in der Veterinärmedizin gegen bakterielle Infektionen, ausgelöst durch grampositive und gramnegative Bakterien, sowie gegen Mykobakterien, Mykoplasmen, Chlamydien, Rickettsien und große Viren eingesetzt [63]. Die allgemeinen Indikationen beim Tier stellen die Infektionen der Atemwege, des Urogenitalbereichs, des Magen-Darm-Traktes und der Haut dar.

Das Maß für die antimikrobielle Wirksamkeit eines Antibiotikums beschreibt die "minimale Hemmkonzentration", MHK. Sie ist die kleinste Wirkstoffkonzentration einer antimikrobiellen Substanz, welche die Erregervermehrung in der Kultur noch verhindert. Diese MHK-Werte von Tetracyclinen variieren gegenüber veterinärmedizinisch relevanten Erregern und sind speziesabhängig [63]. Als allgemeine Empfindlichkeitsgrenze gilt: 0,5-2 µg/mL.

Die Wirkung der Tetracycline wird durch Inhibition der bakteriellen Proteinsynthese an den Ribosomen der zellwandlosen, grampositiven und gramnegativen Bakterien während des Elongationsschrittes erzeugt [258]. Dabei werden die Tetracycline über die Porin-Proteine in den periplasmatischen Raum (Zellkompartiment zwischen Cytoplasmamembran und äußere Membran Gram-negativer Bakterien) transportiert. In der Bakterienzelle erfolgt die Bindung an die ribosomale 30s-Untereinheit mit einhergehender Inhibition der Bindung der Aminoacyl-t-RNA an die Akzeptorregion der Ribosomen. Durch Hemmung der Proteinsynthese wirken Tetracycline bakteriostatisch, d.h. sie hemmen das Bakterienwachstum [63]. Die biologische Verfügbarkeit von Tetracyclinen für den tierischen Organismus hängt sehr vom Füllungsstand des Magens und der Nahrung ab, da in Abhängigkeit vom Kationengehalt schwerlösliche und kaum resorbierbare Chelate gebildet werden können [63].

#### *Umwandlungs- und Abbaureaktionen*

Die Umwandlungs- und Abbaureaktionen von Tetracyclinen sind abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Tetracyclinsubstituenten, Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert und anderen Bedingungen [152, 263, 270]. Für die Rückstandsanalytik mittels LC/MS sind die Umwandlungs- und Abbaureaktionen von besonderer Wichtigkeit, da gezielt detektiert werden muss. Bei den verschiedenen Umwandlungsreaktionen (s. Anhang A. 1.6) wird zwischen Epimerisierung, Isomerisierung und Keto-Enol-Tautomerie unterschieden, wobei sich lediglich die Konfiguration ändert, aber die Summenformel erhalten bleibt. Durch alkalische Behandlung erfolgt eine Umwandlung der Tetracycline in die iso-Form [7, 271]. Iso-Tetracycline besitzen im alkalischen Milieu eine UV-Absorption im Bereich 320-380 nm [271, 272]. Durch die Isomerisierung der Tetracycline wird die Fluoreszenz verstärkt, sodass die Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der Tetracycline herangezogen werden kann [273, 274]. Zu den Abbaureaktionen zählen unter anderem Dehydratisierungsreaktionen.

## **4.2 Fluorchinolone**

Die Fluorchinolone bilden eine Untergruppe der Chinolone, die ihre antibiotische Wirkung aufgrund der Hemmung des bakteriellen Enzyms Gyrase besitzen. Der Wirkstoff

Nalidixinsäure, als erste patentierte Substanz aus der Gruppe der Chinolone, wird seit 1962 in der Human- und Veterinärtherapie angewendet [63]. Die Struktur der Chinolone wurde durch Einführung von cyclischen, basischen und fluorhaltigen Ringsystemen modifiziert und führte zu einer breiteren antibiotischen Wirksamkeit (s. Abbildung 13). Aufgrund dessen gibt es die Bezeichnung Chinolone der ersten und der zweiten Generation. Zu den Chinolonen der ersten Generation zählen die Gruppen der Naphtyridine, Cinnoline und Pyridopyrimidine [63]. Bei den Fluorchinolonen handelt es sich um Chinolone der zweiten Generation, die aufgrund ihrer ausschließlich synthetischen Herstellung als "Chemotherapeutika" bezeichnet werden. Die Fluorchinolone zeichnen sich vor allem durch ein breiteres Wirkungsspektrum mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften aus, wobei die Resistenzentwicklung bislang im Vergleich zu anderen Antibiotika noch sehr gering ist. Aufgrund ihrer guten Resistenzsituation sollen sie nicht gegen banale Infektionen eingesetzt werden. Sie dienen für Haus- und Nutztiere viel mehr als Reserveantibiotikum bei bakteriellen Infektionen, bei denen die anderen Antibiotika keine therapeutische Besserung bringen. Hierzu zählen Infektionen beim Tier mit intrazellulär gelegenen Keimen sowie Lungen- und tiefe Atemwegsinfektionen, schwer zugängliche Infektionsorte wie Knochen, Knochenmark, Urogenitaltrakt als auch Staphylokokken-Infektionen und Pseudomonadenbekämpfung [63].

Das erste Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorchinolone ist das Norfloxacin, das im Jahre 1984 zum ersten Mal vermarktet wurde [169], [275]. Enro-, Dano-, Nor- und Marbofloxacin zählen in der Veterinärtherapie zu den am häufigsten eingesetzten Fluorchinolonantibiotika. Enrofloxacin ist nicht als Human-, sondern nur als Veterinärantibiotikum zugelassen, wobei der Einsatz für Legehennen ausgenommen ist, um Rückstände in Eier zu vermeiden [212].

#### *Struktur, physikalische und chemische Eigenschaften der Fluorchinolone*

Als gemeinsames Strukturmerkmal besitzen die Verbindungen dieser Wirkstoffgruppe ein 4-Chinolon-Grundgerüst mit Fluorsubstitution in Position 6 der 4-Chinoloncarbonsäure [63]. Zu den Fluorchinolonen zählen die relativ neuen Wirkstoffe, wie Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin und Ofloxacin, die in Position 7 Piperazin-substituiert sind [63].

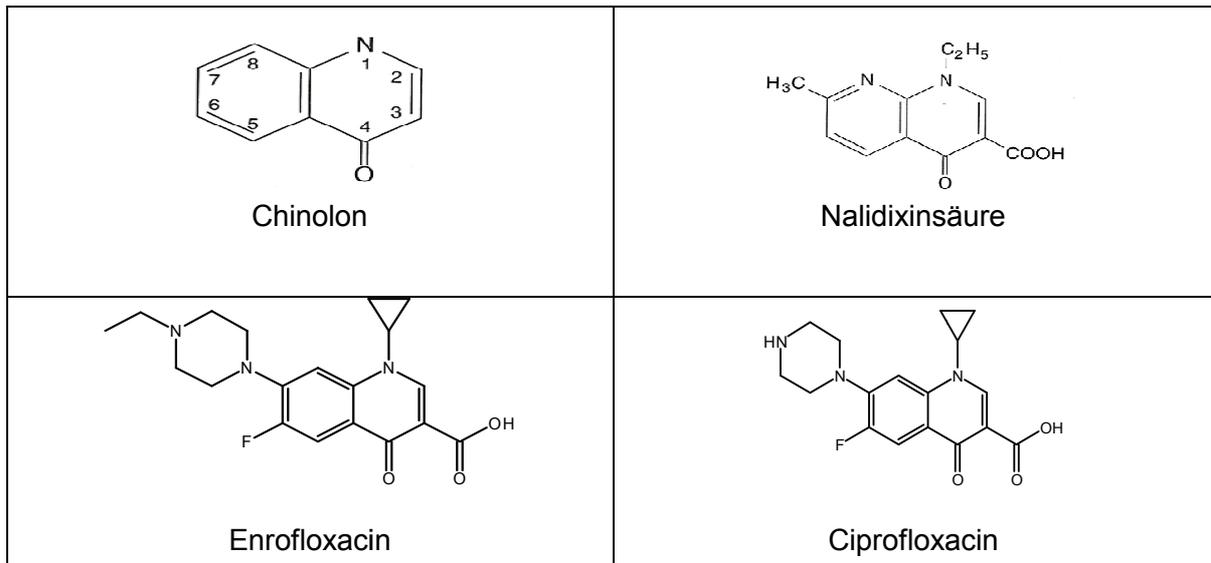


Abbildung 13: Chinolon als Grundgerüst, Nalidixinsäure (erstes Chinolon) und Strukturen von Fluorchinolonen (ENR und CIP) [63]

Bei den Fluorchinolonen handelt es sich um schwach gelbe, kristalline Pulver, die thermostabil und schwach lichtempfindlich sind. Die Löslichkeit im Wasser hängt von dem pH-Wert ab, wobei, aufgrund der Deprotonierung der Säurefunktion, eine größere Löslichkeit in alkalisch wässrigen Lösemitteln vorliegt [276]. Im neutralen Bereich liegen die Fluorchinolone als Zwitterionen vor, die in dieser Form schwer löslich sind. Im Säuren erhöht sich die Löslichkeit aufgrund der Protonierung des tertiären Stickstoffs am Piperazinring. Die zwitterionischen Eigenschaften der Fluorchinolone sind bedingt durch die Carbonsäurefunktion ( $pK_a=5$ ) und eine oder mehrere funktionelle Aminogruppen ( $pK_a=8-9$ ) [277-279].

#### *Pharmakodynamik/-kinetik und Indikation*

Strukturell verantwortlich für die Gyrase-Hemmung ist der Stickstoff in Position 1, die Carboxylgruppe in Position 3 und die Ketogruppe in Position 4 des Chinolons [63].

Fluorchinolone unterscheiden sich von anderen Gyrasehemmern (wie z.B. Cinnoline, Naphtyridine) aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums. Neuere Fluorchinolone sind neben der Gyrase auch gegen andere Bakterien-Enzyme, wie die Topoisomerase IV wirksam. Daher ist die Bezeichnung der Fluorchinolone als Gyrasehemmer veraltet und international unüblich [280]. Die Aufgabe der Gyrase besteht in der Spiralisierung der DNA-Doppelhelix ("supercoiling") bei Bakterien. Durch ihre Hemmung wird diese Spiralbildung unterlassen, d.h. der Wiederverschluss der DNA-Stränge wird gehemmt. Die Chromosomenlänge der Bakterien-DNA nimmt zu, die DNA-Polymerase kann die DNA nicht mehr richtig ablesen und replizieren, sodass am Ende das Bakterium stirbt. Zudem ist die Gyrase in der Lage, zwei verflochtene ringförmige DNA-Stränge zu öffnen und

wieder zu schließen. Somit ist die Gyrase für die Replikation und Transkription der bakteriellen DNA essentiell [277-279].

Topoisomerasen sind ebenfalls für alle Bakterienzellen lebensnotwendig, da nur sie in der Lage sind, die dynamischen Veränderungen der DNA in Bezug auf die räumliche DNA-Organisation (Topologie) bei der Zellteilung, Rekombination und Transkription auszugleichen [281-284].

Die Fluorchinolone weisen ein sehr breites Wirkungsspektrum auf, das sich auf die meisten grampositiven und gramnegativen Erreger erstreckt. Sie wurden von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie nach ihrer Anwendungsmöglichkeit in vier verschiedene Gruppen unterteilt (s. Tabelle 16) [63, 285-287].

Tabelle 16: Gruppen I - IV der Fluorchinolone (Gruppe II ebenfalls zur Anwendung im Veterinärbereich zugelassen) [63]

Gruppe	Indikation	Wirkstoffe (Beispiele)
<b>Gruppe I</b>	Orale Fluorchinolone für Harnwegsinfektionen	Norfloxacin, Perfloxacin
<b>Gruppe II</b>	Systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation	als Humanarzneimittel: Enoxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, <b>als Tierarzneimittel: Danofloxacin, Difloxacin, Enrofloxacin und Marbofloxacin</b>
<b>Gruppe III</b>	Nur als Humanarzneimittel gegen grampositive Bakterien und atypische Erreger (Mykoplasmen, Legionellen, Chlamydien)	Grepafloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin
<b>Gruppe IV</b>	Nur als Humanarzneimittel, Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive Bakterien und atypische Erreger sowie gegen Anaerobier	Trovafloxazin

Die Tierarzneimittel der Gruppe II wirken insbesondere gegen Staphylokokken, Pseudomonaden und Enterobacteriaceae. Die Wirksamkeit gegenüber Streptokokken, Anaerobier und Enterokokken ist sehr eingeschränkt [63]. Bei empfindlichen Keimen liegt die minimale bakterizide Wirkung ("bakterizid": Keime müssen innerhalb der ersten vier Stunden nach Anwendung der Substanz mindestens zu 99 % abgetötet sein) geringfügig über der minimalen Hemmkonzentration.

Bei den pharmakokinetischen Eigenschaften der Fluorchinolone gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wirkstoff und der zu behandelnden Tierart. Meistens wird der Wirkstoff nach oraler oder parenteraler Gabe rasch zu 60 - 90 % resorbiert und aufgrund der guten Gewebegängigkeit in alle Gewebe verteilt [63].

In der Veterinärmedizin werden Fluorchinolone bereits seit Ende der 1980er Jahre eingesetzt, wobei der prophylaktische Einsatz aufgrund der Ausbreitungsgefahr von Resistenzen verboten ist. Wegen der hohen Anwendungsmengen in der Geflügelzucht sind gemäß dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und

Veterinärmedizin (BgVV) 40 % der in Geflügel und Geflügelprodukten gefundenen *Campylobacter*keime bereits gegen Fluorchinolone resistent [288].

#### *Umwandlungs- und Abbaureaktionen*

Die Metabolisierungsrate der Fluorchinolone beträgt bei Tieren nur 20 %. Teilweise werden wirksame Metabolite, wie das Ciprofloxacin durch Dealkylierung von Enrofloxacin gebildet (s. Abbildung 13). Die Biotransformation erfolgt hauptsächlich am Piperazinring in Form einer N-Demethylierung. Bei Tieren wurden zudem antibiotisch unwirksame Glucuronid- und Sulfatkonjugate nachgewiesen. Gemäß Yuan et al. wird das veterinärmedizinisch eingesetzte ENR in der Leber bei Schweinen bis zu 52 % zum CIP abgebaut [289]. Die CIP-Ausscheidungsraten durch den Menschen betragen 44 - 62 % über den Harn und 15 - 25 % über Faeces [290]. Gemäß Frey werden Fluorchinolone überwiegend renal in wirksamer Form ausgeschieden, wobei innerhalb von zwei Tagen ca. 80 % im Harn erscheinen. Der restliche Anteil wird sezerniert und über die Faeces ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeiten liegen für alle Wirkstoffe und Spezies in einem Bereich von 2 bis 10 Stunden. Fluorchinolone zeigen keine Kumulationsneigung und bilden keine persistenten Rückstände im tierischen Organismus [63].

### **4.3 Beta-Lactame**

Fleming machte im Jahre 1928 die Entdeckung, dass eine Schimmelpilzkolonie von *Penicillium notatum* gegenüber Staphylokokken antimikrobielle Wirkung zeigte [291]. Er nannte die von diesem Pilz gebildete chemische Verbindung "Penicillin". Weitere systematische Forschungen ermöglichten Florey und Chain zehn Jahre später die Gewinnung von Penicillin aus *Penicillium*-Kulturen [292].

Penicillin zählt zu der Gruppe der Beta-Lactam-Antibiotika, die mit ihren ca. 10 Strukturklassen bakterizid wirken, indem sie das Endstadium der Peptidoglykansynthese hemmen. Die Peptidoglykansäure dient der Bakterienzelle zur Mureinsynthese. Murein ist ein essentieller Bestandteil der Zellwand von Bakterien, der für ihre physikalische Stabilität verantwortlich ist. Grampositive Bakterien bilden wesentlich dickere Mureinschichten als gramnegative Bakterien [43].

In der Human- und Tiermedizin werden mehr als 50 Substanzen der Wirkstoffgruppe eingesetzt, wobei der Ausgangswirkstoff "Benzylpenicillin" noch bei vielen Indikationen das Mittel der ersten Wahl darstellt [63]. Penicilline und Cephalosporine bilden die zwei großen Gruppen der Beta-Lactam-Antibiotika. Viele Bakterien besitzen Beta-Lactam spaltende Enzyme (Beta-Lactamasen, wie die ESBL's), die die Spaltung des Lactamringes von Beta-Lactam-Antibiotika verursachen und somit deren antibiotische Wirkung aufheben. Daher werden in der Veterinärmedizin fixe Kombinationen von Beta-

Lactam-Antibiotika mit Clavulansäure eingesetzt, da sie als Beta-Lactamase-Inhibitoren auf die bakteriellen Enzyme wirken [63, 293].

#### Struktur, physikalische und chemische Eigenschaften der Penicilline

Die Synthese der Penicilline baut auf der fermentativ hergestellten 6-Aminopenicillansäure (6-APS) auf, wobei sich die Herstellung der Cephalosporine von der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) ableitet (s. Abbildung 14) [293].

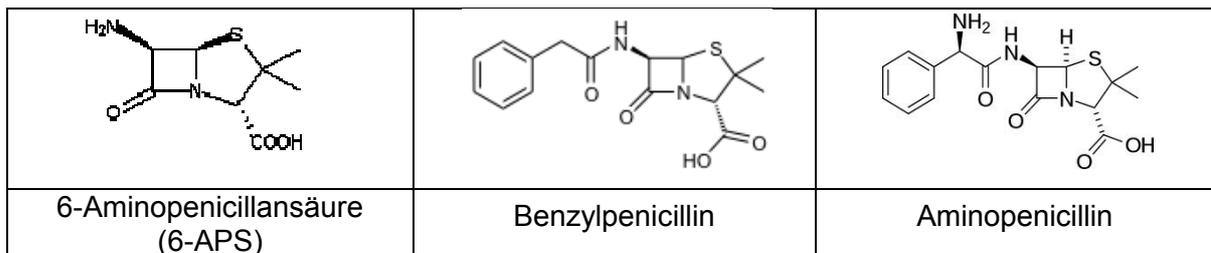


Abbildung 14: Struktur von Penicillin und relevante Derivate

Alle Vertreter der Beta-Lactam-Antibiotika haben in ihrer Grundstruktur einen viergliedrigen Beta-Lactamring, der mit einem fünfgliedrigen Thiazolidinring unter Bildung von 6-Aminopenicillansäure (6-APS) kondensiert [294].

Amoxicillin (AMO) ist ein  $\alpha$ -Aminopenicillin, dessen chemisch-physikalische Eigenschaften wesentlich durch die Natur seiner Seitenketten bestimmt wird. Die drei funktionellen Gruppen weisen folgende  $pK_a$ -Werte auf:  $pK_{a1}$  ( $-\text{COOH}$ )=2,69,  $pK_{a2}$  ( $-\text{NH}_2$ )=7,49 und  $pK_{a3}$  ( $-\text{Ph-OH}$ )=9,63 (vgl. Abbildung 15) [295].

Abhängig vom pH-Wert des wässrigen Lösemittels kann AMO als Kation, Anion oder Zwitterion vorliegen. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,9.

#### Pharmakodynamik/-kinetik und Indikation

Beta-Lactame werden bei Infektionen mit grampositiven und gramnegativen Bakterien eingesetzt. Durch die synthetische Einführung von Aminoresten in die Benzylseitenkette wurde das Wirkungsspektrum der Penicilline in den gramnegativen Bereich erweitert, sodass neben grampositiven Bakterien u.a. *Salmonellen*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus* und *Listerien* miterfasst werden. Ampicillin, mit D-Phenylglycin als Seitenkette, war der erste Vertreter von Penicillinen mit einer  $\alpha$ -Aminogruppe [258]. Es besitzt eine Resorption von ca. 50 % bei oraler Applikation und aufgrund seiner hohen Beta-Lactamase-Empfindlichkeit nur geringe Wirkung gegen *Pseudomonaden*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Proteus*-Stämme [63]. Amoxicillin hat unter vitro-Bedingungen die gleiche Wirksamkeit wie Ampicillin, ist jedoch unter vivo-Bedingungen aufgrund der höheren Serumspiegel besser wirksam, so dass seine bakterizide Wirkung schneller einsetzen kann. Allerdings ist die Resorptionsrate mit 75 % höher als beim Ampicillin. Die

Proteinbindungen für Ampicillin und Amoxicillin liegen je nach Tierart zwischen 3,5 % (Hund) und 18 % (Rind), die Eliminationshalbwertszeit ist speciespezifisch und beträgt ca. eine Stunde.

#### *Umwandlungs- und Abbaureaktionen*

Die Hauptmetabolite von AMO sind gemäß Reysn [296] Diketopiperazin (Diketo) und Penicilloinsäure von AMO (AMA) (vgl. Abbildung 14). AMO ist in einem pH-Bereich von pH 3 bis 8 relativ stabil. Ab pH 1,2 erfolgt die Umwandlung von AMO in AMA [296]. Boxall et al. konnten für AMO eine geringe Halbwertszeit im Boden feststellen, wobei ein 90 %iger Abbau bereits innerhalb eines Tages geschieht [159].

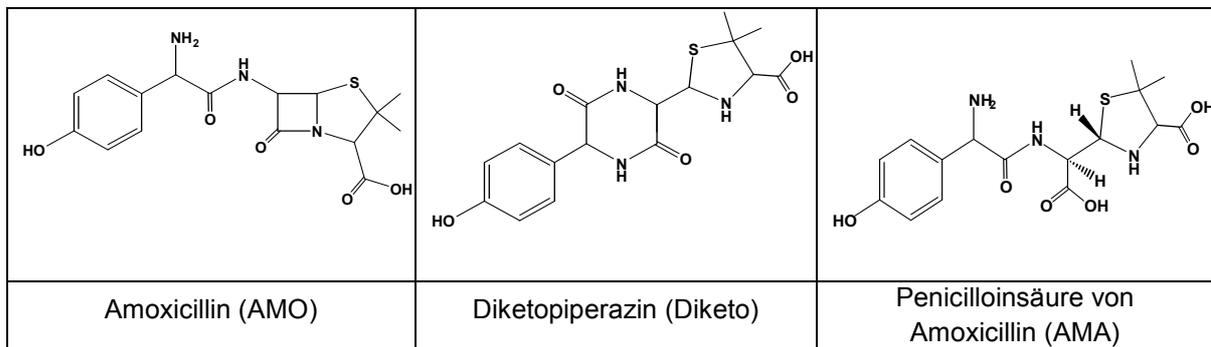


Abbildung 15: Struktur von AMO und seinen Hauptmetaboliten: Diketo und AMA (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 [297])

#### 4.4 Sulfonamide

Sulfonamide wurden in den 1930er Jahren noch vor der Einführung der Penicilline entdeckt und für die Chemotherapie bakterieller Infektionen eingesetzt. Domagk erkannte im Jahre 1935, dass Prontosil gegen experimentell verursachte Kokkeninfektionen Wirkung zeigte [63, 298]. Spätere Erkenntnisse zeigten, dass im Organismus durch Reduktion des Prontosils das Sulfanilamid entsteht, welches die eigentliche chemotherapeutische Wirkung zeigte. Das Sulfanilamid stellt die strukturelle Basis der antimikrobiell wirksamen Sulfonamide dar, von der sich die neueren Sulfonamide ableiten [63, 277]. Sulfonamide wirken aufgrund ihrer strukturellen Analogien zu der p-Aminobenzoesäure der Bakterienzelle als Inhibitoren bei der Folsäuresynthese, welche für die Nucleotidsynthese und somit für die Vermehrung der Bakterienzelle notwendig ist [258].

*Struktur, physikalische und chemische Eigenschaften der Sulfonamide*

Die große Wirkstoffklasse der Sulfonamide leitet sich vom Sulfanilsäureamid ab, wobei sich die Wirkstoffe lediglich aufgrund der Veränderung des Substituenten an Position N1 unterscheiden [299]. In nachfolgender Abbildung 16 sind der Grundkörper "Sulfanilamid" sowie einige Sulfonamidwirkstoffe und ihre jeweiligen Substituenten aufgeführt.

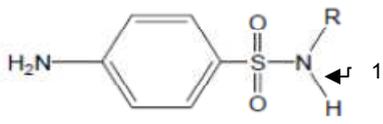
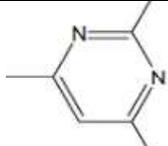
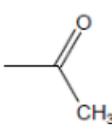
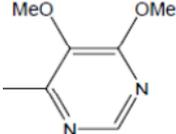
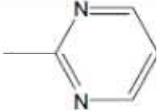
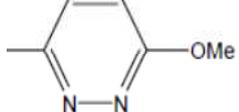
			
Sulfanilamid als Grundkörper der Sulfonamide			
Substanz	R	Substanz	R
Sulfanilamid		Sulfisomidin	
Sulfacetamid		Sulfamethoxazol	
Sulfadiazin		Sulfamethoxy-Pyridazin	

Abbildung 16: Substituenten ausgewählter Sulfonamidwirkstoffe [300]

Dabei werden drei strukturell unterschiedliche Wirkstoffklassen unterschieden: Sulfanilamid-Derivate mit nicht cyclischen Strukturkomponenten, mit Fünfring-Heterocyclen und mit Sechsring-Heterocyclen [277]. Sulfonamide (weiß, kristalline Pulver) sind in kaltem Wasser schwerlöslich (7,5 – 1500 mg/L), daher werden meistens ihre gut löslichen Natriumsalze angewandt [63]. Ihre Löslichkeit in wässriger Lösung ist pH-abhängig, wobei sie sich amphoter verhalten. In stark sauren oder basischen Lösungen reagieren Sulfonamide als schwache Säuren und bilden Salze. Sulfonamide besitzen zwei Säurekonstanten, die bei  $pK_{a1} = 2 - 3$  und  $pK_{a2} = 4,5 - 10,6$  liegen [301]. Die  $pK_a$ -Werte für Sulfadiazin liegen bei 2,10 und 6,28 [302]. Für den  $pK_{a1}$  wird die Protonierung der Aminogruppe und für den  $pK_{a2}$  die Deprotonierung des  $R_1SO_2NHR_2$ -Restes verantwortlich gemacht [303, 304].

*Pharmakodynamik/-kinetik und Indikation*

Der Wirkungstyp der Sulfonamide ist bakteriostatisch und beruht auf einer Synthesehemmung der bakteriellen Folsäure, einem sehr wichtigen Baustein bei der

bakteriellen DNA-, RNA- und Eiweißsynthese. Die kompetitive Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase erfolgt durch Substratkonkurrenz von Sulfonamiden zur p-Aminobenzoessäure (aufgrund der ähnlichen Struktur von Sulfonamiden zur p-Aminobenzoessäure). Damit wird die essentielle Folsäuresynthese und somit die Bakterienentwicklung gehemmt. Die weitere Folge ist, dass nun die körpereigenen Abwehrstoffe in der Lage sind, die Bakterien abzutöten. Dieser Wirkmechanismus funktioniert nur bei proliferierenden Bakterien (sich teilende Bakterien), die Folsäure selbst synthetisieren müssen und sich in dem Moment der Antibiotikaverabreichung bzw.-wirkung nicht in der Ruhephase befinden. Die Erreger, die fertige Folsäure aus der Umgebung aufnehmen können, besitzen gegen Sulfonamide eine natürliche Antibiotikaresistenz [63, 305].

Mehrere Tausend Derivate der Sulfonamide mit unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften konnten synthetisiert werden, wobei für die medizinische Praxis nur einige Derivate eingesetzt werden [299]. In der Humanmedizin werden die Sulfonamide strikt nach der Länge ihrer Wirkungsdauer (kurz-, mittellang-, langwirksam) eingeteilt. Diese Gliederung ist auf die Tiermedizin aufgrund großer Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Tierarten nicht übertragbar.

Sulfonamide werden sehr oft in Kombination mit Trimethoprim (TMP) angewendet (s. Abbildung 17), da dadurch die therapeutische Wirksamkeit erhöht wird. Sulfonamide haben als Monopräparat angewendet eine bakteriostatische, d.h. Bakterienwachstumshemmende Wirkung, als Kombinationspräparat haben sie sogar bakterizide (Bakterien-abtötende) Wirkung. Zudem senkt der Einsatz von Kombinationspräparaten, wie z.B. das "Clotrimoxazol" (Sulfamethoxazol und Trimethoprim im Verhältnis 5:1) die Resistenzausbreitung, da das Trimethoprim ebenfalls in den Mechanismus der bakteriellen Folsäuresynthese eingreift, jedoch an einer anderen Stelle als das Sulfonamid [277-279].

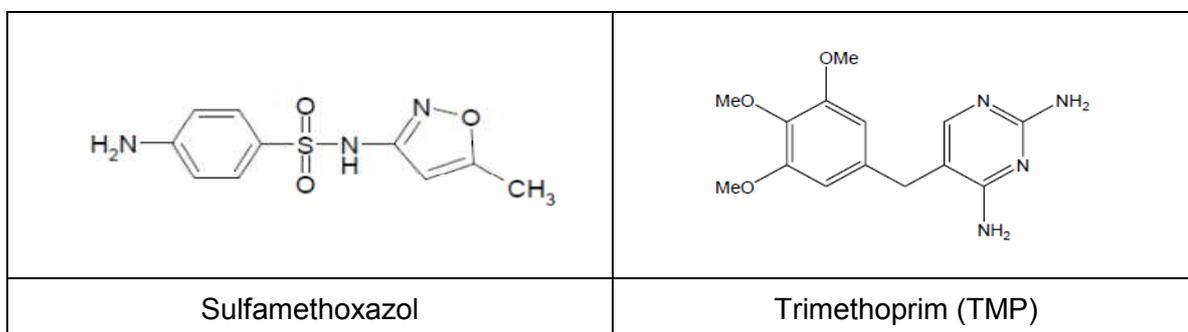


Abbildung 17: Kombipräparat "Clotrimoxazol" (Sulfamethoxazol: TMP (5:1, w/w))

Sulfonamide besitzen ein breites Wirkungsspektrum mit einem Wirkungsoptimum von pH 5,5 bis 7,5. Sie werden sowohl gegen zahlreiche grampositive und gramnegative Keime als auch gegen Chlamydien und Protozoenarten, wie Kokzidien, zur Behandlung von

Harnwegsinfektionen, Infektionen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich, der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes bei Tieren eingesetzt [306]. Ein Anwendungsverbot von Sulfonamiden gilt derzeit für Geflügel, dessen Eier zum menschlichen Verzehr bestimmt sind. Ebenfalls gilt ein Einsatzverbot für Stuten, deren Milch als Lebensmittel bestimmt sind [63]. Zwar besitzen Sulfonamide im veterinärmedizinischen Bereich eine hohe antibakterielle Aktivität, jedoch sind mittlerweile viele Erreger weniger empfindlich oder sogar resistent geworden. Die MHK-Werte liegen zwischen 0,1 und 0,64 µg/L [63].

#### *Umwandlungs- und Abbaureaktion*

Der Metabolismus der Sulfonamide variiert bei den verschiedenen Tierarten unterschiedlich stark. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber, wobei an der N4-Position eine Acetylierung durch das Enzymsystem N-Acetyltransferase und Acetylcoenzym A oder in geringem Maße eine Glucuronidierung erfolgt [63, 307]. Glucuronidierung bezeichnet den Vorgang der Ausscheidung unpolarer Stoffe über Leber und Niere durch Bindung an Glucuronsäure. So entstehen als Hauptmetabolite die N4-Acetyl-Sulfonamide [307].

Die Sulfonamide werden über die Nieren entweder in freier oder konjugierter Form ausgeschieden. Untersuchungen zeigten, dass die Ausscheidungsrate von eingesetztem Sulfadiazin bei Schweinen 50 % beträgt. Das Metabolisierungsprodukt N4-Acetylsulfadiazin ist antibiotisch nicht wirksam, wobei die Acetylierung aber reversibel ist [63, 154, 308, 309].

## **4.5 Ionophore**

Ionophore sind Polyetherantibiotika, die Ionen über biologische Membranen transportieren können. Sie stellen als Kokzidiostatika die Substanzen der Wahl dar, da andere Wirkstoffe aufgrund von Toxizität und Resistenzentwicklung nicht mehr zu diesem Zwecke eingesetzt werden können. Die Polyether werden aus verschiedenen Streptomyces- und Actinomadura-Arten fermentativ gewonnen. Zu ihrer Gruppe gehören Monensin (aus *Streptomyces cinnamonensis*), Lasalocid (aus *Streptomyces aureofaciens*), Salinomycin (aus *Streptomyces albus*) und Maduramycin (aus *Actinomadura yumaensis*) [63].

#### *Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften der Ionophore*

Ionophore bzw. Polyether-Antibiotika haben folgende charakteristischen Strukturelemente: Carboxylgruppe, polyketidische Einheiten, Tetrahydrofuranringsysteme sowie Tetrahydropyranring-systeme [310, 311] (s. Abbildung 18). Derzeit befinden sich die Wirkstoffe Laidlomycin, Lasalocid, Maduramicin, Monensin, Narasin, Salinomycin und Semduramicin auf dem Markt [312].

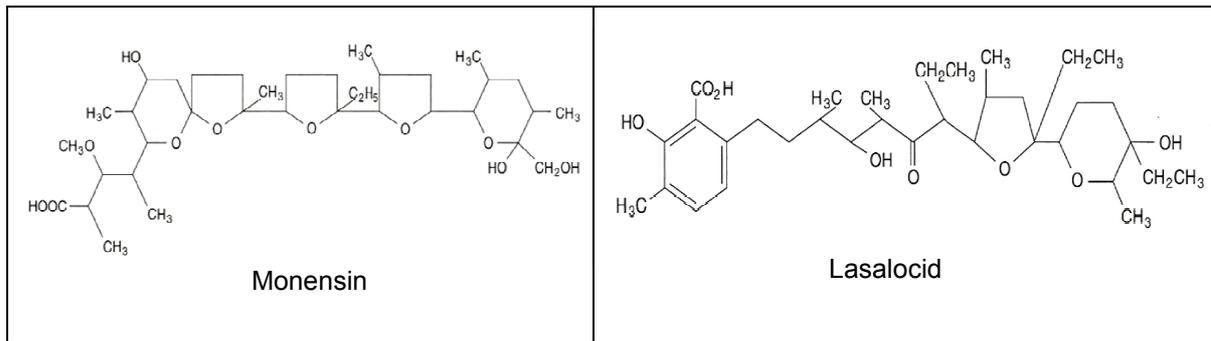


Abbildung 18: Strukturen von Monensin und Lasalocid

### *Physikalische und chemische Eigenschaften*

Ionophore sind hellgelbe pulvrige Verbindungen, die gering wasserlöslich sind. Die Löslichkeit in Methanol ist ebenfalls sehr gering, wobei die Löslichkeit als Natriumsalz größer ist als die der freien Säure [310]. Sie können Alkalimetallionen reversibel zu Chelaten binden und damit deren Transport in biologische Systeme durch Membrane ermöglichen [311].

### *Pharmakodynamik/-kinetik und Indikation*

Der Wirkungsmechanismus beruht darauf, dass sich die Polyether in Lipidphasen von Zellmembranen einlagern und Kationen, wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  passiv durch die Membranen transportieren oder passieren lassen. Durch Monensin werden hauptsächlich Natriumionen im Austausch gegen Protonen in die Zelle transportiert. Dadurch verändert sich das osmotische und elektrochemische Gleichgewicht der Zellen, sodass es aufgrund eines Zusammenbruchs des natürlichen transmembranen Ionengradienten zum Wassereintritt in die Zelle kommt. Durch Druckerhöhung in der Zelle werden die intrazellulären Strukturen zerstört, was zum Zelltod führt [313].

Ionophore wirken selektiv toxisch auf Protozoen, weswegen sie in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt werden. Zu den Protozoen zählen die Sporozoitien, parasitisch lebende, einzellige Sporentierchen, wie z.B. die Kokzidien, die zu schweren Darmerkrankungen und hohen Tierverlusten führen können [63], [66]. Daher muss die Kokzidiostatika-Verabreichung kontinuierlich erfolgen, um einer ständigen Infektion entgegen zu wirken [63]. Durch die Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 gilt seit Januar 2006 ein generelles EU-Verbot für die Verwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen als Leistungsförderer, wobei der Einsatz von Futtermittelzusatzstoffen als Kokzidiostatika oder Histomonostatika weiterhin für Monensin-Natrium und Salinomycin-Natrium erlaubt blieb (vgl. Kapitel 2.1) [45].

Monensin wird zum Teil enteral resorbiert, wobei die orale Bioverfügbarkeit um die 40 % liegt. Aus dem Monensin entstehen zahlreiche Metaboliten, die hauptsächlich über die

Galle ausgeschieden werden. Die Resorption von Lasalocid nach oraler Aufnahme ist dahingegen nur geringfügig, wie auch die enterale Resorption von Narasin. Salinomycin wird nach Verabreichung bereits im Darmtrakt inaktiviert und 90 % der Dosis werden über den Kot ausgeschieden [312]. Die Verträglichkeit von Ionophoren für die jeweilige Tierart darf nicht außer Acht gelassen werden. So wirken Ionophore bei Pferden hochtoxisch, wobei eine bei Schweinen oder Rindern zugelassene Dosis für Pferde bereits letal sein kann [312, 314].

#### *Umwandlungs- und Abbaureaktionen*

Ionophore können an verschiedenen Positionen der Ringe im Molekül durch Demethylierung, Decarboxylierung oder durch Hydroxylierung metabolisieren, woraus ganz unterschiedliche Metabolite resultieren. Die Wirksamkeit der Metabolite ist im Vergleich zu ihrer Ursubstanz vermindert [315, 316].

## 5 Methodische Vorgehensweise

Ziel dieser Arbeit war es einen Beitrag zur Erkenntnis der Aufnahmepotentiale von Rotkohl und Möhren für verordnungsstarke Veterinärantibiotika (Amoxicillin, Chlortetracyclin, Enrofloxacin, Sulfadiazin und Monensin) zu leisten.

### *Begründung der Nutzpflanzenwahl: Rotkohl und Möhren im Rahmen dieser Arbeit*

Rotkohl ist ein ausgeprägter Starkzehrer, noch ausgeprägter als Weißkohl und benötigt zum Wachstum sehr viel organischen Stalldung bzw. Stickstoffdünger sowie Wasser [255]. Daher ist davon auszugehen, dass das Aufnahmepotential für Veterinärpharmaka im Rotkohl besonders hoch ist. In Anlehnung an die bereits vorliegenden Hydrokulturstudien steht daher Rotkohl als ein Untersuchungsobjekt im Fokus dieser Arbeit [27, 146].

Die Untersuchungen der Antibiotikaaufnahme von Möhren in dieser Arbeit sind daher von Bedeutung, da sie in Deutschland zu den verzehrstarken Gemüsearten zählen und sehr häufig aufgrund ihres hohen  $\beta$ -Carotingehaltes als Rohkost verzehrt werden. In einer aktuellen Stellungnahme vom BfR wird vor hoher Keimbelastung von küchenfertigen Mischungen aus Rohkost wie Weiß- oder Rotkohl und Möhren gewarnt, da sie sehr häufig zu einer Infektionsgefahr für den Menschen werden [317]. Zudem werden Möhren für die Weiterverarbeitung zu Möhrenprodukten eingesetzt, wie z.B. für die Produktion von Babynahrung, die unter speziellen Anforderungen steht.

### *Begründung der Veterinärantibiotikawahl im Rahmen dieser Arbeit*

Für die Hydrokulturuntersuchungen der Antibiotikaaufnahme von Rotkohl und Möhren in dieser Arbeit stehen Veterinärpharmaka im Vordergrund, die hauptsächlich bei Schweinen und Geflügel eingesetzt werden, da aus deren Ausscheidungen hauptsächlich Wirtschaftsdünger hergestellt werden. Aufgrund von Verordnungen und Bestandsbucheintragen bzw. aufgrund der Resistenzproblematik wurden die oben genannten Antibiotika aus verschiedenen Wirkstoffklassen für die Untersuchungen herangezogen. Für den Feldversuch wurden die Antibiotika CTC und ENR gewählt. Die Wahl des Veterinärantibiotikums CTC, liegt zudem darin begründet, dass es in der Veterinärmedizin häufig angewendet wird. Nach Schätzungen von Schneiderei et al. liegt die Einsatzmenge der Tetracycline für das Jahr 2005 bei 45 % (vgl. Kapitel 2.1.2) [6]. ENR gehört zu der Wirkstoffklasse der Fluorchinolone, die in Deutschland nur ca. 1 % aller angewendeten Veterinärantibiotika ausmachen. Dennoch sind sie für diese Untersuchung von Relevanz, weil eine ansteigende Resistenzrate gegen Fluorchinolone beobachtet wird [19] und andererseits wird es in der Humanmedizin als Reserveantibiotikum eingesetzt, d.h. wenn andere Antibiotika nicht mehr wirken. Bereits

abgeschlossene Hydrokulturexperimente mit Porree und Weißkohl haben ein hohes Aufnahmepotential der Pflanzen für ENR und CTC gezeigt, weswegen insbesondere die beiden Antibiotika für die Feldversuche mit Rotkohl eingesetzt wurden [25], [41].

Zunächst musste eine Rückstandsanalysemethode entwickelt werden, sodass alle Antibiotika und ihre Hauptmetabolite gleichzeitig erfasst werden konnten (vgl. Kapitel 5.1). Anschließend erfolgten drei Untersuchungsprogramme unter verschiedenen Bedingungen mit unterschiedlichen Fragestellungen und Schwerpunkten bezogen auf die Aufnahme von Veterinärantibiotika in Rotkohl bzw. Möhren:

- Erkenntnisgewinnung über Aufnahmepotential von Rotkohl und Möhren für verordnungsstarke Veterinärantibiotika unter Hydrokulturbedingungen (s. Kapitel 5.3 und 5.4)

Für diese Untersuchung stand die Frage im Vordergrund, ob Rotkohl und Möhren aufgrund relativ langer Wachstumszeiten ein besonders hohes Aufnahmepotential für Veterinärantibiotika besitzen und daher als besonders kritisch zu bewerten sind.

Zur Klärung der Frage wurde die Aufnahmefähigkeit von Rotkohl und Möhren für ausgewählte und häufig eingesetzte Antibiotika in der landwirtschaftlichen Tierproduktion anhand von Dotierungsexperimenten in Hydrokultur untersucht. Ein hohes Aufnahmepotential unter Hydrokulturbedingungen könnte bedeuten, dass ebenfalls unter Feldbedingungen diese beiden Pflanzenarten aufgrund ihrer langen Wachstumszeiten als besonders kritisch zu bewerten sind. Zur Überprüfung des Aufnahmepotentials von verordnungsstarken Veterinärantibiotika in Rotkohl und Möhren wurden folgende antimikrobiellen Wirkstoffe eingesetzt: AMO, CTC, ENR, MON und SFD.

- Untersuchung des Aufnahmepotentials von Rotkohl für ausgewählte Veterinärantibiotika unter Feldbedingungen (s. Kapitel 5.5)

Diese Untersuchung verfolgte die Frage, wie hoch das Aufnahmepotential der zwei ausgewählten Antibiotika, ENR und CTC, in Rotkohl unter modellhaften, jedoch praxisnahen, konventionellen Feldbedingungen ist.

In Anbetracht der Tatsache, dass das Aufnahmepotential in Porree und Weißkohl für ENR und CTC in bereits abgeschlossenen Hydrokulturexperimenten signifikant hoch war, führte zu der dringenden Zielsetzung das Aufnahmepotential von ENR und CTC in Rotkohl unter Feldbedingungen, d.h. unter Berücksichtigung des Transfers Boden-Pflanze, zu untersuchen [41]. Hierzu wird unbelastete Schweinegülle (zur Verfügung gestellt vom Friedrich-Loeffler Institut in Braunschweig) mit ENR und CTC dotiert, auf die Versuchspartzen ausgebracht und anschließend mit Rotkohlpflanzen bepflanzt. Die Rückstandsanalyse des geernteten Rotkohls soll Auskunft über die

Antibiotikakontamination geben. Dieses Teilziel stellt ebenfalls einen Modellversuch unter landwirtschaftlich praxisnahen Bedingungen dar.

- Rückstandsanalysen in laufender Rotkohlkonservenproduktion (s. Kapitel 5.6)

Mit diesem Teilziel wird den folgenden Fragen nachgegangen: Ist konventionell, eventuell auf langjährig güllegedüngten Flächen gewachsener Industrierotkohl, der zur Rotkohlkonserven weiterverarbeitet wird, über den Veterinärantibiotika-Transfer Gülle-Boden-Pflanze antibiotikakontaminiert? Würde eine eventuelle Antibiotikakontamination der Rohware durch die verschiedenen Produktionsstufen verringert werden?

Sowohl die Dotierungsexperimente in Hydrokultur als auch der Feldversuch haben Modellcharakter, wobei nun im dritten Untersuchungsabschnitt der aktuelle Stand der tatsächlichen Antibiotikakontamination von Rotkohl von Gemüseproduzenten untersucht werden soll. Dabei sollen Antibiotika-Belastungsprofile von der Rohware, direkt nach der Ernte, bis hin zum verarbeiteten, verkaufsfertigen Produkt erstellt werden. In der Regel sind die Antibiotikagehalte in der Gülle aus der landwirtschaftlichen Praxis geringer, als unter Hydrokulturbedingungen.

Diese Untersuchungen sind aufbauend auf bereits abgeschlossene Forschungsprojekte der Universität Paderborn, hervorzuheben sind hier:

- „Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“, 2006 [154],
- „Screening zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Getreide in viehstarken Regionen Nordrhein-Westfalens“, 2008 [13], [41],
- „Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Gemüse – Porree und Weißkohl“, 2009 [25], [156].

Diese Studien haben unter anderem belegt, dass durch Düngung der Felder mit antibiotikahaltiger Gülle ein Transfer der Antibiotika über die Wurzel in die Pflanze erfolgen kann. Besonders betroffen sind Pflanzen in Regionen mit intensiver Schweine- und Geflügelhaltung, die unter den Bedingungen der konventionellen Landwirtschaft angebaut werden. In der landwirtschaftlichen Praxis besteht der Wirtschaftsdünger aus Schweinegülle oder Hühnermist, Putenmist, Hühnertrockenkot oder Flüssigdünger. Diese Düngemittel finden sowohl im Getreide- als auch im Gemüseanbau Verwendung.

In den Gemüsearten Porree und Weißkohl konnten Antibiotikarückstände sowohl in Hydrokultur als auch in Feldpflanzen nachgewiesen werden [41]. Zudem konnte die Aufnahmekapazität von Antibiotika in Möhren bestimmt werden [27].

## 5.1 Entwicklung der rückstandsanalytischen Methode mittels LC/MS

Zunächst sollte eine rückstandsanalytische LC/MS-Methode inklusive Probenvorereitung zur Bestimmung der eingesetzten Antibiotika und ihrer Metabolite erfolgen. Als Ausgangspunkt diente die in dem Arbeitskreis Grote der Universität Paderborn entwickelte Hausmethode (Probenvorbereitung, s. Abbildung 19). Zur chromatographischen Trennung wurde dabei eine analytische Säule mit Umkehrphase (Reversed Phase, YMC-ODS-AM, 150 x 3,0 mm ID, S 5 µm) eingesetzt. Die stationäre Phase in der Säule besteht aus polarem Kieselgel, welches mit unpolaren Octadecylketten modifiziert ist. Die ursprünglich polare Oberfläche erhielt somit einen lipophilen Charakter. Für die Trennung der Analyten bedeuteten diese Bedingungen, dass ein polarer Analyt nur kurz in der Säule retardiert, wohingegen unpolare Verbindungen dort länger verweilen. Da bei der Modifizierung mit Octadecylketten aus sterischen Gründen nicht alle Silanolgruppen reagieren können, werden im abschließenden Schritt der Phasenherstellung die verbliebenen polaren, sterisch gehinderten Silanolgruppen mit kurzkettigen Silanen (z.B. Trimethylchlorsilan) umgesetzt, was als "End-capping" bezeichnet wird. Darüber hinaus zeichnete sich die eingesetzte Säule durch einen geringen Metallionengehalt aus.

Bei der Hausmethode wurde das Gradientenprogramm so gewählt, dass zuerst ein Laufmittel mit hohem Anteil an Wasser (Acetonitril/Wasser/Ameisensäure 10/89,9/0,1 v/v/v) eingesetzt wurde. Anschließend wurde der Anteil an lipophilen Komponenten (Acetonitril und Methanol) erhöht, da diese eine stärkere Elutionskraft besitzen (s. Gradientenprogramm im Anhang A. 2.2).

### *Probenvorbereitung*

Die schematische Darstellung der von Grote et al. entwickelten Probenvorbereitung zur Bestimmung von Antibiotika in Gemüse ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt (detaillierte Beschreibung im Anhang A. 2.1). Die Probenvorbereitung erfasste bislang die Wirkstoffe SFD, ENR, CIP, TC, Doxycyclin (DC), Oxytetracyclin (OTC), Demeclocyclin (DMC), CTC mit ihren Epimeren und die Keto-Enol-Tautomere des Epimers von CTC. Zudem ließ sich mit ihr auch das Umlagerungsprodukt iso-CTC und sein Epimer epi-iso-CTC bestimmen.

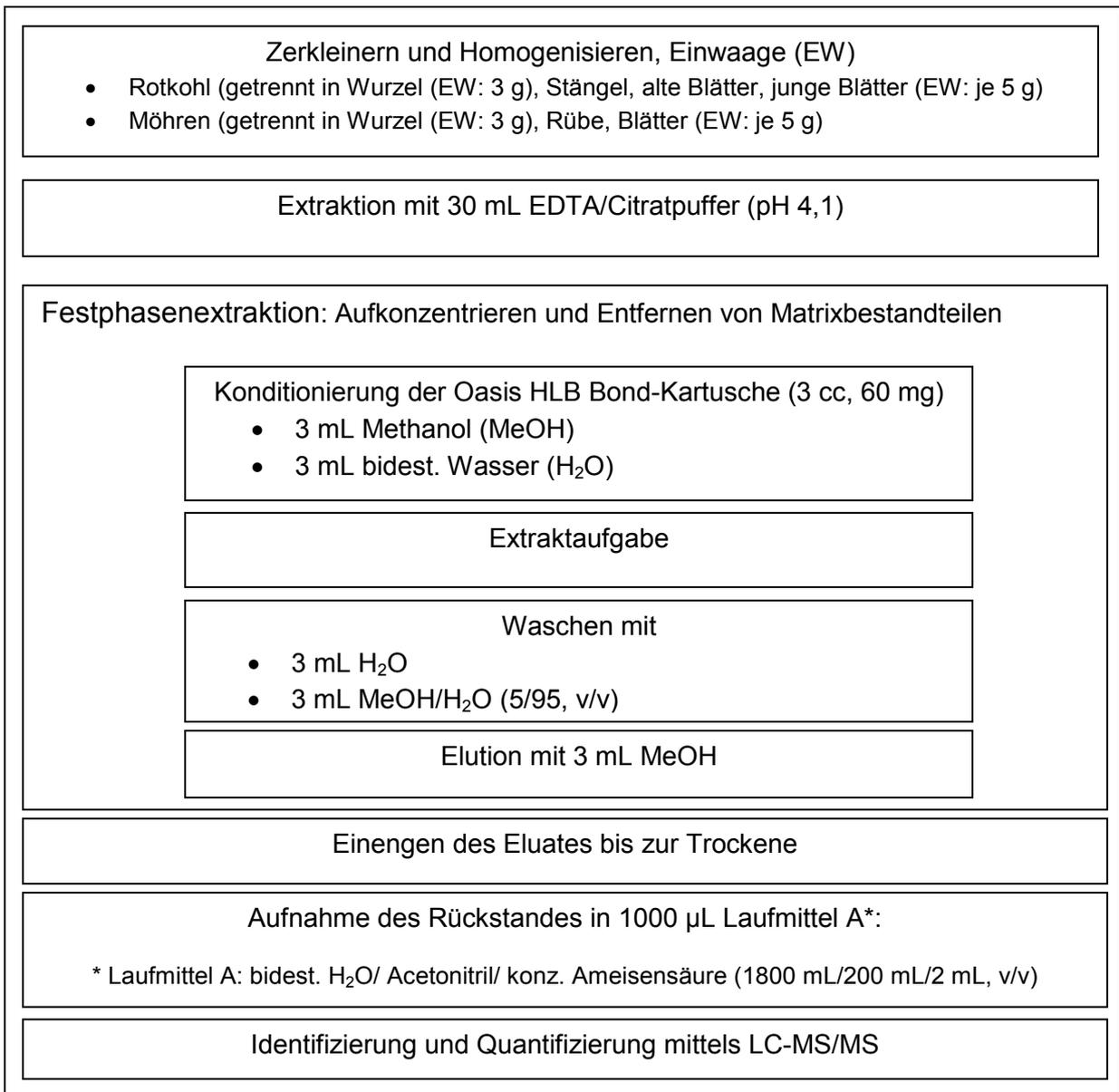


Abbildung 19: Schema der Probenvorbereitung der Hausmethode

Die Identifizierung der Antibiotika und ihrer Metabolite erfolgte über die Massenspuren der Vorläufer- und Produkt-Ionen (MS/MS-Stoßexperimente (Helium), MS<sup>1</sup>, MS<sup>2</sup>) im Zusammenhang mit ihren relativen Peakintensitäten und den entsprechenden Retentionszeiten (s. Anhang A. 2.2.1).

### 5.1.1 Entwicklung einer Multimethode zur gleichzeitigen Erfassung von Amoxicillin und seiner Metabolite (Beta-Lactame)

Erweiterung der Xcalibur Messmethode

Zunächst musste die im Mess- und Auswerteprogramm „Xcalibur“ bestehende Messmethode auf die Analyten AMO, AMA und Diketo erweitert werden. Dazu wurde ein Tuning der Analyten im Massenspektrometer durchgeführt. Die neue Tuningmethode, sowie die Precursorionen und  $[M+H]^+$ -Fragmente (Produktionen) von AMO, AMA und Diketo wurden aufgrund ihrer Retentionszeiten als neue Scan Events in die dazugehörigen Segmente (Zeitfenster) der bereits vorhandenen Messmethode eingefügt. Die um die Analyten AMO, AMA und Diketo erweiterte Methode ist im Anhang A. 2.2 dargestellt.

Zudem musste die Probenvorbereitungsmethode der im Arbeitskreis Grote bereits etablierten Hausmethode zur gleichzeitigen Erfassung von AMO und seiner Metabolite optimiert werden. Die Optimierung führte zur Neuentwicklung einer Probenvorbereitungsmethode.

Jedoch wurde zunächst der Versuch unternommen, die bestehende Hausmethode auf die Analyten AMO, AMA und Diketo anzuwenden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Methode optimierungsbedürftig war, da gar keine bis nur geringe Wiederfindungen erzielt werden konnten. Nach der Erprobung der bestehenden Hausmethode wurden Untersuchungen nach folgenden Kriterien durchgeführt:

- *Kriterium I:* Einfluss des pH-Wertes von ausgewählten Extraktionsmittel bei der Fest-Flüssig-Extraktion (SPE, Solid-Phase-Extraction),
- *Kriterium II:* Erprobung verschiedener Festphasen-Extraktionskartuschen (SPE-Kartuschen)
- *Kriterium III:* Variation des Elutionsmittels und -volumens.

Die erprobten Methoden orientierten sich an den Kriterien I bis III und die Versuchsbedingungen sind systematisch in Tabelle 17 zusammengestellt. Die Untersuchungen zur Entwicklung der neuen Methode basieren auf Wiederfindungsexperimente, wobei die Dotierung so gewählt wurde, dass die zu analysierende Messprobe nach Probenaufbereitung (SPE) bei 100 %-iger Wiederfindung eine Konzentration von 1 mg/L erreichen würde. Dazu wurden jeweils 1000  $\mu$ L eines Multistandards (MSTD,  $\beta=1$  mg/L, bestehend aus AMO, Diketo und AMA) dotiert. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte mit Hilfe eines externen Multistandards (MSTD,  $\beta=1$  mg/L). Bei allen Messungen wurden Doppelbestimmungen (N=2) und Dreifachinjektionen (n=3) durchgeführt.

Tabelle 17: Methodenaufstellung zur Extraktion von AMO und seiner Metabolite aus Gemüsepflanzen; systematische Nummerierung der Methoden anhand der Parameter "pH-Wert", "SPE-Kartusche" und "Elution".

Methoden-Bezeichnung	Kriterium	Extraktionsmittel	pH-Wert	SPE-Kartusche	Elutionsmittel/-volumen	Zusätzliche Variation	
"Hausmethode"	Kriterium I: pH-Wert	Citrat/EDTA	4,1	Oasis HLB Bond (60 mg/3 mL)	MeOH	keine	
I a			3,3		ACN		3 mL
I b		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6				
I c			1,0				
I d			2,0				
I e			2,6				
I f			NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		8,5		ACN/H <sub>2</sub> O
II a	Kriterium II: SPE-Kartusche	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6	Bond Elut Plexa (60 mg/3 mL)	ACN	keine	
II b			1,0				
II c			2,0				
II d			2,6				
II e			3,0				
II f			1,0				
II g			2,0				
II h			2,6				
II i			3,0				
II j		Citrat/EDTA	3,3	Bond Elut C 18 (100 mg/1mL)	MeOH	keine	
<b>II k</b>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>2,0</b>	<b>Bond Elut C 18 (100 mg/1mL)</b>	<b>ACN</b>		<b>3 mL</b>
II m	Bond Elut C 18 (200 mg/3 mL)						
III a	Kriterium III: Elution	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	Bond Elut C 18 (100 mg/1 mL)	ACN	5 mL	
III b						6 mL	
III c		Citrat/EDTA	4,1	Oasis HLB Bond (60 mg/3 mL)	ACN	3 mL	keine

### 5.1.2 Erprobung der Hausmethode

Zunächst wurde die Anwendbarkeit der Hausmethode auf die Bestimmung von AMO, AMA und Diketo aus der Rotkohlmatrix erprobt. Dazu wurden antibiotikafreie Rotkohlblätter einer Kontrollpflanze aus den Hydrokulturexperimenten nach ihrer Einwaage mit MSTD ( $\beta=1$  mg/L), der AMO, AMA und Diketo enthielt, dotiert (Messprobe soll 1 mg/L enthalten, was 200  $\mu\text{g/kg}$  Frischgewicht entspricht) und mit der bestehenden Methode analysiert. Sowohl AMO als auch AMA wurden nicht und Diketo wurde nur zu 5 - 10 % nachgewiesen (s. Tabelle 18).

Um für die weitere Optimierung die Einflüsse der Rotkohlmatrix zunächst unberücksichtigt zu lassen, wurde die Wiederfindung der Analyten aus dem reinen Citrat/EDTA-Puffer (pH 4,1) nach der Hausmethode ermittelt. Diese ergab eine sehr gute Wiederfindung für Diketo mit 82,9 %, für AMO jedoch nur 1,8 %, wohingegen AMA nicht nachweisbar war (s. Tabelle 18). Somit war eine weitere Optimierung dieser Methode notwendig. Die signifikante Wiederfindung von Diketo weist darauf hin, dass die Rotkohlmatrix einen Einfluss auf die Wiederfindung haben muss. Für die niedrige bis gar keine Wiederfindung von AMO und AMA müssen andere Ursachen als nur Matrixeinflüsse vorliegen. Es liegt die Vermutung nahe, dass während der Probenaufbereitung Verluste von AMO und AMA zu verzeichnen sind. Das Ziel des folgenden Untersuchungsschrittes bestand darin, aufzuklären bei welchem Arbeitsschritt der Probenaufbereitung Verluste von AMO und AMA auftraten. Es gibt während der Festphasenextraktion (SPE) drei Möglichkeiten bei denen Analyten-Verluste möglich wären: Bei unzureichender Festphasen-Sorption der Antibiotika, während der nachfolgenden Waschschriffe und/oder bei unvollständiger Elution.

Zur Überprüfung des möglichen Analyten-Verlustes wurde eine höhere Dotierung gewählt, sodass die Messprobe bei 100 %-iger Wiederfindung 3 mg/L AMO, Diketo und AMA enthalten sollte (anstatt 1 mg/L). Hierzu wurde bidest. Wasser mit 3 mL MSTD ( $\beta=1$  mg/L, abs. 3  $\mu\text{g}/30$  mL bidest. Wasser) dotiert. Anschließend wurde das dotierte bidest. Wasser auf die SPE-Kartusche gegeben und das Effluat, welches in der Regel verworfen wird, aufgefangen und mittels LC-MS/MS analysiert. Bei einer optimalen Probenaufbereitung haften die Analyten bzw. Antibiotika an dem Sorbens der SPE-Kartusche. Andere koextrahierte Inhaltsstoffe (wie z.B. Proteine, Zucker, Farbstoffe) wandern überwiegend in das Effluat und beeinflussen dadurch nicht mehr die LC-MS-Analyse. Nach Aufgabe der Extraktionslösung, in diesem Fall dotiertes bidest. Wasser, wurden Waschlösungen auf die SPE-Kartusche gegeben, um eventuell noch immer anhaftende Störsubstanzen von dem SPE-Sorbens zu entfernen. Auch das Waschfiltrat, welches in der Regel ebenfalls verworfen wird, wurde analysiert. Im Effluat und Waschfiltrat konnten AMO, AMA und

Diketo nachgewiesen werden. In der Messprobe war AMO nur mit 0,9 % und Diketo mit 24,2 % zu quantifizieren. AMA wurde erneut nicht nachgewiesen (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über die "Hausmethode" nach MSTD-Dotierung von antibiotikaunbelasteten Rotkohlblättern (Hydrokultur), von Citrat/EDTA-Puffer und von bidest. Wasser, N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungs-Medium	MSTD Dotierung	AMO	Diketo	AMA
Bestehende Hausmethode	unbelastete Rotkohlblätter	$\beta=1$ mg/L	~ 0	5-10	~ 0
	Citrat/EDTA (pH 4,1)	$\beta=1$ mg/L	1,8	82,9	~ 0
	bidestill. Wasser	$\beta=3$ mg/L	0,9	24,3	~ 0

Die Untersuchungsergebnisse belegen, dass während der Probenvorbereitung Verluste der Analyten auftraten. Diese Tatsache macht deutlich, dass die notwendigen Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Sorbensmaterial der SPE-Kartusche sehr gering bzw. gar nicht vorhanden sind. Dafür kann es zwei Gründe geben: Zum einen könnte die Sorbensmenge zu gering sein, sodass die Kapazität des Sorbensmaterial der Oasis HLB Bond Kartusche nicht ausreicht, um die Analyten zu binden. Zum anderen wäre es möglich, dass bei einem pH-Wert von 4,1 die Sorptionsfähigkeit der polymeren Matrix der Oasis-Kartusche (bestehend aus unpolaren, aromatischen Phenyl- und polaren Pyrrolidon-Gruppen) für die pH-abhängige Speziesform der Analyten herabgesetzt ist. AMO liegt bei diesem pH-Wert hauptsächlich zwitterionisch in Lösung vor, wie das strukturell verwandte Ampicillin (AMP) (s. Abbildung 20) [319].

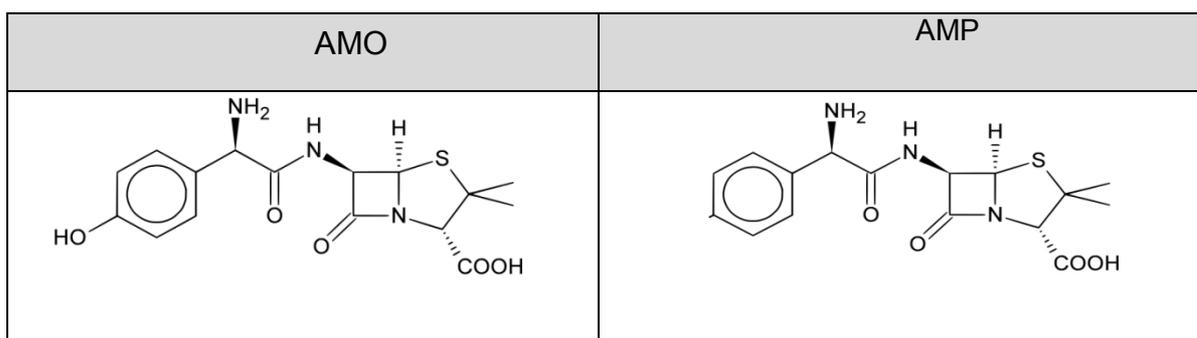


Abbildung 20: Strukturformel von AMO und AMP

Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft besitzen AMO und AMP ähnliche  $pK_a$ -Werte (vgl. Tabelle 19).

Die nachfolgende Abbildung 21 zeigt das Protolysegleichgewicht von AMP bei verschiedenen pH-Werten, welches aufgrund der ähnlichen Strukturformeln (vgl. Abbildung 20) und  $pK_a$ -Werte (s. Tabelle 19) auf AMO übertragen werden kann [155], [319]. Der Ladungszustand der Analyten ist von entscheidender Wichtigkeit für die Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen des Sorbensmaterial der verschiedenen SPE-Kartuschen. Demnach könnte es sein, dass die zwitterionische Spezies für die Sorption an dem Oasis-Sorbens ungünstig ist. Daher sollte mittels pH-Variation der Versuch unternommen werden, das AMO in eine effektiver sorbierbare Protolysespezies zu überführen.

Tabelle 19:  $pK_a$ -Werte von AMO und AMP

AMO		AMP	
$pK_a$ -Werte	Literatur	$pK_a$ -Werte	Literatur
$pK_{a1}$ : 2,69	[318]	$pK_{a1}$ : 2,5 bzw. 2,60	[319] bzw. [320]
$pK_{a2}$ : 7,49	[318]	$pK_{a2}$ : 7,1 bzw. 7,04	[319] bzw. [320]
$pK_{a3}$ : 9,63	[318]	-	-

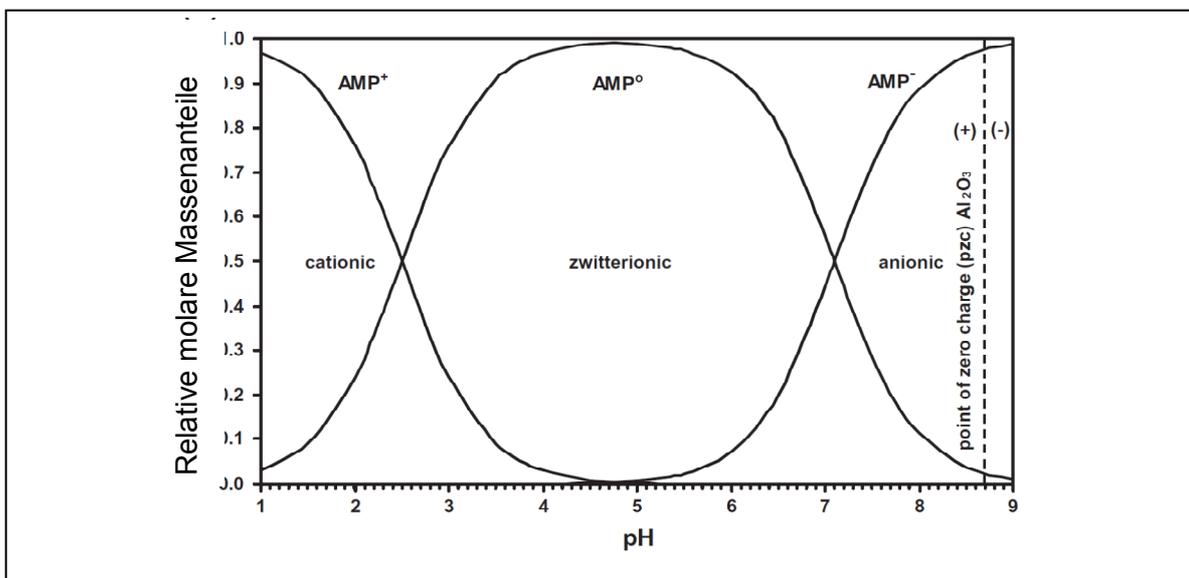


Abbildung 21: Spezies von AMP bei verschiedenen pH-Werten [319]

### 5.1.3 Wiederfindungsversuche unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien

#### *Kriterium I: Einfluss des pH-Wertes von ausgewählten Extraktionsmitteln auf die Wiederfindung*

Die Untersuchungen des pH-Einflusses erstrecken sich über den pH-Bereich von 1 bis 8,5, wobei der Ausgangspunkt der Untersuchungen bei der Hausmethode liegt. Um bei dem bislang eingesetzten Extraktionsmittel (Citrat/EDTA-Puffer, pH 4,1) den pH-Einfluss auf die Wiederfindung zu erkennen, wurden saure und alkalisch eingestellte pH-Bereiche der Extraktionslösungen getestet. Gemäß Abbildung 21 liegt AMO bzw. AMP im pH-Bereich von 2,5 - 2,7 ( $pK_{a1}$ ) jeweils zur Hälfte kationisch ( $AMO^+$ ) und zwitterionisch ( $AMO^0$ ) vor. Das eingesetzte Citrat/EDTA-Extraktionsmittel hat bei einem pH-Wert  $< pK_{a1} = 2,5$  zur Folge, dass AMO überwiegend und bei pH=1 ausschließlich kationisch vorliegt.

Versuche, das Citrat/EDTA-Extraktionsmittel mit verdünnter Salzsäure langsam auf einen pH-Wert von 1 einzustellen, scheiterten, da ab pH  $< 3,3$  die Citronensäure als feinkristalliner Niederschlag ausfällt. Um trotzdem zu erkennen, ob bei pH 3,3 bereits ein Einfluss auf die Wiederfindung besteht, wurde die Hausmethode entsprechend modifiziert (Methode I a). Das Citrat/EDTA-Extraktionsmittel (pH 3,3) wurde mit MSTD ( $\beta=1$  mg/L) dotiert und nach Methode I a analysiert (s. Tabelle 20). Die Erniedrigung des pH-Wertes führte zu einer relativ höheren Wiederfindung an AMO von 10,9 % (Hausmethode: 1,8 %), die jedoch noch nicht zufriedenstellend ist. Auch für Diketo konnte eine bislang maximale Wiederfindung von 86,4 % erzielt werden. Für die Bestimmung von AMA hatte die pH-Wert-Änderung keinen Einfluss, denn erneut konnte AMA nicht nachgewiesen werden.

Da bereits eine pH-Wert-Erniedrigung von 4,1 auf 3,3 die Wiederfindung erhöht, liegt die Vermutung nahe, dass prinzipiell eine weitere Acidifizierung zu einer noch höheren Wiederfindung der Analyten führt. Dies war aber infolge der geringen Löslichkeit der Citronensäure nicht realisierbar. Daher wurde als alternatives Extraktionsmittel, eine mit Trichloressigsäure angesäuerte Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )-Lösung, erprobt, die auch im stark sauren Bereich anwendbar ist (Methode I b, s. Tabelle 20). Die Probenvorbereitung erfolgte in Anlehnung an eine publizierte Methode, die bereits für die AMO-Bestimmung in tierischem Gewebe eingesetzt wurde [321]. Die wesentlichen Probenvorbereitungsschritte der Methode von De Baere et al. bestehen aus der Extraktion von Antibiotika aus Leber, Niere, Muskelfleisch und Fettgewebe vom Schwein mit Trichloressigsäure (TCA) angesäuerter 0,01 mol/L  $KH_2PO_4$ -Lösung (pH=2), der SPE über eine C18-Kartusche und der Elution mit Acetonitril (ACN). Die folgende Abbildung 22 stellt die Bedingungen der einzelnen Probenvorbereitungsschritte der Methode I b schematisch dar, die durch Veränderungen der Methode von De Baere et al. entwickelt

wurde. So wurde u.a. anstatt der C18-Kartusche vergleichend die Oasis HLB Bond-Kartusche (wie bei der Hausmethode und der Methode I a) gewählt.

