

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mit ihrer Hilfe und Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Wilhelm Georg Lorenz für sein Vertrauen, seine Unterstützung und die Betreuung dieser Arbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Herrn Professor Dr. Andreas Schäffer danke ich für sein Interesse und die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Thorsten Reemtsma für die großzügig gewährte Unterstützung, das ausdauernde Engagement, die kritische Durchsicht der Manuskripte, die konstruktive Kritik und die fruchtbaren Diskussionen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Monika Möder für die vielfältige Unterstützung, unermüdliche Diskussionsbereitschaft bei theoretischen und experimentellen Fragestellungen und die kritische Durchsicht der Manuskripte bedanken.

Teile dieser Arbeit entstanden im Rahmen des Projektes „*From Plants to Humans – Plant Accumulation and Transfer of Organic Foreign Compounds in Primary Food Chain*“ (Projekt-Nr. 184339/I10). Ich danke dem Norwegischen Forschungsrat für die Finanzierung des Projektes und der Projektleiterin Frau Dr. Trine Eggen vom Norwegischen Institut für Agrar- und Umweltforschung (Bioforsk) für das entgegengebrachte Vertrauen und das zur Verfügung stellen der untersuchten Pflanzen.

Bei allen Freundinnen und Freunden, aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen im Department Analytik am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig – UFZ möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, für das Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit, für vielfältigen Rat und Hilfe bedanken. Ich danke Euch für eine gute Zeit im Labor und Büro, bei einem schnellen Kaffee oder gelegentlichen Feierabendbier. Vielen Dank auch den Kolleginnen und Kollegen aus anderen Departments, die ich während meiner Zeit am UFZ kennenlernen und mit denen ich zusammenarbeiten durfte.

Ganze besonders danke ich Frau Dr. Bettina Seiwert für ihre großzügige und umfangreiche Unterstützung, die Bereitschaft zur intensiven Diskussion und die gute Zusammenarbeit.

Für die umfangreiche Unterstützung im Labor und die vielfältigen Ratschläge bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Steffi Schrader und Frau Ursula Winkler.

Herr Dr. Christian Albrecht und Herr Dr. Stefan Bergner haben mit ihren Arbeiten zur Entwicklung und Optimierung von Analysenmethoden zum Entstehen meiner Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank dafür.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Peter Schröder, Frau Dr. Lyudmila Lyubenova, Herrn Dr. Christian Huber, Herrn Rudolf Harpaintner und allen Kollegen der Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktion am Helmholtz Zentrum München bedanken, die ich im Laufe meiner Arbeit besuchen durfte. Ich danke für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, die gute Betreuung im Vorfeld und während des Aufenthaltes, die gute Zusammenarbeit, das geteilte Wissen und die Möglichkeit, die Meerrettich-Haarwurzelkultur für Untersuchungen zu nutzen.

Außerdem danke ich den Kolleginnen und Kollegen vom Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie e.V. (SIAB) Frau Dr. Jelka Ondruschka, Herrn Erik Klapproth und besonders Frau Gerlinde Groeger, die mich durch Etablierung und Pflege der Karottenzellsuspensionskulturen unterstützt haben.

Ich danke meinen Freunden in Leipzig und daheim für eine gute Zeit, ihre aufmunternden Worte in schwierigen und anstrengenden Phasen, Entspannung und Zerstreuung, für schöne Abende und Wochenenden.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Birgit und Gert, meinem Bruder Patrick und meiner ganzen Familie, die an mich geglaubt, mir viel Verständnis entgegengebracht und mich grenzenlos unterstützt haben.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2009 bis Januar 2014 im Department Analytik am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig angefertigt.

Diese kumulative Dissertation basiert auf den drei folgenden, bereits veröffentlichten Fachartikeln. Ergänzende, bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse sind im Anschluss an die Artikel dargestellt und entsprechend kenntlich gemacht. Weiterführende Information zu den verwendeten Materialien, Geräten und Methoden sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

1. Macherius, A., Eggen, T., Lorenz, W. G., Reemtsma, T., Winkler, U., Moeder, M. Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012) 7785-7791.
2. Macherius, A., Eggen, T., Lorenz, W., Moeder, M., Ondruschka, J., Reemtsma, T. Metabolization of the Bacteriostatic Agent Triclosan in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake Assessment. *Environmental Science & Technology* 46 (2012) 10797-10804.
3. Macherius, A., Seiwert, B., Schröder, P., Huber, C., Lorenz, W., Reemtsma, T. Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The in Vitro Metabolism of Triclosan in Horseradish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (2014) 1001-1009.

Alle drei Artikel wurden in Peer-Review-Fachzeitschriften veröffentlicht, die von der American Chemical Society (ACS) herausgegeben werden. ACS gestattet den Autoren die Verwendung der Artikel in Dissertationen in gedruckter und digitaler Form.

Kurzfassung

Landwirtschaftlich genutzte Pflanzen sind einer Vielzahl anthropogener organischer Verbindungen ausgesetzt. Eine mögliche Quelle ist die Düngung der Anbauflächen mit Klärschlämmen, in denen sich während der Abwasserbehandlung lipophile Verbindungen, wie z. B. Bestandteile von Körperpflegeprodukten und Reinigungsmitteln, anreichern. Diese Verbindungen können so in den Kontakt mit Nahrungs- und Futterpflanzen kommen, von diesen aufgenommen werden und in die Nahrungskette gelangen. Das kann zu einer chronischen Exposition von Mensch und Tier führen, die mit negativen Folgen für ihre Gesundheit verbunden sein kann. Zudem ist eine Metabolisierung der Kontaminanten in den Pflanzen möglich, die zur Bildung neuer Metaboliten mit unbekanntem Eigenschaften führt. Die Aufnahme, Verteilung und der Metabolismus klärschlamm-bürtiger organischer Verbindungen in Nutzpflanzen kann deshalb einen wichtigen Aspekt der Lebensmittelsicherheit darstellen.

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme und Verteilung von Triclosan, Galaxolid[®] und Tonalid[®] in Karotten, Gerste und Wiesen-Schwingel untersucht. Die Pflanzen wurden in dotierten Böden unter Gewächshausbedingungen kultiviert, nach der Ernte in einzelne Pflanzenteile separiert und mittels GC-MS hinsichtlich ihrer Kontaminantkonzentrationen analysiert. Sowohl in den Wurzeln von Gerste und Wiesen-Schwingel als auch in den Wurzeln der Karottenpflanzen wurden alle drei Verbindungen nachgewiesen. In den Pfahlwurzeln der Karotten wurde zudem ein starker Konzentrationsgradient der drei Kontaminanten zwischen der Wurzelschale und dem Wurzelinneren beobachtet. Eine signifikante Translokation der Kontaminanten von der Wurzel in die oberirdischen Pflanzenteile wurde nur bei den Karotten beobachtet, bei Gerste und Wiesen-Schwingel dagegen nicht.

Um neben der Aufnahme und Verteilung der Ausgangsverbindungen ihre mögliche Metabolisierung berücksichtigen zu können, wurden für Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban Metabolisierungsstudien in Karottenzellsuspensionskulturen durchgeführt. In diesen Kulturen wurden ein schneller Umsatz des Triclosans und die Bildung von acht Triclosanmetaboliten beobachtet. Für diese Metaboliten wurden auf Grundlage von Daten aus LC-MS-Analysen Strukturvorschläge erarbeitet. Dabei handelte es sich ausschließlich um Phase-II-Metaboliten, d. h. um Konjugate der phenolischen OH-Gruppe des Triclosans mit Sacchariden, ihren malonylierten Folgeprodukten und Sulfat. Phase-I-Metaboliten wurden dagegen nicht beobachtet. Die freie OH-Gruppe des Triclosans war Voraussetzung für dessen Metabolisierung. Methyltriclosan und Triclocarban verfügen über keine entsprechende funktionelle Gruppe und wurden in den Karottenzellsuspensionskulturen nicht umgesetzt. Die

acht Metaboliten des Triclosans wurden auch in den Wurzeln der triclosanexponierten Karottenpflanzen nachgewiesen, wobei die Menge der Triclosanmetaboliten die des unmetabolisierten Triclosans überstieg. Die alleinige Bestimmung der Ausgangsverbindung führte zu einer unvollständigen Erfassung der tatsächlich in die Pflanze aufgenommenen Triclosanmenge. In zukünftigen Studien zur Aufnahme von Kontaminanten in Nutzpflanzen sollte daher die mögliche Metabolisierung der Verbindungen berücksichtigt werden, um falsche Schlüsse bezüglich ihres Schicksals in Pflanzen und eine Unterschätzung ihres Eintrags in die Nahrungskette zu vermeiden.

Um zu prüfen, ob diese Ergebnisse spezifisch für Karotten sind, oder ob sie für den Triclosanmetabolismus in Pflanzen allgemeingültig sind, wurde der Metabolismus von Triclosan in Meerrettich-Haarwurzelkulturen untersucht. Durch UPLC-QToF-MS^E-Analysen und Auswertung der Datensätze mittels multivariater Datenanalyse, Massendefekt- und Isotopenmusterfilter wurden 33 Triclosanmetaboliten nachgewiesen und für 23 Strukturvorschläge erarbeitet. Bei der Mehrheit handelte es sich um Phase-II-Metaboliten, wie das Sulfatkonjugat sowie verschiedene Saccharid- und Sulfosaccharidkonjugate und ihren acetylierten und malonylierten Folgeprodukten. Erstmals wurde einem Disulfosaccharid als Produkt des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus nachgewiesen. Zudem wurden in den Meerrettich-Haarwurzelkulturen Konjugate des hydroxylierten Triclosans, also Phase-I+II-Metaboliten, identifiziert, sodass das Metabolitmuster wesentlich komplexer als in den Karottenzellkulturen war. Auch wenn einige Metaboliten in beiden Kulturen nachgewiesen wurden, war der Metabolismus von Triclosan sehr pflanzenspezifisch. Es ist daher nur sehr bedingt möglich, die Ergebnisse von einer Pflanzenspezies auf eine andere zu übertragen und Vorhersagen zu treffen, ob Triclosan in dieser umgesetzt wird bzw. welche Metaboliten gebildet werden.

Abstract

Agricultural plants are exposed to a wide range of anthropogenic organic chemicals. One possible source is the fertilization of acreage with sewage sludge, which accumulates lipophilic compounds during wastewater treatment, such as ingredients of personal care products and cleaning agents. These contaminants may be taken up from sewage sludge treated soils by the crop plants and, thus, may be transferred into the food web. Furthermore, metabolization of the contaminants in the plant tissue is possible, giving rise to new metabolites with often unknown properties. This may lead to chronic exposure of humans and livestock to these contaminants and their metabolites possibly causing adverse health effects. Therefore, uptake, translocation, and metabolism of organic sewage sludge contaminants in crops could represent an important issue of food safety.

In the present work, the uptake and translocation of triclosan, galaxolide[®], and tonalide[®] in carrots, barley and meadow fescue was investigated. The plants were cultivated in spiked soils under greenhouse conditions, subdivided into individual plant parts after harvesting and analyzed for their contaminant concentrations using GC-MS. All three contaminants were detected in the roots of the respective plants. In the taproots of carrot, a steep concentration gradient between the peel and core was observed for all three compounds. A substantial translocation of triclosan, galaxolide[®], and tonalide[®] into the aerial plant parts has only been observed for carrot plants, but not for barley and meadow fescue plants.

In order to determine whether selected contaminants may be subject to a biochemical conversion in carrots and to elucidate the arising products, the metabolism of triclosan, methyl triclosan, and triclocarban was investigated in carrot cell suspension cultures. A fast metabolization of triclosan and the formation of eight triclosan metabolites were observed in these cell cultures. Based on LC-MS analyses tentative structures were assigned to the metabolites. These were exclusively phase II metabolites, i. e. conjugates of triclosans hydroxyl group with saccharides, malonyl saccharides, and sulfate. No phase I metabolites were detected. The free hydroxyl group of triclosan was essential for its metabolization in carrot cell cultures. As methyl triclosan and triclocarban lack this functional group that facilitates direct phase II metabolism, they remained unaltered. All eight triclosan metabolites were detected in the roots of carrot plants cultivated in triclosan contaminated soils. In these carrot roots, the amount of conjugated triclosan exceeded the amounts of unaltered triclosan. The sole consideration of the unaltered parent compound and the neglect of possible metabolites thus caused an incomplete determination of the total incorporated triclosan amounts. Therefore, future studies on the uptake of contaminants in crop plants should

consider a possible metabolization of the incorporated compounds to avoid incomplete conclusions about the fate of environmental contaminants in plants as well as an underestimation of the transfer of these compounds into the food web.

In order to determine whether these results are specific for carrots or generally valid for the metabolization of triclosan in other plants, the metabolism of triclosan in a horseradish hairy root culture was investigated. In this culture, 33 triclosan metabolites were detected by UPLC-QToF-MS^E analyses and a stepwise data processing approach using mass defect filtering, multivariate data analysis, and isotope pattern filtering. Based on their mass spectrometric data, structure proposals were elaborated for 23 triclosan metabolites. The majority were identified as phase II metabolites, viz. conjugates with saccharides, sulfosaccharides as well as their acetylated and malonylated products. For the first time, a disulfosaccharide was identified as a plant metabolite. Additionally, conjugates of the phase I metabolite hydroxyl-triclosan were found. As a result, the metabolite pattern formed by the horseradish hairy root cultures was more complex than that observed in the carrot cell cultures. Even though a few triclosan metabolites were detected in both cultures, the overall triclosan metabolite patterns were very plant specific. Hence, a transfer of the results from one plant species to another in order to predict whether or not triclosan is amenable to metabolization and the arising metabolites is only possible to a limited extend.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, Akronyme und Symbole

Neben den Abkürzungen der deutschen Rechtschreibung laut Duden, den Symbolen der chemischen Elemente des Periodensystems und den internationalen Standardeinheiten wurden die folgenden Abkürzungen, Akronyme und Symbole verwendet.

AbfklärV	Klärschlammverordnung
AHTN	1-(5,6,7,8-Tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalen-2-yl)-ethanon (Tonalid [®])
AOX	adsorbierbare organisch gebundene Halogene
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BCF	Biokonzentrationsfaktor (<i>bioconcentration factor</i>)
CA	Kalifornien
CE	Kollisionsenergie (<i>collision energy</i>)
cv.	Cultivar
DEHP	Bis(2-ethylhexyl)phthalat (Diethylhexylphthalat)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DüMV	Düngemittelverordnung
EU	Europäische Union
EU-27	27 Mitgliedstaaten der Europäischen Union (01.01.2007 - 30.06.2013)
US EPA	Umweltschutzbehörde der Vereinigten Staaten (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FM	Frischmasse
GC	Gaschromatographie
HHCB	1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta- γ -2-benzopyran (Galaxolid [®])
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HS-SPME	Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (<i>headspace-solid phase microextraction</i>)
K _d	(Boden-Wasser)-Verteilungskoeffizient
K _{OC}	Organischer Kohlenstoff des Bodens-Wasser-Verteilungskoeffizient
K _{OW}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
K _{PW}	Pflanze-Wasser-Verteilungskoeffizient
K _{RB}	Wurzel-Boden-Verteilungskoeffizient (<i>root-bulk soil partition coefficient</i>)
L.	Linné
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
MA	Massachusetts
MS	Massenspektrometrie

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NWG	Nachweisgrenze
PA	Pennsylvania
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
PAK	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCDD	polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
Pkt.	Punkte
PLS-DA	<i>partial least squares discriminant analysis</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
QToF-MS	Quadrupol-Flugzeit-Tandem-Massenspektrometrie
RfD	Referenzdosis
RHmV	Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln (Rückstands-Höchstmengenverordnung)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RCF	Wurzelkonzentrationsfaktor (<i>root concentration factor</i>)
RSD	relative Standardabweichung (<i>relative standard deviation</i>)
RT	Retentionszeit (<i>retention time</i>)
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
subsp.	Subspezies
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TDI	tolerierte Tagesdosis (<i>tolerable daily intake</i>)
TM	Trockenmasse
TSCF	Transpirationsstromkonzentrationsfaktor (<i>transpiration stream concentration factor</i>)
UBA	Umweltbundesamt
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
VO	Verordnung
RL	Richtlinie

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Vorwort	III
Kurzfassung	IV
Abstract	VI
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, Akronyme und Symbole	VIII
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einführung und Zielsetzung	1
2 Allgemeine Grundlagen	3
2.1 Organische Klärschlammkontaminanten	3
2.1.1 Die Bakterizide Triclosan und Triclocarban	4
2.1.2 Die polycyclischen Moschusduftstoffe Galaxolid [®] und Tonalid [®]	7
2.1.3 Verwendung von Klärschlämmen als Dünger in der Landwirtschaft	8
2.2 Aufnahme und Verteilung von Kontaminanten in Pflanzen	10
2.2.1 Aufnahme- und Verteilungspfade	10
2.2.2 Einfluss physikochemischer Eigenschaften der Kontaminanten	12
2.3 Metabolismus von Kontaminanten in Pflanzen	16
2.3.1 Phase-I-Reaktionen	17
2.3.2 Phase-II-Reaktionen	17
2.3.3 Phase-III-Reaktionen	19
2.3.4 In vitro-Systeme für die Untersuchung des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus	20
2.4 Probenvorbereitungstechniken zur Extraktion und Anreicherung von Analyten aus verschiedenen Matrices	23
2.4.1 Die QuEChERS-Extraktionsmethode für Pflanzenproben	23
2.4.2 Ultraschallunterstützte Lösemittelextraktion von Bodenproben	24
2.4.3 Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)	24
2.5 Massenspektrometrische Analysetechniken für den Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen	25
2.5.1 Quantifizierung von Analyten mittels Selected Ion Monitoring (SIM) und Multiple Reaction Monitoring (MRM)	25
2.5.2 Produktions-Analyse	26
2.5.3 MS ^E -Analyse als Spezialfall der Produktions-Analyse	26
2.5.4 Neutralverlust- und Vorläuferionen-Analyse	27
2.6 Anwendung von Filtertechniken zur Interpretation massen-spektrometrischer Daten für den Nachweis unbekannter Metaboliten	29
2.6.1 Isotopenmusterfilter	29
2.6.2 Massendefektfilter	30
3 Originalarbeiten	32
3.1 Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants	32
3.1.1 Veröffentlichter Fachartikel	32

3.2	Metabolization of the Bacteriostatic Agent Triclosan in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake Assessment	40
3.2.1	Veröffentlichter Fachartikel	40
3.2.2	Supporting Information des veröffentlichten Fachartikels	49
3.2.3	Ergänzende Informationen	55
3.2.3.1	Etablierung, Kultivierung und Exposition der Karottenzellsuspensionskulturen	55
3.2.3.2	Optimierung der HS-SPME-GC-MS Methode zur Bestimmung von Triclosan, Methyltriclosan, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol in Pflanzenzell- und Haarwurzelkulturen.....	55
3.2.3.3	Identifizierung der Triclosanmetaboliten mittels UPLC-QToF-MS mit Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus	58
3.3	Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The in Vitro Metabolism of Triclosan in Horseradish	64
3.3.1	Veröffentlichter Fachartikel	64
3.3.2	Ergänzende Informationen	74
3.3.2.1	Bestimmung von Methyltriclosan in den Meerrettich-Haarwurzelkulturen	74
4	Zusammenfassung der Dissertation und Ausblick	75
	Literaturverzeichnis	XII
	Abbildungsverzeichnis	XXII
	Tabellenverzeichnis	XXIII
	Anhang.....	XXIV
A.1	Etablierung der Karottenzellsuspensionskultur	XXIV
A.2	Exposition von Karottenzellsuspensionskulturen gegen Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban	XXV
A.3	Analytische Methoden für die Quantifizierung bekannter Verbindungen und Aufklärung von Metaboliten in Karottenzellsuspensionskulturen.....	XXV
A.3.1	Extraktion der Karottenzellsuspensionskulturen	XXV
A.3.2	Bestimmung von Triclosan, Methyltriclosan, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol mittels HS-SPME-GC-MS.....	XXVI
A.3.3	Bestimmung von Triclocarban mittels LC-MS/MS.....	XXVIII
A.3.4	Nachweis und Strukturaufklärung von Triclosanmetaboliten	XXIX
A.3.5	MRM-Methode zur Bestimmung der Triclosanmetaboliten.....	XXIX
A.3.6	Bestimmung der Triclosanmetaboliten mittels UPLC-QToF-MS	XXX
A.4	Verwendete Chemikalien	XXXI
A.4.1	Analyten, Stammlösungen und Lösemittel	XXXI
A.4.2	Nährmedium der Karottenzellsuspensionskulturen	XXXI
	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	XXXIII
	Angaben zur Person	XXXV
	Eidesstattliche Erklärung	XXXVI

1 Einführung und Zielsetzung

Anthropogene organische Verbindungen gelangen in großem Umfang über kommunale Abwässer in Kläranlagen. Darunter sind unter anderem Pharmaka, Inhaltsstoffe von Kosmetik- und Hygieneartikeln, Haushaltsreinigern, Waschmitteln oder Kunststoffadditiven. Einige dieser Verbindungen werden während der Abwasserbehandlung nur unvollständig abgebaut und adsorbieren aufgrund ihrer semi- und unpolaren Eigenschaften an den Klärschlamm. Durch die Ausbringung von Klärschlämmen als Dünger auf landwirtschaftlich genutzte Flächen können diese Verbindungen in die Umwelt freigesetzt werden.

In den Staaten der Europäischen Union (EU-27) werden jährlich etwa zwölf Millionen Tonnen Klärschlamm produziert, davon zwei Millionen Tonnen in Deutschland (Milieu Ltd. et al., 2010a). Behandelte Klärschlämme stellen einen kostengünstigen Pflanzendünger dar, weshalb ein Teil, vor allem als Phosphor- und Stickstoffquelle, auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ausgebracht wird (Wiechmann et al., 2012). In der Europäischen Union beträgt dieser Anteil etwa 40 %, in Deutschland etwa 30 % (Milieu Ltd. et al., 2010a). Der Einsatz im Landschaftsbau und in der Landwirtschaft wird international als nachhaltige Methode zur Verwertung behandelter Klärschlämme anerkannt (Clarke und Smith, 2011). Die ordnungsgemäße Ausbringung der Klärschlämme auf landwirtschaftlich genutzte Flächen wird von der Europäischen Union ausdrücklich unterstützt (Langenkamp et al., 2001; Milieu Ltd. et al., 2010b).

Die Verwendung von Klärschlämmen als Dünger birgt jedoch die Gefahr, dass die enthaltenen Kontaminanten in direkten Kontakt mit Kulturpflanzen kommen, von diesen aufgenommen werden und so in die Nahrungskette gelangen. Die Folge wäre eine chronische Exposition von Tier und Mensch gegenüber Verbindungen, die nachgewiesenermaßen oder zumindest potentiell eine biologische Aktivität aufweisen. Daher ist es wichtig, das Potential einer Verbindung abschätzen zu können, durch den Einsatz von Klärschlämmen in der Landwirtschaft in Nutzpflanzen aufgenommen zu werden. Prinzipiell können die Aufnahme und Verteilung einer Verbindung in Pflanzen anhand ihrer physikochemischen Eigenschaft mit Modellen beschrieben werden. Jedoch sind experimentelle Daten aus Aufnahmestudien unter Feld- oder Gewächshausbedingungen unerlässlich, um das Verhalten der Stoffe in den komplexen Systemen und die Einflüsse biotischer und abiotischer Faktoren verstehen zu können. Der Metabolismus einer aufgenommenen Verbindung ist ein solcher Faktor, der nur schwer vorhergesagt werden kann und in Aufnahmestudien bisher wenig berücksichtigt wird. Kenntnisse über Art und Umfang der Metabolisierung eines Stoffes sind wichtig, um sein Verhalten in Pflanzen verstehen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse zum Verhalten ausgewählter Klärschlammkontaminanten in landwirtschaftlich genutzten Pflanzen zu gewinnen. Dafür sollte zunächst unter Gewächshausbedingungen bestimmt werden, in welchem Umfang die Verbindungen aus einer komplexen Bodenmatrix in Nutzpflanzen übergehen. Zudem sollte die Verteilung der aufgenommenen Verbindungen in einzelne Pflanzenteile erfasst werden.

Das erforderte die Entwicklung und Validierung von Analysemethoden für die quantitative Bestimmung ausgewählter organischer Kontaminanten in Boden- und verschiedenen Pflanzenmatrizes.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des pflanzlichen Metabolismus ausgewählter Verbindungen in axenischen *in vitro*-Kulturen mit dem Ziel, Art und Umfang der Metabolisierung zu ermitteln und die gebildeten Metaboliten aufzuklären. Hierfür sollten Analysemethoden zum quantitativen Nachweis der Ausgangsverbindungen in den Kulturen etabliert und validiert und die gebildeten Metaboliten mittels LC-MS/MS-Methoden identifiziert werden.

Schließlich sollten die in den *in vitro*-Kulturen identifizierten Metaboliten auch in exponierten Pflanzen aus den Aufnahmestudien nachgewiesen werden.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Organische Klärschlammkontaminanten

Über kommunale Abwässer erreicht eine Vielzahl organischer Kontaminanten kommunale Kläranlagen. Einige dieser Stoffe werden in der Kläranlage nur ungenügend abgebaut und überstehen die verschiedenen Prozesse der Abwasserbehandlung zu großen Teilen unverändert. Besonders semi- und unpolare Stoffe adsorbieren dabei vorwiegend an die Klärschlämme und können sich in diesen anreichern.

Die Gehalte an organischen Kontaminanten in Klärschlämmen wurden von Clarke und Smith (2011) in einem Übersichtsartikel zusammengefasst. Die Autoren argumentieren, dass die Konzentrationen „klassischer“ organischer Klärschlammkontaminanten, wie polychlorierte Biphenyle, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe oder polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane im Verlauf der vergangenen Jahre zurückgegangen sind, sodass ihr Eintrag in die Umwelt über Klärschlämme an Bedeutung abgenommen hat. Sie führen das auf eine effektive Kontrolle der Eintragsquellen bzw. auf eine reduzierte Freisetzung dieser Verbindungen zurück. Clarke und Smith (2011) zeigen außerdem, dass in Klärschlämmen andere anthropogene organische Verbindungen, wie die meist als Summenparameter erfassten polychlorierten Alkane, Polydimethylsiloxane und quartären Ammoniumverbindungen, in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegen. Eine bedeutende und strukturell vergleichsweise heterogene Gruppe organischer Klärschlammkontaminanten stellen die Pharmaka und Körperpflegeprodukte dar. Einzelne Vertreter dieser Gruppe können in Klärschlämmen in Konzentrationen bis in den oberen mg kg^{-1} -Bereich nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben sind die Bakterizide Triclosan und Triclocarban sowie die polycyclischen Moschusduftstoffe Galaxolid[®] und Tonalid[®]. Diese werden oft mit den höchsten Konzentrationen aller Einzelverbindungen in Klärschlämmen nachgewiesen, sieht man von einzelnen biogenen Steroiden und dem Weichmacher Bis(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) ab (Clarke und Smith, 2011; EPA, 2009; Gottschall et al., 2012; McClellan und Halden, 2010; Walters et al., 2010).

2.1.1 Die Bakterizide Triclosan und Triclocarban

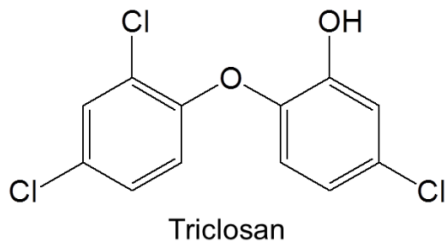


Abbildung 1. Strukturformel von Triclosan.

Bei Triclosan (5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol, Abbildung 1) handelt es sich um eine bakteriostatisch und antimykotisch wirkende Verbindung, die in Zahnpasten, Mundspülungen, Deodorants, Flüssigseifen und anderen Kosmetik- und Hygieneartikeln enthalten ist. Darüber hinaus wird Triclosan in Reinigungsmitteln, Haushaltsartikeln aus Kunststoff, Verpackungsmaterialien, Sportbekleidung, Unterwäsche, Bettwäsche und Schuhen verwendet (Adolfsson-Erici et al., 2002; Rüdell et al., 2013; SCCS, 2010; Singer et al., 2002). In Europa werden jährlich etwa 450 Tonnen dieser Verbindung eingesetzt (SCCS, 2010), in den Vereinigten Staaten liegt der Verbrauch schätzungsweise bei 300 Tonnen pro Jahr, möglicherweise aber auch wesentlich höher (Halden und Paull, 2005; Heidler und Halden, 2007). Aufgrund des vielfältigen Einsatzes und des hohen Verbrauchs gelangen große Mengen dieser Verbindung über kommunale Abwässer in die Kläranlagen. Studien zeigen, dass während des Klärprozesses bis zu 98 % des Triclosans aus der Wasserphase entfernt werden. Allerdings erfolgt die Eliminierung nur teilweise durch Transformations- und Abbauprozesse. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften ($\log K_{OW} = 4,8$) adsorbieren 30 bis 50 % des eingetragenen Triclosans an die Klärschlämme und reichern sich in diesen an (Bester, 2003; Boehmer et al., 2004; Heidler und Halden, 2007; Lozano et al., 2013). Als Folge wird Triclosan regelmäßig in Klärschlämmen europäischer und nordamerikanischer Kläranlagen nachgewiesen (Clarke und Smith, 2011). In einer Studie der Umweltschutzbehörde der Vereinigten Staaten (EPA) wurde Triclosan in 79 der 84 untersuchten Klärschlammproben in einem Konzentrationsbereich von 0,4 bis 133 mg kg⁻¹ Klärschlamm-trockenmasse (TM) detektiert, wobei die mittlere Konzentration bei 16,1 mg kg⁻¹ TM lag (EPA, 2009). Weitere Studien, in denen die Schlämme U.S. amerikanischer und kanadischer Kläranlagen untersucht wurden, berichten von mittleren Triclosankonzentrationen von 3,2 bis 30 mg kg⁻¹ TM (Chu und Metcalfe, 2007; Gottschall et al., 2012; Heidler und Halden, 2007; Kinney et al., 2008; Kinney et al., 2012). In den Klärschlämmen deutscher Anlagen liegt Triclosan ebenfalls nahezu ubiquitär vor. Bei

Untersuchungen von Schlämmen aus Kläranlagen in Schleswig-Holstein und Bayern wurden Mediankonzentrationen von 0,07 und 1,9 mg kg⁻¹ TM nachgewiesen (Eurofins-AUA GmbH und PROWA GmbH, 2007; Hübner et al., 2011). Bei der Beprobung von Klärschlämmen von 20 Anlagen im Raum Dortmund wurden Triclosankonzentrationen zwischen 0,4 und 8,8 mg kg⁻¹ TM bestimmt (Bester, 2003). Die geringste Konzentration wurde in einer Anlage im ländlichen Raum gefunden, die höchste Konzentration in einer Anlage mit urbanem Einzugsgebiet (Bester, 2003). Gelangt Triclosan mit den Klärschlämmen in Böden, ist es dort beständig und wenig mobil. Nur ein geringer Teil wird in tiefere Bodenhorizonte ausgewaschen (Butler et al., 2012). Die Halbwertszeiten von Triclosan liegen in klärschlammbehandelten Böden in Pflanzgefäßen im Freien bzw. unter Feldbedingungen zwischen 104 d und 187 d (Gottschall et al., 2012; Lozano et al., 2010, 2012; Walters et al., 2010). Die Halbwertszeit von Triclosan und anderen Verbindungen in klärschlammbehandelten Böden ist von der Form der aufgetragenen Klärschlämme abhängig. Bei Böden, die mit flüssigem Klärschlamm behandelt wurden, erfolgt eine schnellere Transformation von Triclosan als in Böden, auf die entwässerte Klärschlämme aufgebracht wurden (Al-Rajab et al., 2009).

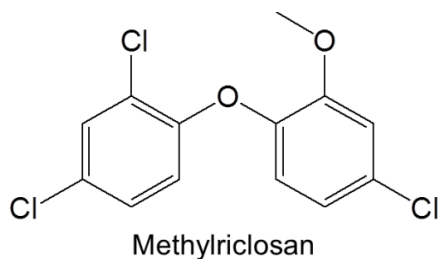


Abbildung 2. Strukturformel von Methyltriclosan.

Ein bekanntes Transformationsprodukt des Triclosans ist das Methyltriclosan (4-Chlor-1-(2,4-dichlorphenoxy)-2-methoxybenzen, Abbildung 2). Es wird sowohl während der Abwasserbehandlung als auch in klärschlammbehandelten Böden durch Methylierung der phenolischen Hydroxygruppe gebildet (Butler et al., 2012; Lozano et al., 2012; Lozano et al., 2013). Methyltriclosan ist lipophiler ($\log K_{OW} = 5,2$), mit einer Halbwertszeit von 443 d persistenter und in klärschlammbehandelten Böden weniger mobil als Triclosan (Boehmer et al., 2004; Butler et al., 2012; Lozano et al., 2012).

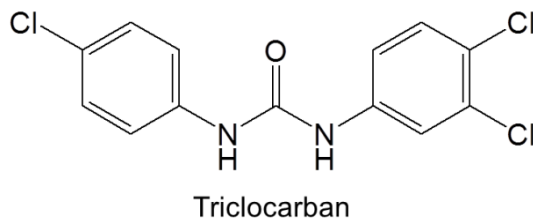


Abbildung 3. Strukturformel von Triclocarban.

Triclocarban (3-(4-Chlorphenyl)-1-(3,4-dichlorphenyl)-harnstoff, Abbildung 3) ist ebenfalls eine antibakteriell wirkende Verbindung, die in Produkten zur Körperreinigung, vor allem in Fest- und Flüssigseife und Duschgel, eingesetzt wird (EPA, 2002). Im Vergleich zu Triclosan wurden nur wenige Studien zum Verhalten von Triclocarban während der Abwasserbehandlung und zum Vorkommen in Klärschlämmen veröffentlicht. Diese Studien wurden vorwiegend in den Vereinigten Staaten durchgeführt (Clarke und Smith, 2011), wo der jährlich Verbrauch dieser Verbindung auf 330 bis 500 t geschätzt wird (EPA, 2002; Halden und Paull, 2005). Analog zu Triclosan, gelangen große Mengen Triclocarban über häusliche Abwässer in die Kläranlagen. Studien zeigten, dass dort etwa 97 % aus dem Abwasser eliminiert wurden. Allerdings wurden nur etwa 20 % durch Transformationsprozesse entfernt, der überwiegende Teil der lipophilen Verbindung ($\log K_{OW} = 4.9$) konnte in den behandelten Klärschlämmen wiedergefunden werden (Halden und Paull, 2005; Heidler et al., 2006; Lozano et al., 2013). In den Vereinigten Staaten und Kanada durchgeführte Studien berichteten für behandelte Klärschlämme mittlere Triclocarbankonzentrationen, die zwischen 4,2 bis 51 mg kg⁻¹ TM und stets über denen des Triclosans liegen (Chu und Metcalfe, 2007; EPA, 2009; Gottschall et al., 2012; Heidler et al., 2006; Sapkota et al., 2007). In Europa ist das Auftreten von Triclocarban in Kläranlagen und Umweltkompartimenten dagegen kaum untersucht. Nur Langford und Koautoren (2011) berichten vom Nachweis dieser Verbindung in den behandelten Klärschlämmen von drei schottischen Kläranlagen in mittleren Konzentrationen von 0,5 bis 2,8 mg kg⁻¹ TM. In einer in Baden-Württemberg durchgeführten Studie konnte Triclocarban nur in einzelnen Klärschlammproben im Bereich der Nachweisgrenze (5 µg kg⁻¹) detektiert werden (Kuch et al., 2003). Halbwertszeiten von Triclocarban in klärschlammbehandelten Böden unter Feldbedingungen sind nicht bekannt. Zwei Studien berichten, dass die Triclocarbankonzentration im beobachteten Zeitraum von einem bzw. drei Jahren nicht signifikant abnahm, sodass eine Abschätzung der Halbwertszeit durch Extrapolation nicht möglich war (Gottschall et al., 2012; Walters et al., 2010). Die Verwendung von Klärschlämmen in der Landwirtschaft oder im Landschaftsbau scheint ein Haupteintragspfad für Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban in die Umwelt zu sein (Lozano et al., 2013).

2.1.2 Die polycyclischen Moschusduftstoffe Galaxolid[®] und Tonalid[®]

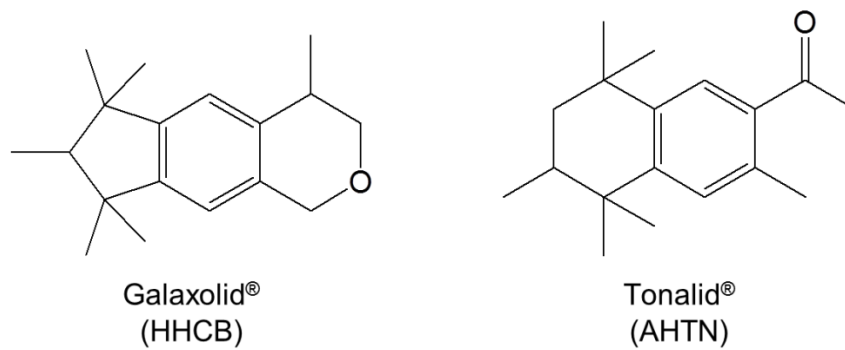


Abbildung 4. Strukturformeln von Galaxolid[®] und Tonalid[®].

Galaxolid[®] (1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta- γ -2-benzopyran, HHCB) und *Tonalid*[®] (1-(5,6,7,8-Tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalen-2-yl)-ethanon, AHTN, Abbildung 4) sind die wichtigsten Vertreter der Gruppe der polycyclischen Moschusduftstoffe. Sie werden in Seifen, Shampoos, Körperlotionen, Deodorants, Parfüm, Reinigungsmitteln, Waschmitteln, Weichspülern und Textilien eingesetzt (HERA, 2004; Herren und Berset, 2000; Müller et al., 2006). Basierend auf Daten aus dem Jahr 2000 liegt der jährliche Verbrauch von HHCB in Europa bei etwa 1400 t und von AHTN bei etwa 350 t (HERA, 2004). Nach einem aktuellen Entwurf der EPA für einen Arbeitsplan zur Risikobewertung von HHCB liegt der jährliche Verbrauch in den Vereinigten Staaten bei etwa 1700 t (EPA, 2012). Bei Untersuchungen zum Verhalten von HHCB und AHTN in Kläranlagen wurden von beiden Stoffen 46 bis 63 % (Reiner et al., 2007) bzw. 70 bis 90 % (Horii et al., 2007) aus der Wasserphase entfernt, was hauptsächlich auf Transformationsprozesse zurückgeführt wurde. Eine Anreicherung der lipophilen Verbindungen (HHCB $\log K_{OW} = 5.9$ und AHTN $\log K_{OW} = 5.7$ (Litz et al., 2007)) in behandelten Klärschlämmen wurde nicht beobachtet. Kupper und Koautoren (2006) berichten dagegen, dass wesentliche Teile, nämlich etwa 70 %, des eingeleiteten AHTN und HHCB an den Rohschlamm adsorbierten, wovon nur etwa die Hälfte während der folgenden Schlammbehandlung abgebaut wurde. Bei weiteren Studien spielen Transformationsprozesse dagegen eine untergeordnete Rolle. Bester (2004) zeigte, dass etwa 50 % des in die Kläranlage eingetragenen HHCB und 80 % des AHTN an die Klärschlämme sorbierten und mit diesen entsorgt wurden. Yang und Metcalfe (2006) bestätigten das und berichteten, dass im Mittel etwa 76 bis 77 % des HHCB und AHTN aus der Wasserphase entfernt und dieser Anteil nahezu vollständig im Klärschlamm wiedergefunden wurde. Aufgrund des hohen Verbrauchs beider Verbindungen, des damit verbundenen hohen Eintrages in die Kläranlagen und den teilweise nur geringen Abbauraten, werden sie regelmäßig in Klärschlämmen nachgewiesen. Bei umfangreichen Untersuchungen von behandelten Klärschlämmen in Bayern, Mecklenburg-Vorpommern und

Schleswig-Holstein wurden Mediankonzentrationen zwischen 7,1 und 10,9 mg kg⁻¹ TM für HHCB und 0,7 und 1,9 mg kg⁻¹ TM für AHTN detektiert (Eurofins-AUA GmbH und PROWA GmbH, 2007; Hübner et al., 2011; Kape et al., 2006). Untersuchungen behandelte Klärschlämme einzelner Anlagen in den Vereinigten Staaten und Kanada zeigen vergleichbare Werte (Kinney et al., 2012; Yang und Metcalfe, 2006). Ein weitere Studie zeigt deutliche höhere Konzentrationen von HHCB (37,6 mg kg⁻¹ TM) und AHTN (17,7 mg kg⁻¹ TM) in behandelten Klärschlämmen U.S. amerikanischer Kläranlagen (DiFrancesco et al., 2004). Erhöhte Konzentrationen wurden auch bei der Beprobung behandelte Klärschlämme in England und Wales gefunden, wo die Mediankonzentrationen bei 26 mg kg⁻¹ für HHCB und 4,0 mg kg⁻¹ für AHTN lagen (Stevens et al., 2003).

Neben den hohen Konzentrationen in Klärschlämmen weisen verschieden Studien auf eine hohe Beständigkeit und geringe Mobilität der polycyclischen Moschusduftstoffe in Böden hin. Aus den Daten von DiFrancesco und Koautoren (2004) wurden für HHCB in klärschlammbehandelten Böden Halbwertszeiten zwischen 141 und 144 d abgeschätzt (EG, 2008). Für AHTN ist diese schätzungsweise größer als ein Jahr (DiFrancesco et al., 2004). Unter Laborbedingungen wurden für HHCB Halbwertszeiten in Böden zwischen 105 und 239 d bestimmt (HERA, 2004). In einer weiteren Studie unter Laborbedingungen wurden aus Abbauraten in klärschlammbehandelten Böden durch Extrapolation Halbwertszeiten von 10 - 17 Monaten für HHCB und 2 - 24 Jahren für AHTN ermittelt. Diese Daten sind allerdings als Richtwerte zu verstehen, da die extrapolierten Halbwertszeiten wesentlich größer als der beobachtete Zeitraum von 32 Wochen waren (Litz et al., 2007). Aufgrund der starken Sorption beider Moschusduftstoffe an Bodenbestandteile ist ihr Auswaschen bzw. Transport im Boden vernachlässigbar gering (DiFrancesco et al., 2004; Litz et al., 2007).

2.1.3 Verwendung von Klärschlämmen als Dünger in der Landwirtschaft

Die Verwendung von Klärschlämmen auf landwirtschaftlich genutzten Flächen ist nach europäischem Recht durch Richtlinie 86/278/EWG geregelt (RL 86/278/EWG, 1986). Nach dieser Richtlinie können sowohl Klärschlämme, die mit chemischen, thermischen oder biologischen Verfahren und längerfristige Lagerung behandelt wurden, als auch unbehandelte Klärschlämme verwendet werden. Unbehandelte Klärschlämme müssen jedoch in die Böden eingearbeitet werden. Die Verwendung von Klärschlämmen auf Obst- und Gemüsekulturen weniger als 10 Monate vor bzw. während der Ernte ist untersagt. Weiden und Futteranbauflächen dürfen wenigstens 3 Wochen nach der Klärschlammausbringung nicht beweidet oder geerntet werden. Bei der Ausbringung sind der Nährstoffbedarf der Pflanzen und die Bodeneigenschaften zu berücksichtigen. Grenzwerte für Schadstoffe in den

aufzubringenden Klärschlämmen und den zu behandelnden Böden sind in dieser Richtlinie nur für Schwermetalle (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg, Cr) vorgegeben. Allerdings können bei der Umsetzung dieser Richtlinie in nationales Recht auch strengere Bestimmungen festgelegt werden (RL 86/278/EWG, 1986).