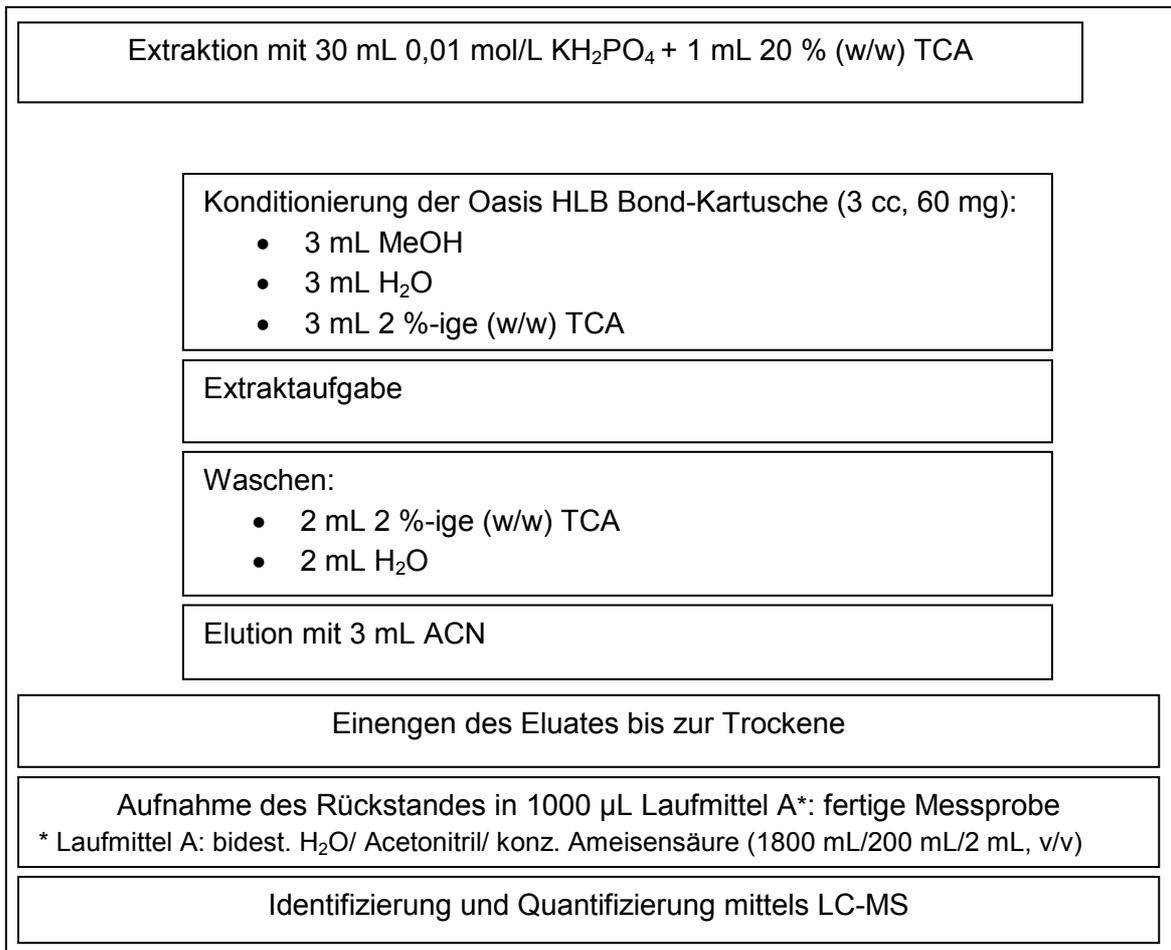


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Methode I b

Bei der Anwendung der Methode I b wurde zunächst MSTD ( $\beta=1$  mg/L) in die  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung dotiert und mit 1 mL 20 %-iger (w/w) TCA versetzt (entspricht pH 1,6). Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Abbildung 22.

Die Ergebnisse zeigen, dass erstmals über die Methode I b AMA nachgewiesen und mit 28,1 % quantifiziert werden konnte. Die Wiederfindung von AMO mit 33,3 % stellt bislang den höchsten Wert dar. Die Wiederfindung von Diketo mit 39,3 % liegt jedoch, im Vergleich zur Hausmethode (82,9 %) und Methode I a (86,4 %), wesentlich niedriger. Das Ziel, die Entwicklung einer optimierten Multimethode zur gleichzeitigen Erfassung von AMO, AMA und Diketo-, neben anderen Analyten (aus den Wirkstoffgruppen der Tetracycline, Sulfonamide, Ionophore, etc.), ist somit noch nicht erreicht. Eine weitere Optimierung blieb erforderlich. Zur besseren Übersicht fasst Tabelle 20 die Wiederfindungsergebnisse der Hausmethode, Methoden I a und I b zusammen.

Tabelle 20: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über die Hausmethode, Methode I a und I b nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L); SPE-Kartusche: Oasis HLB Bond (60 mg/3mL), N=2; n=3

Angewandte Methode	Dotierungsmedium	AMO	Diketo	AMA
Hausmethode	Citrat/EDTA (pH 4,1)	1,8	82,9	~ 0
Methode I a	Citrat/EDTA (pH 3,3)	10,9	86,4	~ 0
Methode I b	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 1,6)	33,3	39,3	28,1

In einem weiteren Versuch wurde Methode I b nur dahingehend variiert, dass das KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Extraktionsmittel mittels TCA auf definierte pH-Werte eingestellt wurde (vgl. Tabelle 21):

- pH = 1,0 (Methode I c)
- pH = 2,0 (Methode I d)
- pH = 2,6 (Methode I e)

Der pH-Wert von 2,6 entspricht dem  $pK_{a1}$ -Wert von AMO. Die genaue Einstellung des Extraktionsmittels auf definierte pH-Werte soll Rückschlüsse auf den Einfluss des pH-Wertes auf die Wiederfindung geben. Dabei steht der chemische Ladungszustand der Analyten und die daraus resultierende Wechselwirkung zum Sorbensmaterial der SPE-Kartusche in Abhängigkeit zum pH-Wert der Umgebung, in der die Analyten gelöst sind. Nach Einstellung des jeweiligen pH-Wertes der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Extraktionslösung wurde der MSTD ( $\beta=1$  mg/L) zudotiert und nach einer anschließenden Probenaufbereitung analysiert. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über Methode I c - e nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), SPE-Kartusche: Oasis HLB Bond (60 mg/3mL), N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungsmedium	AMO	Diketo	AMA
Methode I c	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 1,0)	35,1	60,8	64,1
Methode I d	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,0)	27,1	39,6	67,6
Methode I e	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,6)	18,7	35,1	67,2

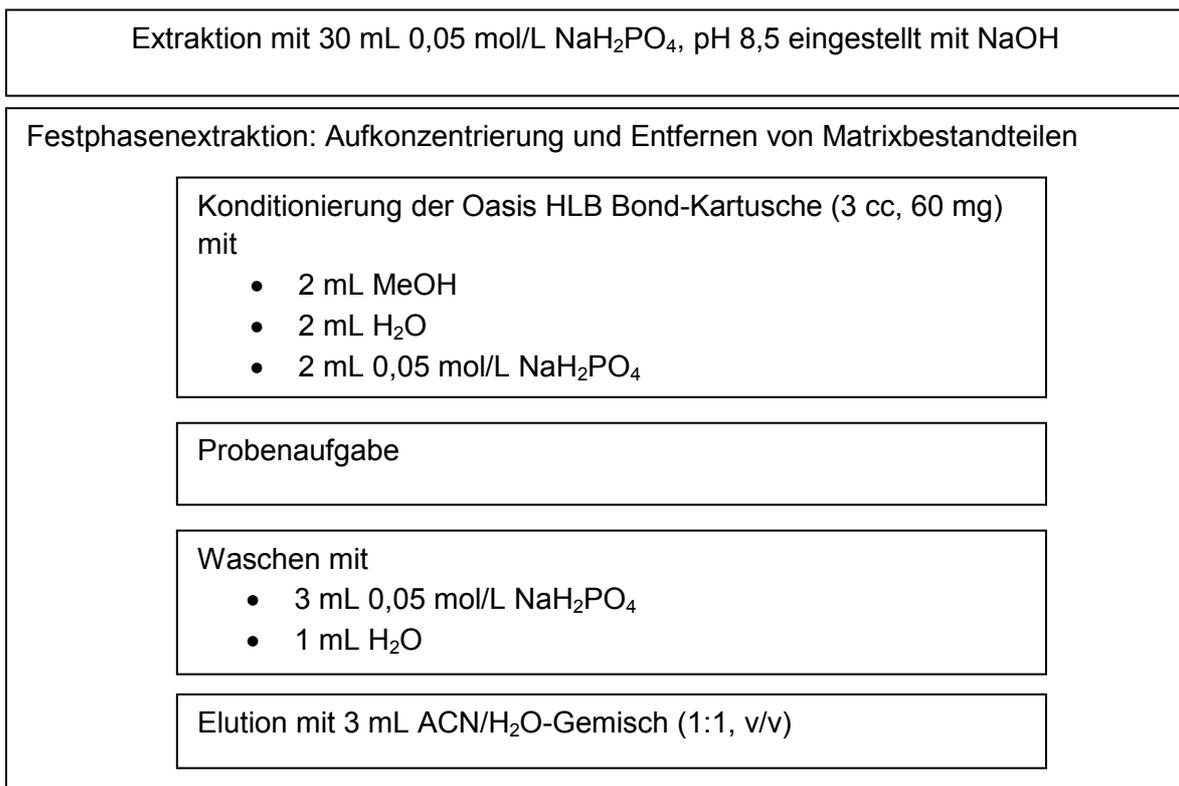
Die Wiederfindungsergebnisse nach Aufarbeitung über die Methoden I c-e zeigen äußerst hohe Wiederfindung für AMA: 64,1 % über Methode I c, 67,6 % über Methode I d und 67,2 % über Methode I e. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von dem Ergebnis der Methode I b (28,1 % AMA, vgl. Tabelle 20). Nach den höchsten Wiederfindungen für AMA, folgt Diketo mit 60,8 % über Methode I c, 39,6 % über Methode

I d und 35,1 % über Methode I e. Der Einfluss des pH-Wertes wird ersichtlich bei dem Vergleich der Wiederfindungsergebnisse von Diketo über Methode I c (60,8 % Diketo) und Methode I d (39,6 % Diketo). Die gleiche Tendenz kann auch bei den Wiederfindungsergebnissen von AMO festgestellt werden, wobei die Wiederfindungen für AMO wie folgt sind: 35,1 % (Methode I c), 27,1 % (Methode I d) und 18,7 % (Methode I e).

*Zusammenfassend* lässt sich feststellen, dass der pH-Wert des Dotierungsmediums die Wiederfindung beeinflusst, wobei die Methoden I c und I d am geeignetsten sind. Bei Methode I c muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei pH 1 AMO instabil ist und bereits eine Umwandlung von AMO in AMA die Folge sein kann [322]. Im Hinblick darauf ist die Methode I d die bessere Alternative.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Einfluss des *alkalischen pH-Bereiches* auf das Extraktionsvermögen untersucht (Methode I f). In Anlehnung an eine publizierte Methode für die AMO-Bestimmung in Rindermuskel und Rinderniere wurde das Extraktionsmittel 0,05 mol/L Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) bei pH 8,5 (Methode I f) eingesetzt [323]. Die wesentlichen Arbeitsschritte dieser Methode bestehen aus der Zugabe von Wasser und ACN zur Probeneinwaage (Gemüse), Zentrifugieren, Abdampfen des ACN, Zugabe von 0,05 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung, Einstellen des pH-Wertes auf 8,5 mit 0,1 mol/L Natriumhydroxid (NaOH), SPE über Oasis HLB Bond Kartusche und Elution mit ACN/Wasser [323].

Das folgende Schema (s. Abbildung 23) fasst die einzelnen Probenvorbereitungsschritte der Methode I f zusammen:



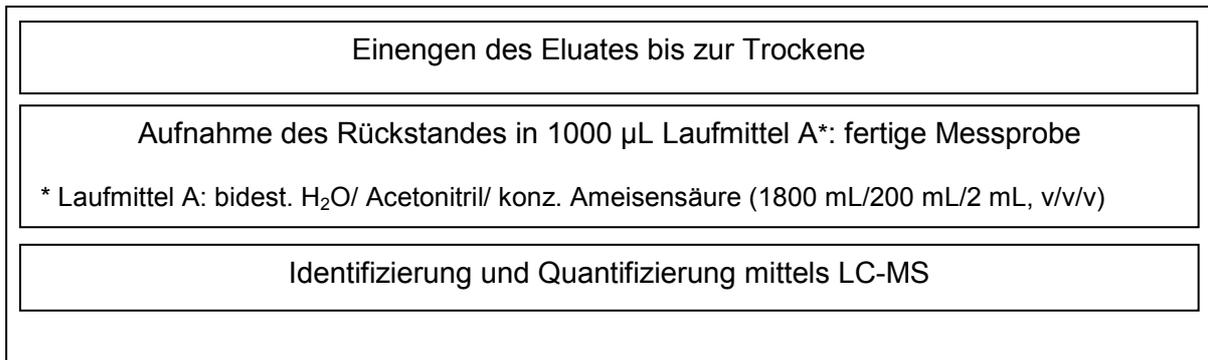


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Methode I f

Zur Erprobung der Methode I f wurde MSTD ( $\beta=1$  mg/L) in das Extraktionsmittel NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dotiert und nach den Arbeitsschritten in Abbildung 23 aufgearbeitet. In einem weiteren Ansatz wurde nur AMO ( $\beta=1$  mg/L) dotiert, um zu sehen, ob die Metabolite AMA und Diketo unter diesen Bedingungen entstehen können. Die angewandte Methode I f führte zu den in Tabelle 22 gezeigten Ergebnissen:

Tabelle 22: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo mit Methode I f nach MSTD- bzw AMO-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), SPE-Kartusche: Oasis HLB Bond (60 mg/3mL), N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungs-Medium	AMO	Diketo	AMA
Methode I f	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,5)	14,3	59,3	12,6
		17,5	nicht dotiert, nicht nachweisbar	nicht dotiert, nicht nachweisbar

Aus dem separat dotierten AMO waren nicht die Umwandlungsprodukte AMA und Diketo entstanden. Die Wiederfindung nach alkalischer Probenvorbereitung liegt im Vergleich zu den Wiederfindungswerten mit Methode I d niedriger. Somit stellt die Methode I f (pH 8,5) keine Alternative zu Methode I d (pH 2) dar, da sie bislang die höchsten Wiederfindungen erbracht hat. Nach Untersuchungen des pH-Einflusses verschiedener Extraktionsmittel soll im nächsten Schritt die Relevanz verschiedener Kartuschen für die Wiederfindung erprobt werden.

*Kriterium II: Erprobung verschiedener Festphasen-Extraktionskartuschen (SPE-Kartuschen)*

Bislang hatte sich in der bestehenden Hausmethode die Festphasenextraktion (SPE) mittels Oasis HLB Bond Kartusche bewährt. Die Festphase besteht aus einem makroporösen Kopolymer mit sogenannter "Hydrophiler und Lipophiler Balance" (HLB), die durch das molare 1:1 Verhältnis des hydrophilen Monomers N-Vinylpyrrolidon und des

lipophilen Monomers Divinylbenzol erreicht wird (vgl. Abbildung 24). Die Spezifikation der Oasis HLB Bond Kartusche garantiert Stabilität im pH-Bereich von 1 - 14.

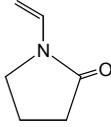
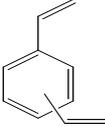
	
N-Vinylpyrrolidon	Divinylbenzol

Abbildung 24: Monomere der Oasis HLB Bond Kartusche

Für eine vergleichende Untersuchung sollte die Bond Elut Plexa-Kartusche erprobt werden. Die Festphasen-Eigenschaften der Oasis HLB Bond- und der Bond Elut Plexa Kartusche sind ähnlich. Bei der Bond Elut Plexa handelt es sich ebenfalls um eine Reversed Phase (RP-Phase), bestehend aus Divinylbenzol und OH-Gruppen, die einen Hydrophilie-Gradienten in der Pore bewirken. Wie bei der Oasis HLB Bond Kartusche garantiert die Spezifikation der Bond Elut Plexa ebenfalls eine Stabilität im pH-Bereich von 1 - 14. Für die Erprobung wurde der MSTD ( $\beta=1$  mg/L) in 0,01 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (pH 1,6 mittels TCA) dotiert und anschließend eine Festphasenextraktion über die Bond Elut Plexa Kartusche durchgeführt (Methode II a). Mit dieser Methode konnten 47,6 % AMO, 60,7 % Diketo und 11,0 % AMA wiedergefunden werden.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Methode I b zu Methode II a lässt erkennen, dass die Wiederfindung für AMO und Diketo über Methode II a, d. h. über eine Festphasenextraktion mittels Bond Elut Plexa-Kartusche höher ist, wobei AMA eine niedrigere Wiederfindung aufwies (vgl. Tabelle 18 mit Tabelle 21).

Wie bereits im Vorfeld die Methode I b durch Variation des pH-Wertes optimiert wurde, soll analog der Einfluss des pH-Wertes auf die Wiederfindung über die Bond Elut Plexa-Kartusche untersucht werden (vgl. Tabelle 20 mit Tabelle 23).

Hierbei wurde das  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Extraktionsmittel auf pH-Werte zwischen 1 und 3 eingestellt (s. Tabelle 22) und nach Zugabe des MSTD ( $\beta=1$  mg/L) über die SPE mittels Bond-Elut-Plexa-Kartusche aufgearbeitet und weiter analysiert. Die Wiederfindungsergebnisse nach der SPE über die Bond Elut Plexa-Kartusche sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über Methode II a - e nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), SPE-Kartusche: Bond Elut Plexa (60 mg/3mL), mit TCA konditioniert, N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungs-Medium	AMO	Diketo	AMA
Methode II a	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 1,6)	47,6	60,7	11,0
Methode II b	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 1,0)	5,7	15,8	10,0
Methode II c	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,0)	35,9	66,7	12,9
Methode II d	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,6)	35,6	69,9	8,9
Methode II e	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3,0)	13,1	66,7	8,1

Die Tabelle 23 zeigt hohe Wiederfindungen (> 60 %) für Diketo ab einem pH-Wert von 1,6. Für AMO wurden die höchsten Werte im pH-Bereich von 1,6 - 2,6 (36 - 48 %) erreicht. Dagegen war die Wiederfindung für AMA bei allen pH-Werten gering (8 - 13 %). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass erwartungsgemäß sowohl der pH-Wert als auch die Wahl der Kartusche einen Einfluss auf die Wiederfindung haben. Bei einem Vergleich der Wiederfindungen nach Methode I d zu II c lassen sich signifikante Unterschiede bei Diketo (39,6 % über Methode I d und 66,7 % über Methode II c) und AMA (67,6 % über Methode I d und 12,9 % über Methode II c) aufgrund unterschiedlicher Kartuschen erkennen. Bei den Methoden II a - e wurde die Bond Elut Plexa Kartusche mit TCA konditioniert.

#### Konditionierung

Eine erneute Variation wurde durchgeführt, indem nun die Bond Elut Plexa-Kartusche lediglich mit MeOH und bidest. Wasser, jedoch nicht mit TCA konditioniert wurde (Methode II f - i). Dazu wurden die Methoden II b – e angewandt, mit dem Unterschied, dass keine Konditionierung mit TCA durchgeführt wurde. Tabelle 24 fasst die Wiederfindungsergebnisse der Methoden ohne TCA-Konditionierung zusammen.

Tabelle 24: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über Methode II f - i nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$ mg/L), SPE-Kartusche: Bond Elut Plexa (60 mg/3mL), ohne TCA konditioniert, N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungs-medium	AMO	Diketo	AMA
Methode II f	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 1,0)	6,7	14,8	9,8
Methode II g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,0)	28,9	69,9	38,0
Methode II h	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,6)	23,2	65,0	18,3
Methode II i	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3,0)	11,4	62,3	8,5

Die TCA-freie Konditionierungsvariation ergab auf die Wiederfindung von AMO und Diketo keinen deutlichen Einfluss, jedoch auf AMA in dem pH-Bereich zwischen 2,0 - 2,6 (vgl. Tabelle 23 und Tabelle 24). Im Hinblick auf den Einfluss der Kartuschen Oasis HLB Bond und Bond Elut Plexa sind die Analyten differenziert zu betrachten. So ist die Wiederfindung von Diketo am größten nach einer Festphasenextraktion über die Bond Elut Plexa-Kartusche. AMA hingegen zeigte sehr hohe Wiederfindungen bei Anwendung der Oasis HLB Bond-Kartusche. Die Wiederfindung von AMO verhält sich bei beiden Kartuschen ähnlich. Oasis HLB Bond und Bond Elut Plexa, die sowohl auf polare als auch auf unpolare Anteile basieren, lieferten keine zufriedenstellenden Wiederfindungen. Daher wurde im Weiteren eine ausschließlich unpolare Phase, die Bond Elut C-18-Kartusche (60 mg/1 mL) getestet.

#### *Bond Elut C 18-Kartusche*

Diese wurde ebenfalls in der Methode von De Baere eingesetzt [321]. Zur Erprobung der Bond Elut C 18-Kartusche wurden erneut die Arbeitsschritte nach Methode I a (Citrat/EDTA, pH 3,3) durchgeführt, wobei die vorher verwendete Oasis HLB Bond-Kartusche durch die Bond Elut C 18-Kartusche ausgetauscht wurde (Methode II j).

In einem weiteren Versuchsansatz zur Überprüfung der Eignung der Bond Elut C 18-Kartusche in Verbindung mit dem Extraktionsmittel  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurde die Probenvorbereitung analog Methode II c durchgeführt mit dem Unterschied, dass hierbei die C 18-Kartusche zum Einsatz kam (Methode II k). In nachfolgender Tabelle 25 werden die Ergebnisse der Methode II j zu I a sowie die Ergebnisse der Methode II k zu II c vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 25: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo im Vergleich von Methode I a zu II j und Methode II c zu II k (1. und 2. Messung) nach MSTD-Dotierung ( $\beta = 1 \text{ mg/L}$ ), Vergleich verschiedener SPE-Kartuschen,  $N=2$ ,  $n=3$

Angewandte Methode	Dotierungsmedium	Kartusche	AMO	Diketo	AMA
Methode I a	Citrat/EDTA (pH 3,3)	Oasis HLB Bond	35,1	60,8	64,1
Methode II j	Citrat/EDTA (pH 3,3)	Bond Elut C18	4,2	46,2	3,4
Methode II c	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2,0)	Bond Elut Plexa	35,9	66,7	12,9
Methode II k (1. Messung)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2,0)	Bond Elut C18	77,0	91,3	55,8
(2. Messung)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2,0)	Bond Elut C18	50,7	74,1	30,5

Die erreichten Wiederfindungen für AMO, Diketo und AMA, ermittelt über Methode II j, sind wesentlich geringer als über Methode I a. Daher war die Methode II j weniger

geeignet. Der Vergleich der Wiederfindungen von Methode II c zu II k ließ erkennen, dass der Einsatz der Bond Elut C 18-Kartusche eine signifikante Steigerung der Wiederfindung bewirkt hat.

Bis zu diesem Stand der Methodenoptimierung für AMO und seine Metabolite eignete sich die Methode II k am besten mit einer Wiederfindung für AMO mit 77,0 %, für Diketo mit 91,3 % und für AMA mit 55,8 %. In einer wiederholten Messung ließen sich die hohen Wiederfindungen annähernd reproduzieren (s. Tabelle 25).

#### *Anwendung von Methode II k auf Möhren*

Da Methode II k die höchsten Wiederfindungen lieferte, wurde der Versuch unternommen, die Extraktionsmethode auf Gemüsepflanzen, in diesem Fall auf Möhren, anzuwenden. Da die oben erprobten Bond Elut C 18-Kartuschen (100 mg/1 mL) sehr schnell durch Matrixbestandteile verstopften, kamen größere Kartuschen (bezogen auf Volumen und Sorbensmasse) Bond Elut C 18-Kartuschen (200 mg/3 mL) zum Einsatz (Methode II m). Laut Hersteller soll die Leistungskapazität der C18-Phasen, (100 mg/1 mL) sowie C18-Phasen, (200 mg/3 mL) adäquat sein, was jedoch nicht bestätigt werden konnte. Eine vergleichende Analyse über Methode II k (C 18-Kartusche, 100 mg/1 mL) und II m (C 18-Kartusche, 200 mg/3 mL) haben ergeben, dass die vom Durchmesser schmalere C 18-Kartusche (100 mg/1 mL) in Bezug auf die Wiederfindung besser für AMO und Diketo geeignet war (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo im Vergleich von Methode II k (SPE-Kartusche: C-18, 100 mg/1 mL) zu II m (SPE-Kartusche: C-18, 200 mg/3 mL) nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1\text{mg/L}$ ),  $N=2$ ,  $n=3$

Angewandte Methode	Dotierungs-medium	AMO	Diketo	AMA
Methode II k	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,0)	63,9	82,7	43,2
Methode II m		17,1	59,6	64,6

Jedoch lag das Endziel der Methodenentwicklung darin, eine Methode zu entwickeln, die eine hohe Wiederfindung der Analyten aus einer Gemüsematrix ermöglicht und nicht nur aus einer rein wässrigen Lösung. Hierzu wurden Möhrenblätter, -rüben und -wurzeln mit MSTD (bezogen auf Möhrenblätter/-rüben: 200  $\mu\text{g/kg}$  bzw. Möhrenwurzeln: 333  $\mu\text{g/kg}$ ) dotiert und aus praktikablen Gründen nach Methode II m über eine C 18 (200 mg/3 mL)-Kartusche aufgearbeitet. Die Wiederfindungen in den einzelnen Matrices sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über Methode II m aus Möhren nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L); SPE-Kartusche: C-18, 200 mg/3 mL), N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungsmedium	AMO	Diketo	AMA
Methode II m	Möhrenblätter	n.n.	n.n.	n.n.
	Möhrenrüben	12,5	2,8	n.n.
	Möhrenwurzeln	n.n.	34,8	n.n.

Die Ergebnisse zeigten sehr deutlich, dass die Pflanzenmatrix im Vergleich zur Wassermatrix einen erheblichen Einfluss auf die Wiederfindung hatte. Die Ursachen für die negativen Befunde bzw. geringen Wiederfindungen könnten in Suppressionseffekten liegen, die es noch zu untersuchen galt. Zuvor jedoch sollte noch der Einfluss des Elutionsmittels und der Elutionsmenge bei der Optimierung mit einbezogen werden.

*Kriterium III: Variation des Elutionsmittels und -volumens*

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der Wiederfindung von Elutionsvolumen wurde MSTD zum  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer dotiert und über Methode II m analysiert, wobei das herkömmliche Volumen von 3 mL ACN in zwei weiteren Ansätzen auf 5 mL (Methode III a) und 6 mL (Methode III b) erhöht wurde. Der Einfluss des Elutionsvolumens in Bezug auf die Wiederfindung ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Wiederfindung [%] von AMO, AMA, Diketo über Methode II m (C-18, 200 mg/3 mL) im Vergleich zu III a (C-18, 100 mg/1 mL) und III b (C-18, 100 mg/1 mL), nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungsmedium	AMO	Diketo	AMA
Methode II m	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 2,0	17,1	59,6	64,6
Methode III a		42,5	74,8	46,0
Methode III b		26,9	62,9	44,0

Die Untersuchungen ergaben, dass eine Elution mit 5 mL ACN zu den höchsten Wiederfindungen für AMO und Diketo führte, jedoch zu einer geringeren Wiederfindung für AMA. Dabei darf nicht ausser Acht gelassen werden, dass eine mögliche Umwandlung von AMO nach AMA zu Verlusten geführt haben könnte. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist die Elution mit 5 mL ACN empfehlenswert.

*Vergleich der Elutionsmittel*

In dieser Versuchsphase wurde ebenfalls ein Vergleich der Elutionsmittel ACN zu MeOH unter den Bedingungen der Hausmethode (Citrat/EDTA-Puffer) gezogen. Es war zu prüfen, ob ACN eine stärkere Elutionskraft als MeOH besitzt und dadurch die sorbierten Antibiotika bzw. Metabolite effektiver von dem SPE-Kartuschensorbens löst. In Bezug auf die Polaritäten unterscheiden sich MeOH (Rohrschneiders Polaritätsparameter  $P_{\text{MeOH}}$ : 5,1 und  $P_{\text{ACN}}$ : 5,8) nur unwesentlich voneinander, wobei ACN ein wenig polarer als MeOH ist [324]. Es wurden die Wiederfindungen der Hausmethode mit Methode III c (Elution mit 3 mL ACN) verglichen und in der Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Wiederfindung [%] von AMO, AMA und Diketo über die Hausmethode (Oasis) und Methode III c (Oasis) nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), N=2, n=3

Methoden	Dotierungs- methode	AMO	Diketo	AMA
Hausmethode	Citrat/EDTA (pH 4,1)	1,8	82,9	~ 0
Methode III c		1,8	47,9	~ 0

Beim Vergleich der Wiederfindungen der Hausmethode und Methode III c lässt sich erkennen, dass AMO, unabhängig vom Elutionsmittel, nur mit einer Wiederfindung von 1,8 % zu quantifizieren war. Jedoch verringerte sich die Wiederfindung von Diketo bei der Elution mit ACN sehr stark. Die Veränderung der Hausmethode durch den Austausch des Elutionsmittels führte somit zu keiner Optimierung. Das ACN war jedoch geeigneter unter den Bedingungen der Methode II k und Methode III a.

Nach Abschluss der Untersuchungen und Veränderungen der Parameter I bis III konnte eine Methode (Methode II k) entwickelt werden, die bislang die höchsten Wiederfindungen für AMO, AMA und Diketo aus einer dotierten wässrigen Lösung ermöglichte. So wurden über die Methode II k durchschnittlich 63,9 % AMO, 82,7 % Diketo und 43,2 % AMA wiedergefunden. Um eventuell eine noch höhere Wiederfindung für AMO zu erzielen, wurde nach weiteren möglichen Ursachen für die offensichtlichen Verluste gesucht.

#### 5.1.4 Weitere mögliche Ursachen für die Verluste an AMO

Bei der Suche nach weiteren Ursachen der z. T. geringen Wiederfindungen wurden Hinweise in der Literatur von Pérez-Parada et al. [325] und Grujic et al. verfolgt [326]. So zeigte die Publikation aus dem Jahre 2011 von Pérez-Parada et al. [325], dass AMO mit MeOH ein AMO-MeOH-Addukt bildet (s. Abbildung 25). Dieser Erkenntnis sowie weiteren möglichen Ursachen, wie z.B. dem Einfluss von Suppressionseffekten bei der MS-Detektion, wurde im Folgenden nachgegangen:

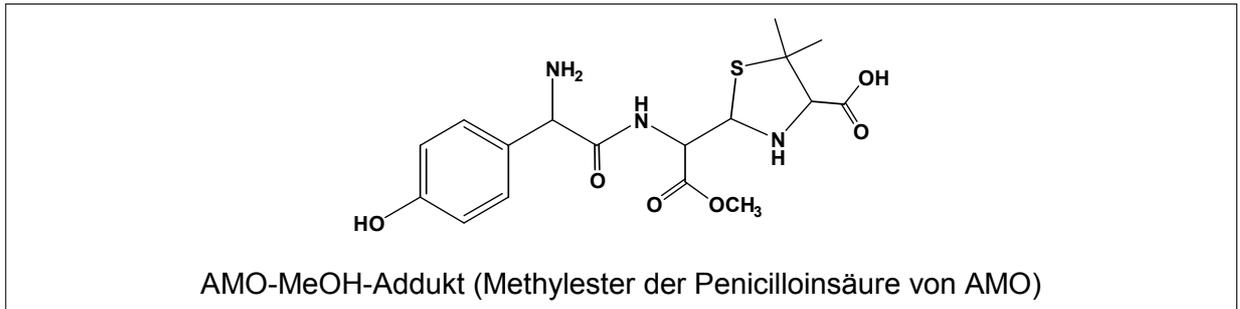


Abbildung 25: Strukturformel vom Methylester der Penicilloinsäure von AMO (AMO-MeOH-Addukt)

#### Massenspektrometrische Untersuchungen auf AMO-MeOH-Addukte

Die in dieser Arbeit gewonnenen massenspektrometrischen Daten zeigten das Addukt im Totalionen-Chromatogramm (TIC). Da bei den vorhergehenden Analysen das AMO immer zur Herstellung der Stammlösung in MeOH gelöst wurde, war zu klären, ob sich bereits in der Stammlösung das AMO-MeOH-Addukt bildet. Dazu wurde methanolische AMO-Stammlösung ( $\beta=1000$  mg/L) mit Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/L verdünnt, wie es in der Probenvorbereitung für die Dotierung üblich ist (s. Anhang A 2.1.6). Diese AMO-Standardlösung wurde mittels LC-MS/MS analysiert.

Die resultierenden Massenchromatogramme von AMO und AMO-MeOH-Addukt sind in Abbildung 26 dargestellt.

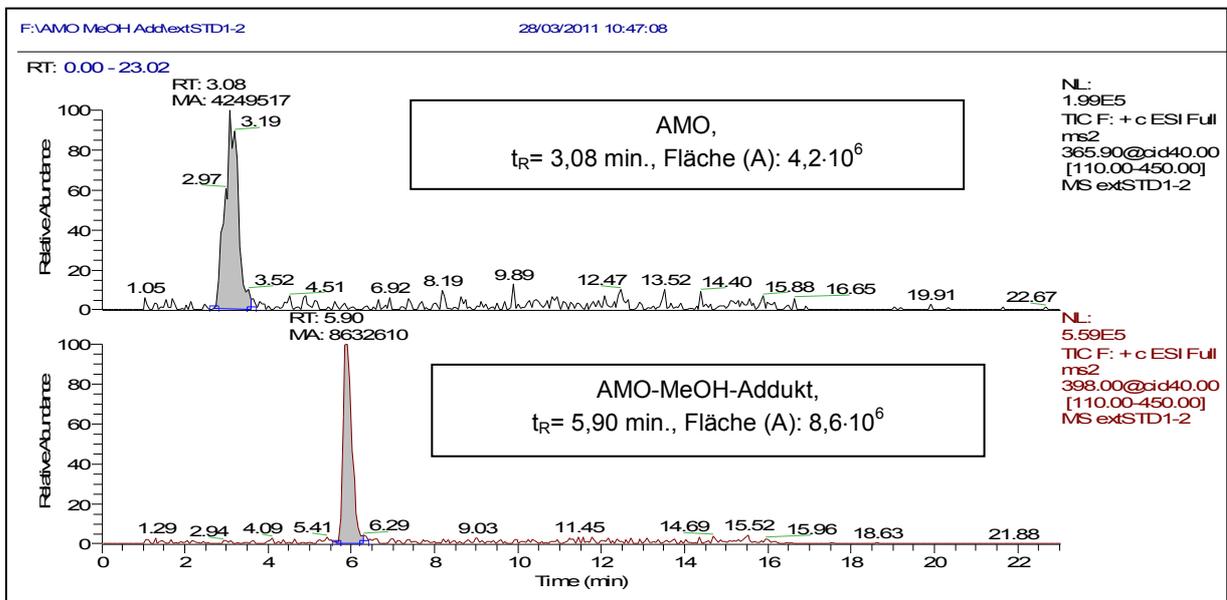


Abbildung 26: Massenchromatogramm (TIC) von methanolischem AMO ( $\beta=1$  mg/L),  $t_R = 3,08$  min und von AMO-MeOH-Addukt,  $t_R = 5,90$  min, LC-MS/MS-Full Scan

Die Chromatogramme lassen erkennen, dass sich tatsächlich bereits in der Standardlösung das AMO-MeOH-Addukt bildet. Im Vergleich dazu wurde eine rein wässrige AMO-Stammlösung ( $\beta=1$  mg/L) als externer Standard gemessen. Abbildung 27 zeigt das erhaltene Massenchromatogramm.

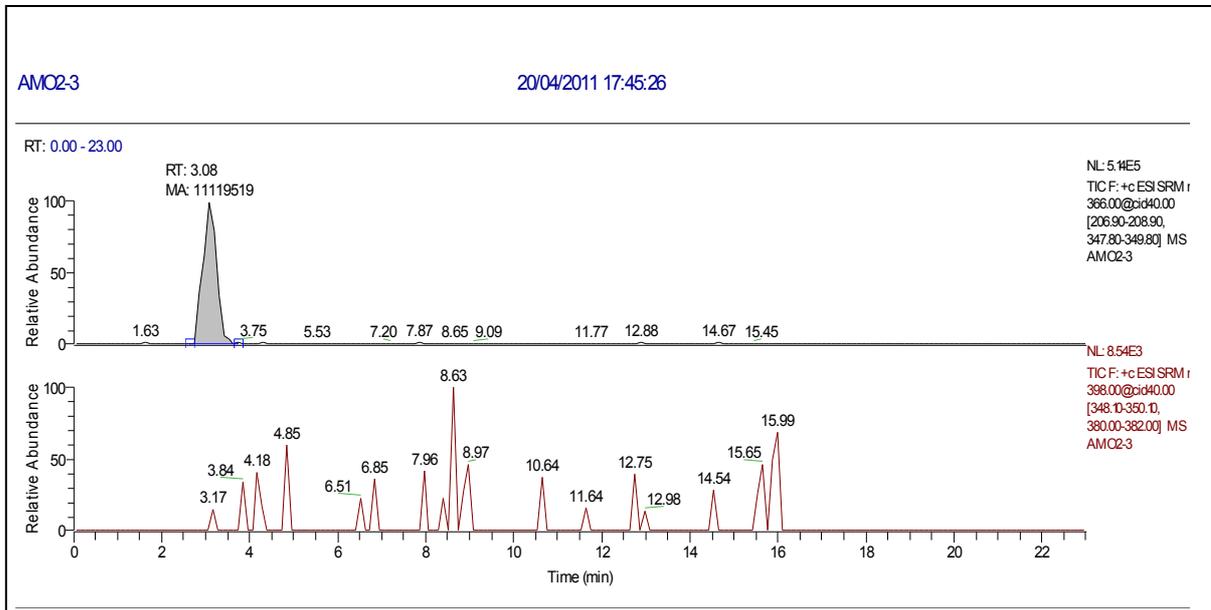


Abbildung 27: Massenchromatogramm von rein wässriger AMO-Lösung ( $\beta=1$  mg/L),  $t_R=3,08$  min, LC-MS/MS, SRM-Modus

Erwartungsgemäß ist bei Abwesenheit von MeOH kein Signal des Adduktes im SRM-Modus,  $MS^2$  bei  $m/z=398$  zu erkennen.

Es stellte sich die Frage, ob AMO durch die Summe der Flächen von AMO und AMO-MeOH-Addukt quantifiziert werden kann, falls ein Gemisch beider Komponenten vorliegt. Eine Voraussetzung dazu wäre, dass die Bildung des AMO-MeOH-Adduktes proportional zur AMO-Konzentration verläuft und reproduzierbar ist. Hierzu wurde eine Kalibriergerade aufgestellt, wobei verschiedene Konzentrationen an AMO zum Citrat/EDTA-Puffer dotiert wurden (Konzentrationen der Messproben: 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L und 3,0 mg/L). Die dotierten Citrat/EDTA-Puffer wurden nach Methode I a (vgl. Tabelle 17) aufgearbeitet und analysiert. Die Peak-Flächen von AMO und dem AMO-MeOH-Addukt sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 30: Peak-Flächen im MS-Spektrum in Abhängigkeit von der AMO-Konzentration, N=2, n=3

Konzentration der Messlösung	Fläche AMO	Fläche [AMO-MeOH-Addukt]	Fläche der Summe: [AMO]+[AMO-MeOH-Addukt]
0,5 mg/L	$1,9 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$
1,0 mg/L	$4,0 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^6$	$10,9 \cdot 10^6$
2,0 mg/L	$7,2 \cdot 10^6$	$12,0 \cdot 10^6$	$19,2 \cdot 10^6$
3,0 mg/L	$11,3 \cdot 10^6$	$19,3 \cdot 10^6$	$30,6 \cdot 10^6$

Die ermittelten Peakflächen führten zu der in Abbildung 28 dargestellten Kalibrierfunktion:

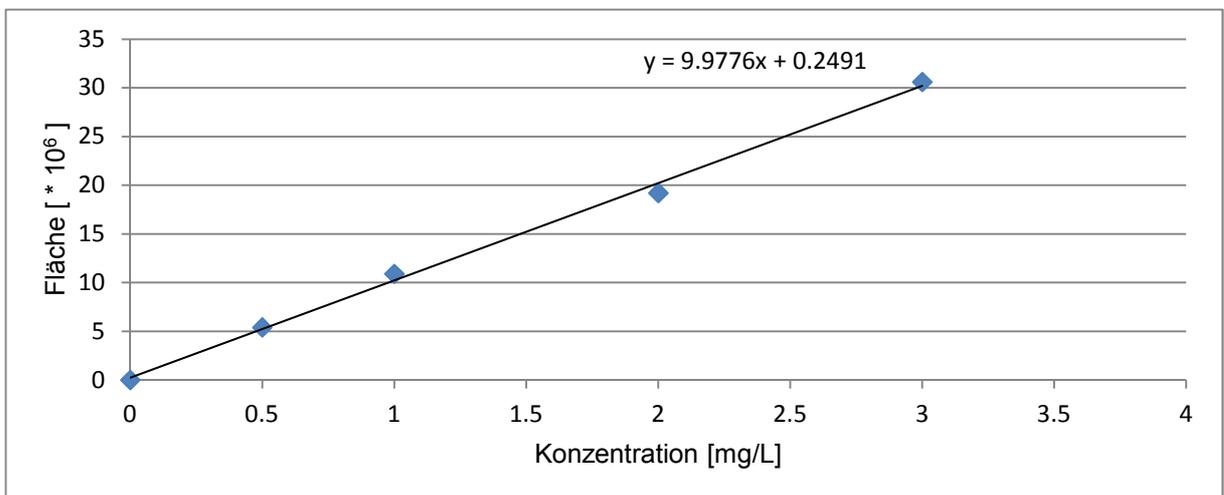


Abbildung 28: AMO-Konzentration gegen Fläche [AMO]+[AMO-MeOH-Addukt]

Die Funktion zeigt eine Linearität mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,9968$ . Somit wäre eine Quantifizierung des Amoxicillin-Gehaltes über die Summe von AMO und AMO-MeOH-Addukt prinzipiell möglich. Wichtig hierbei ist, dass reproduzierbare Bedingungen während der Probenvorbereitung und der Chromatographie eingehalten werden, die zu konstanten AMO-MeOH Massen-Verhältnissen führen.

Alternativ stellte sich die Option, eine methanolfreie Probenaufbereitung zur Quantifizierung von AMO zu erproben, da bei Abwesenheit von MeOH die Bildung des AMO-MeOH-Adduktes unterbunden wäre. Dazu wurde zum einen als Vergleich AMO, wie herkömmlich in MeOH gelöst, zu dem Citrat/EDTA-Puffer dotiert und nach Methode I a aufgearbeitet. Zum anderen wurde die gleiche Methode methanolfrei (AMO in Wasser gelöst) durchgeführt. Die Wiederfindungen der methanolhaltigen und -freien Probenvorbereitung sind in nachfolgender Tabelle 31 dargestellt:

Tabelle 31: Wiederfindung [%] von AMO und AMO-MeOH-Addukt über Methode I a methanolhaltig und -frei nach AMO-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), SPE-Kartusche: Oasis HLB Bond, N=2, n=3

methanolhaltig		Methanolfrei	
AMO	AMO-MeOH-Addukt	AMO	AMO-MeOH-Addukt
~ 0	60,5	~ 0	~ 0

Nach der methanolhaltigen Methode I a war kein AMO-Signal erkennbar, jedoch konnte das AMO-MeOH-Addukt zu 60,5 % wiedergefunden werden. Die methanolfreie Variante hingegen führte zu keinerlei Wiederfindungen. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist die methanolfreie Aufarbeitung mit dem Citrat/EDTA-Puffer und der Oasis HLB Bond Kartusche nicht geeignet.

In den vorangegangenen Phasen der Methodenentwicklung stellte sich die Methode II k als die bislang optimalste heraus, weil mit ihr maximale Wiederfindungen von 77,0 % für AMO, 91,3 % für Diketo und 55,8 % für AMA erreicht wurden (s. Tabelle 32).

Ein weiterer Untersuchungsschritt sollte die Frage klären, ob sich die AMO-Wiederfindung bei Anwendung der Methode II k verändert, wenn eine methanolfreie, rein wässrige AMO-Standardlösung dotiert wird. Die Wiederfindungsergebnisse von AMO über Methode II k (methanolhaltig) und II k (methanolfrei) sind in Tabelle 32 gegenübergestellt:

Tabelle 32: Wiederfindung [%] von AMO über Methode II k (methanolische Stammlösung) und Methode II k (wässrige Stammlösung) nach AMO-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), SPE-Kartusche: C-18 (100mg/ 1mL); N=2, n=3

Angewandte Methode	Dotierungsmedium	AMO
Methode II k "methanolhaltig"	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,0)	77,0
Methode II k "methanolfrei"		74,8

Die Gegenüberstellung der Wiederfindungen zeigt, dass diese in der gleichen Größenordnung liegen. Die methanolfreie Methode der Probenaufbereitung erbrachte ebenfalls eine gute Wiederfindung und verhinderte gleichzeitig die Adduktbildung von AMO mit MeOH. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit eine neue Probenaufbereitungsmethode für die Bestimmung von AMO und seiner Metabolite aus wässrigen Lösungen entwickelt werden. Ob zusätzlich Suppressionseffekte durch Matrixbestandteile bei der massenspektrometrischen Detektion einen Einfluss auf die Wiederfindung hatten, zeigten die anschließenden Untersuchungen.

### Untersuchung auf Suppressioneffekte durch Matrixbestandteile

Bei der Extraktion von AMO aus Pflanzenbestandteilen, wie z.B. aus Organen der Möhrenpflanze (Blätter, Rüben, Wurzeln), bestand die Möglichkeit, dass bei der SPE-Probenaufbereitung Matrixbestandteile koeluiieren und in die Messprobe gelangen. Diese könnten die Ionenausbeute in der ESI-Quelle durch Suppressioneffekte erniedrigen und dadurch die Quantifizierung von AMO verfälschen. Mit einer externen Kalibrierung waren diese Suppressioneffekte nicht erfassbar und müßten daher in einem weiteren Schritt mit der oben genannten Methode II m (methanolfrei) überprüft werden. Hierzu wurden unbelastete Möhrenblätter (Kontrollpflanze aus dem Hydrokulturexperiment) nach Methode II m (methanolfrei) aufgearbeitet, bis zur Trockene eingengt, anschließend mit einer wässrigen AMO-Standardlösung ( $\beta=1$  mg/L) aufgenommen und mittels LC-MS/MS analysiert. Der Einfluss der Matrixbestandteile wurde durch den Vergleich der Signalfächen von der AMO-Kalibrierlösung mit der Pflanzenmatrix (Möhrenblätter) und der Vergleichslösung ohne Matrix deutlich.

Die Abbildung 29 zeigt das Massenchromatogramm eines Möhrenblätterextraktes, dessen Rückstand bei der Probenaufbereitung mit AMO-Standardlösung aufgenommen wurde.

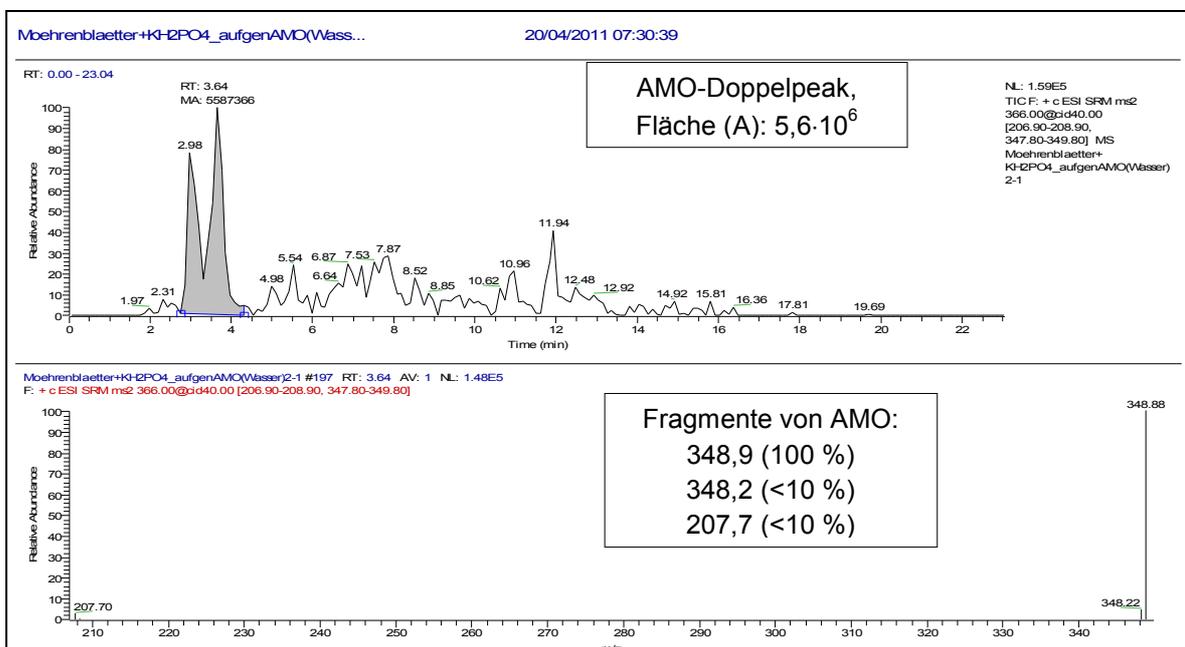


Abbildung 29: Massenchromatogramm und Fragmentspektrum eines Möhrenblätterextraktes, aufgenommen mit wässriger AMO-Standardlösung, ( $\beta=1$  mg/L),  $t_R=2,98$  min u. 3,64 min, LC-MS/MS, SRM-Modus

Das Chromatogramm zeigt zwei Signale (AMO-Doppelpeak) bei  $t_R=2,98$  min und 3,64 min, deren Fragmentspektren identisch sind. Es wurde vermutet, dass AMO in verschiedenen Formen vorliegen kann. Nach Yongxin et al. [327] ist bekannt, dass AMO als L- und D- Stereoisomer vorkommen kann (s. Abbildung 30). Eventuell wurde das

dotierte AMO (D-Form) während der Probenvorbereitung teilweise in L-AMO umgewandelt.

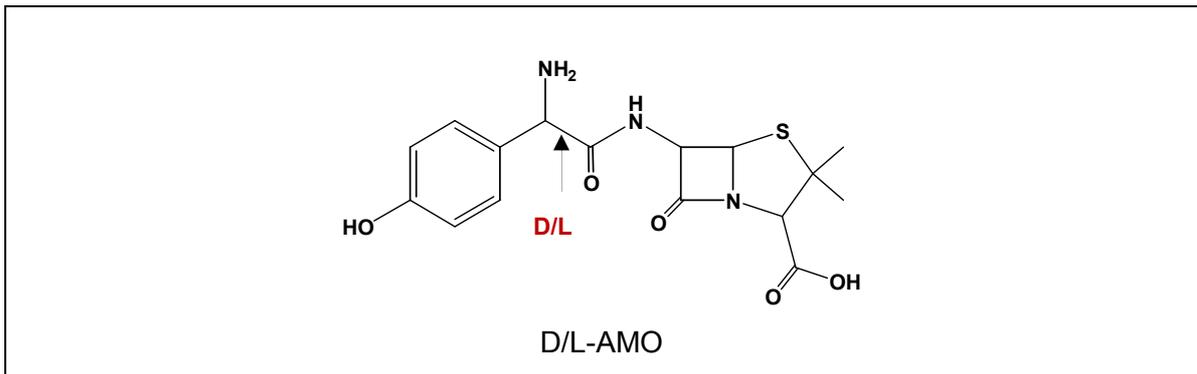


Abbildung 30: Struktur von D- und L-AMO nach [327]

Das folgende Chromatogramm zeigt AMO-Natrium, wobei das L-AMO als kleiner Peak vor dem D-AMO erscheint (s. Abbildung 31) [327].

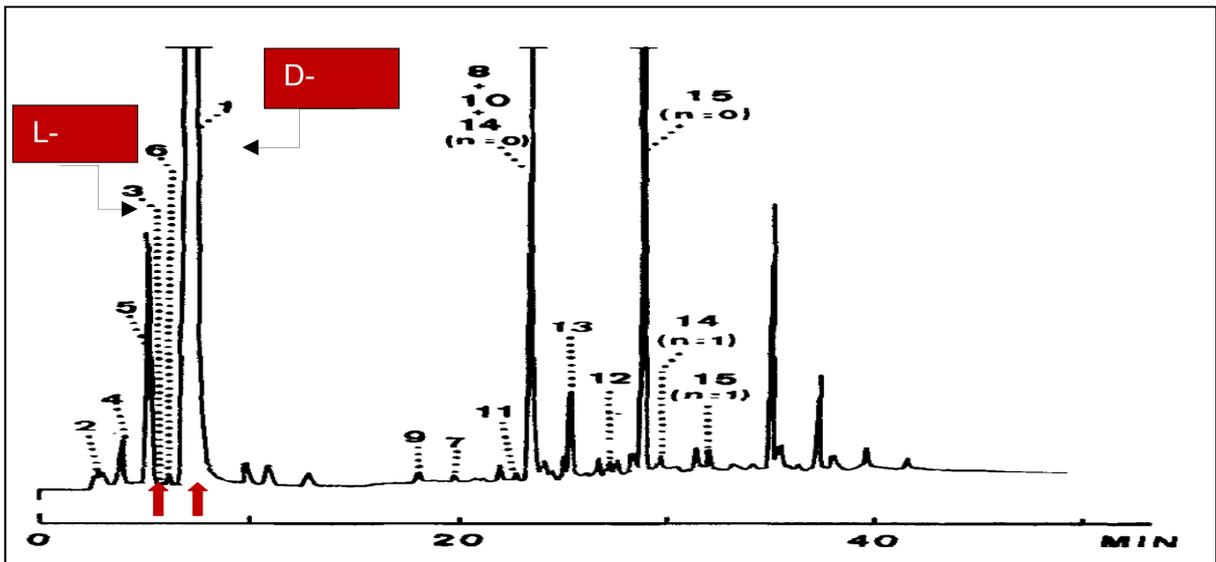


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm von AMO·Na (mit L-AMO und D-AMO) und verwandte Verbindungen [327]

Die AMO-Wiederfindung wurde über die Gesamtfläche beider Peaks in Bezug auf die Fläche des externen Standards berechnet (vgl. Abbildung 29 und Abbildung 32).

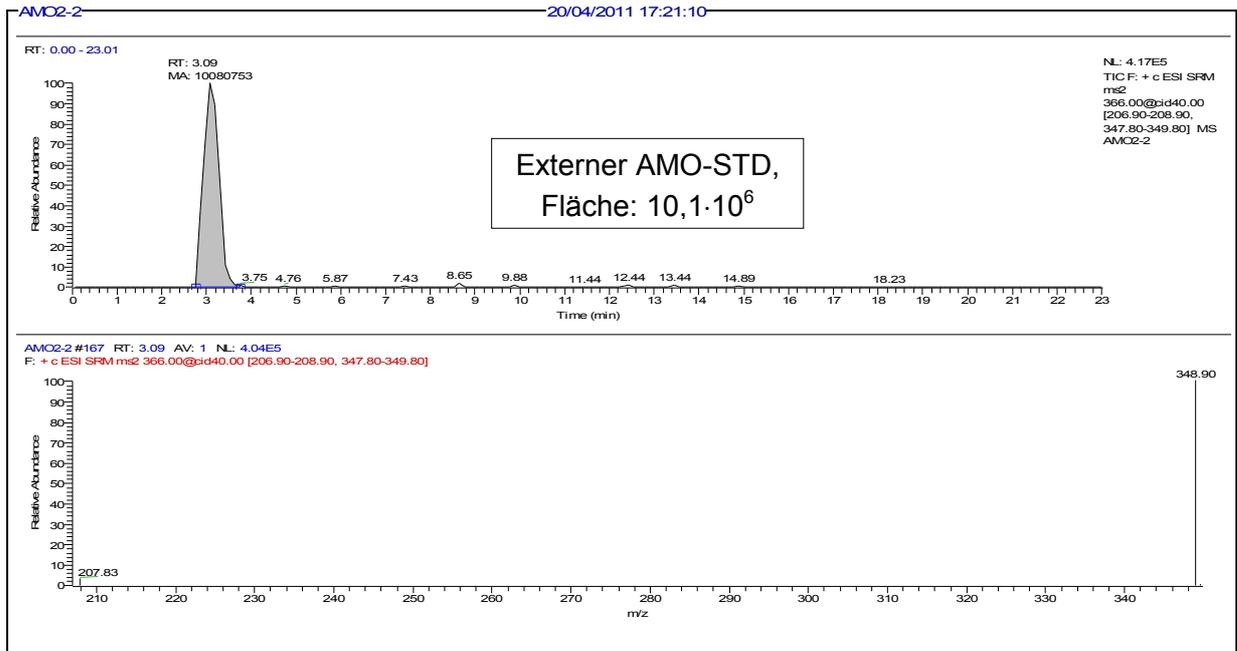


Abbildung 32: Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von wässrigem AMO-Standard, ( $\beta=1$  mg/L),  $t_R=3,09$  min, LC-MS/MS, SRM-Modus

Der Flächen (A) - Vergleich (Möhrenblätter-Eluat:  $A=5,6 \cdot 10^6$  und externer AMO-STD:  $A=10,1 \cdot 10^6$ ) zeigte, dass eine relativ hohe Signalsuppression durch Matrixbestandteile vorlag, da die Wiederfindung von AMO nur 56,4 % betrug.

Nachdem diese Suppressionseffekte erkannt wurden, wurde der Versuch unternommen, Möhrenblätter mit AMO-Standardlösung ( $\beta=1$  mg/L) zu dotieren, diesen Wirkstoff mittels Methode II m (methanolfrei) zu extrahieren und zu quantifizieren. Die Rückstandsanalyse dieser Pflanzenprobe hatte jedoch keinen Nachweis von AMO erbracht (s. Abbildung 33).

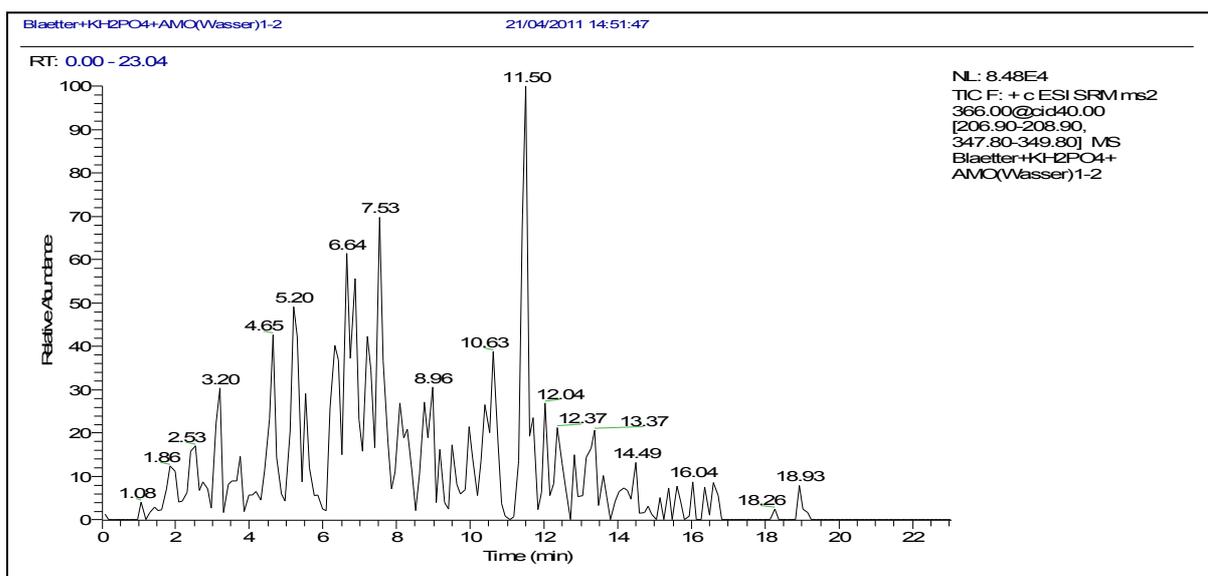


Abbildung 33: Massenchromatogramm eines Möhrenblätterextraktes, dotiert mit wässrigem AMO-Standard, ( $\beta=1$  mg/L), Aufarbeitung nach Methode II m (methanolfrei), LC-MS/MS, SRM-Modus, kein AMO nachweisbar

Somit spielen neben den Suppressionseffekten weitere Einflüsse eine Rolle, die es noch zu untersuchen gilt. Möglicherweise wurde die Extraktionseffektivität durch die Anwesenheit von Matrixbestandteilen beeinflusst, da diese eventuell mit dem AMO wechselwirken.

Aufgrund der Vorerfahrungen in der Rückstandsanalyse von Gemüse war es unwahrscheinlich, dass die Ursache dieser "Nullbefunde" an der SPE-Methode lag, da bei reiner Extrakt-Lösung Wiederfindungen von max. 77,0 % für AMO erzielt werden konnten (s. Tabelle 25). Eine Möglichkeit könnte jedoch sein, dass spezielle Pflanzeninhaltsstoffe, wie z.B. Enzyme, die Antibiotika umwandeln könnten und diese somit nicht mehr von der massenspektrometrischen Methode miterfasst würden. Es besteht der Verdacht, dass der Abbau von AMO durch die Freisetzung von Enzymen ins Zytosol während der Probenvorbereitung durch Zerreiben (Homogenisierung) der Pflanzenproben beschleunigt wird [378]. Gemäß Aga [30] besitzen Pflanzen einen Entgiftungsmechanismus, wobei die Glutathion-S-Transferase eine wichtige Rolle spielt. Dabei werden Glutathion-Konjugate gebildet, wie z.B. das Chlortetracyclin-Glutathion-Konjugat, welches den Wirkstoff CTC unwirksam macht (vgl. Kapitel 3.3.3). Dieses Verhalten ist jedoch nicht auf alle Pflanzenarten übertragbar. So zeigte Mais ein solches Verhalten, Pintobohnen aber nicht [30]. Inkorporierte Antibiotika können in der pflanzlichen Zellvakuole gespeichert und dort bereits abgebaut werden [376, 377]. Diese weiterhin bestehenden Unklarheiten hinsichtlich der Nachweisbarkeit von AMO und seiner Metabolite in Pflanzen, erfordert weiteren Forschungsbedarf.

### **5.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Methodenentwicklung**

Die Methodenentwicklung für die Bestimmung von Amoxicillin und seiner Metabolite in Gemüseproben wurde zunächst nur nach Dotierung des Extraktionsmittels ohne Pflanzenmatrix durchgeführt. Bei der Optimierung wurde neben verschiedenen Extraktionslösungen, der pH-Wert der Extraktionslösung, die eingesetzten SPE-Festphasen-Kartuschen, Konditionierungsschritte und die Elution (Elutionslösung, Elutionsvolumen) variiert. Dabei konnte die Methode II k erstellt werden (s. Tabelle 33), die aus der Extraktionslösung eine maximale Wiederfindung von 77,0 % für AMO, 91,3 % für Diketo und 55,8 % für AMA ergab.

Tabelle 33: Probenvorbereitung nach Methode II k und Wiederfindungen [%] von AMO, AMA und Diketo nach MSTD-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), SPE-Kartusche: C18 (100 mg/1 ml); N=2, n=3

Methoden II k	AMO	Diketo	AMA
Wiederfindung	77,0 %	91,3 %	55,8 %

Da AMO mit MeOH zu einem AMO-MeOH-Addukt reagiert und somit eine direkte Quantifizierung des AMO erschwert wurde, wurde eine methanolfreie Aufarbeitung vorgezogen. Das bedeutete, dass der MSTD nur in bidest. Wasser gelöst wurde und die Konditionierungsschritte aus der Zugabe von ACN, bidest. Wasser und TCA bestand (vgl. Tabelle 34). Diese Veränderung hatte keine Auswirkungen auf die Wiederfindung von Diketo und AMA.

Tabelle 34: Probenvorbereitung der methanolfreien Methode II k und Wiederfindungen [%] nach AMO-Dotierung ( $\beta=1$  mg/L), N=2, n=3

Kartusche	Extraktionsmittel	Konditionierung	Waschen	Elution	Wiederfindung von AMO
Bond Elut -C18 100mg/1mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=2,0)	3 mL ACN, 3 mL Wasser, 3 mL TCA	2 mL TCA, 2 mL Wasser	3 mL ACN	74,8 %

Die Anwendung dieser Methode auf antibiotikadotierte Pflanzen brachte nur geringe bis gar keine nachweisbaren Wiederfindungen. Somit ist die Methodenentwicklung, trotz der positiven Optimierungsschritte mit wässrigen Multistandardproben, für Gemüseproben noch nicht zufriedenstellend abgeschlossen. Untersuchungen auf Suppressionseffekte aus der Pflanzenmatrix "Möhrenblätter" ergaben, dass deutliche Effekte vorliegen und ursächlich zu verringerten Wiederfindungen (56,4 %) beitragen. Ebenso führte die Methode, angewandt auf dotierte Möhrenblätter, zu keiner Wiederfindung, was darauf hindeutete, dass neben den Suppressionseffekten noch andere Ursachen für die Verluste verantwortlich sein müssten. Es stellte sich zudem die Frage, ob die Gemüsepflanzen artspezifische Inhaltsstoffe enthalten, welche die dotierten Antibiotika zu noch nicht identifizierten Produkten umsetzen würden. Zur Klärung dieser Frage besteht weiterer Forschungsbedarf.

## 5.2 Validierung

Die vorliegenden Validierungsergebnisse ausgewählter Antibiotika beziehen sich auf die neu entwickelte Probenvorbereitung (Methode II k) und anschließender LC-MS/MS-Analytik von Rotkohl- und Möhrenproben. Hierbei wurden die Parameter "Wiederfindung",

“Meßpräzision“, “Nachweis- und Bestimmungsgrenze“, “Selektivität“ und “Matrixeffekte“ bestimmt (s. Anhang A. 2.2.3).

### 5.2.1 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung über die neu entwickelte Methode II k wurden die Kontrollproben von Rotkohlblättern und Möhrenrüben aus der Hydrokultur mit Mischstandard dotiert (150 µg/kg FG), aufgearbeitet und die Messlösung jeweils zehnfach in die LC-MS/MS injiziert. Die daraus resultierenden Wiederfindungen sind in Tabelle 35 zusammengefasst und werden mit der bisher eingesetzten Methode verglichen.

Tabelle 35: Wiederfindung für die Bestimmung von Antibiotika aus Kontrollproben von Rotkohlblättern und von Möhrenrüben aus der Hydrokultur (Dotierung 150 µg/kg FG, Matrixkalibrierung, Methode II k, LC-MS/MS, N=2, n=10, fettgedruckt: eingesetzte Antibiotika, nicht fett: Metabolite) im Vergleich zur Hausmethode (Weißkohlblätter)

Analyt	Wiederfindung (WF) [%] über Methode II k		WF [%] über Hausmethode [41]
	Rotkohlblätter	Möhrenrüben	Weißkohlblätter
<b>ENR</b>	98,6	88,1	65,3
*e-keto-CTC + *e-enol-CTC + <b>CTC</b>	93,2	98,8	91,3
*e-iso-CTC + iso-CTC	84,8	94,1	61,9
<b>**AMO</b>	77,0		n.b.
<b>**Diketo</b>	91,3		n.b.
<b>**AMA</b>	55,8 (aus der Extraktionslösung) 50,8 (aus der Möhrenmatrix)		n.b.
<b>MON</b>	45,1	34,4	49,0
<b>SFD</b>	~ 0	~ 0	38,3
CIP	89,6	115,9	62,4
*e-TC + TC	100,0	88,2	60,0
*e-DC + DC	97,3	90,4	57,9
*e-OTC + OTC	72,2	87,2	64,3
*e-DMC + DMC	100,0	70,4	65,2

\* nicht dotiert

\*\*Bestimmung aus der wässrigen Extraktionslösung ohne Pflanzenmatrix

Vergleicht man die Wiederfindungen der Methode II k mit der Hausmethode, dann kann generell erkannt werden, dass die Mehrzahl der Wiederfindungen der zu analysierenden Wirkstoffe mit der neu entwickelten Methode höher sind und daher für die Analytik von Vorteil. Dabei handelt es sich um die Wirkstoffe: ENR, CTC und seine Epimere (bei den Tetracyclinen wurde die Summe der Muttersubstanz und ihrer Epimere ermittelt), CIP, TC, DC, OTC und DMC. Die Wiederfindungsgehalte dieser Wirkstoffe erfüllen zudem die EU-Richtlinie 2002/657/EG, die einen Wiederfindungsbereich von 70 bis 110 % als hinreichend beschreibt. Jedoch ist der Wirkstoff SFD über die neuentwickelte Methode

nicht bestimmbar, mit der früheren Hausmethode jedoch zu ca. max. 38,3 %. AMO und seine Metabolite (Ausnahme von AMA in Möhrenmatrix) können aus den Pflanzenmatrices nicht bestimmt werden, jedoch aus der reinen wässrigen Extraktionslösung. Somit besteht noch Optimierungsbedarf. Die Bestimmung von SFD muss über die Hausmethode erfolgen. Die geringen Wiederfindungen von SFD können durch Suppressionseffekte begründet werden.

### 5.2.2 Messpräzision

Der Begriff Präzision beschreibt die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse. Die Streuung einzelner Ergebnisse ist die Folge von zufälligen Fehlern. Die DIN 55350-13 weist darauf hin, dass ein Analyseverfahren umso präziser arbeitet, je kleiner die "zufälligen Ergebnisabweichungen" des Analyseverfahrens sind. Das Maß für die zufälligen Fehler beschreibt die Mess- und Methodenpräzision, wobei sich die Messpräzision auf zufällige Fehler bei der Durchführung des gesamten Analyseverfahrens bezieht. Die Präzision wird in Form der relativen Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) ausgedrückt. Zur Ermittlung der Meßpräzision wurden Rotkohl- und Möhrenproben aus der Hydrokultur-Anzucht mit Standard dotiert (Dotierung 150 µg/kg FG, Doppelbestimmung), nach der Methode II k (bzw. SFD nach der Hausmethode) aufgearbeitet und mittels LC-MS chromatographisch (n=10) vermessen. Die relative Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) für die verschiedenen Wirkstoffe nach der Methode II k sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Tabelle 36: Relative Standardabweichung als Maß für die Messpräzision nach Methode II k bzw. SFD nach Hausmethode (\*  $s_{rel}$  aus der wässrigen Extraktionslösung)

Analyt	Relative Standardabweichung( $s_{rel}$ ) in %	
	Rotkohl	Möhren
ENR	10,7	4,0
CTC + e-CTC	7,3	4,1
Iso-CTC + e-iso-CTC	7,6	11,1
*AMO	6,3	8,2
*Diketo	4,2	4,1
*AMA	7,2	5,8 (aus der Möhrenmatrix)
MON	4,9	6,2
SFD	5,4	4,9
CIP	8,0	6,7
e-TC + TC	5,4	6,4
e-DC + DC	9,9	10,2
e-OTC + OTC	2,3	2,3
e-DMC + DMC	9,8	10,4

Die relativen Standardabweichungen belegen mit Werten für Rotkohlblätter 2,3 bis 10,7 % und für Möhrenrüben 2,3 bis 11,1 % die hohe Messpräzision des LC-MS/MS-Verfahrens. Die EU-Richtlinie 2002/657/EG besagt, dass die Messpräzision einer Methode eine maximale Standardabweichung von 20 % noch akzeptiert [328, 334]. Somit ist das Kriterium der Messpräzision erfüllt.