In Deutschland wird diese Richtlinie durch die Klärschlammverordnung (AbfKlärV) umgesetzt. Nach dieser ist die Ausbringung von Klärschlamm auf Obst- und Gemüseanbauflächen sowie Dauergrünland verboten. Obst- und Gemüsepflanzen dürfen erst im zweiten Folgejahr nach einer Klärschlammdüngung wieder angebaut werden. Futterpflanzen können unmittelbar nach Ausbringung und Einarbeitung des Schlammes gesät werden (AbfKlärV, 2012). Durch die Klärschlammverordnung wird die auszubringende Klärschlammmenge begrenzt. Innerhalb eines Zeitraums von drei Jahren dürfen maximal 5 Tonnen Trockenmasse pro Hektar aufgebracht werden, sofern der Nährstoffbedarf der Pflanzen das erfordert bzw. es die Bodeneigenschaften zulassen. Die Aufbringung von Rohschlamm, also unbehandeltem Klärschlamm, ist in Deutschland verboten (AbfKlärV, 2012).

Im Vergleich zur Richtlinie des Europäischen Rates, wird durch die deutsche Klärschlammverordnung die Ausbringung von Klärschlämmen durch niedrigere Grenzwerte für Schwermetalle weiter eingeschränkt. Darüber hinaus sind auch Maximalgehalte für bestimmte organische Verbindungen festgelegt, deren Überschreitung ebenfalls zu einem Ausbringungsverbot führt. Für ausgewählte polychlorierte Biphenyle in Klärschlamm liegt der Grenzwert bei $0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ TM, für polychlorierte Dibenzodioxine und polychlorierte Dibenzofurane dürfen $0,1 \mu\text{g TCDD-Toxizitätsäquivalente pro Kilogramm Schlamm Trockenmasse}$ nicht überschritten werden. Für den Summenparameter der adsorbierbaren organisch gebundenen Halogene (AOX) liegt der Grenzwert bei 500 mg kg^{-1} TM (AbfKlärV, 2012). Mit Beginn des Jahres 2015 tritt zudem ein in der Düngemittelverordnung festgelegter Grenzwert für perfluorierte Tenside in Klärschlamm von $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ TM in Kraft (DüMV, 2012).

Neben den Verbindungen, für die in der Klärschlamm- und der Düngemittelverordnung Grenzwerte festgelegt wurden, können in den Klärschlämmen kommunaler Abwasserbehandlungsanlagen meist ein Vielzahl weiterer anthropogener organischer Verbindungen detektiert werden. Das Bakterizid Triclosan und die polycyclischen Moschusduftstoffe AHTN und HHCb sind prominente Beispiele hierfür. Sie werden oft in wesentlich höheren Konzentrationen als die überwachten Kontaminanten nachgewiesen. Auch wenn die Halbwertszeiten von HHCb, AHTN, Triclosan und Triclocarban im Boden geringer als die anderer lipophiler und hoch persistenter Klärschlammkontaminanten (PAKs, PCBs, PCDD/PCDF) sind, besteht aufgrund ihrer hohen Konzentrationen die Gefahr, dass signifikante Mengen in Kontakt mit landwirtschaftlich genutzten Pflanzen kommen.

2.2 Aufnahme und Verteilung von Kontaminanten in Pflanzen

2.2.1 Aufnahme- und Verteilungspfade

Der Transfer anthropogener organischer Verbindungen in Pflanzen kann über eine Reihe unterschiedlicher Pfade erfolgen, wobei die Stoffe grundsätzlich über alle ober- und unterirdischen Pflanzenteile aufgenommen werden können (Abbildung 5).

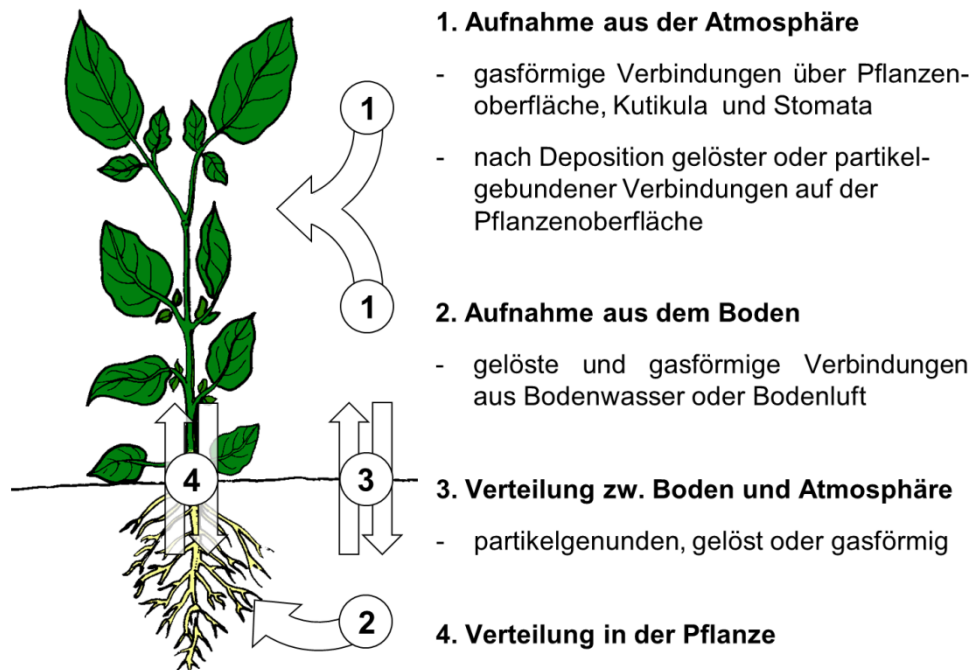


Abbildung 5. Schematische Darstellung von prinzipiellen Pfaden der Aufnahme und Verteilung von Kontaminanten in Pflanzen (nach (Collins et al., 2006; Schwarz und Jones, 1997)).

An oberirdische Pflanzenteile können organische Verbindungen in Form von Gasen, in wässriger Lösung, als Aerosole oder partikelgebunden herangetragen werden. Viele der oberirdischen Pflanzenteile, wie Früchte, Spross und vor allem Blätter, sind mit einer Kutikula aus Kutinmatrix und kutikulären Wachsen bedeckt. Diese bildet eine lipophile Grenzschicht zwischen der Pflanze und ihrer Umwelt, auf der sich Fremdstoffe ablagern können. Vor allem lipophile Verbindungen können sich in der Kutikula verteilen und durch sie hindurch in das Innere der Pflanze diffundieren. Aufgrund ihrer großen Oberfläche gilt die Kutikula als Senke für luftgetragene Kontaminanten. Gasförmige oder flüssige Kontaminanten können zudem in geringem Maße auch über die Spaltöffnungen der Blätter in das Pflanzeninnere gelangen (Collins et al., 2006; McFarlane, 1995).

Aus belasteten Böden erfolgt die Aufnahme von Kontaminanten vor allem über die Wurzel der Pflanze (Bromilow und Chamberlain, 1995). Aus dem Bodenwasser oder der Bodenluft

gelangen die Kontaminanten in den äußeren Bereich der Wurzel, in dem sich Wasser und gelöste Stoffe frei im Apoplast, also außerhalb der Zellmembranen, bewegen. Dieser Bereich spielt für die Aufnahme und Verteilung eine wichtige Rolle, da er eine große Oberfläche für Wechselwirkungen der Verbindungen mit Gewebebestandteilen bietet (McFarlane, 1995). Die Verteilung der Kontaminanten in der Wurzel und besonders der Transfer zum Leitgewebe im Wurzelinneren ist die Voraussetzung für ihre Weiterleitung in die oberirdischen Pflanzenteile. Hierfür sind prinzipiell drei Wege möglich (Abbildung 6).

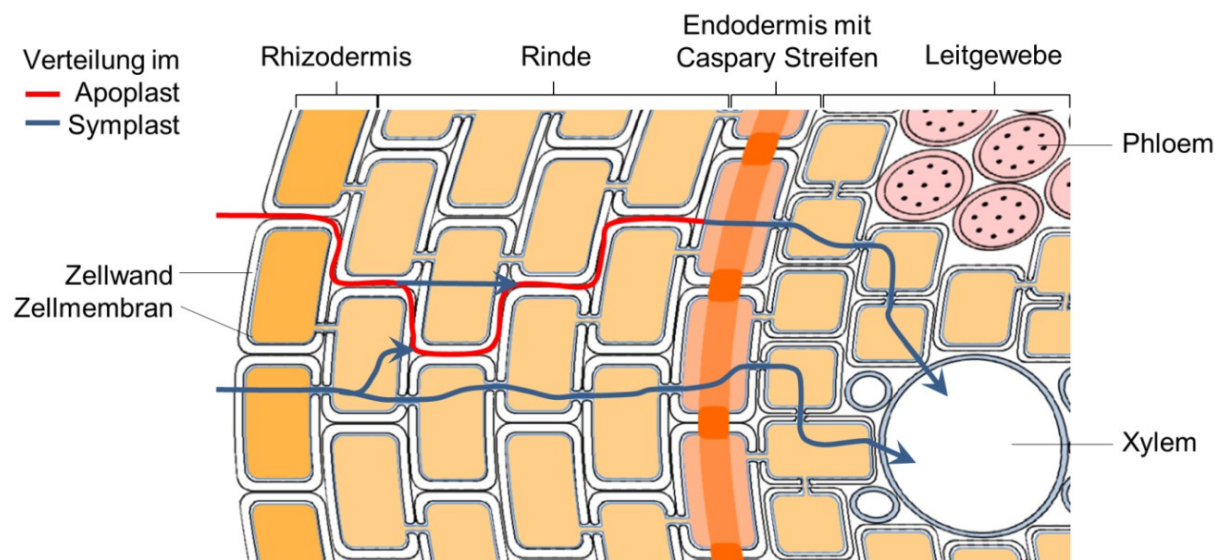


Abbildung 6. Schematische Darstellung eines Wurzelquerschnitts und mögliche Transportwege von Wasser und gelösten Stoffen von der Wurzeloberfläche in das Leitgewebe (nach (McFarlane, 1995; Satoh, 2006; Wild et al., 2005)).

Zum einen können die Verbindungen aus dem Apoplast durch Zellwand und Zellmembran permeieren und so in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Über Plasmodesmen, dünne Verbindungsstränge zwischen den Zellinneren zweier Zellen, können sich die Kontaminanten direkt von Zelle zu Zelle über den gesamten Symplast verteilen und so schließlich in das Leitgewebe gelangen, ohne durch weitere Membranen zu permeieren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Kontaminanten wieder aus dem Zellinneren austreten, über die Zellwände zweier benachbarter Zellen migrieren, um durch eine Zellmembran erneut in das Zellinnere gelangen. Als dritter Pfad ist auch die Verteilung im Apoplast möglich, ohne dass eine Zellmembran durchquert wird. Diese Verteilung im Apoplast wird allerdings an der Endodermis durch den lipophilen Caspary-Streifen begrenzt. Diesen muss die Verbindung entweder durch Diffusion überwinden oder durch Migration in das Zellinnere ausweichen, um schließlich das Leitgewebe zu erreichen. Um in das Leitgewebe im Wurzelinneren zu gelangen, muss der Kontaminant also in jedem Fall lipophile Biomembranen überwinden

(Bromilow und Chamberlain, 1995; Javot und Maurel, 2002; McFarlane, 1995; Wild et al., 2005). Im Leitgewebe befinden sich Xylem und Phloem, die dem Stofftransport dienen. Im Xylem, das vorwiegend aus toten, verholzten Zellen besteht, findet der Transport von Wasser und darin gelösten Salzen von der Wurzel in andere Pflanzenteile statt. Das Phloem dient vor allem dem Transport von Assimilationsprodukten, wie Photosyntheseprodukte und Aminosäuren, vom Ort ihrer Bildung (Blätter) in wachsende Organe oder die Speicherorgane. Erreichen die Kontaminanten das Xylem im Leitgewebe, werden sie mit dem Transpirationsstrom in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert. Dabei kommt es zu ständigen Verteilungsprozessen zwischen dem wässrigen Transpirationsstrom und den festen Bestandteilen des Xylems bzw. angrenzenden Zellen des Leitgewebes. Verbindungen, die den Transpirationsstrom in größerem Umfang erreichen und über diesen in der Pflanze verteilt werden, können in oberirdischen Pflanzenorganen mit hoher Transpiration angereichert werden, was in der Regel die ausgewachsenen Blätter sind. Verbindungen, die das Phloem des Leitgewebes erreichen und bevorzugt in diesem transportiert werden, werden dagegen vermehrt Speicherorgane oder Früchte erreichen. Ungeladene Verbindungen, die durch Biomembranen permeieren können und sowohl Xylem als auch das Phloem erreichen, werden sich bevorzugt mit dem wesentlich größeren Volumenstrom im Xylem innerhalb der Pflanze verteilen (Bromilow und Chamberlain, 1995; McFarlane, 1995).

2.2.2 Einfluss physikochemischer Eigenschaften der Kontaminanten

Die Transportprozesse, die bei Aufnahme und die Verteilung von anthropogenen Verbindungen in der Pflanze stattfinden, sind passiv. Ein aktiver Transport durch Membranen, z. B. mittels Transportproteine, findet in der Regel nicht statt. Lediglich für einige phytohormonähnliche Verbindungen gibt es Indizien für einen aktiven Transport (Bromilow und Chamberlain, 1995). Deshalb bestimmen physikochemischen Eigenschaften, wie Lipophilie und Säurestärke, in welchem Ausmaß eine Verbindung in die Pflanzen aufgenommen und in dieser verteilt wird.

Für die Aufnahme einer Verbindung aus dem Boden ist zunächst ihre Verfügbarkeit im Bodenwasser entscheidend. Diese wird durch ihre Verteilung zwischen Boden- und Bodenwasserphase, also ihrem Boden-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_d , bestimmt. Für ungeladene organische Verbindungen ist K_d vom Verteilungskoeffizienten der Verbindung zwischen dem organischen Kohlenstoff des Bodens und dem Bodenwasser K_{OC} sowie dem Gehalt des Bodens an organischem Kohlenstoff abhängig. Der K_{OC} -Wert ist proportional zum Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{OW} , der die Lipophilie einer Verbindung

charakterisiert (Bromilow und Chamberlain, 1995; Collins et al., 2006; Litz et al., 2007; Trapp, 1995). Die Verteilung eines Stoffes zwischen dem pflanzlichen Gewebe und der Wasserphase kann durch den Pflanze-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{PW} beschrieben werden, der von den Dichten beider Phasen, dem Wasser- und Lipidgehalt des Pflanzengewebes und dem K_{OW} des Stoffes abhängig ist. Durch Kombination der Verteilungskoeffizienten K_{PW} und K_d kann ein Wurzel-Boden-Verteilungskoeffizient K_{RB} berechnet werden (Trapp und Matthies, 1995). Die Verfügbarkeit eines Stoffes in der Bodenluft ergibt sich aus seiner Verteilung zwischen Gas- und Bodenwasserphase und wird durch die Henry-Konstante H des Stoffes ausgedrückt (Bromilow und Chamberlain, 1995; Trapp, 1995). Alle Verteilungskoeffizienten sind also eine Funktion des K_{OW} -Wertes, d. h. der Lipophilie einer Verbindung. Der K_{OW} -Wert ist somit grundsätzlich der Faktor, der für die Quantität des Transfers aus dem Boden und ihrer Verteilung in der Pflanze bestimmend ist. Andere strukturelle Eigenschaften, wie die Anwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen oder das Molekulargewicht scheinen nach Bromilow und Chamberlain (1995), zumindest bei ungeladenen Spezies, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Lipophilere Stoffe adsorbieren stärker an die Bodenpartikel, sind also in der Bodenwasserphase in geringerem Maße verfügbar. Auf der anderen Seite nimmt mit steigender Lipophilie die Aufnahme aus einer wässrigen Lösung in die Wurzel zu (Briggs et al., 1982; Burken und Schnoor, 1998). Auch die Verteilung innerhalb der Pflanze wird wesentlich durch die Lipophilie einer Verbindung bestimmt. Die Verteilung sehr lipophiler Verbindungen kann durch starke Sorption an Gewebebestandteile der Wurzel behindert sein. Bei sehr hydrophilen Verbindungen ist dagegen der Übergang aus der Bodenlösung in die Wurzel gering und die Verteilung innerhalb der Pflanze durch ihre beschränkte Fähigkeit durch Zellmembranen zu diffundieren begrenzt (Bromilow und Chamberlain, 1995; Trapp, 2000).

Die Effizienz der Aufnahme einer Verbindung in die Wurzel wird mit dem Wurzelkonzentrationsfaktor (RCF, *root concentration factor*) beschrieben. Dieser ist als Verhältnis der Konzentration einer Verbindung im Wurzelgewebe zur Konzentration im umgebenden Medium, wie das Nährmedium hydroponischer Kulturen oder das Bodenwasser bei im Boden kultivierten Pflanzen, definiert. Als Maß für den Transfer einer Verbindung in die oberirdischen Pflanzenteile, wird der Transpirationsstromkonzentrationsfaktor (TSCF, *transpiration stream concentration factor*) genutzt, der als Verhältnis der Konzentration einer Verbindung im Xylemsaft zur Konzentration im umgebenden Medium definiert ist (Briggs et al., 1982; Bromilow und Chamberlain, 1995; Ryan et al., 1988; Trapp, 2002; Wild und Jones, 1992). Untersuchungen mit hydroponischen Systemen zeigen, dass Verbindungen mit

moderaten $\log K_{OW}$ -Werten besonders stark in oberirdische Pflanzenteile weitergeleitet werden und die TSCF-Werte der Verbindungen bei einem $\log K_{OW}$ -Werte um 2 ein Maximum erreichen (Briggs et al., 1982; Burken und Schnoor, 1998, Abbildung 7). Die genauen Gründe für dieses Optimum scheinen bislang nicht ausreichend geklärt. Im Gegensatz dazu zeigen neuere Untersuchungen eine besonders starke Aufnahme polarer Verbindungen aus einer Nährlösung in Pflanzen und eine negative sigmoidale Korrelation zwischen den TSCF-Werten der Verbindungen und den $\log K_{OW}$ -Werten (Dettenmaier et al., 2009, Abbildung 7).

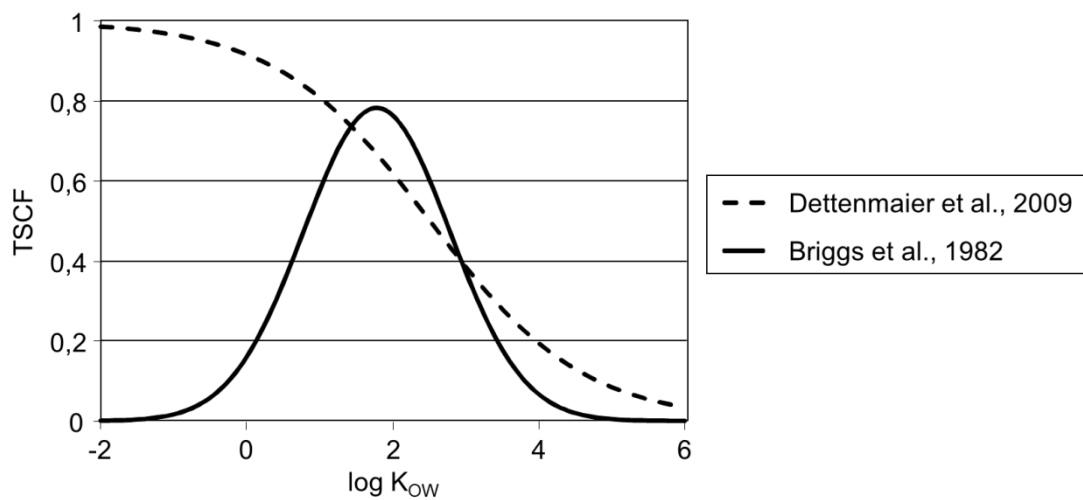


Abbildung 7. Abhängigkeit der Transpirationsstromkonzentrationsfaktoren (TSCF) von Kontaminanten von deren Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (als $\log K_{OW}$) nach Modellen von Briggs und Koautoren (1982) und Dettenmaier und Koautoren (2009).

Neben der Lipophilie, kann die Säurestärke einer Verbindung Einfluss auf deren Aufnahme und Mobilität in der Pflanze haben. So sinkt die Aufnahme einer schwachen Säure in die Wurzel mit steigendem pH-Wert der Lösung, also mit steigendem Anteil der dissoziierten Spezies (Briggs et al., 1987; Bromilow und Chamberlain, 1995). Bei konstantem pH-Wert der Bodenlösung werden deshalb Verbindungen mit einem höheren pK_S -Wert stärker aufgenommen. Außerdem migrieren ionische Spezies organischer Kontaminanten in einem wesentlich geringeren Umfang durch lipophile Biomembranen als nicht-ionische Spezies. Sie sind daher in der Pflanze wenig mobil. Bei schwachen Säuren kann aufgrund unterschiedlicher pH-Werte in einzelnen Gewebeteilen ein so genannter Ionenfallenmechanismus auftreten. Dabei migrieren nicht-ionische Spezies aus einem Bereich mit niedrigerem pH-Wert, wie dem Apoplast (pH 5,0) durch eine Membran in einen Bereich mit höherem pH-Wert, wie dem Zytoplasma (pH 7,5). Dort dissoziieren diese, wodurch sie wesentlich schlechter durch Membranen diffundieren und sich so unter Umständen in einem Pflanzenteil anreichern können (Bromilow und Chamberlain, 1995; Trapp, 2000). Schwache Säuren

können aufgrund dieses Effektes unter Umständen im Phloem mobiler als im Xylem sein, wenn sie, bei den im Vergleich zum Xylem und Apoplast höheren pH-Wert, dissoziieren und so das Phloem nicht wieder verlassen können (Bromilow und Chamberlain, 1995; Paterson et al., 1990).

Bei der Interpretation bzw. Abschätzung der Aufnahme und Verteilung einer Verbindung anhand von Verteilungskoeffizienten, wie dem K_{OW} -Wert, ist zu berücksichtigen, dass diese Konzentrationen im Gleichgewicht beschreiben. Unter Gewächshaus- und Feldbedingungen kann jedoch nicht zwingend vorausgesetzt werden, dass sich diese Verteilungsgleichgewichte in den untersuchten Zeiträumen einstellen. Lipophile Verbindungen zum Beispiel, diffundieren im Pflanzengewebe nur sehr langsam (Trapp, 2002). Ein Zustand nahe dem Verteilungsgleichgewicht stellt sich bei feinen Wurzeln aufgrund des hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses eher ein als bei dickeren Wurzeln, in der die Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt dagegen weit vom Gleichgewicht entfernt sein können (Trapp und Matthies, 1995). Aus diesem Grund wird durch Anwendung von dynamischen Aufnahmemodellen versucht, kinetische Effekte einzubeziehen (Trapp, 2002).

Trotz Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit der Modelle auf Feldbedingungen (Topp et al., 1986), können anhand der physikochemischen Eigenschaften eines Kontaminanten dessen Aufnahme und Verteilung in einer Pflanze im Allgemeinen ausreichend gut abgeschätzt bzw. erklärt werden (Bromilow und Chamberlain, 1995). Der Metabolismus einer aufgenommenen Verbindung kann dagegen sehr pflanzenspezifisch sein, ist deshalb schwer vorherzusagen und muss zunächst experimentell bestimmt bzw. der Literatur entnommen werden (Trapp und Matthies, 1995). Daten für die Entwicklung von Aufnahme- und Verteilungsmodellen werden meist mit hydroponischen Kulturen und verhältnismäßig kurzen Expositionszeiten von einigen Stunden bis wenigen Tagen erzeugt (Briggs et al., 1982; Burken und Schnoor, 1998; Dettenmaier et al., 2009), wobei angenommen wird, dass die Metabolisierung der Verbindungen in der Pflanze vernachlässigt werden kann. In Aufnahmestudien unter Gewächshausbedingungen (> 100 d) wird dagegen häufig argumentiert, dass ein Teil der aufgenommenen Mengen metabolisiert und deshalb nicht detektiert worden sein könnte (Boxall et al., 2006; Wu et al., 2010). Diese These wird jedoch meist nicht weiter untersucht.

2.3 Metabolismus von Kontaminanten in Pflanzen

Pflanzen sind in der Lage, aufgenommene organische Verbindungen natürlichen und anthropogenen Ursprungs zu metabolisieren. Die dabei stattfindenden Prozesse lassen sich grundsätzlich in drei Phasen einteilen (Cole, 1994; Komoša et al., 1995; Sandermann Jr., 1992). In Phase I kommt es zur Funktionalisierung oder Aktivierung des Moleküls, indem reaktive funktionelle Gruppen eingeführt oder freigesetzt werden. Darauf folgt die Konjugation mit polaren niedermolekularen endogenen Verbindungen in Phase II, woran sich in Phase III die Kompartimentierung, Immobilisierung und Speicherung der Metaboliten anschließt (Abbildung 8) (Coleman et al., 1997; Doran, 2009; Komoša et al., 1995; Sandermann Jr., 1992). Anders als in Säugetieren, werden die Metaboliten in der finalen Phase des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus nicht ausgeschieden, sondern verbleiben im Organismus. Trotzdem wurde aufgrund der vielen Analogien zum Fremdstoffwechsel in Säugetieren, für die in Pflanzen stattfindenden Prozesse das „*green liver concept*“ - das Konzept der grünen Leber etabliert (Burken, 2003; Sandermann Jr., 1992).

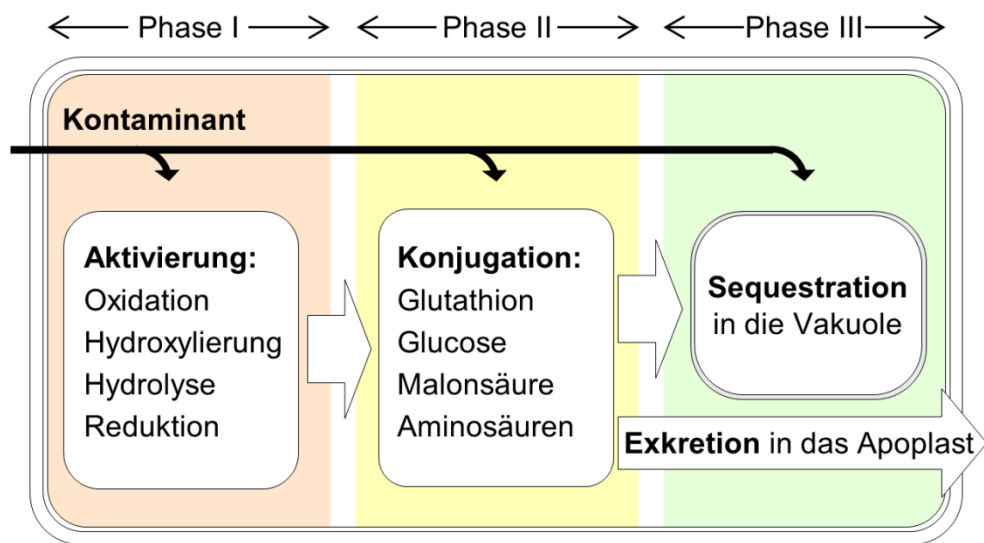


Abbildung 8. Schematische Darstellung des 3-Phasen-Konzeptes zum pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus (nach (Coleman et al., 1997)).

Der überwiegende Teil der beim pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus stattfindenden Transformationsreaktionen ist enzymkatalysiert. Die beteiligten Enzyme erfüllen ursprünglich wichtige Funktion beim Metabolismus natürlicher Verbindungen endogenen und exogenen Ursprungs (Burken, 2003; Kreuz et al., 1996; Sandermann Jr., 1992). Die stattfindenden Reaktionen, die Umsatzraten und resultierenden Metaboliten eines Kontaminanten sind pflanzenspezifisch (Coleman et al., 1997). Ein Abbau bis hin zur Mineralisation der Kontaminanten findet in Pflanzen nicht statt oder spielt zumindest eine stark untergeordnete

Rolle (Coleman et al., 1997; Doran, 2009; Komoßa et al., 1995; Malcherek et al., 1998; Schmidt et al., 1994; van der Krol et al., 1995).

2.3.1 Phase-I-Reaktionen

In der ersten Phase des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus kommt es zur enzymkatalysierten Einführung polarer funktioneller Gruppen, wie Hydroxy-, Amino-, Thiol- und Carboxylgruppen. Dadurch wird das Molekül für die folgenden Metabolisierungsreaktionen aktiviert oder funktionalisiert. Oxidationsreaktionen, besonders die durch P450-Monooxygenasen katalysierte Hydroxylierung am Aromaten oder Aliphaten, spielen dabei eine besonders wichtige Rolle (Burken, 2003; Cole, 1994; Coleman et al., 1997; Komoßa et al., 1995). Des Weiteren werden häufig auch durch N- und S-Oxidation, Epoxidierung sowie N- und O-Dealkylierung reaktive funktionelle Gruppen geschaffen. Reduktionen treten dagegen selten auf (Cole, 1994; Komoßa et al., 1995). Zudem können bei Carbon- und Phosphorsäureestern sowie Carbamaten und Aniliden Hydrolysereaktionen auftreten (Komoßa et al., 1995), durch die reaktive funktionelle Gruppen für den folgenden Phase-II-Metabolismus gebildet werden. Liegt bei den Ausgangsverbindungen bereits eine geeignete funktionelle Gruppe vor, können diese direkt Reaktionen des Phase-II-Metabolismus eingehen (Burken, 2003; Coleman et al., 1997).

Die aus dem Phase-I-Metabolismus resultierenden Produkte sind meist polarer als die Ausgangsverbindungen, aber nicht immer sind sie im pflanzlichen Gewebe weniger toxisch. Einige Herbizide etwa werden in einer inaktiven Form als Proherbizid appliziert und erst im pflanzlichen Gewebe in die aktive, phytotoxische Form überführt. Ein Grund für diese Art der Applikation ist die bessere Aufnahme des lipophileren Proherbizids. Außerdem können so spezifische Pflanzen behandelt werden, wenn in den Unkräutern eine Aktivierung stattfindet, in der Nutzpflanze aber nicht (Cole, 1994).

2.3.2 Phase-II-Reaktionen

In Phase-II des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus erfolgt die enzymkatalysierte Bildung von Konjugaten mit polaren niedermolekularen endogenen Biomolekülen. Eine zentrale Rolle spielt in vielen Fällen die Konjugation mit Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-cysteinylglycin) (Komoßa et al., 1995). Durch den nukleophilen Angriff der Cystein-Thiolgruppe des Glutathions an ein elektrophiles Zentrum des Fremdstoffmoleküls kommt es zur Ausbildung einer Thioetherbindung. Das Vorhandensein einer polaren funktionellen Gruppe ist deshalb nicht notwendig. Die Konjugation mit Glutathion kann unter Umständen ohne Enzymkatalyse

ablaufen, wird aber meist durch eine der substratspezifischen Glutathion-S-Transferasen katalysiert (Cole, 1994; Coleman et al., 1997; Komoßa et al., 1995).

Eine weitere, sehr häufig beobachtet Phase-II-Reaktion ist die Glycosylierung, die besonders bei Kontaminanten mit alkoholischen und phenolischen Hydroxygruppen auftritt (Komoßa et al., 1995). Unter Katalyse einer O-Glucosyltransferase und Verbrauch von Uridindiphosphat-Glucose werden durch Ausbildung einer glycosidischen Bindung die β -O-D-Glucoside gebildet (Coleman et al., 1997; Komoßa et al., 1995). Aus Carbonsäuren können auch die entsprechenden Glucoseester und aus primären und sekundären Aminen unter Katalyse von N-Glycosyltransferasen die N-Glucoside gebildet werden (Cole, 1994; Komoßa et al., 1995; Sandermann Jr., 1992).

Glucosekonjugate sind im pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus oft Intermediate und die Grundlage für die Bildung einer Reihe weiterer Metaboliten. So führt die Addition weiterer Hexosen und Pentosen zur Bildung von Di- und Oligosaccharidkonjugaten. Bei den Hexosen handelt es sich meist ebenfalls um β -Glucose, während die Pentosen Xylose, Arabinose und Apiose in Oligosaccharidkonjugaten beobachtet werden (Day und Saunders, 2004; Komoßa et al., 1995; Laurent et al., 2007; Malcherek et al., 1998; Pascal-Lorber et al., 2004). Die Glucoside können zudem unter Katalyse von O-Malonyltransferasen mit Malonsäure verestert werden (Day und Saunders, 2004; Laurent et al., 2000; Laurent et al., 2007; Malcherek et al., 1998; Pascal-Lorber et al., 2004). N-Malonyltransferasen können die Malonylierung von Aminen katalysieren (Schmidt et al., 1995). Die Malonylierung kann als finaler Schritt dieses Pfades des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus verstanden werden; sie schützt nicht nur das Glucosid vor einer enzymatischen Spaltung durch Glycosidasen, sie dient vermutlich auch als Signal für den Transport des Metaboliten in die Vakuole oder das Apoplast (Komoßa et al., 1995; Sandermann Jr., 1992; Schmitt et al., 1985).

Anders als im Säugetierorganismus, spielt beim pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus die Konjugation von alkoholischen oder phenolischen OH-Gruppen mit Sulfat eine vergleichsweise geringe Rolle (Cole, 1994). Erst eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt die Sulfatkonjugate hydroxylierter Transformationsprodukte des 4-Chlorbiphenyls und damit die direkte Sulfatierung phenolischer OH-Gruppen von Kontaminanten in Pflanzen (Zhai et al., 2012). Zudem kann es in Pflanzen zur Bildung von Sulfoglucosiden durch Sulfatierung eines Glucosekonjugates kommen, wie bei einer Studie zum Metabolismus von 2,4-Dichlorphenol beobachtet wurde (Laurent et al., 2000). Ebenfalls recht selten wird die Bildung von Amiden aus Kontaminanten mit Carboxylgruppe und Aminosäuren, wie zum Beispiel Glutamin- und Asparaginsäure, beobachtet (Cole, 1994; Komoßa et al., 1995; Lewer und Owen, 1989).

Die durch den Phase-II-Metabolismus entstandenen Konjugate sind im Allgemeinen nicht toxisch bzw. weniger toxisch als die Ausgangsverbindung (Coleman et al., 1997). Im Gegensatz zur Konjugation mit Glutathion, ist die Bildung von Sulfaten, Glucosiden, Malonylglucosiden sowie Oligosacchariden aber ein reversibler Prozess, weil die Freisetzung der Ausgangsverbindungen durch Hydrolyse möglich ist (Cole, 1994). Die Erhöhung der Polarität bis hin zur Bildung geladener Metaboliten in Phase II vermindert deren Fähigkeit Biomembranen zu überwinden stark, was die passive Verteilung in der Zelle oder im Gewebe einschränkt (Cole, 1994; Coleman et al., 1997; Doran, 2009).

2.3.3 Phase-III-Reaktionen

Die Prozesse, die der dritten Phase des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus zugeordnet werden, unterscheiden sich wesentlich von denen der Säugetiere. Aus dem Säugerorganismus werden die in Phase-I und II gebildeten Metaboliten über Urin oder Fäzes ausgeschieden. Pflanzen verfügen über kein vergleichbares Organsystem und nutzen dagegen Kompartimentierungs- und Speicherprozesse, um die Stoffe von wichtigen metabolischen Prozessen zu isolieren (Burken, 2003; Cole, 1994; Coleman et al., 1997; Komoßa et al., 1995). Diese führen zur Anreicherung von Metaboliten in wenigstens drei unterschiedlichen Kompartimenten, nämlich der Vakuole, dem Apoplast und der Zellwand (Burken, 2003; Cole, 1994; Coleman et al., 1997; Komoßa et al., 1995; Sandermann Jr., 1992). Der Transfer in diese Kompartimente erfordert die Passage durch Biomembranen, wie dem Tonoplast und der Zellmembran. Das setzt einen aktiven Transport der polaren, teilweise in ionischer Form vorliegenden Metaboliten durch ATP-abhängige Transportproteine voraus (Cole, 1994; Coleman et al., 1997). In der Vakuole und dem Apoplast erfolgt die Speicherung der Metaboliten in gelöster Form, während durch kovalente Bindungen der Metaboliten an Zellwandbestandteile, wie Pektin, Lignin, Zellulose oder Hemicellulose, die Bildung gebundener Rückstände erfolgen kann. Diese gebundenen Rückstände sind mit herkömmlichen Lösemitteln nicht extrahierbar und deshalb analytische schwer zu erfassen bzw. zu charakterisieren (Burken, 2003; Cole, 1994; Coleman et al., 1997; Doran, 2009; Komoßa und Sandermann Jr., 1992).

Das Wissen zum pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus resultiert überwiegend aus Untersuchungen mit Herbiziden, Insektiziden, ihren Transformationsprodukten und verwandten Verbindungen (Doran, 2009; Komoßa et al., 1995). Da diese Verbindungen vorsätzlich in den Kontakt mit Pflanzen gebracht werden, ist die Relevanz von Kenntnissen über ihre Aufnahme, Wirkung, ihr Verbleib und des pflanzenspezifischen Metabolismus in Nutz- und Schadpflanzen leicht nachvollziehbar. Neben Pestiziden wurden bisher auch

einzelne anthropogene Stoffe, die unbeabsichtigt in die Umwelt gelangen, hinsichtlich ihres Verhaltens in Pflanzen untersucht. So wurde der Metabolismus von Sprengstoffen und Pharmaka unter dem Gesichtspunkt der Phytoremediation von kontaminierten Böden durch Bepflanzung oder von Abwässern in Pflanzenkläranlagen untersucht (Doran, 2009; Huber et al., 2009; Huber et al., 2012). Im Kontext einer möglichen Kontamination von Nahrungspflanzen durch die Düngung mit Klärschlämmen ist bereits der Metabolismus von Bisphenol A bestimmt worden (Schmidt und Schuphan, 2002). Auch wenn die grundsätzlichen Mechanismen des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus verstanden sind, ist das Schicksal vieler Umweltkontaminanten in Pflanzen, vor allem im Kontext einer möglichen Kontamination von Nutzpflanzen, bisher nur unzureichend untersucht.

2.3.4 *In vitro*-Systeme für die Untersuchung des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus

Untersuchungen zum pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus unter Feld- oder Gewächshausbedingungen sind anspruchsvoll, zeit- und platzaufwändig. In den komplexen Systemen können verschiedene biotische und abiotische Faktoren das Verhalten der Verbindungen sowie den physiologischen Zustand der Pflanze beeinflussen, was zu schwer reproduzierbaren Ergebnissen führen kann. Darüber hinaus können abiotische und mikrobielle Transformationsprozesse auftreten, die eine Identifizierung der Produkte des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus erschweren. Diese Probleme können durch die Arbeit unter Laborbedingungen mit axenischen Kulturen vermieden werden, da diese frei von anderen Organismen sind und reproduzierbare Kultivierungsbedingungen leichter gewährleistet werden können (Doran, 2009; Sandermann Jr. et al., 1984; Schuphan et al., 1984). Außerdem sind durch gezielte Veränderung der Kultivierungsbedingungen, z. B. Zusammensetzung von Nährmedium oder Phytohormonen, der physiologische Status und die metabolische Kapazität der Zellen leicht zu manipulieren (Sandermann Jr. et al., 1984). Weiterhin ist der Zeit-, Platz- und Ausrüstungsbedarf für *in vitro*-Kulturen im Gegensatz zur Arbeit mit Pflanzen im Gewächshaus oder Feld vergleichsweise gering.

Man unterscheidet im Allgemeinen drei Arten axenischer *in vitro*-Kulturen, nämlich undifferenzierte Zellen als Kallus- oder Suspensionskulturen, Gewebekulturen isolierter Pflanzenorgane und intakte Pflanzen (Doran, 2009). Bei Studien zum Fremdstoffmetabolismus werden vor allem Zellsuspensionskulturen und Gewebekulturen eingesetzt. Ein Überblick über bisherige Arbeiten wird unter anderem von Komoßa und Koautoren (1995) sowie Doran (2009) gegeben. Die Zellsuspensions- und Gewebekulturen werden meist heterotroph unter Lichtausschluss kultiviert, sodass nicht nur mikrobielle,

sondern auch photochemische Transformationsprozesse der zu untersuchenden Kontaminanten ausgeschlossen sind (Komoša et al., 1995; Sandermann Jr. et al., 1984).

In Suspensionskulturen werden einzelne bzw. kleine Aggregate undifferenzierter Zellen in einem flüssigen Nährmedium kultiviert. Im Gegensatz zu organisiertem Gewebe, sind bei den Suspensionskulturen viele für Aufnahme und Verteilung der Kontaminanten entscheidende Barrieren, wie z. B. die Kutikula oder Rhizodermis, nicht vorhanden. Zudem begünstigt die große Oberfläche des Zellmaterials den Stoffaustausch mit dem umgebenden Nährmedium. Aufnahme- und Transportprozesse sind deshalb für die Metabolisierungsraten kein entscheidend limitierender Faktor, weshalb der Umsatz in Zellsuspensionen wesentlich höher als in intakten Pflanzen ist (Doran, 2009; Komoša et al., 1995; Smeda und Weller, 1991). Die in dieser Arbeit verwendeten Karottenzellsuspensionskulturen sind in Abbildung 9 gezeigt.

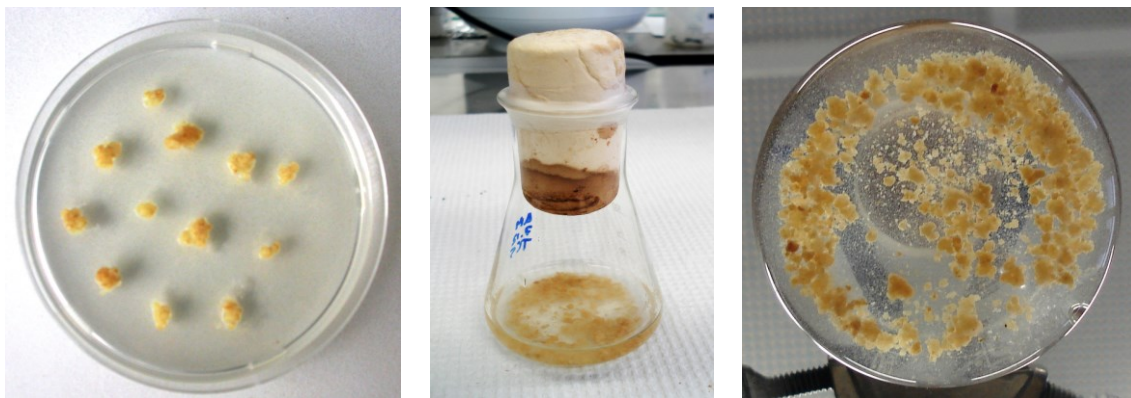


Abbildung 9. Karottenzellkulturen als Kalluskultur auf Festmedium (links) in einer Petrischale und als Suspensionskultur in Flüssigmedium in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben, seitlich (mitte) und von unten (rechts) fotografiert.

Zu Beginn der 1980er Jahre wurde ein standardisierter Test entwickelt, um die Ergebnisse zur Metabolisierbarkeit einzelner Verbindungen auch zwischen Laboren besser vergleichen zu können. Dieser 48 stündige Metabolisierungstest mit axenischen Weizen- und Sojazellsuspensionskulturen wurde vorwiegend für die Arbeit mit ^{14}C -markierten Verbindungen konzipiert (Ebing et al., 1984; Haque et al., 1984; Harms und Langebartels, 1986; Schuphan et al., 1984) und liefert auch zwischen unterschiedlichen Laboren reproduzierbare Ergebnisse. Bei einem Ringversuch zwischen drei Laboratorien lagen die Standardabweichungen für die Metabolisierungsraten von drei Verbindungen zwischen 10 und 20 %. Die Auswertung weiterer publizierter Daten lässt ebenfalls auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schließen (Komoša et al., 1995; Sandermann Jr. et al., 1984). Auch wenn der standardisierte Test mit Weizen- und Sojakulturen durchgeführt wurde, sind Zell- und Gewebekulturen prinzipiell auch von vielen anderen Nutzpflanzen verfügbar,

wie verschiedene Studien und Übersichtsartikel zeigen (Doran, 2009; Schmidt et al., 1994; Schmidt und Schuphan, 2002; van der Krol et al., 1995).

Biologisch komplexere Systeme sind dagegen Gewebekulturen, die häufig als Haarwurzelkulturen oder *hairy root* Kulturen eingesetzt werden (Doran, 2009). Haarwurzelkulturen werden durch die Infektion von pflanzlichen Gewebeteilen mit dem *Agrobacterium rhizogenes* initiiert, die durch genetische Transformation mit bakterieller DNS die Ausbildungen feiner Wurzelhaare zur Folge hat (Doran, 2009; Nepovim et al., 2004). Haarwurzelkulturen zeigen auch über einen längeren Zeitraum sehr stabile und reproduzierbare Eigenschaften und zeichnen sich durch einen raschen Biomassezuwachs aus. Im Gegensatz zu undifferenzierten Pflanzenzellen, ist bei ihrer Kultivierung eine Zugabe exogener Phytohormone nicht notwendig. Zudem ist das organisierte Gewebe in Struktur und Funktion den Organen intakter Pflanzen wesentlich ähnlicher (Doran, 2009; Nepovim et al., 2004). Aufgrund der großen Wurzeloberfläche ist auch bei diesen Kulturen von einer raschen Aufnahme der Fremdstoffe aus dem Nährmedium in das Innere des Gewebes auszugehen, sodass ein vergleichsweise hoher und schneller Umsatz der Ausgangsverbindung stattfindet. Die in dieser Arbeit untersuchte Meerrettich-Haarwurzelkultur ist in Abbildung 10 dargestellt.

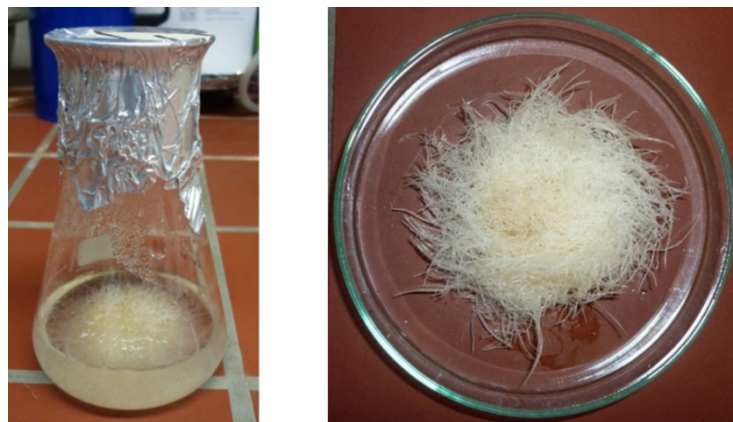


Abbildung 10. Meerrettich-Haarwurzelkultur in Flüssigmedium im 500-ml-Erlenmeyerkolben (links) und nach dem Absaugen des Nährmediums in einer Petrischale (rechts).

Beim Fremdstoffmetabolismus werden in Pflanzenzell- und Gewebekulturen die gleichen Stoffwechselwege in Anspruch genommen wie in intakten Pflanzen. Das heißt, es werden die gleichen Metaboliten gebildet, die Metabolitmuster unterscheiden sich in der Regel nur in den relativen Mengen einzelner Metaboliten (Doran, 2009; Harms, 1992; Komosa et al., 1995). Allerdings kann es bei Zellkulturen unter Umständen zu einem selektiven Verlust einzelner Enzymaktivitäten kommen, sodass im Gegensatz zur intakten Pflanze, einzelne Metaboliten nicht gebildet werden (Cole, 1994; Doran, 2009; Edwards und Owen, 1986, 1988; Frear und Swanson, 1975).

Der, im Vergleich zu intakten Pflanzen, schnelle und hohe Umsatz der Ausgangsverbindung in den Zellsuspensions- und Gewebekulturen birgt auch unter analytischen Gesichtspunkten entscheidende Vorteile. Die erhöhten Metabolitkonzentrationen mit vergleichsweise geringer Matrixbelastung der Extrakte erleichtern die Probenaufarbeitung und besonders den Nachweis und die Strukturaufklärung der gebildeten Metaboliten (Cole, 1994). In Metabolisierungsstudien mit Pflanzen und Pflanzengewebekulturen werden häufig radioaktiv (z. B. ^{14}C) markierte Verbindungen eingesetzt (Komoša et al., 1995; Laurent et al., 2007; Malcherek et al., 1998; Pascal-Lorber et al., 2004; Schmidt et al., 1994; Schmidt und Schuphan, 2002; van der Krol et al., 1995). Der Einsatz radioaktiv markierter Verbindungen erlaubt den einfachen, empfindlichen und sicheren Nachweis sowie die Quantifizierung der Ausgangsverbindung und ihrer Metaboliten. Informationen zur Strukturaufklärung der Metaboliten erhält man damit jedoch nicht. Diese erfordert den Einsatz zusätzlicher Techniken, wie massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Methoden.

2.4 Probenvorbereitungstechniken zur Extraktion und Anreicherung von Analyten aus verschiedenen Matrices

Die quantitative gas- oder flüssigchromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Spurenstoffen in komplexen Matrices, wie Boden- oder Pflanzenproben, setzt den Einsatz von Probenvorbereitungstechniken voraus. Diese haben das Ziel, die zu untersuchenden Analyten möglichst vollständig und reproduzierbar aus der entsprechenden Probe zu extrahieren und so anzureichern, dass sie der instrumentellen Analyse zugänglich sind. Zudem zielen sie darauf ab, den Anteil der begleitenden Matrixverbindungen zu minimieren, da sich diese störend auf die Analyse auswirken können. Die in der Arbeit verwendeten Methoden sind im Folgenden kurz dargestellt.

2.4.1 Die QuEChERS-Extraktionsmethode für Pflanzenproben

Die Extraktion aller für diese Arbeit untersuchten Pflanzenproben wurde mit der QuEChERS-Methode (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) durchgeführt. Der Ablauf der Methode besteht aus drei grundlegenden Schritten: 1) Extraktion der feuchten, homogenisierten Pflanzenproben mit einem organischen Lösemittel, 2) Trennung der organische und anorganischen Phase durch Zugabe von Salzen und 3) Clean-Up der Extrakte mittels dispersiver Festphasenextraktion an einem Gemisch verschiedener Sorbentien wie Aktivkohle und dem PSA-Sorbens (*primary secondary amine*). Die Methode wird vorwiegend im Bereich der Lebensmittelanalytik als Probenvorbereitungstechnik für Multikomponentenmethoden eingesetzt (Anastassiades et al., 2003; Paya et al., 2007).

2.4.2 Ultraschallunterstützte Lösemittelextraktion von Bodenproben

Die Extraktion aller für diese Arbeit untersuchten Bodenproben erfolgte mittels ultraschallunterstützter Lösemittelextraktion. Dabei wird das Extraktionsgut mit einem organischen Lösemittel versetzt und über eine Sonotrode mit gerichtetem Ultraschall in gepulsten Intervallen behandelt. Das bewirkt eine Bewegung, Verteilung und Vergrößerung der Oberfläche des Extraktionsgutes. Das Ziel ist, den Übergang der Analyten in das Lösemittel zu begünstigen und so die Extraktionsausbeute zu erhöhen. Die ultraschallunterstützte Lösemittelextraktion kann beispielsweise nach der EPA-Methode 3550C für die Extraktion von semi- und schwerflüchtigen Verbindungen aus Böden, Schlämmen oder Abfällen angewendet werden (EPA, 2007).

2.4.3 Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)

Bei den Metabolisierungsstudien wurde ein Teil der untersuchten Ausgangsverbindungen in den wässrigen Extrakten des Zellmaterials und den Nährmedien der Pflanzenzell- und Gewebekulturen mittels GC-MS quantifiziert. Die Extraktion und Anreicherung der Analyten vor der Aufgabe in den Gaschromatographen erfolgte mittels Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (*headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME). Bei der SPME wird eine dünne, mit einem Sorbens beschichtete Quarz- oder Metallfaser in der wässrigen Probe oder der Gasphase (Dampfraum) über der Probe exponiert. Das Prinzip der SPME beruht auf der Verteilung der Analyten zwischen flüssiger beziehungsweise gasförmiger Phase und dem Sorbens, in dem sie sich durch Adsorption oder Absorption anreichern. Die Desorption der Analyten erfolgt thermisch im Injektor des Gaschromatographen. Ein Vorteil der HS-SPME ist die Abtrennung nichtflüchtiger Matrixbestandteile, die in der wässrigen Phase verbleiben und die Anreicherung der Analyten und deren Analyse nicht beeinflussen können. Sie setzt allerdings eine ausreichende Flüchtigkeit der Analyten voraus.

2.5 Massenspektrometrische Analysetechniken für den Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen

Trotz des Einsatzes teils aufwändiger Extraktions- und Anreicherungstechniken liegen die Analyten in den Extrakten oft in geringen Konzentrationen vor. Zusätzlich können koextrahierte Matrixbestandteile eine Analyse erschweren. Neben einer guten gas- oder flüssigchromatographischen Trennung der Analyten und dem Einsatz einer geeigneten Ionisierungstechnik, sind für einen empfindlichen qualitativen und quantitativen Nachweis entsprechende massenspektrometrische Analysetechniken wichtig. Die Anwendung dieser Techniken ist sowohl von der Problemstellung als auch von der verfügbaren instrumentellen Ausstattung abhängig.

Gas- und Flüssigchromatographen können mit Quadrupol-, Flugzeit-, Sektorfeld- oder verschiedenen Ionenfallen-Massenspektrometern gekoppelt werden, die sich durch ihren detektierbaren Massenbereich und die Massenauflösung unterscheiden. Während Quadrupol-Massenspektrometer Nominalmassen detektieren, ermöglicht die Anwendung von Flugzeit- und Tandem-Sektorfeld-Massenspektrometer die Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren. Durch Kopplung von mehreren Massenspektrometern oder dem Einsatz von Ionenfallen werden sogenannte MS/MS-Experimente (Tandem-Massenspektrometrie) ermöglicht, die die Selektivität und Sensitivität bei der Quantifizierung von Analyten erhöhen. Außerdem lässt sich damit das Fragmentierungsverhalten unbekannter Verbindungen untersuchen, anhand dessen Informationen für ihre Identifizierung abgeleitet werden können. Eine häufig verwendete Kombinationen sind Triple-Quadrupol-Geräte, bei denen der erste und dritte Quadrupol als Massenanalysator betrieben wird. Der zweite Quadrupol dient als Kollisionszelle, in der den Ionen durch Anlegen eines Potentials kinetische Energie (Kollisionsenergie) zugeführt wird. Stöße mit einem in der Kollisionszelle befindlichen Inertgas führen zur energetischen Anregung der Vorläuferionen und zu deren kollisionsinduzierten Dissoziation (Fragmentierung) unter Bildung von Ionen und neutralen (ungeladenen) Molekülen.

2.5.1 Quantifizierung von Analyten mittels Selected Ion Monitoring (SIM) und Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Bei der quantitativen Bestimmung bekannter Verbindungen, wird zur Erhöhung der Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Analyse der Selected Ion Monitoring-Modus (SIM) eingesetzt. Diese Analysetechnik wird meist bei Massenspektrometern mit nur einem Massenanalysator angewendet. Dabei passieren nur einzelne, substanzspezifische Ionen mit

einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) den Massenanalysator und erreichen den Detektor.

Die Quantifizierung einer Verbindung mit einem Triple-Quadrupol-Gerät erfolgt im Multiple Reaction Monitoring-Modus (MRM). Beim MRM-Modus wird im ersten Quadrupol ein substanzspezifisches Ion, üblicherweise das protonierte bzw. deprotonierte Molekül, ausgewählt und in der Kollisionszelle fragmentiert. Von den dort entstehenden Produktionen passiert nur eins den zweiten Quadrupol und wird detektiert. Das führt zu einer stark erhöhten Selektivität der Analyse. Matrixkomponenten und Untergrundsignale werden ausgeblendet, sodass sehr geringen Nachweisgrenzen erzielt werden können.

2.5.2 Produktionen-Analyse

Die Produktionenanalyse ist eine MS/MS-Technik, die zur Strukturaufklärung von unbekanntem Verbindungen beitragen kann. Dabei wird im ersten Massenanalysator ein Ion selektiert und in der Kollisionszelle zur Fragmentierung gebracht. Die gebildeten Produktionen werden im zweiten Massenspektrometer entsprechend ihrer m/z getrennt und am Detektor registriert. Aus den daraus resultierenden Produktionen-Spektren lassen sich Erkenntnisse über vorhandene funktionelle Gruppen und größere Molekülstrukturen ableiten. So ist der Verlust von CO_2 mit 44 u ein Hinweis auf eine Carboxygruppe. Der Neutralverlust von 80 u kann als Verlust von SO_3 von Sulfat- oder Sulfonatgruppen interpretiert werden.

2.5.3 MS^E -Analyse als Spezialfall der Produktionen-Analyse

Bei der MS^E -Technik (Eigenname der Fa. Waters) handelt es sich um eine massenspektrometrische Analysetechnik, die für Flugzeit-Massenspektrometer der Fa. Waters (Milford, MA, USA) entwickelt wurde. Bei dieser Technik werden alle Vorläuferionen vor ihrem Eintritt in den Flugzeitmassenanalysator abwechselnd mit einer niedrigen bzw. hohen Kollisionsenergie angeregt. Im Flugzeitmassenanalysator werden alle Ionen nach ihren m/z getrennt. Bei niedriger Kollisionsenergie werden überwiegend Molekülionen detektiert, während diese bei höherer Kollisionsenergie fragmentieren und vorwiegend Produktionen detektiert werden (Bateman et al., 2007). Mit Hilfe der MS^E -Technik werden nahezu gleichzeitig aber in unterschiedlichen Spektren, Informationen über die Vorläufer- und Produktionen aufgezeichnet. Die Zuordnung der Produktionen zu einem Vorläuferion erfolgt allein über die Retentionszeit und das Profil des chromatographischen Peaks, sodass die MS^E -Spektren auch als pseudo-Produktionen-Spektren bezeichnet werden.

Für die Auswertung der großen Datensätze aus hochaufgelösten Massenanalysen wurden Datenfiltertechniken entwickelt, die bei der Suche nach unbekanntem Verbindungen eingesetzt werden können (Zhu et al., 2011). Die Grundlagen der in dieser Arbeit eingesetzten Massendefekt- und Isotopenmusterfilter sind in Abschnitt 2.6 beschrieben.

2.5.4 Neutralverlust- und Vorläuferionen-Analyse

Sowohl die Neutralverlust- als auch die Vorläuferionen-Analysen gehören zu den MS/MS-Techniken, die häufig für den Nachweis von Metaboliten in komplexen Matrices angewendet werden. Mit Hilfe der Vorläuferionen-Analyse (*precursor ion scan*) werden zu ausgewählten Produktionen die Vorläuferionen ermittelt, was in der Regel die protonierten oder deprotonierten Moleküle sind. Dabei werden im ersten Massenanalysator alle Vorläuferionen entsprechend ihrer m/z getrennt und in der Kollisionszelle fragmentiert. Im zweiten Massenanalysator werden Produktionen mit einem definierten m/z selektiert. So können Moleküle mit einer spezifischen funktionellen Gruppen oder Molekülstruktur nachgewiesen werden. Zum Beispiel fragmentieren deprotonierte Glutathionkonjugate oft unter Bildung eines typischen Fragmentes mit dem m/z von 272. Wird dieses Ion als Basis für eine Vorläuferionen-Analyse genutzt, können alle vorhandenen Glutathionkonjugate in einem Gemisch erkannt werden (Rousu et al., 2009).

Bei der Neutralverlust-Analyse werden alle Ionen, aus denen ein spezifisches Molekül oder ungeladenes Radikal abgespalten wird, nachgewiesen. Bei dieser Methode werden im ersten Massenanalysator alle Ionen nach ihren m/z getrennt und in der Kollisionszelle fragmentiert. Die entstehenden Produktionen werden im zweiten Massenanalysator jetzt so selektiert, dass nur Produktionen den Detektor erreichen, die um die vorher festgelegte Masse kleiner als das Vorläuferion sind.

Protonierte oder deprotonierte Moleküle von Konjugaten zeigen häufig den Verlust eines charakteristischen neutralen Fragments. Zum Beispiel spalten deprotonierte Glucuronsäurekonjugate typischerweise Anhydroglucuronsäure mit 176 u ab, was für den Nachweis dieser Konjugate mittels Neutralverlust-Analyse genutzt wird (Xia et al., 2003). Die Abspaltung eines Moleküls Pyroglutaminsäure mit 129 u von protonierten Glutathionkonjugaten ist ein weiteres Beispiel für den möglichen Einsatz der Neutralverlust-Analyse (Cuyckens et al., 2009; Mutlib et al., 2005; Yan und Caldwell, 2004). Typische Neutralverluste von protonierten und deprotonierten Phase-II-Metaboliten sind in einem Übersichtsartikel von (Levsen et al., 2005) zusammengefasst. Eine Auswahl typischer Neutralverluste und Produktionen von $[M-H]^-$ und $[M+H]^+$ -Ionen pflanzlicher Phase-II-Metaboliten ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1. Charakteristische Neutralverluste und Produktionen der $[M-H]^-$ - und $[M+H]^+$ -Ionen ausgewählter pflanzlicher Phase-II-Metaboliten (^a (Levsen et al., 2005), ^b (Mutlib et al., 2005), ^c (Laurent et al., 2007), ^d (Day und Saunders, 2004), ^e (Rousu et al., 2009)). Ein charakteristisches Produktion des $[M+H]^+$ -Ions eines Glutathionkonjugates kann bei m/z 274 detektiert werden (Levsen et al., 2005).

Art des Konjugates	Neutralverlust von $[M+H]^+$ [u]	Neutralverlust von $[M+H]^-$ [u]	Produktion von $[M+H]^-$ (m/z)
Hexosid	162 ^a	162 ^{a, c}	
Malonylhexosid	248 ^a	44, 248 ^{c, d}	
Hexosylhexosid	324 ^a	324 ^c	323 ^c
Pentosylhexosid		294 ^{c, d}	293 ^{c, d}
Glutathionylkonjugat	307 ^a , 129 ^{a, b}	306 ^a	272 ^e
Sulfat	80 ^a	80 ^a	80, 97 ^a

Prinzipiell hängt die Effektivität beider Methoden für den Nachweis von Metaboliten stark von der Kenntnis oder Vorhersagbarkeit ihres Fragmentierungsverhaltens ab. Beide Methoden sind deshalb besonders wirkungsvoll beim Nachweis von Phase-II-Metaboliten, die im Allgemeinen einfache und für die Art des Konjugates spezifische Fragmentierungsmuster zeigen (Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2006). Sie sind aber auch auf andere Transformationsprodukte anwendbar, wenn sich deren Fragmentierungsverhalten dem der bekannten Ausgangsverbindung ähneln, sie z. B. die gleichen Fragmentionen bilden oder gleiche Neutralverluste zeigen. Das kann zum Beispiel bei Produkten des Phase-I-Metabolismus, wie hydroxylierten und dihydroxylierten Metaboliten, der Fall sein (Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2006).

Treten unübliche Strukturen auf oder weicht das Fragmentierungsverhalten vom prognostizierten ab, liefern Neutralverlust- oder Vorläuferionen-Analysen keine hilfreichen Daten (Rousu et al., 2009; Zhu et al., 2006). Außerdem gelingt die Unterscheidung zwischen Phase-II-Metaboliten von Kontaminanten und den Konjugaten natürlicher, endogener Verbindungen mit diesen Techniken nicht, da ähnliche Fragmentierungsverhalten vorliegen können. Das führt zu möglichen falschen positiven Befunden (Zhang et al., 2009).

2.6 Anwendung von Filtertechniken zur Interpretation massenspektrometrischer Daten für den Nachweis unbekannter Metaboliten

Neben verschiedenen massenspektrometrischen Techniken, können auch Methoden der Datenauswertung, wie Datenfilter, zum Nachweis unbekannter Metaboliten beitragen. Liegen z. B. Totalionenchromatogramme vor, die mit einem hochauflösenden Massenspektrometer aufgezeichnet wurden, können Isotopenmuster- und Massendefektfilter eingesetzt werden.

2.6.1 Isotopenmusterfilter

Die meisten Elemente liegen natürlicherweise nicht isotopenrein, sondern als Mischelemente aus mehreren Isotopen mit einer spezifischen Häufigkeitsverteilung vor. Das führt dazu, dass die Massenspektren dieser Elemente und ihrer Verbindungen mehr oder weniger charakteristische Isotopenmuster zeigen. Der Nachweis unbekannter Metaboliten mit einem ausgeprägten charakteristischen Isotopenmuster, das bei den koextrahierten Matrixverbindungen nicht oder nur mit geringer Wahrscheinlichkeit vorkommt, kann durch den Einsatz von Isotopenmusterfiltern unterstützt werden (Zhu et al., 2011). Dieser Softwarefilter extrahiert aus einem Satz von massenspektrometrischen Daten alle Signale mit dem spezifischen Isotopenmuster. Signale, die dieses Isotopenmuster nicht zeigen, werden vernachlässigt und der Datensatz für die weitere Datenauswertung reduziert und vereinfacht.

Bei kleinen organischen Molekülen sind es vor allem die chlorierten und bromierten Verbindungen, die ein ausgeprägtes Isotopenmuster zeigen und für deren Nachweis sich der Einsatz dieser Filtertechnik anbietet. Chlorierte und bromierte Verbindungen zeigen in ihren Massenspektren mit Nominalauflösung charakteristische M/M+2-Isotopenmuster, d. h. zwei m/z mit einer Differenz von 2 u. In hochaufgelösten Massenspektren ist die Differenz der zwei m/z 1,997 u bei chlorierten und 1,998 u bei bromierten Verbindungen. Die relativen Signalintensitäten der m/z zueinander sind von der Anzahl der Halogenatome im Molekül abhängig (Abbildung 11).

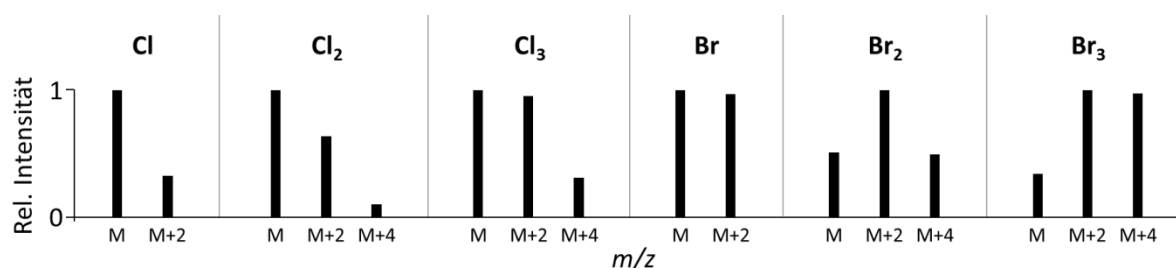


Abbildung 11. Isotopenmuster in Massenspektren von Ionen chlorierter und bromierter Verbindungen (nach (Otto, 2000)).

Auch wenn für die Anwendung des Isotopenmusterfilters hochaufgelöste Massenspektren nicht zwingend notwendig sind, wird mit ihnen die Wahrscheinlichkeit von falschen positiven Befunden durch koeluiierende Verbindungen stark vermindert (Cuyckens et al., 2009; Zhu et al., 2009).

Auch bei Untersuchungen zum Metabolismus nicht-halogenierter Verbindungen ohne entsprechend stark ausgeprägtes Isotopenmuster, kann diese Filtertechnik durch Einsatz von stabilisotopenmarkierten Verbindungen (^{13}C , ^{15}N , ^2H) angewendet werden (Cuyckens et al., 2009; Lim et al., 2008; Zhu et al., 2009). Dabei werden Untersuchungen mit einem definierten, z. B. äquimolaren, Gemisch aus nicht-markierter und markierter Ausgangsverbindung durchgeführt. Sowohl die markierten Verbindungen als auch die daraus gebildeten Metaboliten zeigen die gleichen chemischen Eigenschaften wie ihre Analoga mit natürlicher Isotopenverteilung und eluieren mit diesen in der Regel zeitgleich. Als Folge zeigen die sich überlagernden Massenspektren markierter und nicht-markierter Verbindungen ein entsprechendes nicht natürliches Isotopenmuster, dass sowohl von Art und Anzahl der Markierungen als auch vom Anteil der markierten Verbindung im Gemisch abhängig ist.

Beim Isotopenmusterfilter besteht häufig die Möglichkeit, nicht nur die erzeugten Analysedaten zu behandeln, sondern bereits während der Messung isotonenmusterabhängige MS/MS-Experimente durchzuführen (Cuyckens et al., 2009; Lim et al., 2008). Allerdings neigt dieses Verfahren dazu, Ionen mit geringen Intensitäten bei Matrixinterferenzen nicht zu berücksichtigen (Zhu et al., 2009).

2.6.2 Massendefektfilter

Die Bestimmung hochaufgelöster m/z erlaubt die Nutzung der Massendefekte, also der Differenz zwischen Nominal- und exakter Masse, zur Extraktion von Signalen potentieller Metaboliten mittels Massendefektfilter. Der Massendefektfilter extrahiert aus einem Datensatz alle m/z mit einem bestimmten Massendefekt, während m/z mit einem Massendefekt außerhalb eines festgelegten Toleranzbereiches nicht berücksichtigt werden. So können komplexe Datensätze durch Ausschluss nicht relevanter Signale für die weitere Datenbehandlung reduziert und vereinfacht werden. Dieser Filter ist häufig in kommerziellen Softwarepaketen implementiert (Zhu et al., 2011). Er basiert darauf, dass sich die Massendefekte von menschlichen, tierischen und pflanzlichen Fremdstoffmetaboliten und ihren Ausgangsverbindungen nur geringfügig unterscheiden (Zhang et al., 2003), d. h. trotz größerer Änderungen der Nominalmassen verschieben sich die Dezimalstellen nur in einem engen Bereich. Eine Übersicht über Verschiebungen von Massendefekten, die aufgrund

typischer Phase-I und -II-Reaktionen auftreten, wurde von Zhang und Koautoren (2009) zusammengestellt. In verschiedenen Studien wird davon ausgegangen, dass ein Filterbereich von $\pm 0,050$ u um den Massendefekt der Ausgangsverbindung ausreichend ist, um die Signale typischer Phase-I und -II-Metaboliten zu erfassen. Das Glutathionkonjugat bildet mit einer Massendefektverschiebung von $+ 0,068$ u dabei aber bereits eine Ausnahme (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2009). Aber auch für die Erfassung von für den pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus typischen Malonylglucose- und Disaccharidkonjugaten, ist ein Filterbereich von $\pm 0,050$ u unzureichend und muss breiter gewählt werden (Tabelle 2) (Day und Saunders, 2004; Laurent et al., 2007; Malcherek et al., 1998; Pascal-Lorber et al., 2004).

Tabelle 2. Massen- und Massendefektverschiebungen für typische pflanzliche Phase-I- und Phase-II-Metaboliten (nach (Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2006)).

Art der Transformation	Änderung Summenformel	Änderung Nominalmasse [u]	Änderung Massendefekt [mu]
Phase-I			
Hydroxylierung	+ O	+ 16	-5,1
oxidat. Dehalogenierung	+ OH, - Cl	-18	+ 33,8
Demethylierung	- CH ₂	- 14	- 15,6
Deethylierung	- C ₂ H ₄	- 28	- 31,3
Phase-II, Konjugation mit:			
Glutathion	+ C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	+ 305	+ 68,1
Glutathion (Dehalogenierung)	+ C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₆ S, - Cl	+ 271	+ 107,1
Acetat	+ C ₂ H ₃ O	+ 42	+ 10,6
Glucose	+ C ₆ H ₁₀ O ₅	+ 162	+ 52,8
Malonylglucose	+ C ₉ H ₁₂ O ₈	+ 248	+ 53,2
Hexosylhexose	+ C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	+ 324	+ 105,6
Pentosylhexose	+ C ₁₁ H ₁₈ O ₉	+ 294	+ 95,0
Sulfat	+ SO ₃	+ 80	- 43,2

Werden alle detektierten m/z , die außerhalb dieser Grenzen liegen, aus dem Datensatz entfernt, führt das zu einem Ausschluss störender Signale von Matrixverbindungen und erleichtert die Identifizierung der Signale potentieller Metaboliten in den entsprechenden Ionenchromatogrammen (Bateman et al., 2007; Zhang et al., 2009).

3 Originalarbeiten

3.1 Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants

Die Untersuchungen zur Aufnahme von Galaxolid[®], Tonalid[®] und Triclosan in Karotten, Gerste und Wiesen-Schwingel waren Teil des Projekts „*From Plants to Humans – Plant Accumulation and Transfer of Organic Foreign Compounds in Primary Food Chain*“ (Projekt-Nr. 184339/I10), das vom Norwegischen Forschungsrat finanziert und von Dr. Trine Eggen vom Norwegischen Institut für Agrar- und Umweltforschung (Bioforsk) geleitet wurde.

3.1.1 Veröffentlichter Fachartikel

Macherius A., Eggen T., Lorenz W. G., Reemtsma T., Winkler U., Moeder M. Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012) 7785-7791.

Der Fachartikel ist abrufbar unter:

<http://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-979wzSZAVJEsIxHXBUca>

<http://dx.doi.org/10.1021/jf301917q>

Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants

André Macherius,[†] Trine Eggen,[‡] Wilhelm Georg Lorenz,[§] Thorsten Reemtsma,[†] Ursula Winkler,[†] and Monika Moeder^{*,†}

[†]Department of Analytical Chemistry, Helmholtz Centre for Environmental Research—UFZ, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

[‡]Bioforsk, Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research, Postveien 213, N-4353 Klepp st., Norway

[§]Institute of Chemistry, Food Chemistry and Environmental Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle (Saale), Germany

ABSTRACT: Many xenobiotics entering wastewater treatment plants are known to be persistent during wastewater treatment and tend to adsorb to sewage sludge. The application of sewage sludge as fertilizer in agriculture may pose the risk of an incorporation of xenobiotics in the cultivated plants and, finally, an inclusion into the food chain. This study was performed to investigate the uptake of common sewage sludge contaminants, galaxolide, tonalide, and triclosan, by plants used for human consumption and livestock feeding. Barley, meadow fescue, and four carrot cultivars were sown and grown in spiked soils under greenhouse conditions. After harvesting the plants, roots and leaves were analyzed separately, and the respective bioconcentration factors were calculated. In carrots, a concentration gradient of the xenobiotics became evident that decreased from the root peel via root core to the leaves. A significant influence of the differing root lipid contents on the uptake rates cannot be supported by our data, but the crucial influence of soil organic carbon content was confirmed. Barley and meadow fescue roots incorporated higher amounts of the target substances than carrots, but translocation into the leaves was negligible. The results indicated that an introduction of persistent semi- and nonpolar xenobiotics into the food chain via edible plants like carrots could be of certain relevance when sludge is applied as fertilizer. Due to low rates found for the translocation of the xenobiotics into the aerial plant parts, the entrance pathway into food products via feeding livestock is less probable.

KEYWORDS: uptake, food plants, xenobiotics, polycyclic musk, triclosan, GC–MS

INTRODUCTION

Xenobiotics may enter the food chain via several pathways, e.g., via the use of antibiotics and other veterinary pharmaceuticals in livestock breeding, pesticides in crop farming, or contamination during manufacturing food. Potential transfer of xenobiotics from sewage sludge and manure amended soils into plants used for food and feed production has been less considered so far although the use of sewage sludge and manure as fertilizer in agriculture has been practiced in Europe for a long time. Currently, the European Commission even encourages the reutilization of sludge under observance of corresponding rules regarding toxic relevant sludge pollutants (Council Directive 86/278/EEC¹ or the German Sewage Sludge Act²). Annually, more than 11 million metric tons d.w. (dry weight) of sewage sludge are produced in the countries of the European Union,^{3,4} and about 40% are applied as fertilizer in agriculture.

Particularly, persistent organic substances with semipolar and lipophilic properties tend to accumulate in sewage sludge.^{5,6} For instance, galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN), polycyclic musk compounds frequently applied as ingredients of cosmetic and household products, have been determined in sewage sludge of Norwegian wastewater treatment plants at concentrations of 0.3–22.4 mg kg⁻¹ d.w. (HHCB) and at 0.1–3.5 mg kg⁻¹ (AHTN), or up to 14 mg kg⁻¹ and 2 mg kg⁻¹, respectively, in Austrian WWTPs.^{7,8} The bactericide triclosan

(TCS) released from personal care products such as toothpaste and cosmetics, detergents, or impregnated textiles is accumulated in sludge at concentrations between 0.04 and 7 mg kg⁻¹ d.w.^{9,10} Regular application of the contaminated sludge on fields results in soil concentration of about 1 μg kg⁻¹ as reported previously¹¹ which corresponds well with soil concentrations predicted.¹²

Among adverse effects of polycyclic musks and triclosan to aquatic organisms, there are also potential risks to organisms living in soils and sediments that have been revealed long time ago.^{13–15} Furthermore, triclosan has been proven to support antibiotic resistance of microorganisms.¹⁶ Possible chronic effects of these compounds on human health are still under discussion, but potential risks for human health have been assumed particularly, when they are present in food.¹⁷

Taking into account that plants form an essential basis of the animal and human diet, an evaluation of the uptake and accumulation of potential harmful organic contaminants in plants is of importance for risk assessment. Current studies on xenobiotic uptake by food and feed plants focus predominately on pesticides or veterinary drugs.¹⁸ Root uptake, translocation,




Received: May 3, 2012

Revised: July 18, 2012

Accepted: July 19, 2012

Published: July 19, 2012

Table 1. Selected Features of the HHCB, AHTN, and Triclosan Used for the Plant Exposure and Parameter of the Analytical Protocol, Limit of Quantification (LOQ), Recovery and Mean Relative Standard Deviation (RSD), Maximum Concentrations in European Sludges, and the Resulting Maximum Soil Concentrations

Trade name, abbreviation, structure	CAS-No.	log K _{ow}	Water solubility mg L ⁻¹	Henry's law constant Pa m ³ mol ⁻¹	LOQ in µg g ⁻¹ d.w.	Recovery in % (n=3-4)	% RSD (n=3-4)	Target ions (m/z) quantifier, qualifier	Exemplary sludge Concentration mg kg ⁻¹ d.w.	Calculated max. Soil Concentration mg kg ⁻¹ d.w.
Galaxolide (HHCB) 	1222-05-5	5.9	1.75 ^a	11.3 ^a	0.001 (soil) 0.02 (carrot root) 0.02 (meadow leaf)	115 102 63	7 8 1	243, 258	81 ^c	2.02
Tonalide (AHTN) 	1506-02-1	5.7	1.25 ^a	12.5 ^a	0.001 (soil) 0.05 (carrot root) 0.02 (meadow leaf)	110 97 65	7 10 2	243, 258	16 ^c	0.40
Triclosan (TCS) 	3380-34-5	4.8	10 ²⁵	1.5×10 ^{-2b}	0.005 (soil) 0.05 (carrot root) 0.06 (meadow leaf)	106 86 65	9 12 2	288, 290, 252	8.8 ^d	0.22

^aReference 13. ^bReference 23. ^cReference 24. ^dReference 25.

Table 2. Plants Used for Exposure Experiments

	plant species	analyzed plant parts	reason for selection
barley	<i>Hordeum vulgare</i> , cv Edel	root, leaf	representative for cereal, mainly for animal feed
meadow fescue	<i>Festuca pratense</i> , cv Fure	root, leaves	dominating forage in Norway
carrot	<i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativus</i> , cvs Napoli	root, leaves	representative of root crop; common in Norway, an industrial cultivar
	<i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativus</i> , cvs Amager	root	representative of root crop
	<i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativus</i> , cvs Rothild	root	an old cultivar, common representative of root crop
	<i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativus</i> , cvs Nutri-Red	root	red, high carotene representative of root crop deep red, high carotene and lycopene; commonly grown in kitchen gardens

and accumulation of semipolar sewage sludge contaminants have been less considered, although their inclusion into the food chain via plants should be evaluated to improve the assessment of the daily dose of xenobiotics the consumers encounter. Furthermore, a science-based decision whether the application of sewage sludge in agriculture poses any risks requires more data on the environmental fate of xenobiotics including the uptake by plants.¹⁹

In our study we investigated the uptake of triclosan, HHCB, and AHTN from spiked soil by four carrot cultivars, barley, and meadow fescue which are ranked among most essential food and feed plants in middle and northern European countries.²⁰ Furthermore, carrots are considered as worst case scenario for uptake studies due to their oil rich tap root, which facilitates the transfer of compounds into plants.²¹ Moreover, as a root vegetable especially the edible parts of the carrot are in steady and direct contact to contaminated soils. Barley and meadow fescue were included in this study as important crop and fodder plants of which the aerial compartments become part of the food chain.

In general, the probability of possible human exposure by contaminants arising from biosolids application in agriculture is addressed increasingly in food safety research.²²

MATERIALS AND METHODS

Test Substances. Both polycyclic musk compounds 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8-hexamethylcyclopenta-[g]-2-benzopyran (galaxo-

lide, HHCB) and 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene (tonalide, AHTN) were received from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), and the antibacterial compound triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol) was from Fluka (Budes, Germany). All substances were of ≥95% purity and were used for spiking the soils and served as reference compounds for the analytical measurements.

Soil. The sandy soil used in the experiments (0.9% TOC, 0.21% total N and 1130 mg kg⁻¹ total P-content, pH 5.5) was air-dried and sieved to 4 mm before batches of the soil were mixed with a commercially available, slow-release fertilizer (3 g kg⁻¹ soil). The exact mineral composition was not characterized.

Spiking Procedure. The test substances from a stock solution made in acetone were spiked into 50 mL of acetone which was finally added to the soil of each pot (175 mm i.d., 210 mm high) filled with 4 kg d.w. of soil. All was mixed thoroughly manually in order to adjust concentrations of 10 mg kg⁻¹ d.w. for HHCB, AHTN, and triclosan. After spiking, all pots were stored at ambient temperature for three days to allow the residual acetone to evaporate from the soil. The applied xenobiotic amounts were chosen on the basis of calculated worst case concentrations using eq 1.¹² The prediction considered (i) the maximum concentrations reported for the target substances in sewage sludge (Table 1), (ii) a single sludge application to soil, and (iii) the disregarding of leaching and biodegradation processes of the xenobiotics.

$$c_{0, \text{Soil}} = \frac{c_{\text{Sludge}} \cdot \text{APPL}_{\text{Sludge}} \cdot 10}{\text{DEPTH}_{\text{Soil}} \cdot \text{RHO}_{\text{Soil}}} \quad (1)$$

$c_{0, \text{Soil}}$ is the concentration of the contaminant in soil after one application of sewage sludge in mg kg^{-1} at $t = 0$, c_{Sludge} is the concentration of the contaminant in the applied dry sewage sludge, $\text{APPL}_{\text{Sludge}}$ is the application rate (0.6 kg m^{-2}) d.w., $\text{DEPTH}_{\text{Soil}}$ is the mixing depth of the soil (0.2 m), and RHO_{Soil} is the bulk density of soil (1200 kg m^{-3}), respectively.¹² As shown in Table 1, the expected concentrations of the target compounds in soil are in the low mg kg^{-1} range.

Plant Cultivation and Exposure. The cultivation of the plants used for the experiments (Table 2) has been performed under controlled greenhouse conditions. Three days after spiking, the pots were sown with barley, carrots, and meadow fescue. All pots were kept at $14 \text{ }^\circ\text{C}$ during germination. After germination, temperature was set to $20 \text{ }^\circ\text{C}$ day and $14 \text{ }^\circ\text{C}$ night with a 16 h day length. Lighting was given as $350 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ photosynthetic photon flux (PPF) with SON-T lamps corresponding to $30 \text{ mol m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. The pots were placed on individual trays and irrigated with water ($\text{pH } 7.4$, $\text{EC } 1.5 \text{ mS cm}^{-1}$) to maintain a water content of about 70% of the soil's water holding capacity, which was approximately 11%. The number of plants per pot was 5–6 in the case of all carrot types, 10 for barley, and 20 for meadow fescue. Control plants of carrots (cultivar Napoli) and barley grown in nonspiked soil were placed in between the spiked pots to investigate whether significant amounts of the investigated xenobiotics are transferred directly from the soil to leaf tissue.

Harvesting. Plant materials were harvested during a period of two months, depending on the degree of ripeness of the seeds and the proper size of the carrots and meadow fescue, while all plants per pot were collected and pooled to one sample. Samples of roots and leaves were taken from the same pot. Roots were carefully washed with tap water. Carrots were peeled with a vegetable peeler (depth of 2 mm). All plant materials were dried in an oven for three days starting at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 day) followed by $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Control and exposed plant materials were dried separately to prevent cross-contamination. The dried plant samples were packed in paper bags and soil in glass vessels and stored about two weeks at ambient temperature until analysis.

Sample Preparation. After harvesting, the carrot plants were divided into root peel, root core, and leaves which were analyzed separately. Barley and meadow fescue plants were divided into roots and leaves. The dried samples were coarsely cut and ground with an ultracentrifuge mill (Retsch, Haan, Germany) to obtain fine-grained (0.2 mm), homogenized material. These samples were extracted by the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) methodology^{26,27} which was modified to enable GC–MS analysis. For this purpose, acetonitrile was replaced by a mixture of ethyl acetate/acetone (1:1 v/v) (10 mL). For the whole procedure, glass devices were applied to avoid sample contamination by plasticizers and loss of target compounds by adsorption. The applied MgSO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) was heated at $300 \text{ }^\circ\text{C}$ for 12 h in a muffle furnace for cleanup.

A 2 g sample of the oven-dried and ground plant material (for leaves 1 g) was processed with the modified QuEChERS method and analyzed by GC–MS. The cleanup of the carrot root and leaf extracts was performed using 60 mg and 100 mg Supelclean ENVI-Carb (Sigma-Aldrich, St. Louis), respectively, which were added to the PSA (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

A 1 g amount of soil was extracted for 3 min with $2 \times 10 \text{ mL}$ acetone and $1 \times 10 \text{ mL}$ ethyl acetate using an ultrasonic probe [Sonoplus GM 200 (20 kHz), probe type MS 73 with microtip of $1/8$ in., Bandelin, Mörfelden-Walldorf, Germany]. After centrifugation the supernatants were combined and evaporated to a final volume of 1 mL and analyzed by GC–MS.

Recovery experiments were carried out using carrots purchased from a local supermarket. The carrots free of target analytes were lyophilized and ground as described above. For spiking, the reference compounds were dissolved in acetone and added to the respective sample to reach a concentration of $1\text{--}5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. The solvent was allowed to evaporate, and the material was weighed into glass centrifuge tubes and processed with the QuEChERS procedure.

The recovery of the soil extraction method was determined by spiking 1 g of blank soil to a final concentration of $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ for each

analyte prior to ultrasound assisted extraction. The analyte recoveries and reproducibility of the protocols are given in Table 1.

In order to determine the soluble lipid content of the carrot roots, 2 g of the dried and homogenized root material was extracted by pressurized solvent extraction using a Dionex 200 accelerated solvent extractor (Dionex, Sunnyvale, CA). According to Dionex Application Note 321,²⁸ n-hexane was applied as solvent. The extracts were evaporated to dryness and the lipids determined gravimetrically.