### 5.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze stellt die kleinste qualitativ noch nachweisbare Konzentration einer Substanz dar, wobei die Präzision außer Acht bleibt.

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Konzentration einer Substanz, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann [329, 330, 331].

Unter Beachtung der DIN 32645 zur Durchführung der Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden Kontrollproben von Rotkohl- und Möhrenpflanzen aus Hydrokultur jeweils sechsfach analysiert und mit Matrixkalibrierung quantifiziert. Die gewählten Dotierungen lagen im Bereich von 1 bis 100 µg/kg FG. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms „Valoo“ [332]. Die Nachweis (NWG)- bzw. Bestimmungsgrenze (BG) der einzelnen Wirkstoffe sind in Tabelle 37 aufgeführt:

Tabelle 37: Nachweis- und Bestimmungsgrenze (µg/kg) der Wirkstoffe in Rotkohl und Möhren über die Methode II k bzw. SFD über Hausmethode (\*aus der reinen wässrigen Extraktionslösung KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Analyt	Rotkohlblätter		Möhrenrüben	
	NWG	BG	NWG	BG
ENR	3,2	11,0	8,8	28,8
e-keto-CTC + e-enol-CTC + CTC	3,1	10,5	4,2	13,7
e-iso-CTC + iso-CTC	3,7	12,1	2,9	10,2
*AMO	6,7	14,3	6,7	14,3
*Diketo	6,2	12,4	6,2	12,4
*AMA	5,9	10,4	12,3	34,9
MON	7,2	24,8	8,7	32,1
SFD	6,8	34,5	7,6	24,8
CIP	3,5	11,9	5,3	17,5
e-TC + TC	4,7	9,2	9,8	20,9
e-DC + DC	7,9	20,4	6,8	18,4
e-OTC + OTC	6,2	12,4	7,3	19,0
e-DMC + DMC	5,3	15,2	5,9	22,3

Die mit der MS/MS-Detektion ermittelten Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen für die verschiedenen in Rotkohlmatrix dotierten Antibiotika liegen zwischen 3,1 bis 7,2 µg/kg

(NWG) und 9,2 bis 34,5 µg/kg (BG). Für Möhrenrüben wurden NWG im Bereich von 2,9 bis 12,3 µg/kg und BG von 10,2 und 34,9 ermittelt. Somit können mit dieser Methode auch geringe Antibiotikagehalte im ein- bis zweistelligen µg/kg Bereich quantifiziert werden.

#### 5.2.4 Selektivität

Die Selektivität als Validierungsparameter soll zeigen, ob die gewählte Analysenmethode im Stande ist, bestimmte Wirkstoffe aus einer komplexen Matrix ohne Interferenzen zu messen [330]. Sowohl ein Vergleich der Retentionszeiten als auch der Fragmentspektren der Analyten in einer Standardlösung zu denen der Probe (Wirkstoff in Matrix gebunden) soll gemäß EU-RL 2002/657 Hinweise zur Selektivität bringen [333]. Die Retentionszeit des Analyten in der Probelösung darf max. 5 % von der Retentionszeit der Standardlösung abweichen. Für die Fragmentspektren gilt, dass für die genaue Bestimmung eines Analyten mindestens drei Identifizierungspunkte (ein Precursor-Ion und zwei Produkt-Ionen) benötigt werden, wobei die relativen Ionenintensitäten max. +/- 50 % von dem vergleichenden Analyten in der Standardlösung abweichen darf [334].

Zunächst wurde zur Prüfung der Selektivität der LCMS-Methode ein Vergleich der Retentionszeit von Analyten aus einer Rotkohl- und Möhrenpflanze nach Dotierung mit einem externen Multistandard gezogen (s. Tabelle 38).

Tabelle 38: Vergleich der Retentionszeiten als Maß für die Selektivität nach Methode II k (Dotierung: 250 µg/kg FG, Mischstandard β=1 mg/L, Rotkohlblätter und Möhrenrüben aus Hydrokultur, Doppelbestimmung, LC-MS, n=3)

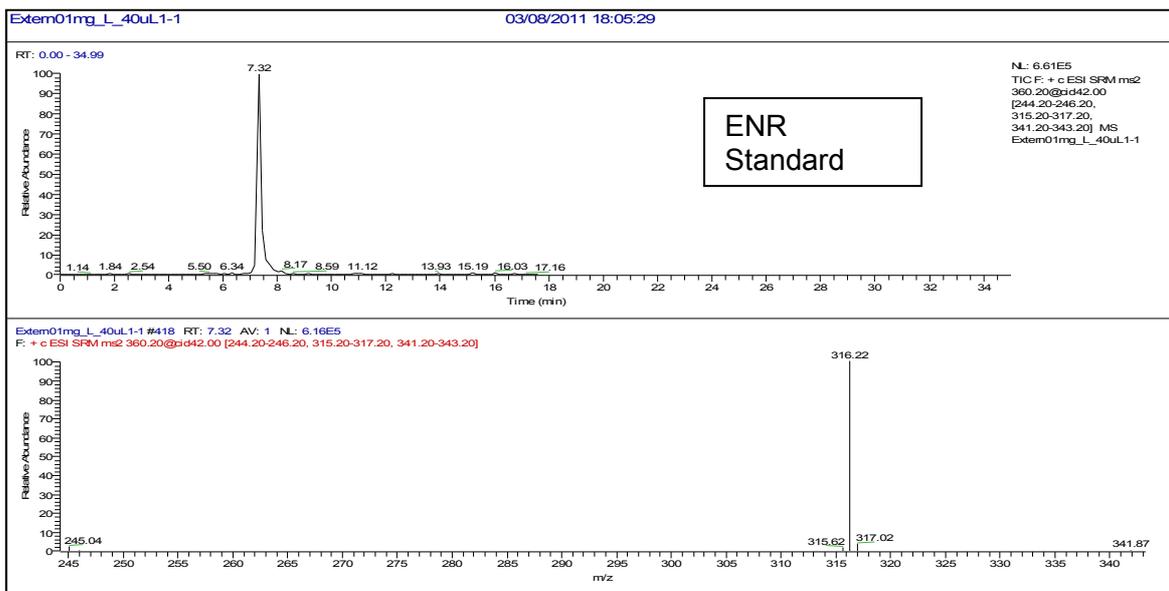
Analyt	Retentionszeit Externer Standard [min]	Retentionszeit-Matrix [min]	
		Rotkohl	Möhren
ENR	7,32	7,33	7,14
CTC	10,56	10,58	10,39
e-keto-CTC	7,31	7,32	7,22
e-enol-CTC	8,89	8,89	8,80
Iso-CTC	8,18	8,19	8,12
e-iso-CTC	6,92	6,92	6,87
AMO	3,09	n.n.	n.n.
Diketo	6,72	n.n.	n.n.
AMA	2,91	n.n.	3,00
SFD	5,60	5,69	5,60
CIP	6,41	6,49	6,38
TC	7,22	7,32	7,14
e-TC	6,23	6,28	6,17
DC	11,84	11,89	11,73
e-DC	11,14	11,20	10,99
OTC	6,29	6,34	6,19

Analyt	Retentionszeit Externer Standard [min]	Retentionszeit-Matrix [min]	
		Rotkohl	Möhren
e-OTC	6,01	6,20	5,94
DMC	8,63	8,66	8,55
e-DMC	7,50	7,52	7,46

Der Vergleich der Retentionszeiten zeigt, dass die Kriterien hinsichtlich der zulässigen 5 % Differenz nicht überschritten sind. Somit ist eine hinreichende Selektivität der LCMS-Methode gegeben.

### Selektivitätstest durch Vergleich ausgewählter MS-Spektren

Ein weiteres Kriterium hinsichtlich der Selektivität einer LCMS-Methode ist die Übereinstimmung der Fragmentspektren der Analyt-Peaks aus den Standardlösungen zu den Spektren der zu untersuchenden Probe. Beispielhaft wurden die MS-Spektren von ENR aus der Standardlösung mit dem dotierten Analyten aus den Rotkohlproben verglichen und in Abbildung 34 gegenübergestellt.



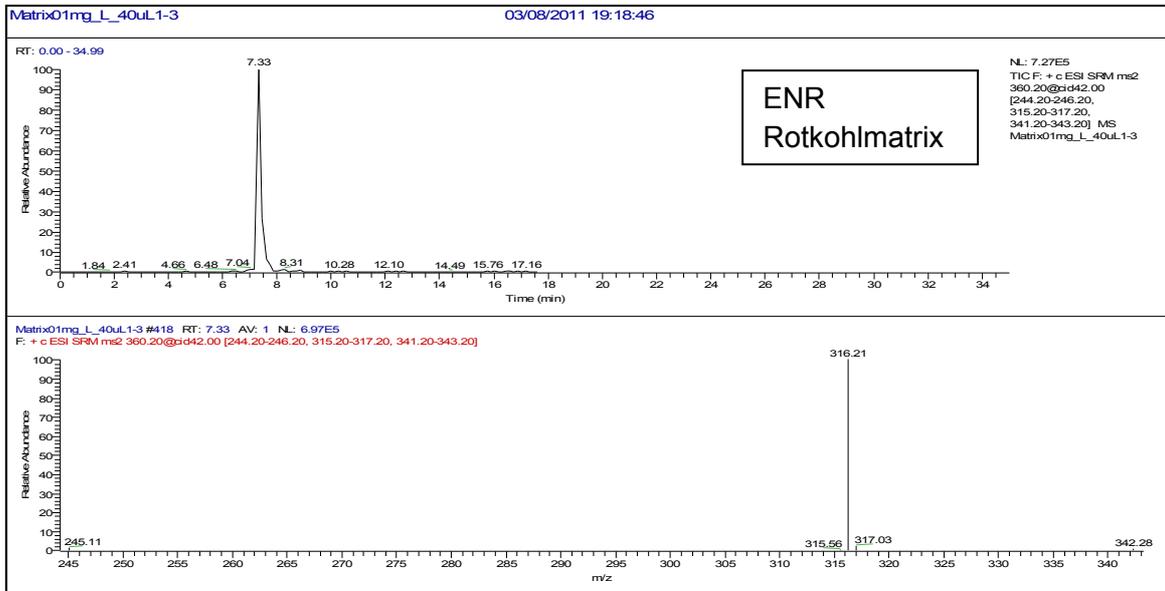
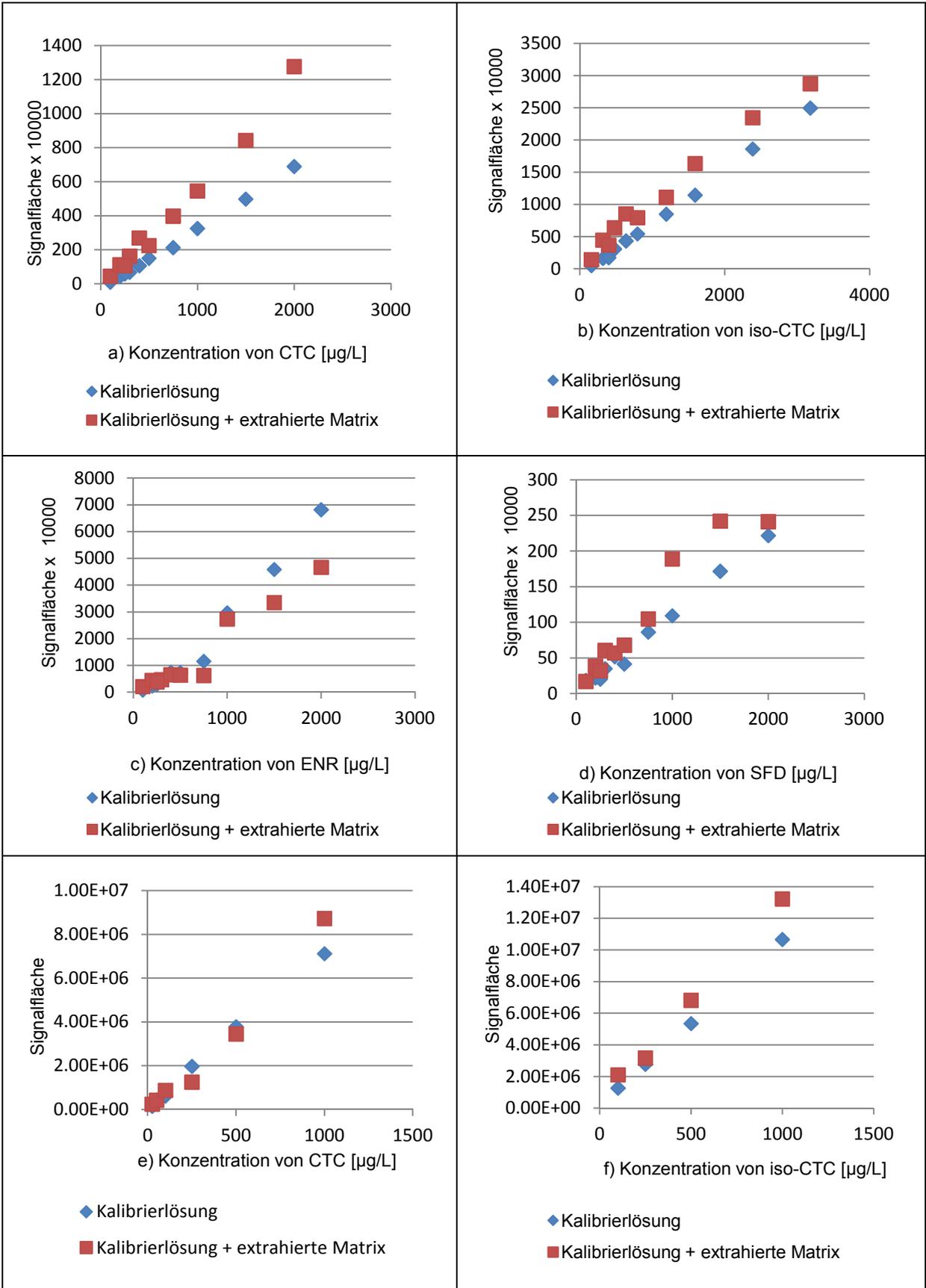


Abbildung 34: Selektivitätstest durch Vergleich der MS-Spektren: Produkt-Ionen-Scan des Vorläuferions von ENR ( $m/z$  360,2) in Standardlösung ( $\beta=1$  mg/L) und in dotierter Rotkohlmatrix (Dotierung: 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG), Methode II k, LC/MS-Methode, SRM-Modus

### 5.2.5 Matrixeffekte

Matrixeffekte sind Einflüsse, die aufgrund von koeluierten Matrixbestandteilen zu einer Veränderung der Ionenausbeute bei der Quantifizierung der Analytmoleküle in der ESI-Quelle führen [345, 346]. Bei einer Erniedrigung der Ionenausbeute handelt es sich um eine Signalsuppression, wobei koeluierte Matrixbestandteile jedoch auch eine erhöhte Ionisationseffizienz bewirken können. Untersuchungen auf Matrixeffekte in Vorstudien aus dem AK Grote zeigten bereits Signalsuppressionen für SFD durch Bodenmatrix [200] und für CTC durch Muskulaturproben [7]. Winterweizen zeigte ebenfalls eine Signalsuppression über den gesamten Konzentrationsbereich [41]. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen sollten die Einflüsse von Rotkohl und Möhren auf die Ionisationseffizienz untersucht werden.

Zur Untersuchung auf Matrixeffekte wurden unbehandelte Rotkohl- und Möhren-Kontrollproben aus den Hydrokulturexperimenten nach Methode II k aufgearbeitet und nicht wie üblich mit Laufmittel A aufgenommen, sondern mit Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen, sodass eine Kalibriergerade aufgestellt werden kann. Zum Vergleich der Analyt-Signalfächen mit Pflanzenmatrix (Rotkohlblätter bzw. Möhrenrüben) wurde die reine wässrige Kalibrierlösung ohne Pflanzenmatrix mittels LC-MS/MS gemessen. Die nachfolgenden Abbildungen 35 a-e zeigen eventuelle Matrixeinflüsse auf die Bestimmung von CTC, iso-CTC, ENR und SFD. Im Vergleich dazu wurden die gleichen Antibiotika in Bezug auf Matrixeffekte in Möhren untersucht (Abbildungen 35 f-h).



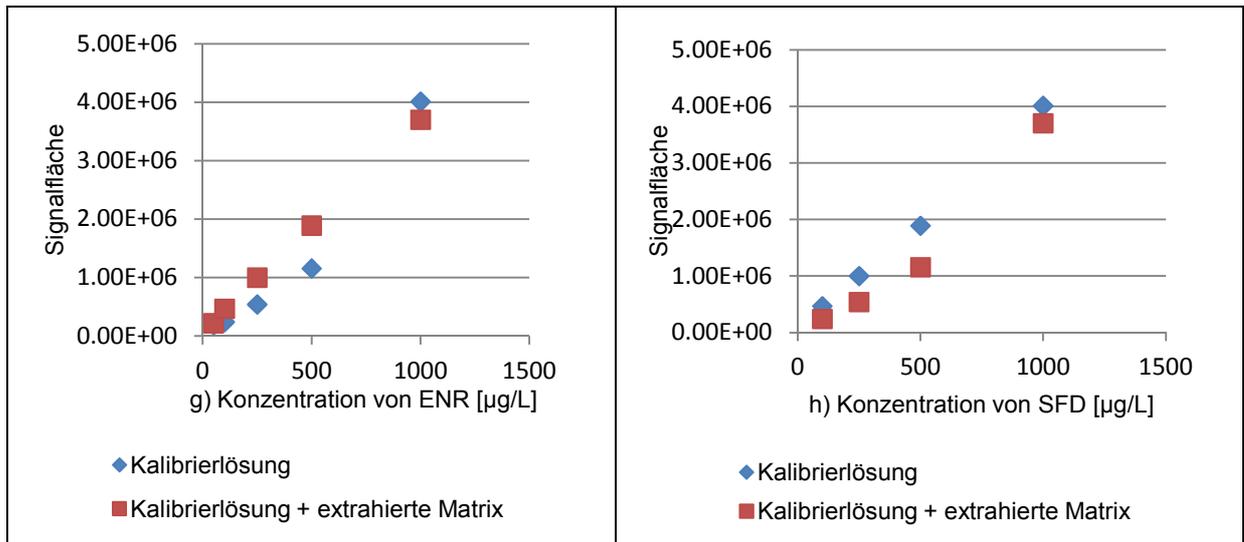


Abbildung 35: Vergleich der Signalfleichen der Analytpeaks aus der reinen Kalibrierlösung zu den Matrix-Proben von Rotkohl- bzw. Möhrenhydrokulturproben (Doppelbestimmung, n=3, LC-MS-Methode, SRM-Modus) a)-d) Matrixeinflüsse von Rotkohl auf die Bestimmung von CTC, iso-CTC, SFD, ENR, e)-h) Matrixeinflüsse von Möhren auf die Bestimmung von CTC, iso-CTC, SFD, ENR

Die Abbildungen lassen Matrixeffekte erkennen, wobei die untersuchten Antibiotika als auch die Pflanzenmatrixes separat betrachtet und ausgewertet werden müssen (vgl. Tabelle 39). Insgesamt konnte erkannt werden, dass die Pflanzenmatrixes in Bezug auf das gleiche Antibiotikum ein sehr ähnliches Matrixverhältnis zeigen. So werden die Signale von CTC und iso-CTC durch koeluierte Bestandteile erhöht, unabhängig von der Pflanzenmatrix und bei ENR und SFD erniedrigt.

Tabelle 39: Matrixeffekte durch Rotkohl und Möhren für ausgewählte Antibiotika

Antibiotikum (AB)	Rotkohl	Möhren	Vergleich
CTC	Signalerhöhung, umso größer die AB-Konz., desto größer die Erhöhung	Im unteren Kalibrierbereich keine Matrixeffekte erkennbar, ab einer Konzentration von 1 mg/L Signalerhöhung	CTC zeigt für beide Pflanzenmatrixes eine Signalerhöhung. Diese Erkenntnis könnte die relativ hohe Aufnahme von CTC in einigen Hydrokulturproben mit begründen
Iso-CTC	Proportionale, geringe Signalerhöhung über gesamten Konz.-Bereich	Proportionale, geringe Signalerhöhung über gesamten Konz.-Bereich	Iso-CTC zeigt ebenfalls gleiches Signalerhöhungsverhalten für beide Pflanzenmatrixes
ENR	Suppression beginnend ab einer Konzentration von ca.	Signalerhöhung bis 1 mg/L, ab dort Suppression	Die Pflanzenmatrixes bewirken ab einer Konz. von 1 mg/L Signalsuppressionen, sodass Minderbefunde

	1 mg/L		resultieren können
Antibiotikum (AB)	Rotkohl	Möhren	Vergleich
SFD	Suppressionen über den gesamten Konzentrationsbereich	Suppressionen über den gesamten Konzentrationsbereich	Bei SFD sind Minderbefunde durch Signalsuppressionen für beide Pflanzen über den gesamten Konz.-Bereich erkennbar

### 5.2.6 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse

Für die Methodvalidierung mit den Probenmatrices Rotkohl und Möhren wurden folgende Parameter bestimmt: Wiederfindung, Messpräzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Selektivität und Matrixeffekte. Als Probenmaterial für diese Validierungsuntersuchungen kamen die Antibiotika unbehandelten Kontrollproben, junge Rotkohlblätter und Möhrenrüben, zum Einsatz.

In Bezug auf die Wiederfindung ist die Methode II k für folgende Antibiotika (Epimere) bzw. Metabolite gemäß der EU-Richtlinie 2002/657/EG [328, 334] geeignet: ENR, CTC, iso-CTC, CIP, TC, DC, OTC und DMC. Hingegen für die Wirkstoffe AMO, AMA, Diketo, MON und SFD ist die bislang entwickelte Methode nicht geeignet, es besteht weiterer Entwicklungs- und Optimierungsbedarf.

Im Weiteren wurde die relative Standardabweichung ( $s_{rel}$ ) der Analysenergebnisse als Kriterium für die Messpräzision des Analysenverfahrens ermittelt. Diese liegt für Rotkohlblätter zwischen 2,3 bis 10,7 % und für Möhrenrüben bei 4,0 bis 11,1 % und erfüllt somit ebenfalls die EU-Richtlinie 2002/657/EG ( $s_{rel}$ : min. 20 %) [328, 334].

Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen liegen bei Rotkohl zwischen 3,1 bis 7,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (NWG) und 9,2 bis 34,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (BG). Für Möhren ergaben sich Gehalte zwischen 2,9 bis 12,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (NWG) und 10,2 bis 34,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (BG). Somit befähigt diese Methode geringe Antibiotikagehalte im ein- bis zweistelligen  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Bereich nachzuweisen und zu quantifizieren.

Der Parameter Selektivität wurde über den Vergleich von Retentionszeiten der Massenspektren und der Produktionen-Intensitäten der Analyten von einer externen Standardlösung zu dotierten Pflanzenproben (Rotkohlblätter bzw. Möhrenrüben) geprüft. Gemäß EU-Richtlinie 2002/657/EG [328, 334] sollen die Retentionszeiten nicht mehr als 5 % vom Standard abweichen. Die Selektivitätsparameter sind erfüllt durch relativ übereinstimmende Retentionszeiten und nahezu identische Fragmentspektren.

Zur Prüfung des Einflusses von koeluierten Matrixbestandteilen auf die Analysenergebnisse von Antibiotika, wurde ein Vergleich der Signalflächen der Kalibrierlösungen mit und ohne Pflanzenmatrix angestellt. Die Ergebnisse zeigten in den meisten Fällen, dass ein Matrixeinfluss vorliegt, entweder in Form von Signalerhöhung

(z.B. CTC, iso-CTC) oder in Form von Suppression (z.B. SFD). Diese Erkenntnis macht deutlich, dass eine genaue Quantifizierung der Antibiotikagehalte eine Matrixkalibrierung mit der jeweiligen Pflanzensorte erforderlich macht. Daher erfolgten die Bestimmungen im Rahmen dieser Arbeit über eine Matrixkalibrierung.

### 5.3 Antibiotika-Aufnahme in Rotkohl und Möhren unter Hydrokulturbedingungen

Zur Untersuchung der Aufnahmepotentiale von Rotkohl und Möhren für verordnungsstarke Veterinärantibiotika wurden Dotierungsexperimente in Hydrokultur durchgeführt (s. Anhang A. 3.1 und A. 4.1). Eine Anzucht unter Hydrokulturbedingungen bedeutet, dass die Ernährung der Pflanzen über eine wässrige Lösung erfolgt, in der die notwendigen Nährsalze enthalten sind. Die Anzucht der Rotkohl- und Möhrenpflanzen, die Dotierungen der Nährlösung mit den unterschiedlichen Veterinärantibiotika und die Ernte der Pflanzen wurde unter fachlicher Betreuung von Dr. Langenkämper im "Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide, Max-Rubner-Institut" (MRI), in Detmold durchgeführt. Die geernteten Pflanzenbestandteile wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und tiefgekühlt zur Universität nach Paderborn transportiert.

Die für das Dotierungsexperiment eingesetzten Antibiotika gehören zu den verordnungsstarken Arzneimitteln, die in der Nutztierhaltung Verwendung finden. Eingesetzt wurden die Wirkstoffe Sulfadiazin (SFD), Enrofloxacin (ENR), Chlortetracyclin (CTC), Monensin (MON) und Amoxicillin (AMO). Es wurden bei den Hydrokulturexperimenten mit Möhren die Dotierungskonzentration 5 µmol/L und für Rotkohl zwei Konzentrationsreihen gewählt: 5 µmol/L und 2,5 µmol/L. Die Auswahl der zwei Konzentrationsstufen in den Nährlösungen von Rotkohl liegt in den Ergebnissen vorangegangener Hydrokulturstudie mit Weißkohl [41] begründet. So zeigten die Weißkohlpflanzen, dessen Nährlösungen separat mit jeweils einem Antibiotikum (Konzentration in der Nährlösung: 5,0 µmol/L) dotiert wurden, dass bereits nach vier Dotierungen die Blätter welkten, gelbliche Verfärbungen der Leitbahnen und Nekrosen auftraten. Wegen dieser deutlichen Stressanzeichen musste die Dotierungsphase verkürzt werden, die Weißkohlpflanzen wurden somit früher geerntet als geplant [25, 41].

Da beide Kohlsorten, Weiß- und Rotkohl, der gleichen Zuchtform, -"Brassica oleracea convar. Capitata (Kopfkohl)"- angehören, wurde ebenfalls die Dotierungskonzentration 5 µmol/L gewählt, um einen Vergleich zwischen Weißkohl- und Rotkohl-Hydrokultur ziehen zu können. Aufgrund des schnellen Weißkohl-Welkens, eventuell bedingt durch eine zu hohe Antibiotikakonzentration, wurde bei den Hydrokulturexperimenten mit

Rotkohl daher zusätzlich eine Dotierungsserie mit der halben Konzentration, d.h. mit 2,5 µmol/L Antibiotikum in der Nährlösung durchgeführt.

**5.3.1 Aufnahmeexperimente mit Rotkohlpflanzen**

**5.3.2 Anzucht, Umsetzung auf Hydrokultur und Antibiotikadotierungen der Nährlösung**

Die Aufnahmeexperimente mit Rotkohl sind im Anhang A. 3 zusammenfassend veranschaulicht. Für die Anzucht wurden die Rotkohlsamen zur Keimungsinduktion für ca. 48 Stunden im Kühlschrank (ca. 7°C in Calciumsulfat-Lösung (1 mmol/L) inkubiert. Die gequollenen und zum Teil bereits gekeimten Sämlinge wurden zur weiteren Anzucht in "Sandwiches" eingebettet. Jedes "Sandwich" bestand aus bis zu fünf Schichten Samen, die sich zwischen Filterpapieren, umbettet von Schaumstoff, befanden (s. Abbildung 36).

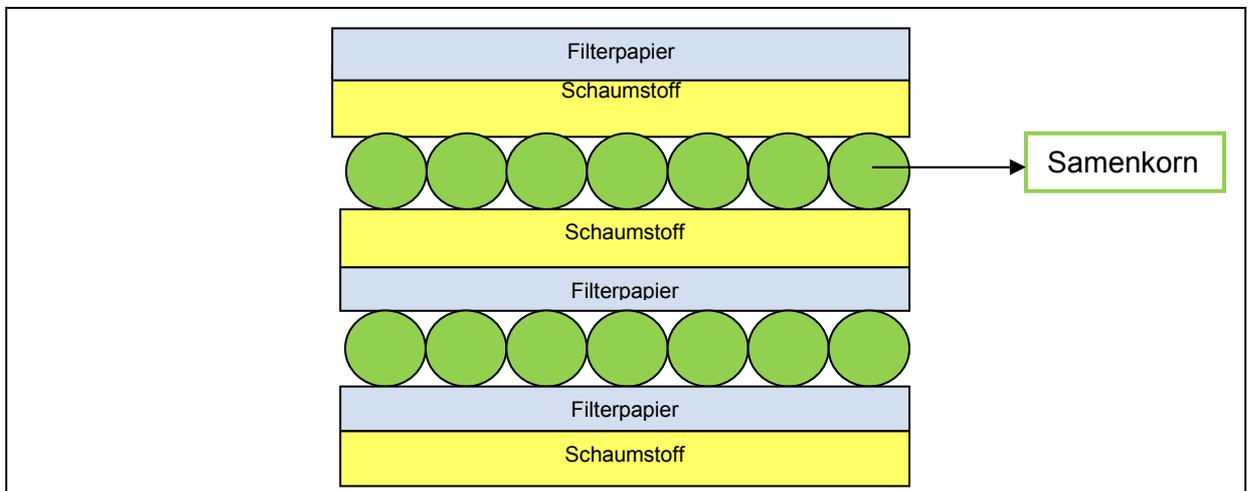


Abbildung 36: Schema eines "Sandwich"-Ausschnittes mit zwei Schichten Samen

Diese "Sandwiches" wurden in ein mit Calciumsulfat-Lösung (1 mmol/L) gefülltes Behältnis gelegt, das mit einer mit Luflöchern versehenen Frischhaltefolie bedeckt wurde (s. Abbildung 37):

<p>37 a) Errichten von "Sandwiches" zur Keimung der Samen</p>	<p>37 b) Anzucht in Calciumsulfat-Lösung</p>	<p>37 c) Hervorspriessen erster Rotkohlpflanzen</p>	<p>37 d) Umsetzen der Rotkohlpflanzen auf Nährlösung</p>

Abbildung 37: Keimung und Anzucht der Rotkohlpflanzen (alle Fotos: F. Chowdhury)

Nach 10 Tagen wurden die "Sandwiches" geöffnet. Aus den Sämlingen waren mittlerweile kleine Rotkohlpflanzen mit ersten Blättern und ca. 10 cm langen Wurzeln entstanden. Einzelne Pflanzen wurden unterhalb des Blattansatzes mit Schaumstoff zu "Schnecken" gerollt (vgl. Abbildung 37, Foto d) und in die dafür vorgesehenen Halterungen in den Deckeln (vier Öffnungen pro Deckel, vgl. Abbildung 38, Foto a) gesteckt. Diese Deckel wurden auf konventionelle Blumentöpfe, welche mit Nährlösung gefüllt sind, gesetzt. Die Wurzeln der Rotkohlpflanzen tauchten in die Nährlösung, eine modifizierte "Hoaglandlösung", ein (Zusammensetzung der Hoaglandlösung zur Anzucht von Rotkohl, s. Anhang A. 3.2).

Nach einer kurzen Adaptionsphase der Pflanze an die Nährlösung (12 Tage) wurde eine neue konzentriertere Nährlösung (Konzentration der Makronährstoffe um das Doppelte erhöht) hergestellt. Um Verwechslungen auszuschließen, wurden die Töpfe und die dazugehörigen Deckel mit einer Nummer, der Wirkstoffbezeichnung und zur weiteren Unterscheidung mit einem Buchstaben (pro eingesetztem Antibiotikum gab es vier Töpfe, gekennzeichnet mit a bis d) versehen. Die Nummerierung der Töpfe gibt die Positionierung im Phytotron an (s. Anhang A. 3.3). Die Pflanzen in den Töpfen wurden dann in das Phytotron (Modell VB1514, Vötsch), ein klimatisierter Pflanzenwuchsschrank, gestellt, der allen Pflanzen vergleichbare Wachstumsbedingungen bot. Die Geräteeinstellung des Phytotrons ist dem Anhang A. 3.4 zu entnehmen.

Die festgelegte Positionierung sorgte dafür, dass Pflanzen, die mit dem gleichen Wirkstoff dotiert wurden, nicht unmittelbar nebeneinander standen, damit sich eventuelle Standortvorteile oder -nachteile, z.B. bedingt durch minimale Licht- oder Temperaturunterschiede, nicht nur auf die Pflanze eines Wirkstoffes auswirkten. Durch diese Maßnahme sollten Fehlinterpretationen bezüglich der Auswirkung des Wirkstoffes auf die Pflanze vermieden werden. Drei weitere Pflanzentöpfe wurden nicht mit Wirkstoffen versehen, sondern bis zur Ernte der Pflanzen nur mit Nährlösung befüllt. Die darin angezüchteten Kontrollpflanzen dienten als Referenzmaterial und wurden zudem für die Matrixkalibrierung und Validierung der einzelnen Wirkstoffe verwendet. Vor jeder (weiteren) Dotierung (Zusammensetzung der Dotierlösungen, s. Anhang A. 3.9) wurden die jeweiligen Töpfe und die darin verbliebene Nährlösung gewogen. Zudem wurde vor jeder Dotierung die Biomasse der Pflanzen bestimmt (s. Anhang A. 3.5).

Ein zusätzlicher Kontrolltopf mit Nährlösung, jedoch ohne Pflanzen, diente der Ermittlung der Verdunstungsmasse. Die Verdunstungsmasse wurde bei der Berechnung der von den Pflanzen aufgenommenen Nährlösung berücksichtigt (s. Anhang A. 3.6).

Zwölf Tage nach Umsetzung auf Nährlösung konnte beobachtet werden, dass die Rotkohlpflanzen ihr Wachstum verdoppelt hatten. Aufgrund des dadurch ausgeschöpften Platzes im Phytotron und der Gefahr der Antibiotikaverschleppung durch Berührung der Blätter, musste die Pflanzenmenge reduziert werden. Hierzu wurden aus jedem Topf, der vier Pflanzen enthielt, zwei Pflanzen entfernt. Die verbliebenen Rotkohlpflanzen hatten somit mehr Raum zur Entfaltung (vgl. Abbildung 38, Foto 38 c).

			
<p>38 a) Rotkohlpflanzen auf Nährlösung umgesetzt</p>	<p>38 b) Wachstumsstand der Pflanzen im Phytotron 12 Tage nach Umsetzung</p>	<p>38 c) Reduzierung der Pflanzenanzahl aufgrund von Platzmangel im Phytotron</p>	<p>38 d) Entwicklungsstand der Rotkohlpflanzen vor der Ernte</p>

Abbildung 38: Anzucht der Rotkohlpflanzen in Nährlösung

### 5.3.3 Ernte und optische Auffälligkeiten der Rotkohlpflanzen

Die Ernte der Pflanzen erfolgte 50 Tage nach Umsetzung auf Nährlösung und 6-facher Antibiotika-Dotierung (Antibiotika-Expositionen entsprachen 12 Tagen, da alle zwei Tage die Nährlösungen ausgetauscht und mit frischer Antibiotikalösung versetzt wurden). Zu diesem Zeitpunkt waren die Pflanzen so groß gewachsen, dass der Raum im Phytotron ausgeschöpft war. Die Rotkohlpflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt das Makrostadium 3 erreicht, d.h. die Entwicklung photosynthetisch aktiver Blätter war nahezu abgeschlossen, jedoch hatte die Kopfbildung noch nicht begonnen (Makrostadium 4). Die Definitionen der Makrostadien sind in der BBCH-Skala [338] beschrieben. Bei der BBCH (**B**iologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, **B**undessortenamt und **C**hemische Industrie)-Skala handelt sich um eine Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien von bestimmten Pflanzen bzw. Pflanzengruppen [338].

Einige Rotkohlpflanzen zeigten im Vergleich zu Kontrollen vergilbte Blätter, wobei jedoch keine optischen Unterschiede durch die verschiedene Antibiotikadotierung (2,5 und 5,0  $\mu\text{mol/L}$ ) ersichtlich waren.

ENR bewirkte einen deutlich sichtbaren Ausbleichungseffekt in den Blättern, unabhängig von der Wirkstoffkonzentration der Nährlösung (vgl. Abbildung 39, Foto 39 b). Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (vgl. Foto 39 a) waren die Blätter bei Enrofloxacin

behandelten Pflanzen nahezu gelblich und während der Dotierungsphase wesentlich mehr gewachsen. Ein ähnlicher Ausbleichungseffekt, jedoch schwächer ausgeprägt, trat bei den Pflanzen auf, die mit CTC behandelt wurden. Diese Pflanzen waren zudem sehr schlaff und dehydriert (vgl. Foto 39 d). MON bewirkte offensichtlich eine Hemmung des Pflanzenwachstums, da die Blätter im Vergleich zu den Kontrollpflanzen signifikant kleiner waren. Zudem wiesen die Blätter eine weiße, spinnengewebsartige Musterung entlang der Blattnervatur auf, die bei keiner der anderen Pflanzen zu beobachten war (vgl. Foto 39 c). Bei den Rotkohlpflanzen, die in AMO- und SFD-dotierter Nährlösung wuchsen, waren keine sichtbaren Effekte und zu den Kontrollpflanzen keine optischen Unterschiede erkennbar.

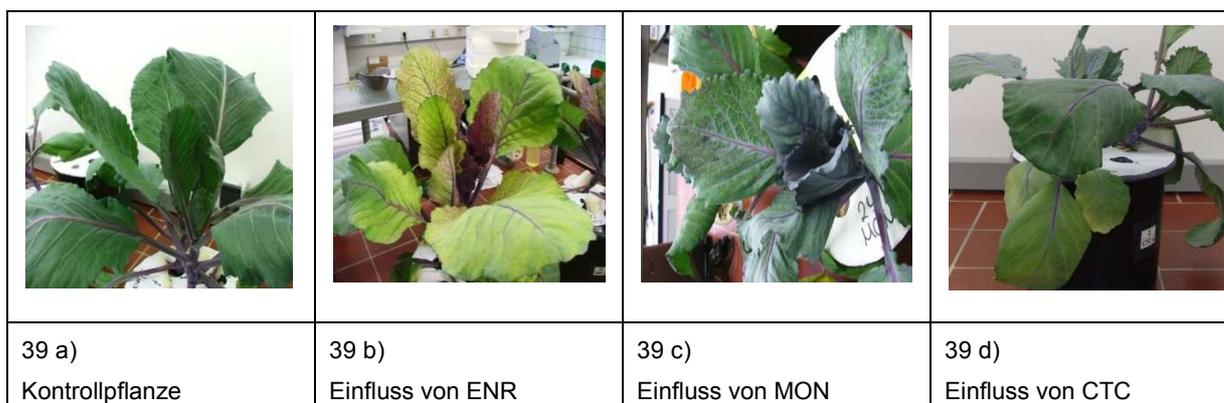


Abbildung 39: Rotkohl nach vierfacher Dotierung (5  $\mu\text{mol/L}$ )

Bei der Ernte wurden die Rotkohlpflanzen in verschiedene Bestandteile separiert: Alte, äußere Rotkohlblätter; junge, innere Rotkohlblätter; Blattstiel- und Sproßmaterial sowie Wurzeln (vgl. Abbildung 40). Zuvor wurden die Wurzeln, die in die Nährlösung eintauchten, mit Kaliumsulfat-Lösung (0,1 mmol/L) gründlich abgespült und mit Zellstoffpapier abgetrocknet. Etwa 4 cm des Wurzel-Sproß-Übergangsbereiches wurden verworfen, damit durch Wurzelmaterial, welches in der Regel die höchste Antibiotikaaufnahme aufweist, keine Verschleppungen in die Sproßproben verursacht werden konnten. Das Pflanzen- und Wurzelmaterial wurde in ca. 0,5 cm lange Stücke geschnitten, in verschraubbare Kunststoffprobenröhrchen gefüllt und unmittelbar mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um der Bioaktivität und einem möglichen Abbau der Wirkstoffe entgegen zu wirken (max. ca. 30 min. von der Separierung bis zum Schockgefrieren). Bis zur weiteren Rückstandsanalyse wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

			
40 a) Geschnittene Rotkohlblätter	40 b) Abwaschen der Wurzeln zur Befreiung von außen anhaftendem Antibiotikum	40 c) Zerkleinerung des Blattstiel- und Sproßmaterials	40 d) Unter flüssigem Stickstoff schock- gefrorene, zerkleinerte Rotkohlblätter

Abbildung 40: Ausschnitt aus dem Ernteablauf von Rotkohlpflanzen aus Hydrokultur

### 5.3.4 Ergebnisse und Diskussion der Aufnahmeexperimente in Rotkohl-Hydrokultur

Vorab sei darauf hingewiesen, dass mit der angewandten Analysenmethode (Fest-Flüssig-Extraktion, LC-MS/MS-Analyse der Extrakte) nur leicht extrahierbare, also überwiegend in den Zellen der Gemüsepflanzen in löslicher Form vorliegende Arzneistoffrückstände nachweisbar sind. Zur Erfassung immobilisierter, zellwandgebundener Rückstände sind andere Aufbereitungs- und Bestimmungsmethoden, wie z.B. die Mikroautoradiographie, erforderlich [153, 154].

Der Wirkstoff AMO und sein Metabolit AMA konnten bislang mit der eingesetzten, im Institut etablierten Methode (Hausmethode) nicht nachgewiesen werden. Daher wurde für die Bestimmung von AMO, AMA und Diketo die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte Methode II k eingesetzt (vgl. Kapitel 5.1). Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen A (5,0 µmol/L-Dotierungsansatz) und B (2,5 µmol/L-Dotierungsansatz) aus den Aufnahmeexperimenten mit Rotkohl wurden differenziert betrachtet. Zum einen nach Wurzel, Spross und Blattstielen, Blatt alt und Blatt jung als auch nach den zudotierten Wirkstoffen CTC, ENR, MON, AMO und SFD und ihren Umwandlungsprodukten bzw. Metaboliten (s. Anhang A. 3.7). Die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente sind nachfolgend graphisch dargestellt und tabellarisch im Anhang A. 3.7 aufgelistet. Die ermittelten Gehalte an Pharmakarückständen umfassen, je nach Stoff und Pflanzenabschnitt, mehrere Größenordnungen.

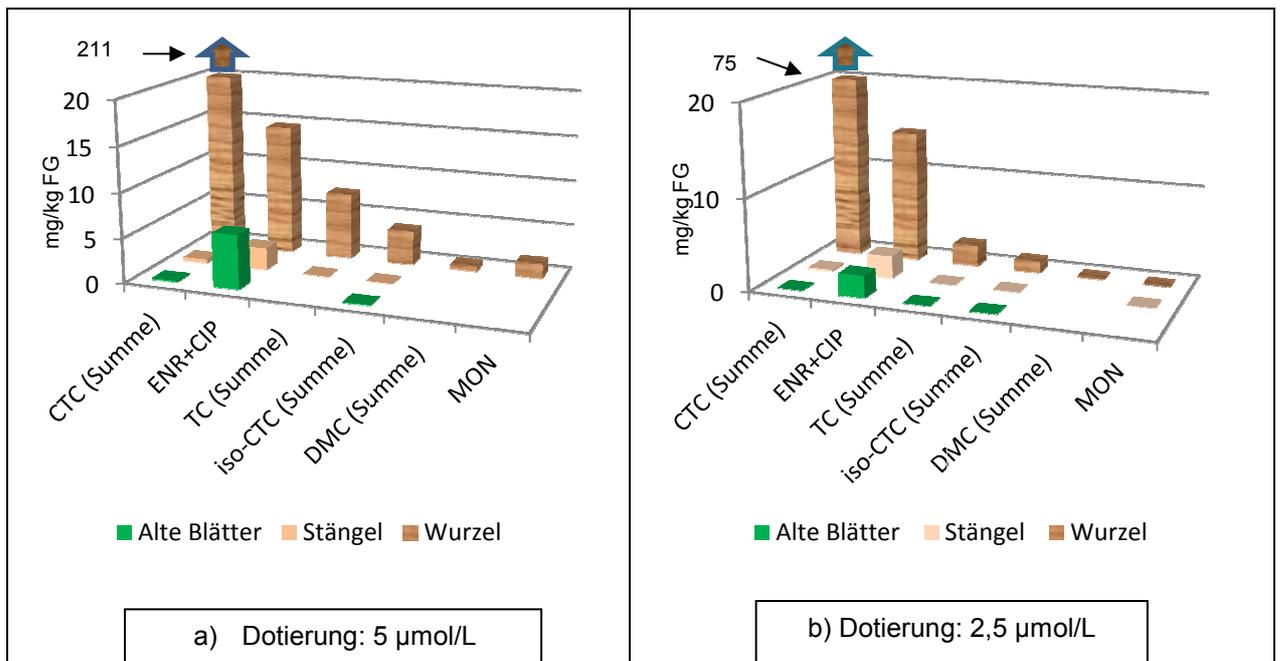


Abbildung 41: Antibiotikagehalte (mg/kg FG) in Rotkohlpflanzen, Dotierung: Versuchsreihe A 5 µmol/L und Versuchsreihe B 2,5 µmol/L

#### Chlortetracyclin-Aufnahme

Die höchsten CTC-Konzentrationen wurden in beiden Versuchsansätzen in den Wurzeln gemessen (Abbildung 41). So wurde in Versuchsreihe A ein CTC-Gehalt der Wurzeln von 211 mg/kg FG und in der halb so hohen Dotierungskonzentration von 75 mg/kg FG nachgewiesen. Das Verhältnis der Dotierungskonzentrationen zwischen Versuchsreihe A und B beträgt 2:1, die ermittelten CTC-Gehalte zeigen ein Verhältnis von knapp 3:1. Demnach nimmt die Rotkohlpflanze bei Vorliegen eines großen "CTC-Angebots" auch vermehrt CTC auf. Erneute Analysen der tiefgekühlt (-80°C) gelagerten Wurzelproben aus Versuchsreihe A bestätigten nach sechs Wochen in etwa die Größenordnung der Antibiotikagehalte der Wurzeln. Allerdings ergab sich lediglich ein CTC-Gehalt von durchschnittlich 60 mg/kg FG. Als Ursache der Verringerung des Antibiotikagehaltes in der Probe können Abbaureaktionen, die durch wiederholtes Auftauen der tiefgekühlten Proben beschleunigt werden, herangezogen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Analyse antibiotikabelasteter Weizenproben gemacht [41].

Im Vergleich zu den Wurzeln enthielten die Sprosse, Blattstiele (402 µg/kg FG) und Blätter (junge Blätter: 174 µg/kg FG / alte Blätter: 211 µg/kg) viel geringere CTC-Gehalte (vgl. Abbildung 41 bzw. Anhang A. 3.7). Die Nachweise in Spross und Blättern belegen, dass ein Transport von CTC über die Wurzel bis in die Blätter erfolgt war. Für die minimale Aufnahme bzw. den geringen Weitertransport von CTC in die oberen Pflanzenbereiche kann zum einen der pflanzliche Metabolismus mit seinen Konjugations- und Kompartimentierungsreaktionen verantwortlich gemacht werden (vgl. Kapitel 3.3.3).

So können u.a. Ablagerungen in den Apoplastenbereichen (Zellwänden) erfolgen, die eine Extrahierbarkeit mittels dieser Methode verhindern. Zum anderen können die Pflanzenwurzeln über unterschiedliche Aufnahmewege (apoplastisch, symplastisch oder transzellulär) Antibiotika aufnehmen (vgl. Kapitel 3.3), wobei der Weitertransport einiger Substanzen durch den Casparischen Streifen unterbunden wird. Bei einem Transport von aufgenommenen Stoffen über die Wurzel in den Sproß müssen Membrantransporte aktiv werden, damit die Substanzen vom Symplasten der Wurzel in den Apoplast des Xylems gelangen. Jedoch hindert der Casparische Streifen, der sich sowohl in der Zellwand der Wurzelendodermis, als auch seltener in der Exodermis befindet, die direkte Aufnahme gelöster Stoffe in das Xylem [235]. Die pflanzliche Morphologie und die Aufnahmewege sowie die pflanzenarttypischen Eigenschaften könnten die hohen Antibiotikagehalte in den Wurzeln und die geringe Transportfähigkeit in andere Kompartimente erklären.

Die CTC-Konzentrationen in den alten, äußeren Blättern im Vergleich zu den jungen, inneren Blättern zeigen ein ähnliches Aufnahmevermögen. Die alten Blätter weisen in Versuchsreihe *A* ein wenig mehr CTC auf als die jungen Blätter. In Versuchsreihe *B* liegen die CTC-Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Gegenüberstellung der CTC-Gehalte von den Blättern zu den Sprossen und Blattstielen lässt für die Versuchsreihe *A* erkennen, dass annähernd gleiche Gehalte vorlagen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Grote et al. in Zusammenhang mit Hydrokulturversuchen [27] mit Winterweizen, der in Nährlösung mit 5 µmol/L CTC angezüchtet wurde, gemacht. Diese enthielten ähnlich hohe CTC-Gehalte in ihren Sprossen und Blättern [26, 27]. Ebenfalls zeigten die Hydrokulturexperimente mit Weißkohl (Dotierungskonzentration: 5 µmol/L), dass die CTC-Gehalte in jungen und alten Blättern nur geringe Unterschiede aufwiesen [41]. In der Versuchsreihe *B* wurde in den Sprossen 141 µg/kg CTC quantifiziert (s. Anhang A. 3.7).

In den CTC-dotierten Rotkohlpflanzen waren signifikante Anteile von Epimeren und iso-Komponenten, insbesondere in den Wurzeln, nachweisbar. In Versuchsreihe *A* konnten ca. 95 mg/kg e-keto-CTC und ca. 56 mg/kg e-enol-CTC (Summe der e-CTC: 151 mg/kg) in den Wurzeln nachgewiesen werden. Die hohe Epimerisierungsrate ist begründbar durch den pH-Wert der Nährlösung (ca. pH 6) und ihrer chemischen Zusammensetzung, denn sie enthält mehrwertige Kationen und Phosphat, die eine Epimerisierung begünstigen. Der Epimergehalt (Summe e-keto-CTC und e-enol-CTC) der Versuchsreihe *B* in den Wurzeln beträgt ca. 56 mg/kg. Der Vergleich der e-CTC-Gehalte von Versuchsreihe *A* zu *B* zeigt erneut annähernd das Verhältnis 3:1. So besteht die Annahme, dass die Epimerisierung mit dem CTC-Gehalt korrespondiert.

Neben e-CTC und iso-CTC ließen sich zudem weitere Umwandlungsprodukte bzw. pflanzliche Metabolite, wie z.B. TC (als Dehalogenierungsprodukt von CTC) mit Epimer (e-TC) nachweisen und in den Wurzeln quantifizieren. In den Wurzeln wurde zudem das

Demethylierungsprodukt Demeclocyclin (DMC) bestimmt. Andere Umwandlungsprodukte, wie Oxytetracyclin (OTC) oder Doxycyclin (DC) waren nicht nachweisbar.

#### *Enrofloxacin-Aufnahme*

Das Aufnahmepotential der Rotkohlwurzeln ist für ENR am zweithöchsten nach CTC. Auffallend bei dem Vergleich der beiden Versuchsreihen *A* und *B* ist, dass die ENR-Gehalte der einzelnen Pflanzenabschnitte junge Blätter, alte Blätter, Spross sowie Wurzel nahezu identische Gehalte aufweisen. So enthalten die Wurzeln, trotz Anzucht in verschiedenen Dotierungskonzentrationen, die gleichen ENR-Gehalte: ca. 15 mg/kg in den Wurzeln und 2 mg/kg in den Sprossen. Die Differenz der ENR-Aufnahmegehalte von alten zu jungen Blättern einer Versuchsreihe ist ebenfalls minimal. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Rotkohlpflanze bis zur Erreichung einer ENR-Sättigung den Wirkstoff aufnimmt, relativ unabhängig vom Angebot in der Nährlösung, in der sie angezogen wurde. Dieses Sättigungsphänomen muss jedoch stoffspezifisch sein, da es bei CTC nicht beobachtet werden konnte. Die Vermutung wird bestärkt durch den Vergleich der ENR-Aufnahmegehalte in die Weißkohl pflanze [25, 41, 156], da diese annähernd identisch sind. Die Tabelle A. 3.8 im Anhang zeigt die Antibiotika-Aufnahmegehalte in Hydrokultur von Weißkohl und Rotkohl im Vergleich. Ebenfalls konnte der Metabolit CIP in beiden Versuchsreihen in allen Pflanzenabschnitten nachgewiesen und in den Sprossen quantifiziert werden.

#### *Monensin-Aufnahme*

Die Aufnahmegehalte von MON sind wesentlich niedriger als von CTC und ENR. Sie liegen in einem Bereich unterhalb der Bestimmungsgrenze; nur in der Versuchsreihe *A* ließ sich in den Wurzeln MON mit ca. 1,6 mg/kg quantifizieren. Jedoch war kein Transport in die anderen Pflanzenteile festzustellen. Die Tatsache, dass visuelle Veränderungen der Pflanze (wie z.B. Wachstumsminderung der gesamten Pflanze sowie Entwicklung kleinerer Blätter mit atypischer Musterung) sichtbar wurden lässt darauf schließen, dass MON von der Pflanze aufgenommen worden sein muss. Die Versuchsreihe *B* zeigt ein ähnliches Aufnahmegeschehen wie *A*. Danach konnte MON in den Wurzeln und Sprossen nachgewiesen werden (< BG). Unter Einbeziehung der Aufnahmeergebnisse in Weißkohl ist zu bestätigen, dass generell nur wenig MON von den Pflanzen aufgenommen wurden. So liegen die Gehalte im µg/kg-Bereich (vgl. Anhang Tabelle A 3.7), wobei in den Wurzeln die höchste MON-Konzentration quantifiziert wurde, gefolgt von den Blättern. Der Sprossbereich weist nur Spuren von MON auf, sodass wiederum davon ausgegangen werden kann, dass MON in Spross und Blattstiele nur transportiert wurde und die Ablagerung in den Blättern erfolgte.

Die theoretische Aufnahmemöglichkeit eines Wirkstoffes in die Pflanze lässt sich über den Verteilungskoeffizienten  $\log K_{OW}$  abschätzen (vgl. Kapitel 3.3.2). Der berechnete  $\log K_{OW}$ -Wert von MON liegt bei 3,72 mit einer absoluten Standardabweichung von  $\pm 0,74$  (s. Anhang A. 1.5). Die geringe Aufnahme von MON in die Pflanze kann darauf zurückgeführt werden, dass gemäß Schnoor [335] bei einem  $\log K_{OW}$ -Wert  $> 3$  das Antibiotikum nur schwierig in die Pflanze aufgenommen werden kann, wobei eine theoretische Pflanzenaufnahme in einem  $\log K_{OW}$ -Bereich von -2 bis +2, aufgrund von Modellrechnungen und praktischen Beobachtungen, angenommen wird.

#### *Sulfadiazin-Aufnahme*

Bei den Aufnahmeexperimenten mit SFD war festzustellen, dass mit Ausnahme von den Wurzeln in Versuchsreihe A (SFD  $<$  BG, s. Anhang A. 3.7), kein Transport in die Pflanzenorgane nachzuweisen ist. Die Gründe für die Minderbefunde können von verschiedenen Faktoren abhängen. Sie sind zum einen in der Pflanzenphysiologie begründbar, wenn das SFD in den Apoplasten des Wurzelgewebes festgehalten wird. Zum anderen lässt sich die geringe bis gar keine Aufnahme von SFD auch anhand von Modellrechnungen erklären, da der errechnete Verteilungskoeffizient  $\log K_{OW}$ -Wert von SFD -0,12 beträgt (s. Anhang A. 1.5). Des Weiteren könnte es sich bei den gemessenen SFD-Aufnahmegehalten auch um "geminderte Befunde" handeln, d. h. die gemessenen Werte wären gegenüber den "wahren Werten" zu niedrig, bedingt durch Signalsuppressionen. Diese Suppressionseffekte wurden bereits in den Hydrokulturexperimenten mit Feldsalat und Möhren beobachtet [27]. Die Aufnahmeergebnisse in Feldsalat und Möhren lagen dabei zum Teil unterhalb der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Für die geringe Nachweisbarkeit kann ebenfalls die relativ niedrige Wiederfindung (ca. 45 %) von SFD im Vergleich zu den anderen Analyten verantwortlich sein. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass aus dem dotierten SFD in der Nährlösung oder in der Pflanze Metabolite, Umwandlungs- und Abbauprodukte entstehen, auf die nicht untersucht wurde. Somit gibt es verschiedene Erklärungsansätze für die SFD-Minderbefunde, wobei gegenwärtig ungeklärt bleibt, welche der Möglichkeiten am wahrscheinlichsten sind und wie viel SFD bzw. SFD-Metabolite tatsächlich in die Pflanzen aufgenommen wurden.

#### *Amoxicillin- bzw. Amoxicillin-Methanol-Addukt-Aufnahme*

AMO wurde zur Herstellung der Amoxicillin-Dotierungslösung in Methanol gelöst, wie alle eingesetzten Antibiotika (s. Anhang A. 2.1.6). In Verbindung mit Methanol bildet es ein AMO-MeOH-Addukt (vgl. Kapitel 5.1.4, Abbildung 25). Zudem kann AMO im tierischen Organismus zu AMA und Diketo metabolisieren. Aus diesen Gründen wurden die Pflanzen rückstandsanalytisch auf die Wirkstoffe AMO, AMA, Diketo und AMO-MeOH-

Addukt untersucht. Der Nachweis der eingesetzten Stoffe blieb jedoch in beiden Versuchsreihen erfolglos. Als Ursache sind eventuell Signalsuppressionseffekte von AMO durch koeludierende Matrixbestandteile möglich. Diese sind in der Lage, die Ionenausbeute in der ESI-Quelle zu erniedrigen, sodass trotz Vorhandenseins von AMO die Nachweisbarkeit nicht gegeben ist. In Kapitel 5.1.4 wurden bereits Suppressionseffekte von AMO durch Möhrenmatrixbestandteile beschrieben. Diese führten zu einer verminderten Wiederfindung von AMO, die bei 43,6 % lag. Neben den Suppressionseffekten können weitere Einflüsse eine Rolle spielen, wie z.B. endogene pflanzliche Enzyme, die mit funktionellen Gruppen der Antibiotika wechselwirken und anschließend durch Konjugatbildungen und Kompartiment die Wirkstoffe ablagern, speichern und unwirksam machen (vgl. Kapitel 3.3.3). So können z.B. die inkorporierten Antibiotika in der pflanzlichen Zellvakuole gespeichert und dort bereits abgebaut werden [376, 377]. Zudem besteht der Verdacht, dass der Abbau von AMO durch die Freisetzung von Enzymen ins Zytosol während der Probenvorbereitung durch Zerreiben (Homogenisierung) der Pflanzenproben beschleunigt wird [378]. Für den pflanzlichen Entgiftungsmechanismus spricht die Tatsache, dass diese Pflanzen sich von den Kontrollpflanzen optisch nicht unterschieden haben (vgl. Kapitel 5.4.2).

## **5.4 Aufnahmeexperimente mit Möhrenpflanzen**

### **5.4.1 Anzucht, Umsetzung auf Hydrokultur und Antibiotikadotierungen der Nährlösung**

Samenkörner der Sorte Bolero F1 wurden in eine Petrischale mit 1 mmol/L Calciumsulfat-Lösung gegeben und über Nacht im Kühlschrank quellen lassen. Die anschließende Möhrenanzucht (Pflanzenabstand: 1 cm) erfolgte nicht in handelsüblicher Blumenerde, da dadurch viele Bodenkeime in die Pflanze gelangen können, sondern in Vermiculit, welches zuvor in 1/8-konzentrierter Hoaglandlösung (pH=6,3; Zusammensetzung der Hoagland-Lösung, s. Anhang A. 4.2) getränkt wurde. Vermiculit ist ein quellfähiges, dreischichtiges Tonmineral, das in der Natur vorkommt. Es besitzt eine sehr gute Wasser- und Nährstoffspeicherfähigkeit. Zudem kann es Licht reflektieren und weist eine geringe Wärmeleitfähigkeit auf. Es findet Verwendung in der Pflanzenanzucht, da es die Jungpflanzen mit Wasser und Nährstoffen versorgt und zudem vor Überhitzung schützt.

Die Blumenkästen wurden mit Frischhaltefolie bedeckt und in eine Plastikwanne gestellt, die zur Wässerung der Möhrenkeime ebenfalls mit 1/4-konzentrierter Hoaglandlösung gefüllt war. Zur weiteren Anzucht wurden die Blumenkästen in das Phytotron (Geräteeinstellungen des Phytotrons für die Möhrenanzucht, s. Anhang A. 4.3) gestellt. Nach 5 bis 8 Tagen waren die Samenkörner gekeimt und die ersten Keimblätter sichtbar. Die Folie über den Blumenkästen wurde über den Saatzeilen aufgeschlitzt. Täglich

wurden die Pflanzen mit -konzentrierter Hoaglandlösung begossen. Das Möhrenwachstum erforderte nach 25 Tagen eine Umpflanzung in größere Blumentöpfe. Die Umpflanzaktion war für die Pflanzen nicht "stressfrei", was an der Erschlaffung der Möhrenblätter erkennbar wurde. Die Regeneration der Möhrenpflanzen konnte nach ca. 17 Tagen nach Umpflanzung beobachtet werden. Sie waren gewachsen, sahen erholt und kräftig aus. Die Anzucht der Möhrensamen bis zur Umsetzung auf die Nährlösung ist in Abbildung 42, Fotos 42 a-d dargestellt.



Abbildung 42: Anzucht der Möhrenpflanzen

Um den Entwicklungsstand der Möhrenpflanzen zu erkennen und den geeigneten Zeitpunkt für die Umsetzung auf Nährlösung zu bestimmen, wurden Möhrenpflanzen eines einzelnen Topfes vermessen (Länge, Durchmesser), fraktioniert und gewichtsmäßig erfasst (s. Anhang A. 4.4). Dazu wurde der Topf samt Vermiculit und Möhrenpflanzen in eine große Plastikwanne umgestülpt. Zur Isolierung der Möhrenpflanzen und zur Entfernung des Vermiculites wurden diese mit Leitungswasser abgespült. Wichtig war dabei, dass die Wurzeln so wenig wie möglich beschädigt wurden. Die Pflanzenentwicklung zeigte, dass die Umsetzung in Hydrokultur zum damaligen Zeitpunkt noch nicht angebracht war. Nach ca. 14 Tagen und einer weiteren Überprüfung der Pflanzenentwicklung erfolgte die Umsetzung in die dafür vorgesehenen Hydrokulturtöpfe, analog zur Anzucht von Rotkohlpflanzen in Hydrokultur (s. Abbildung 43).



Abbildung 43: Isolierung und Umsetzung auf Nährlösung

Der erneute Umsetzungsstress ließ viele Pflanzen verwelken. Diese verwelkten Pflanzen wurden durch überzählige Möhrenpflanzen, die als Reserve in den Vermiculit-Töpfen verfügbar waren, ersetzt. Erst einen Monat nach Umsetzung der Möhrenpflanzen auf Hydrokultur wurde mit der Dotierung begonnen, wobei Kontrollpflanzen undotiert blieben. Die Pflanzen befanden sich zu diesem Zeitpunkt nach BBCH-Skala (2001) im Makrostadium 4 (Erntegut entwickelt sich), wobei ca. 30-40 % des zu erwartenden Rübendurchmessers erreicht wurden (s. Abbildung 43 d). Analog zur Dotierung des Rotkohls wurde jeweils derselbe Wirkstoff in vier Töpfen a-d, allerdings in nur einer Konzentrationstufe von  $5,0 \mu\text{mol/L}$ , hinzugefügt. Nach Vorerfahrungen mit dem Rotkohlexperiment in Hydrokultur, war es nicht erforderlich, eine weitere Versuchsreihe mit der halben Dotierungskonzentration durchzuführen. Die gewählte Konzentration von  $5,0 \mu\text{mol/L}$  bewirkte nicht das befürchtete vorzeitige Pflanzenwelken und war für einen Vergleich mit Hydrokulturexperimenten im Rahmen vorangegangener Projekte aus dem Arbeitskreis Grote [25, 26, 27, 41] besser geeignet.

Insgesamt wurde die Nährlösung an fünf Tagen dotiert, wobei die Dotierungsabstände zwei Tage betragen (s. Anhang A. 4.5). Die Dotierungsphase wurde zu diesem Zeitpunkt beendet, da fortschreitendes Wachstum der Möhrenblätter das Platzangebot im Phytotron ausgeschöpft hatte. Ein weiteres Verbleiben der Möhren im Phytotron wäre mit großer Wahrscheinlichkeit ein zusätzlicher "Stress" für die Pflanzen gewesen- eine Situation, die mit Blick auf die Aufnahmeexperimente vermieden werden sollte.

#### **5.4.2 Ernte und optische Auffälligkeiten der Möhrenpflanzen**

Bei der Ernte wurden die Pflanzenwurzeln kräftig mit Leitungswasser abgespült, um außen anhaftende Wirkstoffe zu entfernen. Anschließend wurden die Möhrenpflanzen in die Bestandteile Wurzel, Rübe und Blätter separiert, ausgewogen, mit einem Messer zerkleinert, in verschraubbare Kunststoffprobenröhrchen gefüllt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren gelagert.

Die Betrachtung der Kontrollpflanzen zeigte, dass sich die Rüben der Möhrenpflanzen in ihrer Form und Größe sehr unterschieden, obwohl sie undotiert und aus demselben Topf stammten. Somit war die Form und Größe der Rübe alleine nicht aussagekräftig in Bezug auf den eventuellen Einfluss der verschiedenen Antibiotika. Die Blätter der Kontrollpflanzen waren satt grün und das Wurzelgeflecht hellbeige. Der Vergleich mit CTC, ENR, SFD, AMO und MON dotierten Möhrenpflanzen ließ lediglich Unterschiede bei den in SFD-dotierter Nährlösung angezüchteten Pflanzen erkennen. Diese (Topf a bis d) wiesen alle einen Schleimbefall der Wurzeln, welche verklebt und bräunlich waren, auf (vgl. Abbildung 44). Ihre Laubblätter waren weniger weit entwickelt und relativ hell im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Des Weiteren waren ihre Rüben auffallend kleiner.

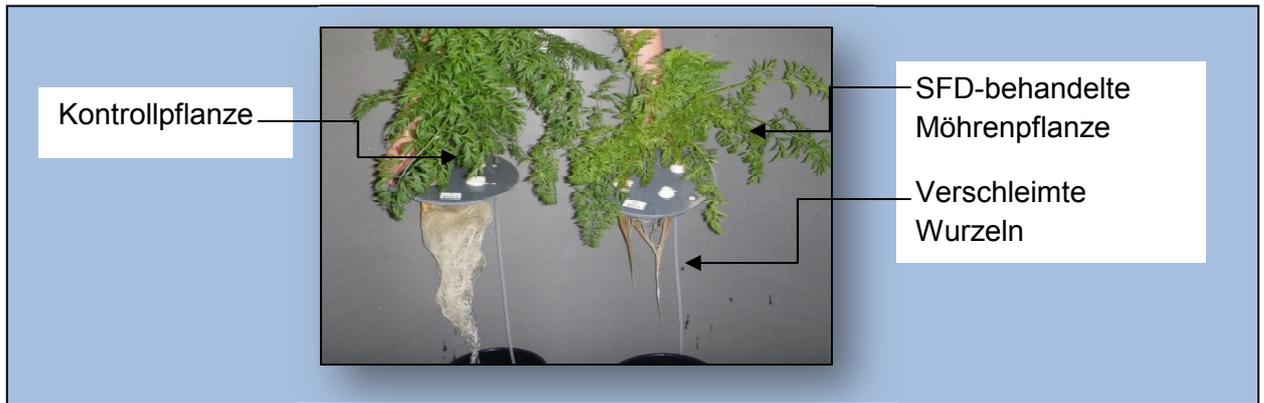


Abbildung 44: Kontrollpflanze und SFD-behandelte Möhrenpflanze im Vergleich

### 5.4.3 Ergebnisse und Diskussion der Aufnahmeexperimente in Möhren-Hydrokultur

#### *Chlortetracyclin-Aufnahme*

Die CTC-Gehalte sind im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen in den Möhrenpflanzen sehr hoch, wobei der ENR-Gehalt in den Möhrenwurzeln sogar den CTC-Gehalt (CTC + e-CTC) von 70,4 mg/kg FG übersteigt. Der durchschnittliche CTC-Gehalt in den Rüben beträgt 6 mg/kg FG und liegt somit um ein 12-faches niedriger als der CTC-Gehalt der Wurzeln. Die Möhrenblätter enthalten Spuren von CTC, die jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Der Nachweis von CTC in allen Pflanzenorganen beweist die Aufnahmefähigkeit und den Transport in die Möhrenpflanzen.

In den CTC-dotierten Rotkohlpflanzen waren hohe Anteile an CTC-Epimere vorhanden. Das Verhältnis zwischen CTC (29,2 mg/kg FG) und den CTC-Epimeren (41,3 mg/kg FG) betrug 1:1,4 und in den Blättern sogar 1:2,6. Einen Beitrag zur hohen Epimerisierungsrate kann eventuell die Nährlösung aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihres pH-Wertes geleistet haben. CTC-Isomere konnten ebenfalls in allen Möhrenorganen nachgewiesen werden, wobei der höchste iso-CTC-Gehalt (Summe der Epimere) mit 6,4 mg/kg FG in den Wurzeln lag. Aus dem dotierten CTC waren viele Umwandlungsprodukte entstanden. So wurde TC (Summe der Epimere) mit 9,8 mg/kg FG in den Möhrenwurzeln nachgewiesen. TC war in allen Organen der Möhrenpflanze zu finden. Ebenso konnten als Metabolite OTC in den Blättern und DMC (mit Epimer) in den Wurzeln und Rüben nachgewiesen werden (s. Abbildung 45).

#### *Enrofloxacin-Aufnahme*

Die Gehalte an Enrofloxacin in den Möhrenpflanzen liegen in der Summe aller ENR-Gehalte von Wurzeln, Blättern und Rüben mit 79,4 mg/kg FG knapp über dem Gesamt-

CTC-Gehalt (Summe der Epimere) von 76,5 mg/kg FG. Die Ergebnisse zeigen, dass das Aufnahmevermögen von Möhren für die Wirkstoffe ENR und CTC annähernd gleich groß ist. Der ENR-Gehalt in der Möhrenwurzel zeigte einen Maximalwert von 72,8 mg/kg FG. Dagegen wurde in der Rübe ein Gehalt von 4,1 und in den Blättern von 2,5 mg/kg FG festgestellt. CIP als Metabolit von ENR konnte in allen Pflanzenorganen nachgewiesen werden. Die Wurzeln wiesen einen CIP-Gehalt von 0,6 mg/kg und die Rüben von 60 µg/kg auf. Der Gehalt in den Blättern lag unterhalb der Bestimmungsgrenze.

#### *Monensin-Aufnahme*

Die Aufnahmegehalte von MON in den Möhrenwurzeln betragen 4,3 mg/kg FG, gefolgt von den Rüben mit 260 µg/kg FG und 22 µg/kg FG in den Blättern. Der Nachweis von MON in Rüben und Blättern beweist erneut den Antibiotikatransfer. MON konnte in diesem Experiment als vierthöchste Wirkstoffkonzentration der Möhrenwurzeln ermittelt werden, trotz seines "lipophilen" log  $K_{OW}$ -Wertes von 3,72 +/- 0,74 (s. Anhang A. 1.5).

#### *Sulfadiazin-Aufnahme*

Bei den SFD-Aufnahmeexperimenten konnte SFD in den Möhrenwurzeln und -rüben nachgewiesen werden, jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze. Mögliche Ursachen für die geringen SFD-Gehalte sind in Kapitel 5.3.4 diskutiert.

Es liegen bereits Ergebnisse von SFD-Hydrokulturexperimenten mit Möhrenpflanzen im Rahmen eines vorangegangenen Projektes [26, 27, 153] vor, die ebenfalls die geringe Aufnahme von SFD belegen.

#### *Amoxicillin- bzw. AMO-MeOH-Addukt-, AMA- und Diketo-Aufnahme*

Die Metabolite von AMO, AMA und Diketo, sowie das AMO-MeOH-Addukt (entsteht bei der Herstellung der AMO-Stammlösung, indem man AMO-Trihydrat in MeOH löst) konnten mittels neuentwickelter Probenvorbereitungsmethode bestimmt werden (vgl. Kapitel 5.1). AMO war nicht nachweisbar, sehr wahrscheinlich aufgrund der Umwandlung und Adduktbildung. So konnten in den Möhrenwurzeln Diketo, AMA und das AMO-MeOH-Addukt unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. In den Möhrenblättern und -rüben ließ sich ebenfalls das AMO-MeOH-Addukt unterhalb der Bestimmungsgrenze nachweisen.

Die ermittelten Gehalte der einzelnen Wirkstoffe in den Organen der Möhrenpflanzen sind im Anhang A. 4.6 aufgelistet und zur besseren Übersicht in dem folgenden Säulendiagramm dargestellt:

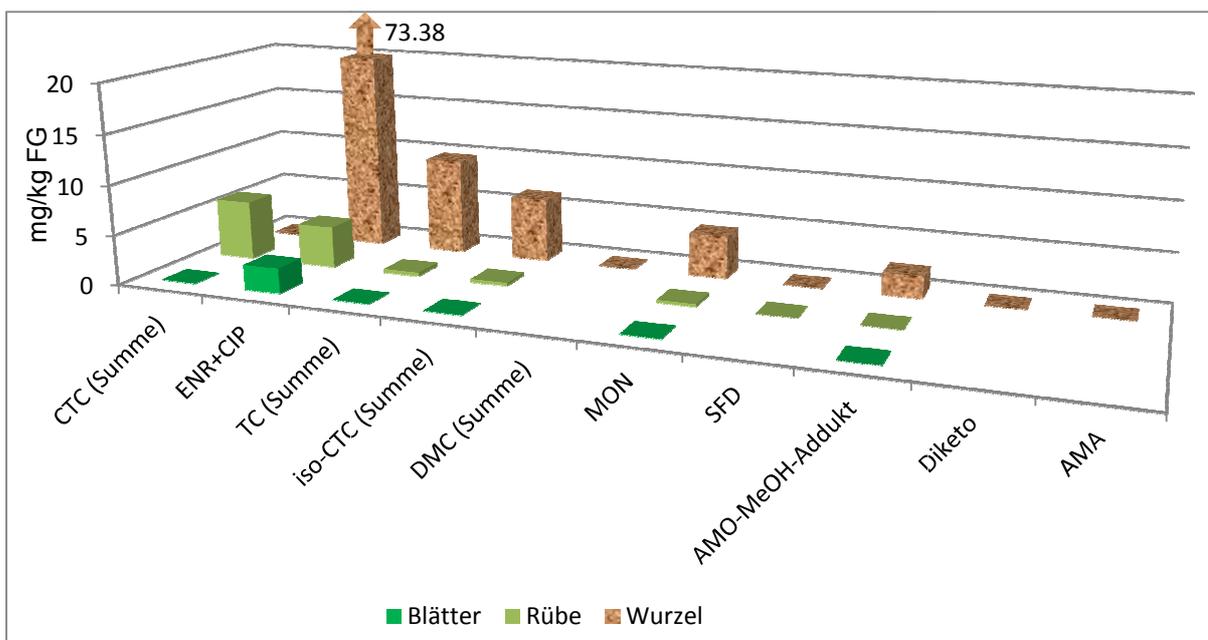


Abbildung 45: Antibiotikagehalte (mg/kg FG) in Möhrenpflanzen (Dotierung: 5 µmol/L)

#### 5.4.4 Vergleich der Ergebnisse von Hydrokulturexperimenten mit Rotkohl und Möhren (Dotierung: 5 µmol/L)

Der Vergleich der Aufnahmen von Antibiotika und ihrer Metabolite in Rotkohl und Möhren wurde zur besseren Übersicht tabellarisch gegenübergestellt, wobei eine separate Betrachtung der Pflanzenorgane "Wurzeln", "Junge Rotkohlblätter bzw. Möhrenrübe" und "Ältere Blätter" erfolgte (vgl. Tabelle 40).

Tabelle 40: a) Antibiotikagehalte (mg/kg FG) in Rotkohl- und Möhrenpflanzen aus den Dotierungsexperimenten, b) Gehalte der gebildeten Metabolite in den Pflanzen

a) Dotierte Wirkstoffe (mg/kg FG)	Wurzeln		Junge Blätter / Rübe		Blätter	
	Rotkohl	Möhren	Rotkohl-junge Blätter	Möhren-rübe	Rotkohl (äussere)	Möhren
ENR	14,6	72,8	7,0	4,1	6,0	2,5
CTC (Summe)	211,1	70,5	0,10	6,0	0,16	0,02
MON	1,6	4,3	< BG	0,3	< BG	0,26
*AMO-MeOH-Addukt	< BG	2,2	n.n.	< BG	n.n.	< BG
SFD	< BG	< BG	n.n.	< BG	n.n.	< BG

\*AMO in MeOH gelöst, dabei entsteht das Addukt

b) Metabolite (mg/kg FG)	Wurzeln		Junge Blätter / Rübe		Blätter	
	Rotkohl	Möhren	Rotkohl- junge Blätter	Möhren- rübe	Rotkohl (äußere)	Möhren
<b>TC (Summe)</b>	7,4	9,8	< BG	0,36	< BG	0,02
<b>Iso-CTC (Summe)</b>	3,8	6,4	0,07	0,32	0,06	0,02
<b>DMC</b>	0,52	0,41	n.n.	0,05	n.n.	n.n.
<b>DC</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Diketo</b>	n.n.	< BG	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>AMA</b>	n.n.	< BG	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Der Vergleich zeigt für beide Pflanzenarten, dass die höchste Antibiotikainkorporation jeweils in der Wurzel ist, sowohl für die dotierten Wirkstoffe als auch für die daraus entstandenen Metabolite (s. Tabelle 40 a) und b)).

#### *Chlortetracyclin*

Im ersten Schritt sollen die CTC-Summengehalte der beiden Pflanzenarten miteinander verglichen werden. Nach der ersten CTC-Analyse der Rotkohlwurzeln konnte ein CTC-Gehalt von 211 mg/kg FG nachgewiesen werden. Nach einer Nachmessung wurden nur noch 57,7 mg/kg FG quantifiziert. Somit ist der Zeitpunkt der rückstandsanalytischen Messung von besonderer Bedeutung, da Lagerzeiten zu einem Antibiotika-Abbau führen. Die Erstanalysen der beiden Gemüsepflanzen erfolgten sehr zeitnah zur Ernte, wobei die Nachmessung des CTC-Gehaltes in den Rotkohlproben mit einer sechswöchigen Zeitverzögerung einherging und eine Diskrepanz der CTC-Werte (Vergleich erste und zweite Messung) von ca. 153 mg/kg FG ausmachte. Der CTC-Summen-Gehalt der Möhrenwurzeln betrug 70,5 mg/kg FG und liegt unter dem CTC-Gehalt der Erstanalyse von Rotkohlwurzeln. Obwohl signifikant hohe CTC-Gehalte in Rotkohlwurzeln nachweisbar waren, wurde dagegen dennoch nur eine Spur von 0,1 mg/kg FG in den inneren und äußeren Blättern quantifiziert. In den Möhrenwurzeln wurden 70,5 mg/kg FG CTC und 6 mg/kg FG in den Möhrenrüben gefunden. Zudem erfolgte ein nachweisbarer Weitertransport in die Möhrenblätter.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das CTC unter diesen Versuchsbedingungen nur sehr schwer, im Vergleich zu den Möhrenpflanzen, in andere Rotkohlorgane transportiert werden kann.

#### *Enrofloxacin*

Die zweithöchste Antibiotikainkorporation wurde bei ENR festgestellt. So wurden in den Möhrenwurzeln 72,8 mg/kg FG ENR nachgewiesen und 14,6 mg/kg FG in Rotkohlwurzeln. In den Möhrenwurzeln liegen die beiden Antibiotika ENR und CTC in

ähnlicher Höhe vor (CTC: 70,5 mg/kg FG und ENR: 72,8 mg/kg FG). Zum Vergleich der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von CTC und ENR wurden diese log  $K_{OW}$ -Werte mit der Software „ACD/LogP v. 8.02“ [245] berechnet. Der Vergleich von CTC (log  $K_{OW}$ (CTC): -0,33 +/- 0,82 absolute Standardabweichung) und ENR (log  $K_{OW}$ (ENR): 2,54 +/- 0,77 absolute Standardabweichung) zeigt, dass ENR lipophiler ist und theoretisch bevorzugter von den Pflanzen aufgenommen werden kann (s. Tabelle Anhang A. 1.5). Beide Versuchsreihen des Hydrokulturexperimentes mit Rotkohl im Zusammenhang mit dem vorangegangenen Weißkohl-Hydrokulturexperiment zeigen, dass jeweils ca. 15 mg/kg ENR in den Rotkohlwurzeln, unabhängig von der Dotierungskonzentration (2,5  $\mu$ mol/L und 5,0  $\mu$ mol/L) und in den Weißkohlwurzeln vorliegen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Aufnahmepotential für ENR limitiert ist. Das Ergebnis für ENR in der Möhrenwurzel erfüllt jedoch nicht dieses Sättigungskriterium, sondern es konnte um ein Fünffaches mehr aufgenommen werden als von den Rotkohl- bzw. Weißkohlpflanzen. Im Vergleich der ENR-Konzentration in Möhrenwurzeln (72,8 mg/kg FG) zu Möhrenrübe (4,1 mg/kg FG) wird ersichtlich, dass der ENR-Gehalt in den Rüben nur 1/18 von dem ENR-Gehalt in den Wurzeln ausmacht. Die ENR-Verteilung in der Rotkohlpflanze jedoch zeigt ein anderes Aufnahme- und Transportverhältnis von Rotkohlwurzeln zu Rotkohllinnenblättern. So wurden ca. 15 mg/kg FG ENR in den Rotkohlwurzeln und nahezu die Hälfte (7,0 mg/kg FG) in den jungen Rotkohlblättern nachgewiesen. Eine Gegenüberstellung der Antibiotikagehalte der Pflanzenorgane „Junge Rotkohlblätter“ und „Möhrenrübe“, zeigt, dass allgemein die Wirkstoffgehalte in der Möhre höher liegen als im Rotkohl. Eine Ausnahme bildet der Wirkstoff ENR, der bei den Rotkohllinnenblättern mit 7 mg/kg FG bestimmt werden konnte, in der Möhrenrübe jedoch nur mit 4,1 mg/kg FG.

### *Monensin*

MON wurde in beiden Pflanzenarten sowohl in den Wurzeln, jungen Rotkohlblättern bzw. Möhrenrüben als auch in den äußeren Blättern nachgewiesen. So konnte MON in den Rotkohlwurzeln mit 1,6 mg/kg FG bestimmt werden. In den jungen und äußeren Blättern lagen die Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze. Hingegen war es in allen Organen der Möhrenpflanze möglich, die MON-Aufnahme zu quantifizieren. So wiesen die Möhrenwurzeln einen MON-Gehalt von 4,3 mg/kg FG, der essbare Pflanzenteil und die Blätter von je 0,3 mg/kg FG auf. Der Vergleich Rotkohl und Möhren in Bezug auf MON läßt insgesamt geringe Aufnahmegehalte erkennen, wobei die Möhrenpflanzen etwas höhere MON-Gehalte aufwiesen.

*AMO bzw. AMO-MeOH-Addukt*

Die Quantifizierung von AMO bzw. AMO-MeOH-Addukt war nur in den Möhrenwurzeln mit 2,2 mg/kg FG möglich, wobei es in den beiden anderen Möhrenorganen nachgewiesen werden konnte. In den Wurzeln der Rotkohlpflanzen konnte das AMO-MeOH-Addukt nur unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. Boxall et al. beobachteten für AMO eine Halbwertszeit < 24 Stunden [159]. Diese Beobachtung wäre eine Begründung für den geringen AMO-Nachweis. AMO kann sich in die Hauptmetabolite Diketo und AMA umwandeln, weswegen die Rückstandsanalyse diese beiden Wirkstoffe mit erfasste (vgl. Tabelle 40 b). So wurden tatsächlich Diketo und AMA in Möhrenwurzeln unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen.

*Sulfadiazin*

SFD wurde nur unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen, wobei ein Nachweis in den Rotkohllinnen- und außenblättern nicht zu verzeichnen war. Gründe hierfür liegen eventuell in Suppressionseffekten, schlechter Wiederfindung und in dem pflanzlichen Metabolismus. Auffallend ist, dass SFD in den Rotkohlpflanzen zu keiner visuellen Veränderung der Pflanzen führte, jedoch bei den Möhrenpflanzen. Die mit SFD behandelten Möhrenpflanzen zeigten toxische Reaktionen, wie weniger entwickelte Möhrenrüben, leicht ausgebleichte Blätter und schleimbefallene Wurzeln. Trotz des optisch erkennbaren Einflusses von SFD auf die Möhrenpflanzen konnte SFD nicht quantifiziert, lediglich unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden.

Diese Aufnahmeunterschiede von Rotkohl- und Möhrenpflanzen machen deutlich, dass es nicht genügt, rückstandsanalytische Daten für eine Pflanzenart zu erheben, da diese nicht auf andere Pflanzenarten 1:1 übertragen werden können. Trotz gleichen Wirkstoffs ist die Interaktion des Wirkstoffs von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich. Daher werden die Modellierungsberechnungen pflanzen- und wirkstoffspezifisch durchgeführt [226, 239, 242, 336].

#### **5.4.5 Vergleich unterschiedlicher Hydrokulturexperimente anhand ausgewählter Ergebnisse**

*Gegenüberstellung der aufgenommenen Wirkstoffgehalte von Rotkohl und Weißkohl [41, 26]*

In den Rotkohlwurzeln wurde am meisten CTC nachgewiesen, wobei der Summengehalt an CTC ( $\sum \text{CTC} = \text{CTC} + \text{e-keto-CTC} + \text{e-enol-CTC}$ ) bei 211 mg/kg FG lag. Im Vergleich dazu lag die  $\sum \text{CTC}$  in den Weißkohlwurzeln bei 10 mg/kg FG, jedoch wurden diese Gemüsepflanzen vorzeitiger geerntet und nicht sechsfach dotiert.

Um erkennen zu können, welche Antibiotika bevorzugt von Rotkohl- und Weißkohlwurzeln aufgenommen wurden, soll mittels Abstufung der nachgewiesenen Wirkstoffgehalte und ihrer Metabolite gezeigt werden:

Rotkohl:  $[\Sigma\text{CTC}] > [\text{ENR}+\text{CIP}] > [\text{TC}+\text{e-TC}] > [\text{MON}] > [\text{DMC}+\text{e-DMC}] > [\text{SFD}]$

Weißkohl:  $[\text{ENR}+\text{CIP}] > [\Sigma\text{CTC}] > [\text{TC}+\text{e-TC}] > [\text{MON}] > [\text{DMC}+\text{e-DMC}] > [\text{SFD}]$  [26, 41]

Der Vergleich der Rückstandsgehalte an Veterinärpharmaka in Rotkohl- und Weißkohlpflanzen, insbesondere der Vergleich der aufgenommenen Gehalte in den Wurzeln, zeigt sowohl ähnliches Aufnahmeverhalten als auch Unterschiede (s. Anhang A. 3.8). Insgesamt liegen höhere Wirkstoffgehalte in den Rotkohlwurzeln vor, wobei hohe Gehalte für die Summe CTC und ENR in beiden Pflanzenwurzeln zu erkennen sind. So konnten in Rotkohl hohe Gehalte an CTC's und in Weißkohl an ENR (und CIP) nachgewiesen werden. Als dritthöchste Komponente folgt anschließend TC (Summe der Epimere) als Umwandlungsprodukt des CTC's. Im Hydrokulturexperiment mit Weißkohl wurde zudem der Wirkstoff TC dotiert, jedoch ist dieser TC-Gehalt bei obiger Gegenüberstellung nicht berücksichtigt. Am Ende der Abstufungsreihe ist bei beiden Pflanzen der Wirkstoff SFD erkennbar. Die Gegenüberstellung der Antibiotika- und Metabolitgehalte ist graphisch dargestellt (s. nachfolgende Abbildung 46 a und b).

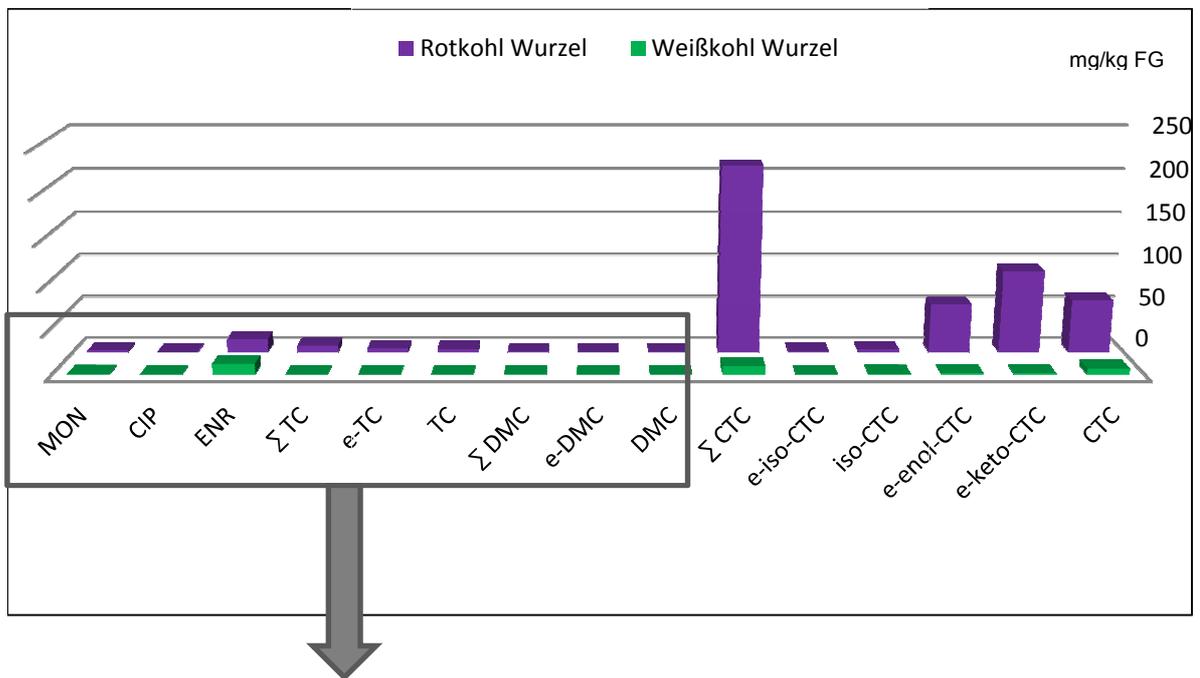


Abbildung 46 a: Antibiotika (mg/kg FG) in Rotkohl- bzw. Weißkohlwurzeln (Dotierung: 5 µmol/L)

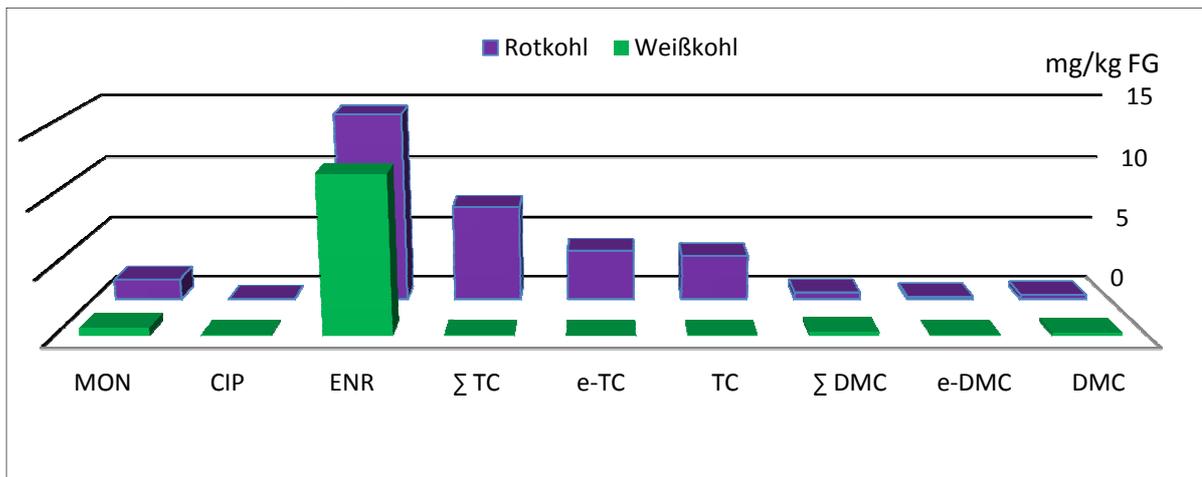


Abbildung 46 b: Vergrößerungsausschnitt: Antibiotika (mg/kg FG) in Rotkohl- bzw. Weißkohlwurzeln (Dotierung: 5  $\mu\text{mol/L}$ )

Die Gegenüberstellung verdeutlicht den signifikant hohen CTC-Gehalt in den Rotkohlproben und die Ausschnittsvergrößerung lässt erkennen, dass beide Kohlpflanzen ähnlich hohe Gehalte an ENR aufweisen. Werden CTC und seine Umwandlungsprodukte (s. Abbildung 47) separat betrachtet, so liegen die Gehalte in den Rotkohlwurzeln signifikant über den Gehalten in den Weißkohlpflanzen. Zur Überprüfung dieser Werte wurden Nachmessungen durchgeführt, die die Größenordnung bestätigten. Dieser Unterschied kann darin liegen, dass sowohl die Behandlungsdauer von Rotkohl mit CTC länger war als bei Weißkohl (12 statt 8 Tage) als auch die Anzahl der Antibiotikadotierungen (Rotkohl sechsfach, Weißkohl vierfach dotiert). Generell gelten Weißkohl und Rotkohl als Starkzehrer. Starkzehrung bedeutet eine vermehrte Aufnahme von Nährsalzen in den Symplast über spezifische und regulierte Transportproteine am Plasmalemma. Somit liegt die Vermutung nahe, dass mit dem hohen Verbrauch von Nährsalzen eine relativ hohe CTC-Aufnahme korreliert und gegebenenfalls sind Mechanismen des hohen Nährsalzaneignungsvermögens direkt oder indirekt mit der CTC-Aufnahme gekoppelt.

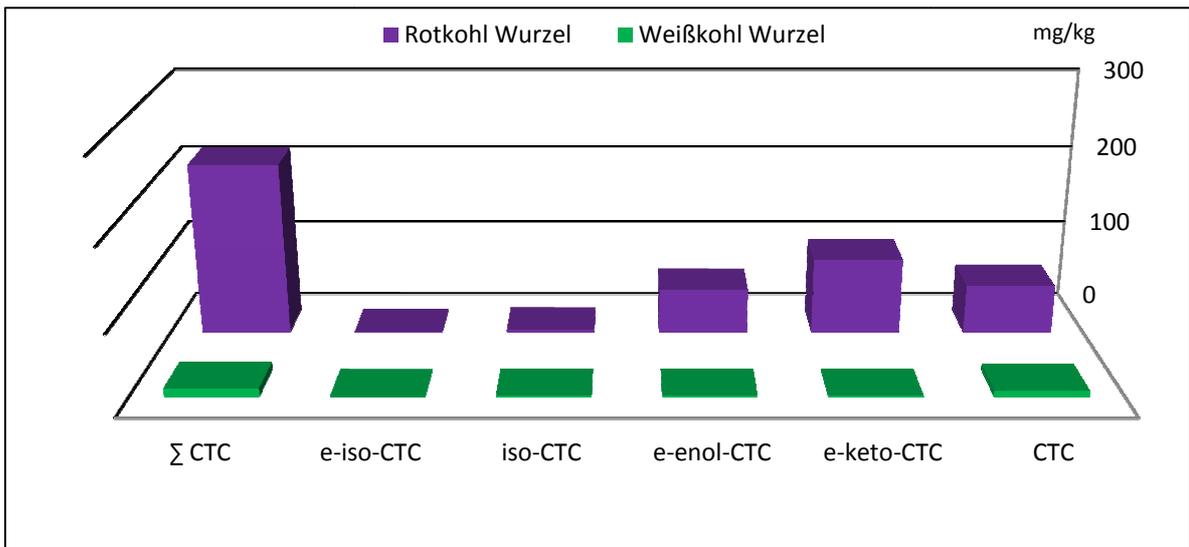


Abbildung 47: CTC (mg/kg FG) in Rotkohl- bzw. Weißkohlwurzeln (Dotierung: 5 µmol/L)

Ferner wird deutlich, dass ein weiterer Antibiotikaaufnahme-Vergleich von Rotkohl- und Weißkohlblättern, erkennen lässt, dass beide Gemüsesorten über ein ähnlich hohes Aufnahmepotential für ENR verfügen (vgl. Abbildung 48 a). Die Einlagerung von CTC war in den Rotkohlblättern größer als im Weißkohl. Die Aufnahmen von SFD und MON waren im Weißkohl größer (vgl. Anhang Tabelle A. 3.8). Die Aufnahmegehalte von Antibiotika zeigen sowohl in den alten als auch in den jungen Blättern für beide Pflanzen ähnliches Verhalten (vgl. Abbildung 48 a und b).

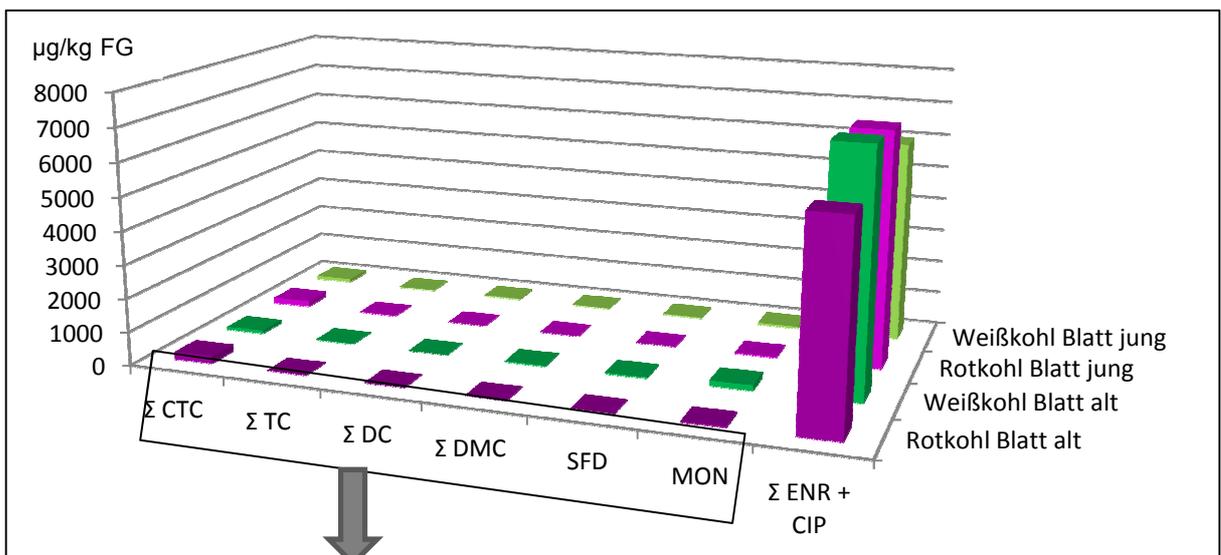


Abbildung 48 a: Antibiotikagehalte (µg/kg FG) in Rotkohl- und Weißkohlblättern (Dotierung: 5 µmol/L) mit Vergrößerungsausschnitt (Abb. 48 b)

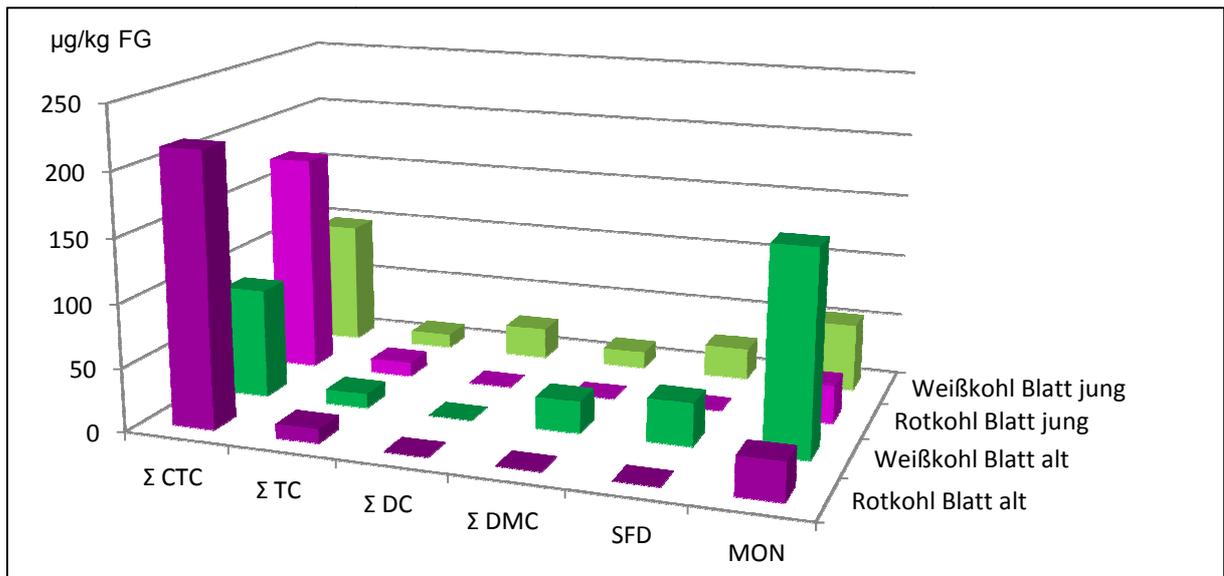


Abbildung 48 b: Vergrößerungsausschnitt einiger Antibiotikagehalte (µg/kg FG) in Rotkohl- und Weißkohlblättern (Dotierung: 5 µmol/L)

Trotz der unterschiedlichen Verweildauer der beiden Pflanzenarten in dotierter Nährlösung zeigt sich die eindeutig hohe Aufnahmekapazität beider Kohlpflanzen für das Fluorchinolon ENR. Unterschiede zeigten sich in der Aufnahmemenge für MON und CTC. Die MON-Gehalte waren am höchsten in den Weißkohlblättern, die höchsten CTC-Gehalte hingegen in den Rotkohlblättern.

*Vergleich der aufgenommenen CTC-Gehalte von Rotkohl- und Feldsalatwurzeln in Hydrokultur*

Die CTC-Gehalte der Feldsalat-Hydrokulturproben aus dem vorangegangenen Projekt „Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“ [154] zeigten vergleichbar hohe CTC-Gehalte, wie sie in den Rotkohlwurzeln bei der Erstanalyse gefunden wurden (s. Tabelle 41) [27].

Tabelle 41: CTC-Aufnahme (mg/kg FG) in Feldsalat- [27, 154] und Rotkohlwurzeln im Vergleich, (Dotierungskonzentration und Behandlungsdauer)

Pflanze	CTC	e-CTC	CTC+ e-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	Summe iso-CTC	Summe CTC total	Zeit [Tage]	Dotierung [µmol/L]
Feldsalat	44,6	18,8	63,5	12,8	7,6	20,3	<b>83,8</b>	7	5
	65,5	30,5	96,0	20,6	13,1	33,8	<b>129,8</b>	14	
	69,2	38,2	107,4	11,2	17,9	29,1	<b>136,5</b>	7	10
	133,8	119,3	253,1	52,8	32,10	84,9	<b>338,0</b>	14	
Rotkohl	60,8	150,3	211,1	2,8	1,0	3,8	<b>214,9</b>	12	5
	28,8	27,8	56,6	1,8	0,2	2,0	<b>58,6</b>		

In Anbetracht der CTC-Ergebnisse aus dem Hydrokultorexperiment mit Feldsalat wird ersichtlich, dass mit zunehmender Dotierungskonzentration und längerer Aufenthaltsdauer der Pflanze in dotierter Nährlösung, die CTC-Aufnahme steigt. So konnten beispielsweise nach 14 Tagen bei einer Dotierungskonzentration von 5  $\mu\text{mol/L}$  ca. 130 mg/kg FG CTC (+ e-CTC und iso-CTC) nachgewiesen werden. Bei der doppelten Dotierungskonzentration im gleichen Zeitraum wurden 338 mg/kg FG CTC (+ e-CTC und iso-CTC) quantifiziert, was eine Erhöhung um das 2,6-fache darstellt. Diese Ergebnisse zeigen den hohen Aufnahmegehalt von CTC in Pflanzenwurzeln. Somit ist der hohe CTC-Aufnahmegehalt von ca. 211 mg/kg FG in den Rotkohlwurzeln nicht als "Ausreißer" zu beurteilen, da er in der gleichen Größenordnung wie die CTC-Gehalte in Feldsalatwurzeln liegen. Trotz ähnlicher Bedingungen (Dotierungskonzentration und Verweildauer in kontaminierter Nährlösung) ist die quantifizierte Gesamt-CTC-Menge in den Rotkohlwurzeln höher als im Feldsalat, der in der Kategorie "Mittelzehrer" eingestuft ist [337]. Dieses Ergebnis stützt erneut die These, dass das Nährstoffaufnahmevermögen mit der CTC-Aufnahme direkt oder indirekt gekoppelt sein könnte. Infolge von Abbaureaktionen hat sich der CTC-Gesamtgehalt vermutlich innerhalb von vier Wochen auf 58,6 mg/kg FG reduziert.

#### *Vergleich verschiedener SFD-Aufnahmeexperimente mit drei Möhrensorten in Hydrokultur*

Die Ergebnisse der SFD-Aufnahme-Experimente im Rahmen dieser Arbeit werden mit Ergebnissen einer Vorstudie verglichen [27, 154]. Dabei wurden die Möhrensorten "Rote Riesen" und "Pariser Markt" in einer 10  $\mu\text{mol/L}$ -SFD-haltigen Nährlösung aufgezogen. Es wurden zwei Versuchsvarianten gewählt: In der Variante 1 wuchsen die Pflanzen 7 Tage und in Variante 2 wurde die Zeit verdoppelt, sodass sie 14 Tage in Nährlösung aufwuchsen. Die Ergebnisse sind tabellarisch aufgeführt:

Tabelle 42: SFD-Gehalte von Möhren aus zwei Hydrokultorexperimenten im Vergleich [27, 154]

Möhrensorte	Gehalt von SFD (mg/kg FG)		Pflanzenorgan	Zeit in Nährlösung (Tage)	SFD-Konzentration in Nährlösung ( $\mu\text{mol/L}$ )
Pariser Markt	0,21		Wurzel	7	10
	3,39		Seitenwurzeln		
	< NWG		Blatt/Halm		
Rote Riesen	0,27	0,23	Wurzel	14	10
	< NWG	< NWG	Blatt/Halm		
Bolero F1 (im Rahmen dieser Arbeit)	< BG		Wurzel	10	5
	< BG		Rübe		
	< NWG		Blatt		

Die Ergebnisse zeigen auf den ersten Blick, dass insgesamt nur geringe Mengen an SFD in die Möhrenpflanze gelangen, unabhängig von der Möhrensorte. Die Anzuchtbedingungen variieren in der SFD-Konzentration der Nährlösung und der Verweildauer der Möhrenpflanzen in der dotierten Nährlösung. Quantifizierbare Positivbefunde konnten lediglich in den Möhrenwurzeln gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte lediglich festgestellt werden, dass die Rüben der Sorte "Bolero" SFD enthalten, wenn auch unterhalb der Bestimmungsgrenze. Der Vergleich der Wurzeln von "Rote Riesen", die 14 Tage in SFD-behandelter Nährlösung standen, zu den Wurzeln der Sorte "Pariser Markt", die lediglich nur 7 Tage im Nährlösungsmedium wuchsen, zeigte keine Unterschiede, denn es konnten jeweils 0,2 mg/kg SFD ermittelt werden. Bei der halben Dotierungskonzentration und nach 10 Tagen Behandlung in dotierter Nährlösung war eine Quantifizierung des SFD-Gehaltes der Wurzel bei der Sorte "Bolero" nicht möglich.

Die Gegenüberstellung des SFD-Aufnahmevermögens verschiedener Gemüsepflanzen (Möhren, Feldsalat, Winterweizen, Porree, Weißkohl und Rotkohl), die unter Hydrokulturbedingungen durchgeführt wurden, ließ jedoch erkennen, dass Aufnahmen von SFD in allen Gemüsepflanzen mit Ausnahme von Rotkohl nachweisbar waren (s. Tabelle 43).

Tabelle 43: Maximale SFD-Gehalte in verschiedenen Gemüsepflanzen über Hydrokulturexperimente [27, 41]

Gemüse- pflanze	Maximaler SFD-Gehalt [mg/kg FG]		Pflanzenorgan		SFD- Dotierungsbedingungen (Tage, Konzentration der Nährlösung)	Literatur
Möhren	3,39	0,27	Seiten- wurzel	Wurzel	7 Tage in 10 µmol/L	[27, 154]
Feldsalat	0,69		Wurzel		7 Tage in 10 µmol/L	[27, 154]
Winterweizen	3,26		Wurzel		21 Tage in 10 µmol/L	[27, 154]
	9,56		Wurzel		7 Tage in 30 µmol/L	
	18,3		Wurzeln		21 Tage in 30 µmol/L	
Porree	0,26		Wurzel		10 Tage in 5 µmol/L	[25, 41, 156]
Weißkohl	0,15		Wurzel		10 Tage in 5 µmol/L	[25, 41, 156]

Die maximalen SFD-Gehalte liegen überwiegend im unteren mg/kg-Bereich mit Ausnahme von den Winterweizenpflanzen. Grote et al. gelang am Beispiel der Winterweizenpflanzen erneut der Beweis, dass mit zunehmender SFD-Konzentration und verlängerter Verweildauer der Pflanzen in der dotierten Nährlösung die Aufnahmemenge in die Pflanze gesteigert wird [27, 154]. So werden 3,26 mg/kg SFD nach 21 Tagen in 10 µmol/L-Nährlösung von den Winterweizenwurzeln aufgenommen. Nur durch Änderung

der SFD-Nährlösungskonzentration um das Dreifache wurde die SFD-Aufnahmemenge um knapp ein Sechsfaches erhöht. Ein weiterer Versuchsansatz zeigt, dass bei gleicher SFD-Nährlösungskonzentration, aber unterschiedlicher Verweildauer, 7 Tage im Vergleich zu 21 Tage, der SFD-Gehalt um den Faktor 2 zu nimmt. Die höchste Kontamination aller untersuchten Pflanzen lag in dem Pflanzenorgan "Wurzel", die anderen Organe wie Rüben und Blätter waren nur minimal mit SFD kontaminiert.

#### **5.4.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur**

Die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente in Hydrokultur belegen ein signifikant hohes Aufnahmepotential von Rotkohl und Möhre, insbesondere für Chlortetracyclin und Enrofloxacin. Die ermittelten Gehalte an Pharmakarückständen in den Gemüseproben umfassen - je nach Wirkstoff und Pflanzenabschnitt - mehrere Größenordnungen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  bis  $\text{mg}/\text{kg}$ -Bereich). Die höchsten Konzentrationen wurden jeweils in den Wurzeln der Gemüsepflanzen mit CTC und ENR erreicht, das in geringen Anteilen zum CIP metabolisiert war. Es ist erkennbar, dass die Antibiotikabelastungen in den Pflanzenteilen jeweils in der gleichen Größenordnung liegen, obwohl sie von zwei verschiedenen Gemüsesorten stammen.

Bei Dotierung mit ENR war eine fast vollständige Ausbleichung der Rotkohlblätter festzustellen. Auch bei Gurken, Feldsalat, Bohnen und Rettich wurden in einer Studie phytotoxische Wirkungen von ENR beobachtet, jedoch ließ sich diese Beobachtung nicht auf Möhren übertragen [158]. MON bewirkte eine Wachstumshemmung, was sich in der Größe der Rotkohlblätter im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigte. Eine weitere augenscheinliche Wirkung des MON war eine atypische, spinnenengewebsartige Musterung der Rotkohlblätter.

Weitere Studien anderer Arbeitskreise belegen das hohe Aufnahme- und Transportpotential zahlreicher Nutzpflanzen, die in der Lage sind, Veterinärpharmaka unterschiedlicher Wirkstoffgruppen über die Wurzel aufzunehmen (vgl. Kapitel 1.1) [28, 29, 31-34].

Die Tatsache, dass in Hydrokultur Rotkohl- und Möhrenpflanzen, insbesondere die Organe, die für den menschlichen Verzehr geeignet sind, Antibiotikawirkstoffe aufgenommen haben, ist bedenklich. Die Untersuchungsergebnisse machten deutlich, dass sogar die Rotkohlblätter, die im späteren Entwicklungsstadium die essbaren Anteile der Pflanze ausmachen, mit hohen Gehalten an ENR (6-7  $\text{mg}/\text{kg}$  FG) belastet sind, wobei die Anzucht in dotierter Nährlösung nur 12 Tage betrug. Die Wachstumszeit der Rotkohlpflanzen im konventionellem Landbau ist relativ lang (in der Regel 120 Tage) und

zudem ist Rotkohl als Starkzehrer bekannt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Aufnahmeexperimenten in Hydrokultur kann eine mögliche Antibiotikabelastung von Rotkohlblättern aus konventionellem Feldanbau erwartet werden. Dieser Verbraucherschutzrelevanten Fragestellung wurde anschließend nachgegangen.

Besorgniserregend ist ebenfalls die Tatsache, dass die Möhrenrüben als essbares Pflanzenorgan antibiotische Wirkstoffe in signifikanten Mengen aufnehmen können, insbesondere CTC (6 mg/kg FG) und ENR (4 mg/kg FG). Mohrrüben werden in Deutschland häufig verzehrt, entweder als Rohkost, gekocht als Möhrengemüse oder gepresst als Möhrensaft. Zudem werden Möhren oft zur Babynahrung weiter verarbeitet und zubereitet. Die Nachweise machen eine mögliche Belastung unter Feldbedingungen der konventionellen Landwirtschaft denkbar. In diesem Zusammenhang bleibt die vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) geforderte "Nulltoleranz" für antibiotisch wirksame Stoffe in Lebensmittel aktuell [38].

Aufgrund der Befunde aus dem Modell "Hydrokultur" wird die Dringlichkeit offenkundig, die Belastungssituation des in landwirtschaftlicher Praxis angebautes Gemüse zu kontrollieren. Die Untersuchungsergebnisse machten zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit einen Feldversuch unter kontrollierten Anbaubedingungen (Anbau von Rotkohl unter Anwendung antibiotikadotierter Schweinegülle als Dünger; Rückstandsanalysen) dringend erforderlich. Das renommierte, in Feldversuchen erfahrene Gartenbauzentrum in Köln-Auweiler bot dazu die optimalen Versuchsbedingungen.

## **5.5 Antibiotika-Aufnahme in Rotkohl unter Feldbedingungen**

### **5.5.1 Bodenvorbereitungen und Düngung der Versuchspartellen vor der Pflanzung**

Für den Feldversuch im Gartenbauzentrum der Landwirtschaftskammer NRW in Köln-Auweiler wurden vier Versuchsvarianten in Streifenanordnung mit drei Wiederholungen, d.h. insgesamt 12 Parzellen benötigt (vgl. Abbildung 49). Die vier Varianten bestanden aus:

- mineralischer Kontrolldüngung (Variante 1),
- organischer Kontrolldüngung (Variante 2),
- Düngung mit dotierter Schweinegülle mit 50 mg/kg CTC und ENR (Variante 3) und
- Düngung mit dotierter Schweinegülle mit 150 mg/kg (Variante 4)

Jede Parzelle hatte die Flächenmaße 1,5 m x 16 m = 24 m<sup>2</sup>. Aus versuchstechnischen Gründen wurden an beiden Seiten Randparzellen mitgeführt, um eventuelle Standortvorteile bzw. -nachteile berücksichtigen und ausgleichen zu können. Die Auswahl der Dotierungskonzentrationen der Schweinegülle wurde nach Literaturstudien (vgl. Kapitel 3.1) getroffen, wobei CTC-Gehalte in Schweinegülle von 0,005 mg/kg bis 331

mg/kg für CTC angegeben sind (s. Kapitel 3.1, Tabelle 8). Diese CTC-Gehalte entstammen verschiedenen Betrieben und sind aufgrund unterschiedlicher Bedingungen (Einsatz von CTC auf dem Betrieb, rückstandsanalytische Bestimmungsmethode oder Angabe des Gehaltes bezogen auf Frischgewicht (FG) oder Trockenmasse (TM) nicht exakt vergleichbar.

Bei der Wahl der Dotierungskonzentration sollte der praxisrelevante Bereich eingehalten werden. Es war zu berücksichtigen, dass die Konzentration nicht zu gering sein durfte, um den Transfer der Antibiotika über den Pfad Gülle-Boden-Pflanze nachweisen zu können. Somit wurden zwei Dotierungskonzentrationen von 50 mg/kg und 150 mg/kg gewählt. Die höhere Konzentration (150 mg/kg) sollte eventuell zeigen, ob phytotoxisch bedingte optische Veränderungen der Pflanze eine mögliche Folge sein können. Zudem sollte erkannt werden, ob der Wirkstofftransfer Boden-Pflanze von der Antibiotikakonzentration in der Gülle abhängig ist. Möglich wäre jedoch auch, dass es für die Pflanze keinen Unterschied macht, wie viel Wirkstoff zur Verfügung steht, da sie nur bis zu einer gewissen Sättigung die Wirkstoffe aufnimmt (vgl. Kapitel 5.3.4, Abbildung 41 und Anhang A. 3.7). Im vorangegangenen Hydrokulturexperiment wurde eine Versuchsreihe mit ENR-dotierter Nährlösung in einer Konzentration von 2,5 µmol/L und einer parallelen Versuchsreihe mit 5,0 µmol/L durchgeführt. Die ENR-Aufnahmegehalte in den Pflanzen waren in beiden Versuchsreihen ähnlich hoch. Dieses Sättigungsphänomen konnte bei den Hydrokulturversuchen jedoch nur für ENR beobachtet werden, nicht bei den anderen eingesetzten Antibiotika.

Die Literaturrecherche über ENR-Gehalte in Wirtschaftsdünger bzw. Putenmist ergab einen Maximalgehalt von 8,3 mg/kg TM (s. Kapitel 3.1, Tabelle 8). Da die Datenbasis für ENR-Gehalte in Wirtschaftsdünger bzw. Tierexkrementen sehr schmal ist, wurde beschlossen, dieselben Konzentrationen, wie für CTC auch für ENR zu wählen. Zwar werden in der Veterinärmedizin nur ca. 1 % Fluorchinolone angewendet (s. Kapitel 2.1.2), wobei die Besonderheit der ENR-Applikation in der Schweineproduktion darin liegt, dass es nicht in Form von Futtermittelzusatz oder als Prophylaxe eingesetzt werden darf, sondern lediglich intramuskulär, weswegen keine hohen Gehalte in tierischen Ausscheidungen erwartet werden können.

Vor Beginn sowie nach Abschluss des Feldversuchs wurden Bodenproben von der LUFA NRW auf chemische und physikalische Bodenparameter untersucht, jedoch nicht auf Mikroorganismen. Demnach handelte es sich bei dem Boden um einen "sandigen, schluffigen Lehmboden", der zu 43,2 % aus Schluff (0,002 – 0,063 mm), zu 38,7 % aus Sand (0,063 – 2,0 mm) und zu 18,1 % aus Ton (< 0,002 mm) bestand. Der pH-Wert des Bodens in Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) lag zwischen 6,2 und 6,6. Gemäß Trapp [242] ist die Pflanzenverfügbarkeit für ein Antibiotikum von der Beschaffenheit des Bodens, der Pflanzenart und den Umweltbedingungen abhängig.

Vor der Güllebeaufschlagung (vgl. Analysenbericht der Gülle Anhang A. 5.2) wurde der Boden, auf dem zehn Jahre kein Anbau erfolgte, gefräst und gelockert. Anschließend wurden die einzelnen Parzellen abgesteckt. Die Abbildung 49 zeigt die Anordnung der Versuchspartellen, wobei die Größenverhältnisse nicht berücksichtigt sind.

	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4	
<b>Rand</b>	Mineralische Kontrolle <b>-Parzelle 3-</b>	Organische Kontrolle <b>-Parzelle 6-</b>	ENR+CTC je 50 mg/kg Schweinegülle <b>-Parzelle 9-</b>	ENR+CTC je 150 mg/kg Schweinegülle <b>-Parzelle 12-</b>	<b>Rand</b>
<b>Rand</b>	Mineralische Kontrolle <b>-Parzelle 2-</b>	Organische Kontrolle <b>-Parzelle 5-</b>	ENR+CTC je 50 mg/kg Schweinegülle <b>-Parzelle 8-</b>	ENR+CTC je 150 mg/kg Schweinegülle <b>-Parzelle 11-</b>	<b>Rand</b>
<b>Rand</b>	Mineralische Kontrolle <b>-Parzelle 1-</b>	Organische Kontrolle <b>-Parzelle 4-</b>	ENR+CTC je 50 mg/kg Schweinegülle <b>-Parzelle 7-</b>	ENR+CTC je 150 mg/kg Schweinegülle <b>-Parzelle 10-</b>	<b>Rand</b>

Abbildung 49: Anordnung der Rotkohlpzellen im Feldversuch

Für die Dotierung der Antibiotika-unbelasteten Schweinegülle vom FLI aus Braunschweig wurden Dotierungslösungen für CTC ( $\beta=10$  g/L in MeOH) und ENR ( $\beta=10$  g/L in MeOH/0,1 mol/L NaOH) angesetzt. Die Dotierung der Schweinegülle wurde in 15 L Gießkannen vorgenommen. Dazu wurden 10 kg Schweinegülle (entspricht einer 10 L Gießkannenfüllung) mit einem Aliquot der beiden Dotierungslösungen versehen (entweder je 50 mL für den Dotierungsgehalt 50 mg/kg Gülle oder je 150 ml für den Dotierungsgehalt 150 mg/kg) und mit einem elektrischen Rührstab homogenisiert.

Die dotierte Gülle wurde auf die dafür vorgesehenen Versuchspartellen 7 - 12 aufgebracht (Variante 3 - 4), während die Versuchspartellen 4 - 6 mit undotierter Gülle beaufschlagt wurden (Variante 2) (vgl. Abbildung 49). Die Partellen 1 bis 3 (Variante 1) wurden mineralisch gedüngt. Nach der Beaufschlagung wurde der Oberboden mittels Fräsmaschine gefräst (Bodentiefe 30 cm), sodass die Gülle gut mit dem Boden durchmischt und gleichzeitig die Beschaffenheit des Bodens für die Bepflanzung optimiert wurde (Fotos in Abbildung 53). Eine Antibiotikakontamination der mineralisch und organisch gedüngten Versuchspartellen durch die Fräsmaschine lässt sich weitgehend ausschließen, da diese Kontrollpartellen als erstes gefräst wurden. Die Fotos in Abbildung 50 a-d dokumentieren einzelne Stadien der Gölledotierung und -aufbringung auf die Versuchspartellen.

			
50 a) Gülle-Kanister mit unbelasteter Gülle	50 b) Dotierung mit CTC- und ENR-Stammlösung, beide in eine Gießkanne	50 c) Durchmischen der Lösungen mit einem elektrischen Rührstab	50 d) Ausbringung der Gülle auf die Versuchsfelder

Abbildung 50: Gölledotierung und -ausbringung

### 5.5.2 Pflanzung der Rotkohl-Jungpflanzen

Die Rotkohl-Jungpflanzen (1500 Stück) der Sorte "Rodon (Nikerson Zwaan)" wurden von dem Unternehmen "Jungpflanzen Rudolph Klein" aus Bonn bezogen. Die Rotkohljungpflanzen bzw. Setzlinge befanden sich vor ihrer Pflanzung in Anzuchtkästen. Zum Zeitpunkt der Pflanzung hatten die jungen Pflanzen zum Teil ihre dikotylen Keimblätter abgeworfen und bereits fünf Laubblätter entwickelt. Nach dem BBCH [338] von kopfbildendem Blattgemüse, worunter der Rotkohl fällt, haben die Pflanzen zum Zeitpunkt der Pflanzung ein Wachstumsstadium mit der Codierung 15 erreicht, d.h. sie haben bereits fünf Laubblätter entfaltet. Abbildung 51 zeigt zum Vergleich eine Pflanze mit drei Laubblättern, die den BBCH-Code 13 erreicht hat (s. Anhang A. 5.3).

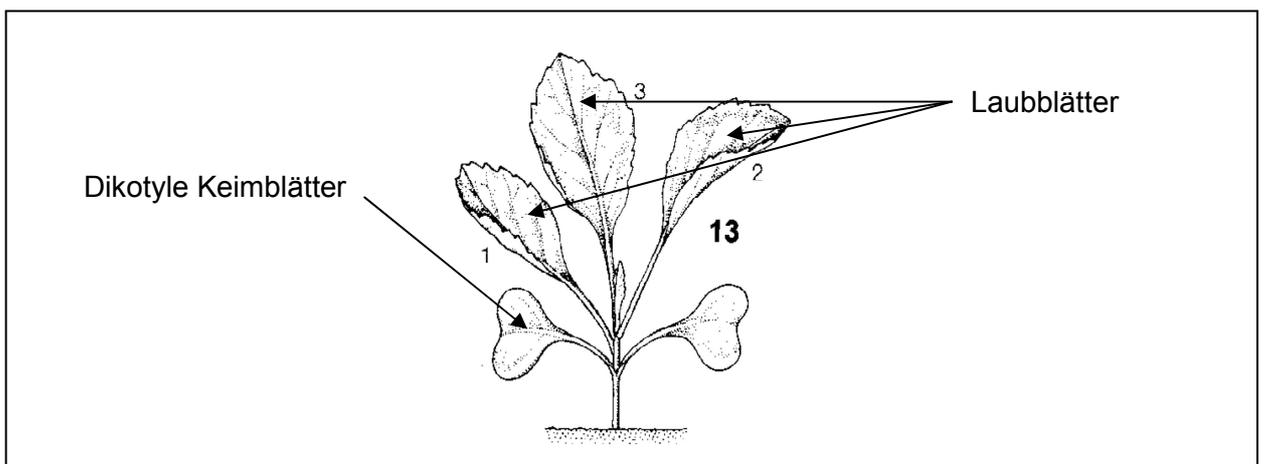


Abbildung 51: Wachstumsstand 13 nach BBCH-Codierung [338]

Die Rotkohl-Jungpflanzen steckten mit ihren Wurzeln in Erdblocken und wurden mit Hilfe einer Pflanzmaschine unter Berücksichtigung der Anbau- und Sortenhinweise für die Anbausorte "Rodon" (s. Anhang A. 5.4) gepflanzt. Dabei saßen zwei Personen auf den

Sitzen der Pflanzmaschine und steckten zeitlich synchron die Pflanze mit Erdblock manuell in den Boden. Auf jeder Parzelle wurden 64 Rotkohlpflanzen gepflanzt, wobei die Pflanzabstände zwischen den Pflanzen einer Pflanzungsreihe 50 cm und zwischen zwei Reihen einer Parzelle 75 cm betragen (vgl. Abbildung 52 und Foto 53 d).

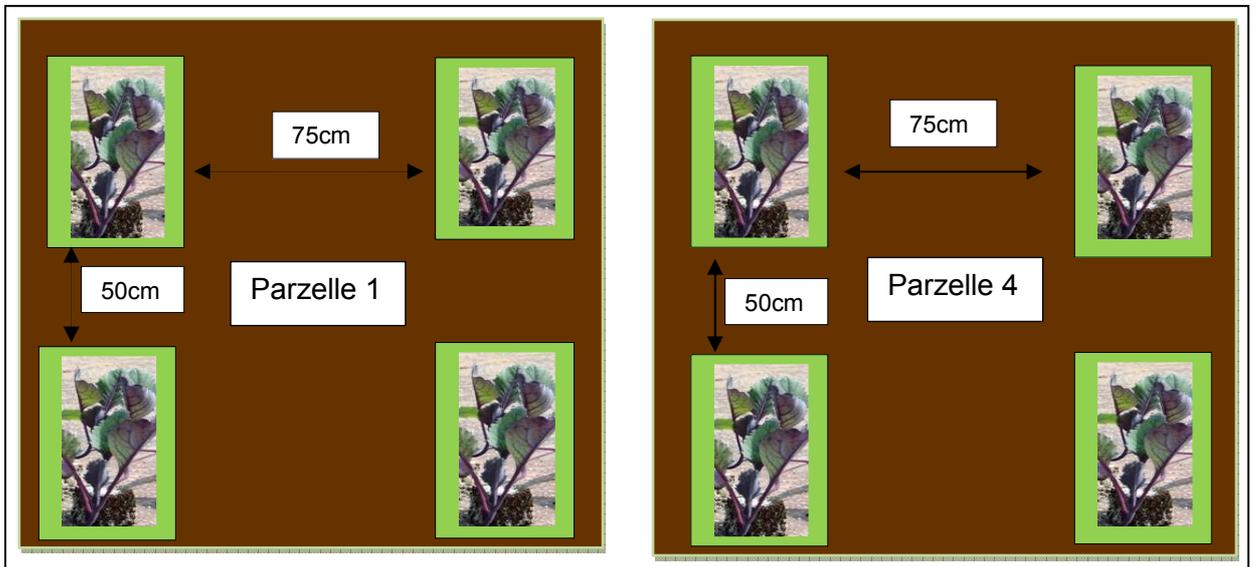


Abbildung 52: Darstellung der Pflanzabstände auf den Versuchsparzellen

Nach abgeschlossener Pflanzung wurden die Felder am selben Tag bewässert. Die Mitarbeiter der Landwirtschaftskammer NRW in Köln-Auweiler waren beauftragt, die weitere Aufzucht der Rotkohlpflanzen zu begleiten. Bei Beeinträchtigungen durch äußere Einflüsse, wie z.B. Schädlingsbefall oder ähnlichem, waren Maßnahmen zu treffen. Die Fotos (Abbildung 53 a-d) geben einen Einblick in den Rotkohlanbau.



Abbildung 53: Pflanzung der Rotkohl-Jungpflanzen

### 5.5.3 Zwischenernte: Untersuchungen aufgrund von Nematodenbefall

Nach 71 Wachstumstagen erfolgte eine außerplanmäßige Ernte (Zwischenernte), da zunächst unerklärliche Ernteverluste zu verzeichnen waren. Am stärksten war die Parzelle 10 der Variante 4 betroffen, sodass auf ihr nur noch 7 Pflanzen wuchsen (vgl. Abbildung 54, Foto 54 m). Drei bis fünf Rotkohlpflanzen von jeder Parzelle wurden geerntet und in Wurzel, äußere Blätter und Rotkohlkopf getrennt. Anschließend wurden die Proben gekühlt nach Paderborn transportiert, tiefgefroren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und anschließend homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur Rückstandsanalyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren gelagert und anschließend analysiert. Die Rückstandsanalysen der einzelnen Pflanzenteile sollten eine genauere Inkorporierungslokalisierung der Antibiotika bzw. ihrer Metabolite in der Pflanze ermöglichen. Aufgrund von Vermutungen des Versuchsleiters der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen (LWK), dass eventuell Nematoden für das Welken der Pflanzen verantwortlich sein könnten, wurden drei Mischproben des Bodens durch den Pflanzenschutzdienst der Landwirtschaftskammer in Bonn untersucht. Die Ergebnisse des Labors haben den Nematodenbefall bestätigt, wie der Untersuchungsbefund der LWK vom 13.08.2010 zeigt (vgl. nachfolgende Tabelle 44):

Tabelle 44: Prüfergebnisse der Bodenuntersuchung auf Nematoden

<b>Prüfergebnisse der Fachlabore des Pflanzenschutzdienstes</b>			
<b>Proben-Nr.</b>	<b>10-005401</b>	<b>10-005402</b>	<b>10-005403</b>
<b>Ihre Probenbez.</b>	<b>Bodenprobe optisch gut</b>	<b>Bodenprobe optisch schlecht</b>	<b>Mischprobe der gesamten Fläche (Rotkohl)</b>
Probenart	Boden	Boden	Boden
Kultur	Rotkohl	Rotkohl	Rotkohl
Sorte	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Probenzustand	geeignet	geeignet	geeignet
Artdifferenzierung Nematoden	Pratylenchus thornei Meloidogyne naasi	Meloidogyne naasi	Meloidogyne naasi
Nematoden im Boden [100 ml]	35 Pratylenchus spp. 25 Paratylenchus spp. 5 Tylenchorhynchus spp. 5 Rotylenchus spp. 20 Helicotylenchus spp. 15 Ditylenchus spp. 20 Meloidogyne spp.	70 Pratylenchus spp. 40 Paratylenchus spp. 10 Rotylenchus spp. 55 Helicotylenchus spp. 5 Ditylenchus spp. 5 Meloidogyne spp. 5 Heterodera spp. 5 Criconema spp. 15 Amplimerlinius spp.	70 Pratylenchus spp. 90 Paratylenchus spp. 10 Tylenchorhynchus spp. 5 Helicotylenchus spp. 5 Meloidogyne spp.
<b>Beurteilung der Prüfergebnisse</b>			
10-005401	Zusätzlich wurde der Boden auf Zysten untersucht: 0 Zysten Hakl, 12.08.2010		
10-005402	Zusätzlich wurde der Boden auf Zysten untersucht: 1 Zyste ohne lebenden Inhalt Hakl, 12.08.2010		
10-005403	Zusätzlich wurde der Boden auf Zysten untersucht: 4 Zysten ohne lebenden Inhalt Hakl, 12.08.2010		

Aus dem Untersuchungsbefund (s. Anhang A. 5.1) geht hervor, dass alle drei Bodenmischproben einen Befall mit Nematoden aufwiesen, wobei laut Untersuchungsbericht die Anzahl der gefundenen Nematoden bei Probe 2 und 3 in der Gesamtheit am Anfang der Schadschwellenüberschreitung eingestuft werden. „Bei Probe

1 und 2 ist besonders die Anzahl der gefundenen Stängelälchen (*Ditylenchus* spp.) als kritisch anzusehen“, laut Prüfbericht. Das würde bedeuten, dass insbesondere die Stängelälchen für das Pflanzenwelken verantwortlich gemacht werden können. Nach mündlicher Auskunft des Versuchsleiters sind Nematoden primär für das Pflanzenwelken verantwortlich, da diese die Pflanzenwurzeln beschädigen. Aufgrund dessen wird es Pilzstämmen erleichtert, die Pflanzen zu befallen, und somit führt ein Pilzbefall zu sekundären Folgeerscheinungen. Es bleibt offen, weshalb der Boden eine so hohe Anzahl an Nematoden aufwies, zudem auf der Feldfläche 10 Jahre keine Pflanzen angebaut wurden oder diese andersartig genutzt worden war.

Der Nematodenbefall der Pflanzen verursachte innerhalb von wenigen Tagen ein rasches Welken der Rotkohlpflanzen. Die Ernteverluste verliefen gradientenartig in Bezug auf die beaufschlagte Antibiotikakonzentration: Die Parzellen, die nicht mit Antibiotika kontaminiert waren, hatten ein geringeres Ausmaß an Ernteverlusten. Die Versuchspartzellen mit den höchsten Antibiotikakonzentrationen hatten dagegen die größten Ernteaufälle zu verzeichnen, gefolgt von den mittelhoch dotierten Versuchspartzellen. Die Abbildungen 54 a-m zeigen Fotos der jeweiligen Parzelle mit der Angabe der Anzahl noch vorhandener Pflanzen. Anfänglich wurden 64 Pflanzen pro Parzelle gepflanzt. Es stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Antibiotikakonzentration und Nematodenbefall besteht. Sicher kann jedoch gesagt werden, dass der Antibiotikaeinsatz, insbesondere in hoher Konzentration, zu visuellen Veränderungen der Rotkohlpflanzen führte. Diese waren im Vergleich zu den Rotkohlpflanzen der Kontrollparzellen schlechter entwickelt und von geringerer Größe (vgl. Abbildung 57).

			
54 a) Mineralische Kontrolle -Parzelle 3-  (38 Pflanzen)	54 b) Organische Kontrolle -Parzelle 6-  (29 Pflanzen)	54 c) ENR+CTC 50 mg/kg -Parzelle 9-  (23 Pflanzen)	54 d) ENR+CTC 150 mg/kg -Parzelle 12-  (10 Pflanzen)
			
54 e) Mineralische Kontrolle -Parzelle 2-  (30 Pflanzen)	54 f) Organische Kontrolle -Parzelle 5-  (31 Pflanzen)	54 g) ENR+CTC 50 mg/kg -Parzelle 8-  (22 Pflanzen)	54 h) ENR+CTC 150 mg/kg -Parzelle 11-  (16 Pflanzen)
			
54 i) Mineralische Kontrolle -Parzelle 1-  (26 Pflanzen)	54 j) Organische Kontrolle -Parzelle 4-  (23 Pflanzen)	54 k) ENR+CTC 50 mg/kg -Parzelle 7-  (10 Pflanzen)	54 m) ENR+CTC 150 mg/kg -Parzelle 10-  <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">7 Pflanzen</span>

Abbildung 54: Ernteverluste auf den Parzellen durch Nematodenbefall (Aufnahmedatum 04.08.2010, Fotos 54 a-m: M. Herbener)

*Qualitative rückstandsanalytische Ergebnisse der Zwischenernte*

Um erste Hinweise auf einen Antibiotikatransfer Boden-Pflanze zu erhalten, wurden zunächst einmal qualitative Untersuchungen an den Rotkohlproben der Zwischenernte vorgenommen. Die Analysen der Rotkohlproben ergaben, dass die Rotkohlpflanzen der Kontrollfelder Antibiotika unbelastet waren (s. Tabelle 45). Die Rotkohlpflanzen der Variante 3 (Dotierung mit 50 mg/kg) als auch Variante 4 (Dotierung mit 150 mg/kg) zeigten positive Befunde für ENR in Wurzeln (z.B. Abbildung 55 und 56), äußeren Blättern und Rotkohlkopf, wohingegen keine CTC-Befunde vorlagen. Untersuchungen von Yan et al. [358] haben gezeigt, dass die Sorption von ENR an Tonminerale größtenteils durch Oberflächensorption (äußere Oberflächen) und Einlagerung von Tonmineralzwischenschichten erfolgt. Die bedeutendsten Sorptionsmechanismen für ENR sind Kationenaustausch und Oberflächenkomplexierung, wohingegen gelöste Huminstoffe wenig Einfluss auf die Sorption haben. Jedoch sind Tonmineral gebundene Huminstoffe nicht zu vernachlässigen, da diese u.a. die Sorptionsplätze blockieren können. Zur Untersuchung der Versickerung von ENR in unterschiedlichen Böden (Sand-, lehmiger Sand- und sandiger Lehmboden) wurden Lysimeterversuche durchgeführt [359]. Unabhängig von der Bodenart befanden sich 98 % des wiedergefundenen ENR in den oberen 5 cm des Bodens [359]. Diese Feststellung bedeutet, dass hauptsächlich Rotkohljungpflanzen aufgrund ihrer noch relativ kurzen Wurzellänge das in dem Oberboden befindende ENR aufnehmen können. Mit zunehmendem Pflanzenwachstum dringen die Wurzeln in tiefere Bodenschichten ein, in denen sich kein ENR befindet.

In der Literatur [360] werden genotoxische Wirkungen, ausgehend von Fluorchinolonekontaminierten Böden auf Wurzelzellen der Bohnensorte *Vicia faba*, beschrieben. Hierbei wurde die Feststellung gemacht, dass die Gentoxizität bei Anwesenheit dreier Fluorchinolone in Kombination (Nalidixinsäure, Ciprofloxacin und Enrofloxacin) aufgrund synergetischer Effekte erhöht wird. Gehalte von 200 µg/kg der Fluorchinolone im Boden führten in Kombination zu einer vergleichbaren Genotoxizität wie Gehalte von 5-10 mg/kg der Einzelantibiotika [360]. Zwar konnte in den Rotkohlpflanzen nur ENR nachgewiesen werden, wobei im Boden zudem CIP als Umwandlungsprodukt festgestellt wurde (s. Kapitel 5.5.4), was ebenfalls das Pflanzenwelken mit verursacht haben könnte.