Analysis. The GC–MS analyses of the extracts were performed on a 6890GC-5973MSD-system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) by injecting $1 \text{ } \mu\text{L}$ of each extract. The analytes were separated on a HP-SMS column of 30 m length, 0.25 mm i.d., and a film thickness of $0.25 \text{ } \mu\text{m}$ (J&W by Agilent Technologies). The GC oven program started at an initial temperature of $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and was held for 1 min, increased at 10 K min^{-1} to $280 \text{ }^\circ\text{C}$, and held for 6 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow of 1 mL min^{-1} . The directly coupled mass spectrometer analyzed the substances after electron impact ionization at 70 eV in selected ion monitoring (SIM) mode (target ions in Table 1). The results of duplicate analyses of 3 parallel extractions were averaged for quantification using external standards. Recoveries were generally corrected for the sample type (soil, plant species, and plant part) to consider possible matrix influence. The determined limits of quantification for the target substances are included in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Analyte Concentration in the Soil. The concentration of the target substances in the soils was examined before seeding (day 0) and after 49 and 119 days of plant cultivation. The detected concentrations differed from the calculated nominal concentration (Figure 1). In the case of AHTN, the

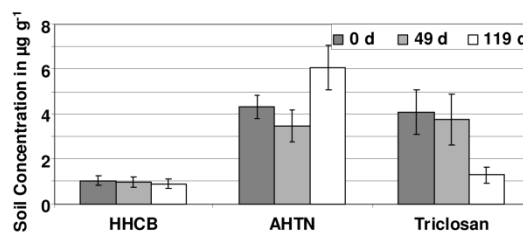


Figure 1. Concentration of HHCB, AHTN, and triclosan determined in soil after 0, 49, and 119 days.

concentration detected at day 0 was smaller than after 119 days which was probably due to an inhomogeneous distribution of AHTN within the soil. However, in general, the concentration of both polycyclic musk compounds HHCB and AHTN were found to be fairly stable over the entire cultivation period of 119 days; dissipation under the exposure conditions was negligible. The resistance against abiotic degradation and low volatilization of AHTN and HHCB from soils goes along with literature data where half-lives between 10 and 17 months for HHCB and even 2–24 years for AHTN were reported.²¹

For the calculation of uptake factors, the concentrations of the target substances measured in initial soil, after 49 days, and after 119 days were averaged and used as “concentration in dry soil” (eq 2).

Plant Uptake Results. Most of the exposed plants were delayed in their development as compared to nonspiked controls, but they compensated for this lag during the cultivation period. This is in agreement with previous studies, in which plant exposure to 0.44 mg L^{-1} of triclosan caused plant death after germination under hydroponic conditions²⁹ or

Table 3. Average Concentration ($n = 3$) of the HHCB, AHTN, and Triclosan in the Carrot Napoli Peels, Cores, and Leaves and the Corresponding Bioconcentration Factors (Relative Standard Deviations in % Given in Parentheses)

	carrot roots			BCF	carrot leaves		BCF (total plant)
	c (peel) $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	c (core) $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	c (total root) $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.		c $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	BCF	
HHCB	4.35 (11)	0.22 (16)	0.86 (12)	0.89	0.74 (16)	0.76	0.86
AHTN	13.41 (2)	0.30 (15)	2.32 (10)	0.50	0.82 (12)	0.18	0.44
triclosan	2.82 (7)	0.14 (4)	0.55 (7)	0.18	0.23 (18)	0.07	0.16

a significant reduced growth of carrot plants exposed to a mixture of veterinary medicines at 1 mg kg^{-1} soil concentration.¹⁸ Also, wheat seedlings have been shown to be sensitive to low exposure concentration of triclosan and HHCB ($0.2\text{--}0.3 \text{ mg L}^{-1}$ as reported by An et al.³⁰).

Uptake of the Target Substances by Carrots. *Uptake and Translocation in Carrot Type Napoli.* Exemplarily, the concentration of the target substances in different parts of the carrot cultivar “Napoli” is shown in Table 3. The studied xenobiotics HHCB, AHTN, and triclosan were detected in all compartments of the carrot plants. The highest concentrations were detected in the root peel and decreased gradually toward the inner parts of the root and to the leaves. The total root concentrations of the xenobiotics were calculated as sum of the concentration found in root peel and root core. The corresponding bioconcentration factors (BCF) included in Table 3 were calculated in accordance with eq 2 on the basis of the dry weight of the material analyzed.

$$\text{BCF} = \frac{\text{concentration in dry plant tissue}(\mu\text{g g}^{-1})}{\text{concentration in dry soil}(\mu\text{g g}^{-1})} \quad (2)$$

With a BCF of 0.18, triclosan shows the lowest enrichment. The BCFs for AHTN and HHCB were up to 5 times higher at 0.50 and 0.89, respectively. Despite the very similar structural properties and $\log K_{\text{OW}}$ values of AHTN (5.7) and HHCB (5.9), their BCFs in the entire root tissue differed significantly. Relating to the entire root, the BCF of HHCB was calculated as almost twice as high as the BCF of AHTN. As the separate analysis of the root peel and core revealed, the concentrations of AHTN and HHCB in the peel reflected the different soil concentrations. The amounts of both substances in the core variations were less distinct due to similar translocation rates assumed for both compounds. For triclosan, about 20 times higher concentrations were found in the peel than in the core which is a comparable ratio as determined for the distribution of HHCB.

The observed transfer of the polycyclic musks from contaminated soils into carrot roots as well as the increased BCF of HHCB in comparison to AHTN goes along with the findings of Litz et al., from 2007.²¹ However, in contrast to their study, we found 1.9 and 1.6 times higher BCFs for both investigated musks. This deviance is probably caused by the total organic carbon content (TOC) of the soil which was with 0.9% quite low compared to the TOC of 3.1% in the study of Litz et al., in 2007.²¹ Data for HHCB and AHTN uptake obtained from our experiments and those provided by Litz et al., from 2007,²¹ are combined in Figure 2 indicating a strong relationship between the BCFs and the soils' TOC. The higher the TOC is, the lower the transferred amount of xenobiotics into the plants, which was also confirmed in a previous study,³¹ where in TOC-rich soil the mobility of several pharmaceutical compounds was reduced.

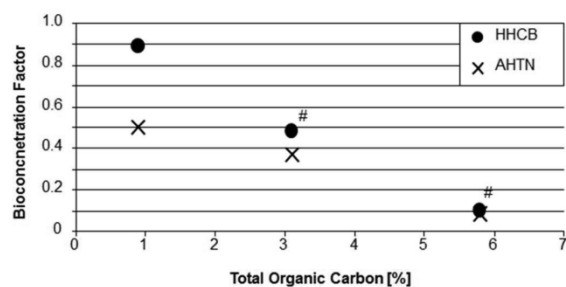


Figure 2. Dependence of bioconcentration factors of HHCB and AHTN in carrot roots on the soils' total organic carbon content (TOC), # marked points are taken from ref 21.

Due to the lack of comparable literature data, a relationship between the soils' TOC and the uptake of the more polar triclosan cannot be deduced. Compared to both polycyclic musk compounds, triclosan indicated a significantly lower bioconcentration factor which points to a direct correlation between uptake and lipophilic properties of the target substances (Figure 3). This is in agreement with the

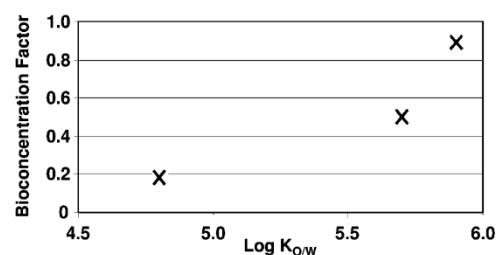


Figure 3. Bioconcentration factors of HHCB, AHTN, and triclosan in carrot Napoli roots versus the $\log K_{\text{OW}}$ values of the compounds.

relationship published by Briggs et al., in 1982,³² concerning the uptake of xenobiotics by roots from a nutrient solution. Although the transfer of results obtained from hydroponic cultures to more complex plant–soil systems is problematic, our results fit the stated correlation: the higher the $\log K_{\text{OW}}$ of a compound the higher is its BCF. Since in our investigation the properties of the three target substances are quite similar ($4.8 < \log K_{\text{OW}} < 5.9$), more studies are required to confirm this relationship for plant–soil cultures and substances with different polarity.

As mentioned before, all compounds were quantified in the carrot leaves, as well. Triclosan was detected at mean concentration of $0.23 \mu\text{g g}^{-1} \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$ and HHCB and AHTN at $0.74 \mu\text{g g}^{-1} \pm 7 \text{ ng g}^{-1}$ and $0.82 \mu\text{g g}^{-1} \pm 16 \text{ ng g}^{-1}$, respectively. The almost equal concentrations of the polycyclic musks are in contrast to the different soil and root peel concentrations and indicate that the transfer from the root peel, via the root core into the leaves, is rate limited. Transferring of

the target substances from soil to the leaf surface via transport by aerosols or bound to particles can be excluded. Neither the musk compounds nor triclosan was detected in leaves of the control plants grown among the exposed ones. Thus, the presence of the compounds in the leaves is the result of their translocation from the root compartments.

The gradual distribution of the xenobiotics, i.e., the decrease of their concentrations from the root peel via the root core to the leaves, is in agreement to the findings of Boxall et al., from 2006,¹⁸ although they reported lower BCFs for a set of veterinary pharmaceuticals. Also, the study of Litz et al., from 2007,²¹ supports our findings regarding a significant translocation of HHCB and AHTN from the carrot root into the aerial parts, but the translocated portions determined by Litz et al. were significantly smaller and the reported BCFs were lower by a factor of 10 in the leaves than in the roots. In our study the BCFs differ just by the factor of 2.7 for AHTN and were found to be comparable for HHCB. Thus, our results indicated an increased translocation of the incorporated substances into the leaves. These differences may arise from the time dependent passive distribution of the substances in the plant occurring via cascades of sorption/desorption and diffusion processes.³³ Furthermore, alterations in plant physiology like growth and aging may influence the substance concentrations in the specific plant tissues. Thus, uptake and translocation of the substances are dynamic, time dependent processes, and a state of equilibrium is not likely to be reached. The assumption of strong kinetic effects is supported by the fact that, despite the very different concentrations of HHCB and AHTN in the soil and the root peel, the amounts of both compounds in the leaf tissue were found to be similar. Thus, processes allowing the translocation of substances with comparable properties within plant tissue are dependent on time and the concentration gradients.

Parts of the incorporated triclosan have entered the carrot leaves as well. The distribution between roots and leaves is comparable to that found for AHTN; the BCF in leaves is about 3 times lower than that in the root tissue. The ability of triclosan to enter the aerial parts of a plant after its uptake via roots has previously been observed for soybean plants³⁴ where the concentrations in leaves exceed those in roots even multiply. In general, the observed distribution of the chemicals is in contrast to the assumption that plants with swollen storage roots as carrots and parsnips fail to translocate chemicals from the roots into the leaves.³²

Influence of the Lipid Content of Roots on the Uptake of the Target Substances. The pivotal feature considered in most uptake models is the lipophilic nature of the neutral organic compound expressed as $\log K_{ow}$ which indicates that the plant specific content on lipophilic root constituents might influence the uptake and accumulation of chemicals, as well. Therefore, four carrot cultivars Napoli, Rothild, Nutri Red, and Amagar were examined regarding their root contents of soluble lipids and a possible correlation with the incorporated quantities of HHCB, AHTN, and triclosan. The content of soluble lipids of the different carrot cultivars was determined in the peels and cores separately. In general, the lipid contents were below 0.2% of the fresh weight of the investigated carrot roots. As shown in Table 4, except for carrot Amagar, the lipid contents in the peels were slightly higher than in the cores. Even though the soluble lipid contents were 2 or 3 times higher in Nutri Red and Amagar than in Napoli roots, the incorporated xenobiotic amounts were fairly similar (Table 4). Furthermore, the portion

Table 4. Soluble Lipid Content of Root Peels and Root Cores of the Different Carrot Cultivars

	Napoli mg g ⁻¹ f.w.	Amagar mg g ⁻¹ f.w.	Rothild mg g ⁻¹ f.w.	Nutri Red mg g ⁻¹ f.w.
peel	0.87	1.49	1.39	1.61
core	0.59	1.85	0.86	1.27
total	0.65	1.77	0.95	1.31

of xenobiotics translocated from peel into the core was similar in all four carrot cultivars, namely 22%, 11%, and 19% for HHCB, AHTN, and triclosan (data not shown), respectively (see Table 5 for details for each compound).

Table 5. Average ($n = 3$) Total Concentration of the HHCB, AHTN, and Triclosan in the Roots of the Different Carrot Cultivars (Relative Standard Deviations in % Given in Parentheses)

	Napoli $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	Amagar $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	Rothild $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	Nutri Red $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.
HHCB	0.86 (12)	0.64 (26)	0.42 (37)	0.73 (21)
AHTN	2.32 (10)	1.51 (12)	1.29 (30)	2.45 (20)
triclosan	0.55 (7)	0.47 (10)	0.31 (33)	0.50 (13)

A positive correlation between the lipid content of roots and the incorporation of lipophilic chemicals in the tissue has been stated in previous studies.^{35,36} For example, Gao et al., in 2006³⁶ investigated the uptake of selected PAHs into the roots of a set of plants covering a range of lipid contents from 0.1% to 1.0% and deduced a positive correlation between uptake rates and lipid content. In contrast to the findings of these previous studies, a correlation between the lipid content of the roots and the incorporated amount of target compounds is not supported by our data (Figure 4).

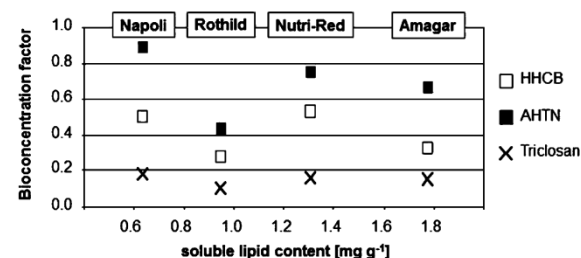


Figure 4. Fresh weight concentrations of HHCB, AHTN, and triclosan in the peels of different carrot types versus the lipid contents of the peel.

Uptake and Translocation of the Target Substances into Barley and Meadow Fescue. Barley and meadow fescue were examined to evaluate their uptake potential for the selected chemicals and to recognize possible entrance pathways into the animal or human food chain. All these substances, HHCB, AHTN, and triclosan, were detected in the expansive network of the fine roots of both plant species. Similar to carrots, the mean BCF of HHCB in barley roots was determined to be 0.83, but in contrast, the BCFs of AHTN (1.49) and triclosan (1.43) in barley roots exceeded those in carrots (Table 6). Both plants incorporated significantly different amounts of the target substances. While the BCFs of HHCB (1.82) and AHTN (2.74) were twice as high in

Table 6. Mean ($n = 3$) Total Concentrations and Bioconcentration Factors of HHCB, AHTN, and Triclosan Found in the Roots of Barley and Meadow Fescue Plants (Relative Standard Deviations in % Given in Parentheses)

	barley		meadow fescue	
	c in $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	BCF	c in $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.	BCF
HHCB	0.81 (33)	0.83	1.77 (3)	1.82
AHTN	6.90 (31)	1.49	12.66 (36)	2.74
triclosan	4.36 (28)	1.43	1.11 (49)	0.36

meadow fescue roots as in barley roots, triclosan showed a significantly lower BCF (0.36) in meadow fescue. In general, the roots of the two grass plant species showed an increased incorporation of the target substances in comparison to the carrot roots. This is probably caused by the higher surface-to-volume ratio of the feathery barley and meadow fescue roots which facilitates the diffusive transfer of the substances into the roots. Their permanent root growth changes also the contact surfaces to soil particles, and exchange of substances is enhanced.

HHCB was found in just one barley sample ($0.04 \mu\text{g g}^{-1}$) above the analytical limit of quantification. AHTN was detected in the leaves of both barley ($0.17 \mu\text{g g}^{-1}$) and meadow fescue ($0.04 \mu\text{g g}^{-1}$), but in this case a foliar uptake of AHTN cannot be excluded. Although previous studies pointed to its low tendency for volatilization,²¹ the corresponding control leaves of barley contained $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ of AHTN. This represents about one-third of the detected AHTN concentration in exposed barley plants and is even equal to those detected in meadow fescue. Also, triclosan could not be detected in any of the leaf samples which is in contrast to the findings for carrot plants. None of the target compounds were detected in barley seeds above the LOQs (data not shown). In contrast to carrot plants, in barley and meadow fescue the chemicals were hardly translocated from the roots into the leaves; thus, their bioaccumulation in aerial parts is of low probability.

Our data imply that the uptake and translocation from contaminated soils in plants is not restricted to polar compounds as, for instance, proved for some veterinary drugs which are spread by manure application. For the more lipophilic compounds HHCB, AHTN, and triclosan, plant specific absorption and translocation were observed. Thus, an introduction of semi- and nonpolar xenobiotics into the food chain via the application of sewage sludge can be of certain relevance particularly for root vegetables. Soil parameters like the TOC were revealed to have a crucial influence on uptake rates which have to be investigated more in detail for a larger set of xenobiotics covering a broad range of structural and physicochemical properties. Furthermore, the influence of the pore water (volume, pH, and accompanying water-soluble matrix) on the uptake of chemicals by plants is another important aspect that was not considered within our investigations but needs further studies.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +49 (0341) 235 1417. Fax: +49 (0341) 235 1443. E-mail: monika.moeder@ufz.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Norwegian Research Council (Project no. 184339/I10) for the financial support of the investigations. Furthermore, we like to thank the Helmholtz Impulse and Networking Fund through Helmholtz Interdisciplinary Graduate School for Environmental Research (HIGRADE) for the kind support. We thank Christian Albrecht and Stefan Bergner for the support in method development.

ABBREVIATIONS

AHTN, tonalide
 HHCB, galaxolide
 BCF, bioconcentration factor
 TOC, total organic carbon
 PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon
 WWTP, wastewater treatment plant

REFERENCES

- (1) Council of the European Communities. Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/278/EEC). *Off. J. Eur. Communities* **1986** L 181, 6–12.
- (2) Federal Republic of Germany—Federal Ministry of Justice. Sewage Sludge Act (Klärschlammverordnung (AbfKlärV)) *Bundesgesetzblatt* **1992** (last update 02-29-2012) 21, 912–935.
- (3) Milieu Ltd., WrC, Risk and Policy Analysts Ltd. (RPA) for the European Commission. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. *Final Report—Part 1: Overview Report*; 2010; pp 1–16.
- (4) European Commission, Consortium ESWL. *Study on Waste Related Issues of Newly Listed POPs and Candidate POPs, No ENV.G.4/FRA/2007/0066, Final Report*; Update13 April 2011; p 242.
- (5) Böhm, L.; Düring, R.-A. Partitioning of polycyclic musk compounds in soil and aquatic environment-experimental determination of K_{DOC} . *J. Soils Sediments* **2010**, *10*, 708–713.
- (6) Butler, E.; Whelan, M. J.; Sakrabani, R.; van Egmond, R. Fate of triclosan in field soils receiving sewage sludge. *Environ. Pollut.* **2012**, *167*, 101–109.
- (7) Mogensen, B. B.; Pritzl, G.; Rastogi, S.; Glesne, O.; Hedlund, B.; Hirvi, J.-P.; Lundgren, A.; Sigurdsson, A. Musk Compounds in the Nordic environment. *TemaNord—Nordic Council of Ministers, Copenhagen* **2004**, *503*, 1–68.
- (8) Clara, M.; Gans, O.; Windhofer, G.; Krenn, U.; Hartl, W.; Braun, K.; Scharf, S.; Scheffknecht, S. Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment. *Chemosphere* **2011**, *82*, 1116–1123.
- (9) Gatidou, G.; Thomaidis, N. S.; Stasinakis, A. S.; Lekkas, T. D. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1138*, 32–41.
- (10) Kuch, C.; Schneider, C.; Metzger, J. W. Monitoring of triclosan, triclocarban and hexachlorphen in surface water, sediments, sludge, influents and effluents of sewage works (title translated). *FZKA-BWPLUS (BWB 21009)*; University of Stuttgart: Stuttgart, Germany, 2003; pp 1–15.
- (11) Cha, J.; Cupples, A. M. Detection of the antimicrobials triclocarban and triclosan in agricultural soils following land application of municipal biosolids. *Water Res.* **2009**, *43*, 2522–2530.
- (12) Eriksen, G.; Amundsen, C.; Berndorf, A.; Eggen, T.; Grave, K.; Halling-Sorensen, B.; Källqvist, T.; Sogn, T.; Sverdrup, L. Risk assessment of contaminants in sewage sludge applied on Norwegian soils. *Norwegian Scientific Committee for Food Safety* **2009**, 1–244.
- (13) Balk, F.; Ford, R. A. Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB. II. Effect assessment and risk characterisation. *Toxicol. Lett.* **1999**, *111*, 81–94.

- (14) Steinberg, P.; Fischer, T.; Arand, M.; Park, E.; Elmadfa, I.; Rimkus, G.; Brunn, H.; Dienes, H.-P. Acute hepatotoxicity of the polycyclic musk 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AHTN). *Toxicol. Lett.* **1999**, *111*, 151–160.
- (15) Lin, D.; Zhou, Q.; Xie, X.; Liu, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* **2010**, *81*, 1328–1333.
- (16) Suller, M. T. E.; Russell, A. D. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 11–18.
- (17) Kroes, R.; Renwick, A. G.; Cheeseman, M.; Kleiner, J.; Mangelsdorf, I.; Piersma, A.; Schilter, B.; Schlatter, J.; van Schothorst, F.; Vos, J. G.; Würtzen, G. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): Guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 65–83.
- (18) Boxall, A. B. A.; Johnson, P.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E.; Levy, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 2288–2297.
- (19) Jones-Lepp, T. L.; Stevens, R. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: The interface between analytical chemistry and regulation. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1173–1183.
- (20) European Commission—Eurostat. Europe in figures 2011. *Eurostat Yearbook 2011*; 2011.
- (21) Litz, N. T.; Müller, J.; Böhmer, W. Occurrence of polycyclic musks in sewage sludge and their behaviour in soils and plants part 2: Investigation of polycyclic musks in soils and plants. *J. Soils Sediments* **2007**, *7*, 36–44.
- (22) Aryal, N.; Reinhold, D. M. Phytoaccumulation of antimicrobials from biosolids: Impacts on environmental fate and relevance to human exposure. *Water Res.* **2011**, *45*, 5545–5552.
- (23) Australian Government—Department of Health and Ageing (NICNAS). Priority existing chemical assessment report no. 30. *Industrial Chemicals Notification and Assessment*; Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS): Sydney, Australia, 2009; pp 1–537.
- (24) Stevens, J. L.; Northcott, G. L.; Stern, G. A.; Tomy, G. T.; Jones, K. C. PAHs, PCBs, PCNs, organochlorine pesticides, synthetic musks, and polychlorinated n-alkanes in U.K. Sewage sludge: Survey results and implications. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 462–467.
- (25) Bester, K. Triclosan in a sewage treatment process—balances and monitoring data. *Water Res.* **2003**, *37*, 3891–3896.
- (26) Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Staynbaheer, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431.
- (27) Paya, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tassdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1697–1714.
- (28) Dionex Corporation. *Application Note 321 Determination of Unbound Fat in Various Food Matrices Using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*; 2004; pp 1–3.
- (29) Herklotz, P. A.; Gurung, P.; Vanden Heuvel, B.; Kinney, C. A. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* **2010**, *78*, 1416–1421.
- (30) An, J.; Zhou, Q.; Sun, Y.; Xu, Z. Ecotoxicological effects of typical personal care products on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* **2009**, *76*, 1428–1434.
- (31) Chefetz, B.; Mualem, T.; Ben-Ari, J. Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere* **2008**, *73*, 1335–1343.
- (32) Briggs, G. G.; Bromilow, R. H.; Evans, A. A. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pestic. Sci.* **1982**, *13*, 495–504.
- (33) Bromilow, R. H.; Chamberlain, K. Principles governing uptake and transport of chemicals. In *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*; Trapp, S., McFarlane, C., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1995; pp 38–64.
- (34) Wu, C.; Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Fang, M.; Czajkowski, K. P. Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6157–6161.
- (35) Schwab, A. P.; Al-Assi, A. A.; Banks, M. K. Adsorption of naphthalene onto plant roots. *J. Environ. Qual.* **1998**, *27*, 220–224.
- (36) Gao, Y.; Ling, L. Comparison for plant uptake of phenanthrene and pyrene from soil and water. *Biol. Fertil. Soils* **2006**, *42*, 387–394.

3.2 Metabolization of the Bacteriostatic Agent Triclosan in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake Assessment

3.2.1 Veröffentlichter Fachartikel

Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Moeder M., Ondruschka J., Reemtsma T. Metabolization of the Bacteriostatic Agent Triclosan in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake Assessment. *Environmental Science & Technology* 46 (2012) 10797-10804.

Der Fachartikel ist abrufbar unter:

<http://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-ETBUbZ7aRzIasd9r8Fb2>

<http://dx.doi.org/10.1021/es3028378>

Metabolization of the Bacteriostatic Agent Triclosan in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake Assessment

André Macherius,[†] Trine Eggen,[‡] Wilhelm Lorenz,[§] Monika Moeder,[†] Jelka Ondruschka,^{||} and Thorsten Reemtsma^{†,*}

[†]Helmholtz Centre for Environmental Research—UFZ, Department of Analytical Chemistry, Leipzig, Germany

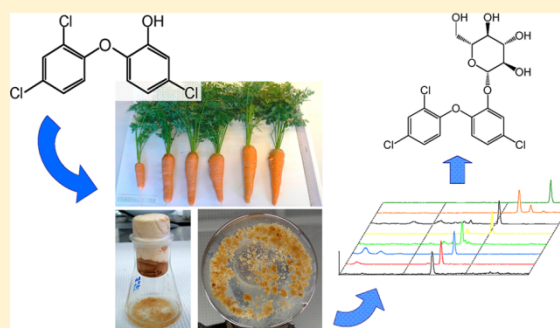
[‡]Bioforsk, Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research, Institute of Food Chemistry and Environmental Chemistry, Klepp, Norway

[§]Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Food Technology and Bioprocess Engineering, Halle (Saale), Germany

^{||}Dresden University of Technology, Dresden, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Persistent environmental contaminants may enter agricultural fields via the application of sewage sludge, by irrigation with treated municipal wastewater or by manuring. It has been shown that such contaminants can be incorporated into crop plants. The metabolism of the bacteriostatic agents triclocarban, triclosan, and its transformation product methyl triclosan was investigated after their uptake into carrot cell cultures. A fast metabolization of triclosan was observed and eight so far unknown phase II metabolites, conjugates with saccharides, disaccharides, malonic acid, and sulfate, were identified by liquid chromatography–mass spectrometry. Triclocarban and methyl triclosan lack a phenolic group and remained unaltered in the cell cultures. Phase I metabolization was not observed for any of the compounds. All eight triclosan conjugates identified in the cell cultures were also detected in extracts of intact carrot plants cultivated on triclosan contaminated soils. Their total amount in the plants was assessed to exceed the amount of the triclosan itself by a factor of 5. This study shows that a disregard of conjugates in studies on plant uptake of environmental contaminants may severely underestimates the extent of uptake into plants and, eventually, the potential human exposure to contaminants via food of plant origin.



1. INTRODUCTION

The antibacterial agent triclosan is widely applied in personal care products, cleaning agents, food packaging, and cloth,¹ and it enters wastewater treatment plants via domestic wastewater. It is known for its persistence during the wastewater treatment processes and its tendency to adsorb on sewage sludge.² About half of the triclosan entering a conventional wastewater treatment plant has been shown to accumulate in sludge, while the other half was transformed, for example, by methylation to methyl triclosan.² This is less polar and mainly adsorbed to the particle phase, as well. Triclocarban, which is also extensively applied in personal care products like soaps, cosmetics, and cleaning agents also adsorbs to sewage sludge to a large extent.³ As a result, triclosan and triclocarban are, besides steroid hormones, among the most frequently found contaminants in sewage sludges. The 95th percentile of their concentration in sewage sludge samples investigated in the U.S. in 2007 were found to be 62 and 131 mg kg⁻¹ (d.w.), respectively.⁴

In the U.S. approximately half of the annually produced 8 million metric tons (d.w.) sewage sludge⁵ and in the European

Union about 40% of 10 million metric tons (d.w.)⁶ are applied to agricultural land. Together with the sludge, the adsorbed contaminants originating from municipal wastewater reach agricultural land. This poses the risk that the contaminants are incorporated into the cultivated plants and thereby enter the human food web. For example, Wu et al. 2010⁷ showed that triclosan and triclocarban are taken up by soybean plants from a biosolid amended soil under greenhouse conditions. The compounds were transported into aerial parts of the plant and were even detectable in the beans. The same has been reported for greenhouse experiments with pumpkin, zucchini, and switch grass.⁸ In carrots, which were grown in soil with an average triclosan concentration of 3 μg g⁻¹ (d.w.), about 20 μg of this bacteriostatic agent were detected in the edible root parts after the plants maturation.⁹ More polar wastewater constituents may reach agricultural fields by irrigation with

Received: July 13, 2012

Revised: August 30, 2012

Accepted: September 4, 2012

Published: September 18, 2012

reclaimed wastewater and may be partly incorporated into plants.^{7,10} Another area of concern is the uptake of antibiotics used in animal husbandry after application of manure on arable land.¹¹

Studies on the fate of pesticides in plants have outlined the potential of plants to transform contaminants after their incorporation.^{12,13} In general, the metabolic pathway of contaminants in plants and animals can be divided into three phases. In phase I, an activation of the molecule may occur by a number of processes^{14,15} such as hydroxylation, hydrolysis or oxidation. Phase I metabolism renders the parent compound more polar and more reactive for metabolization in phase II. This phase involves the conjugation of the contaminant with polar biomolecules as amino acids, glutathione, or carbohydrates to increase its water solubility.^{14,15} In phase III, animals remove these metabolites via biliary or renal excretion, whereas plants apply a strategy of sequestration and storage in vacuoles or parts of the cell wall.¹⁶ To date, plant metabolism has not been considered in studies on the uptake of environmental contaminants.

Studies have shown that triclosan and triclocarban can be subjected to phase I (i.e., hydroxylation) and phase II (conjugation) metabolism in animals as shown for rats and ricefish.^{17,18} Accordingly, plants may also metabolize triclosan after uptake. If this would be the case, the sole consideration of the unaltered contaminant could lead to an underestimation of the incorporated amounts in plant uptake studies. To highlight this aspect we studied the metabolism of triclocarban, triclosan, and methyl triclosan in carrot cell cultures. Cell cultures were selected instead of intact plants because they pose a number of advantages for metabolism studies: microbial and photochemical degradation processes can be excluded reliably, less experimental effort is required, and well-defined cultivation conditions are easy to adjust. It has been shown that the metabolization rate in cell cultures is increased but the metabolite pattern similar as in intact plants.¹⁴

The findings gathered by these metabolism studies were compared to intact carrot plants from related uptake studies. Carrots were selected for this study as they are a highly consumed root vegetable¹⁹ and have been considered a worst case scenario for uptake studies.²⁰

2. MATERIALS AND METHODS

All chemicals and standards were commercially available as indicated in the Supporting Information (SI).

Carrot Cell Culture Experiments. The carrot cell suspensions were grown from a callus culture of *Daucus carota* L. subs. *sativus* (Hoffm.) Arcang. cv. Maxima (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) under sterile conditions and exclusion of light in Narayan culture medium²¹ at 26 °C and 130 rpm. The metabolism experiments were carried out at the beginning of the subcultivation interval (8 days), starting with 18 parallel bottles each using 2 g (f.w.) cell material in 20 mL culture medium. An initial medium concentration of 1 µg mL⁻¹ of either triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol), methyl triclosan (2,4-dichloro-1-(4-chloro-2-methoxyphenoxy)-benzene) or triclocarban (1-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea), dissolved in methanol, was adjusted. Three bottles were sacrificed after 0, 2, 8, 24, 48, and 120 h of incubation.

Cell material was separated from the culture medium by filtration through cellulose filters, washed twice with ultrapure water, wrapped in aluminum foil, immediately frozen and

stored at -20 °C until further processing. To determine the amounts of the study compound sorbed to the cultivation bottle, it was washed with 10 mL of acetone. The cell material was homogenized in liquid nitrogen using a mortar and pestle and transferred to a glass centrifuge tube. A magnetic stir bar was added and the cell material extracted three times with 3 mL water/acetonitrile 1/1 (v/v) with 5 mM ammonium acetate for 30 min at ambient temperature. In the case of triclosan, the extraction buffer additionally contained 0.5% glacial acetic acid. After each extraction step, the tube was centrifuged for 5 min at 4500 rpm; the supernatants were collected and finally adjusted to a total volume of 10 mL. The analysis for triclosan and methyl triclosan in culture medium and cell extracts was carried out by headspace solid phase microextraction followed by GC-MS analysis (see SI) applying an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with a 5973 mass selective detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), a Gerstel MPS2 autosampling device and a Gerstel Agitator/Stirrer device (Gerstel, Muehlheim a. d. Ruhr, Germany).

Triclocarban was analyzed by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using an Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an AB Sciex QTRAP 5500 MS/MS System (AB Sciex, Foster City, CA). The metabolites were detected and identified by means of full scan and product ion scans after negative and positive ionization using LC-MS/MS. To study the time dependence of metabolite formation and their distribution between the cells and culture media, all samples were finally analyzed for the metabolites applying the multiple reaction monitoring (MRM) mode after negative ionization. Proposals for metabolite identity and structure were checked by exact mass measurement using an UPLC equipped with the Waters Synapt G2-S HDMS Q-TOF-MS instrument (Water Corp., Milford, MA) under negative and positive electrospray ionization.

Whole Plant Experiments. Carrots were cultivated under greenhouse conditions in soil contaminated with triclosan (mean of 3 mg kg⁻¹), harvested after maturation and processed as described elsewhere.⁹ The extracts of the carrot root (separated into peel and core) were analyzed for the triclosan metabolites by means of LC-MS/MS using the MRM mode.

More experimental and analytical details are provided in the SI.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Triclosan Concentration in Carrot Cell Cultures. The culture medium depleted rapidly of triclosan, from initial 17.2 µg ± 2.1 µg to 4.0 µg ± 0.6 µg after 2 h and to 0.9 µg ± 0.1 µg after 24 h, respectively (Figure 1). The triclosan concentration then remained below the limit of quantification. The detected triclosan amounts in the cell material increased rapidly within the first 2 h to a maximum of 17.2 µg ± 1.8 µg, likely indicating adsorption of triclosan from the culture medium. However, during the ongoing incubation, the triclosan amount in the cell material decreased steadily to a final content of 1.3 µg ± 0.3 µg triclosan 5 days after incubation. Adsorption of triclosan to the culture bottle turned out to be negligible. The reduction of the detected triclosan amounts in the entire system follows a second order reaction, as the plot of 1/[A_{t, triclosan}] versus the incubation time *t* is linear (*r*² = 0.98). According to this, a reaction rate constant *k* of 0.0056 µg⁻¹ h⁻¹ and a half-life (*t*_{1/2}) of 9 h were calculated for these experiments. In the abiotic control the amount of triclosan in solution remained stable;

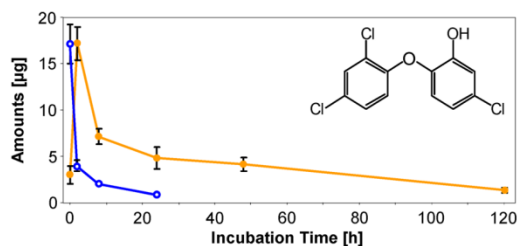


Figure 1. Amounts of triclosan in culture medium (blue open circle) and cell material (orange filled circle) versus incubation time (h). Data shown are means \pm standard deviation from three replicates. Triclosan amount in culture medium after 24 h below the limit of quantification.

$18.2 \pm 1.6 \mu\text{g}$ ($n = 4$) of the initial concentration were recovered after a period of 5 days. Thus, the concentration decrease in the carrot cultures can be ascribed to metabolic processes in the plant cells. It has been reported that triclosan concentrations of $0.44 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the nutrient solution was lethal to cabbage and Wisconsin Fast Plants following germination.²² Even though the applied triclosan concentrations were slightly higher in our study, effects on the vitality (growth inhibition or death cells) were not observed. The fast metabolization of triclosan might be a reason for the absence of obvious phytotoxic effects.

Occurrence and Identification of Triclosan Metabolites. LC-MS/MS analyses were performed to detect and identify metabolites of triclosan in the cell extracts. After 5 days (120 h) of incubation eight signals were detected which were (a) not present in control samples and (b) showed a characteristic isotopic pattern of trichlorinated organic compounds for instance for metabolite M2 at m/z 667, 669, and 671, with relative peak intensities of 100%, 96%, and 31%, respectively (Figure 2A). All eight metabolites had shorter retention times than triclosan, suggesting that their polarity was increased. In the product ion spectra of all metabolites (ESI negative) a fragment ion at m/z 287 was detected (Table 1), which corresponds to the molecular anion of [³⁵Cl₃]-triclosan. This fragment ion indicates that triclosan remained as a

substructure in the metabolites, that is, that conjugates were formed from the triclosan. Further transformation products of triclosan which would have been formed by phase I reactions, such as dechlorination, hydroxylation or ether cleavage were not detected.

The conjugates (Figure 3) were identified based on characteristic mass differences of their molecular ions compared to the triclosan fragment ion (m/z 287) and on other characteristic fragmentation patterns in their product ion spectra²³ (Table 1, Figure 2). For instance, the abundant metabolite M2 is proposed to be triclosan glucopyranosyl-(malonyl)-pentoranoside (Figure 2). This compound shows a molecular anion at m/z 667, which differs by 380 u from that of [³⁵Cl₃]-triclosan, and neutral losses of 44 u and 380 u, representing the loss of CO₂ and of the suggested anhydroglucopyranosyl-(malonyl)-pentofuranoside (C₁₄H₂₀O₁₂) moiety, respectively. The lack of characteristic fragments of the mono- and disaccharide conjugates in negative ionization mode impeded their identification but is in agreement with literature^{23,24} (Table 1). Only the neutral loss of the entire conjugate moiety yielding the triclosan fragment ion (m/z 287) could be observed, as well as decarboxylation of the malonylates (M2, M4, M5, and M6). In the full scan spectra, metabolites M1, M3, and M7 occurred as acetate adducts formed during the electrospray ionization (Table 1). A mass loss of 60 u (acetic acid) during collision induced dissociation yielded the molecular anions and confirmed the adduct formation. Fragmentation of the glycosidic bond of disaccharide conjugates did not occur upon negative ionization. In positive ionization mode, however, where the positive charge is preferentially located at the sugar moieties, fragmentation of the glycosidic bond between two carbohydrate moieties did occur. For example M2 showed a fragment ion at m/z 219.050 detected by high resolution mass spectrometry using a Q-TOF mass spectrometer; this fragment is proposed to represent the anhydromalonylpentose fragment (SI Figure S-1). This fragmentation indicates that the malonylated pentose forms the terminal unit of the conjugate, while the glucose is bound to triclosan. In contrast, the collision induced dissociation of ammonium adducts of triclosan glucopyranosyl-(malonyl)-

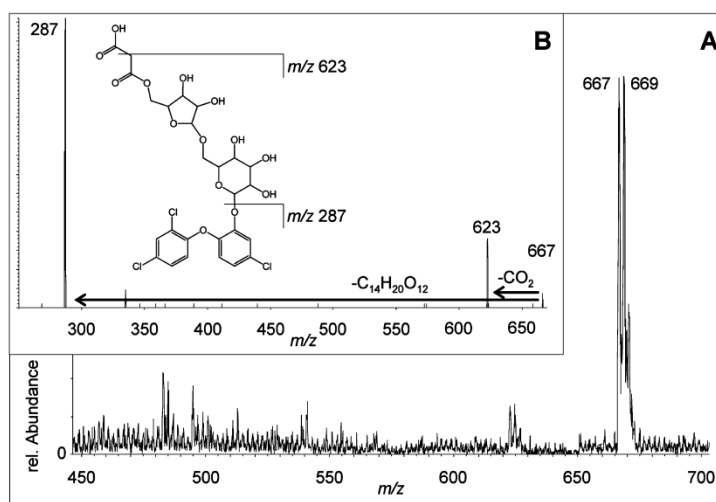


Figure 2. Full scan mass spectrum (A) and product ion spectrum (B) of the molecular anion at m/z 667 determined in ESI negative mode suggested as triclosan glucopyranosyl-(malonyl)-pentofuranoside (M2).

Table 1. Suggested Identity and Retention Times (RT) of the Eight Detected Metabolites Based on Mass Spectrometric Data^a

metabolite	RT (min)	CE (eV)	[M-H] ⁻ (nominal mass) (m/z)	fragment ions (nominal mass) (m/z)	molecular formula	accurate m/z of [M-H] ⁻ (deviation [ppm])
M1 triclosan glucopyranosyl-desoxyhexopyranoside	22.1	-15	655*	595, 287	C ₂₄ H ₂₇ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ C ₂₄ H ₂₇ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₁₁	595.0532 (1.5) 597.0508 (0.5)
M2 triclosan glucopyranosyl-(malonyl)-pentofuranoside	22.7	-15	667	623, 287	C ₂₆ H ₂₇ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ C ₂₆ H ₂₇ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₁₄	667.0387 (0.1) 669.0372 (1.9)
M3 triclosan glucopyranosyl-pentofuranoside	23.1	-17	641*	581, 287	C ₂₃ H ₂₅ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ C ₂₃ H ₂₅ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₁₁	581.0397 (2.2) 583.0374 (3.3)
M4 triclosan glucopyranosyl-(malonyl)-glucopyranoside	23.2	-15	697	653, 287	C ₂₇ H ₂₉ ³⁵ Cl ₃ O ₁₅ C ₂₇ H ₂₉ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₁₅	697.0501 (1.0) 699.0479 (2.1)
M5 triclosan glucopyranosyl-(dimalonyl)-glucopyranoside	23.3	-17	783	739, 695, 287	C ₃₀ H ₃₁ ³⁵ Cl ₃ O ₁₈ C ₃₀ H ₃₁ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₁₈	783.0490 (0.1) 785.0468 (0.9)
M6 triclosan (malonyl)-glucopyranoside	25.3	-5	535	491, 287	C ₂₁ H ₁₉ ³⁵ Cl ₃ O ₁₀ C ₂₁ H ₁₉ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₁₀	534.9976 (1.9) 536.9968 (6.0)
M7 triclosan glucopyranoside	26.1	-15	509*	449, 287	C ₁₈ H ₁₇ ³⁵ Cl ₃ O ₇ C ₁₈ H ₁₇ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₇	448.9968 (1.3) 450.9942 (2.2)
M8 triclosan hydrogen sulfate	28.8	-28	367	287	C ₁₂ H ₇ ³⁵ Cl ₃ O ₅ S C ₁₂ H ₇ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl ₁ O ₅ S	366.9008 (1.6) 368.8976 (1.1)

^aThe molecular anions [M-H]⁻ and the corresponding fragment ions which were obtained by collision induced dissociation by the collision energy (CE). The m/z with an asterisk represent the detected acetate adducts.

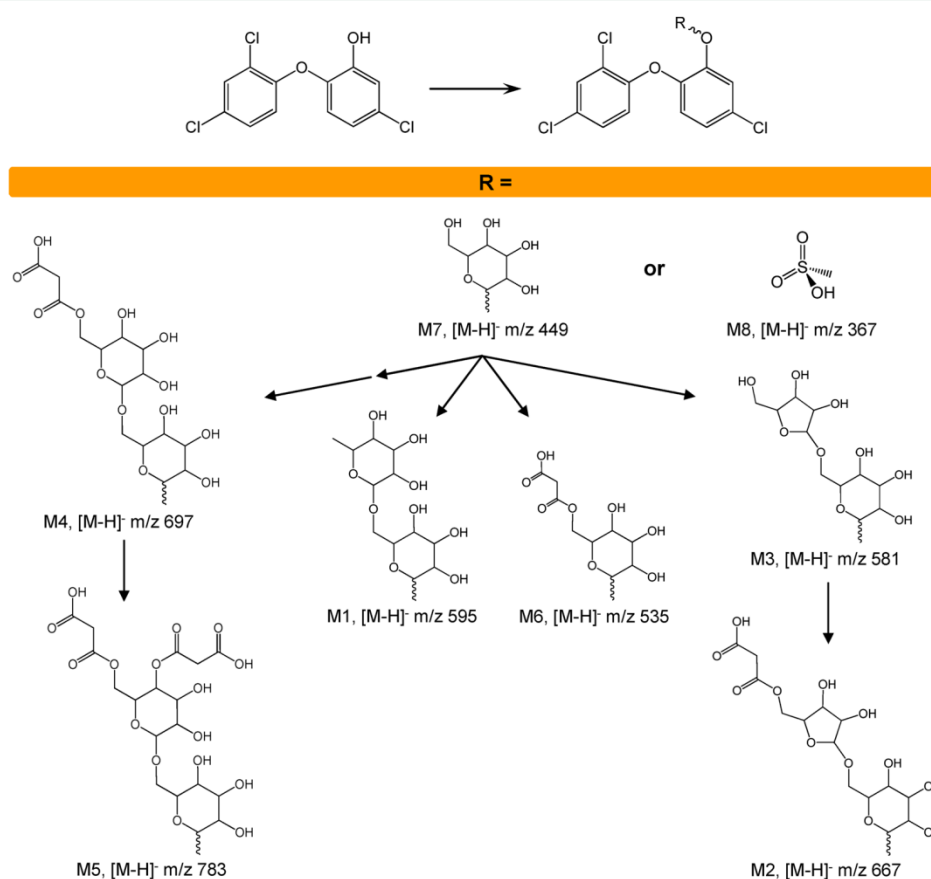


Figure 3. Proposed structures for the triclosan conjugates detected in carrot cell cultures and their possible formation pathway. The wavy line represents the bond to the phenolate oxygen of triclosan.

glucopyranoside (M4) gave rise to a fragment ion at m/z 249.060 pointing to an anhydromalonylhexose moiety. The other conjugates were identified analogously; their molecular

formulas were confirmed by exact mass determination using a Q-TOF mass spectrometer (Table 1).

Possible Metabolic Pathway. Glycosylation is a frequently observed detoxification reaction in plants and has been

shown to be especially important for the fate of exogenous phenols in plant tissue.^{25–27} A possible metabolic pathway for the formation of the eight metabolites is provided in Figure 3. Although mass spectrometric analysis does not provide information on the stereoisomeric structure of the metabolites, it is very likely that the hexose conjugate M7 was a β -D-glucopyranose moiety forming an O-1-glycosidic bond with the phenolic hydroxyl group of triclosan. This could then be the precursor for the formation of the disaccharide conjugates (M1–M5) by addition of a hexose or a pentose, respectively (Figure 3). Conjugates with the monosaccharide β -D-glucose are typical metabolites in plants,^{23,28} whereas the formation of disaccharide conjugates is less frequently reported. The second hexose molecule as in M4 and M5 is most likely a second glucopyranoside forming an O-glucosidic bond^{23,27} (Figure 3). The involvement of a pentose as in M2 and M3 has been rarely described so far.²⁸ In these few studies, the pentose moieties were identified as xylose, arabinose,^{24,29} or, more recently, apiose.^{26,27} The metabolite M1 is a rather unusual metabolite as it bears a disaccharide consisting of the glucopyranose and a deoxy-hexose (Figure 3), which is most probably rhamnose^{30,31} (Figure 3).

After glycosylation, the final step of phase II metabolism in plants often involves esterification of the saccharides with malonic acid. The most common product is the β -D-(6-O-malonyl)-glucopyranoside,^{14,16} which was also identified as an abundant metabolite M6 in our study (Figure 4) and arises

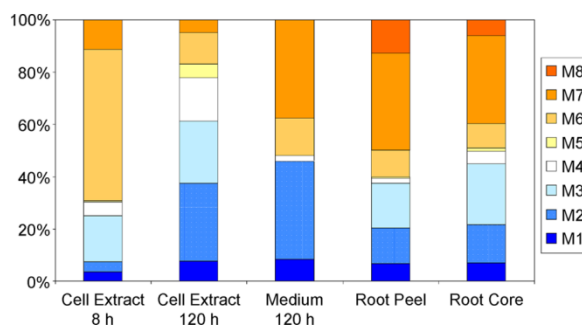


Figure 4. Relative peak areas of the triclosan metabolites M1–M8 (see Figure 3) detected by LC-MS/MS in extracts of cells incubated with triclosan after 8 h and 120 h, of the culture medium of the cells after 120 h, and of the root peel and root core of carrot plants grown 17 weeks in triclosan contaminated soils (average triclosan concentration in soil: 3 mg kg⁻¹).

from the malonylation of the triclosan glucopyranoside M7 (Figure 3). Formation of malonyl esters was also observed for disaccharides, leading to M2 and M4, as well as the 2-fold esterification with malonic acid which yields M5 (Figure 3). Malonic acid serves as protectant of the saccharide conjugates against their enzymatic cleavage and is assumed to act as a signal for the translocation into the vacuole or apoplast.^{14,16,32}

A further metabolite which is not related to the conjugation with carbohydrates, but arises from a second metabolic pathway is the sulfate conjugate M8 (Figure 3). Conjugation with sulfate is well-known in the metabolism of animals.^{17,23} For plants sulfatation has been shown for a glucose conjugate,³³ while no report is known for the direct sulfatation of a phenolic contaminant as in M8. In the carrot cell cultures, however, M8 was found in very low amounts (therefore not visible in Figure 4).

Some indications on the sequence of metabolite formation were obtained from the time-resolved analysis of the cell culture experiments (Figure 4). The first triclosan metabolites, namely the monosaccharide conjugates M6 and M7 occurred within two hours after starting the experiment. M6 was particularly dominant after 8 h (Figure 4). The contribution of the more complex disaccharides and malonylated saccharides increases with time. Namely M2, M3, and M4 were more abundant toward the end of the experiment (120 h in Figure 4).

This is the first study showing that triclosan is amenable to metabolization in plant tissue and the first to identify eight different conjugates in plant cells. The observed metabolization of triclosan in carrot cells is, however, less diverse than in animals. There various hydroxylations (phase I metabolism) of triclosan have been observed as well as a larger diversity of conjugates (phase II), for example with glucuronic acids, sulfate and amino acids.¹⁷

Metabolites in Culture Medium. Triclosan metabolites were not only found in the cells but some of them (M1, M2, M3, M4, M6, and M7) also in the culture medium. However, the distribution of the metabolites differed from that in the cells. It has been suggested that conjugation with malonic acid would be a signal for the translocation into the vacuole or cell wall compartments.^{14,16,32} Here malonylated (M2, M4, M6) and nonmalonylated conjugates (M3, M7) were detected in the culture medium (Figure 4). Obviously esterification with malonic acid was not a prerequisite for the release of the conjugates from carrot cells.

The concentrations of all conjugates in the culture medium decreased toward the end of the incubation period of five days. This suggests that a part of the conjugates initially released into the culture medium were taken up again by the cells. Such a reuptake has previously been observed for 4-nitrophenol and 3,4-dichloroaniline in carrot cell cultures or phenoxyacetic acid in soybean cell cultures.^{34–36} Due to the high polarity and the anionic properties of the malonyl esters their reuptake, likely, occurs by an active process.^{34,36} The observed release and reuptake of the metabolites by the cell cultures is not representative for a possible behavior in intact plants. It is well accepted that metabolites of contaminants in plants are not released but sequestered and stored by the plant.¹⁶

Formation of Triclosan Metabolites in Intact Carrot Plants. It then had to be checked whether the metabolization of triclosan observed in carrot cell cultures does also occur in whole plants. For this purpose extracts of carrot plants from a previous study were reanalyzed, in which intact carrot plants had been exposed to triclosan at a soil concentration of 3 mg kg⁻¹ (d.w.) in pot experiments.⁹ The reanalysis was carried out by LC-MS/MS applying a MRM method established for the sensitive determination of the identified metabolites. All eight metabolites could be determined in the extracts of carrot root peel and core material (SI Figure S3). The relative metabolite composition of carrot peel and core was quite similar but it differed from that found in the cell cultures: the glucoside M7 and the triclosan sulfate M8 were much more abundant in the plants than in the cell culture whereas M6 was much less important (Figure 4). These findings confirm that all transformation reactions observed in the carrot cell cultures also occurred in intact carrot plants grown on triclosan contaminated soil, although to a different extent.

As no reference material of the metabolites was available, a direct quantification of the conjugates in the plant extracts was not possible. For a first estimate of the total conjugate amount

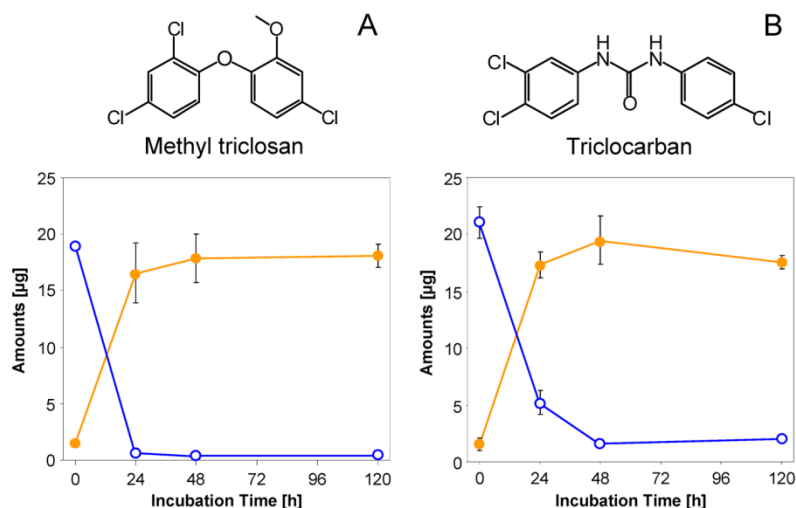


Figure 5. Molecular structures and amount (a) of methyl triclosan and (b) of triclocarban in culture medium (blue open circle) and cell material (orange filled circle) versus incubation time. Data shown are means \pm standard deviation from three experiments.

it was assumed that their total peak area in the MRM chromatograms determined from cell extracts and culture medium corresponds to the decrease of triclosan in the respective experiment (Figure 1). With this assumption a response factor for the sum of the metabolites was calculated which then was applied to the total peak area in the MRM chromatograms determined from plant extracts under the same analytical conditions (Figure 4). On this basis the amount of the triclosan in form of conjugates in the carrot roots (peel + core) was assessed to be about 100 μg . This amount clearly exceeds the 20 μg of the unaltered triclosan which had been detected in that plant.⁹

Behavior of Methyl Triclosan and Triclocarban in the Carrot Cell Cultures. In addition to triclosan, the uptake and metabolism of the functionally and structurally related compounds methyl triclosan and triclocarban in carrot cell cultures was investigated (Figure 5). Similar to triclosan the concentration of both compounds decreased rapidly in the culture medium within 24 h and increased simultaneously inside the cells. Contrary to triclosan, the cell concentrations remained constant over 5 days, indicating that neither methyl triclosan nor triclocarban was metabolized in the carrot cells. Compared to triclosan, these two compounds lack a phenolic group. They do also not offer any other functional group suitable for direct conjugation reactions (phase II metabolism). Both molecules require an activation by phase I metabolism reactions to allow conjugation in phase II. Although examples for phase I reactions have been reported for chlorinated aromatic compounds in plants^{37,38} no such metabolism occurred with methyl triclosan or triclocarban in this carrot cell culture. A cleavage of the biphenyl ether bridge of methyl triclosan or the carbanilide bridge of triclocarban was also not observed, thus both compounds remained unaltered in the cells.

Implications for Assessment of Plant Uptake and Human Exposure. The detection of a variety of triclosan conjugates in carrot cell cultures and carrot roots indicated that this species is able to metabolize contaminants after their uptake. For compounds amenable to phase II metabolism such as triclosan the conjugated portion can exceed the portion

found as unaltered triclosan. It must be assumed that for such compounds previous uptake studies have underestimated the extent of uptake, as only the amount of nonmetabolized triclosan has been determined.

Likely, phase II metabolism as observed here for triclosan may apply to other phenolic contaminants, such as bisphenol A and alkyl phenols, which have been shown to be incorporated by crested wheatgrass.³⁹ Compounds bearing other polar functional groups might be equally amenable to phase II metabolism. For example primary amines and carboxylic acids as they are present in a number of antibiotics used in animal husbandry, that have been shown to be taken up by plants when manure is applied on arable land.¹¹ For these compound classes the search for conjugates formed in the plants could be useful and may correct our picture on the extent of uptake by plants, as well.

The possible formation of conjugates from contaminants amenable to phase II metabolism should also be considered when the exposure of humans to contaminants via food of plant origin is assessed. This should comprise the identification and the quantification of the formed conjugates, as well as the assessment whether the parent compound might be liberated after the ingestion of the plant material into the human body. The sole consideration of the unaltered contaminant and the neglect of conjugates might lead to an underestimation of the effective contaminant concentration and, thus, of the human exposure to that contaminant.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Experimental and analytical details are provided in the Supporting Information. A product ion scan of the ammonium adduct of metabolite M2 and its proposed collision induced fragmentation pathway are given in Figure S1 and S2. Figure S3 shows the MRM chromatogram of triclosan metabolites detected in an extract of carrot root peel. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +49-341-2351261; fax: +49-341-2351443.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gerlinde Groeger from the Saxonian Institute for Applied Biotechnology (SIAB, Leipzig, Germany) for the extensive technical assistance with the cell cultivation and Bettina Seiwert (UFZ) for LC-Q-TOF-MS analyses. Financial support of a part of this study by the Norwegian Research Council is gratefully acknowledged (Project no. 184339/I10). A.M. thanks the Helmholtz Impulse and Networking Fund through Helmholtz Interdisciplinary Graduate School for Environmental Research (HIGRADE) for the kind support.

REFERENCES

- (1) Adolfsson-Erici, M.; Pettersson, M.; Parkkonen, J.; Sturve, J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* **2002**, *46*, 1485–1489.
- (2) Heidler, J.; Halden, R. U. Mass balance assessment of Triclosan removal during conventional sewage treatment. *Chemosphere* **2007**, *66*, 362–369.
- (3) Heidler, J.; Sapkota, A.; Halden, R. U. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 3634–3639.
- (4) U.S. Environmental Protection Agency—Office of Water. *Targeted National Sewage Sludge Survey—Statistical Analysis Report*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2009; p 58.
- (5) Snyder, E. H.; O'Connor, G. a.; McAvoy, D. C. Fate of ¹⁴C-triclocarban in biosolids-amended soils. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 2726–2732.
- (6) Milieu Ltd., WRC, Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA) for the European Commission. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land; *Final Report - Part 1: Overview Report*, 2010; pp 1–16
- (7) Wu, C.; Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Fang, M.; Czajkowski, K. P. Uptake of Pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6157–6161.
- (8) Aryal, N.; Reinhold, D. M. Phytoaccumulation of antimicrobials from biosolids: Impacts on environmental fate and relevance to human exposure. *Water Res.* **2011**, *45*, 5545–5552.
- (9) Macherius, A.; Eggen, T.; Lorenz, W. G.; Reemtsma, T.; Winkler, U.; Moeder, M. Uptake of galaxolide, tonalide, and triclosan by carrot, barley, and meadow fescue plants. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60* (32), 7785–7791.
- (10) Shenker, M.; Harush, D.; Ben-Ari, J.; Chefetz, B. Uptake of carbamazepine by cucumber plants—A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* **2011**, *82* (6), 905–910.
- (11) Boxall, A. B. A.; Johnson, P.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E.; Levy, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 2288–2297.
- (12) Cole, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pestic. Sci.* **1994**, *42* (3), 209–222.
- (13) Suresh, B.; Sherkhane, P. D.; Kale, S.; Eapen, S.; Ravishankar, G. A. Uptake and degradation of DDT by hairy root cultures of *Cichorium intybus* and *Brassica juncea*. *Chemosphere* **2005**, *61*, 1288–1292.
- (14) Komofa, D.; Langebartels, C.; Sandermann Jr., H. Metabolic processes for organic chemicals in plants. In *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*; Trapp, S.; McFarlane, C., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, 1995; pp 69–103.
- (15) Coleman, J. O. D.; Blake-Kalff, M. A.; Emyr Davis, T. G. Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 144–151.
- (16) Sandermann, H., Jr. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 82–84.
- (17) Wu, J.-L.; Liu, J.; Cai, Z. Determination of triclosan metabolites by using in-source fragmentation from high-performance liquid chromatography/negative atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 1828–1834.
- (18) Schebb, N. H.; Flores, L.; Kurobe, T.; Franze, B.; Ranganathan, A.; Hammock, B. D.; Teh, S. J. Bioconcentration, metabolism and excretion of triclocarban in larval Quirt medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105*, 448–454.
- (19) Piirto, J.; Johansson, A.; Lang, V., *Europe in Figures 2011—Eurostat Yearbook*; European Union: Luxembourg, Luxembourg, 2011.
- (20) Wild, S. R.; Jones, K. C. Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: Screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *Sci. Total Environ.* **1992**, *119*, 85–119.
- (21) Narayan, M. S.; Thimmaraju, R.; Bhagyalakshmi, N. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 351–358.
- (22) Herklotz, P. A.; Gurung, P.; Vanden Heuvel, B.; Kinney, C. A. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* **2010**, *78*, 1416–1421.
- (23) Levens, K.; Schiebel, H.-M.; Behnke, B.; Dötzer, R.; Dreher, W.; Elend, M.; Thiele, H. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 55–72.
- (24) Berthiller, F.; Hauser, M.-T.; Krška, R.; Sulyok, M.; Werner, U.; Schuhmacher, R. LC-MS/MS determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 1194–1200.
- (25) Su, Z.-H.; Xu, Z.-S.; Peng, R.-H.; Tian, Y.-S.; Zhao, W.; Han, H.-J.; Yao, Q.-H.; Wu, A.-Z. Phytoremediation of trichlorophenol by phase II metabolism in transgenic arabidopsis overexpressing a populus glucosyltransferase. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 4016–4024.
- (26) Day, J. A.; Saunders, E. M. Glycosidation of Chlorophenols by *Lemma minor*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 613–620.
- (27) Laurent, F.; Canlet, C.; Debrauwer, L.; Pascal-Lorber, S. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenol in tobacco cell suspension cultures. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26*, 2299–2307.
- (28) Pascal-Lorber, S.; Rathahao, E.; Cravedi, J.-P.; Laurent, F. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere* **2004**, *56*, 275–284.
- (29) Roberts, T. R.; Wright, A. N. The metabolism of 3-phenoxybenzyl alcohol, a pyrethroid metabolite, in plants. *Pestic. Sci.* **1981**, *12*, 161–169.
- (30) Kachlicki, P.; Einhorn, J.; Muth, D.; Kerhoas, L.; Stobiecki, M. Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 572–586.
- (31) Maatoog, G. T.; Rosazza, J. P. N. Metabolism of daidzein by *Nocardia* species NRRL 5646 and *Mortierella isabellina* ATCC 38063. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1007–11.
- (32) Schmitt, R.; Kaul, J.; v.d. Trenck, T.; Schaller, E.; Sandermann, H., Jr. β -D-Glucosyl and O-malonyl- β -D-glucosyl conjugates of pentachlorophenol in soybean and wheat: Identification and enzymatic synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1985**, *24*, 77–85.
- (33) Laurent, F.; Debrauwer, L.; Rathahao, E.; Scalla, R. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid metabolism in transgenic tolerant cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 5307–5311.
- (34) Schmidt, B.; Thiede, B.; Rivero, C. Metabolism of the pesticide metabolites 4-Nitrophenol and 3,4-dichloroaniline in carrot (*Daucus carota*) cell suspension cultures. *Pestic. Sci.* **1994**, *40*, 231–238.

(35) Laurent, F. M. G.; Scalla, R. Metabolism and cell wall incorporation of phenoxyacetic acid in soybean cell suspension culture. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 3–10.

(36) Doran, P. M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 60–76.

(37) Zimmerlin, A.; Durst, F. Xenobiotic Metabolism in plants: Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1729–1732.

(38) Frear, D. S.; Swanson, H. R.; Thalacker, F. W. Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron, and linuron in wheat. *Pestic. Sci.* **1991**, *41*, 274–287.

(39) Dettenmaier, E. M.; Doucette, W. J. Mineralization and plant uptake of ^{14}C -labeled nonylphenol, nonylphenol tetraethoxylate, and nonylphenol nonylethoxylate in biosolids/soil systems planted with crested wheatgrass. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26*, 193–200.

3.2.2 Supporting Information des veröffentlichten Fachartikels

Supporting Information

Metabolization of the Bacteriostatic Agent Triclosan in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake Assessment

André Macherius^a, Trine Eggen^b, Wilhelm Lorenz^c, Monika Moeder^a, Jelka Ondruschka^d, Thorsten Reemtsma^{a,*}

^a *Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany*

^b *Bioforsk, Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research, Klepp, Norway*

^c *Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany*

^d *Dresden University of Technology, Dresden, Germany*

The Supporting Information contain 3 figures on 6 pages.

S1 Material and Methods

Chemicals

Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichloro phenoxy)-phenol, > 97.0%), methyl triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-methoxydiphenyl ether, 99.7%) and ammonium acetate ($\geq 99.0\%$ for HPLC) were provided by Fluka (Buchs, Switzerland), acetonitrile, methanol (both hypergrade), and glacial acetic acid (p.a.) were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Triclocarban (3,4,4'-trichlorocarbanilide, 99.5%) by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), 2,4-dichlorophenol and 4-chlorophenol (analytical grade) was provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA). The MS basal salt mixture, MS vitamin mixture, indole-3-acetic acid, kinetin, and saccharose for plant cell cultivation were provided by Duchefa Biochemie BV (Haarlem, Netherlands).

Carrot cell cultures and treatments

The carrot cell suspensions were grown from a callus culture of *Daucus carota L. subs. sativus (Hoffm.) Arcang. cv. Maxima* (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) under sterile conditions and exclusion of light in Narayan culture medium [1] at 26 °C and 130 rpm. The metabolism experiments were performed at the beginning of the subcultivation interval (8 d). 20 µg of the respective compound, dissolved in methanol, were applied to 20 mL culture medium inoculated with 2 g (f.w.) cell material. The incubation was terminated 0, 2, 8, 24, 48, and 120 h after exposure to determine the

concentration of the contaminant in the culture medium, in the cell material and adsorbed to the glass surface, applying three biological replicates each.

Sample processing

Culture medium and cell material were separated by filtration through cellulose filters. The Erlenmeyer flask and cells were washed twice with 10 mL water which was combined with the respective medium. To determine the amounts of the study compound sorbed to the Erlenmeyer flask, it was washed with 10 mL of acetone. The cell material was wrapped in aluminium foil, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C for further processing. The medium (plus wash water) was stored at -20 °C until analysis, as well. The frozen cell material was homogenized in liquid nitrogen using a mortar and pestle and transferred into a 30 mL glass centrifuge tube. A magnetic stir bar was added and the cell material extracted three times with 3 mL water/acetonitrile 1/1 (v/v) with 5 mM ammonium acetate for 30 min at ambient temperature. In the case of triclosan, the extraction buffer additionally contained 0.5% glacial acetic acid. After each extraction step, the tube was centrifuged for 5 min at 4500 rpm; the supernatants were combined and adjusted to a total volume of 10 mL.

Determination of triclosan and methyl triclosan by HS-SPME-GC-MS

The determination of triclosan and methyl triclosan was carried by means of head space - solid phase micro extraction - gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) technique. An Agilent 6890 gas chromatograph equipped with a 5973 mass selective detector, a HP-5ms U.I. column (30 m x 250 µm i.d. x 0.25 µm film thickness, all Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), a Gerstel MPS2 autosampling device and a Gerstel Agitator/Stirrer device (Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr, Germany) was applied.

The extraction/enrichment conditions were optimized applying experimental design methods using a central composite design (CCD). Based on 10 ml bidistilled water in 20 ml-head space vials, the factors to be optimized were extraction temperature, pH, and sodium chloride content in the ranges of 30 – 90 °C, pH 2.0 – 7.0, and 0 – 25% (w/w), respectively. At optimized conditions, an extraction temperature of 78 °C and a sodium chloride content of 20% were applied. The pH of the solution showed no significant effect and was therefore adjusted to 5.5 with HCl to work under reproducible conditions and to meet the pH of the culture medium. The extraction was carried with an 85 µm polyacrylate (PA) fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) for 30 min followed by desorption for 2 min in the split/splitless injector at 290 °C. The GC oven program started at an initial temperature of 45 °C

(2 min) and was increased with a rate of 20 K min⁻¹ to the final temperature 290 °C, which was held for 1.5 min. Carrier gas was helium at a constant pressure of 10.8 psi.

To determine triclosan and methyl triclosan, aliquots of max. 200 µl cell extract and medium and 100 µl of Erlenmeyer flask extracts were added to 10 ml of the sodium chloride solution in headspace vessels and analysed by means of the described procedure.

Analysis of Triclosan metabolites.

The cell extracts of the respective time steps (biological replicates) were unified and concentrated in a gentle stream of argon at ambient temperature to 0.5 µl. The analysis was carried out on an Agilent 1260 Infinity HPLC equipped with an Agilent Eclipse XDB-C8 column (150 mm x 4.6 mm ID, 5 µm particle size; both Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), an AB Sciex QTRAP[®] 5500 MS/MS System (AB Sciex, Foster City, CA, USA), applying electro spray ionisation in negative mode. Eluent A was 95% bidist. water, 5% acetonitril, 0.5% glacial acetic acid, and 5 mM ammonium acetate, whereas 95% acetonitrile, 5% bidist. water, 0.5% glacial acetic acid, and 5 mM ammonium acetate was applied as eluent B. At a constant flow of 200 µl min⁻¹, the gradient program was started with 30% B and held for 9 min, increased to 50% within 3 min and to 90% within additional 13 min, held for 15 min, and decreased to 30% in the following 3 min, which was finally held for 5 min. To study the metabolites in the culture medium, samples of 40 ml were concentrated to 5 ml via lyophilisation and analyzed for the identified metabolites. The accurate masses of the identified metabolites were determined by means of time - of-flight mass spectrometry using a Waters Synapt G2-S HDMS instrument (Waters GmbH, Eschborn, Germany).

Determination of Triclocarban by HPLC-MS-MS

The determination of triclocarban in culture medium, cell extracts, and glass wall extracts was carried out with the previously described HPLC-MS-MS. The applied eluents were the same as for triclosan analysis, but no glacial acetic acid was used. At a constant flow of $200 \mu\text{l min}^{-1}$, the gradient program was started with 30% B and held for 7 min, increased to 90% within 3 min, held for 25 min, and decreased to 30% in the following 3 min, which was finally held for 5 min. After electrospray ionisation at -3500 V and $600 \text{ }^\circ\text{C}$, the mass spectrometric detection was carried out in MRM mode using the transitions m/z 313 to 160 and m/z 315 to 162.

S2 Results

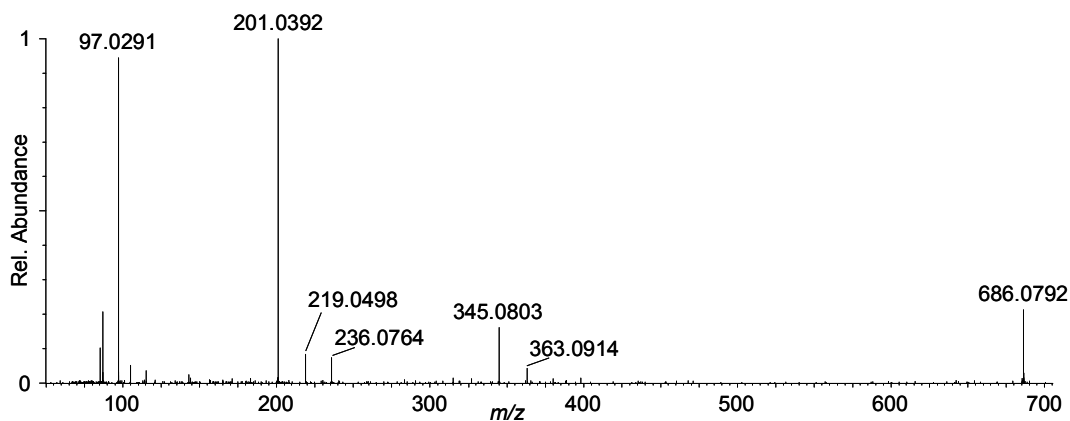


Figure S1. Product Ion Scan of the ammonia adduct of the triclosan glucopyranosyl-(malonyl)-pentofuranoside M2 (m/z 686.08) after positive ionization.

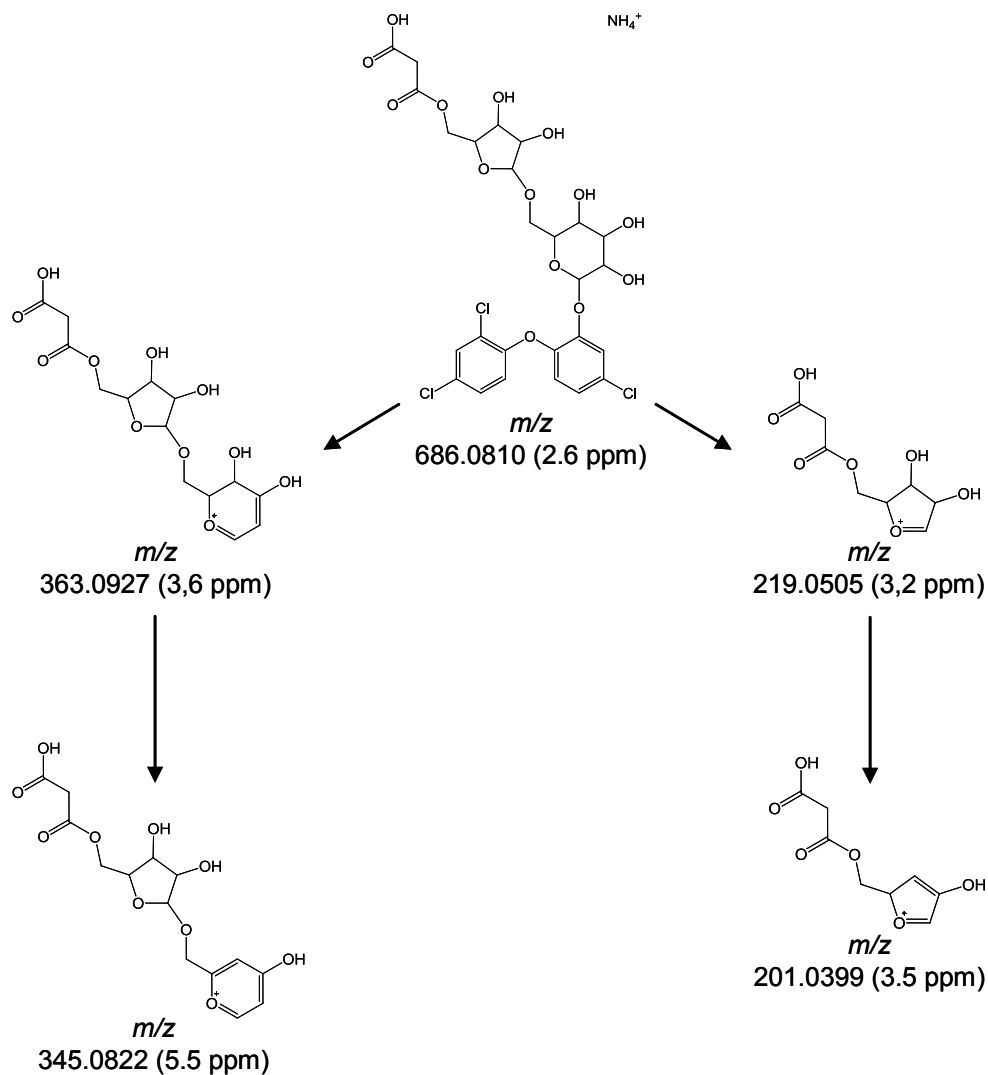


Figure S2. Proposed collision induced fragmentation pathway of the ammonia adduct of metabolite M2 in positive mode (m/z 868.08)

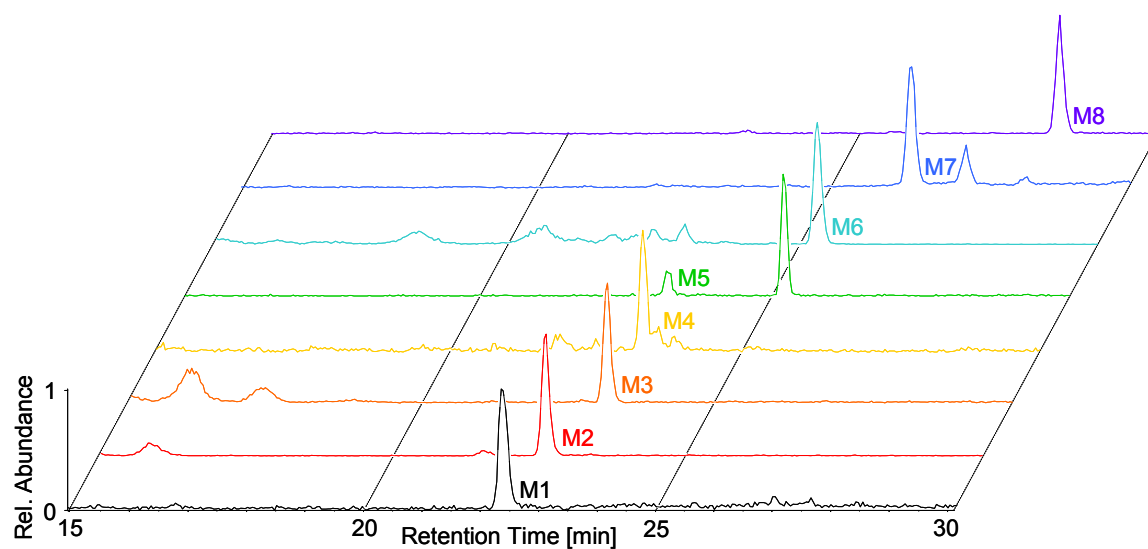


Figure S3. MRM chromatogram for the eight metabolites of triclosan in an extract of carrot root peels grown in soil with an average concentration of 3 mg kg^{-1} (d.w.) of triclosan (harvest after 17 weeks)

Literature Cited

1. Narayan, M. S.; Thimmaraju, R.; Bhagyalakshmi, N., Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 351-358.

3.2.3 Ergänzende Informationen

3.2.3.1 Etablierung, Kultivierung und Exposition der Karottenzellsuspensionskulturen

Die Karottenzellsuspensionskulturen wurden von Erik Klapproth am Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie e.V. in Leipzig im Rahmen seiner Bachelorarbeit ausgehend von Kalluskulturen hergestellt (Klapproth, 2010). Nachdem eine stabile Kultur etabliert, die Wachstumscharakteristika bestimmt und ausreichend Zellmaterial produziert wurde, wurden die Kulturen gegen die ausgewählten Kontaminanten exponiert. Dabei wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Detaillierte Informationen zu Etablierung, Kultivierung und Exposition der Kulturen sind im Anhang (Abschnitte A.1 und A.2) aufgeführt.

3.2.3.2 Optimierung der HS-SPME-GC-MS Methode zur Bestimmung von Triclosan, Methyltriclosan, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol in Pflanzenzell- und Haarwurzelkulturen

In Anlehnung an zwei in der Literatur beschriebene Methoden (Canosa et al., 2005; Regueiro et al., 2009) wurde eine automatische HS-SPME-GC-MS Methode zur quantitativen Bestimmung von Triclosan und dessen mögliche Transformationsprodukte Methyltriclosan, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol in den Nährmedien und Extrakten der Zell- und Haarwurzelkulturen etabliert.

In Vorversuchen wurden zunächst verschiedene SPME-Fasern hinsichtlich Ihrer Extraktionsausbeuten für die vier zu untersuchenden Verbindungen getestet. Die getesteten Faserbeschichtungen waren Polyacrylat (PA) mit einer Schichtdicke von 85 μm , Polydimethylsiloxan (PDMS, 100 μm) Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen (PDMS/DVB, 65 μm), Carbowax/Divinylbenzen (CW/DVB, 65 μm) und Carboxen/Polydimethylsiloxan (CAR/PDMS, 75 μm) der Fa. Supelco (Bellefonte, PA, USA). Die Fasern wurden im Dampfraum über destilliertem Wasser exponiert, das mit den Analyten dotiert wurde. Die Anreicherung erfolgte für dreißig Minuten bei 60 °C. Als Maß für die Anreicherung an der SPME-Faser sind die relativen Signalintensitäten der Analyten in Abbildung 12 dargestellt.

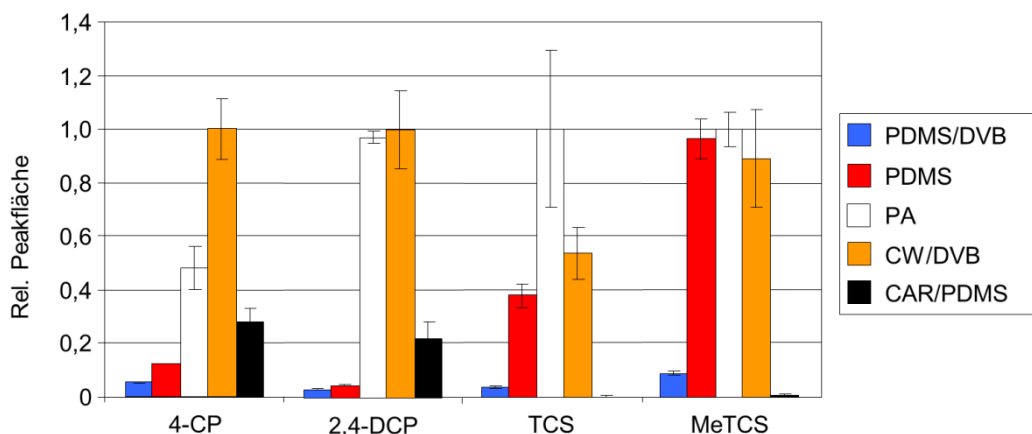


Abbildung 12. Relative Signalintensitäten von 4-Chlorphenol (4-CP), 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP), Triclosan (TCS) und Methyltriclosan (MeTCS) bei der GC-MS Analyse nach der HS-SPME mit Polyacrylat- (PA), Polydimethylsiloxan- (PDMS), Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen- (PDMS/DVB), Carbowax/Divinylbenzen- (CW/DVB) und Carboxen/Polydimethylsiloxan-Fasern (CAR/PDMS).

Die Polyacrylatfaser (PA) reicherte alle Analyten gut an und lieferte vor allem für Triclosan die besten Ergebnisse. Deshalb wurde die PA Faser für die weitere Methodenoptimierung ausgewählt. Außerdem zeigt diese Faser im Vergleich zu anderen in Frage kommenden Belegungen (PDMS, CW/DVB) die höchste mögliche Arbeitstemperatur, sodass die Desorption im Injektor des Gaschromatographen bei höheren Temperaturen erfolgen kann.

Die Optimierung der Extraktionsbedingungen erfolgte mittels statistischer Versuchsplanung mit einem rotierbaren zentral zusammengesetzten Versuchsplan (*central composite design*) unter Anwendung des Statistiksoftwarepaketes JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Dabei wurde der Einfluss von drei Faktoren auf die Extraktionsausbeute untersucht: 1) Extraktionstemperatur, 2) Natriumchloridgehalt und 3) pH-Wert der zu extrahierenden Lösung. Jeder Faktor wurde in fünf Faktorstufen getestet. Das Experiment am Zentralpunkt (0) des Versuchsplanes wurde mit sechs Replikaten durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Getestete Extraktionstemperaturen in °C, Natriumchloridgehalte in % und pH-Werte

	- α	- 1	0	+ 1	+ α
Extraktionstemperatur [°C]	30	42	60	78	90
Natriumchloridgehalt [%, w/w]	0	5	12,5	20	25
pH-Wert	2	3	4,5	6	7

Der pH-Wert der Lösung hatte für keine der untersuchten Verbindungen einen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Da alle untersuchten pH-Werte stets niedriger als die pK_S -Werte der Phenole waren, lagen in allen Lösungen vorwiegend die nicht-ionischen

Spezies vor. Für alle weiteren Optimierungsversuche wurde stets ein pH-Wert von 5,5 eingestellt, da dieser dem pH-Wert des verwendeten Nährmediums der Karottenzellsuspensionskulturen entspricht. Die Extraktionstemperatur und der Natriumchloridgehalt der Lösung hatten dagegen einen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute der Verbindungen (Abbildung 13).

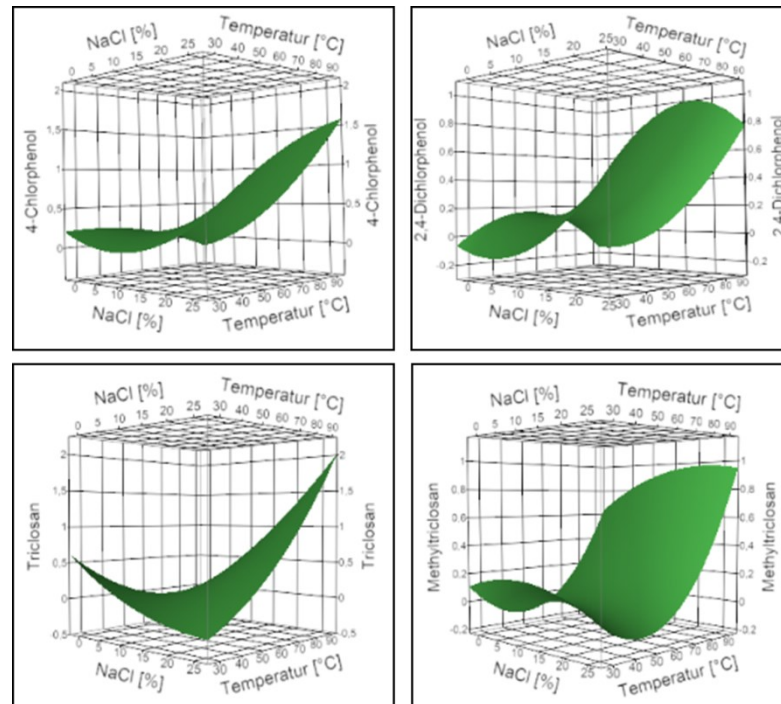


Abbildung 13. Wirkungsflächen für die Signalintensitäten von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan gegen die Faktoren Natriumchloridgehalt in % (w/w) und Extraktionstemperatur in °C bei pH 5,5.

Die Extraktionstemperatur zeigt bei nahezu allen Verbindungen einen signifikant positiven Effekt auf die Extraktionsausbeute. Auf die Extraktion von 2,4-Dichlorphenol hat der Faktor Temperatur zwar einen positiven Effekt, dieser ist jedoch nicht signifikant. Der Natriumchloridgehalt hat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Extraktionsausbeuten, der mit Ausnahme von Methyltriclosan bei allen Analyten signifikant war. Aus Abbildung 13 wird deutlich, mit zunehmenden Natriumchloridgehalt und höherer Temperatur steigen die Extraktionsausbeuten der Zielverbindungen. Als Optimum für alle weiteren Analysen wurden somit ein pH-Wert von 5,5, eine Extraktionstemperatur von 78 °C und ein Natriumchloridgehalt von 20 % festgelegt.

Unter den gewählten Bedingungen wurde die Zeitabhängigkeit der Anreicherung in einem Bereich zwischen 15 und 120 min untersucht. Bei den Signalintensitäten der flüchtigen Chlorphenole ist bereits ab 30 min kein signifikanter Anstieg erkennbar. Für Methyltriclosan

stellte sich nach 60 min ein Extraktionsgleichgewicht ein, während für Triclosan ein stetiger Anstieg der Signalintensitäten und auch nach 120 min keine Gleichgewichtseinstellung beobachtet wurde. Um einen möglichst hohen Probendurchsatz zu gewährleisten, wurde eine Anreicherungszeit von 30 min gewählt, auch wenn zu dieser Zeit für Triclosan und Methyltriclosan kein Gleichgewicht vorlag. Da die Extraktion aber vollständig automatisiert und somit die Extraktionszeit hoch reproduzierbar war, konnte eine Extraktionszeit in diesem dynamischen Extraktionsbereich gewählt werden. Eine Konditionierung der Proben durch Temperierung vor Beginn der Anreicherung hatte keinen Einfluss auf die Extraktionsausbeute und wurde deshalb nicht durchgeführt. Die optimierte automatische HS-SPME-Methode wurde in Verbindung mit der GC-MS Analyse validiert und zur Quantifizierung der Analyten in allen Nährmedien sowie Zell- und Gewebeextrakten der *in vitro*-Kulturen angewendet. Ablauf und Kenndaten der validierten HS-SPME-GC-MS Methode sind im Anhang (Abschnitt A.3.2) aufgeführt.