Im Gegensatz zu ENR war CTC in keiner der Pflanzenorgane nachweisbar. Bislang gibt es wenige Untersuchungen von der Aufnahme und Akkumulation von Tetracyclinen in Pflanzen. Modelluntersuchungen von Boonsaner et al. [366] an Reispflanzen haben gezeigt, dass die Tetracycline, die unter normalen Umweltbedingungen als Zwitterionen im Boden vorliegen, über passive Aufnahme durch Diffusion in die Pflanzen eingetragen werden. Mögliche Ursachen, weshalb kein CTC in den Pflanzen nachgewiesen wurde,

sind im Kapitel 5.5.4 beschrieben. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft die Massen- und Fragmentspektren von ENR in Rotkohlwurzeln (Variante 3 und 4):

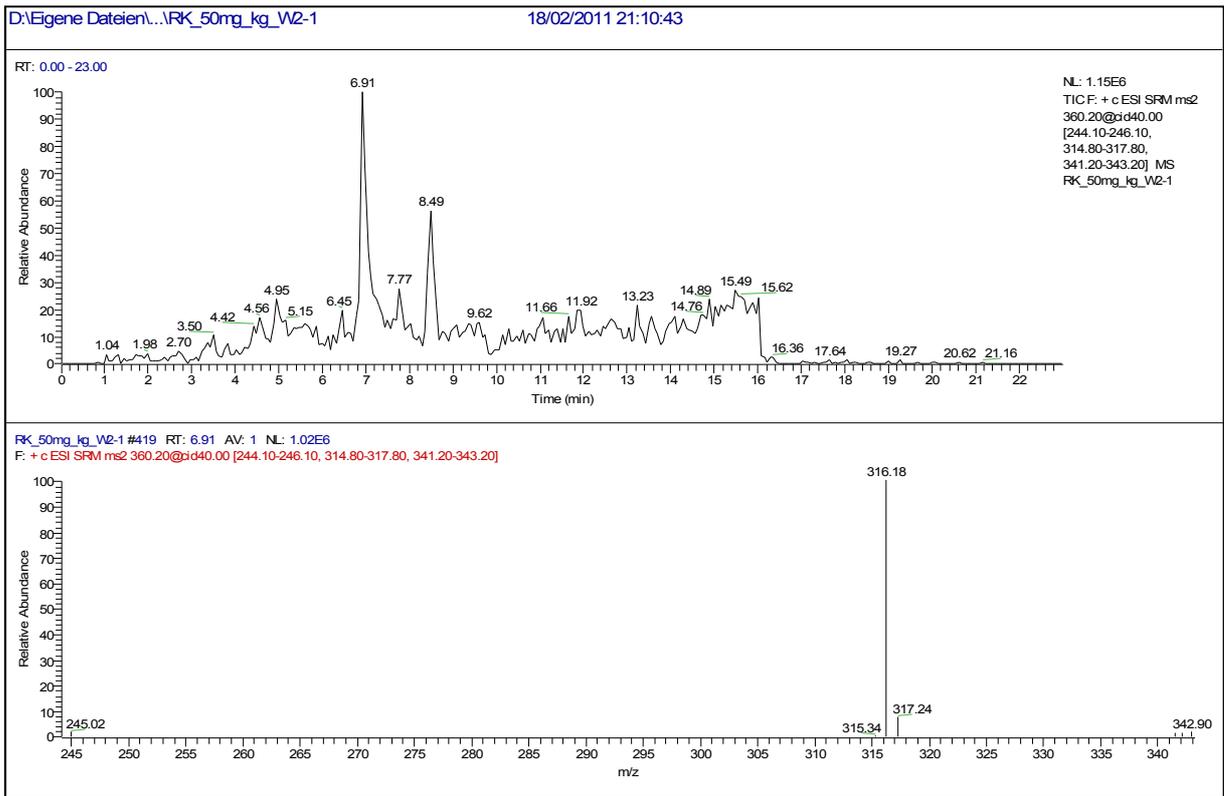


Abbildung 55: Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von ENR in Rotkohlwurzeln, angebaut auf den dotierten Parzellen der Variante 3 [ $\beta=50$  mg/kg], ( $t_R = 6,91$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

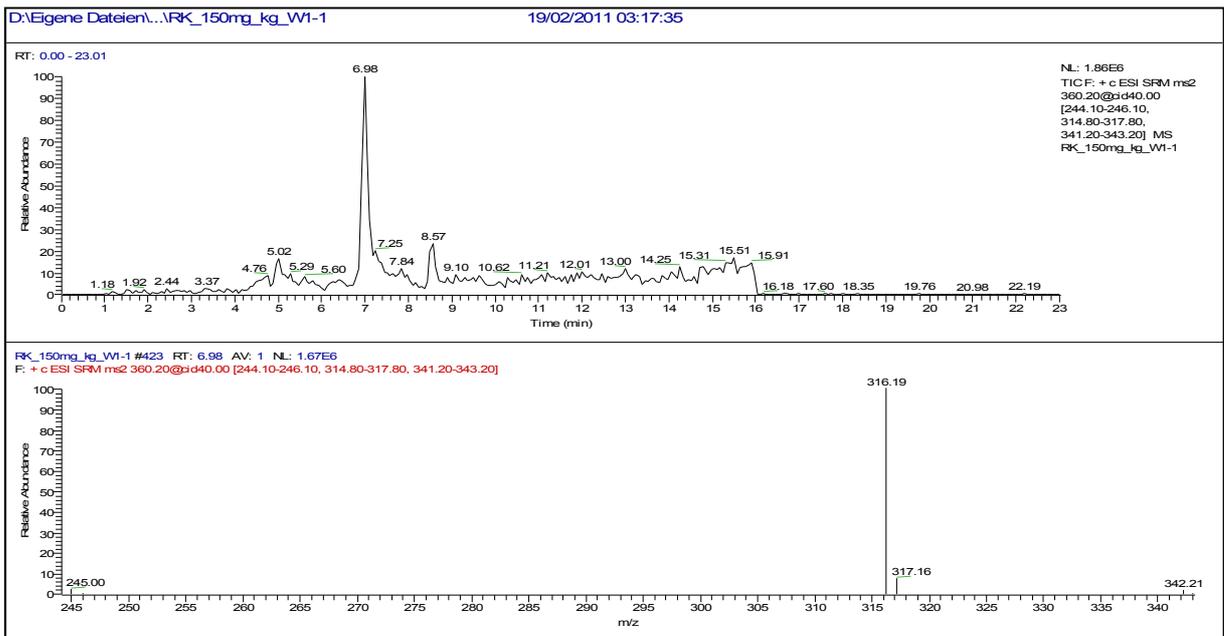


Abbildung 56: Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von ENR in Rotkohlwurzeln, angebaut auf den dotierten Parzellen der Variante 4 [ $\beta=150$  mg/kg], ( $t_R = 6,98$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

### 5.5.4 Haupternte: Untersuchungsergebnisse und Diskussion

Nach weiteren zehn Tagen (81 Tage nach der Pflanzung) erfolgte analog zur Zwischenernte die reguläre Ernte. Zu diesem Zeitpunkt waren die Rotkohlköpfe durchschnittlich 1 kg schwer und hatten nach der BBCH-Codierung den Wachstumsstand Code 49 und damit die art-/sortentypische Größe, Form und Festigkeit erreicht. Die nachfolgende Abbildung 57 zeigt die erntereifen Rotkohlpflanzen der verschiedenen Varianten.

			
57 a) Rotkohl vom mineralischen Kontrollfeld	57 b) Rotkohl vom organischen Kontrollfeld	57 c) Rotkohl, angebaut auf den gülle-beaufschlagten Parzellen der Variante 3 (50 mg/kg)	57 d) Rotkohl, angebaut auf den gülle-beaufschlagten Parzellen der Variante 4 (150 mg/kg)

Abbildung 57: Erntereifer Rotkohl (Stand: 14.08.2010, Fotos 57 a-d: M. Herbener)

Die Rotkohlpflanzen der mineralisch (Variante 1) und der organisch gedüngten Kontrollfelder (Variante 2) sahen arttypisch, "gesund" und handelsüblich aus (vgl. Abbildung 57, Foto 57 a und b). Die Rotkohlpflanzen der antibiotikadotierten, güllebeaufschlagten Felder der Variante 3 und 4 unterschieden sich nicht in ihrem Aussehen, aber viele Pflanzen waren viel kleiner im Vergleich zu den Kontrollpflanzen der Varianten 1 und 2. Ob diese Wachstumshemmung mit der Antibiotikakontamination im Zusammenhang steht oder mit dem Nematodenbefall, der vor allem auf den Parzellen der Variante 3 und 4 zu verzeichnen war, kann hierbei nicht beurteilt werden.

#### *Rückstandsanalysen der Haupternte*

Die Pflanzen, die auf den antibiotikaunbehandelten Kontrollfeldern wuchsen, waren unbelastet, d.h., dass auch keine Verschleppungseffekte aufgetreten waren. Dagegen konnte ENR in allen Organen der Rotkohlpflanzen sowohl der Variante 3 als auch der Variante 4 nachgewiesen werden. Die ENR-Gehalte der Rotkohlkompimente der Variante 3 betragen 12,4 µg/kg FG für die inneren Rotkohlblätter, 10,9 µg/kg FG für die äußeren Blätter und 9,2 µg/kg FG für die Wurzeln. Variante 4 zeigte trotz dreifach höherer Dotierungskonzentration der aufgebrauchten Schweinegülle ähnlich hohe ENR-Gehalte in den Rotkohlproben. So wurde ENR in den inneren Blättern mit 16,9 µg/kg FG, in den äußeren Blättern mit 10,6 µg/kg FG und in den Wurzeln mit 11,9 µg/kg FG quantifiziert (s. Tabelle 45).

Tabelle 45: ENR-Gehalte ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG) in Rotkohlblättern, (Variante 1: Mineralische Kontrolldüngung, Variante 2: Organische Kontrolldüngung, Variante 3: Gülledotierung 50 mg/kg, Variante 4: Gülledotierung 150 mg/kg); CTC wurde in keiner Probe nachgewiesen, Methode II k, N=2, n=3

ENR-Gehalt in ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ FG)	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4
<b>innere Blätter bzw. Rotkohlkopf</b>	n.n.	n.n.	12,4 +/- 1,84	16,9 +/- 0,94
<b>äußere Blätter</b>	n.n.	n.n.	10,9 +/- 0,83	10,6 +/- 0,46
<b>Wurzel</b>	n.n.	n.n.	9,2 +/- 0,36	11,9 +/- 1,04

Der Vergleich der Dotierungskonzentrationen mit den Aufnahmegehalten in die Pflanzenorgane zeigt, dass zwar ein Zusammenhang zwischen Dotierungskonzentration und Aufnahmegehalt besteht, der aber nicht linear ist. So wurde bei dreifach höherer Antibiotikadotierung in den äußeren Rotkohlblättern beider Varianten (3 und 4) eine ENR-Kontamination von 10,9 bzw. 10,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG gemessen. Das Verhältnis der beiden Varianten 3 und 4 in Bezug auf die Inkorporation in die inneren Blätter und die Wurzeln beträgt 1:1,4 (12,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG zu 16,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG) bzw. 1:1,3 (9,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG zu 11,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG). Diese Ergebnisse stimmen tendenziell mit dem Aufnahmevermögen in Hydrokultur überein, die annehmen lassen, dass ENR in den Rotkohlpflanzen nur bis zu einem bestimmten Sättigungsgrad aufgenommen wird (vgl. Kapitel 5.3.4). Bei den Möhrenpflanzen konnte in Hydrokultur ein solches Sättigungsphänomen nicht erkannt werden.

Die Rückstandsanalysen des Rotkohls haben keine CTC-Befunde erbracht, obwohl dieses Tetracyclin in den Hydrokulturexperimenten (s. Tabelle 40 a) bevorzugt von den Rotkohlpflanzen aufgenommen wurde. Dafür kann es verschiedene Gründe geben, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

#### *Mögliche Ursachen der nicht nachweisbaren Aufnahme von CTC in Rotkohl*

Die nicht nachweisbare Aufnahme von CTC in die Rotkohlpflanze ist entgegen der Erwartung, denn unter Hydrokulturbedingungen wurden signifikante Mengen an CTC durch Rotkohlpflanzen aufgenommen. Der Vergleich der Aufnahmegehalte der verschiedenen Antibiotika ergab deutlich, dass sowohl die Rotkohlpflanzen als auch die Möhrenpflanzen bevorzugt CTC und ENR aufnahmen. Bei den vorherigen Dotierungsexperimenten, mit verschiedenen Antibiotika in Hydrokultur, wurde der Pflanze immer nur ein Antibiotikum pro Nährlösung angeboten. Bislang wurde nicht untersucht, wie hoch das Aufnahme- und Transferpotential der Pflanze ist, wenn zeitgleich zwei

Wirkstoffe als Mischung angeboten werden. Modellrechnungen über mögliche Antibiotikaaufnahmen in die Pflanze, gestützt auf physikalisch-chemische Parameter, wie Lipophilie, Verdampfungstendenz, Säurekonstante ( $pK_a$ ) und pH-Wert, erlauben Abschätzungen (vgl. Kapitel 3.3.2) [242, 336], wobei CTC mit einem  $\log K_{OW}$ -Wert von -0,33 als pflanzengängig beurteilt werden kann. Jedoch gemäß Wu [339] müssen diese lipophiliebasierten Modellberechnungen nicht für alle Stoffe Gültigkeit haben, da die Bedingungen wie z.B. pH-Wert des Bodens, Sorptionsbereitschaft an den Boden, Abbauprozesse, Pflanzenart und chemische Eigenschaften der Stoffe von noch größerer Wichtigkeit in Bezug auf die Pflanzenaufnahme seien [339].

Bei der Ursachendiskussion über die nicht nachweisbare Aufnahme von CTC kam die Vermutung auf, dass ENR und CTC in einer Konkurrenzsituation stehen könnten, wobei ENR das Eindringen von CTC in die Pflanze verhindert. Somit wäre das Aufnahmevermögen von ENR dominierend, wobei CTC der Konkurrenz unterliegen würde. Bei den Hydrokulturexperimenten zeigte sich eine maximale Aufnahme von CTC (Summe) in den Wurzeln mit 211 mg/kg FG und ENR mit 15 mg/kg FG. Demnach ist das Aufnahmepotential der Rotkohlpflanzen für CTC unter Hydrokulturbedingungen - separat dotiert -, um ein Vielfaches größer. Umso erstaunlicher ist die Beobachtung, dass unter Feldbedingungen keine nachweisbare Aufnahme von CTC zu erkennen war, jedoch von ENR.

Es stellte sich zudem die Frage, ob sich das CTC bereits vollständig in der Gülle zersetzt hat. Zwar schien es sehr unwahrscheinlich, da in der Antiinfektiva-Studie [154] von Grote et al. gezeigt wurde, dass sogar nach acht monatiger Gülle-Lagerung CTC und seine Umwandlungsprodukte in hohen Konzentrationen nachweisbar waren. Die Analysen der dotierten Schweinegülle, die am Tag der Güllebeaufschlagung als Rückstellprobe genommen wurden, haben ergeben, dass sowohl in der mittelhoch dotierten (50 mg/kg, s. Abbildung 59) als auch in der hoch dotierten Schweinegülle (150 mg/kg) ENR und CTC mit seinen Umwandlungsprodukten (epi-keto-CTC, iso-CTC und epi-enol-CTC) vorlagen, wobei die Peakflächen der erwarteten Dotierungskonzentration im Vergleich zu den Peakflächen eines externen MSTD ( $\beta=1$  mg/L) lagen. Des Weiteren konnten die Umwandlungsprodukte TC und CIP in den dotierten Gülleproben nachgewiesen werden (alle Chromatogramme sind aufgeführt im Anhang A. 5.5, Abbildungen 5.5.1 bis 5.5.7).

Die nachfolgende Abbildung 58 zeigt das Massenchromatogramm (TIC) von CTC aus der 50 mg/kg dotierten Schweinegülle (Probenvorbereitung nach der Hausmethode).

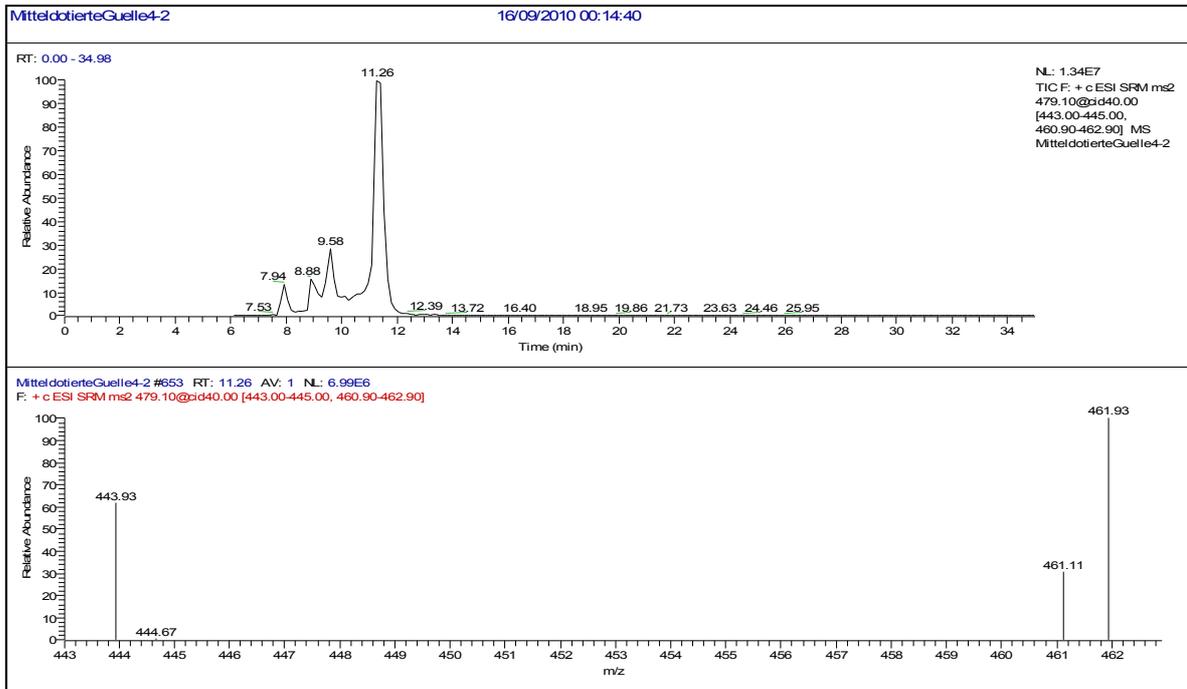


Abbildung 58: Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von CTC aus dotierter Schweinegülle ( $\beta=50$  mg/kg), CTC ( $t_R=11,26$  min) und seine Metabolite: e-keto-CTC ( $t_R=7,94$  min), iso-CTC ( $t_R=8,88$  min), e-enol-CTC ( $t_R=9,58$ ), LC-MS/MS, SRM-Modus

Eine weitere Ursache für die Nichtnachweisbarkeit von CTC in den Rotkohlpflanzen könnte in dem Sorptionsverhalten von CTC im Boden liegen (vgl. Kapitel 3.2). Demnach werden Tetracycline als immobil und persistent beschrieben. Diese Sorptionseigenschaft von CTC an die Bodenmatrix kann eine drastische Reduzierung der Verfügbarkeit für die Pflanze verursachen, da die an der Bodenmatrix haftenden Antibiotika irreversibel adsorbiert sind. Die Pflanzenverfügbarkeit ist abhängig von zahlreichen Faktoren, wie z. B. von der Polarität des Antibiotikums und seine Sorptionseigenschaften im Boden, von der Pflanzenart, von Bodenfaktoren, wie z.B. pH-Wert, Belastungsausmaß, Bodenzusammensetzung und den Witterungsverhältnissen (vgl. Kapitel 3.3.2) [339]. Die Sorption von CTC an Bodenpartikel wird durch das Protolysegleichgewicht der Tetracycline in Abhängigkeit vom pH-Wert beeinflusst. Wie bereits im Kapitel 5.5.1 erwähnt, beträgt der pH-Wert des Bodens 6,2. Bei diesem pH-Wert liegt das CTC überwiegend in zwitterionischer Form vor (s. Abbildung 59). Demnach würde gemäß Thiele-Bruhn [213] aufgrund der zwitterionischen CTC-Form im leicht sauren Boden eine stärkere Sorption an den Boden erfolgen.

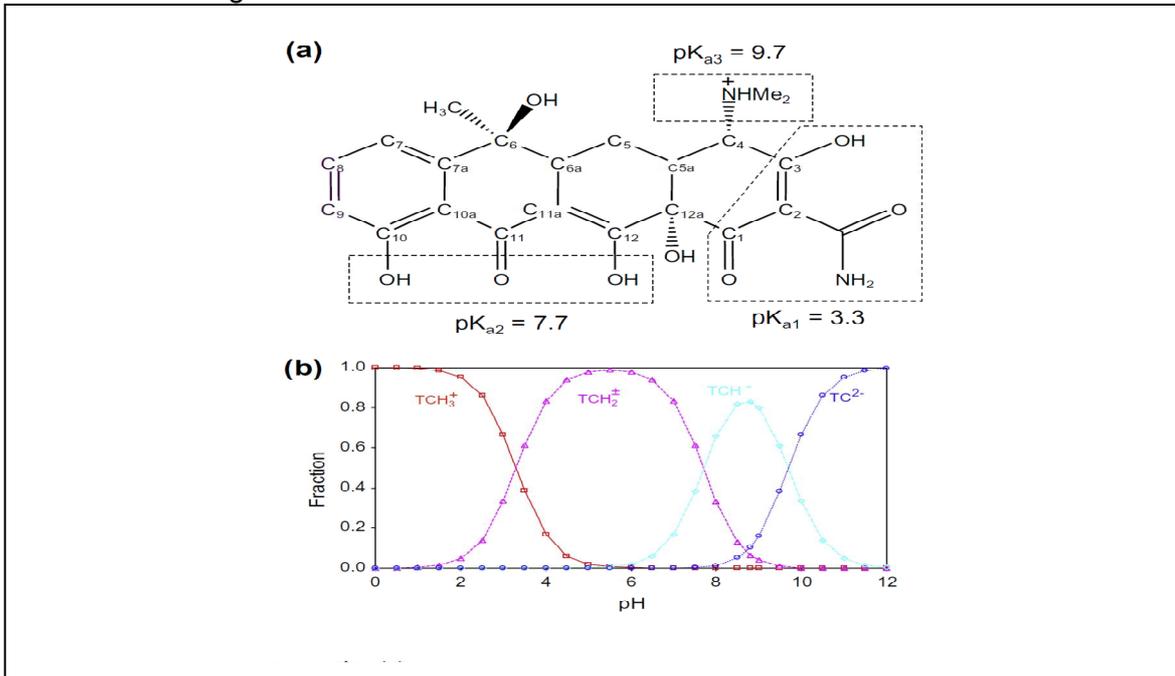


Abbildung 59: Protolyse und  $pK_a$ -Werte von Tetracyclin (a); Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert (b) [213]

Zur weiteren Ursachenklärung wurden rückstandsanalytische Bodenuntersuchungen auf CTC, ENR und CIP durchgeführt. Die Bodenproben wurden von den gedüngten Parzellen der Varianten 2, 3 und 4 zum Zeitpunkt der Rotkohlernte aus einer Schichttiefe von 30-60 cm entnommen. Dazu wurden von H. Stevens aus dem Arbeitskreis Grote Analysenmethoden zur Quantifizierung der extrahierbaren Anteile der genannten Antibiotika aus dem Boden entwickelt (s. Anhang A. 5.6, detaillierte Methodenbeschreibung). Die Ergebnisse der Bodenanalysen waren wie folgt:

Tabelle 46: Antibiotikagehalte im Boden der Versuchspartzellen (Region Köln) zum Zeitpunkt der Rotkohlernte (Variante 3: Gülledotierung 50 mg/kg, Variante 4: Gülledotierung 150 mg/kg); ca. 3 Monate nach Gülleaufbringung; Methoden nach H. Stevens (s. Anhang A. 5.6), N=2, n=3

Antibiotikagehalt ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Extraktionsmittel	Variante 3	Variante 4
Summe CTC	* $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$	***3,2 +/- 0,7	9,9 +/- 2,2
ENR	** $\text{Mg}(\text{NO}_3)$	15,1 +/- 4,5	51,1 +/- 16,4
CIP	** $\text{Mg}(\text{NO}_3)$	***1,3 +/- 0,1	***3,1 +/- 0,7

\*  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ : Ammoniak/Ammoniumchlorid/Ethylendiamintetraessigsäure

\*\*  $\text{Mg}(\text{NO}_3)$ : Magnesiumnitrat

\*\*\* < Bestimmungsgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)= 10:1)

In der mittelhoch dotierten, 3. Variante wurden lediglich 3,2 µg/kg FG CTC und in der hohen Dotierungsvariante nur 9,9 µg/kg FG CTC nachgewiesen. Die Gehalte für ENR in den Bodenproben lagen höher. Im Boden der 3. Variante konnte 15,1 µg/kg FG ENR und der 4. Variante 51,1 µg/kg FG ENR quantifiziert werden. Zudem konnte CIP in Bodenproben beider Varianten nachgewiesen werden. Gemäß Sturini et al. [361] findet ein Photoabbau von ENR nur an der direkten Bodenoberfläche statt. Neben vielen Umwandlungsprodukten entsteht CIP als Hauptmetabolit von ENR.

Zudem könnten Umwandlungsprodukte und Metabolite des CTC's entstanden sein, die nicht mit der angewandten Multimethode erfasst werden, wie z.B. das Anhydro-CTC. Des Weiteren besitzen Pflanzen einen Metabolismus, der bewirkt, dass die eingetragenen Antibiotika entweder in der Zellvakuole eingelagert oder nach Transformations- und Konjugationsreaktionen in die pflanzlichen Zellwände kompartmentiert werden und somit nicht extrahierbar sind (vgl. Kapitel 3.3.3). Zu ihnen zählt auch die "Lignifizierung" bei der sich Zellulose und Lignin in die Pflanzenzellwände einlagern und es dadurch zu einer Verholzung bzw. Verfestigung der Pflanzen kommt [340].

Im Hinblick auf den so geringen extrahierbaren CTC-Gehalt aus dem Boden wird verständlich, dass eine mögliche Aufnahme durch die Rotkohlpflanze daher nur sehr gering sein kann. Die geringen extrahierbaren CTC-Gehalte im Boden beruhen vor allem auf Sorption an die Bodenmatrix (vgl. Kapitel 3.2). Eventuell spielen noch andere Ursachen eine Rolle, jedoch kann die Sorption an den Boden als hauptsächliche Ursache erkannt werden. Tetracycline werden als sehr persistent klassifiziert und können von Bodenpartikeln sorbiert bzw. sequestriert werden [221]. Diese "Sequestrierung" macht eine rückstandsanalytische Extraktion äußerst schwierig, was jedoch nicht bedeutet, dass kein CTC im Boden vorhanden ist (vgl. Kapitel 3.2). Nur Antibiotika, die in der Bodenlösung gelöst vorliegen, sind für die Pflanzen zugänglich und somit über die Wurzel aufnehmbar. In diesem Fall war eine ausreichende Pflanzenverfügbarkeit für CTC aufgrund der Sorption an den Boden nicht gegeben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es mehrere Einflüsse und Ursachen für die nicht nachweisbare Aufnahme von CTC in Rotkohl geben kann. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass ENR aufgenommen und in den Rotkohlpflanzen transportiert wird, sodass in den essbaren Teilen Gehalte um 11 µg/kg FG vorlagen. Eine Antibiotikaaufnahme ist somit nicht nur unter idealen Hydrokulturbedingungen gegeben, sondern ebenso unter Feldbedingungen, was in Bezug auf den Verbraucherschutz als bedenklich eingestuft werden kann. Die Aufnahme von CTC in die Pflanze konnte nicht nachgewiesen werden, wobei Sequestrierung als hauptsächliche Ursache anzunehmen ist [211].

## 5.6 Rückstandsanalysen in laufender Rotkohlkonserven-Produktion

Nach den Antibiotika-Aufnahmeexperimenten sowohl unter Hydrokultur- als auch unter Feldbedingungen bestand eine weitere Zielsetzung darin, Industrie-Rotkohl aus konventionellem Anbau (Vertragsanbau) zu analysieren, wobei die Rohware bis zum verkaufsfertigen Produkt im Rahmen verschiedener Produktionsstufenkontrollen rückstandsanalytisch zu verfolgen waren. Dazu erfolgte die Probenahme in einem großen Produktionsunternehmen, das u.a. Gemüsekonserven, wie tafelfertigen Rotkohl produziert und seine Produkte an marktführende deutsche Unternehmen vertreibt, aber auch Kunden in Europa, Nordamerika und Australien beliefert.

### 5.6.1 Produktionsablauf zur Herstellung von Rotkohlkonserven

Der erntefrische Rotkohl wird vom LKW auf ein Fließband verladen (s. Schema in Abbildung 60). Anschließend werden maschinell der Strunk und manuell die beiden äußeren Blätter entfernt, welche für die weitere Rotkohlverarbeitung nicht verwendet werden. Im nächsten Schritt wird der Rotkohl maschinell von einem Schnetzler zu feinen, 5 cm langen Rotkohlstreifen geschnitten und mittels Verleseband zu den Dämpfvorrichtungen transportiert. Am Verleseband findet im Rahmen einer optischen Begutachtung eine Qualitätskontrolle des Rotkohls statt. Manuell werden optisch auffällige Rotkohlblätter ausgesondert. Das Verleseband fährt nun den Rotkohl in die erste der drei aufeinanderfolgenden Dämpfvorrichtungen. Die Dämpfung hat zum einen die wichtige Funktion, unerwünschte, gesundheitsgefährdende Stoffe aus dem Rotkohl zu entfernen. Zu diesem Zweck wird die Rotkohllake nach der ersten Dämpfung verworfen. Sie enthält viel Nitrat, aus dem sich durch bakterielle Reduktion toxisches Nitrit bilden kann. Neben der Beseitigung der Schadstoffe hat die Dämpfung die weitere Funktion den Rotkohl zu Garen, sodass die Zubereitungszeit für den Konsumenten verringert wird. Nach der ersten Dämpfung erfolgen zwei weitere Dämpfeinheiten, wobei die dabei getrennte Lake, neben weiteren Zusätzen wie Gewürze und Essig, bei der anschließenden "Krautfüllung" in Konservengläser wieder zugeführt wird. Die Verdeckelung der mit Rotkohl gefüllten Gläser erfolgt hierbei unter Vakuum. Anschließend werden die verschraubten Gläser über ein Transportband in den Pasteurisierer gefahren. Die Pasteurisierung erfolgt für 20 min. bei einer Temperatur von 85°C, sodass noch vorhandene Keime abgetötet und die Rotkohlkonserven mit einer Mindesthaltbarkeit von 4 Jahren deklariert werden kann. Nach der Etikettierung der Gläser werden diese durch einen Metall- und Glasdetektor gefahren. Die Rotkohlkonserven sind nun verkaufsfertig und werden in Kartons verpackt, sachgemäß gelagert und zum Kunden geliefert.

*Probenahmestationen zur Ermittlung der rückstandsanalytischen Belastungsprofile*

Insgesamt wurden im Jahr 2010 im Rahmen dieser Arbeit drei deutsche Rotkohllieferanten beprobt. Die Produktionszahlen für Rotkohlkonserven und die Anzahl der Rotkohllieferanten stehen in Abhängigkeit zur Anfrage der Kunden. So werden in einem Jahr Jahreskontrakte für das Folgejahr mit dem Vertriebsanbau festgelegt. Über einen Fragebogen sollten Informationen zu den Anzuchtbedingungen, sowie Viehbestand, Medikation, Bodenart und Gülleausbringung eingeholt werden. Trotz zugesicherter Anonymität und mehrmaliger Aufforderung der Rotkohllieferanten den Fragebogen zu beantworten, trafen keine Rückmeldungen ein, was die anschließende Bewertung der Rückstandsanalysen erschwert.

Während der laufenden Produktion wurden an sechs Stationen repräsentative Probemengen entnommen. Dabei war die erste Station der "Entstrunker", wobei der Strunk (gestauchter Sproß) als Speicher- und zudem als Transportorgan für Nährstoffe gilt und daher rückstandsanalytisch von besonderem Interesse war [341]. Über den Strunk können Nährstoffe und Antibiotika in andere Pflanzenkompartimente gelangen. Diese werden bevorzugt in den älteren, äußeren Blättern eingelagert, weswegen bei der nachfolgenden Station "Entblätterung" die äußeren Blätter als weitere Probe genommen wurden. Strunk und äußere Blätter stellen nur Abfallprodukte dar, jedoch könnten die Rückstandsanalysen von Strunk und äußeren Blättern Informationen über den möglichen Antibiotikatransfer von Boden in den Strunk bis in die alten Blätter geben. Im Gegensatz zu den Abfallprodukten wird der geschnittene Rotkohl für die Weiterverarbeitung eingesetzt, der eine mögliche Kontaminationsquelle für die weitere Rotkohlproduktion darstellen könnte. Daher wurde "geschnittener Rotkohl vom Verleseband", der dritten Station, beprobt. Anschließend wurden Proben des "gedämpften Rotkohls ohne Lake" entnommen, um zu erkennen, ob der temperierte Dämpfprozess Auswirkungen auf die eventuelle Antibiotikakontamination hat. Die letzten beiden Probenahmestationen waren "Rotkohl vor Pasteurisierung" und "nach Pasteurisierung" als Fertigprodukt. Bei der 20 minütigen Pasteurisierung bei 85 °C können eventuell thermolabile Antibiotika bzw. andere Xenobiotika (Insektizide, etc...) abgebaut werden. Die Untersuchung des marktfähigen Endproduktes ist von besonderer Wichtigkeit, da sie mit der Verbraucherschutzfrage in Zusammenhang steht.

Die Probennahmen der sechs Stationen von Rotkohl eines Lieferanten erfolgte am gleichen Tag, wobei diese in Kühlboxen zur Universität Paderborn transportiert und dort gelagert wurden. Die "unverarbeiteten" Proben, wie Strunk, äußere Blätter und geschnittener Rotkohl wurden kurz tiefgefroren und anschließend homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur LC-MS/MS-Analyse bei -80°C tiefgefroren. Die verarbeiteten Rotkohlproben der Stationen "Dämpfung" bzw. "vor und nach Pasteurisierung" wurden bei Raumtemperatur gelagert und als erstes untersucht. Die folgende Abbildung zeigt in der

linken Spalte die einzelnen Produktionsstufen von erntefrischem Rotkohl bis zur Konserve und in der rechten die einzelnen Probeentnahmestationen (vgl. Abbildung 60).

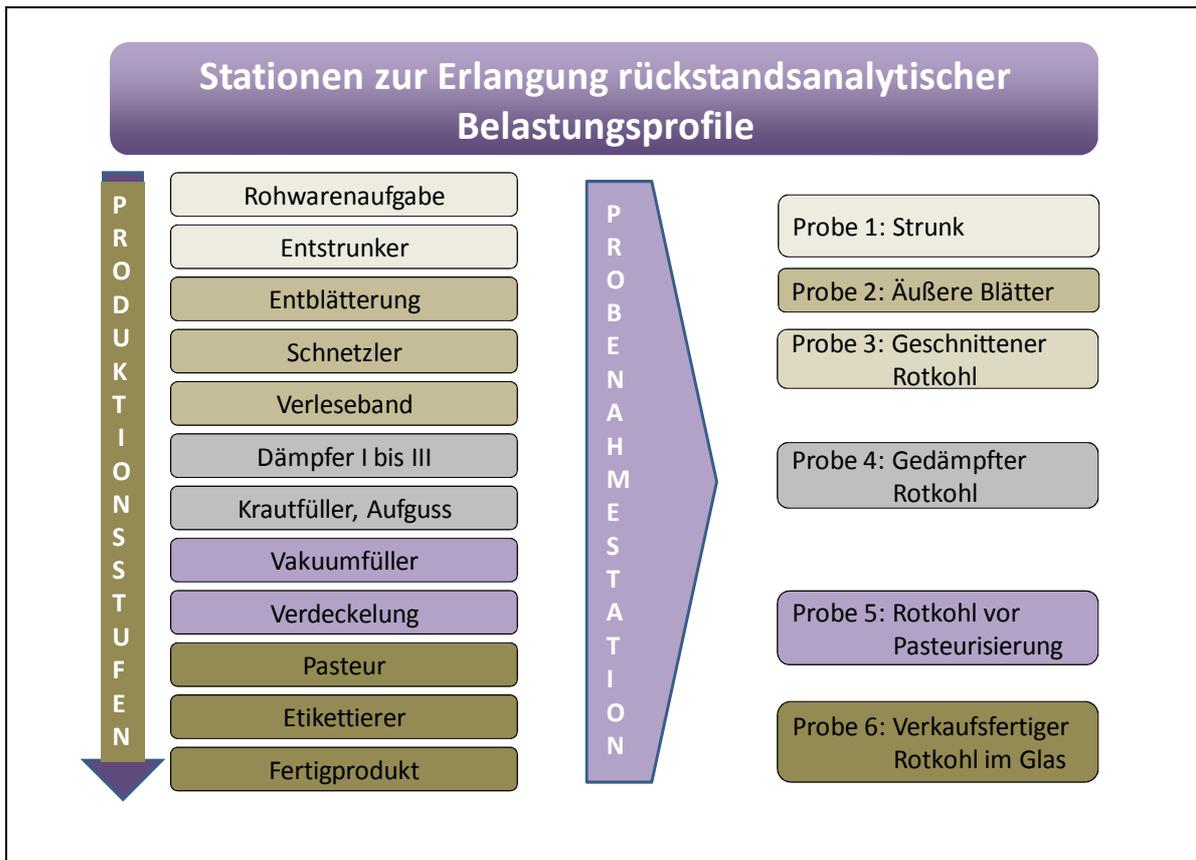


Abbildung 60: Stufenkontrollplan bei der industriellen Produktion von Rotkohl

### 5.6.2 Analysergebnisse der Rotkohlproben aus der Produktion

Von den drei beprobten Rotkohllieferanten konnten nur in 4 Mischproben eines Lieferanten Antibiotikakontaminationen festgestellt werden. So ergaben sich zunächst Positivbefunde von TC im Strunk, in den äußeren Blättern und zugleich in geschnittenem Rotkohl. Zudem konnten neben TC Spuren auch iso-CTC in geschnittenem Rotkohl festgestellt werden. Die Identifizierung erfolgte anhand eines Vergleiches mit den Massenchromatogrammen und Fragmentspektren ( $MS^2$ , SRM-Modus) eines externen MSTD's ( $\beta=1$  mg/L, bestehend aus SFD, ENR, CIP, TC, DC, OTC, DMC und CTC mit ihren Epimeren und die Keto-Enol-Tautomere der CTC's). Zur weiteren Bestätigung der Befunde und ggf. Quantifizierung wurden erneut Proben von alten, äußeren Blättern, von geschnittenem Rotkohl und dem Strunk aufgearbeitet und mittels Standardaddition analysiert. Jedoch ergaben sich bei der erneuten Messung keine Antibiotikaspuren mehr im Strunk, wobei die TC-Gehalte in den äußeren Blättern bei 19,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und in

geschnittenem Rotkohl bei 16,4 µg/kg lagen (vgl. Tabelle 47). Zudem ließ sich der Verdacht auf iso-CTC im geschnittenen Rotkohl mittels Standardaddition nicht bestätigen.

Tabelle 47: Tetracyclin-Befunde im Rahmen des Stufenkontrollplanes, N=4, n=3

Matrix	Tetracyclin-Gehalte [µg/kg]
äußere Rotkohlblätter	19,2 +/- 1,2
geschnittener Rotkohl	16,4 +/- 0,9

Die aufgenommene TC-Menge lag in den äußeren und inneren Rotkohlblättern in der gleichen Größenordnung. Ein solches Verhalten konnte bereits in den Hydrokulturexperimenten beobachtet werden.

Beispielhaft zeigen Abbildung 61 und 62 die Massenchromatogramme und Fragmentspektren von TC als externen Standard und in der Realprobe "geschnittener Rotkohl".

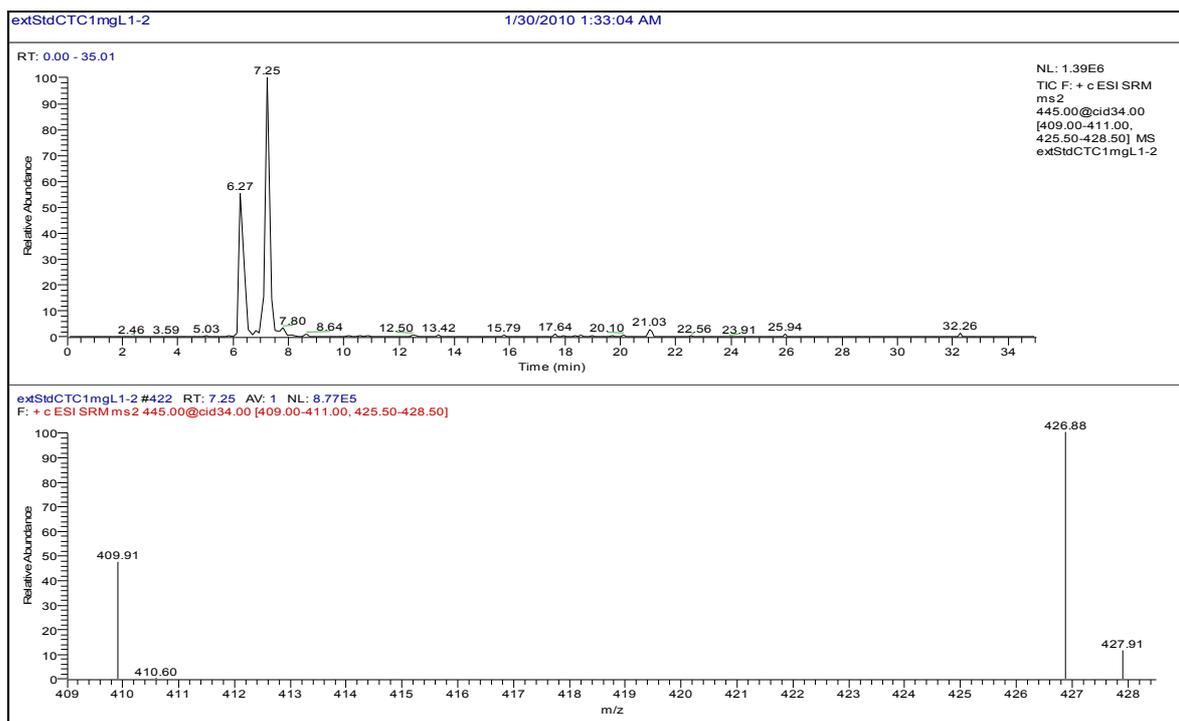


Abbildung 61: MS<sup>2</sup>-Chromatogramm und Massenspektrum von externem TC-Standard ( $\beta=1$  mg/L), LC-MS/MS Chromatogramme: a) TIC SRM MS<sup>2</sup> ( $m/z=445,0; 409,00-411,00; 425,50-428,50$ ), b) Massenspektrum,  $t_R=7,25$  min (TC)

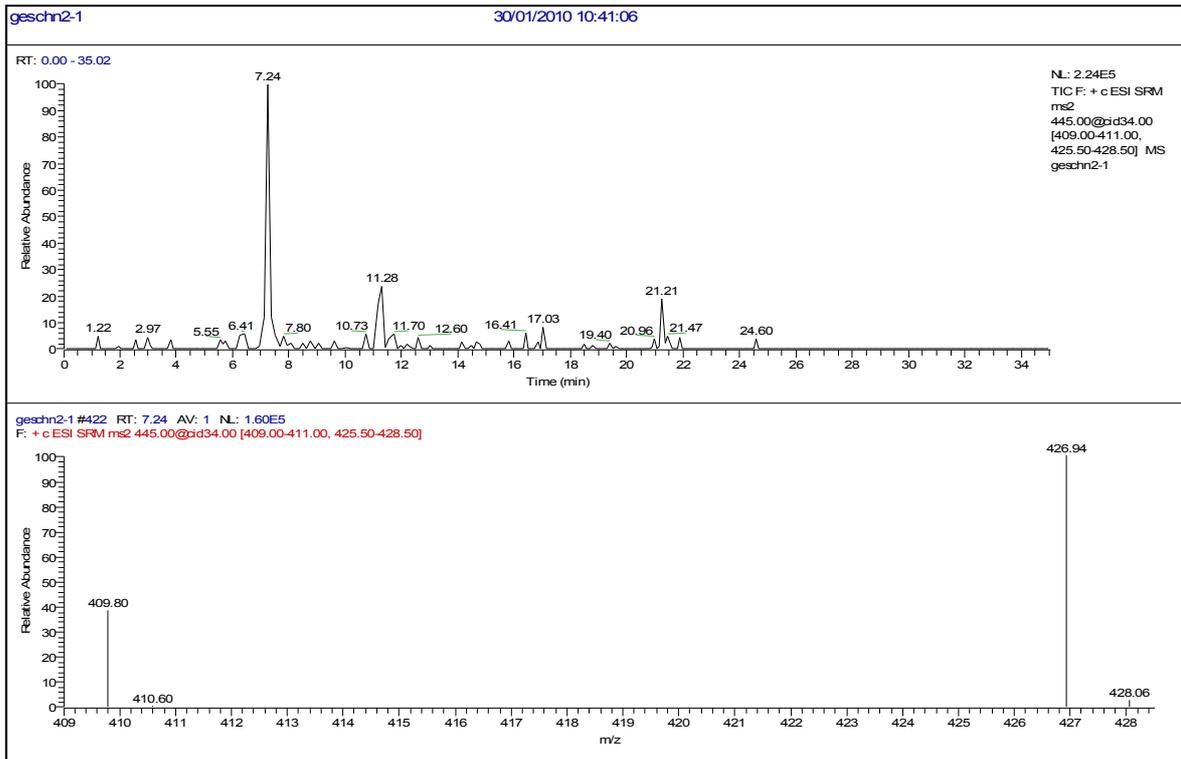


Abbildung 62: MS<sup>2</sup>-Chromatogramm und -spektrum von TC in "geschnittenem Rotkohl"; LCQ-System, LC-MS/MS-Chromatogramme a) TIC SRM MS<sup>2</sup> (m/z= 445,0; 409,00-411,00; 425,50-428,5; b) Massenspektrum, t<sub>R</sub>=7,24 min (TC)

Nach Durchlaufen der drei Dämpfungsschritte wurde eine weitere Probenahme und anschließende Rückstandsanalyse durchgeführt. Ebenso wurde Rotkohl vor und nach der Pasteurisierung analysiert, mit dem Ergebnis, dass TC in keiner dieser Produktionsstationen nachgewiesen werden konnte. Ursache für dieses Ergebnis kann zum einen darin liegen, dass beim ersten Dämpfungsschritt die wasserlöslichen Antibiotikarückstände in die wässrige Phase (Lake) überführt und diese Lake bei der industriellen Produktion verworfen wird. Zum anderen könnte eine Erklärung sein, dass die thermischen Verarbeitungsschritte bei hohen Temperaturen zur Zersetzung von TC führen. So haben z.B. Hassani et al. [380] Thermostabilitätsprüfungen bei 110-140°C von OTC, DC und TC durchgeführt mit dem Ergebnis, dass DC am thermostabilsten, OTC am -labilsten ist und die Thermostabilität von TC dazwischen liegt.

Abschließend ist festzustellen, dass die Rückstandsanalysen von Industrie-Rotkohl aus konventionellem Anbau tatsächlich Positivbefunde an TC von erntefrischem, geschnittenem Rotkohl ergaben, die aber im weiteren Prozessablauf nicht mehr auftraten. Jedoch lagen keine Informationen der landwirtschaftlichen Betriebe über Anbauperiode, Bodenqualität, Bodenbearbeitung, Produktionsbedingungen, Viehbestand, Medikation des Viehbestands und Gülleausbringung vor. Somit fehlen entscheidende Informationen zur Interpretation der Befunde bzw. zur Identifizierung der Belastungsquelle, d.h. welche landwirtschaftlichen Produktions- und Anbaubedingungen zu einem eventuell

verbrauchergefährdenden Antibiotikatransfer von Boden in Gemüsepflanzen beitragen. Nur durch diese Erkenntnisse sind zukünftig die Anbaubedingungen der Gemüseproduktion so zu verändern, dass Kontaminationen durch antibiotisch wirksame Stoffe weitgehend reduziert werden. Somit besteht weiterhin großer Forschungsbedarf zur Gewinnung repräsentativer Daten zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen. Die rückstandsanalytischen Befunde im Rahmen dieser Arbeit haben dennoch gezeigt, dass Antibiotikaaufnahmen in Rotkohl sowohl in Modellversuchen unter Hydrokultur- und Freilandbedingungen, als auch in konventioneller Landwirtschaft erfolgten.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Zur Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten von Mensch und Tier sind in den letzten 70 Jahren große Fortschritte durch die Anwendung von Antibiotika erzielt worden. Seit den beiden letzten Jahrzehnten wird jedoch weltweit eine drastische Zunahme an pathogenen, antibiotikaresistenten Bakterien beobachtet. Infolge dessen sind in der Infektions-Behandlung von Mensch und Tier zahlreiche Antibiotika unwirksam geworden. Die Bundesregierung Deutschland nahm sich der Problematik an und veröffentlichte im November 2008 die Deutsche Antibiotika-Resistenz-Strategie (DART), die die Reduzierung der Bildung und Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen zum Ziel hat.

Die Hauptursache für die Zunahme von Antibiotika-Resistenzen in der Human- und Veterinärmedizin sind die unsachgemäße Verordnung und Anwendung von Antibiotika sowie Mängel in der Hygiene, insbesondere der extensive Antibiotikaeinsatz in der Massentierhaltung von Schweinen und Geflügel. Gemäß der aktuellen Stellungnahme (04/2012, vom 08.02.12) des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) „gilt es zu verhindern, dass die antibiotikaresistenten Keime aus dem Tierstall über Lebensmittel oder den direkten Kontakt mit Tieren zum Problem für den Menschen werden“ [375]. In Deutschland fallen jährlich 30 Millionen Tonnen an tierischen Exkrementen an, die als Wirtschaftsdünger auf die landwirtschaftlichen Felder gelangen. Diese können u.a. pathogene, antibiotikaresistente Keime sowie Antibiotika-Rückstände und ihre Umwandlungsprodukte bzw. Metabolite enthalten. Über die Wurzel von Nutzpflanzen können diese aufgenommen und in die essbaren Pflanzenorgane transportiert werden [17, 31, 32, 153, 158, 347-352]. In einem Getreidescreening wurde ein Antibiotika-Transfer sogar bis ins Getreidekorn nachgewiesen [14]. Eine Risikobewertung für die menschliche Gesundheit durch den Verzehr von Antibiotika kontaminierten Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs wurde noch nicht vom BfR vorgenommen, da die bisherigen Datenerhebungen noch keine Aussage ermöglichen [39]. Aufgrund dessen ist ebenfalls nicht geklärt, ob lebensmittelrechtliche Regelungen für antibiotisch wirksame Stoffe in pflanzlichen Lebensmitteln notwendig sind, wie sie bereits in Lebensmitteln tierischer Herkunft geregelt werden.

Im Hinblick auf die beschriebenen Forschungs- und Gesetzeslücken bestand die Zielsetzung dieser Arbeit darin, einen Beitrag zur Untersuchung der Antibiotikaaufnahmen von verzehrstarken Gemüsesorten am Beispiel von Rotkohl und Möhren zu leisten. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sowie parallele Untersuchungen zur Resistenzverbreitung anderer Arbeitskreise können für die Abschätzung der Gesundheitsrisiken eine wichtige Grundlage bilden.

Dazu wurde, aufbauend auf die Untersuchungsmethodik früherer Studien, das Aufnahmepotential dieser Gemüse für Antibiotika in Hydrokultur (Möhren, Rotkohl), sowie unter Feldbedingungen (Rotkohl) als auch die Belastung von Rotkohl aus konventioneller Landwirtschaft ermittelt.

Zur Bestimmung der Antibiotika-Rückstände wurde eine Analysenmethode auf der Basis sequentieller Extraktionen (Fest-Flüssig-Extraktion und Festphasen-Extraktion) mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS/MS) entwickelt. Untersucht wurden Möhren- und Rotkohlpflanzen aus den Aufnahmeexperimenten auf die folgenden applizierten verordnungstarken Veterinärantibiotika und einige ihrer Metabolite: Amoxicillin (AMO), Chlortetracyclin (CTC), Sulfadiazin (SFD), Monensin (MON) und Enrofloxacin (ENR). Die Validierung der Methode ergab hohe Wiederfindungen (~ 72 bis 100 %) für ENR, MON und CTC sowie auch für die Umwandlungsprodukte von CTC (Tetracyclin (TC), Doxycyclin, Oxytetracyclin und Demeclocyclin) und für Ciprofloxacin als Umwandlungsprodukt von ENR.

Der Nachweis von AMO und seiner Metabolite Diketopiperazin (Diketo) und Penicilloinsäure von Amoxicillin (AMA) in Pflanzen erwies sich als äußerst problematisch. Zunächst wurde versucht, AMO, Diketo und AMA aus reiner Citrat-Lösung zu extrahieren, was nicht möglich war. Nach zahlreichen Optimierungsversuchen gelang es aber, aus Hydrogenphosphat-Lösung zufriedenstellende Wiederfindungen für AMO (77,0 %), Diketo (91,3 %) und AMA (55,8 %) zu erzielen. Diese Methode lässt sich aber nur bedingt auf die Fest-Flüssig-Extraktion der Antibiotika aus Rotkohl und Möhren anwenden, da ausschließlich AMA (50,8 %) in Möhrenrüben wiedergefunden wurde.

Für die unzureichende Extrahierbarkeit der  $\beta$ -Lactame aus Pflanzen sind verschiedene Ursachen anzuführen. So können z.B. die inkorporierten Antibiotika in der pflanzlichen Zellvakuole gespeichert und dort bereits abgebaut werden [376, 377]. Zudem besteht der Verdacht, dass der Abbau von AMO durch die Freisetzung von Enzymen ins Zytosol während der Probenvorbereitung durch Zerreiben (Homogenisierung) der Pflanzenproben beschleunigt wird [378]. Diese weiterhin bestehenden Unklarheiten bezüglich der Nachweisbarkeit von AMO und seiner Metabolite in Pflanzen, erfordert weiteren Forschungsbedarf. Für den Nachweis der anderen applizierten Antibiotika war die entwickelte und validierte Analysenmethode erfolgreich.

Zur Bestimmung des Antibiotika-Aufnahmevermögens von Rotkohl- und Möhrenpflanzen wurden Experimente in Hydrokultur, deren Nährlösung jeweils mit einem Antibiotikum dotiert (5  $\mu\text{mol/L}$  bzw. 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) worden war, durchgeführt. Tatsächlich zeigten beide Pflanzen ein enormes Aufnahme- und Transportpotential, insbesondere für ENR und CTC.

Rotkohlblätter enthielten 0,21 mg/kg Frischgewicht (FG) CTC, 14,6 mg/kg FG ENR, die Wurzeln sogar bis zu ~ 60 mg/kg FG CTC und 72,8 mg/kg FG ENR, die Möhrenrüben 6,0 mg/kg FG CTC, 4,1 mg/kg FG ENR und deren Wurzeln 70,5 mg/kg FG CTC sowie 72,8 mg/kg FG ENR. Komponenten anderer Wirkstoffgruppen (SFD, MON) wurden nur in geringen Mengen aufgenommen, teilweise unter chemischer Umwandlung (Metabolisierung). Das hohe Aufnahmepotential der Gemüsepflanzen unter Hydrokulturbedingungen machte eine Feldstudie notwendig, um unter praxisnahen landwirtschaftlichen Bedingungen den Transfer der Antibiotika aus güllegedüngtem Boden in die Pflanze zu ermitteln.

So wurde in einem Feldversuch Rotkohl auf Versuchspartzen angebaut, die mit Antibiotika dotierter Gülle gedüngt wurden (CTC und ENR kombiniert in zwei Dotierungskonzentrationen: 50 mg/kg (Variante 3) und 150 mg/kg (Variante 4)) Die Rückstandsanalysen der verschiedenen Pflanzenorgane (Wurzeln, Kopf) ergaben für ENR Gehalte von 9,2 bis 16,9 µg/kg FG in den essbaren Bestandteilen des Rotkohlkopfes.

Da in den Hydrokulturexperimenten sehr hohe Konzentrationen von CTC in den Rotkohlwurzeln nachgewiesen wurden, bestand die Erwartung, dass auch unter Feldbedingungen CTC im Rotkohl aufgenommen wird. Entgegen dieser Annahme war aber in keiner der Rotkohl-Feldproben CTC nachweisbar.

Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes wurden auch Bodenproben der Versuchspartzen rückstandsanalytisch untersucht. So ergaben sich zum Zeitpunkt der Ernte extrahierbare ENR-Gehalte von 15,1 µg/kg FG (Variante 3) bis 51,5 µg/kg FG (Variante 4) und viel geringere CTC-Gehalte (3,2 µg/kg bis 9,9 µg/kg). Zudem konnte CIP als Hauptmetabolit von ENR (1,3 bis 3,1 µg/kg) im Boden nachgewiesen werden.

Jedoch besagt dieses Ergebnis nicht, dass sich tatsächlich nur derartig geringe Spuren von CTC im Boden befinden, sie geben nur die extrahierbaren Anteile an. Denn durch starke Sorption von CTC an die Bodenmatrix lassen sich diese unter Umständen nur unvollständig extrahieren. In Anbetracht, der in so geringem Ausmaß extrahierbaren, also auch nur minimal bioverfügbaren CTC-Anteile im Boden, wird die äußerst geringe bis gar keine Aufnahme durch die Rotkohlpflanze verständlich. Zur Überprüfung möglicher Umwandlungsprozesse von CTC wurden die Bodenproben auf eine Reihe von Umwandlungsprodukten untersucht, jedoch konnten auch diese nicht nachgewiesen werden. Ein eventuelles Verdrängungsverhalten von ENR gegenüber CTC während der Transfervorgänge Boden – Pflanze im Bereich der Rhizosphäre kann als weitere Ursache der nicht nachweisbaren CTC-Aufnahme angenommen werden.

Nachdem in beiden Aufnahmeexperimenten unter Hydrokultur- und Feldbedingungen gezeigt werden konnte, dass beim Rotkohl eine Antibiotikaaufnahme über die Wurzeln und der Transport in weitere Pflanzenorgane möglich ist, wurden auch Rückstandsanalysen von Rotkohl durchgeführt, der aus konventionellem Landbau stammte. Hierzu wurde Industrie-Rotkohl während der Rotkohlkonserven-Produktion, - beginnend vom erntefrischen Rotkohl bis zur Fertigkonserve - in Form eines Stufenkontrollplanes auf Antibiotika-Rückstände untersucht. Die Probenahmestationen waren: Rohwarenaufgabe, entstrunkter, geschnittener Rotkohl, gedämpfter Rotkohl, Rotkohl vor Pasteurisierung und schließlich die verkaufsfertige Rotkohlkonserven.

Die Analysen ergaben tatsächlich positive Befunde von Tetracyclin (TC) im erntefrischen Rotkohl in der Rotkohlcharge von einem der drei Lieferanten (äußere Blätter: 19,2 µg/kg FG und geschnittener Rotkohlkopf: 16,4 µg/kg FG). Nach den Dämpfeinheiten bei 90-100°C waren diese TC-Gehalte nicht mehr nachzuweisen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass während der thermischen Verarbeitungsstufen TC abgebaut wird. Möglich wäre jedoch auch, dass sich das Antibiotikum nach der ersten Dämpfungseinheit in der Lake abreicherte, die industriell verworfen wird. Allerdings kann aufgrund der geringen Probenanzahl (12 Mischproben pro Lieferant) keine repräsentative Aussage getroffen werden. Aus denselben Gründen ist generell keine Repräsentanz in Bezug auf eine Antibiotikabelastung von konventionell angebautem Rotkohl gegeben.

Alle rückstandsanalytischen Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass grundsätzlich eine Antibiotikaaufnahme von Rotkohl und Möhren möglich ist. Diese Nutzpflanzen nehmen Antibiotika unterschiedlicher Wirkstoffgruppen über die Wurzel auf, können diese in verschiedene Pflanzenorgane (äußere und jüngere Rotkohlblätter, Rotkohlkopf bzw. Möhrenrübe und Möhrenblätter) transportieren, metabolisieren und einlagern. Mit dem Feldversuch ist der Nachweis erbracht, dass nicht nur in einem Hydrokultursystem ein Antibiotikatransfer in Rotkohl erfolgt, sondern auch aus güllebeaufschlagtem Boden. Zudem wurden in konventionell angebautem Industrie-Rotkohl Spuren von Tetracyclin nachgewiesen. Somit stellt antibiotikakontaminiertes Gemüse, neben Lebensmitteln tierischen Ursprungs, einen weiteren möglichen Eintragspfad für Antibiotika in die Lebensmittelkette für Mensch bzw. Futtermittelkette für Tier dar.

Die Ergebnisse der Arbeit liefern weitere Erkenntnisse über die mögliche Antibiotika-Exposition von Verbrauchern durch Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. Weitere systematische Screenings der Belastung von Nutzpflanzen aus konventionellem und biologischem Anbau, in Verbindung mit mikrobiologischen Untersuchungen, bilden eine Ausgangsbasis zur Bewertung der Verbraucherrisiken.

Als Konsequenz aus den beschriebenen rückstandsanalytischen und mikrobiologischen Befunden sowie der zunehmenden Brisanz der Resistenzlage sind Strategien und interdisziplinäre Forschungsansätze zu entwickeln, die zu einem nachhaltigeren Einsatz von Veterinärantibiotika in der Landwirtschaft führen, mit dem Ziel der Resistenzprävention.

Derzeit haben sich verschiedene Projekte und Organisationen der Resistenzprävention angenommen. Dazu zählt auch das seit November 2010 vom BMBF geförderte interdisziplinäre dreijährige Verbundprojekt **RESET** "ESBL and (fluoro)quinolone **Resistance in Enterobacteriaceae**". Ein Teilprojekt von RESET, "Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus güllegedüngten Böden und mikrobiologische Effekte", wird an der Universität Paderborn, Department Chemie im Arbeitskreis Prof. Grote, durchgeführt. Die in diesen Projekten erarbeiteten Daten sollen einen Beitrag zur Deutschen Antibiotika-Resistenz-Strategie (DART) leisten.

Im Sinne eines vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutzes könnten die gewonnenen rückstandsanalytischen Daten weitere Erkenntnisse über die Antibiotikaexposition, denen Verbraucher durch Lebensmittel pflanzlicher Herkunft ausgesetzt sind, ergeben und mikrobiologische Zusammenhänge über die Entstehung und Verbreitung Antibiotika resistenter Keime aufzeigen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] U. Schwabe, D. Paffrath; *Arzneiverordnungs-Report 2011: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York; ISBN 978-3-642-219917, 2011.
- [2] R. Sattelberger, O. Gans, E. Martínez; *Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*; Umweltbundesamt, Bericht, 2005.
- [3] C. Winckler, H. Engels, K. Hund-Rinke, T. Luckow, M. Simon, G. Steffens; *Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden (Wirkung von Tetrazyklinen und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion)*; Umweltbundesamt, Forschungsbericht 200 73 248, UBA-FB 000630, 2004.
- [4] Bayerisches Landesamt für Umwelt; *Arzneistoffe in der Umwelt*; Umweltwissen, 2008; [http://www.lfu.bayern.de/umweltwissen/doc/uw\\_8\\_arzneistoffe\\_umwelt.pdf](http://www.lfu.bayern.de/umweltwissen/doc/uw_8_arzneistoffe_umwelt.pdf) (letzter Zugriff am 22.07.2011).
- [5] FEDESA; *Verbrauch von Antibiotika*; Deutsches Tierärzteblatt 11, 1998, 1093.
- [6] Bundesverband für Tiergesundheit (BfT), M. Schneidereit; *Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen*; Vortrag, Bonn, 14. September 2006, [http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz\\_in\\_der\\_veterinaermedizin\\_folien.pdf](http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf) (letzter Zugriff am 16.07.2011).
- [7] A. Vockel; *Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS – Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien*; Dissertation, Universität Paderborn, 2005.
- [8] Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU), *Arzneimittel in der Umwelt*, Stellungnahme Nr.12, April 2007, ISSN 1612-2968.
- [9] Umweltbundesamt Texte 29/05, *Arzneimittel in der Umwelt-Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen sie das Umweltbundesamt*, ISSN 0722-186X, Umweltbundesamt, Dessau, Dezember 2005.
- [10] A. Vockel, B. Brand, K. Röwer, M. Vogel, A. Mehlich, M. Stolz, M. Grote; *Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung*; Sonderprogramm Verbraucherschutz 2000-2002, Abschlussbericht, Hrsg.: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW, Düsseldorf, Juni 2004.
- [11] J. Koschorreck; *Die Notwendigkeit einer umfassenden Umweltbewertung von Tierarzneimitteln*; in Umweltbundesamt, Texte 29/05, *Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt*, 2005.
- [12] T. Ternes, D. Löffler, M. Meller, J. Römbke; *Behaviour of selected human and veterinary pharmaceuticals in aquatic compartments and soil*; Umweltbundesamt, Texte 05/05, Forschungsbericht 299 67 401/01, 2005.
- [13] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; *Screening zum Antibiotikatransfer aus dem Boden in Getreide in viehstarken Regionen in Nordrhein-Westfalen*; Abschlußbericht des

Zuweisungserlasses II 1-F60.2006.01 vom 12.03./29.06.2006. Ministerium für Verbraucherschutz.

- [14] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag, *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil*; Landbauforschung Völkenrode, 2007, 57:25-32.
- [15] R. Kreuzig, S. Höltge, J. Heise, M. Kolb, N. Berenzen, T. Hahn, St. Jergentz, J. Wogram, R. Schulz; *Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide*; UBA-Texte 24/07, Forschungsbericht 202 67 435.
- [16] R. Kreuzig, C. Kullmer, B. Matthies, B. Plaga, H. Dieckmann, S. Höltge; *Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsystemen "Modellsystem Boden"*; Umweltbundesamt, Texte 11/05, Forschungsbericht 201 67 401/02, 2005.
- [17] N.A. Krasilnikov, *Soil, microorganisms and higher plants*, in: Academy of Sciences of the USSR (Hrsg); Interaction between soil microorganisms and plants, Part IV, Moskau; 1958, Übersetzung von 1961. Washington .D.C.: The national science foundation.
- [18] *Antimicrobial resistance*, World Health Organization, Regional Office for Europe, <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>, letzter Zugriff am 13.12.11.
- [19] DART, *Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie*, Bundesminister für Gesundheit, gemeinsam mit: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin, April 2011, Online-Dokument: [http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/DART.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/DART.pdf?__blob=publicationFile) (letzter Zugriff am 16.01.2012).
- [20] Kant Laboratorium BS, *Nachweis von Antibiotikaresistenzen in Staphylokokken aus Lebensmitteln*, [http://www.kantonslabor-bs.ch/files/berichte/AB-Resistenz2010\\_StaphDivLM.pdf](http://www.kantonslabor-bs.ch/files/berichte/AB-Resistenz2010_StaphDivLM.pdf), letzter Zugriff am 13.12.11.
- [21] G. N. Kastrup, *Untersuchung zum Vorkommen Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus entlang der Schlachtlinie und im Zerlegebereich bei der Gewinnung roher Fleischwaren von Schweinen*, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2011.
- [22] J. D. Turnidge, J. M. Bell; *Methicillin-resistant Staphylococcal aureus evolution in Australia over 35 years*; Microb Drug Resist, 2000. 6(3): p. 223-9.
- [23] Online-Dokument: <http://www.heise.de/newsticker/Mediziner-warnen-vor-Post-Antibiotika-Zeitalter--/meldung/87667.html>, Stand: 30.03.2007, letzter Zugriff am 16.07.2011.
- [24] Bulletin Nr. 77-2 vom 09.07.2010, Deutscher Bundestag, Rede des Bundesministers für Gesundheit, Dr. Philipp Rösler, zum Arzneimittelmarktneuordnungsgesetz vor dem Deutschen Bundestag am 9. Juli 2010 in Berlin.
- [25] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; *Untersuchungen zum Transfer pharmakologischer wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Porree und Weißkohl [Investigation on the transfer of pharmacologically active substances used in animal husbandry into leek*

- and cabbage*; *Lebensmittelsicherheit*, 4, 2009, 287-304, <http://www.springerlink.com/content/89713532jk8n6618/>; letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [26] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, T. Betsche, M. Freitag, *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden – Ergebnisse eines Modellversuchs*, *J. Verbr. Lebensm.*, 2006, 1:38-50.
- [27] C. Schwake-Anduschus; *Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen*; Dissertation, Universität Paderborn, 2008.
- [28] H. Dolliver, K. Kumar, S. Gupta, *Sulfamethazine uptake by plants from manure amended soil*, *J. Environ. Qual.* 2007, 36:1224-1230.
- [29] N. A. Krasilnikov, *Soil, microorganisms and higher plants*, Academy of Sciences of the USSR (Hrsg); *Interaction between soil microorganisms and plants, Part IV*, Moskau; 1958, Übersetzung von 1961. Washington .D.C.: The national science foundation.
- [30] D. S. Aga; *Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems*; ISBN: 978-1-4200-5232-9, 2008.
- [31] L. Migliore, G. Brambilla, S. Cozzolino, L. Gaudio; *Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming ( Panicum miliaceum, Pisum sativum and Zea mays)*; *Agriculture, Ecosystems and Environment*: 52, 1995, 103-110.
- [32] L. Migliore, C. Civitareale, S. Cozzolino, P. Casoria, G. Brambilla, L. Gaudio; *Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants*; *Chemosphere* 37, 1998, 2957-2961.
- [33] J. P. Langhammer, F. Führ, H. Büning-Pfaue; *Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanze*; *Lebensmittelchem. Gerichtl Chem* 44, 93, 1990.
- [34] P. P. Maia, E. Clarete da Silva, S. Rath, F. Guillermo Reyes; *Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse*; *Food Control* 20, 2009, 11–16.
- [35] M. H. Farkas, J. O. Berry, D. S. Aga; *Chlortetracycline Detoxification in Maize via Induction of Glutathione S-Transferase after Antibiotic Exposure*; *Environmental Science and Technology*, 41 (4), 2007, 1450-1456.
- [36] W. D. Kong, Y. G. Zhu, Y. C. Liang, J. Zhang, F. A. Smith, M. Yang M.; *Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (medicago sativa L.)*; *Environmental Pollution* 147, 2007, 187-193.
- [37] Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln (ABl. L364 S. 5).
- [38] BfR: BfR-Positionspapier zu Nulltoleranzen in Lebens- und Futtermitteln [http://www.bfr.bund.de/cm/208/nulltoleranzen\\_in\\_lebens\\_und\\_futtermitteln.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/nulltoleranzen_in_lebens_und_futtermitteln.pdf), 2007, letzter Zugriff am 16.07.2011.
- [39] BfR, Rückstände von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft; Information Nr. 019/2010 des BfR vom 15. Februar 2010.