3.2.3.3 Identifizierung der Triclosanmetaboliten mittels UPLC-QToF-MS mit Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus

Die im Fachartikel (Abschnitt 3.2.1) vorgestellten Strukturvorschläge für die Triclosanmetaboliten wurden hauptsächlich auf Grundlage von massenspektrometrischen Analysen mit Elektrospray-Ionisation im Negativ-Modus erarbeitet (Methodenparameter im Anhang, Abschnitt A.3.4). Um weitere Informationen für die Bestätigung der Strukturvorschläge zu gewinnen, wurden die Extrakte der triclosanexponierten Karottenzellkulturen auch mittels UPLC-QToF-MS mit Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus analysiert (Methodenparameter im Anhang, Abschnitt A.3.6). Teile der Ergebnisse wurden im Fachartikel bereits beschrieben und werden im folgenden Abschnitt detaillierter dargestellt.

Nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus wurden von den Metaboliten M1 - M7 bevorzugt die Ammonium-Adduktionen der Moleküle ($[M+NH_4]^+$ -Ionen) detektiert, die im Elektrospray mit den Ammoniumionen des Eluenten gebildet wurden. Für einige der Ammonium-Adduktionen wurden zudem Fragmentationen detektiert, sodass aus den Fragmentierungsmustern weitere Informationen über die Strukturen der Triclosanmetaboliten gewonnen werden konnten. Aus den exakten Massen der detektierten Ionen wurden die Summenformeln abgeleitet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstützen die im Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Strukturvorschläge für die Triclosanmetaboliten. Die massenspektrometrischen Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Für das Sulfatkonjugat M8 konnte unter diesen Bedingungen kein Signal detektiert werden.

Tabelle 4. Detektierte m/z und Summenformeln der Ammonium-Adduktionen ($[M+NH_4]^+$ -Ionen) und Fragmentationen der in den Karottenzellkulturen nachgewiesenen Triclosanmetaboliten M1 - M7.

Metabolit	detektierte m/z der $[M+NH_4]^+$ -Ionen (Abweichung in ppm)	Summenformel	detektierte m/z der Fragmentationen (Abweichung in ppm)	Summenformel
M1	614,0960 (-0,5) 616,0937 (0,6)	$C_{24}H_{31}^{35}Cl_3NO_{11}$ $C_{24}H_{31}^{35}Cl_2^{37}ClNO_{11}$	n. d.	
M2	686,0822 (1,7) 688,0778 (-0,4)	$C_{26}H_{31}^{35}Cl_3NO_{14}$ $C_{26}H_{31}^{35}Cl_2^{37}ClNO_{14}$	363,0943 (4,4) 345,0815 (-2,0) 236,0771 (0,4) 219,0505 (0,0) 201,0402 (1,5)	$C_{14}H_{19}O_{11}$ $C_{14}H_{17}O_{10}$ $C_8H_{14}NO_7$ $C_8H_{11}O_7$ $C_8H_9O_6$
M3	600,0813 (1,2) 602,0783 (1,0)	$C_{23}H_{29}^{35}Cl_3NO_{11}$ $C_{23}H_{29}^{35}Cl_2^{37}ClNO_{11}$	n. d.	
M4	716,0893 (-3,2) 718,0872 (-1,9)	$C_{27}H_{33}^{35}Cl_3NO_{15}$ $C_{27}H_{33}^{35}Cl_2^{37}ClNO_{15}$	393,1019 (-3,6) 231,0508 (1,3) 213,0383 (-7,5) 159,0290 (-1,9) 127,0389 (-4,7) 145,0502 (0,7) 109,0290 (0,0) 117,0189 (0,9)	$C_{15}H_{21}O_{12}$ $C_9H_{11}O_7$ $C_9H_9O_6$ $C_6H_7O_5$ $C_6H_7O_3$ $C_6H_9O_4$ $C_6H_5O_2$ $C_4H_5O_4$
M5	802,0889 (-3,9) 804,0862 (-3,5)	$C_{30}H_{35}^{35}Cl_3NO_{18}$ $C_{30}H_{35}^{35}Cl_2^{37}ClNO_{18}$	n. d.	
M6	554,0391 (0,5) 556,0364 (1,1)	$C_{21}H_{23}^{35}Cl_3NO_{10}$ $C_{21}H_{23}^{35}Cl_2^{37}ClNO_{10}$	266,0882 (2,3) 248,0777 (2,8) 230,0672 (3,0) 249,0620 (4,0) 231,0511 (2,6) 213,0407 (3,8) 159,0298 (3,1) 117,0190 (1,7) 145,0503 (1,4) 127,0398 (2,4) 109,0291 (0,9)	$C_9H_{16}NO_8$ $C_9H_{14}NO_7$ $C_9H_{12}NO_6$ $C_9H_{13}O_8$ $C_9H_{11}O_7$ $C_9H_9O_6$ $C_6H_7O_5$ $C_4H_5O_4$ $C_6H_9O_4$ $C_6H_7O_3$ $C_6H_5O_2$
M7	468,0378 (-1,3) 470,0347 (-1,5)	$C_{18}H_{21}^{35}Cl_3NO_7$ $C_{18}H_{21}^{35}Cl_2^{37}ClNO_7$	180,0868 (-2,2) 163,0604 (-1,2) 145,0496 (-3,4)	$C_6H_{14}NO_5$ $C_6H_{11}O_5$ $C_6H_9O_4$
M8	n. d.		n. d.	

Der Triclosanmetabolit M6 (Malonylhexopyranosyltriclosan) zeigt in den Chromatogrammen das intensivste Signal aller 7 im Positiv-Modus detektierten Metaboliten. Das $[M+NH_4]^+$ -Ion von M6 wurde bei einem m/z 554,0391 detektiert und bildet durch kollisionsinduzierte Dissoziation eine Reihe von Fragmenten. Das pseudo-Produktionenspektrum ist in Abbildung 14 dargestellt.

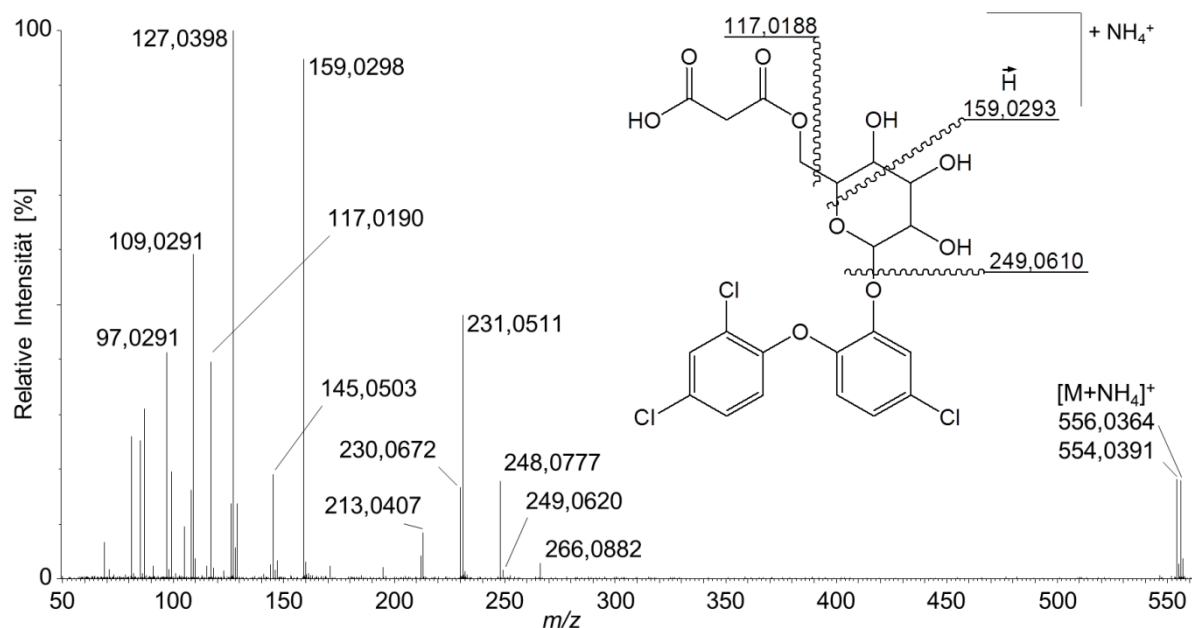


Abbildung 14. Pseudo-Produktionenspektren und Strukturvorschlag des $[M+NH_4]^+$ -Ion des Triclosanmetaboliten M6 nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und Fragmentierung bei hoher Kollisionsenergie (CE = 15 - 35 eV, MS^E).

Das pseudo-Produktionenspektrum des $[M+NH_4]^+$ -Ions von M6 zeigt keine Fragmentionen mit einem Chlorisotopenmuster. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass bei der Fragmentierung dieses $[M+NH_4]^+$ -Ions die Ladung bevorzugt am Glyconfragment verbleibt und nicht wie im negativen Ionisationsmodus am Triclosanfragment lokalisiert ist (vgl. Abschnitt 3.2.1). Das Fragmention bei m/z 249,0620 kann dem Malonylhexopyranosyl-Fragment zugeordnet werden und resultiert aus dem Verlust des neutralen Triclosanmoleküls sowie NH_3 von $[M+NH_4]^+$. Analog dazu lässt sich das Fragmention bei m/z 266,0882 mit dem Verlust von Triclosan von $[M+NH_4]^+$ erklären (Abbildung 15).

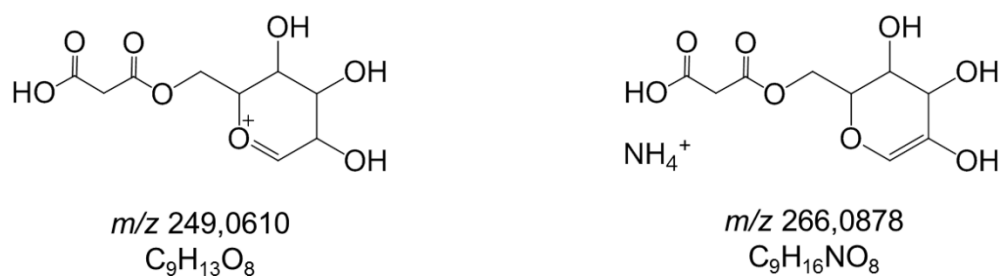


Abbildung 15. Strukturvorschläge, berechnete m/z und Summenformeln von zwei Malonylhexopyranosyl-Fragmentionen, die durch kollisionsinduzierte Fragmentierung der $[M+NH_4]^+$ -Ionen der Metaboliten M6 und M4 gebildet werden.

Die Signalintensitäten beider Fragmentionen sind vergleichsweise gering, die Abspaltung von ein bzw. zwei Molekülen H_2O (Δ 18,01 u bzw. 36,02 u) von diesen Fragmenten führt zu Fragmentionen mit intensiveren Signalen. Die Wasserabspaltung vom Fragmention bei

m/z 249,0620 führt zu den Fragmenten bei m/z 231,0511 und 213,0407. Analog dazu führt die Abspaltung von H_2O vom Fragmention bei m/z 266,0882 zu den Fragmenten bei m/z 248,0777 und 230,0672 (Abbildung 14). Ein analoger Zusammenhang besteht zwischen den Signalen bei m/z 145,0503, 127,0398 (Basispeak) und 109,0291, die aus dem Verlust von H_2O vom Hexopyranosyl-Fragmention resultieren. Ein weiteres intensives Signal im pseudo-Produktionenspektrum dieses Metaboliten wurde bei m/z 159,0298 detektiert. Es resultiert aus der Spaltung des Hexopyranosylringes zwischen C3-C4 und C5-O (Abbildung 14). Das postulierte Fragment ist ein Indiz für die Malonylierung an C6. Unterstützt wird diese Annahme von dem Signal bei m/z 117,0190. Das kann dem Malonylmethylenoxonium-Fragmention zugeordnet werden (Abbildung 14) und ist ein Hinweis auf Malonylierung an einem primären Alkohol, also an C6 der Hexopyranose.

Von Metabolit M4 (Malonyldihexopyranosyltriclosan) wird bei der Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus ebenfalls das $[M+NH_4]^+$ -Ion gebildet und bei m/z 716,0893 detektiert. Wie bereits bei M6 beobachtet, zeigt auch das pseudo-Produktionenspektrum des $[M+NH_4]^+$ -Ion von M4 ausschließlich Fragmentionen ohne Chlorisotopenmuster, da die positive Ladung am Konjugatteil des Metaboliten verbleibt (Abbildung 16).

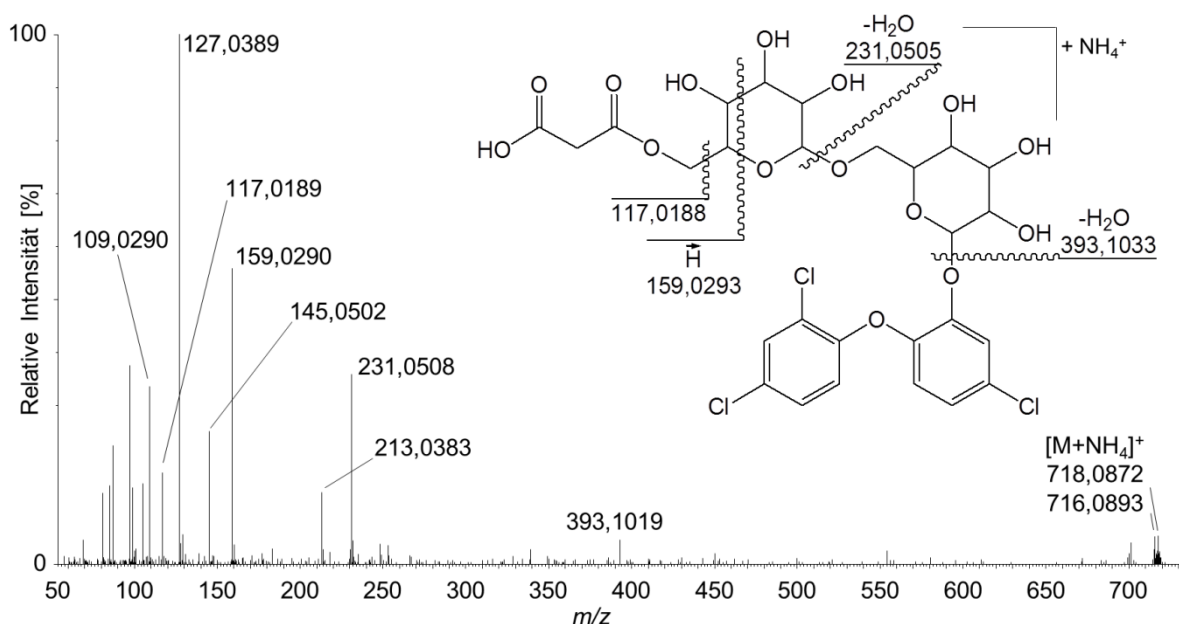


Abbildung 16. Pseudo-Produktionenspektren und Strukturvorschlag des $[M+NH_4]^+$ -Ion des Triclosanmetaboliten M4 nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und Fragmentierung bei hoher Kollisionsenergie (CE = 15 - 35 eV, MS^E).

Das Signal mit geringer Intensität bei m/z 393,1019 resultiert aus dem neutralen Verlust von Triclosan, NH_3 und H_2O vom $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Ion. Im niedrigeren m/z -Bereich ähnelt das Produktionspektrum des $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Ions von M4 stark dem des Metaboliten M6 (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 16). Das Anhydromalonylhexopyranosyl-Fragmentation bei m/z 249,0610 wurde selbst nicht detektiert, aber dessen Produktionen bei m/z 231,0508 und 213,0383, die aus der Abspaltung von einem bzw. zwei Molekülen H_2O resultieren. Die Signale bei m/z 145,0505, 127,0389 und 109,0290 sind hier ebenfalls dem Hexopyranosyl-Fragment zuzuordnen, von dem mehrfach H_2O abgespalten wurde. Außerdem weisen auch bei M4 Fragmentationen bei m/z 159,0290 und 117,0187 auf die Malonylierung von C6 einer der Hexopyranosen hin.

Der Metabolit M2 (Malonylpentosylhexosyltriclosan) wurde nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus als $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Ion bei m/z 686,0822 detektiert. Durch den neutralen Verlust von Triclosan, NH_3 und einem bzw. zwei Molekülen H_2O wurden die Fragmentationen mit den m/z 363,0943 und 345,0815 gebildet (Abbildung 17).

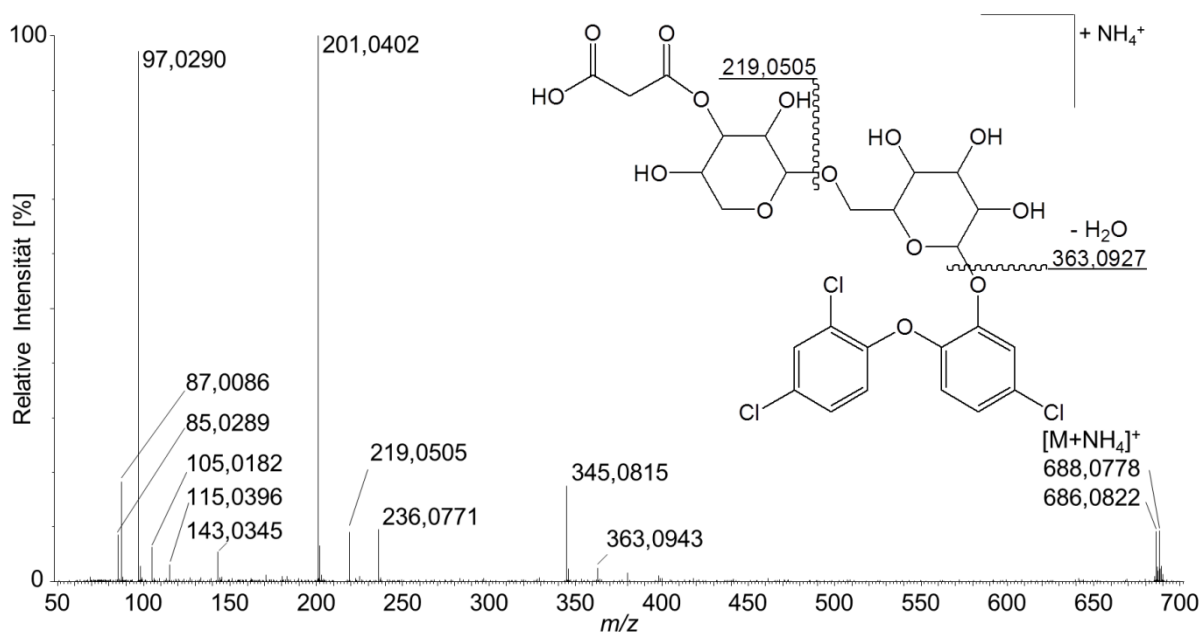


Abbildung 17. Pseudo-Produktionenspektren und Strukturvorschlag des $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Ion des Triclosanmetaboliten M2 nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und Fragmentierung bei hoher Kollisionsenergie ($\text{CE} = 15 - 35 \text{ eV}$, MS^E).

Das Signal bei m/z 219,0505 wurde dem Anhydromalonylpentose-Fragmentation zugeordnet, das durch Wasserabspaltung das Fragmentation bei m/z 201,0402 (Basispeak) bildet. Das Ammonium-Adduktion des Anhydromalonylpentosyl-Fragments wurde bei m/z 236,0771 detektiert. Diese Interpretation führt zu dem Schluss, dass eine Veresterung mit Malonsäure an der Pentose des Disaccharidkonjugates stattgefunden hat. Im Gegensatz zu den

Produktionspektren von M4 und M6 wurde bei M2 kein Signal eines Malonylmethylenoxonium-Fragmentions bei m/z 117,0188. detektiert. Das deutet darauf hin, dass bei M2 keine primäre, sondern eine sekundäre OH-Gruppe mit Malonsäure verestert wurde. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Pentose in Pyranoseform vorliegt und damit über keine primäre OH-Gruppe verfügt.

3.3 Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The in Vitro Metabolism of Triclosan in Horseradish

3.3.1 Veröffentlichter Fachartikel

Macherius A., Seiwert B., Schröder P., Huber C, Lorenz W., Reemtsma T. Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The in Vitro Metabolism of Triclosan in Horseradish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (2014) 1001-1009.

Der Fachartikel ist abrufbar unter:

<http://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-cJM64Kt3Vz6Sv8YsVV5p>

<http://dx.doi.org/10.1021/jf404784q>

Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The *in Vitro* Metabolism of Triclosan in Horseradish

André Macherius,[†] Bettina Seiwert,[†] Peter Schröder,[§] Christian Huber,[§] Wilhelm Lorenz,[#] and Thorsten Reemtsma^{*,†}

[†]Department of Analytical Chemistry, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Permoserstraße, D-04138 Leipzig, Germany

[§]Department Microbe-Plant Interactions, Helmholtz Centre München, German Research Center for Environmental Health, Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Neuherberg, Germany

[#]Institute of Chemistry, Food Chemistry and Environmental Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle (Saale), Germany

ABSTRACT: Plants can extensively transform contaminants after uptake through phase I and phase II metabolism to a large diversity of products. UPLC-QToF-MS was used to detect and identify metabolites of the bacteriostatic agent triclosan in a horseradish hairy root culture. Thirty-three metabolites of triclosan were recognized by a stepwise approach of mass defect filtering, multivariate data analysis, and isotope pattern filtering from a data set of several thousands of signals in the exposed culture. Structure proposals were elaborated for 23 triclosan metabolites on the basis of their MS data. The majority were identified as conjugates (phase II metabolites) such as saccharides or sulfosaccharides. Additionally, a disulfosaccharide was identified as a plant metabolite for the first time. Besides that, also conjugates of a phase I metabolite, hydroxytriclosan, were determined in horseradish tissue extracts. Dehalogenation products of triclosan were not observed. The large number of metabolites detected and identified in this study emphasizes the importance of a comprehensive analytical approach in studies on the uptake and fate of organic contaminants in plants.

KEYWORDS: *plant metabolism, UPLC-QToF-MS, triclosan, hydroxylation, OPLS-DA*

■ INTRODUCTION

Crop plants growing on agricultural land may be exposed to a wide range of anthropogenic organic chemicals and may incorporate them to a certain extent. To assess the extent of plant uptake of environmental contaminants, uptake studies were conducted under hydroponic,^{1,2} greenhouse,^{3–6} and field conditions.⁷ These studies have proven that organic contaminants are taken up and distributed in plants. For example, triclosan, which is a widely applied bacteriostatic agent, is frequently detected in sewage sludge and is likely to be spread on arable land.⁸ It has been reported to be incorporated and distributed from triclosan-spiked or biosolid-treated soil into pumpkin, zucchini, carrots, switchgrass, barley, meadow fescue, and soy plants.^{4,9,10}

Studies on the uptake of organic contaminants often raise questions regarding the fate of the incorporated compounds, especially whether and to what extent transformation occurs and regarding the structure of the formed products. It is well-known that plants are capable of metabolizing organic contaminants. This metabolism can be categorized into three phases. Phase I includes aryl and alkyl hydroxylation and other oxidative reactions, hydrolysis of esters, and N- or O-dealkylation. These processes render the molecule more polar by introducing a reactive functional group for further processing. During phase II, compounds with a suitable reactive functional group are bound to polar endogenous molecules, such as carbohydrates, malonic acid, or sulfate. Furthermore,

conjugation with glutathione may occur, but this phase II reaction does require an electrophilic moiety rather than a polar functional group. In the following phase III, the conjugates are excreted from the cytosol of the cell into the vacuole or apoplast, where they remain as solute or as bound residues, respectively.^{11,12} Even though the uptake and translocation of environmental contaminants in plants has been proven (see above), their possible metabolization in plants has received comparatively little attention, thus far. This might have led to a significant underestimation of the total incorporated amounts of organic contaminants.

Triclosan is one of the few environmental contaminants for which the metabolization in plants has been studied. In carrots cultivated in triclosan-contaminated soils and axenic carrot cell cultures, exclusively phase II metabolites (conjugates) of triclosan were formed.¹³ Products of phase I reactions were not observed in this study, which led to a set of metabolites with comparatively narrow properties. The occurrence of a phase I metabolism, as hydroxylation catalyzed by P450 monooxygenase and peroxidase enzymes, in combination with phase II consecutive reactions might lead to a more diverse set of metabolites. Horseradish roots are known to contain large

Received: October 23, 2013

Revised: January 6, 2014

Accepted: January 14, 2014

Published: January 23, 2014

amounts of such enzymes,¹⁴ and their ability to perform aryl hydroxylation has been shown.¹⁵ Furthermore, horseradish is a root vegetable. If cultivated in contaminated soil, its edible parts are in direct and permanent contact with environmental contaminants and are likely to incorporate them to a certain extent as was shown for the edible root parts of carrot plants.⁴ This makes horseradish suitable for studies on the uptake of environmental contaminants and on metabolite elucidation in the context of agricultural and environmental research.

UPLC high-resolution mass spectrometry using MS^E was proven to be an outstanding method for the analysis of metabolites enabling both their sensitive detection and deducing their elemental composition from their exact masses.¹⁶ Due to interfering matrix compounds, coextracted from the plant tissue, the visual discovery of metabolites in total ion current chromatograms will be restricted to very abundant signals. Common strategies to search for metabolites are neutral loss scans and precursor ion scans using a QqQ mass spectrometer. However, these approaches can be too selective as they exclude unexpected metabolites. In general, methods of multivariate data analysis are promising to investigate the metabolism of xenobiotics in plant cells to handle the large quantities of obtained chromatographic and mass spectrometric data and to evaluate them in an unbiased and comprehensive manner. Principal component analysis (PCA) in combination with orthogonal projection to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) is increasingly applied to handle the large amount of data in metabolomics studies, whereas their application in environmental or contaminant metabolism research is rarely reported. In the following study the advantages of the above-mentioned method for the elucidation of metabolites of xenobiotics in plants are presented using the example of triclosan applied to a hairy root culture of horseradish (*Armoracia rusticana*).

■ EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol, >97.0%) was provided by Fluka (Buchs, Switzerland) and methanol (Hypergrade) by Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile, ammonium acetate, and acetic acid (all of ULC/MS grade) were provided by Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands).

Root Culture Treatment and Sample Processing. A hairy root culture of horseradish (*A. rusticana*) was cultivated in 100 mL of MS culture medium in Erlenmeyer flasks as described elsewhere.¹⁷ Ten days after subcultivation, triclosan was dissolved in methanol and applied to the culture medium to a concentration of 0.6 µg mL⁻¹ (2 µM). The incubation was terminated at day 1, 2, or 5 of exposure to detect and identify triclosan metabolites in plant material.

The plant material was separated from the culture medium by suction filtration, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -20 °C prior to further sample processing. The plant material was ground under liquid nitrogen using a mortar and pestle and transferred to 45 mL glass centrifuge tubes with a magnetic stir bar. The plant material was extracted three times with 8 mL of water/acetonitrile 1:1 (v/v) with 5 mM ammonium acetate and 0.5% glacial acetic acid by stirring at room temperature and centrifuged for 5 min at 4500 rpm. The three biological replicates of each sampling day were combined to obtain a higher concentration of metabolites in the extract. The supernatants were collected and concentrated to a volume of 1 mL by removing acetonitrile using a rotary evaporator followed by water removal employing lyophilization. The samples were filtered through syringe filters (0.45 µm) prior to liquid chromatographic–mass spectrometric analysis.

UPLC-QToF-MS Analysis. The analysis was performed on a Waters Acquity UPLC system connected to Synapt G2S QToF mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source (Waters,

Milford, MA, USA). An aliquot of 10 µL of each sample was injected onto the column. UPLC separation was achieved using an Acquity UPLC HSS-T3 column (100 × 2.1 mm, 1.7 µm particle size) at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and a column temperature of 60 °C. The mobile phase consisted of (A) water and (B) ACN, both with 5 mM NH₄OAc and 0.05% acetic acid. The gradient applied was as follows: 0 min, 5% B; 7 min, 95% B; 8 min, 95% B; 8.1 min, 5% B; 10 min, 5% B. Electrospray ionization was carried out in separate analyses under negative and positive polarity by applying capillary voltages of -0.7 and +0.7 kV, respectively. The source temperature was set to 140 °C and the desolvation temperature to 550 °C. The sampling cone voltage was set to 35 V and source offset at 50 V. Nitrogen and argon were used as cone and collision gases, respectively. The desolvation gas flow was 950 L h⁻¹.

The mass spectrometric data were collected from *m/z* 50 to 1200 in centroid mode with a 0.15 s scan time. To ensure *m/z* accuracy, leucine enkephaline was infused via the reference probe as lockspray and a two-point calibration was applied. Two sets of data were collected in parallel using MS^E acquisition. One data set contains low collision energy data (4 eV, MS, effectively the accurate mass of molecular ions) and the second data set the elevated collision energy data (15–35 eV, MS^E, all of the fragment ions).

Each sample was measured three times in a randomized order.

Data Processing. Centroid raw mass spectrometric data obtained under low collision energy were processed using MarkerLynx application manager for MassLynx 4.1 software (Waters). The parameters used were as follows: retention time ranging from 0 to 8 min, *m/z* ranging from 50 to 1200, retention time tolerance 0.05 min, a *m/z* tolerance of 0.01 Da, and a marker intensity threshold of 500.

The intensity of each ion was normalized with respect to the total ion count to generate a data matrix that consisted of the retention time, *m/z* value, and normalized peak area using MarkerLynx software. The data matrix was reduced by applying a mass defect filtering of ±0.150 u of triclosan and processed by EZinfo software (Waters). The unsupervised segregation of control and exposed cell extract was checked by PCA using pareto-scaled data. The S-plot of the supervised partial least-squares-discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal projection to latent structures (OPLS) enabled the selection of analytes that are responsible for the distinction of control and exposed cell extract ($|p(\text{corr})| > 0.5$ on S-plot). These analytes are subsequently analyzed for chlorine pattern, that is, two signals with a *m/z* difference of 1.9970 u (±0.0030 u), by applying an isotopic pattern filter (Macro for Microsoft Excel). The *m/z* values of potential candidates were arranged according to their retention time and peak profile to align the signals of molecular ions, adducts, and fragment ions.

The assignment of the chemical formula was accomplished according to the following criteria: The deviation for ion mass was set to ≤5 ppm and the following element limits: C (0–100), H (0–100), O (0–30), N (0–4), S (0–4), Cl (0–6), and P (0–2). The chlorine number was restricted further according to the observed isotopic pattern.

■ RESULTS AND DISCUSSION

To overcome the limitations of a targeted analysis, in which a limited set of probable and predictable metabolites has to be defined before analysis, a more unbiased approach was chosen. A screening by recording high-resolution full scan mass spectra combined with their treatment by multivariate statistics and data filter techniques was performed to include possible unexpected and minor abundant metabolites in this study, as well. Therefore, the extracts of control and triclosan-exposed horseradish hairy root tissues were analyzed by UPLC–high-resolution mass spectrometry applying the MS^E mode. Abundant triclosan metabolites with high signal intensities became apparent by comparing base peak chromatograms of extracts of control and exposed root tissues (Figure 1). In contrast, less abundant metabolites are difficult to discover in

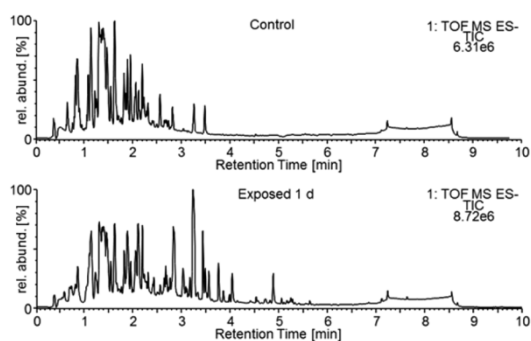


Figure 1. Low collision energy total ion current chromatograms (ESI neg) of extracts of control (top) and triclosan-exposed (bottom) horseradish root tissues.

the presence of intense signals of the biogenic plant matrix. This requires the use of multivariate data analysis.

In addition, two filter techniques were applied, which consider likely mass spectrometric features of the triclosan metabolites and discriminate them from matrix compounds. The application of the mass defect filter results from the knowledge that mass defect values of a parent compound and its metabolites are quite similar and enable the discrimination of matrix ions that arise from endogenous compounds. Compared to others,^{18–20} we applied a rather broad filter of ± 0.150 u for mass defect filtering to account for extensively conjugated metabolites. The mass defect filter was applied to the raw data set and reduced the number of candidate signals from 6939 to 3867.

These signals were further processed via PCA. PCA provided a clear separation of the extracts of control and treated hairy root tissues (Figure 2a). By using OPLS-DA of the untreated horseradish sample and the triclosan-treated horseradish samples (different treatment periods (1, 2, and 5 days) now considered as replicates), the number of signals representing potential metabolites was further reduced to 572 ($|p(\text{corr})| > 0.5$ on S-plot, Figure 2b). Differentiation within the S-plot occurs because of concentration differences, and metabolites with a higher intensity yield a better separation from the background ions.

The reduced data matrix was treated with a second filter method, with the assumption that metabolites contain at least one chlorine atom of the three originally present in the triclosan molecule. This isotopic pattern filter utilizes the isotopic pattern of chlorinated organic compounds, that is, two signals with $\Delta m/z$ of 1.9970 u (± 0.0030 u) and a relative intensity of $m + 2/m$ of at least 32%. Dehalogenation might occur during the plant metabolism of organic contaminants,^{21–23} but it is unlikely that all three chlorine atoms are removed at once. It was essential to reduce the data matrix by mass defect filter and multivariate statistics prior to the application of the isotopic pattern filter. Otherwise, due to the complex mixture of coeluting matrix compounds, the sole application of the isotopic filter would have led to a large number of false positives because molecular ions of coeluting compounds appear as an isotopic pattern of chlorinated compounds.

The final step of the data processing was to arrange the m/z values according to their retention time and peak shape. This led to a further reduction of the number of potential triclosan metabolites, because several m/z values could be assigned as

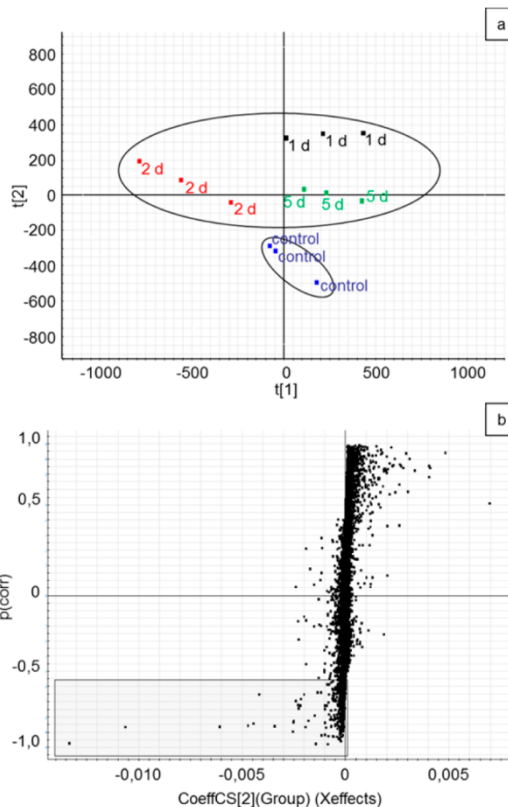


Figure 2. Score plot (a) of the principal component analysis of the acquired data set and S-plot (b) comparing the data from control and exposed (1, 2, and 5 days) horseradish cultures via orthogonal projection to latent structures discriminant analysis. The rectangle includes data that contribute significantly ($|p(\text{corr})| > 0.5$) to the differentiation between extracts of control and treated cultures.

molecular ion, fragment ions, and adduct ions of one compound. Thirty-three potential triclosan metabolites were considered for structure elucidation. The same procedure was applied to the mass spectrometric data generated by positive ionization. However, the ion intensities of the triclosan metabolites obtained in positive mode were generally low, so that only abundant metabolites were visible and no additional metabolites were detected. Therefore, only data generated in negative mode are considered here.

Structure Elucidation. According to the fragmentation behavior of their molecular anions, these 33 metabolites were categorized into four groups.

Triclosan Sulfosaccharides (Group 1). The signal that contributes most to the differentiation between the extracts of exposed and control tissue cultures was detected at a retention time of 3.22 min (M9). The low collision energy mass spectrum of this compound shows a signal at m/z 694.9100 (Figure 3a) with the characteristic isotopic pattern of a trichlorinated compound and a mass 407.6967 u heavier than the parent triclosan. For this m/z a sum formula of $C_{21}H_{18}Cl_3O_{16}S_2$ was derived. The intensity of the molecular anion is very low, whereas the fragment ion at m/z 614.9544 is far more abundant. This fragment ion ($C_{21}H_{18}Cl_3O_{13}S$) arises from a neutral loss of 79.9556 u, corresponding to the loss of

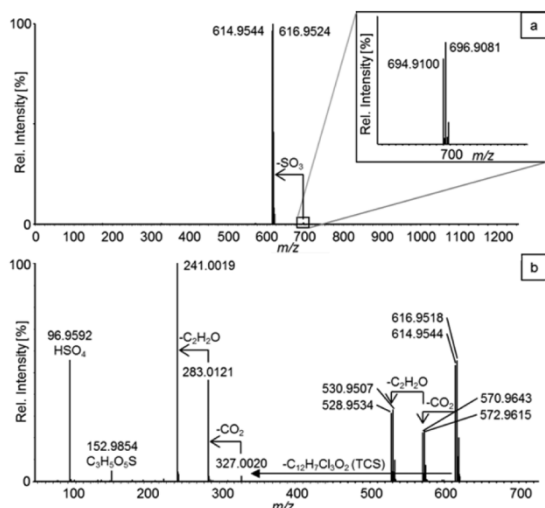


Figure 3. Low (a) and high (b) collision energy mass spectra (ESI neg) of metabolite M9 tentatively identified as triclosan (malonyl disulfo) hexopyranoside.

SO_3 from a sulfate moiety of $[\text{M} - \text{H}]^-$. This is confirmed by a product ion at m/z of 96.9592 (HSO_4^-).

As visible from the high collision energy mass spectrum (Figure 3b), collision-induced fragmentation gave rise to a number of further fragment ions, of which some showed the trichloro isotopic pattern. The most intense fragment ion without chlorine substituent (m/z 327.0020; $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_{11}\text{S}$) arises from the neutral loss of triclosan (287.9524 u) from the $[\text{M} - \text{HSO}_3]^-$ ion. The corresponding triclosan fragment ion (m/z 286.9426) was also recorded, although with a very low relative intensity. This suggests that this metabolite was transformed solely at the phenolic moiety of triclosan. Further ions detected at m/z 283.0121 ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_9\text{S}$) and 241.0019 ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_8\text{S}$) are formed by the successive neutral losses of 43.9901 u ($-\text{CO}_2$) and 42.0109 u ($-\text{ketene}, \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$). They point to a malonyl moiety. The remaining $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_8\text{S}$ fragment ion was assumed to be a sulfohexopyranose. The formation of a fragment ion of m/z 152.9854 via a retro-Diels–Alder cleavage suggests that C5 of the hexopyranose is sulfated. Therefore, this metabolite was tentatively identified as triclosan (malonylhexopyranosyl) disulfate, the suggested fragmentation pathway of which is given in Figure 4. Additionally, trichlorinated fragment ions were detected at m/z 570.9643 ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{O}_{11}\text{S}$) and 528.9534 ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{O}_{10}\text{S}$). These are formed by losses of 43.9901 and 42.0109 u from $[\text{M} - \text{HSO}_3]^-$, respectively, as has been analogously observed for the $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_{11}\text{S}$ fragment ion. Besides the very low abundant $[\text{M} - \text{H}]^-$ at m/z 694.9100, no further hints for the presence of two sulfate groups were detected. For comparison, the fragmentation behavior of the reference compound *D*-glucosamine 3,6-disulfate was studied. In agreement with the fragmentation pathway of M9, a very facile loss of SO_3 was observed already in the low collision energy mass spectrum of *D*-glucosamine 3,6-disulfate. This led to a molecular anion of low abundance but a rather prominent $[\text{M} - \text{H} - \text{SO}_3]^-$.

Analogous to this example, a total four sulfo- and disulfosaccharide conjugates of triclosan were tentatively identified by their mass spectra (Table 1). Among the most intensive ones was the triclosan hexopyranosyl sulfate (M18) as

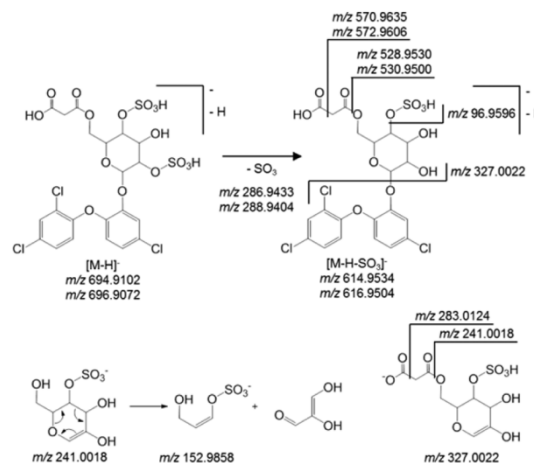


Figure 4. Proposed fragmentation pathway of metabolite M19 and structures of the fragment ions (spectrum shown in Figure 3).

another example of a sulfated monosaccharide, eluting at 3.76 min.

Conjugation of organic contaminants with sulfate is very important for the animal xenobiotic metabolism. For plants, only a few studies exist on the formation of 2-*O*-sulfate glucosides and 6-*O*-sulfate glucosides.^{24,25} Disulfated carbohydrate conjugates, however, have not been described so far. This may partly be due to their lability, which leads to the facile loss of one of the sulfate groups upon ionization.

Triclosan Saccharide and Sulfate Conjugates (Group 2). Besides the triclosan sulfosaccharide conjugates, which formed predominately fragment ions of the glycon moiety, an additional group of metabolites has been detected. Contrary to the sulfosaccharides, the collision-induced dissociation of their molecular anions gave rise almost exclusively to the triclosan fragment ion at m/z 286.9433 (calcd). One of these seven metabolites is M19, which eluted after 3.98 min and gave rise to a series of trichlorinated ions in its low collision energy mass spectrum (Figure 5a). Whereas the signal m/z 448.9952 ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{O}_7$) was assigned to the molecular ion, m/z 484.9724, 495.0013, and 509.0170 were assigned to its chloride, formate, and acetate adducts, respectively. The molecular formula and mass gain of 162.0519 u compared to triclosan suggest that an anhydrohexose moiety was added, and M19 therefore is the triclosan hexoside. The preferred loss of the anhydrohexose moiety and formation of the aglycon (triclosan) anion is typical for glycoside conjugates.²⁶ In comparison to the metabolites of group 1, the hexoside lacks a sulfate group to stabilize the negative charge at the glycon moiety. The conjugation with hexose plays a central role in the proposed pathway of triclosan metabolism in the hairy root culture of horseradish and is crucial for the formation of almost all further metabolites (Figure 6).

By analogy, the molecular anions of the metabolites M10 and M14 were detected at m/z 611.0493 ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{O}_{12}$) and m/z 595.0547 ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{O}_{11}$), respectively. These point to additional hexose and desoxyhexose moieties and thus to the metabolites triclosan hexosyl hexoside (M10) and triclosan desoxyhexosyl hexoside (M14), respectively.

The molecular anion of M13 was detected at 3.44 min in the low collision energy mass spectrum at m/z 534.9968 ($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{O}_{10}$). This is 86.0016 u higher than that of the

Table 1. LC-MS Data of the Triclosan Metabolites Detected in the Horseradish Cell Extract

metabolite ^a	RT (min)	molecular anion [M - H] ⁻ m/z (deviation (ppm))	sum formula of molecular anion [M - H] ⁻	fragments m/z (deviation (ppm))	sum formula of fragment anions ^b	structure proposal
Group 1: Metabolites Showing a Neutral Loss of Triclosan						
M5	2.98	761.0100 (3)	C ₂₇ H ₂₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₇ S	96.9595 (1)	HSO ₄	triclosan (desoxyhexosyl malonyl hexosyl) sulfate
		763.0081 (3)	C ₂₇ H ₂₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₇ S	283.0109 (5)	C ₈ H ₁₁ O ₉ S	
				614.9527 (1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₃ S	
				616.9506 (0)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₃ S	
M6a	3.13	675.0099 (1)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ S	387.0587 (3)	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₂ S	triclosan desoxyhexosyl hexoside sulfate
		677.0068 (-1)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₄ S			
M9	3.22	694.9100 (0)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₆ S ₂	96.9592 (4)	HSO ₄	triclosan malonyl hexosyl disulfate
		696.9081 (-1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₆ S ₂	152.9854 (3)	C ₃ H ₅ O ₅ S	
				241.0019 (0)	C ₆ H ₉ O ₆ S	
				283.0121 (1)	C ₈ H ₁₁ O ₉ S	
				327.0020 (1)	C ₉ H ₁₁ O ₁₁ S	
				286.9426 (2)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	
				288.9398 (2)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
				528.9534 (-1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₀ S	
				530.9507 (-1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₀ S	
				570.9643 (-1)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ S	
				572.9615 (-2)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁ S	
				614.9544 (-2)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₃ S	
				616.9518 (-2)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₃ S	
M6b	3.38	675.0119 (-1)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ S	387.0594 (1)	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₂ S	triclosan desoxyhexosyl hexoside sulfate
		677.0088 (-1)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₄ S			
M12	3.43	614.9528 (1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₃ S	96.9592 (4)	HSO ₄	triclosan malonyl hexosyl sulfate
		616.9495 (1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₃ S	241.0019 (0)	C ₆ H ₉ O ₆ S	
				286.9446 (-5)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	
				288.9413 (-3)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
				528.9527 (1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₀ S	
				530.9504 (-1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₀ S	
M18	3.76	528.9544 (-3)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₀ S	96.9594 (2)	HSO ₄	triclosan hexosyl sulfate
		530.9515 (-3)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₀ S	152.9857 (1)	C ₃ H ₅ O ₅ S	
				241.0024 (-2)	C ₆ H ₉ O ₆ S	
				286.9435 (-1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	
				288.9404 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
Group 2: Metabolites Showing Triclosan Anion as Fragment Ion						
M7	3.16	637.0631 (2)	C ₂₆ H ₂₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₂	153.0545 (5)	C ₈ H ₉ O ₃	triclosan acetyl desoxyhexosyl hexoside
		639.0598 (3)	C ₂₆ H ₂₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₂	286.9432 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	
				288.9400 (1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
M10	3.32	611.0493 (0)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₂	286.9432 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	triclosan hexosyl hexoside
		613.0474 (-2)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₂	288.9406 (-1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
M13	3.44	534.9968 (0)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₀	491.0063 (1)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₈	triclosan malonyl hexoside
		536.9944 (-2)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₀	493.0041 (-1)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₈	
		1071.0035 (-2)	C ₄₂ H ₃₇ ³⁵ Cl ₅ O ₂₀	286.9432 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	
		1073.0010 (-3)	C ₄₂ H ₃₇ ³⁵ Cl ₅ ³⁷ ClO ₂₀	288.9403 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
M14	3.56	595.0536 (1)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁	286.9432 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	triclosan desoxyhexosyl hexoside
		597.0510 (0)	C ₂₄ H ₂₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁	288.9406 (-1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
M15	3.59	491.0062 (1)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₈	286.9432 (0)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	triclosan acetyl hexoside
		493.0042 (-1)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₈	288.9402 (1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	
M19	3.98	448.9952 (2)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₇	286.9428 (2)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂	triclosan hexoside
		450.9926 (1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₇	288.9399 (2)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	

Table 1. continued

metabolite ^a	RT (min)	molecular anion [M - H] ⁻ m/z (deviation (ppm))	sum formula of molecular anion [M - H] ⁻	fragments m/z (deviation (ppm))	sum formula of fragment anions ^b	structure proposal
Group 2: Metabolites Showing Triclosan Anion as Fragment Ion						
M20	4.04	366.9006 (-1) 368.8976 (-1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₅ S C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₅ S	286.9429 (1) 288.9397 (2)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂ C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	triclosan sulfate
Group 3: OH-Triclosan Conjugates						
M1a	2.02	630.9478 (1) 632.9444 (1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ S C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₄ S	266.9600 (6) 268.9557 (11)	C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan malonyl hexosyl sulfate
M2a	2.23	544.9466 (2) 546.9440 (2)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ S C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁ S	301.9298 (2) 303.9284 (-3)	C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₃ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan hexosyl sulfate
M1b	2.50	630.9472 (2) 632.9419 (1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ S C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₄ S	544.9462 (3) 546.9452 (-1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ S C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁ S	OH-triclosan malonyl hexosyl sulfate
M3a	2.64	507.0026 (-2) 508.9989 (0)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₉ C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₉	266.9624 (-3) 268.9585 (0) 301.9303 (0) 303.9288 (-4)	C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₃ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan acetyl hexoside
M1c	2.68	630.9500 (-3) 632.9467 (-2)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ S C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₄ S			OH-triclosan malonyl hexosyl sulfate
M2b	2.81	544.9449 (6) 546.9443 (1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ S C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁ S			OH-triclosan hexosyl sulfate
M1d	3.33	630.9484 (0) 632.9457 (-1)	C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₁₄ S C ₂₁ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₄ S	266.9608 (3) 268.9579 (3)	C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan malonyl hexosyl sulfate
M3b	3.51	507.0008 (2) 508.9984 (1)	C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₃ O ₉ C ₂₀ H ₁₈ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₉	266.9611 (2) 268.9578 (3)	C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan acetyl hexoside
M2c	3.84	544.9478 (0) 546.9453 (-1)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ S C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁ S	96.9596 (0) 241.0021 (-1) 266.9612 (1) 268.9585 (0)	HSO ₄ C ₆ H ₉ O ₈ S C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan hexosyl sulfate
M22	4.26	382.8949 (1) 384.8923 (-1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₆ S C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₆ S	266.9609 (3) 268.9579 (3) 302.9386 (-1) 304.9365 (-4)	C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃ C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₃ C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₃	OH-triclosan sulfate
Group 4: Unidentified Triclosan Metabolites						
M4a	2.96	967.0676 969.0654				unidentified
M4b	3.08	967.0675 969.0636		544.9455 (4) 546.9433 (3) 266.9606 (4) 268.9576 (4)	C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ S C ₁₈ H ₁₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁ S C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ₂ O ₃ C ₁₂ H ₅ ³⁵ Cl ³⁷ ClO ₃	unidentified (contains OH-TCS)
M8	3.18	663.0542 665.0524				unidentified
M11	3.38	683.0328 685.0312				unidentified
M16a	3.63	640.0208 (1) 642.0184 (0)	C ₂₄ H ₂₅ ³⁵ Cl ₃ NO ₁₁ S C ₂₄ H ₂₅ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClNO ₁₁ S	352.0693		unidentified (triclosan as neutral loss)

Table 1. continued

metabolite ^a	RT (min)	molecular anion [M - H] ⁻ m/z (deviation (ppm))	sum formula of molecular anion [M - H] ⁻	fragments m/z (deviation (ppm))	sum formula of fragment anions ^b	structure proposal
Group 4: Unidentified Triclosan Metabolites						
M17	3.69	805.0363 (1) 807.0333 (1)	C ₂₉ H ₃₂ ³⁵ Cl ₃ O ₁₈ S C ₂₉ H ₃₂ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₈ S			unidentified
M19	3.72	593.0387 (-1) 595.0369 (-2)	C ₂₄ H ₂₄ ³⁵ Cl ₃ O ₁₁ C ₂₄ H ₂₄ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₁₁	286.9432 (0) 288.9408 (-1)	C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₃ O ₂ C ₁₂ H ₆ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClO ₂	unidentified
M16b	3.88	640.0209 (1) 642.0187 (0)	C ₂₄ H ₂₅ ³⁵ Cl ₃ NO ₁₁ S C ₂₄ H ₂₅ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClNO ₁₁ S	352.0701		unidentified (triclosan as neutral loss)
M16c	3.96	640.0215 (0) 642.0188 (-1)	C ₂₄ H ₂₅ ³⁵ Cl ₃ NO ₁₁ S C ₂₄ H ₂₅ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ ClNO ₁₁ S	352.0698		unidentified (triclosan as neutral loss)
M21	4.22	628.9709 630.9671		341.0210		unidentified (triclosan as neutral loss)

^aMetabolites are numbered according to their elution order. Metabolites that are supposed to be isomers are labeled with the adjuncts a–d.
^bMolecular anions and fragment ions whose detected *m/z* values led to no or more than one possible sum formula could not assigned.

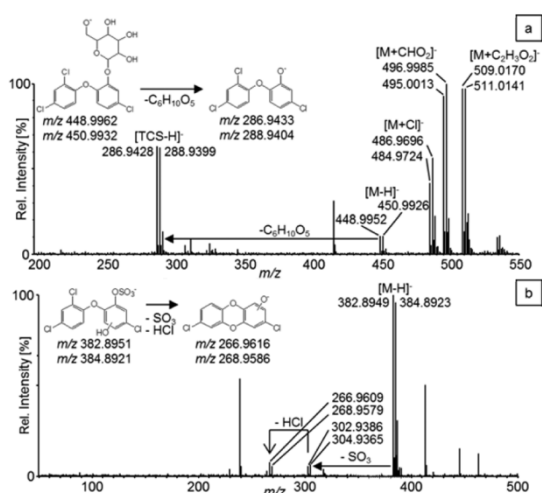


Figure 5. Low collision energy mass spectra (ESI neg) and proposed structure of (a) metabolite M19 tentatively identified as triclosan hexopyranoside and of (b) metabolite M22 tentatively identified as OH-triclosan sulfate.

triclosan hexoside. Additionally, an abundant signal of its dimeric anion $[2M - H]^-$ at *m/z* 1071.0035 was observed. The $[M - H]^-$ ion underwent a neutral loss of 43.9905 u (CO_2) to a fragment ion *m/z* 491.0063 ($C_{20}H_{18}Cl_3O_8$). Metabolite M13 was therefore tentatively identified as triclosan malonylhexoside. One metabolite that does not contain a carbohydrate moiety was M20 and eluted after 4.04 min. Its molecular anion at *m/z* 366.9006 corresponds to a sum formula of $C_{12}H_6Cl_3O_5S$ and gave rise also to the triclosan fragment ion. M20 was therefore assigned as triclosan sulfate and is one of two detected metabolites that are not conjugated with a hexose (Figure 6).

Hydroxytriclosan Conjugates (Group 3). In contrast to the previous two groups of metabolites, the mass spectra of a number of additional transformation products showed neither the triclosan fragment ion nor the neutral loss of triclosan. Rather, the fragmentation of most of these metabolites gave rise to only one fragment ion at *m/z* 266.9609 ($C_{12}H_5Cl_2O_3$) with the corresponding Cl_2 isotopic pattern. Because the molecular formulas and isotopic patterns of all corresponding molecular anions indicated trichlorinated metabolites, the fragment ion at *m/z* 266.9609 ($C_{12}H_5Cl_2O_3$) was interpreted as the dichlorodibenzodioxinol fragment ion, which was, likely, formed from

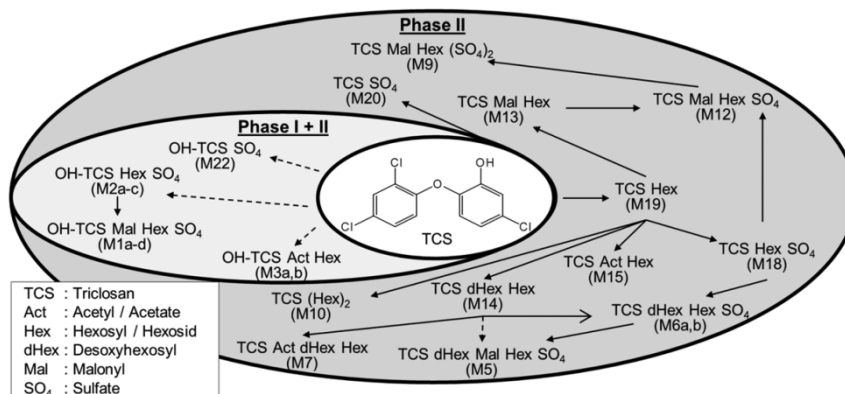


Figure 6. Proposed pathway of triclosan metabolization in hairy root cultures of horseradish. Dashed arrows represent multistep processes.

the conjugates of hydroxylated triclosan (OH-triclosan) (Figure 5b). The likely precursor of this fragment ion, that is, the hydroxytriclosan fragment ion itself, was detected at m/z 302.9386 only for hydroxytriclosan sulfate (M22). Whereas the triclosan conjugates would also allow for ring closure upon HCl elimination, they would lack the additional hydroxy moiety to stabilize the negative charge of the anion.

Another fragmentation behavior of hydroxylated metabolites is observed for the metabolites M2 and M4, which form m/z 301.9306 ($C_{12}H_5Cl_3O_3$). This formula is consistent with a resonance-stabilized triclosan quinone radical anion. This nicely illustrates the diversity in mass spectrometric fragmentation behavior, which would have impeded the detection of all hydroxylated metabolites by a precursor ion scan. In sum, 11 hydroxylated triclosan metabolites with four different elemental compositions were detected and tentatively identified. Because their mass spectra show only a few diagnostic ions, the support for the proposed structures is low and no additional structural information can be obtained by formed fragment ions for more complex metabolites such as the OH-triclosan malonyl hexosyl sulfate M1. The introduction of an additional hydroxy group is expected to increase the polarity and, hence, to decrease the retention time during reversed phase chromatography of metabolites in comparison to nonhydroxylated ones. In contrast, the OH-triclosan sulfate eluted later than its nonhydroxylated equivalent.

The comparison of the peak intensities of hydroxylated and nonhydroxylated metabolites suggests that only a small portion of triclosan was subjected to phase I metabolism prior to conjugation. The ability of the horseradish culture to form hydroxylated species was already observed recently and can be ascribed to the existence of P450 monooxygenase in plant cells.¹⁵ Except for the hydroxylated sulfate metabolite, several isomers (up to four) were formed for saccharide conjugates of OH-triclosan. However, with the fragment ions observed it was not possible to assign the sites of hydroxylation.

Despite this intensive study of the mass spectra generated at low and high collision energies, a total of 10 of the compounds recognized as triclosan metabolites could not be identified (Table 1, group 4). According to the m/z values and sum formula, respectively, three of these compounds contained nitrogen. As cysteine and glutathione conjugates might be formed during the plant metabolism, the sum formulas were examined to match respective structures, but no proper structure could be derived. For five of these unidentified compounds no sum formulas were determined from the exact m/z values of the molecular anions, because more than one probable sum formula was derived by the MassLynx 4.1 software.

Proposed Pathway of Triclosan Metabolism in Horseradish Hairy Root Cultures. A possible metabolic pathway for the formation of these 23 metabolites is provided in Figure 6. The detected metabolites are mainly pure phase II metabolites, that is, conjugates with endogenous compounds at the phenolic OH-group of triclosan. The conjugation of this OH-group with a hexose, probably β -D-glucose,²⁷ plays a central role, because the resulting triclosan hexoside (M19) is an intermediate for the formation of a number of further metabolites. The malonylation, acetylation, and sulfation of one OH-group of the glycon part gave rise to the malonylhexoside (M13), acetylhexoside (M15), and sulfohexoside (M18), respectively. Disaccharide conjugates such as M10 and M14 are formed by the glycosylation with one further hexose or

desoxyhexose, respectively. Furthermore, products formed by combinations of these reactions were observed, such as the triclosan malonylsulfohexoside (M12), which upon further sulfation gives rise to triclosan malonyldisulfohexoside (M9). Even though the formation of sulfohexosides of contaminants was reported before, disulfation of hexose conjugates has not been observed, so far. Besides these metabolites, the triclosan sulfate (M20) is formed by the direct sulfation of the phenolic OH-group of triclosan and is one of the few metabolites that does not require the previous glycosylation. Besides this large number of metabolites, which are formed exclusively by a combination of phase II reactions, four conjugates of the phase I metabolite OH-triclosan were detected. Three of the OH-triclosan conjugates form two to four structural isomers as the detection of identical m/z values at several retention times indicates. In sum, the OH-triclosan conjugates had comparatively low signal intensities, and the phase I metabolite OH-triclosan itself was not detected. The phase I reactions seem to play a minor role in the entire metabolism of triclosan by the hairy root culture of horseradish. This may indicate that the conjugation reactions of triclosan with sulfate or a hexose are faster than the hydroxylation in the phase I metabolism. Nevertheless, this is the first report on the phase I metabolism of triclosan in plants.

The combination of phase I and II metabolism in plants may give rise to a complex mixture of structurally diverse metabolites of environmental contaminants of high and very low signal intensities. This emphasizes the need and usefulness of the reported strategy of an unbiased and comprehensive approach for sample analysis using UPLC-QToF-MS^E and data processing using statistical means. It reduces the risk of overlooking a part of the metabolites formed in a plant. Even though structure proposals could be derived for 23 of the 33 detected triclosan metabolites, about one-third remained unidentified. Further analytical effort would be required for their identification. The inclusion of this and similar analytical approaches to detect and identify metabolites into uptake studies of environmental contaminants into plants would provide a more comprehensive view on this issue. An important next challenge poses the quantification of these metabolites, as reference compounds are usually not available.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(T.R.) E-mail: thorsten.reemtsma@ufz.de, Phone: +49 (0341) 235 1261. Fax: +49 (0341) 235 450822.

Funding

A.M. thanks the Helmholtz Impulse and Networking Fund through the Helmholtz Interdisciplinary Graduate School for Environmental Research (HIGRADE) for the kind support.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rudolf Harpaintner (Helmholtz Centre München), Steffi Schrader, and Ursula Winkler (both UFZ) for extensive technical assistance with the horseradish tissue cultivation and sample preparation.

■ REFERENCES

- (1) Herklotz, P. A.; Gurung, P.; Vanden Heuvel, B.; Kinney, C. A. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* **2010**, *78*, 1416–1421.
- (2) Shenker, M.; Harush, D.; Ben-Ari, J.; Chefetz, B. Uptake of carbamazepine by cucumber plants – a case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* **2011**, *82*, 905–910.
- (3) Eggen, T.; Asp, T. N.; Grave, K.; Hormazabal, V. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. *Chemosphere* **2011**, *85*, 26–33.
- (4) Macherius, A.; Eggen, T.; Lorenz, W. G.; Reemtsma, T.; Winkler, U.; Moeder, M. Uptake of galaxolide, tonalide, and triclosan by carrot, barley, and meadow fescue plants. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7785–7791.
- (5) Litz, N. T.; Müller, J.; Böhmer, W. Occurrence of polycyclic musks in sewage sludge and their behaviour in soils and plants. Part 2: Investigation of polycyclic musks in soils and plants. *J. Soil Sediment* **2007**, *7*, 36–44.
- (6) Boxall, A. B. A.; Johnson, P.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E.; Levy, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2288–2297.
- (7) Sabourin, L.; Duenk, P.; Bonte-Gelok, S.; Payne, M.; Lapen, D. R.; Topp, E. Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci. Total Environ.* **2012**, *431*, 233–236.
- (8) Gottschall, N.; Topp, E.; Metcalfe, C.; Edwards, M.; Payne, M.; Kleywegt, S.; Russell, P.; Lapen, D. R. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* **2012**, *87*, 194–203.
- (9) Aryal, N.; Reinhold, D. M. Phytoaccumulation of antimicrobials from biosolids: impacts on environmental fate and relevance to human exposure. *Water Res.* **2011**, *45*, 5545–5552.
- (10) Wu, C.; Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Fang, M.; Czajkowski, K. P. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6157–6161.
- (11) Komoša, D.; Langebartels, C.; Sandermann Jr., H. Metabolic processes for organic chemicals in plants. In *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*; Trapp, S., McFarlane, C., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, USA, 1995; pp 69–103.
- (12) Cole, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pestic. Sci.* **1994**, *42*, 209–222.
- (13) Macherius, A.; Eggen, T.; Lorenz, W.; Moeder, M.; Ondruschka, J.; Reemtsma, T. Metabolization of the bacteriostatic agent triclosan in edible plants and its consequences for plant uptake assessment. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 10797–10804.
- (14) Van Eerd, L. L.; Hoagland, R. E.; Zablotowicz, R. M.; Hall, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.* **2003**, *51*, 472–495.
- (15) Huber, C.; Bartha, B.; Schröder, P. Metabolism of diclofenac in plants – hydroxylation is followed by glucose conjugation. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *243*, 250–256.
- (16) Bonn, B.; Leandersson, C.; Fontaine, F.; Zamora, I. Enhanced metabolite identification with MS^E and a semi-automated software for structural elucidation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3127–3138.
- (17) Huber, C.; Bartha, B.; Harpaintner, R.; Schröder, P. Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants – two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2009**, *16*, 206–213.
- (18) Bateman, K. P.; Castro-Perez, J.; Wrona, M.; Shockcor, J. P.; Yu, K.; Oballa, R.; Nicoll-Griffith, D. A. MS^E with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1485–1496.
- (19) Zhu, M.; Ma, L.; Zhang, D.; Ray, K.; Zhao, W.; Humphreys, W. G.; Skiles, G.; Sanders, M.; Zhang, H. Detection and characterization of metabolites in biological matrices using mass defect filtering of liquid chromatography/high resolution mass spectrometry data. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1722–1733.
- (20) Zhang, H.; Zhang, D.; Ray, K.; Zhu, M. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 999–1016.
- (21) Bode, M.; Stöbe, P.; Thiede, B.; Schuphan, L.; Schmidt, B. Biotransformation of atrazine in transgenic tobacco cell culture expressing human P450. *Pest Manag. Sci.* **2004**, *60*, 49–58.
- (22) Chu, W. K.; Wong, M. H.; Zhang, J. Accumulation, distribution and transformation of DDT and PCBs by *Phragmites australis* and *Oryza sativa* L.: I. Whole plant study. *Environ. Geochem. Health* **2006**, *28*, 159–168.
- (23) Ferrari, R. P.; Laurenti, E.; Trotta, F. Oxidative 4-dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 232–237.
- (24) Laurent, F.; Debrauwer, L.; Rathahao, E.; Scalla, R. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid metabolism in transgenic tolerant cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5307–5311.
- (25) Capps, T. M.; Barringer, V. M.; Eberle, W. J.; Brown, D. R.; Sanson, D. R. Identification of a unique glucosylsulfate conjugate metabolite of profenofos in cotton. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2408–2411.
- (26) Levsen, K.; Schiebel, H.-M.; Behnke, B.; Dötzer, R.; Dreher, W.; Elend, M.; Thiele, H. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1067*, 55–72.
- (27) Laurent, F.; Canlet, C.; Debrauwer, L.; Pascal-Lorber, S. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenol in tobacco cell suspension cultures. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26*, 2299–2307.

3.3.2 Ergänzende Informationen

3.3.2.1 Bestimmung von Methyltriclosan in den Meerrettich-Haarwurzelkulturen

Die Nährmedien und Gewebeextrakte der Haarwurzelkulturen des Meerrettichs wurden mit der im Anhang (Abschnitt A.3.2) beschriebenen HS-SPME-GC-MS-Methode hinsichtlich ihres Gehaltes an Triclosan, Methyltriclosan, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol untersucht. Die Ausgangsverbindung Triclosan war bereits nach einem Tag weder in den Nährmedien noch in den Gewebeextrakten in Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze nachweisbar. Auch 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol konnten in keiner Probe bestimmt werden. Methyltriclosan wurde dagegen in den Gewebeextrakten zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen. Am ersten Tag lag der Gehalt bei $13 \pm 5 \mu\text{g}$, am zweiten Tag bei $17 \pm 3 \mu\text{g}$ und am dritten Tag bei $13 \pm 2 \mu\text{g}$. Das heißt, dass durchschnittlich etwa ein Fünftel des eingesetzten Triclosans in Methyltriclosan überführt wurde.

Methylierte Metaboliten werden beim pflanzlichen Metabolismus von Kontaminanten selten beobachtet. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zum Metabolismus des bromierten Diphenylethers BDE-47 berichtet von der Methylierung eines hydroxylierten Zwischenproduktes (Sun et al., 2013). Für Bakterien und Pilze ist die Methylierung von Kontaminanten dagegen eine typisch Metabolisierungsstrategie (Allard et al., 1987; Hundt et al., 2000; Van Eerd et al., 2003). So ist die Bildung von Methyltriclosan aus Triclosan in Kläranlagen und klärschlammbehandelten Böden auf eine Methylierung durch Mikroorganismen zurückzuführen (Balmer et al., 2003; Lindström et al., 2002). Bei den untersuchten Haarwurzelkulturen wurden jedoch keine Anzeichen für eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen beobachtet, sodass die Transformation von Triclosan zu Methyltriclosan innerhalb des Meerrettich-Haarwurzelgewebes stattgefunden hat.

4 Zusammenfassung der Dissertation und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme, Verteilung und der Metabolismus ausgewählter organischer Klärschlammkontaminanten in landwirtschaftlich genutzten Pflanzen untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf Untersuchungen zum Verhalten des Bakterizids Triclosan. Diese Untersuchungen wurden mit intakten Pflanzen unter Gewächshausbedingungen und mit *in vitro*-Pflanzenzell- und Gewebekulturen durchgeführt. Dafür wurden geeignete analytische Methoden, basierend auf GC- und LC-MS, für die quantitative Bestimmung der Zielverbindungen in verschiedenen Matrices und für den Nachweis und die Aufklärung unbekannter Transformationsprodukte entwickelt. Die Ergebnisse und Erkenntnisse der Untersuchungen wurden in drei Fachartikeln publiziert und sind im Folgenden zusammengefasst.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Aufnahme und Verteilung des Bakterizids Triclosan und der polycyclischen Moschusduftstoffe Galaxolid[®] (HHCB) und Tonalid[®] (AHTN) in vier Karottensorten, Gerste und Wiesen-Schwingel untersucht. Die Pflanzen wurden in dotierten Böden unter Gewächshausbedingungen kultiviert, nach der Ernte in einzelne Pflanzenteile unterteilt und mittels GC-MS (SIM) hinsichtlich ihrer Kontaminantkonzentrationen analysiert.

In den Wurzeln der Karottenpflanzen konnte alle drei Verbindungen nachgewiesen werden. Dabei waren die Konzentrationen in der Schale der Pfahlwurzel wesentlich höher als im Inneren der Wurzel. Zudem nahmen die vier untersuchten Karottensorten die Kontaminanten in unterschiedlichen Umfang in ihre Wurzeln auf. Die Ursache für diese sortenspezifische Anreicherung konnte nicht aufgeklärt werden, eine vermutete Korrelation mit den Lipidgehalten der Wurzeln konnte nicht bestätigt werden. Außerdem konnten HHCB, AHTN und Triclosan auch in den oberirdischen Teilen der Karottenpflanzen nachgewiesen werden. Trotz ihrer unpolaren Eigenschaften, wurden die Kontaminanten also nicht nur in die äußeren Wurzelschichten aufgenommen, sondern auch über das Leitgewebe im Inneren der Wurzel in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert.

In den Wurzeln der Gerste- und Wiesen-Schwingelpflanzen konnten ebenfalls alle drei untersuchten Kontaminanten nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren wesentlich höher als in der Pfahlwurzel der Karotte, was wahrscheinlich durch das größere Oberfläche-Volumen-Verhältnis der Gräserwurzeln und den dadurch begünstigten Stofftransfer aus dem Boden bedingt war. Trotz der höheren Konzentrationen in den Wurzeln, wurden die untersuchten Verbindungen, im Gegensatz zu den Karotten, nicht bzw. in nur einem sehr geringen Umfang in die oberirdischen Pflanzenteile von Gerste und Wiesen-Schwingel transportiert.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Aufnahme von semi- und unpolaren Kontaminanten aus belasteten Böden in Pflanzen und ein damit verbundener Eintrag in die Nahrungskette in erster Linie für Wurzelgemüse wie Karotten relevant sein können. Bei den Aufnahmestudien lagen die Konzentrationen von Triclosan, HHCB und AHTN in den Karottenwurzeln zwischen 0,3 und 2,5 mg kg⁻¹ TM. Diese Konzentrationen der Kontaminanten liegen weit über der allgemeinen Höchstmenge von 0,01 mg kg⁻¹, wie sie für Rückstände bestimmter Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel in Lebensmitteln gelten würden (RHmV, 2010; VO 396/2005/EG, 2005). Auch wenn die Kultivierungsbedingungen und die Bodenkonzentrationen der Kontaminanten bei den Aufnahmeuntersuchungen ein Worst-Case-Szenario darstellen, sind die in den Karottenwurzeln aufgenommenen Triclosan-, HHCB- und AHTN-Mengen in diesem Kontext nicht vernachlässigbar. Die provisorischen TDI-Werte (*tolerable daily intake*) für HHCB (0,5 mg kg⁻¹ Körpergewicht) und AHTN (0,05 mg kg⁻¹ Körpergewicht) bzw. die Referenzdosis für Triclosan (0,3 mg kg⁻¹ d⁻¹) – offizielle TDI-Werte wurden nicht festgelegt – würden durch den Verzehr üblicher Mengen dieser Karotten allerdings nicht annähernd erreicht (EPA, 2008; Lignell et al., 2008). Trotzdem kann dieser Eintragungspfad zu einer unerwünschten und bisher unberücksichtigten chronischen Exposition des Menschen gegen diese Verbindungen beitragen. Problematisch ist hier vor allem das Triclosan, das vermutlich eine Rolle bei der Bildung von Antibiotikaresistenzen spielt und dessen Einsatz deshalb auf Empfehlung des Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) auf ein unbedingt notwendiges Maß beschränkt und z. B. in Lebensmittelverpackungen verboten werden sollte (BfR, 2009).

Bei den Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Triclosan, HHCB und AHTN in Pflanzen wurden ausschließlich die Ausgangsverbindungen analytisch erfasst. Eine mögliche Transformation der Kontaminanten wurde nicht berücksichtigt. Pflanzen sind jedoch in der Lage, aufgenommene organische Verbindungen zu metabolisieren. Um das Schicksal aufgenommener Verbindungen in den untersuchten Pflanzen nachvollziehen zu können, war es daher notwendig, Art und Umfang ihrer Metabolisierung zu bestimmen und die Struktur der Metaboliten aufzuklären.

Für die Untersuchungen zum pflanzlichen Metabolismus von Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban unter Laborbedingungen wurde eine axenischen Karottenzellsuspensionskultur etabliert. Diese wurde fünf Tage gegen die Kontaminanten exponiert und die Ausgangsverbindungen mittels HS-SPME-GC-MS und LC-MS quantitativ bestimmt. Für Triclosan konnte in den Kulturen ein schneller Verbrauch beobachtet und eine Halbwertszeit von neun Stunden berechnet werden. Anschließend wurden in den Kulturen acht Triclosanmetaboliten mittels LC-MS nachgewiesen und auf Grundlage von Daten aus MS-Experimenten Strukturvorschläge erarbeitet. Es handelt es sich ausschließlich um Phase-II-

Metaboliten, also um Konjugate der phenolischen Hydroxygruppe des Triclosans. Der überwiegende Teil dieser Phase-II-Metaboliten waren Saccharidkonjugate, wobei sowohl Monosaccharide als auch Disaccharide nachgewiesen wurden. Bei dem Monosaccharid handelt es sich um das Konjugat mit einer Hexose, wahrscheinlich Glucose, aus dem durch Erweiterung um eine zusätzliche Hexose, Desoxyhexose oder Pentose die Disaccharide gebildet wurden. Zudem wurden Malonsäureester dieser Saccharide nachgewiesen. Als einziger Metabolit, der nicht aus der Glykosylierung hervorgeht, wurde das Sulfatkonjugat identifiziert. Phase-I-Metaboliten, die etwa durch eine Hydroxylierung am Aromaten, Etherspaltung oder Dehalogenierung gebildet werden, wurden nicht nachgewiesen. Auch ein Glutathionkonjugat wurde nicht nachgewiesen, sodass die Metabolisierungsreaktionen ausschließlich an der Hydroxygruppe des Triclosans stattfanden. Entweder laufen die Reaktionen des Phase-II-Metabolismus bevorzugt ab, oder die untersuchte Karottenkultur ist nicht in der Lage, Verbindungen wie Triclosan in Phase-I-Reaktionen umzusetzen. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurden analoge Untersuchungen zum Metabolismus mit Methyltriclosan, einem bekannten Transformationsprodukt des Triclosans, und dem Bakterizid Triclocarban durchgeführt. Beide Verbindungen sind dem Triclosan strukturell zwar ähnlich, verfügen aber über keine Hydroxygruppe, die einem direkten Phase-II-Metabolismus zugänglich wäre. In den exponierten Karottenzellkulturen blieben die detektierten Mengen beider Verbindungen über den gesamten Untersuchungszeitraum von fünf Tagen unverändert, Hinweise auf eine Metabolisierung wurden nicht beobachtet. Weder Methyltriclosan noch Triclocarban konnten von den untersuchten Karottenzellkulturen umgesetzt werden.

Mit den Kenntnissen der chromatographischen und massenspektrometrischen Charakteristika der Triclosanmetaboliten wurde eine LC-MS/MS-Methode (MRM) für ihren sensitiven Nachweis etabliert. Mit dieser Methode konnten alle acht Triclosanmetaboliten in den Wurzeln triclosanexponierter Karottenpflanzen nachgewiesen werden. Eine semi-quantitative Abschätzung zeigt, dass in den Karottenwurzeln etwa fünfmal mehr Triclosan in Konjugaten als in unmetabolisierter Form vorlag. Eine exakte Quantifizierung der Metaboliten war allerdings nicht möglich, da keine Referenzverbindungen verfügbar waren. Durch die Metabolisierung, wurde in der Pflanze ein großer Teil des aufgenommenen Triclosans maskiert. Die alleinige Bestimmung der Ausgangsverbindung hat so zu einer Unterschätzung der tatsächlich in die Pflanze aufgenommenen Triclosanmenge geführt. Diese Metaboliten können jedoch auch zur Exposition von Mensch und Tier beitragen, da aus ihnen die Ausgangsverbindung Triclosan, z. B. durch Hydrolyse, wieder freigesetzt werden kann. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sollte bei Untersuchungen zur Aufnahme von Kontaminanten in Nutzpflanzen auch deren mögliche Metabolisierung berücksichtigt werden,

um falsche Schlüsse bezüglich des Schicksals der Kontaminanten in Pflanzen und ein Unterschätzung ihres Eintrages in die Nahrungskette zu vermeiden.

Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere Pflanzen beziehungsweise deren Zell- oder Gewebekulturen wurde in analogen Studien zum Metabolismus von Triclosan in Meerrettich-Haarwurzelkulturen untersucht. Dabei sollte bestimmt werden, ob in diesen Kulturen ein ähnlich schneller und vollständiger Umsatz von Triclosan stattfindet und ob das gebildete Metabolitmuster mit dem der Karottenzellkultur vergleichbar ist. In den Extrakten der Meerrettich-Haarwurzelkulturen wurden mittels UPLC-QToF-MS^E und Auswertung der Datensätze mittels Massendefektfilter, multivariater Datenanalyse und Isotopenmusterfilter 33 Triclosanmetaboliten nachgewiesen. Basierend auf massenspektrometrischen Daten wurden für 23 Metaboliten Strukturvorschläge erarbeitet. Bei der Mehrheit handelte es sich um reine Phase-II-Metaboliten. Neben dem Sulfat- und dem Hexosekonjugat des Triclosans, wurde eine Reihe von Disaccharidkonjugaten unterschiedlicher Zusammensetzung sowie die acetylierten und malonylierten Folgeprodukte nachgewiesen. Darüber hinaus wurden Strukturvorschläge für Sulfosaccharide und Sulfodisaccharide ermittelt. Erstmals konnte ein Malonyldisulfohexosekonjugat als Produkt des pflanzlichen Metabolismus einer anthropogenen Verbindung nachgewiesen werden. Ebenfalls ungewöhnlich war die Bildung des Methyltriclosans. Neben diesen Phase-II-Metaboliten, wurden in den Extrakten der Meerrettichkultur auch Konjugate des hydroxylierten Triclosans nachgewiesen, also Produkte eines Phase-I- und Phase-II-Metabolismus. Dabei war die Signalintensitäten dieser Metaboliten jedoch vergleichsweise gering, das hydroxylierte Triclosan selbst wurde nicht detektiert.

Sowohl in den Meerrettich-Haarwurzel- als auch in den Karottenzellsuspensionskulturen wurde eine schnelle und vollständige Metabolisierung des Triclosans beobachtet. Einzelne Metaboliten, wie das Hexose- und Malonylhexose- sowie das für Pflanzen bisher selten beobachtet Sulfatkonjugat, wurden in beiden Kulturen gebildet. Die Mehrzahl der Metaboliten war aber spezifisch für eine Kultur und wurde entweder in der einen oder der anderen nachgewiesen. Zudem fand in den Meerrettich-Haarwurzelkulturen, wenn auch nur in geringem Umfang, ein Phase-I-Metabolismus statt. Im Gegensatz dazu wurden in Karottenzellkulturen ausschließlich Phase-II-Metaboliten gebildet. Da die Metabolisierung des Triclosans sehr pflanzenspezifisch ist, können auf Grundlage des Metabolitmusters in einer bestimmten Pflanze nur sehr bedingt Vorhersagen für Metaboliten in anderen Pflanzen bzw. Zell- und Gewebekulturen getroffen werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang Untersuchungen zum Metabolismus von Methyltriclosan und Triclocarban in Meerrettich-Haarwurzelkulturen, d. h. ob die Verbindungen, wie in den Karottenzellkulturen, persistent sind oder durch Phase-I-Reaktionen umgesetzt werden. Konkrete Vorhersagen zur

Metabolisierung bisher nicht untersuchter Verbindungen können nur schwer getroffen werden. Im Allgemeinen werden Stoffe mit polaren funktionellen Gruppen, wie z. B. Hydroxy- oder Carboxygruppen, in Pflanzen mit größerer Wahrscheinlichkeit umgesetzt als Stoffe, ohne eine solche Gruppe. Für die Berücksichtigung der Metabolisierung und der gebildeten Metaboliten einer Verbindung in Aufnahmestudien bleiben experimentelle Daten dennoch unverzichtbar.

Die Arbeit zeigt, dass Klärschlammkontaminanten aus belasteten Böden in landwirtschaftlich genutzte Pflanzen aufgenommen und in diesen metabolisiert werden können. Neben der Ausbringung von Klärschlämmen auf Ackerflächen, können anthropogene organische Verbindungen auch durch die Bewässerung in den Kontakt mit Nahrungspflanzen kommen. Besonders in semiariden und ariden Gebieten, wo aufgrund der Wasserknappheit große Anteile der behandelten Abwässer für die Bewässerung von Obst- und Gemüsekulturen verwendet werden, besteht diese Gefahr. Auch in diesem Kontext sind Untersuchungen zur Aufnahme, Verteilung und zum Metabolismus der meist polaren Wasserkontaminanten notwendig, um die Exposition von Mensch und Tier abschätzen und einen möglichen Handlungsbedarf ableiten zu können.

Bei zukünftigen Untersuchungen wird eines der zu lösenden Probleme die Quantifizierung der Metaboliten sein, da Referenzverbindungen oft nicht kommerziell erhältlich sind. Ein Ansatz zur Gewinnung von Referenzverbindungen wäre die Isolierung und Aufreinigung der Metaboliten aus Zell- oder Gewebekulturen, eine anderer ihre chemische Synthese. Zudem kann die Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen den Nachweis und die Quantifizieren der Transformationsprodukte in komplexen Matrices erleichtern. Für die Strukturaufklärung sind dagegen leistungsfähige massenspektrometrische Methoden unverzichtbar.

Eine weitere Herausforderung ist die Bestimmung von möglichen gebundenen Rückständen der Kontaminanten in Zell- und Gewebekulturen sowie in intakten Pflanzen. Es ist bekannt, dass beim pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus neben löslichen Metaboliten auch kovalent an Zellwandbestandteile gebunden Produkte gebildet werden können. Die vollständige Erfassung der aufgenommenen Menge eines Kontaminanten und dessen Schicksal in der Pflanze erfordert, dass auch diese gebundenen Rückstände charakterisiert und quantifiziert werden. Die qualitative und quantitative Erfassung dieser Art von Metaboliten mittels gas- oder flüssigchromatographisch-massenspektrometrischer Methoden setzt ihre Überführung in eine lösliche Form durch eine geeignete Probenvorbereitung, z. B. durch Hydrolyse, und die Verfügbarkeit von Referenzverbindungen voraus. Auch hier kann die Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen bei dem Nachweis und der Quantifizierung gelöster und gebundener Metaboliten helfen.

Literaturverzeichnis

- AbfKlärV *Klärschlammverordnung (AbfKlärV)*. Ausfertigungsdatum: 15.04.1992 (BGBl. I S. 912); zuletzt geändert durch Artikel 5 Absatz 12 des Gesetzes vom 24. Februar 2012 (BGBl. I S. 212). Bundesrepublik Deutschland - Bundesministerium der Justiz und Verbraucherschutz, 2012.
- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., Sturve, J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46 (2002) 1485-1489.
- Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Scott, A., Lapen, D. R., Topp, E. Impact of biosolids on the persistence and dissipation pathways of triclosan and triclocarban in an agricultural soil. *Science of The Total Environment* 407 (2009) 5978-5985.
- Allard, A. S., Remberger, M., Neilson, A. H. Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (1987) 839-845.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Staynbaheer, D., Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86 (2003) 412-431.
- Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.-A., Müller, M. D., Buser, H.-R. Occurrence of Methyl Triclosan, a Transformation Product of the Bactericide Triclosan, in Fish from Various Lakes in Switzerland. *Environmental Science & Technology* 38 (2003) 390-395.
- Bateman, K. P., Castro-Perez, J., Wrona, M., Shockcor, J. P., Yu, K., Oballa, R., Nicoll-Griffith, D. A. MS^E with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (2007) 1485-1496.
- Bester, K. Triclosan in a sewage treatment process - balances and monitoring data. *Water Research* 37 (2003) 3891-3896.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). *Stellungnahme Nr. 031/2009 des BfR vom 12. Juni 2009: BfR unterstützt Verwendungsverbot von Triclosan in Lebensmittelbedarfsgegenständen*. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, 2009 (http://www.bfr.bund.de/cm/343/bfr_unterstuetzt_verwendungsverbot_von_triclosan_in_lebensmittelbedarfsgegenstaenden.pdf, Zugriff: 30.12.2013).
- Boehmer, W., Ruedel, H., Wenzel, A., Schroeter-Kermani, C. Retrospective Monitoring of Triclosan and Methyl-triclosan in Fish: Results from the German Environmental Specimen. *Organohalogen Compounds* 66 (2004) 1516-1521.
- Boxall, A. B. A., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E., Levy, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 2288-2297.
- Briggs, G. G., Bromilow, R. H., Evans, A. A. Relationships Between Lipophilicity and Root Uptake and Translocation of Non-ionised Chemicals by Barley. *Pesticide Science* 13 (1982) 495-504.
- Briggs, G. G., Rigitano, R. L., Bromilow, R. H. Physico-chemical Factors Affecting Uptake by Roots and Translocation to Shoots of Weak Acids in Barley. *Pesticide Science* 19 (1987) 101-112.