- [40] Land- und Forstwirtschaft, Fischerei Landwirtschaftliche Bodennutzung-Gemüseanbauflächen – Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010, <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/LandForstwirtschaft/Bodennutzung/Gemuese-anbauflaechen2030313107004,property=file.pdf>; letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [41] D. H. Merić; *Untersuchungen zur Aufnahme und zum Transport antibiotisch wirksamer Stoffe in Getreide- und Gemüsepflanzen*; Dissertation, Universität Paderborn, 2010.
- [42] Online Dokument: [www.biologie.uni-lm.de/lehre/botanik/nutzpflanzen/taxa/brassica\\_oleracea\\_blatt.html](http://www.biologie.uni-lm.de/lehre/botanik/nutzpflanzen/taxa/brassica_oleracea_blatt.html), letzter Zugriff am 16.12.2011.
- [43] W. Köhler, H.J. Eggers, B. Fleischer; *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage (2001), Elsevier, München, S. 200.
- [44] *Antibiose et Symbiose*. In: Assoc. franc. pour l'Avanc. des Sciences, Paris 2, 1889, S. 525-542.
- [45] VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung; ABl. L 268 vom 18.10.2003.
- [46] Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel (ABl. L311 vom 28.11.2001, S. 67), in der konsolidierten Fassung vom 20.07.2009.
- [47] Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel (ABl. L311 vom 28.11.2001, S. 1), in der konsolidierten Fassung vom 07.08.2009.
- [48] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln, Arzneimittelgesetz (AMG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 25. Mai 2011 (BGBl. I S. 946) geändert worden ist.
- [49] Online-Dokument: [http://www.bfr.bund.de/de/nationales\\_referenzlabor\\_fuer\\_antibiotikaresistenz-8859.html](http://www.bfr.bund.de/de/nationales_referenzlabor_fuer_antibiotikaresistenz-8859.html), letzter Zugriff am 16.12.2011.
- [50] S. Schwarz, E. Chaslus-Dancla; *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*; Vet. Res. 32, 2001, 201-225.
- [51] S. Schwarz, C. Kehrenberg, T.R. Walsh; *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*; Int. J. Antimicrob. Agents 17, 2001, 431-437.
- [52] Verordnung über das datengestützte Informationssystem über Arzneimittel des Deutschen Instituts für medizinische Dokumentation und Information (DIMDI-Arzneimittelverordnung-DIMDI-AMV) vom 24.02.2010 (BGBl. I S. 140), Online-Dokument: [http://www.dimdi.de/static/de/klassi/aktuelles/news\\_0321.html](http://www.dimdi.de/static/de/klassi/aktuelles/news_0321.html), letzter Zugriff am 15.07.2011.

- [53] A. Karci, I.A. Balcioglu; *Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey*; Science of the Total Environment 407, 2009, 4652–4664.
- [54] M. Grote; *Antibiotika in der Umwelt und in Nahrungsmitteln – Ein Risiko für den Konsumenten?*; internist. prax. 47, 919-926, 2007.
- [55] Bundestierärztekammer und Arbeitsgruppe Tierarzneimittel (AGTAM) der Ländergemeinschaft Verbraucherschutz, *Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln-mit Erläuterungen (Stand Juli 2010)*, letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [56] Düngegesetz vom 9. Januar 2009 (BGBl. I S. 54, 136), das zuletzt durch Artikel 10 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist.
- [57] Verordnung über tierärztliche Hausapotheken in der Fassung der Bekanntmachung vom 8. Juli 2009 (BGBl. I S. 1760).
- [58] Burkhard Oexmann (Rechtsanwalt), *Die rechtliche Bedeutung der Antibiotika-Leitlinien*, Nutztierpraxis aktuell 36/2011; [http://www.animal-health-online.de/gross/wp-content/uploads/2011/03/npa\\_36\\_2011\\_oexmann.pdf](http://www.animal-health-online.de/gross/wp-content/uploads/2011/03/npa_36_2011_oexmann.pdf); letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [59] Ökotest, Nr. 1, Januar 2012, Online-Dokument: [www.oekotest.de](http://www.oekotest.de), letzter Zugriff am 10.02.2012.
- [60] S. Schwarz, C. Werckenthin; *Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*; Chemotherapie Journal 6, 2001, 197-202.
- [61] Verordnung über die biologische Landwirtschaft und die Kennzeichnung biologisch produzierter Erzeugnisse und Lebensmittel1 (Bio-Verordnung) vom 22. September 1997 (Stand Januar 2012).
- [62] Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (ABl. L 268 vom 18.10.2003).
- [63] H. Frey und W. Löscher, *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Sonderausgabe der 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 2007, ISBN: 978-3-8304-1070-6.
- [64] Futtermittelgesetz in der Fassung vom 25. August 2000 (BGBl. I S. 1358).
- [65] H. Bentz; *Veterinärmedizinische Pharmakologie. Antibiotika. Antiparasitika*; 1. Aufl. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 461-503 und 524-534, 1982.
- [66] F. BAGER; *DANMAP 2000 – Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*; Danish Veterinary&Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory Copenhagen, Denmark, ISSN 1600-2032, 2001.
- [67] Verordnung (EG) Nr. 108/2007 der Kommission vom 5. Februar 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1356/2004 hinsichtlich der Bedingungen für die Zulassung des zur Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel zählenden Futtermittelzusatzstoffes Elancoban (ABl. L 31 vom 6.2.2007).

- [68] A. Richter, W. Löscher; *Zusatzstoffe mit pharmakologischer Wirkung*; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin; H.H. Frey, W. Löscher (Hrsg.), 2. Aufl. Enke Berlin, 2002, 592-597.
- [69] Verordnung (EG) Nr. 1852/2003 der Kommission vom 21. Oktober 2003 zur Zulassung eines Kokzidiostatikums in Futtermitteln für zehn Jahre (ABl. L 271 vom 22.10.2003).
- [70] Verordnung (EG) Nr. 1463/2004 der Kommission vom 17. August 2004 über die Zulassung des zur Gruppe der Kokzidiostatika und andere Arzneimittel gehörenden Zusatzstoffes «Sacox 120 microGranulat» in Futtermitteln für zehn Jahre (ABl. L 270 vom 18.8.2004).
- [71] Verordnung (EG) Nr. 600/2005 der Kommission vom 18. April 2005 über die Neuzulassung eines Kokzidiostatikums als Zusatzstoff in Futtermitteln für zehn Jahre, die vorläufige Zulassung eines Zusatzstoffes und die Zulassung bestimmter Zusatzstoffe in Futtermitteln für unbefristete Zeit (ABl. L 99 vom 19.4.2005).
- [72] Verordnung (EG) Nr. 249/2006 der Kommission vom 13. Februar 2006 zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 2430/1999, (EG) Nr. 937/2001, (EG) Nr. 1852/2003 und (EG) Nr. 1463/2004 hinsichtlich der Bedingungen für die Zulassung bestimmter Futtermittel-Zusatzstoffe der Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel (ABl. L 42 vom 14.2.2006).
- [73] Verordnung (EG) Nr. 496/2007 der Kommission vom 4. Mai 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 600/2005 hinsichtlich der Einführung eines Rückstandshöchstgehalts für den zur Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel zählenden Futtermittelzusatzstoff Salinomax 120G (ABl. L 117 vom 5.5.2007).
- [74] Verordnung (EG) Nr. 500/2007 der Kommission vom 7. Mai 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1463/2004 hinsichtlich der Einführung eines Rückstandshöchstgehalts für den zur Gruppe Kokzidiostatika und andere Arzneimittel zählenden Futtermittelzusatzstoff Sacox 120 microGranulat (ABl. L 118 vom 8.5.2007).
- [75] Verordnung (EG) Nr. 167/2008 der Kommission vom 22. Februar 2008 über die Neuzulassung eines Kokzidiostatikums als Zusatzstoff in Futtermitteln für zehn Jahre (ABl. L 50 vom 23.2.2008).
- [76] Verordnung (EG) Nr. 937/2001 der Kommission vom 11. Mai 2001 zur Zulassung neuer Verwendungszwecke für Zusatzstoffe und einer neuen Zusatzstoffzubereitung in der Tierernährung, zur Verlängerung vorläufiger Zulassungen und zur Zulassung eines Zusatzstoffes für zehn Jahre (ABl. L 130 vom 12.5.2001).
- [77] Umweltbundesamt Texte 29/05, *Arzneimittel in der Umwelt-Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen sie das Umweltbundesamt*, ISSN 0722-186X, Umweltbundesamt, Dessau, Dezember 2005.
- [78] MARAN 2009, J. Mevius, J. Koene, B. Wit, W. van Pelt, N. Bondt; *Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2009*; Central Veterinary Institute of Wageningen UR, Lelystad; <http://www.maran.wur.nl>.
- [79] FIDIN 2010; *Antibioticagebruik in de veehouderij in 2009*, Wageningen, UR; <http://www.fidin.nl/62096/FIDIN-LEI-Antibioticagebruik-2009.pdf>.

- [80] F.R. Ungemach; *Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang*; 1999; Tierärztl. Prax. 27, 1999, 335-340.
- [81] D. Skutlarek, *Analysenmethoden für Antibiotika und perfluorierte Tenside in wässrigen Matrices mittels LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung*, Dissertation, Bonn, 2008.
- [82] B. Abbas, I. Kratz, W. Linke, *Erhebung des Verbrauchs von Arzneimittelwirkstoffen im Land Brandenburg*, Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, Volume 13, Number 4, 197-203, DOI: 10.1007/BF03038257, <http://www.springerlink.com/content/gxu733275133ln71/>, letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [83] P. M. Rountree, M.A. Beard; *Hospital strains of Staphylococcus aureus, with particular reference to methicillin-resistant strains*, Med J Aust, 1968. 2(26): p. 1163-8.
- [84] CDC, *Laboratory Detection of Oxacillin/Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*; 1999.
- [85] Germap 2008; *Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; 2008; ISBN 978-3-00-025097-2.
- [86] J. T. Smith, C. S. Lewin; *Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology*; Vet. Microbiol. 35, 1993, 233-242.
- [87] T. Doan, H.B. Fung, D. Mehta, P.F. Riska; *Tigecycline: A Glycylcycline Antimicrobial Agent*; Clinical Therapeutics 28, 2006, 1079-1106.
- [88] L. Martinez, F. Baquero; *Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance*; Clinical Microbiology Reviews 15; 2002; 647-679.
- [89] D. L. Smith, A. D. Harris, J. A. Johnson, E. K. Silbergeld, J. G. Morris; *Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99; 2002; 6434-6439.
- [90] M. Kresken, D. Hafner; *Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975 and 1995*; Infection 27; 1999; 2-8.
- [91] Chr. Lunke; *Antibiotikaresistenzen bei Bakterien tierischer Herkunft*, Dissertation; Universität Freiburg; 2004.
- [92] <http://riboworld.com/antib/antiresistenz.php>; letzter Zugriff am 03.08.2011.
- [93] I. Adeleye; *Conjugal transferability of multiple antibiotic resistance in three genera of Enterobacteriaceae in Nigeria*; J Diarrhoeal Dis Res 10:93-6; 1992.
- [94] R. Son, G. Rusu, M. I. Karim; *Conjugal transfer of plasmide and antibiotic resistance among Escherichia coli isolated from animals in a rural area in Sarawak (Malaysia)*; J. Appl. Microbiol 82: 240-4; 1997.
- [95] J. Katayama, H. Okada, K. O`Hara, N. Noguchi; *Isolation and characterisation of two plasmids that mediate macrolide resistance in Escherichia coli: transferability and molecular properties*; Biol Farm Bull 21: 326-0; 1998.

- [96] A. Ansari, S. Radu; *Conjugal transfer of antibiotic resistances and plasmids from Campylobacter jejuni clinical isolates*; FEMS Microbial Lett 70:125-8, 1992.
- [97] S. Radu, S. A. Mutalib, G. Rusul, Z. Hassan, L. K. Yeang; *Molecular characterisation of Salmonella weltevreden isolated from poultry: evidence of conjugal transfer of plasmid and antibiotic resistance*; Microbios 104: 39-47; 2001.
- [98] E. F. Dunne; *Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant Salmonella infections associated with AmpC beta-lactamase*; Jama 284; 3151-6; 2000.
- [99] H. Schmieger, P. Schicklmaier; *Transduction of multiple drug resistance of Salmonella enterica serovar typhimurium DT104*; FEMS Microbiol Lett 170:251-6, 1999.
- [100] P. M. Rountree, M.A. Beard; *Hospital strains of Staphylococcus aureus, with particular reference to methicillin-resistant strains*. Med J Aust, 1968. 2(26): p. 1163-8.
- [101] H.-G. Classen, H.-J. Hapke; *Fremdstoffe in Lebensmittel: Zusätze, Verunreinigungen und Rückstände*; ISBN: 3-7776-0774-6, 1997.
- [102] F. Møller Aarestrup; *Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals*; Int. J. Antimicrob. Agents 12, 1999, 279-285.
- [103] American Public Health Association; *Addressing the use of fluoroquinolone antibiotics in agriculture*; Am. J. Public Health 91, 2001, 518–519.
- [104] A. E. van den Bogaard, E. E. Stobberingh; *Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans*; Int. J. Antimicrob. Agents 14, 2000, 327-335.
- [105] Dr. Wilke; *Einsatz von Antibiotika; Empfehlung zur Verminderung von Resistenzentwicklung- Beitrag der Veterinärmedizin*, Stand: 1999; Bundesgesundheitsbl. –Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz 43, 2000, 234.
- [106] W. Witte; *Medical consequences of antibiotic use in agriculture*; Science 279, 1998, 996-997.
- [107] M. P. Jevons; *"Celbenin"-resistant Staphylococci*, Br Med J, 1961. 1: p. 124-125.
- [108] M. Barber; *Methicillin-resistant staphylococci*, J Clin Pathol, 1961. 14(385-393).
- [109] C. Goll; *MRSA in einem Universitätsklinikum (1999-2004)*; Charité-Universitätsmedizin Berlin; Dissertation; 2008.
- [110] F. H. Kayser; *Methicillin-resistant staphylococci 1965-75*, Lancet, 1975. 2(7936): p. 650-3.
- [111] H. Giamarellou, M. Papapetropoulou, G. K. Daikos; *'Methicillin resistant' Staphylococcus aureus infections during 1978-79: clinical and bacteriologic observations*, J Antimicrob Chemother, 1981. 7(6): p. 649-55.
- [112] J. D. Turnidge, J. M. Bell; *Methicillin-resistant Staphylococcal aureus evolution in Australia over 35 years*; Microb Drug Resist, 2000. 6(3): p. 223-9.
- [113] P. M. Rountree, M.A. Beard; *Hospital strains of Staphylococcus aureus, with particular reference to methicillin-resistant strains*, Med J Aust, 1968. 2(26): p. 1163-8.

- [114] J. Engberg, F. Møller Aarestrup, D. E. Taylor, P. Gerner-Smidt, I. Nachamkin; *Quinolone and macrolide resistance in Campylobacter jejuni and C. coli: resistance mechanisms and trends in human isolates*; Emerg. Infect. Dis. 7; 2001; 24-34.
- [115] J. Engberg, J. Neimann, E. Møller Nielsen, F. Møller Aarestrup, V. Fussing; *Quinolone-resistant Campylobacter Infections in Denmark: Risk Factors and Clinical Consequences*; Emerg. Infect. Dis. 10, 2004, 1056-1063.
- [116] F. Møller Aarestrup, A.M. Seyfarth, H.D. Emborg, K. Pedersen, R.S. Hendriksen, F. Bager; *Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark*; Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2001, 2054-2059.
- [117] H.-D. Emborg, O.E. Heuer; DANMAP 2002; Danish Veterinary Institute, *Danish Veterinary and Food Administration*, Statens Serum Institut, Danish Medicines Agency, 2002.
- [118] B. Berger-Bächli; *Mechanismen der Antibiotika-Resistenzbildung in Bakterien*; Mitt. Lebensm. Hyg. 92, 2001, 3–9.
- [119] C. A. A. Fischer; *Resistenzentwicklung von S. pneumoniae, S. pyogenes und anderer Streptokokken-Spezies gegenüber Fluorchinolonen*; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2003.
- [120] Bayerisches Landesamt für Umwelt; *Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Lebensmitteln und Umwelt*; Umweltwissen, 2002.
- [121] M. Johnston; *Use of antimicrobial drugs in veterinary practice*; BMJ 317, 1998, 665-667.
- [122] S. Schwarz, C. Werckenthin; *Risiken des Antibiotika- Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*; Chemotherapie Journal 6, 2001, 197-202.
- [123] M. Teuber; *Antibiotika - Vom Segen zum Alptraum*; uni-eth zürich, Magazin der Universität Zürich Nr. 285 (1/02), 2002, 31-34.
- [124] P. Butaye, L. A. Devriese, F. Haesebrouck; *Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on grampositive bacteria*; Clin. Microbiol. Rev. 16, 2003, 175-188.
- [125] American Public Health Association; *Addressing the use of fluoroquinolone antibiotics in agriculture*; Am. J. Public Health 91, 2001, 518–519.
- [126] R. Helmuth; *Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin - Zum Stand der Diskussion*; Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz 42, 1999, 26-34.
- [127] N. Kemper; *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*; Ecological Indicators 8, 2008, 1-13.
- [128] J. Kamphues; *Risiken der Medikation von Futter und Wasser in Tierbeständen*; Deutsche Tierärztl. Wochenschrift; 103; 250-256, 1996.

- [129] M. Kietzmann, W. Markus, J. Havez, W. Bollwahn; *Arzneimittelrückstände in unbehandelten Schweinen*; Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.; 102; 441-442, 1995.
- [130] P. Dorn, J. Neudegger, H. O. Knöppler; *Zur Problematik der Wirkstoffverschleppung bei der Mischfutterherstellung am Beispiel Nicarbazin*; Tierärztl. Umsch.; 43; 524-529, 1988.
- [131] [http://www.bfr.bund.de/de/nationales\\_referenzlabor\\_fuer\\_antibiotikaresistenz-8859.html](http://www.bfr.bund.de/de/nationales_referenzlabor_fuer_antibiotikaresistenz-8859.html); letzter Zugriff am 25.07.2011.
- [132] A. Fleming; Penicillin – Nobel lecture 1945. Online im Internet: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf); letzter Zugriff am 20.07.2011.
- [133] M. Hereth; *Antibiotika in der Tierhaltung: Ursachen und Wirkungen des Mißbrauchs*; Dtsch. Aerztebl.; 1996, 93 (51-52):A-3396/B-2860/C-2656; <http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?src=heft&id=4492>; letzter Zugriff am 25.07.2011.
- [134] A. Hensel, R. Helmuth; *Aktuelles zur Antibiotikaresistenz. Das Problem aus veterinärmedizinischer Sicht*; Fortbildung für den ÖGD 16.03.2005.
- [135] M. Kresken, D. Hafner, F.-J. Schmitz, T. A. Wichelhaus, Studiengruppe PEG-Resistenzstudie 2007, [http://www.p-e-g.org/ag\\_resistenz/PEG-Studie-2007.pdf](http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/PEG-Studie-2007.pdf); letzter Zugriff am 25.07.2011.
- [136] Robert-Koch-Institut; *ARS-Antibiotika Resistenz Surveillance*, 18.01.2011, <https://ars.rki.de/History.aspx>; letzter Zugriff 26.07.2011.
- [137] Robert-Koch-Institut; *Staphylokokken-MRSA, Klinische Symptomatik*, Ratgeber des RKI-aktualisierte Fassung vom Februar 2007, Erstveröffentlichung im epidemiologischen Bulletin 8/ 2000; <http://www.gapinfo.de/gesundheitsamt/alle/seuche//infekt/bakt/staph/rg/07.htm>.
- [138] Autoimmun Diagnostika GmbH; *CAP Resistenz*; [http://www.aid-diagnostika.com/deutsch/kits/genID/rdb\\_2145\\_d.htm](http://www.aid-diagnostika.com/deutsch/kits/genID/rdb_2145_d.htm), letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [139] H. Hof, R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie*; Thieme Verlag, 4. Auflage; 2009, 326-328.
- [140] S. Schwarz, E. Alešik, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, J. Wallmann, Chr. Werckenthin, L. H. Wieler; *The BfT-GermVet monitoring program-aims and basic*, Berl., Münch., tirärztl. Wochenschr. 120, 357-362, 2007; ISSN: 0005-9366; [http://vetline.de/first\\_site.htm?id=17079309&p=bmtw\\_2007\\_09\\_0357.pdf](http://vetline.de/first_site.htm?id=17079309&p=bmtw_2007_09_0357.pdf), letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [141] M. Grobbel, A. Lübke-Becker, E. Alesik, S. Schwarz, J. Wallmann, C. Werckenthin, L.H. Wieler; *Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006*; Berl. Münch.; Tierärztl. Wschr. 120: 9-10, 391-401 (2007).

- [142] BfR, *Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette*; 18/2010, 13.12.2010; [http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/18/antibiotikaresistenzen\\_in\\_der\\_lebensmittelkette-53288.html](http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/18/antibiotikaresistenzen_in_der_lebensmittelkette-53288.html); letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [143] A. Käsbohrer; B.-A. Tenhagen, K. Heckenbach, B. Guerra, R. Helmuth, J. Beutlich, A. Hensel, B. Appel, A. Käsbohrer; *Deutsche Antibiotikaresistenz-Situation in der Lebensmittelkette-DARLink*, BfR, 2010.
- [144] Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin, 13. Juli 2007/ Nr. 28, Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health: ESBL und AMPC:  $\beta$ -Lactamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien, [http://www.rki.de/clin\\_178/nn\\_200238/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausschnitte/ESBL\\_28\\_07,temp](http://www.rki.de/clin_178/nn_200238/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausschnitte/ESBL_28_07,temp); letzter Zugriff am 16.07.2011.
- [145] I. Wiegand: *Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Laktamasen*; Chemother J 2003; 12: 151-167.
- [146] D. L. Paterson; *Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae*; Am J Infect Control 2006; 34: 20-28.
- [147] DAR Deutscher Akkreditierungs Rat, Medizinisches Versorgungszentrum (MVZ), Labor 28 AG Ausgabe Juli 2006 (Das Labor 28 Magazin); [http://www.labor28.de/lab\\_mag/juli2006/esbl\\_5.html](http://www.labor28.de/lab_mag/juli2006/esbl_5.html); letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [148] V. U. Grimm; *Entwicklung eines diagnostischen Mikroarrays zum Nachweis von Beta-Lactamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum für den Einsatz in der klinischen Mikrobiologie*; Dissertation, Universität Stuttgart, 2005.
- [149] BfR; *EHEC 0104: H4-Ausbruchsgeschehen in Deutschland aufgeklärt: Auslöser waren Sprossen von aus Ägypten importierten Bockshornkleesamen*; [http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2011/21/ehec\\_o104\\_](http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2011/21/ehec_o104_); letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [150] BgVV; Antibiotikaresistenzen; 1997; Dtsch. Tierärztebl.; 45 (6); 532.
- [151] G.K. Jim, P.T. Guichon, O. C. Schunicht, B. K. Wildman, C .W. Booker; *Introduction of the Issues Related to Antimicrobial.: Resistance in Beef Production*; 1999; The Bovine Proceedings 32; 71-72.
- [152] A. H. Farnleitner, R. L. Mach; *Antibiotika und Resistenzproblematik in aquatischen Systemen*; Wiener Mitteilungen, 2002; 178; 151-178.
- [153] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, W. Heyser, H. Hayen, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Aufnahme und Transport von Tierarzneistoffen in Nutzpflanzen*; In Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Band 58, Vorträge der 58. Fachtagung "Tierarzneimittel in der Umwelt", Hrsg. Bayrisches Landesamt für Umwelt, Oldenburg Industrieverlag GmbH, ISBN 978-3-8356-3135-9, 161-173, 2007.
- [154] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; „*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, 2005.

- [155] K. Kumar, S. C. Gupta, S. K. Baidoo, Y. Chander, C. J. Rosen; *Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure*; J. Environ. Qual. 34, 2005, 2082 – 2085.
- [156] M. Grote, T. Betsche, M. Freitag; *Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Gemüse-Porree und Weißkohl*; Abschlußbericht vom 11.06.2008 des Forschungsauftrages ZV-2.1-07/080, Vergabe-Nr. 07/080, MUNLV, Ministerium für Verbraucherschutz des Landes NRW, 2008.
- [157] A. R. Batchelder; *Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems*, Journal of environmental quality:11 (4), 1982, 675-678.
- [158] L. Migliore, S. Cozzolino, M. Fiori; *Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants*; Chemosphere 52, 2003, 1233–1244.
- [159] A. B. A. Boxall, P. Johnson, E.J. Smith, C.J. Sinclair, E. Sturr, L.S. Levy; *Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants*; J. Agric. Food Chem. 54, 2006, 2288-2297.
- [160] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Investigation on the fate of antibiotics used in Pig farming in food chain and environment (Part 1)*; Fresenius Environmental Bulletin - FEB 13, 2004, 1216-1224.
- [161] B. Zierenberg; *Ausgewählte Ergebnisse im Verbraucherschutz und in der Tiergesundheit, Verbraucherschutz und Tiergesundheit*, Online-Dokument: [http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C47830161\\_L20.pdf](http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C47830161_L20.pdf), letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [162] A. Vockel, M. Grote, A. Mehlich; *Bestimmung von Chlortetracyclin in Schlachtproben: Methodenentwicklung und Validierung*; Laborpraxis, Juli/August, 2005, 19-21.
- [163] G. Zurhelle; *Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen*; Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, 2000.
- [164] R. Michel; *Entwicklung eines Monitoring-Systems zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte in Honig*; Universität Paderborn, Dissertation, 2010.
- [165] M. Dettenkoffer, M. Ackermann, M. Eikenberg, H. Merkel; *Auswirkungen des Einsatzes von Antibiotika und Substanzen mit antibiotischer Wirkung in der Landwirtschaft und im Lebensmittelsektor*; Ein Literatur-Review. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Freiburg, 2004.
- [166] BfR: Jahresbericht 2008 zum Nationalen Rückstandskontrollplan. Online-Dokument, [http://www.bvl.bund.de/cln\\_027/nn\\_493680/DE/01\\_Lebensmittel/01\\_Sicherheit\\_Kontrollen/04\\_NRKP/01\\_berichte\\_nrkp/03\\_NRKP\\_ErgaenzendeDokumente\\_2008/nrkp\\_bericht\\_2008.html#doc1330186bodyText15](http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_493680/DE/01_Lebensmittel/01_Sicherheit_Kontrollen/04_NRKP/01_berichte_nrkp/03_NRKP_ErgaenzendeDokumente_2008/nrkp_bericht_2008.html#doc1330186bodyText15); letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [167] Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 24. Juli 2009 (BGBl. I S. 2205), das zuletzt durch Artikel 5 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist.

[168] Verordnung (EWG) Nr. 470/2009 des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr.2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments.

[169] Wolfgang Löscher et al., *Arzneirechtliche Bestimmungen*. In: Löscher et al. (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Paul Parey Verlag, 7. Aufl. 2006, S. 8-22. ISBN 3-8304-4160-6.

[170] Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Amtsblatt Nr. L 015 vom 20/01/2010 S. 0001 - 0072).

[171] Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Amtsblatt Nr. L 015 vom 20/01/2010 S. 0001 – 0072).

[172] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs; ABl. L 224 vom 18.8.1990.

[173] Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 24. Juli 2009 (BGBl. I S. 2205), das zuletzt durch Artikel 5 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist.

[174] Verordnung (EWG) Nr. 470/2009 des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr.2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments.

[175] S. Boehme, G. Werner, I. Klare, R. Reissbrodt, W. Witte; *Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs*, Molecular Nutrition and Food Research 48, 2004, 522-531.

[176] Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Amtsblatt Nr. L 015 vom 20/01/2010 S. 0001 - 0072).

[177] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs; ABl. L 224 vom 18.8.1990.

- [178] H. Naegeli, *Rückstandstoxikologie, Bewertung aus Sicht eines Toxikologen*; Universität Zürich, 14. April 2011, letzter Zugriff am 04.08.2011 <http://www.tvl-avsa.ch/Archiv/2011/FT/Naegeli.pdf>.
- [179] R. Alexy, K. Kümmerer; *Antibiotika in der Umwelt*; KA - Abwasser Abfall 5, 2005, 563-571.
- [180] K. Kümmerer; *Antibiotics in the aquatic environment*; A review - Part 1, Chemosphere 75, 2009, 417-434.
- [181] BLAC (Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit); *Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse*; Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, 2003.
- [182] M. Salomon; *Pharmazeutische Wirkstoffe und Umweltschutz*; UWSF – Z. Umwelt. Chem. Ökotox. 19, 2007, 155–167.
- [183] Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln -Düngemittelverordnung (DüMV) vom 16. Dezember 2008 (BGBl. I S.2524), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 14. Dezember 2009 (BGBl. I S. 3905).
- [184] G. Hamscher; *Tierarzneimittel in der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von Stallstäuben*, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 3, 2/ Mai 2008.
- [185] C. Winckler, A. Grafe; *Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden*; Umweltbundesamt Berlin, Forschungsbericht 279 33 911 UBA-FB 000074; 2000.
- [186] C. Winckler, A. Grafe; *Use of veterinary drugs in intensive animal production-evidence for persistence of tetracycline in pig slurry*; J. Soils Sediments 1: 66-70.
- [187] H. Focke; *Die Natur schlägt zurück, Antibiotikamissbrauch in der intensiven Nutztierhaltung und Auswirkungen auf Mensch, Tier und Umwelt*; Pro Business, Berlin, 2010, ISBN: 978-3-8-6805-766-9.
- [188] A. Hembrock-Heger; *Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie*; Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV, Hrsg.), LANUV-Fachbericht 2, 2007.
- [189] Bayerisches Landesamt für Umwelt; *Austrag von Tierarzneimitteln aus Wirtschaftsdünger in Sickerwasser, Grundwasser und oberirdische Gewässer*; 2008.
- [190] H. Engels; *Verhalten von ausgewählten Tetrazyclinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und in Böden*; Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 2004.
- [191] K. Harms, Dr. K. Meyer; *Techn. Universität München, Lehrstuhl für Tierhygiene; Schweinegülle –Quelle für potentiell unerwünschte Stoffe?*; Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.); 2006.
- [192] O. Gans; *Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden in Österreich*; Umweltbundesamt Wien, Online-Dokument, [http:// www. umweltbundesamt. at/ fileadmin/ site/ leistungen/ Umweltanalytik/ Veterin\\_rantibiotika\\_in\\_Wirtschaftsd\\_nger.pdf](http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/leistungen/Umweltanalytik/Veterin_rantibiotika_in_Wirtschaftsd_nger.pdf); letzter Zugriff am 25.07.2011.

- [193] P. Kay, P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall; *Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land*; Chemosphere 59, 2005, 951–959.
- [194] A. Batt, D. S. Aga; *Simultaneous Analysis of multiple classes of Antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination*, Analytical chemistry, 2005.
- [195] S.-C. Kim, K. Carlson; *Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed*; Water Research, 40, 2006, 2549-2560.
- [196] H. Pawelzick; *Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten – Untersuchungen zu Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie*, Dissertation, Universität Hannover, 2005.
- [197] G. Hamscher, S. Sczesny, A. Abu-Qare, H. Höper, H. Nau; *Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry*; Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 107, (8); 2002; 332-334.
- [198] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K. L. Kratz; *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*; The Science of the Total Environment, 225, (1-2); 1999; 109-118).
- [199] M. Grote, B. Kuhlmann, G. Preuß, U. Schulte-Ebbert, H. Stevens und N. Zullei-Seibert; *Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes*; Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH Dortmund, Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung Nr. 66, 2007.
- [200] H. Stevens; *Untersuchungen zum Verhalten von Veterinärpharmaka im Boden*; Dissertation, Universität Paderborn, 2009.
- [201] Klärschlammverordnung (AbfKlärV) vom 15. April 1992 (BGBl. I S. 912), die zuletzt durch Artikel 9 der Verordnung vom 9. November 2010 (BGBl. I S. 1504) geändert worden ist.
- [202] J. Hartung; *Gas- und partikelförmige Emissionen aus Ställen der Tierproduktion*; Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 102, 1995, 283-288.
- [203] S. Pedersen, M. Nonnenmann, R. Rautiainen, T.G. Demmers, T. Banhazi, M. Lyngbye; *Dust in pig buildings*; J. Agric. Saf Health 6, 2000, 261-274.
- [204] J. Seedorf, J. Hartung; *Dust and micro-organisms in animal housing*; KTBL Schrift 393, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, 2002.
- [205] J. Hartung; *Staubbelastung in der Nutztierhaltung*; Zentralblatt für Arbeitsmedizin; Arbeitsschutz und Ergonomie, 47, 2, 1997, 65-72.
- [206] Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, *Grundlagen der biologischen Bodensanierung*, Umweltbundesamt Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF.

- [207] C. Pfeiffer, C. Emmerling, D. Schröder, J. Niemeyer; *Antibiotika (Ivermectin, Monensin) und Endokrine Umweltchemikalien (Nonylphenol, Ethinylöstradiol) im Boden*, UWSF-Umweltchem.Ökotox. 10, 1998, 3.
- [208] T. Gimmi; *Verlagerung gelöster Stoffe durch den Boden ins Grundwasser*, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL, Schweiz), Schriftenreihe Umwelt Nr. 349, 2004.
- [209] G. Hamscher, S. Sczesny, H. Höper, H. Nau; *Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by highperformance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry*; Analytical Chemistry 74, 2002, 1509-1518.
- [210] Y. Chander, K. Kumar, S.M. Goyal, S.C. Gupta; *Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics*; J. Environm. Qual. 34, 2005, 1952-1957.
- [211] M. Burkhardt, C. Stamm; *Depth Distribution of Sulfonamide Antibiotics in Pore Water of an Undisturbed Loamy Grassland Soil*; J. Environ. Qual. 36, 2007, 588–596.
- [212] G. Hamscher; *Entwicklung und Einsatz neuer rückstandsanalytischer Nachweisverfahren für Antibiotika und Antiparasitika in Umwelt- und Lebensmittelproben*, Tierärztlichen Hochschule Hannover, Habilitation, 2003.
- [213] S. Thiele-Bruhn; *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- A review*, J. Plant Nutr. Soil Sci. 166, 2003, 145-167.
- [214] J. C. Chee-Sanford, R.I.Mackie, S.Koike, I.G. Krapac, Y-F. Lin, A.C. Yannarell, S. Maxwell, R.I. Aminov; *Fate and Transport of Antibiotik Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste*; J. Environ. Qual. 38: 1086-1108; 2009.
- [215] K. Smalla, C.T.T. Binh, C. Kopmann, H. Heuer; *Effekte von Veterinärantibiotika auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden*; Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 60, 2008, 236.
- [216] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology Unit; CVMP/VICH/592/98-FINAL; London 2000, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004394.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004394.pdf), letzter Zugriff am 31.08.2011.
- [217] Scotland and Northern Ireland Forum for Environmental Research, *ER09: Levels of pharmaceuticals and drugs of abuse in the scottish environment*; Norwegian Institute for Water Research (NIVA); 2009.
- [218] S. Sassman, L. Lee; *Sorption and degradation of ionophore antibiotics monensin and lasalocid in soils and manure-soil systems*; Purdue University, West Lafayette, IN, USA; <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2005/document/56216>; letzter Zugriff am 31.08.2011.
- [219] G. Hamscher, H.T. Pawelzick, H. Höper, H. Nau; *Different Behavior of Tetracyclines and Sulfonamides in Sandy Soils after Repeated Fertilization with Liquid Manure*; Environ. Toxicol. Chem. 24, 2005, 861-868.

- [220] Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grundlagen der biologischen Bodensanierung, Umweltbundesamt Projekträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF.
- [221] A. Eschenbach, H. Mescher, R. Wienberg, B. Mahro; *Humifizierung von Schadstoffen*; J. Michels, T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Fachredaktion), Umweltbundesamt (Hrsg.): Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grün-Weiße Reihe des BMBF, 2001, 14.
- [222] U. Schulte-Ebbert, U. Schöttler; *Transport polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) bei der Untergrundpassage. Einfluss organischer und anorganischer mobiler Festphasen auf die Mobilität von PAK*; Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung, 2003.
- [223] K. Smalla, C.T.T. Binh, C. Kopmann, H. Heuer; *Effekte von Veterinärantibiotika auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden*; Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 60, 2008, 236.
- [224] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology Unit; CVMP/VICH/592/98-FINAL; London 2000, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004394.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004394.pdf), letzter Zugriff am 31.08.2011.
- [225] W. Dekant, S. Vamvakas; Toxikologie; ISBN:3-86025-218-6, 1995.
- [226] S. Trapp, M. Larsen, H. Christiansen; *Experimente zum Verbleib von Cyanid nach Aufnahme in Pflanzen*; Umweltchem. Ökotox 13 (1), 2001, 29-37.
- [227] J. Breuer; *Aufnahme, Metabolismus und Bildung nicht extrahierbare Rückstände aus 4-Nitrophenol in Soja und Weizen- Ein Vergleich verschiedener In-vitro-Systeme*; Dissertation; Rheinisch-Westfälische Hochschule Aachen, 2001.
- [228] J. Neuendorff, Leitfaden: *Umweltschadstoffe in der Landbau-Praxis*, Bundesprogramm Ökologischer Landbau, Hrsg.: GfRS (Gesellschaft für Ressourcenschutz mbH), Göttingen, 2010.
- [229] Y. Gao, L. Zhu, W. Ling; *Application of the partition-limited model for plant uptake of organic chemicals from soil and water*, Science of the total environment 336, 2005, 171-182.
- [230] A. Hüser; *Untersuchungen zum Stoffwechsel der Aminosäuren Aspartat und Glutamat, sowie ihrer Amide in Pseudomonas: Klonierung und Charakterisierung von Amidohydrolase-Genen. Konstruktion und Analyse von Transposon-Mutanten*; Dissertation, Universität Marburg; 1999.
- [231] U. Lüttge, M. Kluge, G. Bauer G.; *Botanik, ein grundlegendes Lehrbuch*; VCH, Weinheim, 1998.
- [232] Online-Dokument: [www.biokurs.de/skripten/bilder/Zea\\_xs.jpg](http://www.biokurs.de/skripten/bilder/Zea_xs.jpg), letzter Zugriff am 06.08.2011.
- [233] R. Danova-Alt; *Die Wirkung von xenobiotischem Phosphit auf die Phosphatmangelantwort und den Stoffwechsel von Pflanzen*; 2008.

- [234] U. Lüttge; *Stofftransport der Pflanzen*; ISBN:3-540-06230-0, 1973.
- [235] E. Steudle; *Aufnahme und Transport des Wassers in Pflanzen*; Nova Acta Leopoldina NF, 85 (323), 251-278, 2002.
- [236] Online-Dokument: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d28/28d.htm>; letzter Zugriff am 05.08.2011.
- [237] J. Plugge; *Wechselwirkungen industrieller organischer Schadstoffe mit Rhizosphärenkomponenten und Bilanzierung von Stoffströmen in Pflanzenkläranlagen-Laborversuche*; Dissertation; Universität Leipzig; 2001.
- [238] Online-Dokument: [www.geodiz.com/deu/d/Pflanzenverfuegbarkeit](http://www.geodiz.com/deu/d/Pflanzenverfuegbarkeit), letzter Zugriff am 17.04.2012
- [239] A. Rein, P. Bauer-Gottwein, S. Trapp; *Dynamic plant uptake modelling and mass flux estimation*; GQ10: Groundwater Management in a Rapidly Changing World; IAHS Press, 2011, p. 55-58.
- [240] I. Savric; *Einflussfaktoren auf die Bindung und Mobilität organischer und anorganischer Stoffe in kontaminierten Rieselfeldböden*; Dissertation, Technische Universität Berlin, 2001.
- [241] J. M. Wessels, W.E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider; *The Complexation of Tetracycline and Anhydrotetracycline with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>: A Spectroscopic Study*; J. Phys. Chem. B 102, 1998, 9323-9331.
- [242] S. Trapp; *Plant uptake and transport models for neutral und ionic Chemicals*; Environ. Sci.&Pollut.Res 11, 2004, 33-39.
- [243] G. Briggs, G. Geoffrey; *Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor*; Journal of Agricultural and Food Chemistry: 29(5), 1981, 1050.
- [244] J. L. Schnoor, L. A. Light, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe, L. H. Carreira; *Phytoremediation of organic and nutrient contaminants*, Environ. Sci. Technol. 29 (7), (1995), 318A-323A.
- [245] ACD/I-Lab service; ACD/pKa v8.02 und ACD/Log P v8.02, [www.acdl.com](http://www.acdl.com).
- [246] P. R. Wallnöfer, U. Preiß, W. Ziegler, G. Engelhardt; *Konjugatbildung organischer Schadstoffe in Pflanzen*; Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung; 1996; Volume 8, Number 1, 43-46; DOI: 10.1007/BF02937570.
- [247] M. Bode, *Studien zum Metabolismus von Pestiziden und Xenobiotika durch humane Cytochrom P450-Monooxygenasen in transgenen Tabakzellkulturen*, Dissertation, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 2004.
- [248] S. Pflugmacher; *Chemo-taxonomische Untersuchung von Enzymsystemen für die Umsetzung von Xenobiotika in niederen Pflanzen und marinen Mikroalgen: Ein Beitrag zum Konzept der "grünen Leber"*; Dissertation; Ludwig-Maximilians Universität München; 1996.

- [249] H.-W. Heldt, B. Piechulla; *Pflanzenbiochemie*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; September 2008; ISBN: 978-3-8274-1961-3.
- [250] Z. S. Li, M. M. Szczycka, Y.-P. Lu, D. J. Thiele, P. A. Rea; *The yeast cadmium factor protein (YCF 1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump*; J. Biol. Chem. 271: 6509-6517; 1996.
- [251] Land- und Forstwirtschaft, Fischerei Landwirtschaftliche Bodennutzung-Gemüseanbauflächen – Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010, <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/LandForstwirtschaft/Bodennutzung/Gemuese-anbauflaechen2030313107004.property=file.pdf>; letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [252] Fachserie 3 Reihe 3.2.1 Land- und Forstwirtschaft, Fischerei Wachstum und Ernte-Gemüse - Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010.
- [253] W. Franke, neu bearbeitet von Reinhard Lieberei und Christoph Reisdorff, *Nutzpflanzenkunde*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, 2007, ISBN 978-3-13-530407-6.
- [254] [www.biologie.uni-lm.de/lehre/botanik/nutzpflanzen/taxa/brassica\\_oleracea\\_blatt.html](http://www.biologie.uni-lm.de/lehre/botanik/nutzpflanzen/taxa/brassica_oleracea_blatt.html).
- [255] <http://www.gartenfieber.de/pflanzen/rotkohl-blaukraut-pflege-im-garten.html>, letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [256] <http://www.fug-verlag.de/on909>, letzter Zugriff am 17.07.2011.
- [257] D. G. Kennedy, R. J. McCracken, S. A. Hewitt, J. D. G. McEvoy; *Metabolism of Chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg*; Analyst 123, 1998, 2443-2447.
- [258] U. Gräfe; *Biochemie der Antibiotika*; 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1992.
- [259] J. Koza; *Synthesis of 7-Substituted Tetracycline Derivatives*; 2000; Org. Lett. 2, 2000, 815-817.
- [260] H. Muxfeldt, H. Döpp, J.E. Kaufman, J. Schneider, P.E. Hansen, A. Sasaki, T. Geiser; *Totalsynthese des Anhydro-aureomycins*; Angew. Chem. 85, 1973, 508-510.
- [261] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim, 5. Aufl., 1988, 580-715.
- [262] H. Auterhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje; *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart; 13. Aufl., 1994, 741-795.
- [263] R. Brunner, A. Rank, K. Riedl; *Die Antibiotica, Band 1 (Die großen Antibiotika), Teil 2 (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline)*; Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1962, 311-625.
- [264] W. Dürckheimer; *Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungsbeziehungen*; Angew. Chem. 87, 1975, 751-784.

- [265] A. K. Sarmah, M. T. Meyer, A. B. A. Boxall; *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*; Chemosphere 65, 2006, 725-759.
- [266] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto; *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*; J. Chromatogr. A 882, 2000, 109–133.
- [267] C. R. Stephens, K. Murai, K.J. Brunings, R.B. Woodward; *Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics*; J. Am. Chem. Soc. 78, 1956, 4155-4158.
- [268] J. L. Claizzi, P.R.Klink; *pH-Partition behavior of Tetracyclines*; J. Pharm. Sci. 58, 1969, 1184-1189.
- [269] H. A. Duarte, S. Carvalho, E. B. Paniago, A .M. Simas; *Importance of Tautomers in the Chemical Behavior of Tetracyclines*; J. Pharm. Sci. 88, 1999, 111-120.
- [270] A.M. Walter, L. Heilmeyer; *Antibiotika-Fibel*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl., 1975, 2-108, 319-361.
- [271] J. R. D. McCormick, S. M. Fox, L. L. Smith, B. A. Bitler, J. Reichenthal, V. E. Origoni, W. H. Muller, R. Winterbottom, A. P. Doerschuk; *Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines*; J. Am. Chem. Soc. 79, 1957, 2849-2858.
- [272] D. G. Kennedy, R. J. McCracken, M. P. Carey, W. J. Blanchflower, S. A. Hewitt; *Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*; J. Chromatogr. A 812, 1998, 327-337.
- [273] P. D. Bryan, K. R. Hawkins, J. T. Stewart, A. C. Capomacchia; *Analysis of Chlortetracycline by High Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Alkaline-induced Fluorescence Detection*; Biomed. Chromatogr. 6, 1992, 310-350.
- [274] W. J. Blanchflower, R. J. McCracken, D. A. Rice; *Determination of Chlortetracycline Residues in Tissues Using High-Performance Liquid Chromatography With Fluorescence Detection*; Analyst 114, 1989, 421-423.
- [275] European Agency for the Evaluation of Medical Products, *Committee for veterinary medical products Summary report*, 2002, <http://www.emea.eu.int>, letzter Zugriff am 08.08.2011.
- [276] J. E. Renew, C.-H. Huang; *Simultaneous determination of fluorquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 1042, 2004, 113-121.
- [277] H. J. Roth, H. Fenner; *Pharmazeutische Chemie III: Arzneistoffe - Bioreaktivität - Wirkungsbezogene Eigenschaften*, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York; 1988; 39-90.
- [278] C. J. Coulson; *Molecular mechanism of drug action*; Taylor & Francis Ltd., London; 1994.
- [279] R. M. Evans; *The chemistry of the antibiotics used in medicine*, Pergamon Press Ltd., Oxford; 1965.

- [280] G. Füllgraf, B. Lemmer, K. Brune (Hrsg.): *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie*, 13. Auflage, Springer, 2006, ISBN 978-3-540-34180-2, S. 132.
- [281] J. Kato, Y. Nishimura, M. Yamada, H. Suzuki, Y. Hirota; *Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in Escherichia coli*, J. Bacteriol.; 1988; 170:3967-3977.
- [282] K. N. Kreuzer, N. R. Cozzarelli; *Escherichia coli mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth*, J. Bacteriol.; 1979; 140:424-435.
- [283] M. B. Schmid; *A locus affecting nucleoid segregation in Salmonella typhimurium*; J. Bacteriol.; 1990; 172:5416-5424.
- [284] T. Grüger; *Die Rolle von Topoisomerase IV als Zielstruktur für Inhibitoren in E. coli sowie die Transkriptionskontrolle ihrer Strukturgene parC und parE*; Dissertation; Universität Hamburg; 2004.
- [285] Chemotherapie Journal; *Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin)*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Heft 3 (1999), 8. Jahrgang, 89-109; <http://www.p-e-g.org/publikationen/ctj/0399/UEBER.PDF>; letzter Zugriff am 27.07.2011.
- [286] Chemotherapie Journal; *Neuere Fluorchinolone im Vergleich*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Supplement 20; 2002; 11. Jahrgang, 1-81; [http://www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de/CTJ/CTJ2002/Supl\\_20.pdf](http://www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de/CTJ/CTJ2002/Supl_20.pdf); letzter Zugriff am . 25.07.2011.
- [287] W. Graninger; *Chinolone in der Veterinärmedizin*; Antibiotika Monitor, tom; XXII, 6; 2006; 91-96; [http://www.antibiotikamonitor.at/06\\_6/pdf/06\\_6\\_03.pdf](http://www.antibiotikamonitor.at/06_6/pdf/06_6_03.pdf); letzter Zugriff am 28.07.2011.
- [288] Pharmazeutische Zeitung online; *Antibiotika einsparen*; [http://www.pharmazeutischezeitung.de/index.php?id=pharm5\\_10\\_2002](http://www.pharmazeutischezeitung.de/index.php?id=pharm5_10_2002); letzter Zugriff am 24.07.2011.
- [289] Z. H. Yuan, J. H. Duan, S. X. Fan, K. Kong; *Comparison of an ELISA and a HPLC for determination of ciprofloxacin residues in pork*; Food Agric. Immun. 13(3), 2001, 199-204.
- [290] Online Dokument, <http://www.gifte.de/Antidote/ciprobay.htm>, letzter Zugriff am 26.07.2011.
- [291] E. Lausch; *Geniestreiche (XVI): Wie Alex Fleming das Penicillin entdeckte – Am Anfang war die Panne*; Die Zeit 14/1996.
- [292] E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders; *Penicillin as a chemotherapeutic agent*, Lancet II; 1940; 226.
- [293] M. Becker, *LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-Antibiotika*; Dissertation; Universität Wuppertal; 2005.

- [294] V. Homem, A. Alves, L. Santos; *Amoxicillin degradation at ppb by Fenton's oxidation using design of experiments*; Science of the Total Environment 408; 2010; 6272-6280.
- [295] D. Morthorst; *Bioverfügbarkeit von Amoxicillin bei Absatzferkeln nach parenteraler und peroraler Applikation über Futter und Trinkwasser unter verschiedenen Bedingungen*, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2002.
- [296] T. Reyns, S. De Boever, S. De Baere, P. De Backer, S. Croubels; *Tissue Depletion of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Pigs: Influence of the Administration Route and the Simultaneous Dosage of Clavulanic Acid*; J. Agric. Food Chem. 2008; 56, 448-454.
- [297] EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0, Online-Dokument:  
[http://ebookey.org/European-Pharmacopoeia-5th-Ed-Main-Volume-5-0\\_897761.html](http://ebookey.org/European-Pharmacopoeia-5th-Ed-Main-Volume-5-0_897761.html), letzter Zugriff am 03.05.2012.
- [298] G. Domagk; *Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen*; Dtsch. Med. Wschr. 7, 1935, 250-256.
- [299] J. W. Spoo, J. E. Riviere; *Sulfonamides*; in: Veterinary Pharmacology and Therapeutics; H. R. Adams (Hrsg.), Iowa State University Press, Ames (USA), 8. Edition, 796-817, 2001.
- [300] C. Hartig; *Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt*; Dissertation, Technische Universität Berlin, 2000.
- [301] S. Thiele-Bruhn; *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review*; J. Plant Nutr. Soil Sci. 166, 2003, 145-167.
- [302] C. Lin, C. Chang, W. Lin; *Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. III. Citrate buffer as a background electrolyte*; J. Chromatogr. A 768, 1997, 105-112.
- [303] W. Tappe, C. Zarfl, S. Kummer, P. Burauel, H. Vereecken, J. Groeneweg; *Growth-inhibitory effects of sulfonamides at different pH: Dissimilar susceptibility patterns of a soil bacterium and a test bacterium used for antibiotic assays*; Chemosphere 72, 2008.
- [304] C. Zarfl, M. Matthies, J. Klasmeier; *A mechanistical model for the uptake of sulfonamides by bacteria*; Chemosphere 70, 2008, 753-760.
- [305] F. Schulze; *Verbleib in Knochen gebundener Rückstände von Tetracyclinen während der Herstellung von Gelatine mit dem sauren Aufschlussverfahren*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2003.
- [306] T. Christian; *Antibiotika in Oberflächengewässern Nordrhein-Westfalens*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2004; [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online/math\\_nat\\_fak/2004/christian\\_thorsten/0476.pdf](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2004/christian_thorsten/0476.pdf), Zugegriffen am 27.07.2011.
- [307] J. L. Woolley, C. W. Sigel; *Metabolism and disposition by the rat of sulfadiazine-S-35 alone and in the presence of trimethoprim*; Drug Metabolism and Disposition 7; 1979; 94-99.

- [308] P. Duelli; *Untersuchungen zum Vorkommen von Antiinfektiva in bayerischer Konsum- und Tankmilch*, Universität München; 2008.
- [309] M. Clara, O. Gans, F. Humer, S. Weiß, I. Zieritz; *Antibiotika Im Grundwasser; Sondermessprogramm im Rahmen der Gewässerzustandsüberwachungsverordnung*, Report REP-0258, ISBN 978-3-99004-059-1, Wien, 2010.
- [310] T. Köhler; *Untersuchungen zum Einfluß von antibiotischen Leistungsförderern und ionophoren Antikokzidien auf die Inzidenz der Clostridium perfringens-Enterotoxämie des Huhnes nach experimenteller Infektion*, Dissertation, Universität Leipzig; 2000.
- [311] J. W. Westley; *Polyether Antibiotics*; Biology, Marcel Dekker Inc., 1, 1982.
- [312] Online-Dokument:  
[http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?clinitox/toxdb/pfd\\_047.htm?clinitox/pfd/toxipfd.htm](http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?clinitox/toxdb/pfd_047.htm?clinitox/pfd/toxipfd.htm), letzter Zugriff am 08.08.2011.
- [313] F. Gerlach, *Kokzidiose beim Dromedar (Camelus dromedarius)*; Dissertation, Universität Berlin; 2008.
- [314] M. Aleman, G. K. Magdesian, T. S. Peterson, F. D. Galey; *Salinomycin toxicosis in horses*, Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA) 230, 2007, 1822-1826.
- [315] A. L. Donoho; *Biochemical studies on the fate of monensin in animals and the environment*; J. Anim. Sci. 58, 1984, 1528-1539.
- [316] EFSA, *Zusammenfassung des Gutachtens des Wissenschaftlichen Gremiums für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tiernahrung über die erneute Beurteilung des Kokzidiostatikums Elancoban auf Ersuchen der Kommission entsprechend Artikel 9G der Richtlinie 70/524/EWG des Rates*, EFSA-Q-2003-0045; 2003.
- [317] BfR; *Hohe Keimbelastung in Sprossen und küchenfertigen Salatmischungen*; Aktualisierte Stellungnahme Nr. 017/2011 des BfR vom 09. Mai 2011 zur Ersetzung der Stellungnahme Nr. 026/2010 vom 16. Juni 2010.
- [318] V. Homem, A. Alves, L. Santos; *Amoxicillin degradation at ppb by Fenton's oxidation using design of experiments*; Science of the Total Environment 408; 2010; 6272-6280.
- [319] J.W. Peterson; R. S. Burkhart; D.C. Shaw; A. B. Schuilling; M. J. Haserodt; M. D. Seymour; *Experimental determination of ampicillin adsorption to nanometer-size Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in water*, Chemosphere 80 (2010) 1268-1273.
- [320] S. Babić, A. J. M. Horvat, D. M. Pavlović, M. Kaštelan-Macan; *Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients*; Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 11, 2007.
- [321] S. De Baere, M. Cherlet, K. Baert, und P. De Backer; *Quantitative Analysis of Amoxycillin and Its Major Metabolites in Animal Tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*; Anal. Chem. 2002, 74, 1393-1401.

[322] T. Reyns, M. Charlet, S. De Baere, P. De Backer, S. Croubels; *Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues*, Journal of chromatography B, 861 (2008) 108-116.

[323] M. Becker, *LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-Antibiotika*; Dissertation; Universität Wuppertal; 2005.

[324] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, (Laborbücher Chemie), 7., durchges. Aufl. 1992, Otto Salle Verlag GmbH & Co., Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer AG, Aarau.

[325] A. Pérez-Parada, A. Agüera, M. Gómez-Ramos, J. F. García-Reyes, H. Heinzen, A. R. Fernández-Alba; *Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry*; Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011; 25: 731-742.

[326] S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, T. Ast; *Study on formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry*; Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008; 22: 67-74.

[327] Zhu Yongxin, E. Rotets, M. L. Moreno, E. Porqueras, J. Hoogmartens; *Evaluation of LC Methods for the Separation of Amoxicillin and Its Related Substances*; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 19: 12, 1893-1908, 1996.

[328] Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 3044).

[329] Deutsches Institut für Normung e.V.; DIN 32645; *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung*; 1994.

[330] S. Kromidas; *Handbuch Validierung in der Analytik*; WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1. Aufl., 2. Nachdruck, 2003.

[331] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert; *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*; VCH-Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim; 1. Aufl.; 1992.

[332] Valoo Software Programm, [www.analytik-software.de/valoo.html](http://www.analytik-software.de/valoo.html), letzter Zugriff am 10.08.2011.

[333] Official Journal of the European Union; amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (2004/25/EC); 2004.

[334] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften; Entscheidung der Kommission, Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend der Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen; (2002/657/EG), 12. August 2002.

- [335] J. L. Schnoor, L. A. Light, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe, L. H. Carreira; *Phytoremediation of organic and nutrient contaminants*; Environ. Sci. Technol. 29 (7), 318 A-323 A; 1995.
- [336] S. Trapp, M. Matthies, B. Reiter; *Überprüfung und Fortentwicklung der Bodenwerte für den Boden-Pflanze-Pfad, Transferfaktoren Boden-Pflanze*; Forschungsbericht 296 71 005, UBA-FB, 2001, 98-114, ISSN0722-186X.
- [337] Online-Dokument: [http://www.bio-gaertner.de/Articles/I.Pflanzen-dieDatenbank/Gemuese-Salate\\_allgemein/FruchtfolgeFruchtwechsel.html](http://www.bio-gaertner.de/Articles/I.Pflanzen-dieDatenbank/Gemuese-Salate_allgemein/FruchtfolgeFruchtwechsel.html); letzter Zugriff am 28.08.2011.
- [338] Feller et al., bearbeitet von U. Meier; *Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen, BBCH-Monografie*, Gemeinschaftsarbeit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), des Bundessortenamtes (BSA) und des Industrieverbandes Agrar (IVA) unter Mitwirkung anderer Institutionen, 2001.
- [339] C. Wu, A. L. Spongberg, J. D. Witter; *The uptake of pharmaceuticals and personal care products by agriculturally relevant plant species*; chemica oggi/Chemistry Today-vol. 29 no. 2, 2011.
- [340] <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biochemie/3611>, letzter Zugriff am 10.04.2012.
- [341] H.-W. Heldt, B. Piechulla; *Pflanzenbiochemie*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; September 2008; ISBN: 978-3-8274-1961-3.
- [342] M. T. Brandl; *Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety*; Annual Review of Phytopathology 44, 2006, 1-26.
- [343] M. Ö. Uslu, A. Yediler, I. A. Balcioglu, S. Schulte-Hostede; *Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices*; Water Air Soil Pollut. 190, 2008, 55-63.
- [344] E. Turiel, A. Martin-Esteban, J. L. Tadeo; *Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV*; Analytica Chimica Acta 562, 2006, 30-35.
- [345] M. Stüber, T. Reemtsma; *Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS*; Anal. Bioanal. Chem. 378, 2004, 910-916.
- [346] A. Klopfer, J.B. Quintana, T. Reemtsma; *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples*; Journal of Chromatography A 1067, 2005, 153-160.
- [347] K. Kumar, S.C. Gupta, S.K. Baidoo, Y. Chander, C.J. Rosen; *Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure*; J. Environ. Qual. 34, 2005, 2082 – 2085.
- [348] A.B.A. Boxall, P. Johnson, E.J. Smith, C.J. Sinclair, E. Stutt, L.S. Levy; *Uptake of veterinary medicines from soils into plants*; J. Agric. Food Chem.: 54, 2006, 2288-2297.
- [349] J.P. Langhammer, F. Führ, H. Büning-Pfaue; *Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanze*; Lebensmittelchem. Gerichtl Chem 44, 93, 1990.

- [350] H. Dolliver, K. Kumar, S. Gupta; *Sulfamethazine uptake by plants from manure amended soil*; J Environ Qual 36, 2007, 1224 – 1230.
- [351] J. M. Hamilton-Miller, S. Shah; *Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables*; International Journal of Antimicrobial Agents 18, 2001, 81-83.
- [352] P.P. Maia, E. Clarete da Silva, S. Rath, F. Guillermo Reyes; *Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse*, Food Control 20, 2009, 11–16.
- [353] BfT Bundesverband für Tiergesundheit e.V., *Das aktuelle Interview-GermVet: Ein beispielhaftes Monitoring-Programm*, Pressemitteilung BfT Spezial Nr. 40/ Februar 2007.
- [354] Online-Dokument: [it.wikipedia.org/wiki/File:Root\\_Tlp\\_Anatomy.png](http://it.wikipedia.org/wiki/File:Root_Tlp_Anatomy.png), letzter Zugriff am 17.04.2012
- [355] J. Kollmus; *Extraktion organischer Schadstoffe aus Böden mit überkritischem Wasser und Evaluation von Extraktionsmodellen*; Dissertation, Technische Universität Bergakademie Freiberg, 2006
- [356] Online-Dokument: <http://lexikon.huettenhilfe.de/gemuese/rotkohl.html>
- [357] M. M. Bellakova, S. I. Bessonov, B. M. Sergeev, I. G. Smirnova, E. N. Dobrov, A. M. Kopylov; *Rate of Tetracycline Photolysis during Irradiation at 365 nm*, Biochemistry (Moscow), Vol. 68, No. 2, pp. 182-187 (russisch, translated pp. 218-224), 2003.
- [358] W. Yan, S. Hu, C. Jing; *Enrofloxacin sorption on smectite clays: Effects of pH, cations, and humic acid*; Journal of Colloid and Interface Science 372, 2012, 141-147.
- [359] Z. Yu, A. Yediler, M. Yang, S. Schulte-Hostede; *Leaching behavior of Enrofloxacin in three different soils and the influence of a surfactant on its mobility*; Journal of Environmental Sciences 24 (3), 2012, 435-439.
- [360] A. Khadra, E. Pinelli, M. Z. Lacroix, A. Bousquet-Melou, H. Hamdi, G. Merlina, M. Guirese, M. Hafidi; *Assesment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the Vicia faba micronucleus test*; Ecotoxicology and Environmental Safety 76, 2012, 187-192.
- [361] M. Sturini, A. Speltini, F. Maraschi, A. Profumo, L. Pretali, E. Fasani, A. Albini; *Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin*; Chemosphere 86, 2012, 130-137.
- [362] K. Schwaiger, K. Helmke, C. S. Hölzel, J. Bauer; *Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket)*; International Journal of Food Microbiology 148, 2011, 191-196.
- [363] M. A. Fernández-Fuentes, E. O. Morente, H. Abriouel, R. Pérez Pulido, A. Gálvez; *Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics*; Food Control 26; 2012, 73-78.

- [364] Y. W. Li, Y. Zhang, C. H. Mo, Y. P. Tai, X. L. Wu, J. Y. Wang, Q. Y. Su; *Preliminary study on occurrence and health risk assessment of quinolone antibiotics in vegetables from Guangzhou, China*; Huanjing Kexue 31 (10), 2010, 2445-2449.
- [365] X. L. Wu, C. H. Mo, Y. P. Tai, X. L. Wu, J. Y. Wang, Q. Y. Su, X. D. Huang, X. L. Qu; *Investigation and health risk assessment of quinolone antibiotics in vegetables: Taking supermarket vegetables of Guangzhou city for an exemple*; Huanjing Kexue 32 (6), 2011, 1703-1709.
- [366] M. Boonsaner, D. W. Hawker; *Investigation of the mechanism of uptake and accumulation of zwitterionic tetracyclines by rice (Oryza sativa L.)*, Ecotoxicology and Environmental Safety 78, 2012, 142-147.
- [367] P. S. McManus, V. O. Stockwell, G. W. Sundin, A. L. Jones; *Antibiotic use in plant agriculture*, Annual Review of Phytopathology 40, 2002, 443-465.
- [368] Online-Dokument: European and Mediterranean Plant Protection Organization; [http://www.eppo.int/?utm\\_source=www.eppo.org&utm\\_medium=int\\_redirect](http://www.eppo.int/?utm_source=www.eppo.org&utm_medium=int_redirect), letzter Zugriff am 01.05.2012.
- [369] Online-Dokument: International Plant Protection Convention; <https://www.ippc.int/IPPC/En/default.jsp>, letzter Zugriff am 01.05.2012.
- [370] S. Sczesny; *Analytik von Tetracyclinen in Umwelt- und Lebensmittelproben mittels selektiver Extraktionsverfahren und sensitivem Nachweis durch HPLC gekoppelt mit mikrobiologischem Assay und Tandem-Massenspektrometrie*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2001.
- [371] S. Sczesny, H. Nau; G. Hamscher; *Residue Analysis of Tetracyclines and Their Metabolites in Eggs and in the Environment by HPLC Coupled with a Microbial Assay and Tandem Mass Spectrometry*; J. Agric. Food Chem. 51, 2003, 697-703.
- [372] T. Schrittmatter, M. Siewert; *Zur Qualitätsbeurteilung der Tetracycline: Übersicht zur Stabilität und Analytik der Tetracyclinderivate*; Pharm. Ztg. 126, 1981, 1951-1954.
- [373] E. Weidenberg; *Vergleich verschiedener Aufschlußverfahren zur Herstellung von Gelatine aus Knochenen im Hinblick auf Rückstände von Tetracyclinen*; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2001.
- [374] A. Pena, A. Carmona, A. Barbosa; C. Lino, I. Silveira, B. Castillo; *Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection*; J. Pharm. Biomed. Anal. 18, 1998, 839-845.
- [375] BfR-Stellungnahme; Antibiotikaresistente Bakterien im Stall-welches Risiko besteht für den Menschen?; 04/2012, vom 08.02.2012, Online-Dokument: [www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2012/04/antibiotikaresistente\\_bakterien](http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2012/04/antibiotikaresistente_bakterien), letzter Zugriff am 14.05.2012.
- [376] F. Marty, *Plant Vacuoles*, The Plant Cell, Vol. 11, 587–599, April 1999, Online-Dokument: [www.plantcell.org](http://www.plantcell.org) © 1999 American Society of Plant Physiologists, letzter Zugriff am 14.05.2012.

[377] D. N. De; *Plant Cell Vacuoles, An Introduction*; CSIRO PUBLISHING (Hrsg.), Kharagpur, India; 2000; ISBN: 9780643062542; Online-Dokument: [www.publish.csiro.au/pid/2318.htm](http://www.publish.csiro.au/pid/2318.htm), letzter Zugriff am 14.05.2012.

[378] Persönliche Mitteilung von Dr. Langenkämper (Biologe am MRI)

[379] B. Karsten, R. Reski;  *$\beta$ -Lactam Antibiotics Inhibit Chloroplast Division in a Moss (*Physcomitrella patens*) but not in Tomato (*Lycopersicon esculentum*)*; J. Plant Physiol. Vol. 150, 1997, 137-140.

[380] M. Hassani, R. Lazaro, C. Perez, S. Condon, R. Pagan; *Thermostability of Oxytetracycline, Tetracycline, and Doxycycline at Ultrahigh Temperatures*; J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 2676-2680.

[381] Biodynamic Research Team, *Wirkungen von Rottemist und biol.-dyn. Präparaten*, Langzeitversuch am IBDF, Darmstadt (seit 1980); Online-Dokument: <http://www.biodynamic-research.net/rf/b/ltt/lvda1>; letzter Zugriff am 12.04.2012.

# Anhang

## **A. 1 Theoretische Grundlagen**

- A. 1.1 Vorgehensweise bei der Therapie von bakteriellen Infektionen
- A. 1.2 Zugelassene Veterinärantibiotika
- A. 1.3 Mögliche Übertragungswege von Antibiotikarückständen und resistenten Keimen auf den menschlichen Organismus
- A. 1.4 Rückstandshöchstmengen (MRL)-Werte der eingesetzten Wirkstoffe
- A. 1.5 Berechnete log  $K_{OW}$ -Werte für verschiedene Antibiotika
- A. 1.6 Umwandlungs- und Abbaureaktionen von Tetracyclinen

## **A. 2 Experimenteller; methodischer Teil**

- A. 2.1 Probenvorbereitung (Hausmethode)
  - A. 2.1.1 Chemikalien
  - A. 2.1.2 Verbrauchsmaterialien
  - A. 2.1.3 Geräte
  - A. 2.1.4 Lösungen für HPLC
  - A. 2.1.5 Angewandtes Gradientenprogramm für HPLC
  - A. 2.1.6 Antibiotika-Stammlösungen
  - A. 2.1.7 Durchführung der Probenvorbereitung
- A. 2.2 Erweiterung der Xcalibur-LC-MS/MS-Messmethode
  - A. 2.2.1 Vorläufer- und Produktionen von Antibiotika
  - A. 2.2.2 Massenchromatogramme einer Mischstandardlösung ( $\beta=1$  mg/L), LC/MS, SRM-Modus, Methode II k
  - A. 2.2.3 Methodvalidierung der neuen Methode II k
  - A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite

## **A. 3 Hydrokulturexperimente mit Rotkohl**

- A. 3.1 Dotierungsexperimente mit Rotkohl
- A. 3.2 Zusammensetzung der Hoaglandlösung für die Rotkohlhydrokulturen
- A. 3.3 Positionierung der Töpfe im Phytotron
- A. 3.4 Geräteeinstellung des Phytotrons zur Anzucht von Rotkohl
- A. 3.5 Ermittelte Erntegewichte von Rotkohlblättern und Möhrenrüben (für Topf a)
- A. 3.6 Durchschnittlicher Verbrauch an Nährlösung der Rotkohlhydrokultur
- A. 3.7 Quantitative Ergebnisse von Rotkoh (1), Dotierung: 5,0  $\mu\text{mol/L}$
- A. 3.7 Quantitative Ergebnisse von Rotkohl (2), Dotierung: 2,5  $\mu\text{mol/L}$
- A. 3.8 Vergleich der Antibiotikaaufnahme von Weißkohl und Rotkohl in Hydrokultur
- A. 3.9 Dotierlösungen für die Hydrokulturversuche

## **A. 4 Hydrokulturexperimente mit Möhren**

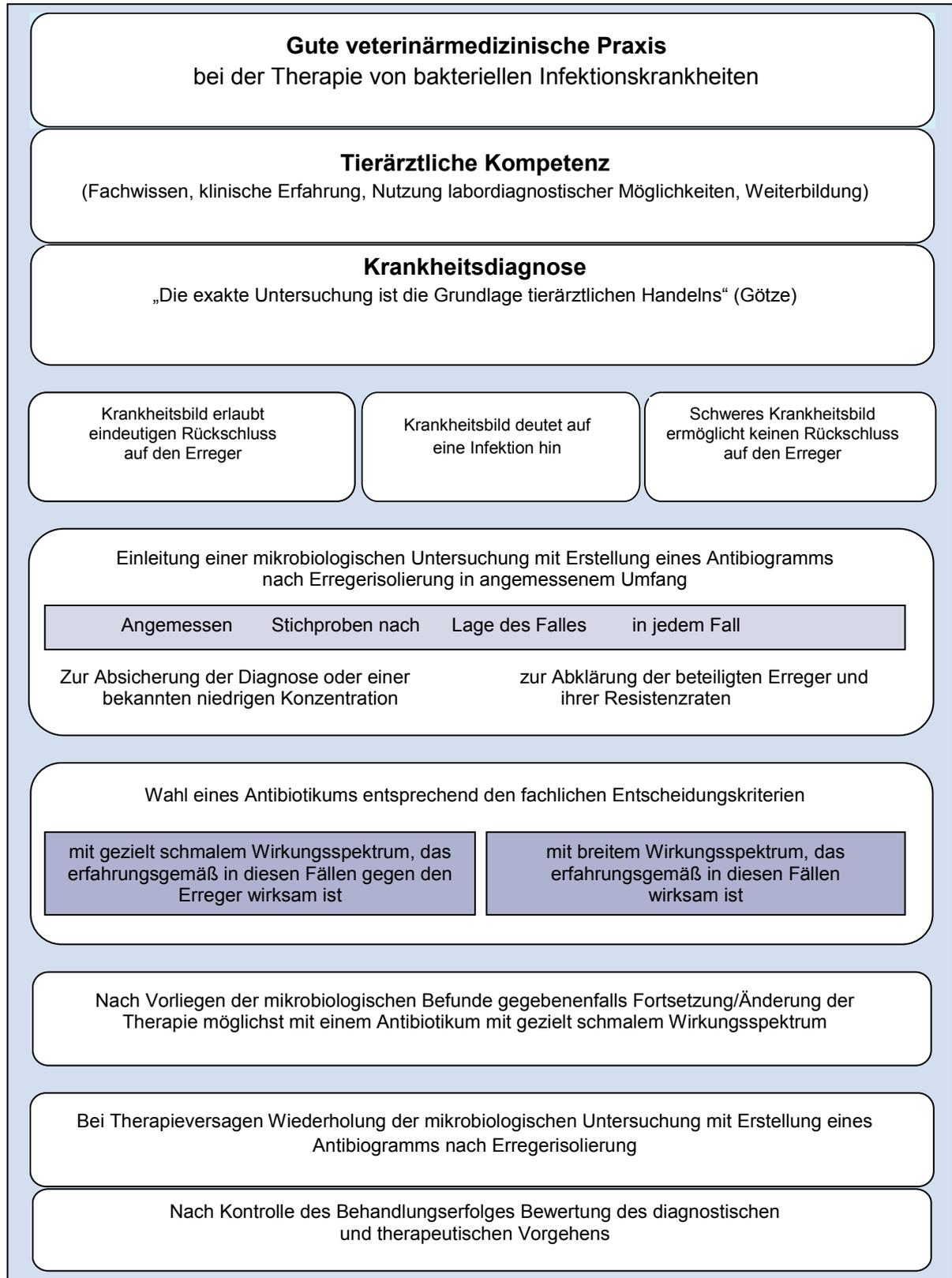
- A. 4.1 Dotierungsexperimente mit Möhren
- A. 4.2 Zusammensetzung der Hoaglandlösung für die Möhrenhydrokulturen
- A. 4.3 Geräteeinstellung des Phytotrons zur Anzucht von Möhren
- A. 4.4 Maße der Möhren vor Umsetzung auf Hydrokultur
- A. 4.5 Anzuchtbedingungen von Möhren und Rotkohl in Hydrokultur
- A. 4.6 Ergebnisse der Analyse von Möhren (Hydrokultur: Topf a – d)

## **A. 5 Antibiotikaaufnahme in Rotkohl unter Feldbedingungen**

- A. 5.1 Prüfbericht der Bodenergebnisse der LUFA NRW
- A. 5.2 Bericht über die Gülleanalyse der LUFA NRW
- A. 5.3 BBCH-Skala
- A. 5.4 Anbau und Sortenhinweise für den Rotkohlanbau (Rheinland-Pfalz 2010)
- A. 5.5 Chromatogramme der Gülleproben
- A. 5.6 Probenaufbereitung für die Bodenanalysen nach Stevens

## A. 1 Theoretische Grundlagen

### A. 1.1 Vorgehensweise bei der Therapie von bakteriellen Infektionen nach [55]

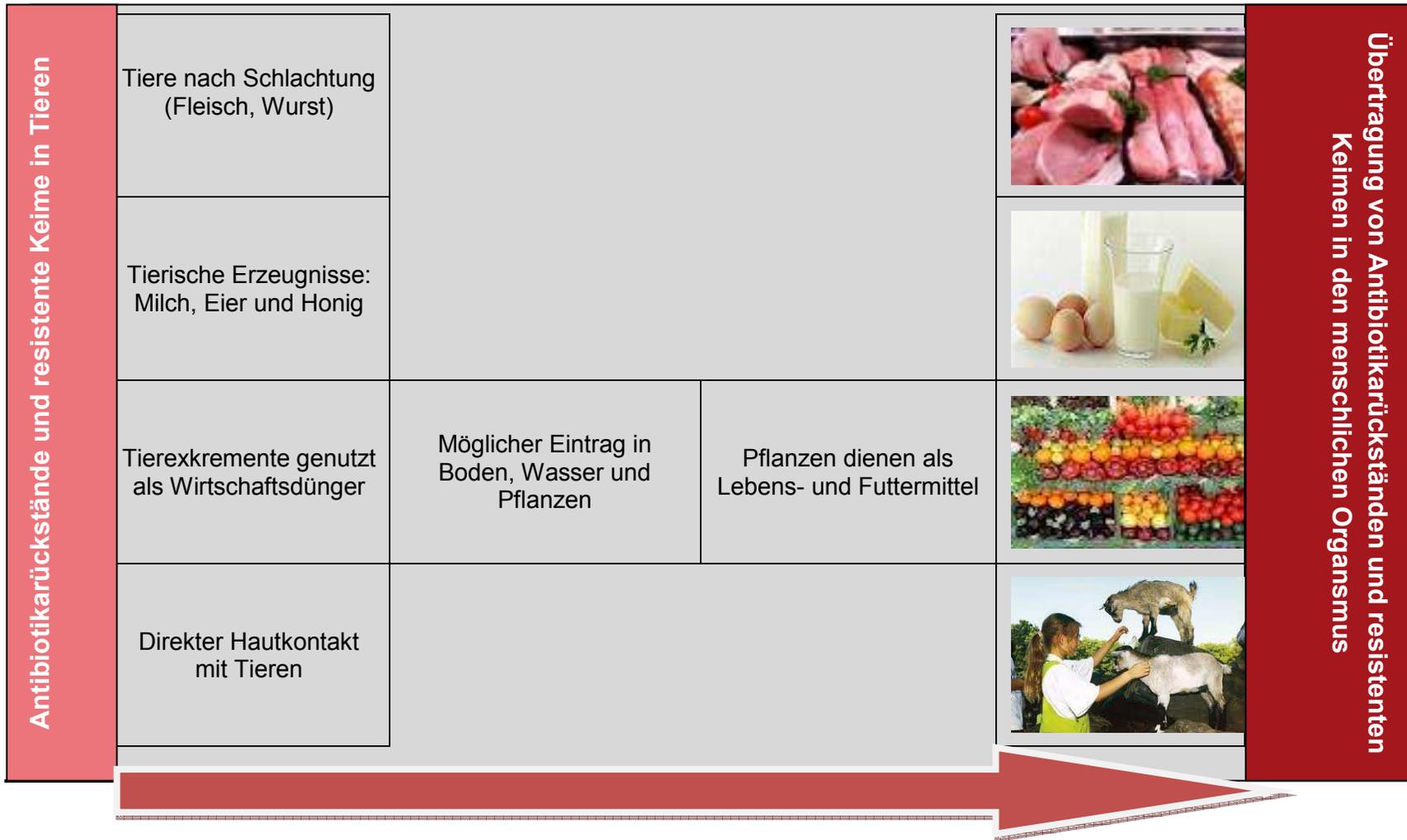


## A. 1.2 Zugelassene Veterinärantibiotika nach [55]

Wirkstoffgruppen/ pharmakologische Wirkstoffe (Beispiele)	Spektrum	Therapeutische Breite	Besonderheiten	Wirktyp	Pharmako- kinetik: Gewebeängigkeit
<b><u>Aminoglykoside</u></b> Apramycin Gentamicin Kanamycin Neomycin Spectinomycin Streptomycin Dihydrostreptomycin	gram neg., z.T. gram pos.	gering (system. Anwendung)  mittel (orale/ locale Anwendung)	Neurotoxizität, Ototoxizität, Nephrotoxizität	bakterizid	gering
<b><u>Amphenicole</u></b> Chloramphenicol Florfenicol	gram pos. u. neg.	mittel		bakteriostatisch	groß
		groß			
<b><u>Ansamycine</u></b> Rifamycin	gram pos.	groß		bakterizid	
<b><u>Beta-Lactame</u></b> <b>Penicilline:</b> Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin) Amoxicillin+Clavulansäure  Benzylpenicillin Cloxacillin, Oxacillin  <b>Cephalosporine:</b> Frühere Generation (z.B. Cefacetril, Cephalexin) Neuere Generation (z.B. Cefoperazon, Ceftiofur, Cefquinom)		groß	Allergiepotential, besonders Penicillin	bakterizid	mittel
	gram pos. + neg., β-lactamasebildend				
	gram pos.+ Pasteurellen				
	gram pos.		Kreuzallergie möglich zwischen β-Lactamen		
	gram pos. + (neg.)				
	gram pos. + neg. + β-Lactamasebildend				

<b><u>Chinolone</u></b> Danofloxacin, Difloxacin Enrofloxacin Marbofloxacin Orbifloxacin	gram pos. + neg., Mykoplasmen	groß	potentiell gelenkschädigend beim Jungtier	bakterizid	groß
<b><u>Fusidinsäure</u></b>	gram pos.	groß		bakteriostatisch	groß
<b><u>Lincosamide</u></b> Clindamycin Lincomycin	gram pos. + Mykoplasmen	mittel	gastrointestinale Störungen	bakteriostatisch	groß
<b><u>Makrolide</u></b> Erythromycin Spiramycin Tylosin Tilmicosin	gram pos. + Pasteurellen + Mykoplasmen	mittel	lokale Reizungen möglich	bakteriostatisch	groß
		gering			
<b><u>Pleuromutiline</u></b> Tiamulin Valnemulin	gram pos. + Mykoplasmen	groß	Unverträglichkeit mit Ionophoren	bakteriostatisch	groß
<b><u>Polypeptidantibiotika</u></b> Colistin Polymixin B Bacitracin	gram neg.	gering (system. Anwendung) mittel (orale/lokale Anwendung)	lokale Reizungen möglich	bakterizid	gering
	gram pos.	mittel (nur zur lokalen Anwendung)	Neurotoxizität		
<b><u>Sulfonamide</u></b> Sulfadiazin, Sulfadoxin, Sulfadimidin u.a.  Kombination mit Trimethoprim	gram pos. + neg.	mittel	Potentiell nephrotoxisch	bakteriostatisch	mittel
			Schockgefahr bei i.v. Anwendung	bakterizid	
<b><u>Tetracycline</u></b> Tetracyclin, Chlortetracyclin Oxytetracyclin, Doxycyclin	gram pos. + neg. +Mykoplasmen + Chlamydien	mittel	lokale Reizungen möglich (parenteral)	bakteriostatisch	groß

### A. 1.3 Mögliche Übertragungswege von Antibiotikarückständen und resistenten Keimen auf den menschlichen Organismus



## A. 1.4 Rückstandshöchstmenge(n) (MRL)-Werte der eingesetzten Wirkstoffe [55]

Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Markerrückstand	Tierart(en)	Rückstandshöchstmenge(n)	Zielgewebe	Sonstige Vorschriften (gemäß VO(EG) Nr. 470/2009)	Therapeutische Einstufung
Chlortetracyclin	Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	100 µg/kg 300 µg/kg 600 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg	Muskel Leber Nieren Milch Eier	Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstandshöchstmenge(n)wert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmenge(n)werte für Leber und Nieren gelten nicht für Fisch.	Mittel gegen Infektionen/ Antibiotika
Enrofloxacin	Summe von Enrofloxacin und Ciprofloxacin	Rinder, Schafe, Ziegen	100 µg/kg 100 µg/kg 300 µg/kg 200 µg/kg 100 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren Milch	Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstandshöchstmenge(n)wert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmenge(n)werte für Fett, Leber und Nieren gelten nicht für Fisch. Für Schweine betrifft der Fett-Rückstandshöchstmenge(n)wert „Haut und Fett in natürlichen Verhältnissen“. Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind	Mittel gegen Infektionen/ Antibiotika
		Schweine, Kaninchen	100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 300 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren		
		Geflügel	100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 300 µg/kg	Muskel Haut und Fett Leber Nieren		
		Alle anderen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 200 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren		

Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Markerrückstand	Tierart(en)	Rückstandshöchstmenge(n)	Zielgewebe	Sonstige Vorschriften (gemäß VO(EG) Nr. 470/2009)	Therapeutische Einstufung
Amoxicillin	Amoxicillin	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg 4 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren Milch	Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstandshöchstmengenwert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmengenwerte für Fett, Leber und Nieren gelten nicht für Fisch. Für Schweine und Geflügel betrifft der Fett-Rückstandshöchstmengenwert „Haut und Fett in natürlichen Verhältnissen“. Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind.	Mittel gegen Infektionen/ Antibiotika
Sulfonamide (alle Stoffe der Sulfonamidgruppe)	Muttersubstanz	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren	Die Rückstände aller Stoffe der Sulfonamidgruppe dürfen insgesamt 100 µg/kg nicht überschreiten. Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstandshöchstmengenwert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmengenwerte für Fett, Leber und Nieren gelten nicht für Fisch. Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind.	Mittel gegen Infektionen/ Chemotherapeutika
		Rinder, Schafe, Ziegen	100 µg/kg	Milch		
Monensin	Monensin A	Rinder	2 µg/kg 10 µg/kg 30 µg/kg 2 µg/kg 2 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren Milch	KEIN EINTRAG	Mittel gegen Infektionen/ Antibiotika

### A. 1.5 Berechnete log K<sub>OW</sub>-Werte für verschiedene Antibiotika

Wirkstoff	log K <sub>OW</sub> -Wert	Wirkstoff	log K <sub>OW</sub> -Wert
Amoxicillin	0,61 +/- 0,33	Chlortetracyclin	-0,33 +/- 0,82
Penicilloisäure von Amoxicillin	0,95 +/- 0,86	Iso-Chlortetracyclin	-0,74 +/- 0,76
Amoxicillin-Methanol-Addukt	1,39 +/- 0,81	Sulfadiazin	-0,12 +/- 0,26
Diketopiperazin	1,33 +/- 0,81	Enrofloxacin	2,54 +/- 0,77
Tetracyclin	-1,47 +/- 0,81	Ciprofloxacin	1,31 +/- 0,78
Doxycyclin	0,54 +/- 0,80	Monensin	3,72 +/- 0,74
Oxytetracyclin	1,50 +/- 0,83	Demeclocyclin	0,87 +/- 0,81

### A. 1.6 Umwandlungs- und Abbaureaktionen von Tetracyclinen

- Isomerisierung

Chlortetracyclin isomerisiert bereits ab einem pH-Wert von  $> 7$  zum iso-CTC, wobei der Ring C an Position C-6 aufbricht und eine irreversible Isomerisierung zustande kommt (Abbildung A. 1.6.1). Die Wirkstoffe TC und OTC isomerisieren jedoch erst oberhalb eines pH-Wertes von 9-10. Die iso-Tetracycline besitzen keine oder nur noch sehr geringe antibiotische Aktivität [7, 272, 257, 370-371]. Die iso-Tetracycline können ebenfalls in einem pH-Bereich von 2 bis 6 zum 4-epi-iso-Tetracyclin epimerisieren.

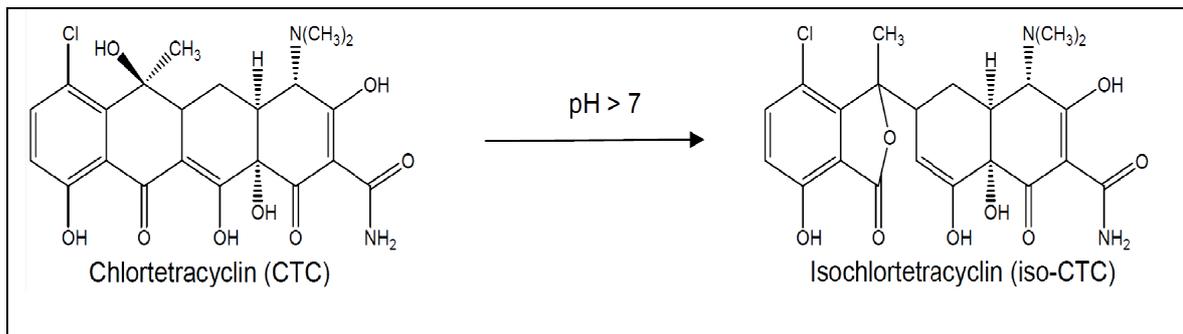


Abbildung A. 1.6.1: Isomerisierung von Chlortetracyclin im alkalischen Milieu [7]

- Keto-Enol-Tautomerie

Die unterschiedlichen Tetracycline können in Abhängigkeit von Polarität und pH-Wert des Lösungsmittels verschiedene tautomere Formen annehmen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Enol- und Keto-Form von CTC.

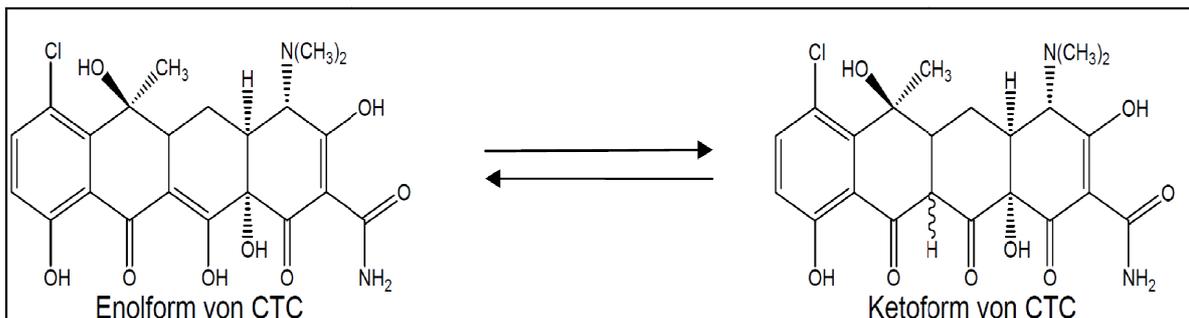


Abbildung A. 1.6.2: Keto-Enol-Tautomerie von Chortetracyclin [7]

- Dehydratisierung

Neben den zahlreichen Umwandlungsreaktionen können auch Dehydratisierungsreaktionen stattfinden. So erfolgt im sauren Bereich ( $\text{pH} < 1,5$ ) eine irreversible Dehydratisierung der Tetracycline (Abbildung A. 1.6.3).

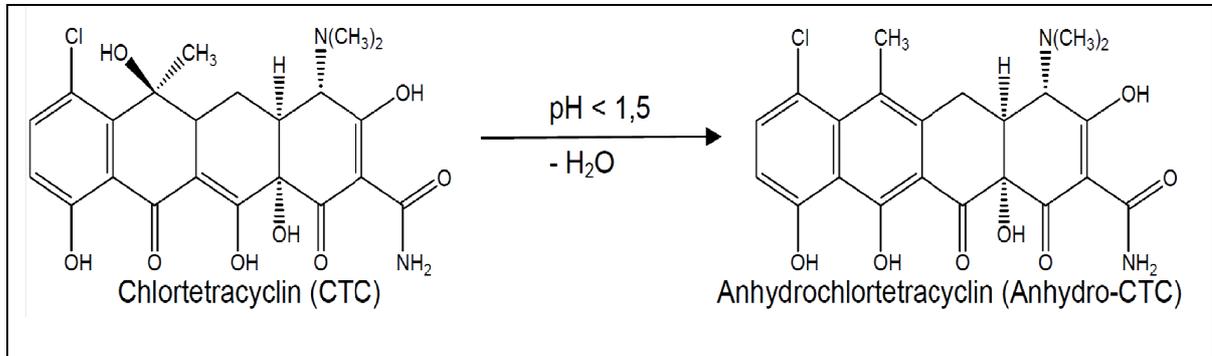


Abbildung A. 1.6.3: Dehydratisierung von Chlortetracyclin zum Anhydrochlortetracyclin [7]

Bei der Dehydratisierung von Chlortetracyclin wird an Position C-6 leicht Wasser abgespalten und unter anschließender Aromatisierung von Ring C entsteht das Anhydrochlortetracyclin. Dabei handelt es sich um eine irreversible Reaktion zweiter Ordnung. Die Eliminierung von Wasser ist durch die *trans*-Stellung der tertiären Hydroxylgruppe an Position C-6 zum H-Atom an C-5a möglich [264, 273, 372].

Abhängig vom Ausgangswirkstoff können analog die entsprechenden Anhydrotetracycline gebildet werden. Diese unterliegen ebenfalls den Epimerisierungsreaktionen und der Keto-Enol-Tautomerie. Die antibiotische Wirksamkeit von Anhydrotetracyclinen ist um ca. 70 % gegenüber ihrer ursprünglichen Substanz vermindert. Zudem werden ihnen deutlich toxischere Eigenschaften zugeschrieben, weswegen sie nicht für klinische Zwecke eingesetzt werden [241, 373, 374].

## A. 2 Experimenteller, methodischer Teil

### A. 2.1 Probenvorbereitung (Hausmethode)

#### A. 2.1.1 Chemikalien

Aceton (p.a.; Merck/Darmstadt)

Acetonitril (HPLC Grade; Merck)

Ameisensäure reinst. 98-100 % (Merck)

Amoxicillin (LCG, Luckenwalde)

Chlortetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97$  % (Acros)

Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)  
Citronensäure-Monohydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)  
Demeclocyclin Hydrochlorid  $\geq 97\%$  (Acros)  
Diketopiperazin (LCG, Luckenwalde)  
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)  
Doxycyclin Hydrochlorid  $\geq 97\%$  (Acros)  
Enrofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)  
Epichlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))  
Epichlortetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97\%$  (Acros)  
Epidemeclocyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))  
Epidoxycyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))  
Epioxytetracyclin (Acros Organics/Geel (Belgien))  
Epitetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))  
Flüssiger Stickstoff  
Isochlortetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97\%$  (Acros)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck/Darmstadt)  
Koffein (Sigma-Aldrich/Steinheim)  
Methanol (Chromasolv; Sigma-Aldrich/Steinheim)  
Natriumcarbonat (wasserfrei; Merck/Darmstadt)  
Natriumdihydrogenphosphat (Merck/Darmstadt)  
Natriumhydroxid (p.a.; Merck/Darmstadt) Methanol (p.a.; Merck/Darmstadt)  
Oxytetracyclin Hydrochlorid,  $\geq 97\%$  (Acros)  
Pufferlösung, pH 2 und pH 7 (gebrauchsfertig)  
Salzsäure, 25 % (w/w; p.a.; Merck/Darmstadt)  
Sulfadiazin min. 99 % (Sigma-Aldrich)  
Tetracyclin Hydrochlorid  $\geq 97\%$  (Acros)  
Titriplex III, Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat EDTA (p.a., Merck/Darmstadt)  
Trichloressigsäure (p.a.; Merck/Darmstadt)  
Ultramark (Alfa Aesar Lancaster/Pelham (Great Britain))  
Wasser (bidestilliert über Quarzglas mit Destamat Bidest von Heraeus/Hanau)

### **A. 2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

50 mL (VWR, Falcon Tubes)

Analytische Trennsäule, YMC ODS-AM 5 µm 150 x 3 mm und YMC ODS-AM 5 µm 150 x 1 mm (YMC Europe GmbH/Dinslaken)

Analytische Vorsäule, YMC ODS-AM 5 µm 20 x 3 mm (YMC Europe GmbH/Dinslaken)

Deckel für Probenvials (RSC)

Einwegspritzen 30 mL

Glaswatte (reinst, silanisiert) (Serva Feinbiochemica)

Kartusche Bond Elut C18, 1 mL (Agilent)

Kartusche Bond C18, 3 mL (Agilent)

Kartusche Bond-Elut Plexa, 3 mL (Agilent)

Messkolben 10 mL, Duran-Glas (VWR, Brand)

Pasteurpipetten 150 mm (VWR, Brand)

Pasteurpipetten 250 mm, (VWR)

Polymerphasen-Kartuschen: Oasis HLB 3cc (Waters, Art.Nr.: WAT094226)

Probenbeutel 540 mL (VWR, Twist-Seal)

Probenvials, (VWR)

Reagenzgläser, (RSC)

Zentrifugengläser 50 mL (VWR, Duran-Glas)

### **A. 2.1.3 Geräte**

#### **HPLC-MS/MS-System (LCQ dreidimensionale Iontrap)**

##### **HPLC**

Degasser: SCM 1000 Vakuum Membran Degasser

Pumpe: P 4000 Gradient Pumpe

Injektionseinheit: AS 3000,

Autosampler gekühlt (10°C)

Säulenofen (temperiert auf 30°C)

Trennsäule: YMC-Pack ODS-AM, 150 x 3,0 i.D.; S 5 µm

Säulenschaltventil: STUW-Trapping

##### **Massenspektrometer**

LCQ-Adventage Ionenfallen-Massenspektrometer (Fa. Thermo Finnigan)

Ionisierungsmethode: Electrospray Ionization (ESI), positiv-Mode [M+H]<sup>+</sup>, Bestätigung durch MS/MS-Stoßexperimente (He), Precursor- und Produkt-Ionen

Tune-Page-Parameter:

Mass Range:	80-2000 [m/z]
Sheat Gas Flow Rate:	47 [arb]
Auxillary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	250 [°C]
Capillary Voltage:	9 [V]
Tube Lens Offset:	- 5,0 [V]
Multipole 1 Offset:	- 1,5 [V]
Lens Voltage:	- 32 [V]
Multipole 2 Offset:	- 5,5 [V]

### **Sonstige Laborgeräte**

Handelsübliche Labor- und Glasgeräte Zentrifuge, Hettich Rotofix 32

SPE-Vakuumblock, Merck LiChrolut

Ultraschallbad, Bandelin Sonorex

Thermostat, VLM EC 1

Schüttler, IKA Vibrax VXE basic

Trockenschrank, Heraeus T 5042

Magnetrührer, IKA RH basic 2

Opi (Overpressure-Injection), RSC Chromatographie

Analysenwaage, CP 622 Sartorius und Handy Sartorius

### **A. 2.1.4 Lösungen für HPLC**

#### ***Mobile Phasen A-D:***

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

In einem Becherglas werden 200 mL Acetonitril, 1800 mL bidest. Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100 %) zusammengegeben, mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt und 10 min. zum Entgasen in das Ultraschallbad gestellt.

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

In einem Becherglas werden 1200 mL Acetonitril, 800 mL bidest. Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100 %) zusammengegeben, mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt und 10 min. zum Entgasen in das Ultraschallbad gestellt.

#### **Laufmittel C: Methanol**

#### **Laufmittel D: Acetonitril**

**A. 2.1.5 Angewandtes Gradientenprogramm für HPLC**

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Fließmittel C [%]	Fließmittel D [%]
0.00	90	10	0	0
1.50	80	20	0	0
10.00	60	40	0	0
12.00	0	100	0	0
12.50	0	0	0	100
25.00	0	0	0	100
26.00	90	10	0	0
35.00	90	10	0	0

**A. 2.1.6 Antibiotika-Stammlösungen**1000 mg/L - Stammlösungen

Die Stammlösungen aller eingesetzten Analytsubstanzen (mit Ausnahme von e-iso-CTC) wurden als Einzellösung hergestellt. Dazu wurden 10,0 mg des entsprechenden Antibiotikums in fester Form in einem 10 mL Messkolben eingewogen und je nach Wirkstoff mit Methanol oder bidest. Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Bei der Herstellung von Ciprofloxacin-Stammlösung wird jedoch mit 2 %-iger Ameisensäure in Acetonitril aufgefüllt. Die Herstellung der e-iso-CTC-Stammlösung erfolgt durch Epimerisierung von iso-CTC, da der Wirkstoff kommerziell nicht erhältlich ist. Für die Herstellung werden 2 mL iso-CTC-Stammlösung ( $\beta = 1000 \text{ mg/L}$ ) mit 3 mL Methanol und 5 mL der mobilen Phase A in einem Reagenzglas für eine Stunde bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  (Thermostatenblock) hergestellt. Die Berechnung der daraus resultierenden Konzentration für e-iso-CTC (ca.  $200 \text{ mg/L}$ ) wird indirekt durch die Differenzbildung der iso-CTC-Konzentration vor und nach der Erwärmung ermittelt. Die Stammlösungen ( $\beta = 1000 \text{ mg/L}$ ) wurden danach bei  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$  tiefgekühlt aufbewahrt, wobei die Lagerungszeit nicht sechs Monate überschreiten durfte.

Mischstandard-Lösungen (10 mg/L)

Zur Herstellung einer  $10 \text{ mg/L}$  Mischstandard-Lösung werden  $100 \text{ }\mu\text{L}$  der jeweiligen  $1000 \text{ mg/L}$ -Antibiotika-Stammlösung in einen  $10 \text{ mL}$  Messkolben pipettiert und mit Methanol oder bidest. Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Aus dieser Mischstandard-Lösung, die jeweils vor jeder Messung hergestellt wird, werden die verdünnten Arbeitslösungen, je nach gewünschter Konzentration gewonnen.

## Pufferlösungen

### EDTA/Citratpuffer (pH 4,1)

In einem 3000 mL Becherglas werden 620 mL 0,1 mol/L Citronensäure mit 380 mL einer 0,2 mol/L Natriumhydrogenphosphatlösung gemischt. Zu dieser Mischung gibt man 37,244 g Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat (0,1 mol/L). Dieses wird zum Lösen für 15 min. auf einen Magnetrührer gestellt und ist anschließend gebrauchsfertig.

0,1 mol/L Citronensäure:	21,014 g Citronensäure Monohydrat werden in 1000 mL bidest. Wasser gelöst.
--------------------------	--

0,2 mol/L Natriumhydrogenphosphat:	35,6 g Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat werden in 1000 mL bidest. Wasser gelöst.
------------------------------------	---

### EDTA/Citratpuffer (pH 3,3)

Zur Herstellung wird der EDTA/Citratpuffer pH 4,1 mit verdünnter Salzsäure auf einen pH von 3,3 gesenkt.

### Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (0,01 mol/L, verschiedene pH-Werte)

In einen 1000 mL Messkolben werden 1,36 g Kaliumdihydrogenphosphat gegeben und mit bidest. Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt ( $c=0,01$  mol/L). Je nach gewünschtem pH-Wert wird dieser mittels 20 %-iger (w/w) Trichloressigsäure eingestellt.

### Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (0,05 mol/L, pH 8,5)

Es werden 6,00 g Natriumdihydrogenphosphat in einem 1000 mL Messkolben eingewogen und mit bidest. Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Die pH-Einstellung auf pH 8,5 erfolgt mit verdünnter Natronlauge.

### **A. 2.1.7 Durchführung der Probenvorbereitung**

- **Homogenisierung**

Das bei - 80°C tiefgekühlte Rotkohlmateriale wird in einer Labor-Mörsermühle (Grindomix GM200, Fa. Retsch) homogenisiert (3 x 15 sec., speed x 1000 rpm: 7).

- **Fest-Flüssig-Extraktion**

Die Fest-Flüssig-Extraktion besteht aus zwei Extraktionsstufen:

- **Extraktionsstufe 1**

Es werden jeweils zwei Einwaagen je 5 g (für Blatt alt, Blatt jung, Stängel bzw. Rüben) und 3 g (für Wurzeln) parallel aufgearbeitet. Die Einwaage des Probenmaterials erfolgt in je einem 50 mL-Zentrifugenglas, zu dem 20 ml Citrat-EDTA-Pufferlösung gegeben wird. Die mit einem Glasstab aufgeschlämmte Suspension wird nach 5 min. Ultraschallbad für 10 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres Zentrifugenglas überführt.

- **Extraktionsstufe 2**

Zu dem verbleibenden Rückstand werden 10 mL Citrat-EDTA-Pufferlösung gegeben, aufgeschlämmt, 5 min. in ein Ultraschallbad gestellt, 10 min. zentrifugiert (4000 U/min.) und der resultierende Überstand wird mit dem Überstand der ersten Extraktionsstufe vereinigt. Der Gesamtextrakt wird weiter für die Festphasenextraktion eingesetzt.

- **Festphasen-Extraktion (Möglichkeit 1 und 2)**

Es bestehen zwei Möglichkeiten der Festphasen-Extraktion: Manuelle SPE-Einheit oder über das OPI-SPE (Over Pressure inline Solid Phase Extraction)-System.

- **Möglichkeit 1: Manuelle SPE-Einheit mit**

Die Probenaufbereitung beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

Konditionierung, Extraktaufnahme, Waschen und Elution.

#### **Konditionierung**

Die Konditionierung der SPE-Kartusche erfolgt mit 3 mL Methanol und anschließend mit 3 mL bidest.Wasser. Dabei ist zu beachten, dass die Kartusche nicht trockengesaugt werden darf. Die Effluat werden verworfen.

### **Extraktaufgabe**

Der vereinigte Gesamtextrakt (30 mL) wird mit einer Pasteurpipette auf die Kartusche gegeben. Sollte der Gesamtextrakt nicht ganz klar sein, sondern noch Rückstände der Probenmatrix enthalten, so wird zuvor Glaswolle in die Kartusche gegeben, sodass die Poren der Kartusche nicht verstopfen. Mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe wird ein Unterdruck erzeugt, sodass ca. 40 Tropfen pro Minute durch die Festphasenkartusche gesaugt werden. Dieses Effluat wird verworfen.

### **Waschen**

Die Kartusche wird zweimal gewaschen, zunächst mit 3 mL bidest.Wasser und anschließend mit 3 mL Methanol/bidest.Wasser (5/95 v/v). Die Kartuschen müssen anschließend trocken gesaugt werden. Die Waschlösungen werden verworfen.

### **Elution**

Die Elution der Antibiotika aus der Kartusche erfolgt durch Zugabe von 3 mL Methanol. Dabei ist zu beachten, dass diese sehr langsam von statten geht, um Verluste zu vermeiden. Das Eluat wird in einem 10 mL-Einmalreagenzglas aufgefangen, solange bis die Kartusche trocken gesaugt ist. Das Einmalreagenzglas mit dem Eluat wird in einem Metall-Thermostatenblock (30°C) gestellt und mit Hilfe eines leichten Stickstoffstroms zur Trockene eingengt. Im letzten Schritt wird der Rückstand mit 1000 µL Laufmittel A (Acetonitril/Wasser/Ameisensäure 10/89,9/0,1 v/v) aufgenommen. Die erhaltene Messprobe sollte eine klare Lösung sein. Andernfalls muss diese erneut für 10 min. zentrifugiert oder über Glaswolle gegeben werden, um ungelöste Partikel zu entfernen, bevor die Messung mittels LC-MS/MS erfolgen kann.

#### ➤ **Möglichkeit 2: OPi-SPE-System**

##### **(Over Pressure inline Solid Phase Extraction)**

Die Arbeitsschritte bei Verwendung des OPi-SPE-Systems, von der Firma RSC (Fa. Richard Sauerbrey Chromatographie, Reinhardshagen, sind die gleichen, wie bei der manuellen SPE-Einheit. Der Unterschied liegt darin, dass man die Proben nicht per Hand auf die Kartusche gibt, sondern zunächst in eine Spritze, die über die Kartusche gesteckt wird. Der Vorteil des OPi-Systems liegt im kontinuierlichen Durchfluss der verschiedenen Lösungen, die auf die Kartuschen gegeben werden. Das Prinzip beruht auf ein Pumpenhydrauliksystem, das bewirkt, dass der Kolben der Spritze mit gleichbleibender Geschwindigkeit herunter fährt und so die Probelösung mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 35 Tropfen durch die Kartusche drückt.

Dahingegen hängt der Durchfluss der einzelnen Lösungen bei der manuellen SPE-Einheit stark von den individuellen Durchflusswiderständen der SPE-Kartuschen und der Handhabung des Bedieners ab.

Bei dem OPi-System wird dieser unterschiedliche Widerstand der einzelnen SPE-Kartuschen durch ein 5 mL Luftpolster in der Spritze kompensiert, und ein gleichbleibender Durchfluss synchron bei allen Kartuschen durch Druck- und Frequenzeinstellung gewährleistet.

### **Konditionierung**

Die Konditionierung wird ebenfalls mit 3 mL Methanol und anschließend 3 mL bidest.Wasser vorgenommen, wobei die Lösung mittels einer Eppendorf-Pipette in die Einwegspritzen einzufüllen sind und zudem ein Luftpolster von 5 mL aufgezogen werden. Die Frequenz an der Pumpe wird auf 40 (Stoßzahl) eingestellt.

### **Extraktaufgabe**

Der Extrakt wird mit der Spritze aufgenommen und auf die Festphasenkartusche gegeben. Anschließend erfolgt der Waschschrift, wie bei der manuellen SPE-Einheit, wobei in diesem Fall die Waschreagenzien über die Spritze auf die Kartusche gelangen. Zum Trocknen der Kartusche werden manuell ca. drei mal 30 mL Luft schnell durch die Kartusche gedrückt.

### **Elution**

Die Elution erfolgt bei der gleichen Frequenz mit 3 mL Methanol. Die weitere Handhabung des Eluats entspricht der oben beschriebenen manuellen SPE-Einheit.

### A. 2.2 Erweiterte Xcalibur-LC-MS/MS-Messmethode

Segment 1 (0-6 min)	Segment 2 (6-12 min)	Segment 3 (12-20 min)	Segment 4 (20-35 min)
------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------

	Scan Event 1	Scan Event 2	Scan Event 3	Scan Event 4	Scan Event 5	Scan Event 6
Analyt	Full MS	AMA	AMO	Sulfadiazin	Oxytetracyclin	Tetracyclin
Precursorion	230,0-700,0	383,9	365,8	251,1	461,1	
Stoßenergie für MS/MS	Keine	50 %	45 %	35 %	44 %	34 %
Produktionen		188,0-190,0 321,8-323,8 365,8-367,8	158,9-160,9 205,0-209,0 347,8-349,8	155,0-157,0 172,9-174,9	425,0-427,0 441,5-444,5	409,0-411,0 425,5-428,5

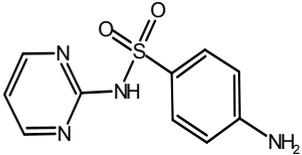
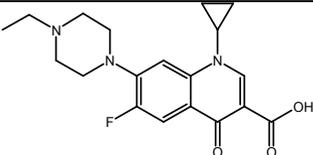
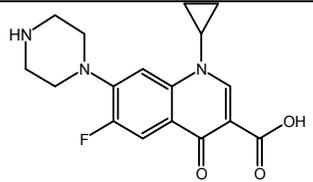
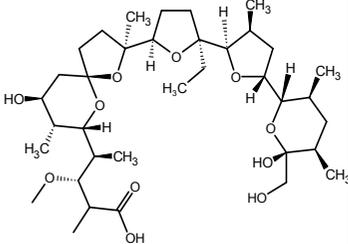
Segment 1 (0-6 min)	Segment 2 (6-12 min)	Segment 3 (12-20 min)	Segment 4 (20-35 min)
------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------

	Scan Event 1	Scan Event 2	Scan Event 3	Scan Event 4	Scan Event 5	Scan Event 6	Scan Event 7	Scan Event 8
Analyt	Full MS	ENR	IsoCTC/ CTC	Tetracyclin	Diketo	Ciprofloxacin	Oxytetracyclin	Demeclocyclin
Precursorion	230,0-700,0	360,2	479,1	445,0	365,8	332,1	461,1	465,0
Stoßenergie für MS/MS		42 %	40 %	34 %	45 %	44 %	44 %	40 %
Produktionen		244,2-246,2; 315,2-317,2; 341,2-343,2	443,0-445,0 460,9-462,9	409,0-411,0 425,5-428,5	158,9-160,9 206,1-208,1 347,8-349,8	425,0-427,0 441,5-444,5	425,0-427,0 441,5-444,5	429,0-431,0 447,0-449,0

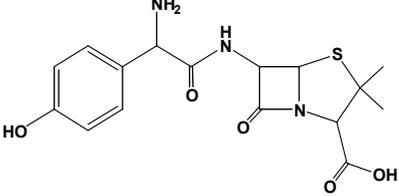
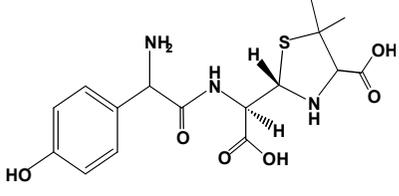
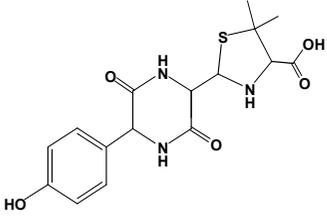
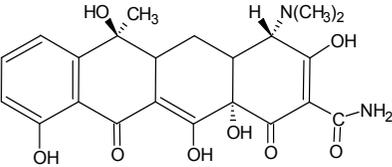
**A. 2.2 Fortsetzung: Erweiterte Xcalibur-LC-MS/MS-Messmethode**

Segment 1 (0-6 min)	Segment 2 (6-12 min)	Segment 3 (12-20 min)			Segment 4 (20-35 min)	
	Scan Event 1	Scan Event 2	Scan Event 3	Scan Event 4	Scan Event 5	Scan Event 6
Analyt Precursorion	Full MS 230,0-700,0	Doxycyclin	isoCTC/CTC	Demeclocyclin 465,0	ENR 360,2	Ciprofloxacin 332,1
Stoßenergie für MS/MS		34 %	40 %	40 %	42 %	44 %
Produktionen		409,0-411,0 425,5-428,5	443,0-445,0 460,9-462,9	429,0-431,0 447,0-449,0	244,2-246,2; 315,2-317,2; 341,2-343,2	425,0-427,0 441,5-444,5

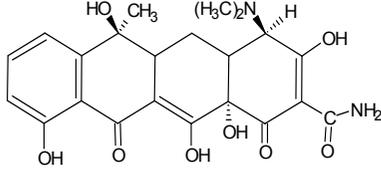
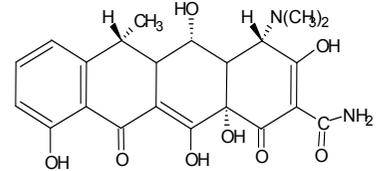
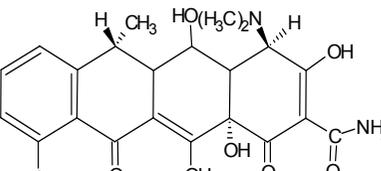
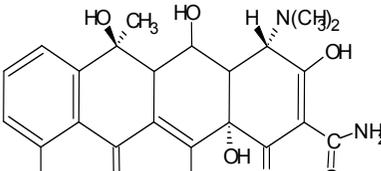
## A. 2.2.1 Vorläufer- und Produktionen von Antibiotika (1)

Stoffklasse	Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	Vorläufer-Ion (m/z)	Stoßenergie (%)	Produkt-Ionen (m/z) Peakintensität	Retentionszeit $t_R$ (min)
Sulfonamide	<b>Sulfadiazin</b>	SFD		251,1	35	155,7 (96-100 %) 173,8 (40-100%)	6,0
Fluorchinolone	<b>Enrofloxacin</b>	ENR		360,2	42	245,1 (< 5 %) 316,1 (100 %) 317,0 (10-20 %)	9,6
	<b>Ciprofloxacin</b>	CIP		332,1	44	288,1 (100 %) 314,1 (< 5 %)	8,3
Ionophore	<b>Monensin</b>	MON		693,4	45	479,2 (100 %)	22,8

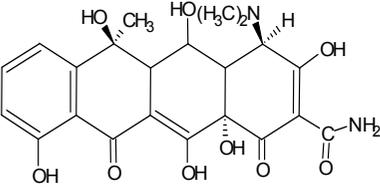
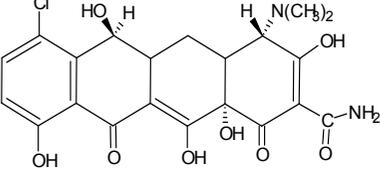
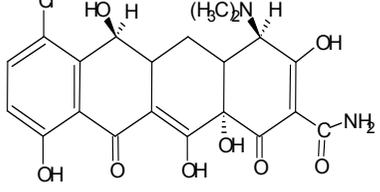
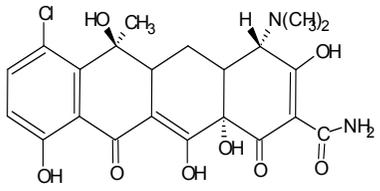
A. 2.2.1 Vorläufer- und Produktionen von Antibiotika (2)

Stoffklasse	Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	Vorläufer-Ion (m/z)	Stoßenergie (%)	Produkt-Ionen (m/z) Peakintensität	Retentionszeit $t_R$ (min)
β-Lactame	Amoxicillin	AMO		365,8	45	207,9 (100 %) 348,7 (100 %)	3,09
	Penicilloisäure von Amoxicillin	AMA		384,0	44	366,9 (100 %) 340,0 (10-20 %) 323,0 (50-70 %)	2,70
	Diketopiperazin	Diketo		365,8	30	159,9 (100 %) 207,0 (10 %)	6,74
Tetracycline	Tetracyclin	TC		445,0	34	409,9 (30%) 426,9 (100%) 427,9 (10 %)	8,74

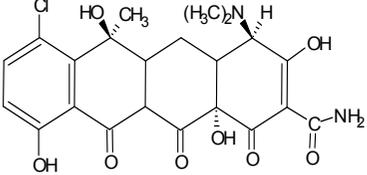
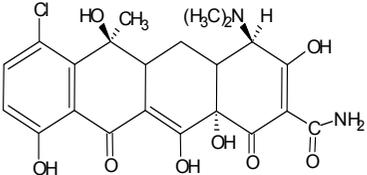
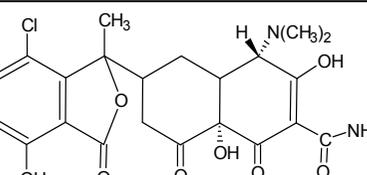
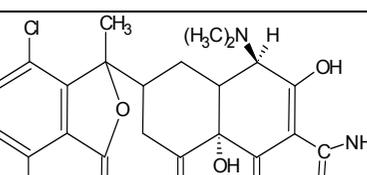
A. 2.2.1 Vorläufer- und Produktionen von Antibiotika (3)

Stoffklasse	Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	Vorläufer-Ion (m/z)	Stoßenergie (%)	Produkt-Ionen (m/z) Peakintensität	Retentionszeit t <sub>R</sub> (min)
Tetracycline	epi-Tetracyclin	e-TC		445,0	34	409,9 (40-50 %) 426,9 (100 %) 427,9 (30 %)	7,29
	Doxycyclin	DC		445,0	34	428,0 (100 %)	14,43
	epi-Doxycyclin	e-DC		445,0	34	428,0 (100 %)	13,71
	Oxytetracyclin	OTC		461,1	44	425,8 (100 %) 442,9 (60-80 %) 443,9 (15-20 %)	7,50

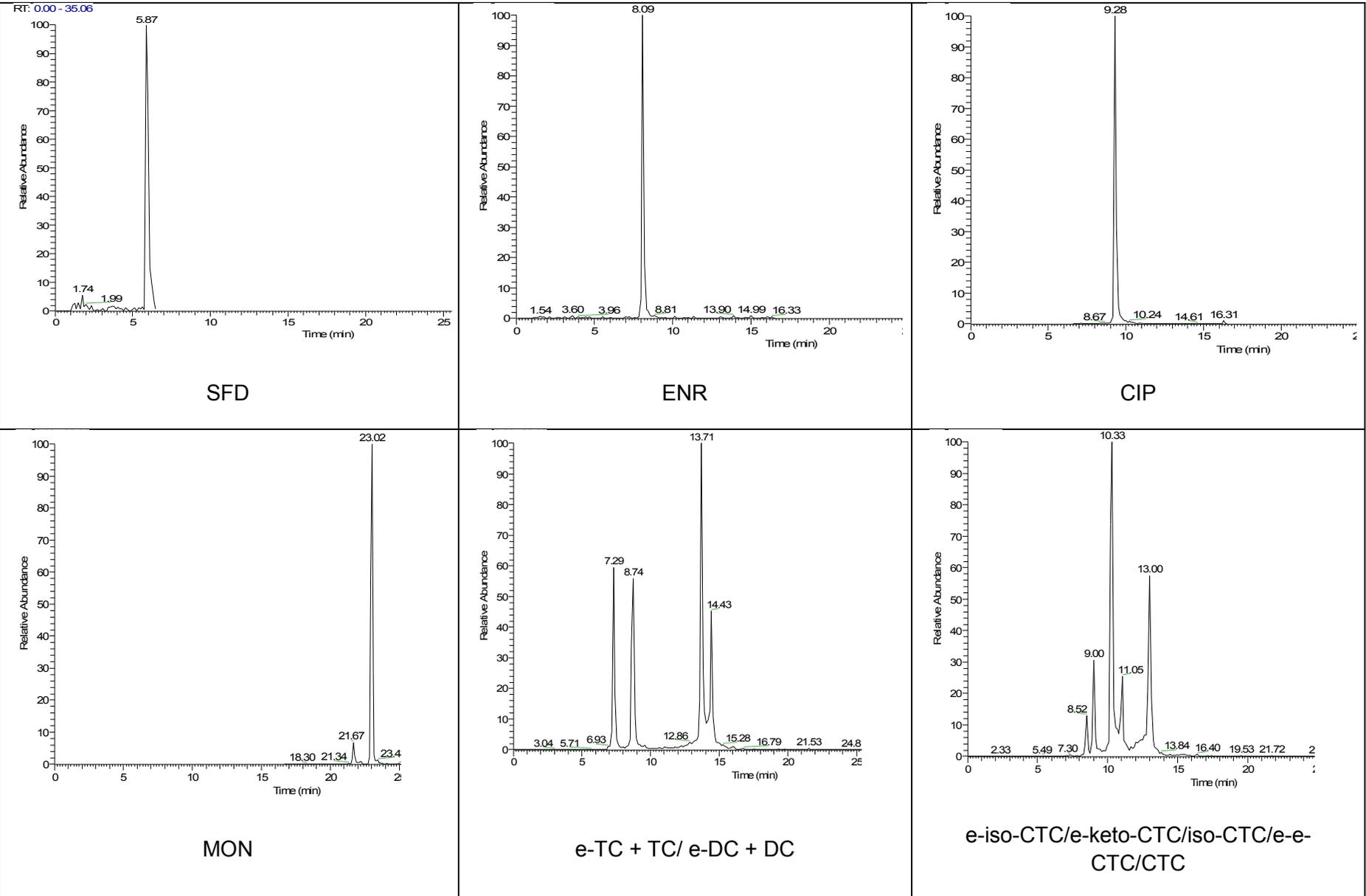
A. 2.2.1 Vorläufer- und Produktionen von Antibiotika (4)

Stoffklasse	Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	Vorläufer-Ion (m/z)	Stoßenergie (%)	Produkt-Ionen (m/z) Peakintensität	Retentionszeit $t_R$ (min)
Tetracycline	epi-Oxytetracyclin	e-OTC		461,1	44	426,0 (100 %) 444,0 (95 %) 442,9 (40-60 %)	7,14
	Demeclocyclin	DMC		465,0	40	448,0 (100 %) 430,0 (10-20 %)	10,59
	epi-Demeclocyclin	e-DMC		465,0	40	448,0 (100 %) 430,0 (10-20 %)	9,14
	Chlortetracyclin	CTC		479,1	40	461,8 (100 %) 443,8 (55-100 %)	13,00

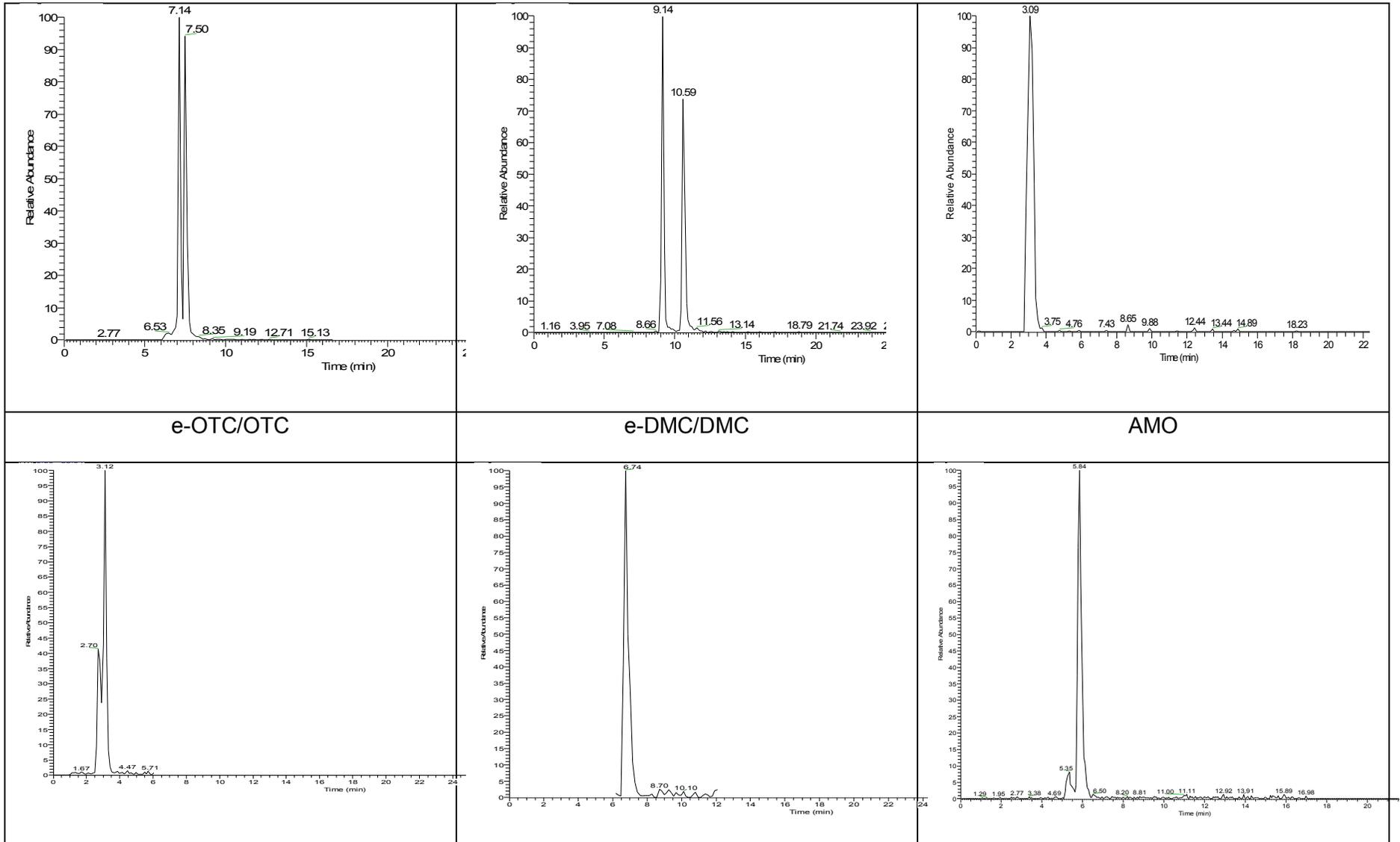
A. 2.2.1 Vorläufer- und Produktionen von Antibiotika (5)

Stoffklasse	Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	Vorläufer- lon (m/z)	Stoßenergie (%)	Produkt-Ionen (m/z) Peakintensität	Retentions- zeit $t_R$ (min)
Tetracycline	epi-keto- Chlortetracyclin	e-keto-CTC		479,1	40	461,9 (100 %) 262,7 (< 2 %) 444,0 (< 2 %)	9,00
	epi-enol- Chlortetracyclin	e-enol-CTC		479,1	40	461,9 (100 %) 443,9 (50-80 %) 461,2 (10 %)	11,45
	Isochlortetracyclin	iso-CTC		479,1	40	462,0 (100 %)	10,33
	epi- Isochlortetracyclin	e-iso-CTC		479,1	40	462,0 (100 %) 462,8 (< 5 %)	8,52

2.2.2 Massenchromatogramme einer Mischstandardlösung ( $\beta=1$  mg/L), LC/MS, SRM-Modus, Methode II k (1)



2.2.2 Massenchromatogramme einer Mischstandardlösung ( $\beta=1$  mg/L), LC/MS, SRM-Modus, Methode II k (2)



### A. 2.2.3 Methodenvalidierung der neuen Methode II k

#### Wiederfindung

Die Wiederfindung ist ein Beurteilungskriterium von Analysenverfahren. Zur Bestimmung der Wiederfindungen werden Kontrollproben von Rotkohlblättern aus der Hydrokulturanzucht mit Mischstandard dotiert (50 µg/kg FG). Nach ca. 15 Minuten Einwirkzeit werden die Proben nach der Probenaufbereitungsvorschrift (s. Kapitel 6.2) aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS analysiert. Die erhaltenen Messproben werden jeweils zehnfach injiziert. Die Auswertung erfolgt mittels Matrixkalibrierung. Alle Tetracycline werden als Summenparameter (Tetracyclin + entsprechendes Epimer) ermittelt und bei CTC beinhaltet der Summenparameter e-iso-CTC und iso-CTC.

des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe und lässt sich wie folgt berechnen:  $WF = \frac{X}{XR} \cdot 100\%$

WF=Wiederfindung in %,

X=gemessener Mittelwert,

XR=richtiger Wert entspricht der zugesetzten Konzentration

#### Präzision

Für die Präzision werden die relativen Standardabweichungen nach folgenden Formeln berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

$$s_{\text{rel}} = \frac{s}{y} \cdot 100\%$$

s=Standardabweichung

$s_{\text{rel}}$ =relative Standardabweichung

$y_i$ =Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

y=Peakfläche

$\bar{y}$ =Mittelwert der Peakflächen (Detektorsignal)

**Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lassen sich nach folgender Formel berechnen:

Nachweisgrenze ( $X_{NWG}$ )	Bestimmungsgrenze ( $X_{BG}$ )
$X_{NWG} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$	$X_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k \cdot X_{NWG} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$

$\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$	$\hat{y}_i$ = zu $y_i$ gehöriger Schätzwert aus der Regressfunktion
$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$	$s_{y1}$ = Reststandardabweichung
$s_{x_0} = \frac{S_{\bar{y}1}}{b}$	$s_{x_0}$ = Verfahrensstandard-abweichung

$X_i$  = Mittelwert der experimentell ermittelten Konzentration

$a$  = Ordinatenabschnitt

$b$  = Geradensteigung

$y_i$  = Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche

$t_{f,\alpha}$  = Quantil der t-Verteilung (einseitiges Prognoseintervall)

$f = n-2$  (mit  $f$  = Anzahl der Freiheitsgrade)

$\alpha$  = Signifikanzniveau

$m$  = Anzahl der Messungen an der Analysenprobe

$n$  = Anzahl der Proben

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (1)

Nr.	Dotierung [β=1mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
1	*MSTD zu Rotkohlblät- tern (Blindprobe)	Oasis HLB Bond	Citrat/ EDTA- Puffer pH 4,1	3 mL MeOH	3 mL bidest.H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH	0	5-10	0
				3 mL H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH/ bidest. H <sub>2</sub> O (5/95,v/v)				
2	MSTD zu Extraktions- mittel	Oasis HLB Bond	Citrat/ EDTA- Puffer pH 4,1	3 mL MeOH	3 mL bidest.H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH	1,8	82,9	0
				3 mL H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH/ bidest. H <sub>2</sub> O (5/95,v/v)				
3	MSTD zu Extraktions- mittel	Oasis HLB Bond	Citrat/ EDTA- Puffer pH 4,1	3 mL MeOH	3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	3 mL ACN	1,8	47,9	0
				3 mL H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH/ bidest. H <sub>2</sub> O (5/95,v/v)				
4	MSTD zu Wasser	Oasis HLB Bond	H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH	3 mL H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH	** Messlö- sung: 0,9 %	*** Messlö- sung: 24,2 %	**** Messlö- sung: 0 %
				3 mL H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH/ bidest. H <sub>2</sub> O (5/95,v/v)				
5	MSTD zu 0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	33,3	39,3	28,1
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O					
				3 mL 2% ige TCA	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
6	MSTD zu 0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	47,6	60,7	11,0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (2)

Nr.	Dotierung [β=1mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
7	MSTD zu Möhrenmatri- ces: Blätter	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0	0	0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
8	MSTD zu Möhrenmatri- ces: Rübe	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0	Qualita- tive Hinwei- se	0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
9	MSTD zu Möhrenmatri- ces: Wurzel	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0	8,8	5,6
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
10	MSTD zu Möhrenmatri- ces: Blätter	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0	0	0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
11	MSTD zu Möhrenmatri- ces: Rübe	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0	0	0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
12	MSTD zu Möhrenmatri- ces: Wurzel	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 mL 20% ige Trichloressig- säure (TCA)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0	7,6	5,5
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (3)

Nr.	Dotierung [β=1 mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung [%]		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
13	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 1 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	35,1	60,8	64,1
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
14	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	27,1	39,6	67,6
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
15	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2,64 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	18,7	35,1	67,2
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
16	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 1 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	5,7	15,8	10,0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
17	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	35,9	66,7	12,9
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
18	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2,64 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	35,6	69,9	8,9
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
19	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 3 eingestellt	2 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	13,1	66,7	8,1
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (4)

Nr.	Dotierung [β=1 mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung [%]		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
20	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 1 (ohne TCA konditioniert)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	6,7	14,8	9,8
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
21	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 (ohne TCA konditioniert)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	28,9	69,9	38,0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
22	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2,64 (ohne TCA kond.)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	23,2	65,0	18,3
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
23	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut Plexa	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 3 (ohne TCA konditioniert)	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	11,4	62,3	8,5
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
24	AMO zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 1 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	0,4	nicht dotiert, nicht nachge- wiesen (n.n.)	nicht dotiert, n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
25	AMO zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 1 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL MeOH	0,5	nicht dotiert, n.n.	nicht dotiert, n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (5)

Nr.	Dotierung [β=1 mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung [%]		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
26	AMO zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Oasis HLB Bond	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 1 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	6 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Aceton	dotiert, n.n.	nicht dotiert, n.n.	nicht dotiert, n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
27	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut- C18 (100mg/1mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	77,0	91,3	55,8
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
28	AMO zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Bond Elut- C18 (100mg/1mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	58,6	nicht dotiert, n.n.	nicht dotiert, dennoch 4,7% aus AMO umge- wandelt
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
29	MSTD zu NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,5)	Oasis HLB Bond	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit 0,2 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt	2 mL MeOH	3 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mL ACN/ H <sub>2</sub> O	14,3	59,3	12,6
				2 mL H <sub>2</sub> O	1 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				2 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					
30	AMO zu NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,5)	Oasis HLB Bond	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit 0,2 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt	2 mL MeOH	3 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mL ACN/ H <sub>2</sub> O	17,5	nicht dotiert, n.n.	nicht dotiert, n.n.
				2 mL H <sub>2</sub> O	1 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				2 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (6)

Nr.	Dotierung	Kartusche	Extraktionsmittel	SPE			Wiederfindung [%]		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
31	MSTD zu Citrat/ EDTA-Puffer (pH 3,3)	Bond Elut-C18 (100mg/1mL)	Citrat/ EDTA-Puffer (pH 3,3)	3 mL MeOH	3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH	4,2	46,2	3,4
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH/ bidest. H <sub>2</sub> O (5/95,v/v)				
32	MSTD zu Citrat/ EDTA-Puffer (pH 3,3)	Bond Elut-C18 (100mg/1mL)	Citrat/ EDTA-Puffer (pH 3,3)	3 mL MeOH	3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	3 mL ACN	n.n.	12,2	n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	3 mL MeOH/ bidest. H <sub>2</sub> O (5/95,v/v)				
33	MSTD zu Möhrenmatrices: Blätter	Bond Elut-C18 (100mg/1mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	n.n.	n.n.	n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
34	MSTD zu Möhrenmatrices: Rübe	Bond Elut-C18 (100mg/1mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	12,5	2,8	n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
35	MSTD zu Möhrenmatrices: Wurzel	Bond Elut-C18 (100mg/1mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	n.n.	34,8	n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
36	AMO zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut-C18 (100mg/3mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	14,8 und 7,8	nicht dotiert, n.n.	nicht dotiert, n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

## A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (7)

Nr.	Dotierung [β=1 mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung [%]		
				Konditionierung	Waschen	Elutionsmittel	AMO	Diketo	AMA
37	Diketo zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut- C18 (100mg/3mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	nicht dotiert	71,0 und 24,3	nicht dotiert
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
38	AMA zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut- C18 (100mg/3mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	nicht dotiert	nicht dotiert	4,4
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
39	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut- C18 (100mg/1mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	50,7	74,1	30,5
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
40	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut Plexa (60 mg/ 1 mL Nr. 9601 SPL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	25,0	34,5	n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
41	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	RPCI Polyspher (100 mg/ 1 mL Nr. 19872)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	n.n.	n.n.	n.n.
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
42	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut – C 18 (200mg/3mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	3 mL ACN	17,1	59,6	64,6
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

A. 2.2.4 Optimierung der Methode zur Bestimmung von AMO und Metabolite (8)

Nr.	Dotierung [β=1 mg/L]	Kartusche	Extraktions- mittel	SPE			Wiederfindung [%]		
				Konditionierung	Waschen	Elution	AMO	Diketo	AMA
43	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut – C 18 (200mg/3mL) (Nr.12102025)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	5 mL ACN	42,5	74,8	46,0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
44	MSTD zu KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)	Bond Elut – C 18 (200mg/3mL) (Nr.12102025)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	6 mL ACN	26,9	62,9	44,0
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					
45	MSTD zu Rotkohlmatri- ces: Stängel	Bond Elut- C 18 (200mg/3mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit TCA auf pH 2 eingestellt	3 mL MeOH	2 mL 2% ige TCA	5 mL ACN	3,4	1,8	quali- tativ: nachge- wiesen
				3 mL bidest. H <sub>2</sub> O	2 mL bidest. H <sub>2</sub> O				
				3 mL 2% ige TCA					

**A. 3 Hydrokulturexperimente mit Rotkohl (Fotos: F. Chowdhury)****A. 3.1 Dotierungsexperimente mit Rotkohl (1)**

			
<p>3.1 a) Rotkohlsamen der Fa. Nickerson-Zwaan, Sorte: Rodon F1</p>	<p>3.1 b) Samenkörner im Originalzustand und bereits gequollene Samen in der Petrischale</p>	<p>3.1 c) Verteilung der Samenkörner auf dem zugeschnittenen Schaumstoff zu Errichtung von „Sandwiches“</p>	<p>3.1d) „Sandwiches“ in Calciumsulfat-Lösung, abgedeckt mit Frischhaltefolie die zur Belüftung mit Löchern versehen wird</p>
			
<p>3.1 e) Nach 10 Tagen: Rotkohlpflanzen sind 2 cm groß</p>	<p>3.1 f) Grüne dikotyle Blätter und rote Stängel</p>	<p>3.1 g) Durchschnittliche Wurzellänge: 10 cm, 3 Samen sind nicht angegangen</p>	<p>3.1 h) Jedes Pflänzchen wird mit Schaumstoff umwickelt, sodass die Wurzel hinunter hängt</p>
			
<p>3.1 i) Töpfe für die Anzucht in Hydrokultur</p>	<p>3.1 j) Die Rotkohljungpflanzen werden mit den Schaumstoffscheiben in die Löcher der Deckel gesteckt</p>	<p>3.1 k) Ansetzen von 90 L Hoagland-Nährlösung</p>	<p>3.1 m) Je 8 L angesetzte Nährlösung werden in weiße Eimer gegeben und mit Wirkstoff dotiert</p>
			
<p>3.1 n) 8 L werden auf zwei schwarze Töpfe verteilt, für Kontrollproben wird nur undotierte Nährlösung eingesetzt</p>	<p>3.1 o) Fertig besetzte Töpfe, gefüllt mit Nährlösung, im Phytotron</p>	<p>3.1 p) Anzucht im Phytotron (ein klimatisierter Pflanzenwuchsschrank der Fa. Vötsch)</p>	<p>3.1 q) Belüftungssystem für die Pflanzen wurde eingerichtet</p>

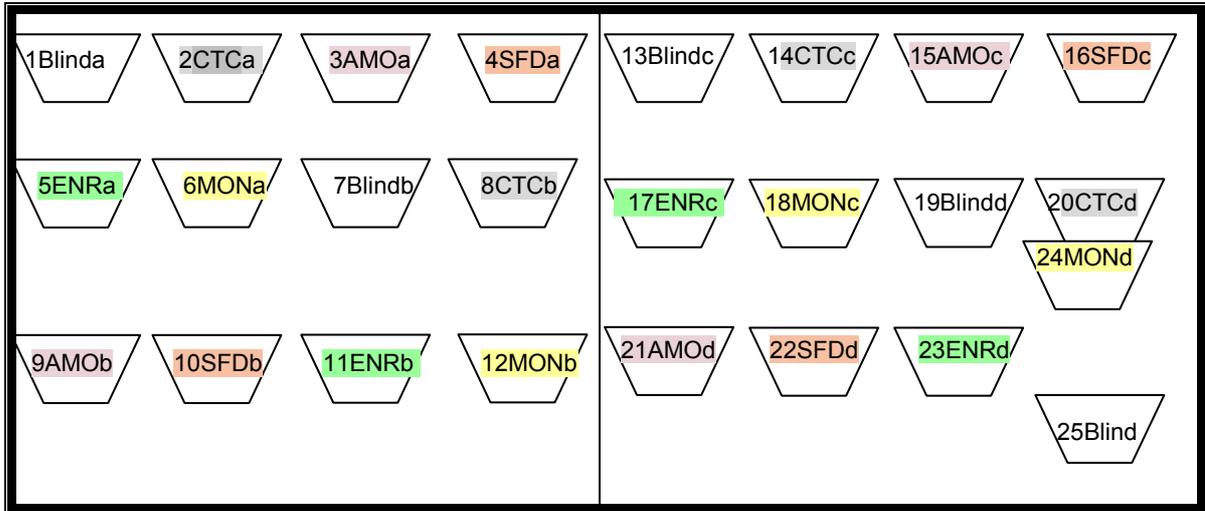
### A. 3.1 Dotierungsexperimente mit Rotkohl (2)

			
3.1 r) Gleiche Beschriftung von Topf und Deckel, um Verwechslungen zu vermeiden	3.1 s) Rotkohlpflanzen in MON-dotierter Nährlösung	3.1 t) Bisheriges Wurzelgeflecht	3.1 u) Wachstum der Rotkohlpflanzen drei Tage nach Umsetzung auf Nährlösung

### A. 3.2 Zusammensetzung der Hoaglandnährlösung für die Rotkohlhydrokulturen

Lösung	Substanzen	Einwaagen	Volumen
Hoagland 1			In 2 L gelöst
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	49,30 g	davon 450 mL eingesetzt
	KNO <sub>3</sub>	103,13 g	
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	46,01 g	
Hoagland 2			In 2 L gelöst
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	104,51 g	davon 225 mL eingesetzt
Hoagland 3			In 2 L gelöst
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	188,92 g	davon 450 mL eingesetzt
Hoagland 4			In 2 L gelöst
	Fe-EDTA	42,11 g	davon 90 mL eingesetzt
Hoagland 5			In 1 L gelöst
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g	davon 90 mL eingesetzt
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,80 g	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,26 g	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,08 g	
	CoCl <sub>2</sub>	0,01 g	
	KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	0,05 g	
Hoagland 6			In 1 L gelöst
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,24 g	davon 90 mL eingesetzt
Hoagland 7			In 1 L gelöst
	Na <sub>2</sub> Si <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	ca. 5,0 g	davon 90 mL eingesetzt

**A. 3.3 Positionierung der Töpfe im Phytotron**



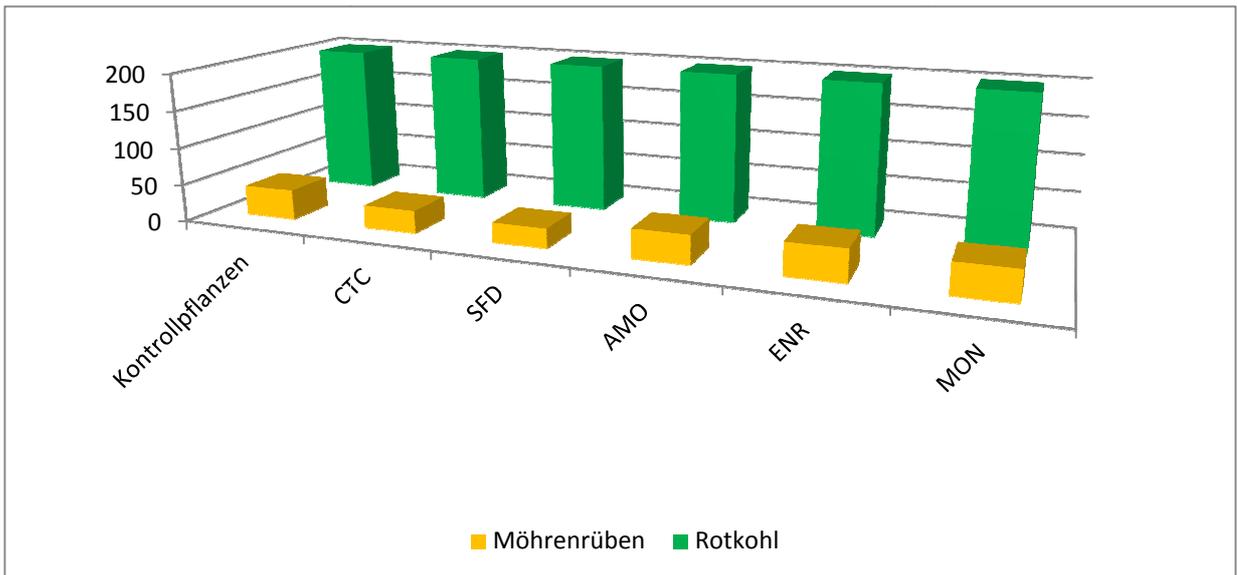
**A. 3.4 Geräteeinstellung des Phytotrons zur Anzucht von Rotkohl**

(Abkürzungserläuterung: rF=relative Feuchte, Best.=Bestrahlung)

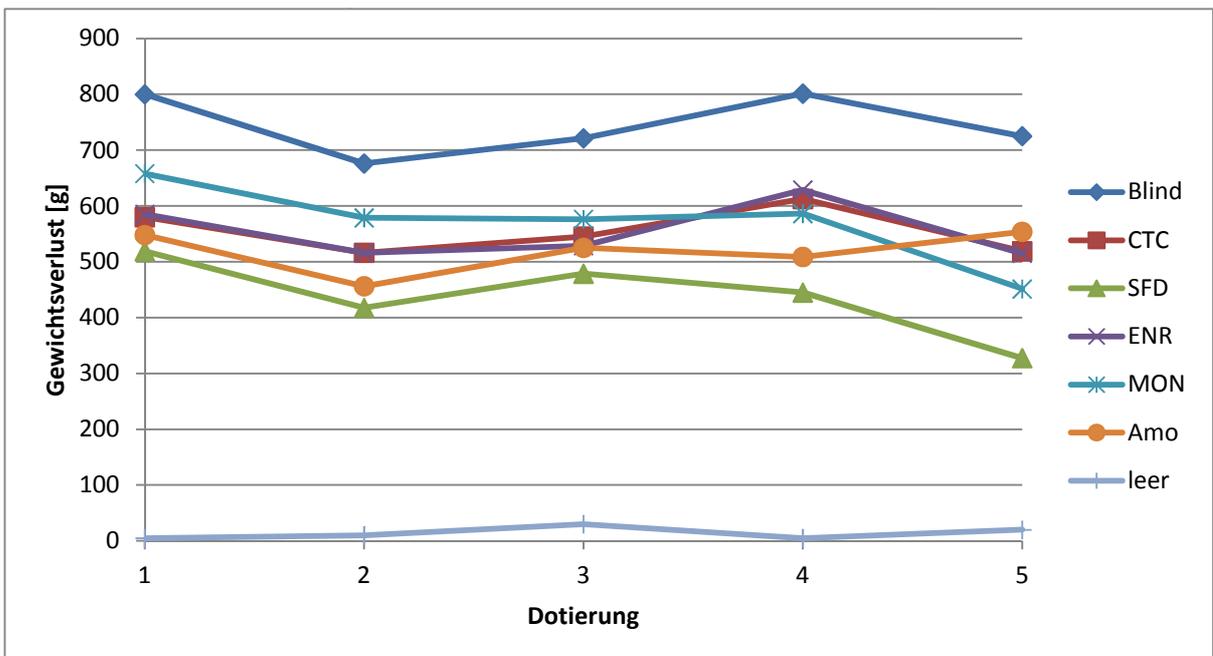
Schritt	Zeit (h)	Parameter (Sollwert)
00	0:01	16.0°C
01	0:01	55.0 % rF
02	0:01	0.0 % Best.
03	5:29	16.0°C
04	5:29	5.0 % rF
05	5:29	0.0 % Best.
06	5:30	18.0°C
07	5:30	55.0 % rF
08	5:30	40.0 % Best.
09	6:00	20.0°C
10	6:00	71 % rF

Schritt	Zeit (h)	Parameter (Sollwert)
11	6:00	88.0 % Best.
12	21:59	20.0°C
13	21:59	65.0 % rF
14	21:59	88.0 % Best.
15	22:00	18.0°C
16	22:00	55.0 % rF
17	22:00	40.0 % Best.
18	22:30	16.0°C
19	22:30	55.0 % r F
20	22:30	0.0 % Best.

**A. 3.5 Ermittelte Erntegewichte von Rotkohlblättern und Möhrenrüben (für Topf a)**



**A. 3.6 Durchschnittlicher Verbrauch an Nährlösung der Rotkohlhidrokultur, Topf a-d)**



**A. 3.7 Teil 1: Quantitative Ergebnisse der Analyse von Rotkohl (Hydrokultur: Topf a – b), 5 µmol/L Dotierung, Einwaagen Homogenat: 5 g (Blätter und Stängel), 3 g (Wurzel); Doppelbestimmung (N=2), Anzahl der Injektionen (n=3), Matrixkalibrierung; BJ: Blatt jung, BA: Blatt alt, S: Stängel, W: Wurzel; Ergebnisse in µg/kg, fett/kursiv: **mg/kg** FG-Homogenat**

Dotiert	Probe	TC	e-TC	AMO-MeOH-Addukt	AMO	AMA	Diketo	DMC	e-DMC	CTC	e-keto-CTC	e-enol-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	SFD	ENR	CIP	MON
AMO	RK-AMO-BA*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-AMO-BJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-AMO-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-AMO-W	-	-	<BG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC	RK-CTC-BA	<BG	<BG		-	-	-	-	-	157,6	<BG	<BG	57,6	<BG	-	-	-	-
	RK-CTC-BJ	<BG	<BG		-	-	-	-	-	102,2	<BG	<BG	71,7	<BG	-	-	-	-
	RK-CTC-S	12,9	-		-	-	-	-	-	154,0	52,7	164,2	30,9	<BG	-	-	-	-
	RK-CTC-W	<b>3,5</b>	<b>3,9</b>		-	-	-	340,2	175,7	<b>60,8</b>	<b>94,6</b>	<b>55,7</b>	<b>2,8</b>	<b>1,0</b>	-	-	-	-
CTC-Nachmess. am 14.10.09	RK-CTC-W**	-	-		-	-	-	-	-	28,8	17,5	10,3	1,8	224,5	-	-	-	-
	RK-CTC-W-neu***	-	-		-	-	-	-	-	27,8	18,4	11,5	2,0	206,0	-	-	-	-
ENR	RK-ENR-BA	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>6,0</b>	<BG	-
	RK-ENR-BJ	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>7,0</b>	<BG	-
	RK-ENR-S	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2,4</b>	42,7	-
	RK-ENR-W	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>14,6</b>	<BG	-
MON	RK-MON-BA	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-BJ	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-S	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-W	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1,58</b>
SFD	RK-MON-BA	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-MON-BJ	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-MON-S	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-MON-W	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Bezeichnung "RK-AMO-BA": Rotkohl-**Amoxicillin** - dotierte-Nährlösung-Topf a bis b - **Blatt alt**

\*\*Bezeichnung "RK-CTC-W": Rotkohl- **CTC**-dotierte Nährlösung-Topf a bis d- **Wurzel**

\*\*\*Bezeichnung "RK-CTC-W-neu": Rotkohl- **CTC**-dotierte Nährlösung-Topf a bis d- **Wurzel**- neu homogenisiert

**A. 3.7 Teil 2: Quantitative Ergebnisse der Analyse von Rotkohl** (Hydrokultur: Topf c – d), 2,5 µmol/L Dotierung, Einwaagen Homogenat: 5 g (Blätter und Stängel), 3 g (Wurzel); N=2, n=3, Matrixkalibrierung; BJ: Blatt jung, BA: Blatt alt, S: Stängel, W: Wurzel; Ergebnisse in µg/kg, fett/kursiv: **mg/kg** FG-Homogenat

Dotiert	Probe	TC	e-TC	DC	AMO-MeOH-Addukt	AMO	AMA	Diketo	DMC	CTC	e-keto-CTC	e-enol-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	SFD	ENR	CIP	MON
AMO	RK-AMO-BA*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-AMO-BJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-AMO-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-AMO-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC	RK-CTC-BA	<BG	<BG	-	-	-	-	-	-	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	-	-	-	-
	RK-CTC-BJ	<BG	<BG	-	-	-	-	-	-	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	-	-	-	-
	RK-CTC-S	<BG	-	48,0	-	-	-	-	-	41,4	5,3	94,4	6,7	-	-	-	-	-
	RK-CTC-W	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>	-	-	-	-	-	74,2	<b>19,0</b>	<b>36,1</b>	<b>19,8</b>	898,7	274,2	-	-	-	-
SFD	RK-SFD-BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-SFD-BJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-SFD-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-SFD-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENR	RK-ENR-BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2,4</b>	<BG	-
	RK-ENR-BJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>3,1</b>	<BG	-
	RK-ENR-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2,4</b>	32,0	-
	RK-ENR-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>14,4</b>	<BG	-
MON	RK-MON-BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-MON-BJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-MON-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG

\*Bezeichnung „RK-AMO-BA“: Rotkohl-Amoxicillin-dotierte-Nährlösung-Topf c bis d-Blatt alt

### A. 3.8 Vergleich der Antibiotikaaufnahme von Weißkohl (WK) und Rotkohl (RK) in Hydrokultur

(WK: Topf a, vierfache Dotierung (5 µmol/L); RK: Topf a-b, sechsfache Dotierung (5 µmol/L); Einwaagen Homogenat: 5 g (Blätter und Stängel), 3 g (Wurzel); N=2, n=3, Matrixkalibrierung; BJ: Blatt jung, BA: Blatt alt, S: Stängel, W: Wurzel; Ergebnisse in µg/kg, fett/kursiv: **mg/kg** FG-Homogenat)

Dotiert	Probe	Σ TC	Σ DC	Σ OTC	Σ DMC	Σ CTC	Σ ENR+CIP	SFD	MON
<b>CTC in WK</b>	WK-CTC-a-BA*	<BG	-	-	<BG	86,3	-	-	-
	WK-CTC-a-BJ	<BG	<BG	-	<BG	98,6	-	-	-
	WK-CTC-a-S	<BG	-	-	<BG	71,8	-	-	-
	WK-CTC-a-W	76,2	-	-	279,9	<b>9,5</b>	-	-	-
<b>CTC in RK</b>	RK-CTC-BA**	<BG	-	-	-	215,2	-	-	-
	RK-CTC-BJ	<BG	-	-	-	173,9	-	-	-
	RK-CTC-S	12,9	-	-	-	401,8	-	-	-
	RK-CTC-W	<b>7,4</b>	-	-	515,9	<b>214,9</b>	-	-	-
<b>SFD in WK</b>	WK-SFD-a-BA	-	-	-	-	-	-	33,8	-
	WK-SFD-a-BJ	-	-	-	-	-	-	<BG	-
	WK-SFD-a-S	-	-	-	-	-	-	<BG	-
	WK-SFD-a-W	-	-	-	-	-	-	147,4	-
<b>SFD in RK</b>	RK-SFD-BA	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-SFD-BJ	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-SFD-S	-	-	-	-	-	-	-	-
	RK-SFD-W	-	-	-	-	-	-	<BG	-
<b>MON in WK</b>	WK-MON-a-BA	-	-	-	-	-	-	-	158,9
	WK-MON-a-BJ	-	-	-	-	-	-	-	53,7
	WK-MON-a-S	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	WK-MON-a-W	-	-	-	-	-	-	-	567,2
<b>MON in RK</b>	RK-MON-a-BA	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-a-BJ	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-a-S	-	-	-	-	-	-	-	<BG
	RK-MON-a-W	-	-	-	-	-	-	-	<b>1,58</b>
<b>ENR in WK</b>	WK-ENR-a-BA	-	-	-	-	-	<b>7,2</b>	33,8	-
	WK-ENR-a-BJ	-	-	-	-	-	<b>6,0</b>	<BG	-
	WK-ENR-a-S	-	-	-	-	-	<b>2,5</b>	<BG	-
	WK-ENR-a-W	-	-	-	-	-	<b>12,1</b>	147,4	-
<b>ENR in RK</b>	RK-ENR-BA	-	-	-	-	-	<b>6,0</b>	-	-
	RK-ENR-BJ	-	-	-	-	-	<b>7,0</b>	-	-
	RK-ENR-S	-	-	-	-	-	<b>2,4</b>	-	-
	RK-ENR-W	-	-	-	-	-	<b>14,6</b>	<BG	-

\*Bezeichnung „WK-CTC-a-BA“: Weißkohl-Chlortetracyclin-dotierte-Nährlösung-Topf a-Blatt alt

\*\*Bezeichnung „RK-CTC-BA“ : Rotkohl-Chlortetracyclin-dotierte-Nährlösung-Topf a bis b-Blatt alt

### **A. 3.9 Dotierlösungen für die Hydrokulturversuche**

#### *Amoxicillin (AMO) – Stammlösung:*

Es werden 0,3356 g Amoxicillin-Trihydrat in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit Methanol bis zur Messmarke aufgefüllt. Die AMO-Konzentration der Stammlösung beträgt 3,3556 g/L.

#### *Chlortetracyclin (CTC) – Stammlösung:*

Es werden 0,4123 g Chlortetracyclin-Hydrochlorid in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit bidest. Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Die CTC-Konzentration der Stammlösung beträgt 4,1127 g/L.

#### *Sulfadiazin (SFD) – Stammlösung:*

Es werden 0,2086 g Sulfadiazin in einem 250 mL Messkolben eingewogen. Zum Lösen werden 150 mL Methanol dazugegeben und der Messkolben ins Ultraschallbad gestellt (10 min.). Anschließend wird mit destilliertem Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Die SFD-Konzentration der Stammlösung beträgt 0,8384 g/L.

#### *Enrofloxacin (ENR) – Stammlösung:*

Es werden 0,2246 g Enrofloxacin in einem 250 mL Messkolben eingewogen. Zum Lösen werden 50 mL Methanol dazugegeben und der Messkolben ins Ultraschallbad gestellt (10 min.). Anschließend wird mit destilliertem Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Die ENR-Konzentration der Stammlösung beträgt 0,8984 g/L.

#### *Monensin (MON) – Stammlösung:*

Es werden 0,5543 g Monensin-Natriumsalz in einem 100 mL Messkolben eingewogen und anschließend wird mit Methanol bis zur Messmarke aufgefüllt. Die MON-Konzentration der Lösung beträgt 5,5428 g/L.

**A.4 Hydrokulturexperimente mit Möhren (Fotos: F. Chowdhury)**

**A. 4.1 Dotierungsexperimente mit Möhren (1)**

			
<p>4.1 a) Möhrensamen der Sorte Bolero wurden in Vermiculit gesät und im Phytotron angezchtet</p>	<p>4.1 b) Samen wurden in einem Abstand von 1 cm gesät</p>	<p>4.1 c) Die jungen Möhrenpflanzen wachsen heran</p>	<p>4.1 d) Die einzelnen Pflänzchen wurden aus dem Blumenkästen genommen und in Töpfe umgepflanzt, damit sie mehr Platz zum Wachsen haben.</p>
			
<p>4.1 e) Die einzelnen Pflanzen wurden isoliert und von anhaftender Vermiculit befreit</p>	<p>4.1 f) Möhrenwachstum zum Zeitpunkt des Umpflanzens</p>	<p>4.1 g) Mit Hilfe eines Stativringes, an dem die einzelnen Pflänzchen mit Tesafilm befestigt sind, erfolgt die Umpflanzung</p>	<p>4.1 h) Vermiculit wird hinzugegeben</p>
			
<p>4.1 i) Der Stativring wird entfernt</p>	<p>4.1 j) Die einzelnen Pflänzchen werden an Holzstäben für einen besseren Halt befestigt</p>	<p>4.1 k) Die bepflanzten Töpfe werden in das Phytotron gestellt</p>	<p>4.1 m) Wachstumsstadium der Möhrenpflanzen 50 Tage nach Säen (vor Umsetzung auf Hydrokultur)</p>
			
<p>4.1 n) Isolierung der Möhren und Abwaschen des Vermiculites</p>	<p>4.1 o) Vermiculit befreite Pflanzen werden ausgemessen</p>	<p>4.1 p) Mittlerweile sind die Rüben der Pflanzen ca. 10 cm lang</p>	<p>4.1 q) Die Möhrenpflanzen werden nun auf Hydrokultur gesetzt</p>

### A. 4.1 Dotierungsexperimente mit Möhren (2)

			
4.1 r) Viele Pflanzen sind nach Umsetzung ein-gegangen	4.1 s) Eingegangene Pflanzen werden verworfen und neue Pflanzen erneut auf Hydrokultur gesetzt	4.1 t) Weitere Anzucht im Phytotron	4.1 u) Erntereife Kontrollpflanzen
			
4.1 v) Effekt der SFD-Dotierung: Wurzeln sind bräunlich verfärbt und verschleimt (s. rechts; Kontrollpflanze links)	4.1 w) Möhrenpflanzen werden bei der Ernte in drei Bestandteile separiert: Blätter, Wurzeln und Rüben	4.1 x) Zerkleinerte Pflanzenteile werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C tiefgekühlt	4.1 y) Analyse mittels LC-MS/MS an der Universität Paderborn

### A. 4.2 Zusammensetzung der Hoaglandlösung für die Möhrenhydrokulturen (1)

Lösung	Substanzen	Einwaagen	Volumen
Hoagland 1			In 2 L gelöst
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	49,30 g	davon 450 mL eingesetzt
	KNO <sub>3</sub>	103,13 g	
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	46,01 g	
Hoagland 2			In 2 L gelöst
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	104,51 g	davon 225 mL eingesetzt
Hoagland 3			In 2 L gelöst
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	188,92 g	davon 450 mL eingesetzt
Hoagland 4			In 2 L gelöst
	Fe-EDTA	42,11 g	davon 90 mL eingesetzt
Hoagland 5			In 1 L gelöst
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g	davon 90 mL eingesetzt
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,80 g	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,26 g	

### A. 4.2 Fortsetzung: Zusammensetzung der Hoaglandlösung für die Möhrenhydrokulturen (2)

	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,08 g	
	$\text{CoCl}_2$	0,01 g	
	$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g	
Hoagland 6			In 1 L gelöst
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,24 g	davon 90 mL eingesetzt
Hoagland 7	$\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_7$	ca. 5,0 g	In 1 L gelöst, davon 90 mL

### A. 4.3 Geräteeinstellung des Phytotrons zur Anzucht von Möhren

Schritt	Zeit (h)	Parameter (Sollwert)
00	0:01	16.0°C
01	0:01	60.0%rF
02	0:01	0.0% Best.
03	5:29	16.0°C
04	5:29	60.0%rF
05	5:29	0.0%Best.
06	5:30	18.0°C
07	5:30	65.0%rF
08	5:30	40.0%Best.
09	6:00	20.0°C
10	6:00	75.0%rF

Schritt	Zeit (h)	Parameter (Sollwert)
11	6:00	88.0%Best.
12	21:59	20.0°C
13	21:59	75.0%rF
14	21:59	88.0%Best.
15	22:00	18.0°C
16	22:00	70.0%rF
17	22:00	40.0%Best.
18	22:30	16.0°C
19	22:30	60.0%rF
20	22:30	0.0%Best.

(Abkürzung: rF=relative Feuchte, Best.=Bestrahlung)

**A. 4.4 Maße der Möhren vor Umsetzung auf Hydrokultur (54 Tage nach der Aussaat)**

	Blätter		Rüben mit Wurzeln	Rüben			Wurzeln
	Länge [cm]	Gewicht [g]	Gesamtlänge [cm]	Länge [cm]	Gewicht [g]	Durchmesser [cm]	Gewicht [g]
1	45	9,9	37	10	14,9	3,0	1,95
2	43,5	16,0	49	8	25,8	3,0	13,0
3	43	14,3	35	12	31,3	2,5	3,6
4	45	17,3	34	12	27,6	3,0	3,7
5	43	12,2	46	11	24,0	2,5-3	5,0
6	44	16,5	38	11	27,9	2,5-3	3,1
7	40	13,9	34	10	23,4	2,5	2,9
8	45	16,2	30	13	15,9	2,0	4,1

**A. 4.5 Anzuchtbedingungen von Möhren und Rotkohl in Hydrokultur**

Pflanze	Wachstumstage	Dotierungsanzahl	Dotierungsdatum
Möhre	Von der Keimung (10.06.09) bis zur Ernte (25.09.09): 108 Tage	5	15.09.09
			17.09.09
			19.09.09
			21.09.09
			23.09.09
Rotkohl	Von der Keimung (18.03.2009) bis zur Ernte (10.05.2009): 54 Tage	5	30.04.09
			02.05.09
			04.05.09
			06.05.09
			08.05.09

### A. 4.6 Ergebnisse der Analyse von Möhren (Hydrokultur: Topf a – d),

5 µmol/L Dotierung, Einwaagen Homogenat: 5 g (Blätter und Rübe), 3 g (Wurzel); N=2, n=3, Matrixkalibrierung; B: Blatt, R: Rübe, W: Wurzel; Ergebnisse in µg/kg, fett/kursiv: **mg/kg** FG-Homogenat

Dotiert	Probe	TC	e-TC	AMO	AMA	Diketo	AMO-MeOH-Addukt	OTC	DMC	e-DMC	CTC	e-keto-CTC	e-enol-CTC	iso-CTC	e-iso-CTC	SFD	ENR	CIP	MON
AMO	M-AMO-B*	-	-	-	-	-	<BG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M-AMO-R	-	-	-	-	-	<BG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M-AMO-W	-	-	-	<BG	<BG	<b>2,2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC	M-CTC-B	<BG	17	-	-	-	-	36	-	-	<BG	<BG	17	<BG	18	-	-	-	-
	M-CTC-R	120	240	-	-	-	-	-	50	<BG	<b>1,65</b>	<b>2,6</b>	<b>1,7</b>	280	40	-	-	-	-
	M-CTC-W	<b>3,6</b>	<b>6,2</b>	-	-	-	-	-	250	160	<b>29,2</b>	<b>25,3</b>	<b>16,0</b>	<b>5,87</b>	<b>0,51</b>	-	-	-	-
SFD	M-SFD-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M-SFD-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG	-	-	-
	M-SFD-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<BG	-	-	-
ENR	M-ENR-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2,5</b>	<BG	-
	M-ENR-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>4,1</b>	60	-
	M-ENR-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>72,8</b>	<b>0,58</b>	-
MON	M-MON-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
	M-MON-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	260
	M-MON-W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>4,3</b>

\*Bezeichnung "M-AMO-B": Möhre-Amoxicillin-dotierte-Nährlösung-Topf a bis d-Blatt

## A. 5 Antibiotikaaufnahme in Rotkohl unter Feldbedingungen

### A. 5.1 Prüfbericht der Bodenergebnisse der LUFA NRW (1)



**Referat 32  
Pflanzenschutzdienst**

Siebenbergstr. 200, 53229 Bonn  
**Web** [www.pflanzenschutzdienst.de](http://www.pflanzenschutzdienst.de)

Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Postfach 30 08 64, 53188 Bonn

GBZ Straelen / Köln-Auweiler  
Herrn Björn Pieper  
Gartenstraße 11  
  
50765 Köln-Auweiler

Auskunft erteilt Johannes Keßler  
Durchwahl 0228/703-2180  
Mobil 0172/2948021  
Fax 0228/7032102  
Mail [johannes.kessler@lwk.nrw.de](mailto:johannes.kessler@lwk.nrw.de)

**Bericht-Nr. 10-001418**  
Bonn 13.08.2010

## Untersuchungsbefund

Seite 1 / 1

Auftraggeber: GBZ Straelen / Köln-Auweiler, Gartenstraße 11, 50765 Köln-Auweiler, Tel.: 0221/5340-241  
Probenahme: In Eigenverantwortung des Auftraggebers

**Prüfbereich: Gemüsebau**  
**Eingang: 09.08.2010**

Sehr geehrter Herr Pieper,

die drei eingesandten Bodenproben (Rotkohl) wiesen alle Befall mit Nematoden auf. Die Anzahl der gefundenen Nematoden dürfte sich bei Probe 2 und 3 in der Gesamtheit am Anfang der Schadschwellenüberschreitung befinden. Bei Probe 1 und 2 ist besonders die Anzahl der gefundenen Stängelälchen (*Ditylenchus* sp.) als kritisch anzusehen.

Die Anzahl der einzelnen gefundenen Nematoden bitte ich dem beiliegenden Laborbericht zu entnehmen.

Sollten Sie weitere Fragen haben, stehe ich Ihnen gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag  
gez. J. Keßler

Der Untersuchungsbefund wurde elektronisch erstellt und ist ohne Unterschrift rechtsgültig.  
Das Prüfergebnis im Anhang bezieht sich ausschließlich auf den angegebenen Prüfgegenstand. Eine auszugsweise Vervielfältigung des Untersuchungsbefundes bedarf der schriftlichen Genehmigung der Prüfeinrichtung.  
Diese Prüfeinrichtung ist zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2000.

---

**Konten der Hauptkasse der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen:**

WGZ-Bank Münster	BLZ 400 600 00	Konto-Nr. 403 213	IBAN: DE97 4006 0000 0000 4032 13	BIC/SWIFT: GENO DE MS
Volksbank Bonn Rhein-Sieg eG	BLZ 380 601 86	Konto-Nr. 210 077 1015	IBAN: DE 27 3806 0186 2100 7710 15	BIC/SWIFT: GENO DE D1 BRS
Ust.-Id.-Nr. DE 126118293	Steuer-Nr. 337/5914/0780			

**A. 5.1 Prüfbericht der Bodenergebnisse der LUFA NRW (2)**

Bericht-Nr. 10-001418

Seite 1 / 1

**Prüfergebnisse der Fachlabore des Pflanzenschutzdienstes**

Proben-Nr.	10-005401	10-005402	10-005403
Ihre Probenbez.	Bodenprobe optisch gut	Bodenprobe optisch schlecht	Mischprobe der gesamten Fläche (Rotkohl)
Probenart	Boden	Boden	Boden
Kultur	Rotkohl	Rotkohl	Rotkohl
Sorte	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Probenzustand	geeignet	geeignet	geeignet
Artdifferenzierung Nematoden	Pratylenchus thornei Meloidogyne naasi	Meloidogyne naasi	Meloidogyne naasi
Nematoden im Boden [100 ml]	35 Pratylenchus spp. 25 Paratylenchus spp. 5 Tylenchorhynchus spp. 5 Rotylenchus spp. 20 Helicotylenchus spp. 15 Ditylenchus spp. 20 Meloidogyne spp.	70 Pratylenchus spp. 40 Paratylenchus spp. 10 Rotylenchus spp. 55 Helicotylenchus spp. 5 Ditylenchus spp. 5 Meloidogyne spp. 5 Heterodera spp. 5 Criconema spp. 15 Amplimerlinius spp.	70 Pratylenchus spp. 90 Paratylenchus spp. 10 Tylenchorhynchus spp. 5 Helicotylenchus spp. 5 Meloidogyne spp.

**Beurteilung der Prüfergebnisse**

- 10-005401 Zusätzlich wurde der Boden auf Zysten untersucht: 0 Zysten  
Hakl, 12.08.2010
- 10-005402 Zusätzlich wurde der Boden auf Zysten untersucht: 1 Zyste ohne lebenden Inhalt  
Hakl, 12.08.2010
- 10-005403 Zusätzlich wurde der Boden auf Zysten untersucht: 4 Zysten ohne lebenden Inhalt  
Hakl, 12.08.2010

## A. 5.2 Bericht über die Gülleanalyse der LUFA NRW

# LUFA NRW

Landwirtschaftskammer  
Nordrhein-Westfalen

Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Postfach 59 80, 48135 Münster

Gartenbauzentrum  
Köln Auweiler  
Herrn Martin Herbener  
Gartenstr. 11  
  
50765 Köln

**Prüfberichts-Nr.:** 10-030907  
KundenbetreuerIn: Tanja Iken  
Service-Telefon: 0251/2376-595  
Telefax: 0251/2376-702

## Prüfbericht

vom 31.05.2010

Seite 1 / 1

Auftraggeber: Gartenbauzentrum Köln Auweiler, Gartenstr. 11, 50765 Köln  
Probenahme: In Verantwortung des Auftraggebers Datum: 26.05.2010

**Probe-Nr.: 10-092009 Prüfgegenstand: Wirtschaftsdünger**

Eingang der Probe: 27.05.2010 Prüfbeginn: 27.05.2010 Prüfende: 31.05.2010

Fremde Kennung Schweinegülle

Kennzeichnung: Gülle-/ Mistart: sonstige Gülle

Prüfparameter	Einheit	Prüfergebnis		
		in Frisch- substanz	in Trocken- substanz	in kg/m <sup>3</sup>
Trockensubstanz	%	<b>3,2</b>		
Stickstoff (N) gesamt	%	<b>0,36</b>		<b>3,57</b>
Ammonium-N (NH <sub>4</sub> -N)	%	<b>0,23</b>		<b>2,34</b>
Phosphor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) gesamt	%	<b>0,24</b>		<b>2,43</b>
Kalium (K <sub>2</sub> O) gesamt	%	<b>0,20</b>		<b>1,98</b>
Magnesium (MgO) gesamt	%	<b>0,09</b>		<b>0,93</b>
Calcium (CaO) gesamt	%	<b>0,20</b>		<b>2,02</b>

**Prüfparameter/Prüfmethoden:**

Ammonium-N (NH<sub>4</sub>-N): DIN 38406 (E 5-1)

Calcium (CaO) gesamt, Kalium (K<sub>2</sub>O) gesamt, Magnesium (MgO) gesamt, Phosphor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) gesamt: DIN 38414-7; DIN EN ISO 11885

Stickstoff (N) gesamt: VDLUFA Bd. II.1, 3.5.2.7

Trockensubstanz: VDLUFA Bd. II.1, 11.5.1

i. A. Dipl.-Chem. Dr. M. Müller  
(Laborleiter)

## A. 5.3 BBCH-Skala nach [338]

**Blattgemüse (kopfbildend)** Feller et al., 1995 a**BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien von Blattgemüse (kopfbildend)**

Code	Beschreibung
<b>Makrostadium 6: Blüte (Hauptspross)</b>	
60	Vereinzelte erste Blüten offen
61	Beginn der Blüte: 10% der Blüten offen
62	20% der Blüten offen
63	30% der Blüten offen
64	40% der Blüten offen
65	Vollblüte: 50% der Blüten offen
67	Abgehende Blüte: 70% der Blüten verblüht
69	Ende der Blüte
<b>Makrostadium 7: Fruchtentwicklung</b>	
71	Erste Früchte ausgebildet
72	20% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
73	30% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
74	40% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
75	50% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
76	60% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
77	70% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
78	80% der Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
79	Früchte haben artspezifische Grösse erreicht
<b>Makrostadium 8: Frucht- und Samenreife</b>	
81	Beginn der Reife: 10% der Früchte ausgereift bzw. 10% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
82	20% der Früchte ausgereift bzw. 20% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
83	30% der Früchte ausgereift bzw. 30% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
84	40% der Früchte ausgereift bzw. 40% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
85	50% der Früchte ausgereift bzw. 50% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
86	60% der Früchte ausgereift bzw. 60% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
87	70% der Früchte ausgereift bzw. 70% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
88	80% der Früchte ausgereift bzw. 80% der Samen art-/sortentypisch gefärbt, trocken und hart
89	Vollreife: Samen an der gesamten Pflanze art-/sortentypisch ausgefärbt und hart
<b>Makrostadium 9: Absterben</b>	
92	Beginn der Blatt- und Triebverfärbung
95	50% der Blätter und Stengel vergilbt bzw. abgestorben
97	Pflanze abgestorben
99	Erntegut (Samen)

## A. 5.4 Anbau und Sortenhinweise für den Rotkohlanbau (Rheinland-Pfalz 2010)

Anbau- und Sortenhinweise für den Gemüseanbau in Rheinland-Pfalz

Bearbeiter: J.Schlaghecken

### **Rotkohl Frischmarkt, Lagerung, Industrie:** Anbau- und Sortenhinweise 2010, (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *capitata rubra*)

Anzucht und Pflanzung					Empfohlene Sorten							
End-standort	Anzucht			Pflanzdatum	schnelle		mittelschnelle		langsame		sehr langsame	
	Saat-Datum	Wie	Tage		Red Jewel		Integro, Nurima, Primero Redima, Reball		Anosa, Buscaro, Huzaro, Rebecca, Rodeo, Rodima, Rodon, Rovita		Lectro, Reguma, Regilus, Roxy Subaro, Zelox	
					Tage	Erntebeginn	Tage	Erntebeginn	Tage	Erntebeginn	Tage	Erntebeginn
Folie	15.01.	ET	60	15.03.	75	01.06.	95	20.06.				
Folie	27.02.	ET	33	01.04.	75	15.06.	90	01.07.				
Freiland	16.03.	ET	31	15.04.	75	01.07.	85	10.07.	120	15.08.		
Freiland	01.04.	ET	30	01.05.	70	10.07.	80	20.07.	120	01.09.	135	15.09.
Freiland	15.04.	ET	30	15.05.			80	05.08.	120	15.09.	140	05.10.
Freiland	01.05.	ET	30	01.06.					130	10.10.	140	20.10.
Freiland	15.05.	ET	30	15.06.					130	25.10.		
Saatgutangebot:		Normal, Erdtopfpille, Saatplatte, Präzisionsaatgut, inkrustiert, insektizidbehandelt, kalibriert 1,50-1,75 mm, 1,75-2,00 mm, 2,00-2,25 mm										
Saatgut:		TKG = 3 - 5 g, 1 g = 200-350 Korn, Mindestkeimfähigkeit 70 %, 3 - 4 Jahre keimfähig										
Anzucht/Topfpflanzen		z.B. Erdtöpfen, Speedis oder andere Pflanzsysteme sind heute Standard. Jungpflanzen, produziert in modernen Anzuchtssystemen, lassen sich mit zahlreichen neuen halb- und vollautomatischen Pflanzmaschinen setzen.										
Jungpflanzenlagerung:		Bis zu 2 Wochen bei + 2° C, die Pflanzen sollten über 5 g schwer sein										
Fruchtwechsel:		Möglichst innerhalb von 3 Jahren nur einmal ein Kreuzblütleranbau. Die Adernschwärze ( <i>Xanthomonas campestris</i> ) und die Kohlhernie sind anders kaum fernzuhalten.										
Erntebeginn (*)		Gilt in den einzelnen Gruppen für die Sorten										
Adernschwärze:		<i>Xanthomonas campestris</i> ist saatgutübertragbar, verlangen Sie von Ihrem Saatgutlieferanten freies Saatgut										
Bestandesdichte:		Siehe Pflanzabstände und Kopfgewichte in der Sortenbeschreibung										
Schosserprobleme:		Kritische Anzuchtzeit von Januar bis März, kritischer Wachstumszustand ab 4 Blätter (ca. 4 - 8 Wochen nach der Saat) Temperaturen von 0 - 12°C lösen das Schossen aus, Sorten mit langsamer Entwicklung sind gefährdeter als schnelle Sorten.										
Anzuchttemperaturen:		1. bis 4. Woche tags > 10°C, nachts > 3°C 5. bis 8. Woche tags > 14°C, nachts > 3°C bei viel Licht können die kritischen Wirkungen niedriger Nachttemperaturen durch hohe Tagestemperaturen aufgehoben werden. Lüftung auf 20-25 ° C einstellen										

**Rotkohl Frischmarkt, Lagerung, Industrie: Sortenbeschreibung 2010 (1)**

Sorten	Züchter/ Lieferant/ Ökosaatgut	Empfehlung/ Pflanzung	Pflanzung bis Ernte Tage	Pflanzabstände und Kopfgewichte				Platz- Festigkeit (1-9) 9= s. hoch	Eignung		Lagereignung, Lagerdauer in Wochen	
				normal	kg	eng	kg		Frischmarkt	Industrie		
<b>Haupt-Sorten:</b>												
Anoxa	F 1	RS/Se/--	April - Juni	125	65 x 60	3,0 - 5,0	-	-	9	Fr	In	10
Buscaro	F 1	Be/Be/Ö	April - Juni	110	65 x 45	3,0 - 5,0	-	-	8	Fr	In	-
Huzaro	F 1	Be/Be/--	April - Juni	125	-	-	50 x 30	1,5 - 2,0	7	Fr	-	18
Integro	F 1	Be/Be/Ö	März - A. Juli	95	-	-	40 x 40	1,0 - 2,0	9	Fr	-	-
Lectro	F 1	Be/Be/--	April - Juni	140	65 x 40	3,0 - 4,0	-	1,5 - 2,0	9	Fr	-	18
Nurima	CMS	RZ/RZ/CU	März - April	80	50 x 50	1,5 - 2,0	35 x 35	0,5 - 1,0	7	Fr	-	-
Primero	F 1	Be/Be/--	März - April	80	-	-	50 x 35	1,0 - 1,5	7	Fr	-	-
Reball	F 1	SG/SG/--	März bis Juli	90	-	-	40 x 50	1,5 - 2,5	9	Fr	-	-
Rebecca	CMS	SG/SG/--	April - Mai	120	65 x 50	1,5 - 3,0	50 x 35	1,0 - 1,5	9	Fr	-	15
Redna	F 1	RZ/RZ/--	März - Juli	90	65 x 50	3,0 - 4,0	50 x 40	1,0 - 2,0	9	Fr	-	-
Reguma	F 1	RZ/RZ/--	April - M. Mai	140	65 x 45	2,0 - 3,0	50 x 40	1,0 - 2,0	9	Fr	-	28
Rodeo	F 1	NZ/NZ/--	April - Juni	100	65 x 40	1,0 - 2,5	50 x 35	1,0 - 1,5	9	Fr	-	-
Rodima	F 1	RZ/RZ/--	April - Juni	130	65 x 50	3,0 - 4,0	50 x 40	1,0 - 2,0	9	Fr	-	25
Rodon	F 1	NZ/NZ/--	April - Juni	130	65 x 50	3,0 - 5,0	50 x 30	1,5 - 2,0	7	Fr	In	15
Rovite	F 1	NZ/NZ/--	April - Mai	115	65 x 50	4,0 - 6,0	-	-	9	-	In	-
Roxy	F 1	RS/Se/--	April - M. Mai	140	65 x 50	2,0 - 3,0	40 x 40	1,0 - 2,0	9	Fr	-	20
Subaro	F 1	Be/Be/Ö	Mai	135	65 x 40	2,0 - 5,0	50 x 30	1,5 - 2,0	9	Fr	-	28
Zelox	F 1	RS/Se/--	April - Mai	135	65 x 50	3,0 - 4,0	65 x 35	1,0 - 2,0	9	Fr	In	20

### A. 5.5 Chromatogramme der Gülleproben

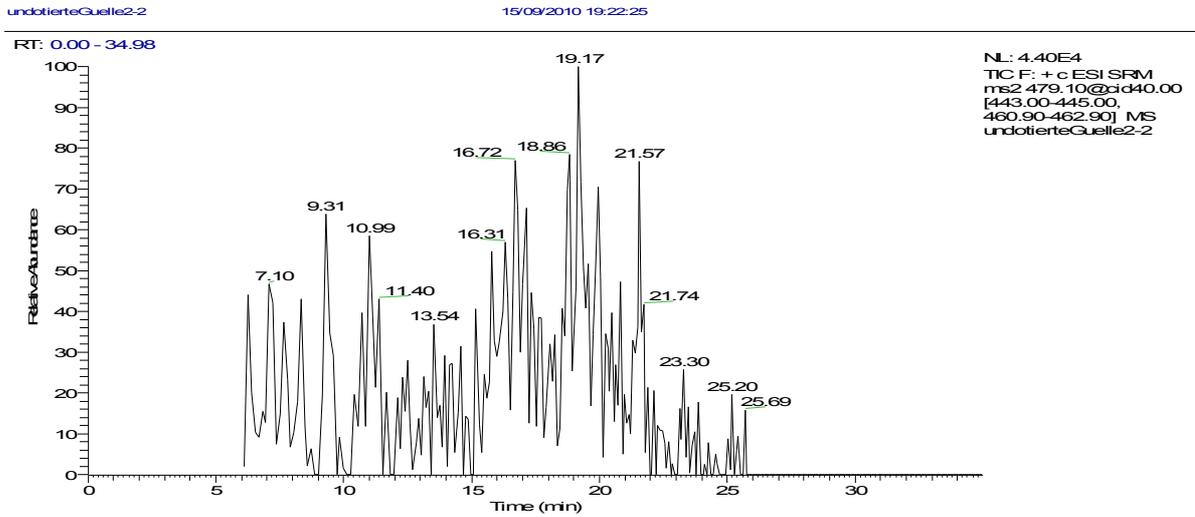


Abb. A. 5.5.1 Massenchromatogramm von CTC in undotierter Gülle, Kontrollprobe; LC-MS/MS, SRM-Modus

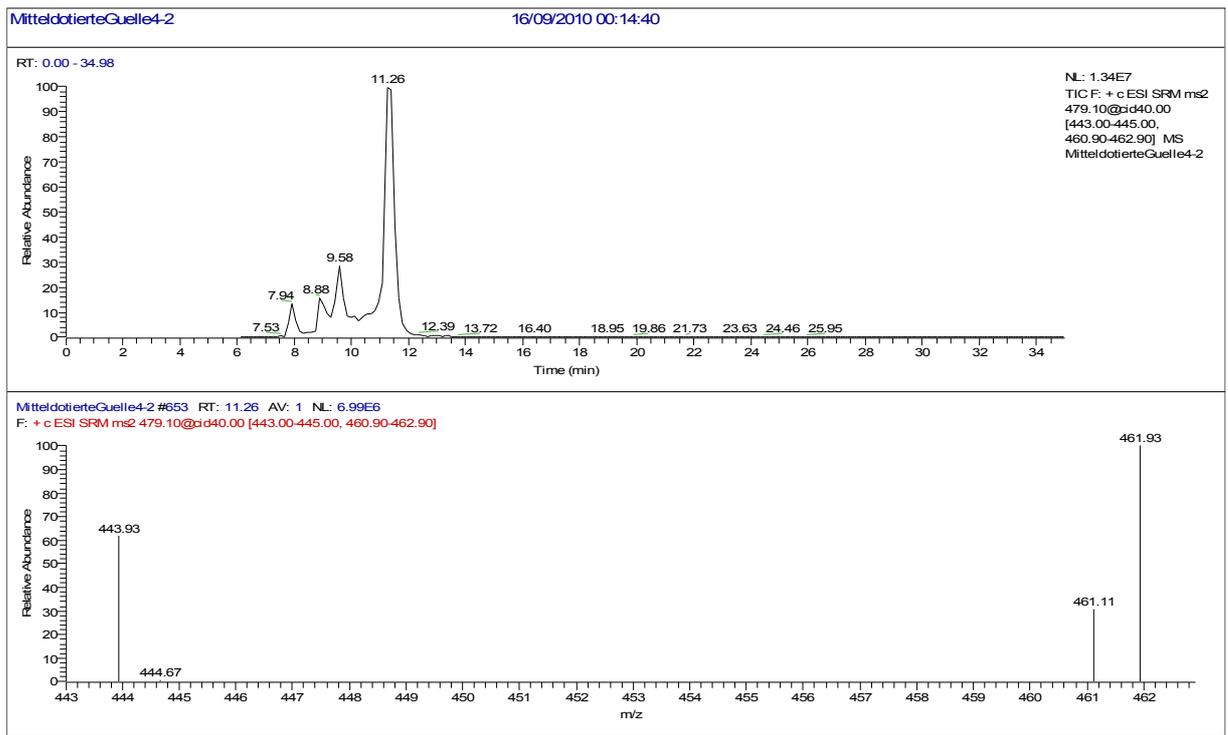
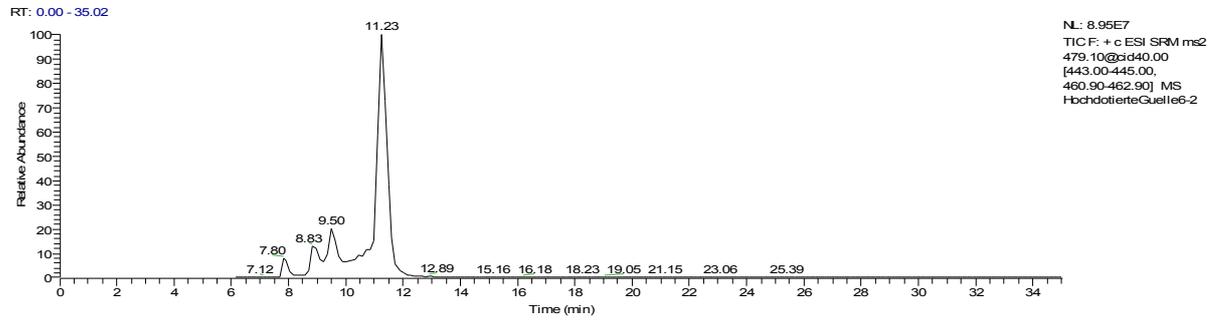


Abb. A. 5.5.2 Massenchromatogramm von CTC und Metabolite und Fragmentspektrum von CTC in dotierter Gülle [ $\beta=50$  mg/kg], ( $t_R=11,26$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

HochdotierteQuelle6-2

16/09/2010 05:07:17



HochdotierteQuelle6-2 #661 RT: 11.23 AV: 1 NL: 4.96E7  
F: + c ESI SRM ms2 479.10@d440.00 [443.00-445.00, 460.90-462.90]

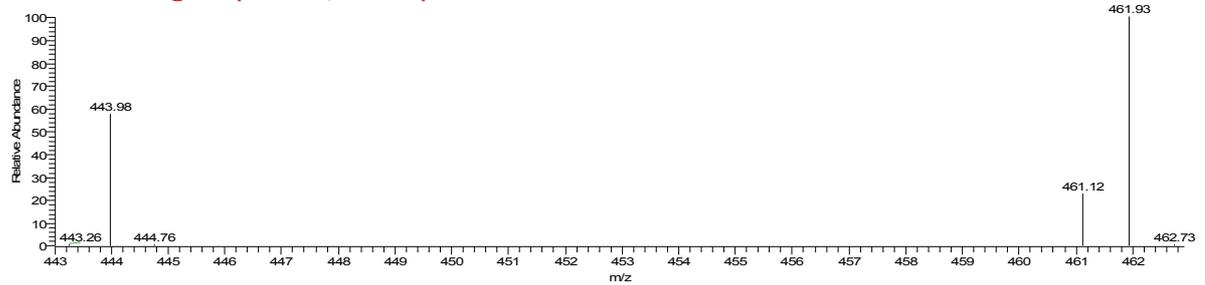
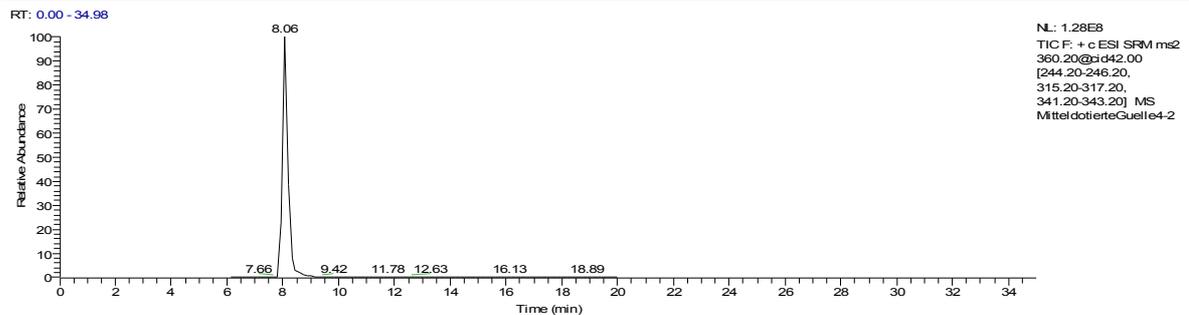


Abb. A. 5.5.3 Massenchromatogramm von CTC und Metabolite und Fragmentspektrum von CTC in dotierter Gülle [ $\beta=150$  mg/kg], ( $t_R=11,23$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

MitteldotierteQuelle4-2

16/09/2010 00:14:40



MitteldotierteQuelle4-2 #468 RT: 8.06 AV: 1 NL: 1.17E8  
F: + c ESI SRM ms2 360.20@d42.00 [244.20-246.20, 315.20-317.20, 341.20-343.20]

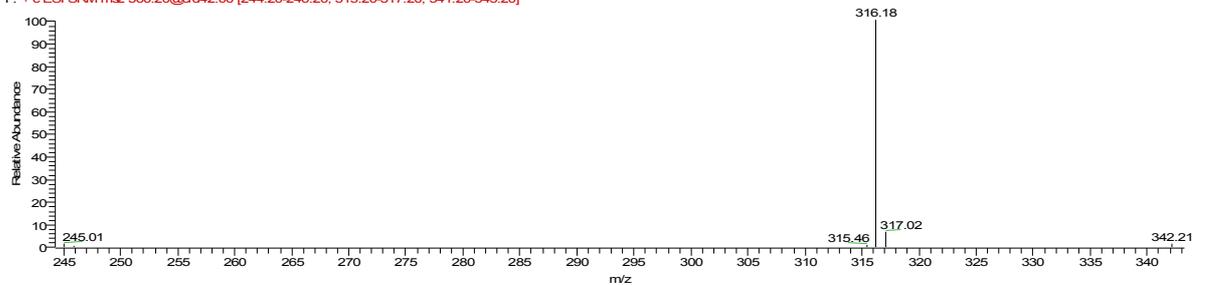
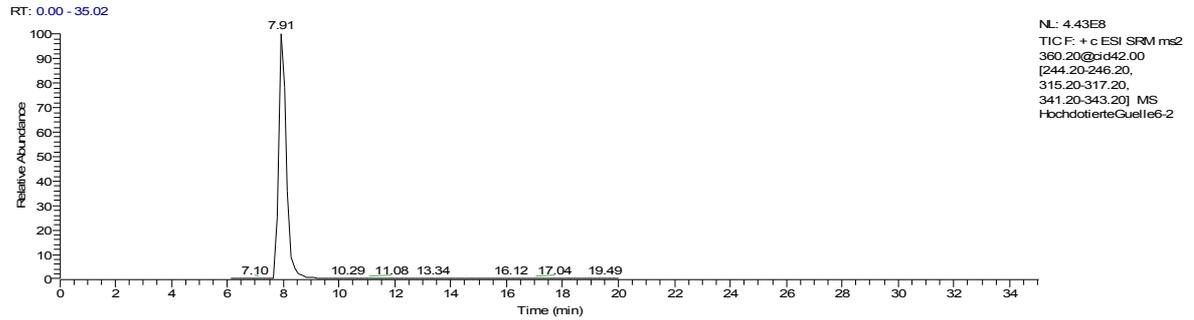


Abb. A. 5.5.4 Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von ENR in dotierter Gülle [ $\beta=50$  mg/kg], ( $t_R=8,06$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

HochdotierteQuelle6-2

16/09/2010 05:07:17



HochdotierteQuelle6-2 #460 RT: 7.91 AV: 1 NL: 4.14E8  
 F: + c ESI SRM ms2 360.20@d42.00 [244.20-246.20, 315.20-317.20, 341.20-343.20]

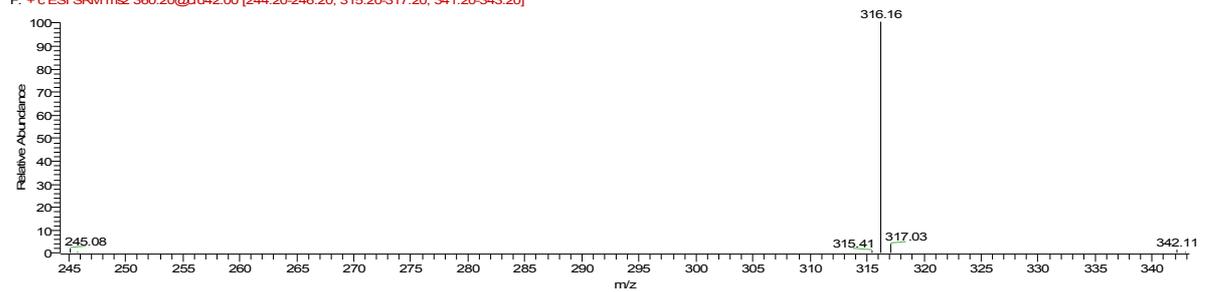
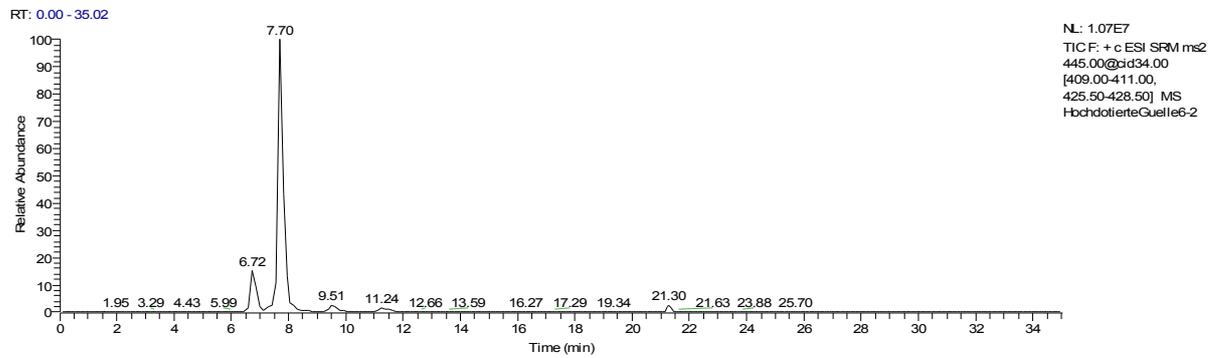


Abb. A. 5.5.5 Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von ENR in dotierter Gülle [ $\beta=150$  mg/kg], ( $t_R=7,91$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

HochdotierteQuelle6-2

16/09/2010 05:07:17



HochdotierteQuelle6-2 #446 RT: 7.70 AV: 1 NL: 8.14E6  
 F: + c ESI SRM ms2 445.00@d34.00 [409.00-411.00, 425.50-428.50]

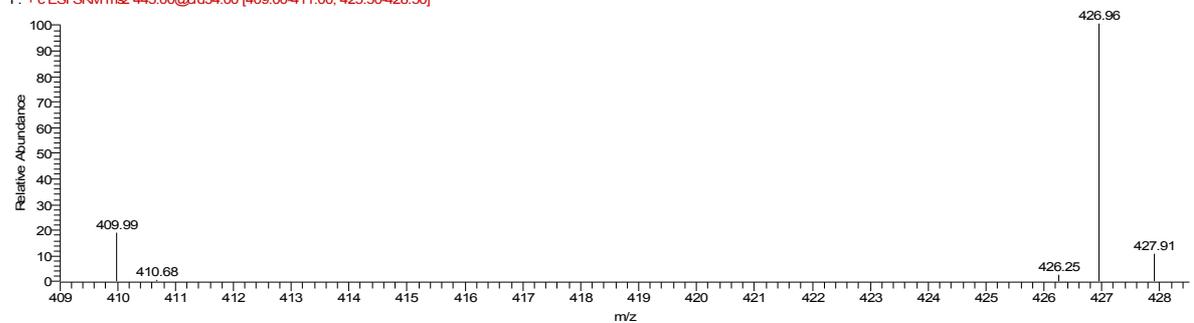


Abb. A. 5.5.6 Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von TC (als Umwandlungsprodukt von CTC) in dotierter Gülle [ $\beta=50$  mg/kg], ( $t_R=7,7$  min), LC-MS/MS, SRM-Modus

MitteldotierteQuelle4-2

16/09/2010 00:14:40

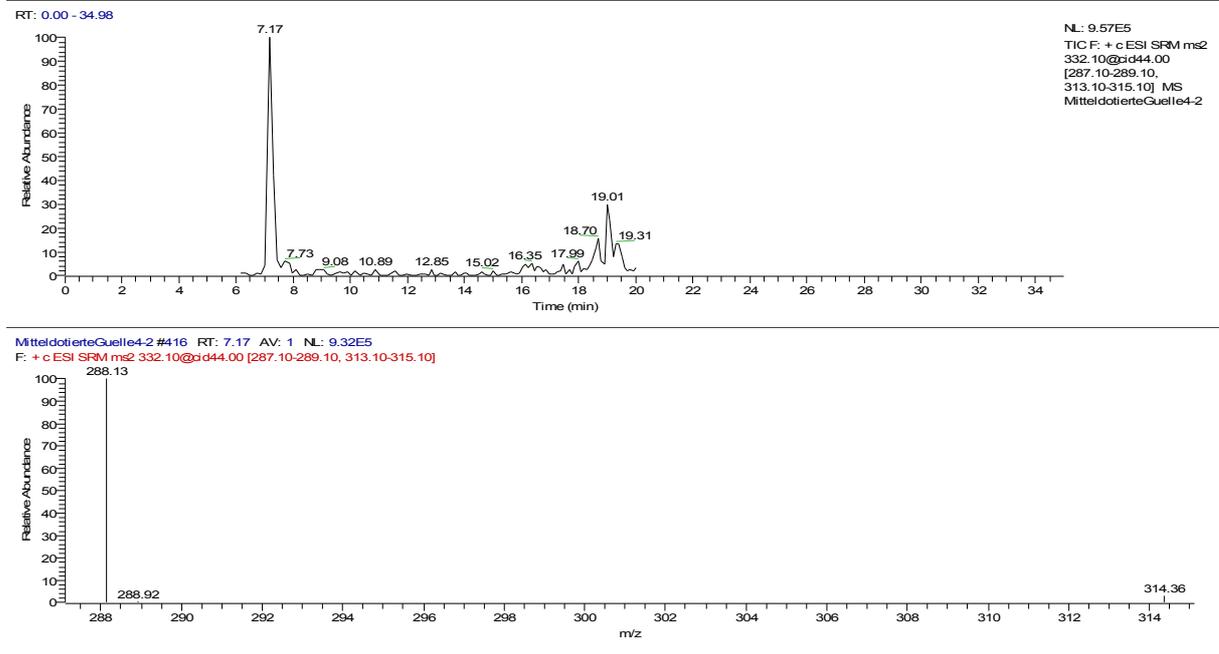


Abb. A. 5.5.7 Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von CIP (als Umwandlungsprodukt von ENR) in dotierter Gülle [ $\beta$ =50 mg/kg], ( $t_R$ =7,17 min), LC-MS/MS, SRM-Modus

#### A. 5.6 Probenaufbereitung für die Bodenanalysen nach Stevens (Arbeitskreis interner Untersuchungsbericht „Rückstandsanalyse von Chlortetracyclin und Enrofloxacin in Bodenproben“)

##### *NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl/EDTA-Extraktionsmethode für die Bestimmung von Chlortetracycline*

Eine Analysemethode zur Bestimmung von Chlortetracyclin im Boden war im Rahmen eines Vorgangerprojekts „Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente“ entwickelt worden. Diese basiert auf einer fest/fussig Extraktion mit einem NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl/EDTA-Puffer, einer anschließenden Festphasenextraktion (SPE) zur Aufkonzentrierung der Analyte und einer LC-MS/MS-Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung der Analyte. Durch die alkalischen Bedingung (pH=10) bei der Extraktion mit NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl/EDTA-Puffer wurde im Boden vorhandenes CTC und e-CTC in die Isomere iso-CTC und e-iso-CTC umgewandelt, sodass eine Summenbestimmung von CTC als Summe aus iso-CTC und e-iso-CTC möglich war. Der Zusatz von EDTA sollte dabei die Bildung von Metall-CTC-Komplexen unterdrücken, da sofern das Metallkation fest an die Bodenmatrix gebunden ist auch die Extrahierbarkeit von CTC erniedrigt wird. Mittels dieser Methode wurden Bodenproben

aus der Region Soest untersucht. Bei diesem Boden handelte es sich laut bodenkundlichen Gutachten um die Bodenartengruppe sL/uL (Schluffanteil ca. 70%), also einem sandigen, schluffigen Lehmboden. Der für die Untersuchung maßgebliche Bodenhorizont ( $A_p$ , 0-30cm) wurde als „mittel toniger Schluff“ bezeichnet, was einem Bodentyp Ut3 (12-17% Ton, 65-88% Schluff, 0-23% Sand; genaue Korngrößenverteilung geht aus dem Gutachten nicht hervor) entspricht. Der pH-Wert ( $CaCl_2$ ) des Bodens aus der Region Soest betrug 6,5-7,0. Bei dem Boden aus der Region Köln handelte es sich laut Gutachten um einen sandigen, schluffigen Lehmboden, also ebenfalls einen Boden der Bodenartengruppe sL/uL. Nach bodenkundlichen Gutachten bestand der Feinboden aus 18,1% Ton, 43,2% Schluff und 38,7% Sand, was der Bodenart Ls2 (schwach sandiger Lehm) entspricht. Der pH-Wert ( $CaCl_2$ ) dieses Bodens betrug laut Gutachten 6,2-6,6. Da beide Böden der gleichen Bodenartengruppe, Unterschiede im wesentlichen nur in den der Sand- und Schluffanteilen, angehören war zu erwarten, dass die Extraktionsmethode mit  $NH_3/NH_4Cl/EDTA$ -Puffer auch bei der Extraktion von CTC aus dem Kölner Boden angewendet werden kann. Um dieses zu überprüfen wurde eine Wiederfindungsstudie durchgeführt, welche gleichzeitig die Anwendbarkeitsprüfung der  $NH_3/NH_4Cl/EDTA$ -Extraktionsmethode für TC, ENR und CIP einschloss.

#### Versuchsdurchführung

##### *Herstellung des $NH_3/NH_4Cl/EDTA$ -Puffers*

54,0 g Ammoniumchlorid wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und in 300 mL bidest. Wasser gelöst. Danach wurden 37,224 g EDTA Dinatriumsalz und 350 mL konz. Ammoniaklösung (25% w/w) zugesetzt. Im Anschluss wurde mit bidest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Der pH-Wert des Extraktionspuffers betrug 10,0.

##### *Extraktionsmethode $NH_3/NH_4Cl/EDTA$*

Einwaagen von 5,00 g des Bodens (Köln, Bodenprobe: K) wurden in einem 50 mL Zentrifugenglas eingewogen wozu dann 500  $\mu$ L Antibiotikamischstandardlösung (CTC, TC, ENR, CIP;  $\beta$ = 1000  $\mu$ g/L; Verdünnung in bidest. Wasser) zupipettiert wurden. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wurden die dotierten Bodenproben mit 10 mL  $NH_3/NH_4Cl/EDTA$ -Puffer (pH=10) versetzt und 30 min. auf einem Horizontalschüttler (275

U/min) äquiliibriert und dann bei 4000 U/min für 10 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein weiteres 50 mL Zentrifugenglas überführt. Die Bodenprobe wurden erneut

mit 10 mL  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Puffer versetzt, mit einem Glasstab aufgeschlämmt und wieder für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur ersten Charge gegeben. Die vereinigte Extraktionslösung wurde mit Salzsäure (25% (w/w)) auf pH 4,0 eingestellt. Dieser Extrakt wurde zur SPE eingesetzt.

#### Probenumfang

Insgesamt wurden 3 Bodenproben dotiert (3-fach Bestimmung), eine 4-te Bodenprobe wurde als Kontrolle (Qualitätsicherung) auf mögliche Antibiotikaverschleppungen während der Probenaufarbeitung undotiert aufgearbeitet. Jede Messprobe wurde 3-mal mittels LC-MS/MS analysiert.

#### Ergebnisse

Bei Verwendung des  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Puffers (pH=10) zur Extraktion von CTC als dem Boden (Köln) beträgt die Wiederfindung 75,1%, wobei CTC erwartungsgemäß unter den Extraktionsbedingungen vollständig in e-iso-CTC und iso-CTC umgewandelt und daher als Summe CTC (e-iso-CTC + iso-CTC) quantifiziert wird. Im Vorgängerprojekt wurde mit dieser Extraktionsmethode demgegenüber eine Wiederfindung von 56-71% erreicht. Die etwas höhere Wiederfindung von CTC beim Boden der Region Köln ist durch seinen höheren Sand- und geringeren Schluffanteil gegenüber dem Boden der Region Soest erklärbar. Die Beobachtung, dass die Wiederfindung mit höheren Ton-/Schluffanteilen im Boden geringer wird, zeigen auch Ergebnisse von Uslu et al. [343] für ENR und CIP (Hinweis: Einteilung der Korngrößenfraktionen entspricht in dieser Literaturstelle nicht der DIN 4220; auch steigt der Gehalt an organischen Kohlenstoff an). Die Wiederfindung von TC (Summe aus TC und e-TC) beträgt 57,0% und ist damit niedriger als von CTC. Im Unterschied zu CTC konnte für TC keine Isomerisierung in iso-TC und e-iso-TC festgestellt werden. Dieser Unterschied begründet die unterschiedliche Extrahierbarkeit von „CTC“ und „TC“ mit dem  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ -Puffer. Das iso-CTC besitzt gegenüber

dem CTC einen deutlich niedrigeren 3-ten  $pK_s$ -Wert (CTC:9,33; iso-CTC:7,83) und trägt, aufgrund seines damit verbundenen höheren Deprotonierungsgrades, eine höhere negative Ladung. Dadurch wird eine Desorption von der in der Regel negativen Oberflächenladung der Bodenmatrix begünstigt, was wiederum eine bessere Extrahierbarkeit zur Folge hat. Eine Erhöhung des pH-Wertes des Extraktionsmittels sollte demnach auch eine bessere Extrahierbarkeit von TC zur Folge haben. Für ENR und CIP wurde jeweils eine Wiederfindung von lediglich 6,8% erreicht. Der  $NH_3/NH_4Cl/EDTA$ -Puffer ist demnach zur Extraktion von ENR und CIP nicht geeignet.

#### *Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Extraktionsmethode zur Bestimmung von Enrofloxacin und Ciprofloxacin*

Turiel et al. führten Untersuchungen zur Extraktion von Fluorchinolonen (u.a. ENR und CIP) mit einer Vielzahl von Extraktionsmittel durch [344]. Der in den Wiederfindungsversuchen verwendete Boden enthielt einem Tonanteil von 18,22% sowie einen Sandanteil von 44,34% (weitere Daten: 0,97% Organisches Material, pH=7,69), was dem Boden der Region Köln nahezu entspricht. Die bestens Wiederfindungen wurden dabei mit einer wässrigen  $Mg(NO_3)_2$ -Lösung unter Zusatz von  $NH_3$  erreicht. Für ENR wurde damit eine Wiederfindung von 84-90% und für CIP von 86-104% erreicht. Das Prinzip bei dieser Methode beruht auf einer Extraktion der Fluorchinolone durch Bildung von Magnesium-Fluorchinolon-Komplexen unter basischen Bedingungen. Auch in anderen Untersuchungen wurden auf Grundlage der Arbeit von Turiel et al. wässrige  $Mg(NO_3)_2$ -Lösungen unter Zusatz von  $NH_3$  zur Extraktion von Fluorchinolonen aus Böden eingesetzt. So geben Sturini et al. Wiederfindungsraten von 63-96% für ENR und 66-106% für CIP an [361]. Karci et al., welche eine Reihe unterschiedlicher Böden untersuchten, ermittelten für ENR und CIP Wiederfindungsraten im Bereich 46-55% [53]. Allerdings wird in keiner der Quellen die Zusammensetzung der Extraktionslösung exakt beschrieben, sodass die Zusammensetzung einer wässrigen  $Mg(NO_3)_2$ -Lösung unter Zusatz von  $NH_3$  für eine Überprüfung ihres Extraktionsvermögens abgeschätzt werden musste. Karci et al. geben mit pH=8,1 als einzige einen pH-Wert der Extraktionslösung an. Als pH-Wert der eingesetzten Lösung wurde pH=8,5 gewählt, da ein höherer pH-Wert eine Fällung von Magnesiumhydroxid in der Extraktionslösung zur Folge gehabt hätte.

### Versuchsdurchführung

#### *Herstellung des $Mg(NO_3)_2$ -Extraktanten*

400 g  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und in 700 mL bidest. Wasser gelöst. Im Anschluss wurden 20 mL konz. Ammoniaklösung (25% w/w) zugesetzt. Der pH-Wert des  $Mg(NO_3)_2$ -Extraktanten wurde mit 25%iger HCl auf pH=8,5 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

#### *Extraktionsmethode $Mg(NO_3)_2$*

Einwaagen von 5,00 g des Bodens (Köln, Bodenprobe: K) wurden in einem 50 mL Zentrifugenglas eingewogen wozu dann 500  $\mu$ L Antibiotikamischstandardlösung (CTC, TC, ENR, CIP;  $\beta$ = 1000  $\mu$ g/L; Verdünnung in bidest. Wasser) zupipettiert wurden. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wurden die dotierten Bodenproben mit 10 mL  $Mg(NO_3)_2$ -Extraktant (pH 8,5) versetzt und 30 min. auf einem Horizontalschüttler (275 U/min) äquilibriert und dann bei 4000 U/min für 10 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein weiteres 50 mL Zentrifugenglas überführt. Die Bodenprobe wurden erneut mit 10 mL  $Mg(NO_3)_2$ -Extraktant versetzt, mit einem Glasstab aufgeschlämmt und wieder für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur ersten Charge gegeben. Die vereinigte Extraktionslösung wurde mit Salzsäure (25% (w/w)) auf pH 3,0 eingestellt und ein weiteres Mal bei 4000 U/min 10 min lang zentrifugiert. Dieser Extrakt wurde zur SPE eingesetzt.

#### Probenumfang

Insgesamt wurden 3 Bodenproben dotiert (3-fach Bestimmung), eine 4-te Bodenprobe wurde als Kontrolle (Qualitätsicherung) auf mögliche Antibiotikaverschleppungen während der Probenaufarbeitung undotiert aufgearbeitet. Jede Messprobe wurde 3-mal mittels LC-MS/MS analysiert.

#### Ergebnisse

Die Wiederfindungen für CTC (Summe aus e-CTC und CTC; Isomerisierung konnte nicht festgestellt werden) und für TC (Summe aus e-TC und TC) betragen für  $Mg(NO_3)_2$ -Extraktionsmethode 33,8% bzw. 35,3%. Anhand dieser Ergebnisse ist diese Methode zur

Extraktion von Tetracyclinen als ungeeignet anzusehen. Für die Fluorchinolone sind die ermittelten Wiederfindungsraten mit 38,8% für ENR und 35,8% für CIP nur geringfügig höher, sind aber deutlich besser als die der anderen Extraktionsmethoden. Aus diesem Grund sollte die  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Extraktionsmethode auch zur Ermittlung des Gehaltes von ENR und CIP in den Bodenproben des Feldversuches angewendet werden.