- Bromilow, R. H., Chamberlain, K. *Principles Governing Uptake and Transport of Chemicals*. In: Trapp, S., McFarlane, J.C. (Hrsg.): *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995, S. 37-67.
- Burken, J. und G., Schnoor, J. L. Predictive Relationships for Uptake of Organic Contaminants by Hybrid Poplar Trees. *Environmental Science & Technology* 32 (1998) 3379-3385.
- Burken, J. G. *Uptake and Metabolism of Organic Compounds: Green-Liver Model*. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Hrsg.): *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminant*. Hoboken (NJ), John Wiley & Sons. Inc., 2003, S. 59-84.
- Butler, E., Whelan, M. J., Sakrabani, R., van Egmond, R. Fate of triclosan in field soils receiving sewage sludge. *Environmental Pollution* 167 (2012) 101-109.
- Canosa, P., Rodriguez, I., Rubi, E., Cela, R. Optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples. *Journal of Chromatography A* 1072 (2005) 107-115.
- Chu, S. und Metcalfe, C. D. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1164 (2007) 212-218.
- Clarke, B. O., Smith, S. R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* 37 (2011) 226-247.
- Cole, D. J. Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants. *Pesticide Science* 42 (1994) 209-222.
- Coleman, J. O. D., Blake-Kalff, M. A., Emyr Davis, T. G. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2 (1997) 144-151.
- Collins, C., Fryer, M., Grosso, A. Plant Uptake of Non-Ionic Organic Chemicals. *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 45-52.
- Cuyckens, F., Hurkmans, R., Castro-Perez, J. M., Leclercq, L., Mortishire-Smith, R. J. Extracting metabolite ions out of a matrix background by combined mass defect, neutral loss and isotope filtration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (2009) 327-332.
- Day, J. A., Saunders, E. M. Glycosidation of Chlorophenols by *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (2004) 613-620.
- Dettenmaier, E. M., Doucette, W. J., Bugbee, B. Chemical Hydrophobicity and Uptake by Plant Roots. *Environmental Science & Technology* 43 (2009) 324-329.
- DiFrancesco, A. M., Chiu, P. C., Standley, L. J., Allen, H. E., Salvito, D. T. Dissipation of Fragrance Materials in Sludge-Amended Soils. *Environmental Science & Technology* 38 (2004) 194-201.
- Doran, P. M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnology and Bioengineering* 103 (2009) 60-76.
- DüMV *Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV)*. Ausfertigungsdatum: 05.12.2012 (BGBl. I S. 2482). Bundesrepublik Deutschland - Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz, 2012.

- Ebing, W., Haque, A., Schuphan, I., Harms, H. H., Langebartels, C., Scheel, D., von der Trenck, K. T., Sandermann Jr., H. Ecochemical Assessment of Environmental Chemicals: Draft Guideline of the Test Procedure to Evaluate Metabolism and Degradation of Chemicals by Plant Cell Cultures. *Chemosphere* 13 (1984) 947-957.
- Edwards, R. und Owen, W. J. Comparison of glutathione S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta* 169 (1986) 208-215.
- Edwards, R. und Owen, W. J. Regulation of glutathione S-transferases of *Zea mays* in plants and cell cultures. *Planta* 175 (1988) 99-106.
- EG (Europäische Gemeinschaft). *European Union Risk Assessment Report: 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta- γ -2-benzopyran(1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylin-deno[5,6- c]pyran - HHCB)*. Europäische Gemeinschaft, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg, 2008 (http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/hhcbreport414.pdf, Zugriff: 29.11.2013).
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). *High Production Volume (HPV) Chemical Challenge Program Data Availability and Screening Level Assessment for Triclocarban (Report 201-14186A)*. U. S Environmental Protection Agency, The TCC Consortium, Washington, D.C., 2002 (<http://www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/triclocar/c14186tp.pdf>, Zugriff: 29.11.2013).
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). *Methode 3550C Ultrasonic Extraction*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2007 (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf>, Zugriff: 29.12.2013).
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). *Reregistration Eligibility Decision (RED) Document for Triclosan (Report EPA 739-RO-8009)*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2008 (<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/2340red.pdf>, Zugriff: 10.02.2014).
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). *Targeted National Sewage Sludge Survey - Statistical Analysis Report (EPA-822-R-08-018)*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, 2009 (http://water.epa.gov/scitech/wastetech/biosolids/upload/TNSSS_stat_report-Apr-2009.pdf, Zugriff: 22.06.2012).
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). *Toxic Substances Control Act (TSCA) Workplan Chemical Risk Assessment - HHCB 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta- γ -2- benzopyran*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, DC, 2012 (http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/TSCA_Workplan_Chemical_Risk_Assessment_of_HHCB.pdf, Zugriff: 29.11.2013).
- Eurofins-AUA GmbH und PROWA GmbH. *Bewertung der (organischen) Schadstoffbelastung kommunaler Klärschlämme in Schleswig-Holstein hinsichtlich der zukünftigen landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung*. Eurofins-AUA GmbH und PROWA Ingenieure Dresden GmbH im Auftrag des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (MLUR) Schleswig-Holstein, Jena/Dresden/Kiel, 2007 (http://server.ime.fraunhofer.de/download/permanent/klaerschlamm-monitoring/Infos_Klaerschlamm/Klaerschlamm_Schleswig-Holstein_2007.pdf, Zugriff: 29.11.2013).
- Frear, D. S. und Swanson, H. R. Metabolism of cisanilide (cis-2,5-dimethyl-1-pyrrolidincarboxanilide) by excised leaves and cell suspension cultures of carrot and cotton. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5 (1975) 73-80.

- Gottschall, N., Topp, E., Metcalfe, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., Lapen, D. R. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* 87 (2012) 194-203.
- Halden, R. U. und Paull, D. H. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. *Environmental Science & Technology* 39 (2005) 1420-1426.
- Haque, A., Ebing, W., Schuphan, I. Ecochemical assessment of environmental chemicals Part 2: Standard supplementary screening procedure to evaluate more volatile and less persistent chemicals in plant cell cultures. *Chemosphere* 13 (1984) 315-320.
- Harms, H. und Langebartels, C. Standardized Plant Cell Suspension Test Systems for an Ecotoxicologic Evaluation of the Metabolic Fate of Xenobiotics. *Plant Science* 45 (1986) 157-165.
- Harms, H. H. In-vitro systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pesticide Science* 35 (1992) 277-281.
- Heidler, J., Sapkota, A., Halden, R. U. Partitioning, Persistence, and Accumulation in Digested Sludge of the Topical Antiseptic Triclocarban during Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 3634-3639.
- Heidler, J., Halden, R. U. Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment. *Chemosphere* 66 (2007) 362-369.
- HERA. *Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products - Polycyclic musks - AHTN (CAS 1506-02-1) and HHCB (CAS 1222-05-05)*. HERA Initiative, Brüssel, 2004 (<http://www.heraproject.com/files/28-E-36551E10-F8EF-E807-E4199B9BB0076A9F.pdf>, Zugriff: 13.11.2013).
- Herren, D., Berset, J. D. Nitro musks, nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludges. Quantitative determination by HRGC-ion-trap-MS/MS and mass spectral characterization of the amino metabolites. *Chemosphere* 40 (2000) 565-574.
- Horii, Y., Reiner, J. L., Loganathan, B. G., Senthil Kumar, K., Sajwan, K., Kannan, K. Occurrence and fate of polycyclic musks in wastewater treatment plants in Kentucky and Georgia, USA. *Chemosphere* 68 (2007) 2011-2020.
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., Schröder, P. Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants--two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science and Pollution Research* 16 (2009) 206-213.
- Huber, C., Bartha, B., Schröder, P. Metabolism of diclofenac in plants - Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *Journal of Hazardous materials* 243 (2012) 250-256.
- Hübner, G., Gierig, M., Frey, S., Sengl, M., Waller, U., Körner, W. *Analyse und Verteilungsverhalten von perfluorierten Chemikalien und anderen persistenten organischen Spurenstoffen in Klärschlamm und Boden. Teil 1: Klärschlammuntersuchungen*. Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU), Augsburg, 2011 (http://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/pft_verteilungsverhalten/doc/endbericht_teil1_klaerschlamm.pdf, Zugriff: 22.11.2013).
- Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M. K., Schauer, F. Transformation of Triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 4157-4160.

- Javot, H. L. N. und Maurel, C. The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Annals of Botany* 90 (2002) 301-313.
- Kape, H., Pöplau, R., Didik, H., Schaecke, B. *Bericht zur Belastung von Klärschlämmen aus der kommunalen Abwasserbehandlung von Mecklenburg-Vorpommern mit organischen Schadstoffen*. Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern und Landwirtschaftliche Fachbehörde Mecklenburg-Vorpommern Rostock, 2006 (<http://www.lung.mv-regierung.de/dateien/ks-bericht06-endfassung.pdf>, Zugriff: 06.11.2013).
- Kinney, C. A., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Burkhardt, M. R., Zaugg, S. D., Werner, S. L., Bossio, J. P., Benotti, M. J. Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. *Environmental Science & Technology* 42 (2008) 1863-1870.
- Kinney, C. A., Campbell, B. R., Thompson, R., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Burkhardt, M. R., Zaugg, S. D., Werner, S. L., Hay, A. G. Earthworm bioassays and seedling emergence for monitoring toxicity, aging and bioaccumulation of anthropogenic waste indicator compounds in biosolids-amended soil. *Science of The Total Environment* 433 (2012) 507-515.
- Klapproth, E. *Kultivierung von Daucus carota auf Fest- und Flüssigmedien*. Jena, Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik/Biotechnologie, Bachelorarbeit, 2010.
- Komoşa, D., Sandermann Jr., H. Plant metabolism of herbicides with C-P bonds: Phosphinothricin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 43 (1992) 95-102.
- Komoşa, D., Langebartels, C., Sandermann Jr., H. *Metabolic Processes for Organic Chemicals in Plants*. In: Trapp, S., McFarlane, J.C. (Hrsg.): *Plant Contamination : Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995, S. 69-103.
- Kreuz, K., Tommasini, R., Martinoia, E. Old Enzymes for a New Job - Herbicide Detoxification in Plants. *Plant Physiology* 111 (1996) 349-353.
- Kuch, C., Schneider, C., Metzger, J. W. *Monitoring der Desinfektionsmittel Triclosan, Triclocarban und Hexachlorophen in Fließgewässern, Sedimenten, Klärschlämmen, Zu- und Abläufen von Kläranlagen (Forschungsbericht FZKA-BWPLUS (BWB 21009))*. Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Stuttgart, 2003 (<http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/40137/BWB21009SBer.pdf?command=downloadContent&filename=BWB21009SBer.pdf&FIS=203>, Zugriff: 07.11.2013).
- Langenkamp, H., Part, P., Erhardt, W., Prüß, A. *Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agricultural Use*. Europäische Kommission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability, Soil and Waste Unit und UMEG Center for Environmental Measurements, Environmental Inventories and Product Safety, Brüssel, 2001 (http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/organics_in_sludge.pdf, Zugriff: 29.11.2013).
- Langford, K. H., Reid, M., Thomas, K. V. Multi-residue screening of prioritised human pharmaceuticals, illicit drugs and bactericides in sediments and sludge. *Journal of Environmental Monitoring* 13 (2011) 2284-2291.

- Laurent, F., Debrauwer, L., Rathahao, E., Scalla, R. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Metabolism in Transgenic Tolerant Cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 5307-5311.
- Laurent, F., Canlet, C., Debrauwer, L., Pascal-Lorber, S. Metabolic Fate of [¹⁴C]-2,4-Dichlorophenol in Tobacco Cell Suspension Cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (2007) 2299-2307.
- Levsen, K., Schiebel, H.-M., Behnke, B., Dötzer, R., Dreher, W., Elend, M., Thiele, H. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A* 1067 (2005) 55-72.
- Lewer, P., Owen, W. J. Amino acid conjugation of triclopyr by soybean cell suspension cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 33 (1989) 249-256.
- Lignell, S., Darnerud, P. O., Aune, M., Cnattingius, S., Hajslova, J., Setkova, L., Glynn, A. Temporal Trends of Synthetic Musk Compounds in Mother-Milk and Associations with Personal Use of Perfumed Products. *Environmental Science & Technology* 42 (2008) 6743-6748.
- Lim, H.-K., Chen, J., Cook, K., Sensenhaus, C., Silva, J., Evans, D. C. A generic method to detect electrophilic intermediates using isotopic pattern triggered data-dependent high-resolution accurate mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (2008) 1295-1311.
- Lindström, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P.-A., Müller, M. D., Buser, H.-R. Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and Its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology* 36 (2002) 2322-2329.
- Litz, N. T., Müller, J., Böhmer, W. Occurrence of Polycyclic Musks in Sewage Sludge and their Behaviour in Soils and Plants Part 2: Investigation of Polycyclic Musks in Soils and Plants. *Journal of Soils and Sediments* 7 (2007) 36-44.
- Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M., Torrents, A. Fate of triclosan in agricultural soils after biosolid applications. *Chemosphere* 78 (2010) 760-766.
- Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M., Torrents, A. Fate of Triclosan and Methyltriclosan in soil from biosolids application. *Environmental Pollution* 160 (2012) 103-108.
- Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M., Torrents, A. Fate of Triclocarban, Triclosan and Methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Research* 47 (2013) 4519-4527.
- Malcherek, K., Breuer, J., Schuphan, I., Schmidt, B. Metabolism of 4-nitrophenol in aseptically cultivated plants of the species wheat (*Triticum aestivum* L.), soybean (*Glycine max* L.), wild oat (*Avena fatua* L.) and corn cockle (*Agrostemma githago* L.). *Journal of Plant Physiology* 153 (1998) 192-199.
- McClellan, K., Halden, R. U. Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water Research* 44 (2010) 658-668.
- McFarlane, J. C. *Anatomy and Physiology of Plant Conductive Systems*. In: Trapp, S., McFarlane, J.C. (Hrsg.): *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995, S. 13-35.
- Milieu Ltd., WrC, Ltd., Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA). *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report - Part 1: Overview*

- Report (Service contract No 070307/2008/517358/ETU/G4)*. Milieu Ltd., WrC, Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA) im Auftrag der Europäischen Kommission, Brüssel, 2010a (http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_i_report.pdf, Zugriff: 10.03.2011).
- Milieu Ltd., WrC, Ltd., Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA). *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report - Part 3: Project Interim Report (Service contract No 070307/2008/517358/ETU/G4)*. Milieu Ltd., WrC, Risk & Policy Analysts Ltd. (RPA) im Auftrag der Europäischen Kommission, Brüssel, 2010b (http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_iii_report.pdf, Zugriff: 10.03.2011).
- Müller, J., Böhmer, W., Litz, N. T. Occurrence of Polycyclic Musks in Sewage Sludge and their Behaviour in Soils and Plants Part 1: Behaviour of Polycyclic Musks in Sewage Sludge of Different Treatment Plants in Summer and Winter. *Journal of Soils and Sediments* 6 (2006) 231 - 235.
- Mutlib, A., Lam, W., Atherton, J., Chen, H., Galatsis, P., Stolle, W. Application of stable isotope labeled glutathione and rapid scanning mass spectrometers in detecting and characterizing reactive metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (2005) 3482-3492.
- Narayan, M. S., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochemistry* 40 (2005) 351-358.
- Nepovim, A., Podlipna, R., Soudek, P., Schröder, P., Vanek, T. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere* 57 (2004) 1007-1015.
- Otto, M. *Analytische Chemie*. 2. Aufl. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000.
- Pascal-Lorber, S., Rathahao, E., Cravedi, J.-P., Laurent, F. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere* 56 (2004) 275-284.
- Paterson, S., Mackay, D., Tam, D., Shiu, W. Y. Uptake of organic chemicals by plants: A review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 21 (1990) 297-331.
- Paya, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 1697-1714.
- Regueiro, J., Becerril, E., Garcia-jares, C., Llompart, M. Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4693-4702.
- Reiner, J. L., Berset, J. D., Kannan, K. Mass Flow of Polycyclic Musks in Two Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52 (2007) 451-457.
- RHmV *Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln (Rückstands-Höchstmengenverordnung - RHmV)*. Ausfertigungsdatum: 01.09.1994 (BGBl. I S. 2299); in der Fassung vom 21. Oktober 1999 (BGBl. I S. 2082; 2002 I S. 1004); zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 19. März 2010

- (BGBl. I S. 286). Bundesrepublik Deutschland, Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz, 2010.
- RL 86/278/EWG *Richtlinie 86/278/EWG des Rates vom 12. Juni 1986 über den Schutz der Umwelt und insbesondere der Böden bei der Verwendung von Klärschlamm in der Landwirtschaft (AbIEG Nr. L181 04.07.1986)*. Europäische Gemeinschaften, 1986.
- Rousu, T., Pelkonen, O., Tolonen, A. Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labeled trapping agents and ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (2009) 843-855.
- Rüdel, H., Böhmer, W., Müller, M., Flidner, A., Ricking, M., Teubner, D., Schröter-Kermani, C. Retrospective study of triclosan and methyl-triclosan residues in fish and suspended particulate matter: Results from the German Environmental Specimen Bank. *Chemosphere* 91 (2013) 1517-1524.
- Ryan, J. A., Bell, R. M., Davidson, J. M., O'Connor, G. A. Plant Uptake of Non-Ionic Organic Chemicals from Soils. *Chemosphere* 17 (1988) 2299-2323.
- Sandermann Jr., H., Scheel, D., Trenck, T. V. D. Use of Plant Cell Cultures to Study the Metabolism of Environmental Chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8 (1984) 167-182.
- Sandermann Jr., H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences* 17 (1992) 82-84.
- Sapkota, A., Heidler, J., Halden, R. U. Detection of triclocarban and two co-contaminating chlorocarbanilides in US aquatic environments using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environmental Research* 103 (2007) 21-29.
- Satoh, S. Organic substances in xylem sap delivered to above-ground organs by the roots. *Journal of Plant Research* 119 (2006) 179-187.
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). *Opinion on triclosan - Antimicrobial Resistance*. Europäische Kommission, Scientific Committee on Consumer Safety, Brüssel, 2010 (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_023.pdf, Zugriff: 20.01.2011).
- Schmidt, B., Thiede, B., Rivero, C. Metabolism of the Pesticide Metabolites 4-Nitrophenol and 3,4-Dichloroaniline in Carrot (*Daucus carota*) Cell Suspension Cultures. *Pesticide Science* 40 (1994) 231-238.
- Schmidt, B., Rivero, C., Thiede, B. 3,4-Dichloroaniline N-glucosyl- and N-malonyltransferase activities in cell cultures and plants of soybean and wheat. *Phytochemistry* 39 (1995) 81-84.
- Schmidt, B., Schuphan, I. Metabolism of the environmental estrogen bisphenol A by plant cell suspension cultures. *Chemosphere* 49 (2002) 51-59.
- Schmitt, R., Kaul, J., v.d. Trenck, T., Schaller, E., Sandermann Jr., H. β -D-Glucosyl and O-Malonyl- β -D-glucosyl Conjugates of Pentachlorophenol in Soybean and Wheat: Identification and Enzymatic Synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 24 (1985) 77-85.
- Schuphan, I., Haque, A., Ebing, W. Ecochemical assessment of environmental chemicals Part I: Standard screening procedure to evaluate chemicals in plant cell cultures. *Chemosphere* 13 (1984) 301-313.

- Schwarz, O. J., Jones, M. A. *Bioaccumulation of xenobiotic organic chemicals by terrestrial plants*. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Hrsg.): *Plants for Environmental Studies*. Boca Raton, CRC Press, 1997, S. 417-450.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environmental Science & Technology* 36 (2002) 4998-5004.
- Smeda, R. J., Weller, S. C. Plant Cell and Tissue Culture Techniques for Weed Science Research. *Weed Science* 39 (1991) 497-504.
- Stevens, J. L., Northcott, G. L., Stern, G. A., Tomy, G. T., Jones, K. C. PAHs, PCBs, PCNs, Organochlorine Pesticides, Synthetic Musks, and Polychlorinated n-Alkanes in U.K. Sewage Sludge: Survey Results and Implications. *Environmental Science & Technology* 37 (2003) 462-467.
- Sun, J., Liu, J., Yu, M., Wang, C., Sun, Y., Zhang, A., Wang, T., Lei, Z., Jiang, G.-B. In vivo metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in young whole pumpkin plant. *Environmental Science & Technology* 47 (2013) 3701-3707.
- Topp, E., Scheunert, I., Attar, A., Korte, F. Factors Affecting the Uptake of ¹⁴C-labeled Organic Chemicals by Plants from Soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11 (1986) 219-228.
- Trapp, S. *Model for Uptake of Xenobiotics into Plants*. In: Trapp, S., McFarlane, J.C. (Hrsg.): *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995, S. 107-151.
- Trapp, S., Matthies, M. Generic One-Compartment Model for Uptake of Organic Chemicals by Foliar Vegetation. *Environmental Science & Technology* 29 (1995) 2333-2338.
- Trapp, S. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Management Science* 56 (2000) 767-778.
- Trapp, S. Dynamic Root Uptake Model for Neutral Lipophilic Organics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (2002) 203-206.
- van der Krol, D., Schuphan, I., Thiede, B., Schmidt, B. Metabolism of [Ring-2,6-¹⁴C]Parathion in Plant Cell Suspension Cultures of Carrot (*Daucus carota*), Purple Foxglove (*Digitalis purpurea*), Soybean, Thorn Apple (*Datura stramonium*) and Wheat (*Triticum aestivum*). *Pesticide Science* 45 (1995) 143-152.
- van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., Hall, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science* 51 (2003) 472-495.
- VO 396/2005/EG *Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates (AblEG Nr. L70 16.03.2005)*. Europäische Gemeinschaften, 2005.
- Walters, E., McClellan, K., Halden, R. U. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water Research* 44 (2010) 6011-6020.
- Wiechmann, B., Dienemann, C., Kabbe, C., Brandt, S., Vogel, I., Roskosch, A. *Klärschlammensorgung in der Bundesrepublik Deutschland*. Umweltbundesamt,

- Dessau-Roßlau, 2012 (<http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/4280.pdf>, Zugriff: 05.10.2012).
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G. O., Jones, K. C. Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots. *Environmental Science & Technology* 39 (2005) 3695-3702.
- Wild, S. R., Jones, K. C. Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: Screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *Science of the Total Environment* 119 (1992) 85-119.
- Wu, C., Spongberg, A. L., Witter, J. D., Fang, M., Czajkowski, K. P. Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water. *Environmental Science & Technology* 44 (2010) 6157-6161.
- Xia, Y.-Q., Miller, J. D., Bakhtiar, R., Franklin, R. B., Liu, D. Q. Use of a quadrupole linear ion trap mass spectrometer in metabolite identification and bioanalysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (2003) 1137-1145.
- Yan, Z., Caldwell, G. W. Stable-Isotope Trapping and High-Throughput Screenings of Reactive Metabolites Using the Isotope MS Signature. *Analytical Chemistry* 76 (2004) 6835-6847.
- Yang, J.-J., Metcalfe, C. D. Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. *Science of the Total Environment* 363 (2006) 149 - 165.
- Zhai, G., Lehmler, H.-J., Schnoor, J. L. Sulfate Metabolites of 4-Monochlorobiphenyl in Whole Poplar Plants. *Environmental Science & Technology* 47 (2012) 557-562.
- Zhang, H., Zhang, D., Ray, K. A software filter to remove interference ions from drug metabolites in accurate mass liquid chromatography/mass spectrometric analyses. *Journal of Mass Spectrometry* 38 (2003) 1110-1112.
- Zhang, H., Zhang, D., Ray, K., Zhu, M. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 44 (2009) 999-1016.
- Zhu, M., Ma, L., Zhang, D., Ray, K., Zhao, W., Humphreys, W. G., Skiles, G., Sanders, M., Zhang, H. Detection and Characterization of Metabolites in Biological Matrices Using Mass Defect Filtering of Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry Data. *Drug Metabolism and Disposition* 34 (2006) 1722-1733.
- Zhu, M., Zhang, H., Humphreys, W. G. Drug Metabolite Profiling and Identification by High-resolution Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 286 (2011) 25419-25425.
- Zhu, P., Tong, W., Alton, K., Chowdhury, S. An Accurate-Mass-Based Spectral-Averaging Isotope-Pattern-Filtering Algorithm for Extraction of Drug Metabolites Possessing a Distinct Isotope Pattern from LC-MS Data. *Analytical Chemistry* 81 (2009) 5910-5917.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Strukturformel von Triclosan.....	4
Abbildung 2. Strukturformel von Methyltriclosan.....	5
Abbildung 3. Strukturformel von Triclocarban.....	6
Abbildung 4. Strukturformeln von Galaxolid® und Tonalid®.....	7
Abbildung 5. Schematische Darstellung von prinzipiellen Pfaden der Aufnahme und Verteilung von Kontaminanten in Pflanzen (nach (Collins et al., 2006; Schwarz und Jones, 1997))....	10
Abbildung 6. Schematische Darstellung eines Wurzelquerschnittes und mögliche Transportwege von Wasser und gelösten Stoffen von der Wurzeloberfläche in das Leitgewebe (nach (McFarlane, 1995; Satoh, 2006; Wild et al., 2005)).....	11
Abbildung 7. Abhängigkeit der Transpirationsstromkonzentrationsfaktoren (TSCF) von Kontaminanten von deren Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (als log K_{OW}) nach Modellen von Briggs und Koautoren (1982) und Dettenmaier und Koautoren (2009).....	14
Abbildung 8. Schematische Darstellung des 3-Phasen-Konzeptes zum pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus (nach (Coleman et al., 1997)).	16
Abbildung 9. Karottenzellkulturen als Kalluskultur auf Festmedium (links) in einer Petrischale und als Suspensionskultur in Flüssigmedium in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben, seitlich (mitte) und von unten (rechts) fotografiert.	21
Abbildung 10. Meerrettich-Haarwurzelkultur in Flüssigmedium im 500-ml-Erlenmeyerkolben (links) und nach dem Absaugen des Nährmediums in einer Perischale (rechts).	22
Abbildung 11. Isotopenmuster in Massenspektren von Ionen chlorierter und bromierter Verbindungen (nach (Otto, 2000)).	29
Abbildung 12. Relative Signalintensitäten von 4-Chlorphenol (4-CP), 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP), Triclosan (TCS) und Methyltriclosan (MeTCS) bei der GC-MS Analyse nach der HS-SPME mit Polyacrylat- (PA), Polydimethylsiloxan- (PDMS), Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen- (PDMS/DVB), Carbowax/Divinylbenzen- (CW/DVB) und Carboxen/Polydimethylsiloxan-Fasern (CAR/PDMS).....	56
Abbildung 13. Wirkungsflächen für die Signalintensitäten von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan gegen die Faktoren Natriumchloridgehalt in % (w/w) und Extraktionstemperatur in °C bei pH 5,5.	57
Abbildung 14. Pseudo-Produktionenspektren und Strukturvorschlag des $[M+NH_4]^+$ -Ion des Triclosanmetaboliten M6 nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und Fragmentierung bei hoher Kollisionsenergie (CE = 15 - 35 eV, MS^E).	60
Abbildung 15. Strukturvorschläge, berechnete m/z und Summenformeln von zwei Malonylhexospyranosyl-Fragmentationen, die durch kollisionsinduzierte Fragmentierung der $[M+NH_4]^+$ -Ionen der Metaboliten M6 und M4 gebildet werden.....	60
Abbildung 16. Pseudo-Produktionenspektren und Strukturvorschlag des $[M+NH_4]^+$ -Ion des Triclosanmetaboliten M4 nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und Fragmentierung bei hoher Kollisionsenergie (CE = 15 - 35 eV, MS^E).	61
Abbildung 17. Pseudo-Produktionenspektren und Strukturvorschlag des $[M+NH_4]^+$ -Ion des Triclosanmetaboliten M2 nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und Fragmentierung bei hoher Kollisionsenergie (CE = 15 - 35 eV, MS^E).	62
Abbildung 18. Sedimentiertes Zellvolumen der Karottenzellsuspensionskulturen über eine Inkubationszeit von 8 d (verändert nach (Klapproth, 2010)).	XXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Charakteristische Neutralverluste und Produktionen der [M-H] ⁻ - und [M+H] ⁺ -Ionen ausgewählter pflanzlicher Phase-II-Metaboliten (^a (Levsen et al., 2005), ^b (Mutlib et al., 2005), ^c (Laurent et al., 2007), ^d (Day und Saunders, 2004), ^e (Rousu et al., 2009)). Ein charakteristisches Produktion des [M+H] ⁺ -Ions eines Glutathionkonjugates kann bei m/z 274 detektiert werden (Levsen et al., 2005).	28
Tabelle 2. Massen- und Massendefektverschiebungen für typische pflanzliche Phase-I- und Phase-II-Metaboliten (nach (Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2006)).	31
Tabelle 3. Getestete Extraktionstemperaturen in °C, Natriumchloridgehalte in % und pH-Werte	56
Tabelle 4. Detektierte m/z und Summenformeln der Ammonium-Adduktionen ([M+NH ₄] ⁺ -Ionen) und Fragmentionen der in den Karottenzellkulturen nachgewiesenen Triclosanmetaboliten M1 - M7.	59
Tabelle 5. Wiederfindungsraten und Standardabweichung (n=3) als Maß für die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung für die Bestimmung von Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban den Karottenzellsuspensionskulturen.	XXVI
Tabelle 6. Instrumentelle Parameter der HS-SPME-GC-MS Methode für die Bestimmung von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan in Nährmedien und Zellextrakten der Karottenzellsuspensions- und Meerrettich-Haarwurzelkulturen.	XXVII
Tabelle 7. Retentionszeiten sowie m/z und relative Intensitäten der im SIM detektierten Ionen für die HS-SPME-GC-MS Bestimmung von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan.	XXVII
Tabelle 8. Analytische Kenngrößen der HS-SPME-GC-MS-Methode: Anzahl der Messpunkte der Kalibriergeraden (Pkt.), Kalibrierbereich und -funktion, relative Standardabweichung (RSD) der Peakfläche bei einer Konzentration (c), Bestimmtheitsmaß sowie die aus der Kalibrierfunktion abgeleiteten Nachweis- (NWG) und unteren Bestimmungsgrenzen (BG).	XXVIII
Tabelle 9. Analytische Kenngrößen der LC-MS/MS-Methode (MRM) für die Bestimmung von Triclocarban: Anzahl der Messpunkte der Kalibriergeraden (Pkt.), Kalibrierbereich und -funktion, Bestimmtheitsmaß, relative Standardabweichung (RSD) der Peakfläche bei einer Konzentration (c), sowie die aus der Kalibrierfunktion abgeleiteten Nachweis- (NWG) und unteren Bestimmungsgrenze (BG).	XXVIII
Tabelle 10. Retentionszeiten (RT), Übergänge und Kollisionsenergien (CE) für die LC-MS/MS Bestimmung der Triclosanmetaboliten in den Zellextrakten und Nährmedien der Karottenzellsuspensionskulturen und Extrakten intakter Pflanzen.	XXX
Tabelle 11. Bestandteile des Murashige-Skoog-Basissalzmischung und ihrer Konzentrationen im Narayan-Nährmedium der Karottenzellsuspensionskulturen.	XXXII
Tabelle 12. Konzentrationen von Phytohormonen, Vitaminen und weiteren Organika im Narayan-Nährmedium der Karottenzellsuspensionskulturen.	XXXII

Anhang

A.1 Etablierung der Karottenzellsuspensionskultur

Die Etablierung der heterotrophen Suspensionskultur sowie die Aufnahme der Wachstumsparameter wurden von Erik Klapproth am Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie e.V. (SIAB) in Leipzig durchgeführt und sind in seiner Bachelorarbeit detailliert beschrieben (Klapproth, 2010).

Die verwendete Karottenkultur *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang. cv. Maxima wurde in Form einer Kalluskultur auf Festmedium vom Leibnitz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig bezogen. Die Kalli wurden in kleinere Aggregate geteilt und in frisch hergestelltes Nährmedium nach Narayan (siehe Abschnitt A.4.2) überführt (Narayan et al., 2005). Die Kulturen wurden im Dunkeln in einem Schüttelinkubator bei 26 °C und einer Drehzahl von 130 min⁻¹ kultiviert. In Zyklen von 6 bis 7 Tagen wurde das Zellmaterial in neues Nährmedium umgesetzt, sodass sich nach mehreren Subkultivierungszyklen eine homogene und fein vereinzelte Suspensionskultur mit gelb- bis orangefarbenen Einzelzellen und Zellaggregaten bis zu einer Größe von wenigen Millimetern etablierte. Im Folgenden wurden 3 bis 5 g Zellmaterial in 100 ml Nährmedium kultiviert und die Zellmasse bei Bedarf geteilt.

Zur Bestimmung der Wachstumscharakteristika der Suspensionskultur wurde in sieben 100-ml-Erlenmeyerkolben je zwei Gramm (FM) Zellmaterial in 20 ml Nährmedium in eingewogen und das sedimentierte Zellvolumen nach 0, 1, 2, 5, 6, 7 und 8 Tagen mit Hilfe graduierter Reagenzgläser bestimmt. Die von Erik Klapproth bestimmte Wachstumskurve ist in Abbildung 18 dargestellt.

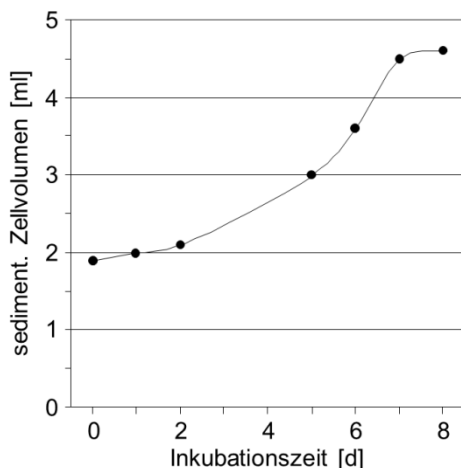


Abbildung 18. Sedimentiertes Zellvolumen der Karottenzellsuspensionskulturen über eine Inkubationszeit von 8 d (verändert nach (Klapproth, 2010)).

Das Nährmedium und alle bei der Arbeit mit den Karottenzellkulturen verwendeten Glasgeräte, Stopfen und Siebe wurden vor ihrer Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Alle Arbeiten mit offenen Kulturen, wie Subkultivierung oder Zugabe der Kontaminanten, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

A.2 Exposition von Karottenzellsuspensionskulturen gegen Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban

Das Zellmaterial wurde am Ende eines Subkultivierungszyklus mit einem Sieb (50 µm Maschenweite) vom alten Nährmedium getrennt und umgehend in frisches Nährmedium überführt. Hierfür wurden in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit einer sterilen Vollpipette 20 ml Nährmedium vorgelegt und 2 g Zellmaterial eingewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µg Triclosan, Methyltriclosan oder Triclocarban in methanolischer Lösung so, dass der Methanolanteil im Nährmedium unter 0,1 % lag. Die Kolbenöffnungen wurden daraufhin abgeflammt, mit Zellstoffstopfen verschlossen und im Dunkeln bei 26 °C und 130 min⁻¹ für 2, 4, 8, 24, 48 und 120 Stunden inkubiert (je drei bis vier Replikate). Parallel dazu wurden unbehandelte Kontrollkulturen und im Fall von Triclosan abiotische Kontrollen (je drei Replikate) 120 Stunden inkubiert.

A.3 Analytische Methoden für die Quantifizierung bekannter Verbindungen und Aufklärung von Metaboliten in Karottenzellsuspensionskulturen

A.3.1 Extraktion der Karottenzellsuspensionskulturen

Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde das Zellmaterial über Zellulosefilter (Weißband (589/2), 150 mm, Whatman, Dassel) abgesaugt, die Erlenmeyerkolben und das Zellmaterial zweimal mit je 10 ml destilliertem Wasser gewaschen und die Spüllösung mit dem Nährmedium vereinigt. Das Zellmaterial der Karottenzellsuspensionskultur wurde in tarierten Aluminiumfoliebriefchen überführt, ausgewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C bis zur Extraktion gelagert. Nach dem Auswiegen des Nährmediums, wurde dieses ebenfalls bei -20 °C eingefroren und gelagert. Zur Bestimmung der an den Glasoberflächen der Erlenmeyerkolben adsorbierten Analyten wurden diese 15 min mit 10 ml Aceton (bzw. Acetonitril bei Triclocarban) gespült und die Lösungen bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Das gefrorene Zellmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in Zentrifugengefäße aus Glas überführt. Nach Zugabe eines Magnetrührers wurde das Zellmaterial bei Raumtemperatur dreimal 30 min mit 3 ml Extraktionspuffer durch Rühren extrahiert, die Probe 5 min bei 4500 min^{-1} zentrifugiert, die vereinigten Überstände in einem Maßkolben vereinigt und auf 10 ml aufgefüllt. Als Extraktionspuffer wurde für Methyltriclosan und Triclocarban bidestilliertes Wasser/Acetonitril 1/1 (v/v) mit 5 mM Ammoniumacetat eingesetzt. Bei Triclosan wurde dem Puffer zusätzlich 0,5 % Eisessig zugesetzt. Zur Bestimmung von Triclosan und Methyltriclosan wurden Aliquote der Zellextrakte, Nährmedien und Acetonextrakte mittels HS-SPME-GC-MS analysiert (Abschnitt A.3.2). Die Bestimmung von Triclocarban erfolgte nach dem Filtrieren durch $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ PTFE-Spritzenvorsatzfilter (25 mm, Sartorius AG, Göttingen) mittels HPLC-MS/MS (Abschnitt A.3.3). Die Wiederfindungsraten von Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5. Wiederfindungsraten und Standardabweichung (n=3) als Maß für die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung für die Bestimmung von Triclosan, Methyltriclosan und Triclocarban den Karottenzellsuspensionskulturen.

	Nährmedium [% ± SD]	Zellmaterial [% ± SD]
Triclosan	64 ± 3	80 ± 6
Methyltriclosan	48 ± 6	77 ± 7
Triclocarban	44 ± 5	103 ± 7

A.3.2 Bestimmung von Triclosan, Methyltriclosan, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol mittels HS-SPME-GC-MS

Die Quantifizierung von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan in den Zellextrakten, Nährmedien und acetonischen Extrakten der Kultivierungsgefäße erfolgte mittels HS-SPME-GC-MS. Die Analysen wurden mit einem Agilent 6890 Gaschromatographen mit Split/Splitless-Injektorsystem durchgeführt, der mit einer HP-5ms Ultra Inert Kapillare ($30 \text{ m} \times 250 \text{ }\mu\text{m i. d.} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ Filmdicke) einem Agilent 5973 massenselektiven Detektor (alle Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) und einem MPS2 Probengeber mit Agitator/Stirrer (Gerstel GmbH & Co.KG, Mülheim a. d. Ruhr) ausgestattet war. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Festphasenmikroextraktion erfolgte an einer Faser mit Polyacrylatbeschichtung von $85 \text{ }\mu\text{m}$ Filmdicke (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Zur Analyse wurden in 20-ml-Headspacevials 10 ml einer mit HCl auf pH 5,5 eingestellten 20 %igen Natriumchloridlösung (w/w) und ein teflonbeschichteter Magnetrührer vorgelegt, Aliquote von 50 bis 200 μ l der Zellextrakte, Nähmedien oder acetonischen Extrakte der Kultivierungsgefäße zugegeben und mittels HS-SPME-GC-MS analysiert. Die Extraktionsparameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6. Instrumentelle Parameter der HS-SPME-GC-MS Methode für die Bestimmung von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan in Nährmedien und Zellextrakten der Karottenzellsuspensions- und Meerrettich-Haarwurzelkulturen.

Extraktion		Desorption	
Extraktionstemperatur	78 °C	Injektortemperatur	290 °C
Extraktionszeit	30 min	Desorptionszeit	2 min
Vial Einstichtiefe	23 mm	Injektor Einstichtiefe	46 mm
Rührgeschwindigkeit	600 min ⁻¹		

Bei einem konstanten Säulenvordruck von 74,5 kPa startete das Temperaturprogramm des Säulenofens bei 45 °C (2 min isotherm) und stieg um 20 K min⁻¹ auf 290 °C (1,5 min isotherm). Die Temperatur der Transferline betrug konstant 280 °C. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nach Elektronenstoßionisation bei 70 eV im Selected Ion Monitoring (SIM) Modus, die entsprechenden Retentionszeiten und *m/z* sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Retentionszeiten sowie *m/z* und relative Intensitäten der im SIM detektierten Ionen für die HS-SPME-GC-MS Bestimmung von 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, Triclosan und Methyltriclosan.

	Retentionszeit [min]	Quantifier-Ion (<i>m/z</i>) (rel. Intensität [%])	Qualifier-Ionen (<i>m/z</i>) (rel. Intensität [%])
4-Chlorphenol	7,42	128 (100)	130 (32), 65 (50)
2,4-Dichlorphenol	7,21	162 (100)	164 (65), 98 (26)
Triclosan	13,38	288 (100)	290 (97), 218 (90)
Methyltriclosan	13,45	302 (100)	304 (97), 252 (81)

Für die Kalibrierung der HS-SPME-GC-MS Methode wurden pro Kalibrierkonzentration 3 Replikate vermessen. Dafür wurden 10 ml 20 %ige NaCl-Lösung (pH 5,5) mit der jeweiligen Menge der Standardgemisches so dotiert, dass der Anteil organischen Lösemittels nie über 1 % des Gesamtvolumens lag. Die kalibrierten Bereiche, Kalibrierfunktionen und daraus abgeleiteten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Analytische Kenngrößen der HS-SPME-GC-MS-Methode: Anzahl der Messpunkte der Kalibriergeraden (Pkt.), Kalibrierbereich und -funktion, relative Standardabweichung (RSD) der Peakfläche bei einer Konzentration (c), Bestimmtheitsmaß sowie die aus der Kalibrierfunktion abgeleiteten Nachweis- (NWG) und unteren Bestimmungsgrenzen (BG).

	Pkt.	Kalibrierbereich [ng]	Kalibrierfunktion	r ²	RSD [%] (n = 3; bei c [ng ml ⁻¹])	NWG [ng]	BG [ng]
4-Chlorophenol	5	5 - 500	y = 9846x - 11608	1,0000	10 (15)	5,0	10,7
2,4-Dichlorophenol	5	1 - 100	y = 42472x + 20714	0,9998	22 (10)	1,4	5,5
Triclosan	5	1 - 100	y = 56945x - 25284	0,9999	6 (3)	1,0	2,7
Methyltriclosan	5	0,1 - 10	y = 611652x - 39346	0,9997	8 (1)	0,2	0,6

A.3.3 Bestimmung von Triclocarban mittels LC-MS/MS

Die Bestimmung Triclocarbans in den Zellextrakten, Nährmedien und Acetonitrilextrakten der Karottenzellsuspensionskulturen erfolgte flüssigchromatographisch-massenspektrometrisch mit einer Agilent 1260 Infinity HPLC, die mit einer Agilent Eclipse XDB-C8 Säule (150 mm × 4.6 mm i. d., 5 µm Partikelgröße; beide Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) und einem AB Sciex QTRAP[®] 5500 Massenspektrometer (AB Sciex, Foster City, CA, USA) ausgestattet war. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl, die Eluenten waren Wasser/Acetonitril 95/5 (v/v) (Eluent A) und Acetonitril/Wasser 95/5 (v/v) (Eluent B) mit 5 mM Ammoniumacetat. Bei einem konstanten Fluss von 0,2 ml min⁻¹ und einer Säulentemperatur von 20 °C startete der Laufmittelgradient bei 30 % B, wurde 7 min isokratisch gehalten, stieg in 3 min auf 90 % B wurde 25 min isokratisch gehalten, in 3 min auf 30 % B reduziert, was 5 min isokratisch gehalten wurde. Die Ionisation erfolgte durch Elektrospray-Ionisation im Negativ-Modus bei einer Sprayspannung von -3500 V, einer Temperatur von 600 °C und einem *Declustering Potential* von -40 V. Die Bestimmung des Triclocarban erfolgte im MRM-Modus, wobei bei einer Kollisionsenergie von -17 V die Übergänge *m/z* 313 auf 160 zur Quantifizierung und 315 auf 162 verwendet wurden. Die analytischen Kenngrößen der Methode sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Analytische Kenngrößen der LC-MS/MS-Methode (MRM) für die Bestimmung von Triclocarban: Anzahl der Messpunkte der Kalibriergeraden (Pkt.), Kalibrierbereich und -funktion, Bestimmtheitsmaß, relative Standardabweichung (RSD) der Peakfläche bei einer Konzentration (c), sowie die aus der Kalibrierfunktion abgeleiteten Nachweis- (NWG) und unteren Bestimmungsgrenze (BG).

	Pkt.	Kalibrierbereich [ng ml ⁻¹]	Kalibrierfunktion	r ²	RSD [%] (n = 3, bei c = 0,35 ng ml ⁻¹)	NWG [ng]	BG [ng]
Triclocarban	6	0,035 – 10	y = 387370x + 10122	0,9999	1	0,05	0,20

A.3.4 Nachweis und Strukturaufklärung von Triclosanmetaboliten

Die Untersuchungen zur Bestimmung und Aufklärung Triclosanmetaboliten in den Extrakten der Karottenzellsuspensionskulturen mittels LC-MS(/MS) wurden mit der in Abschnitt A.3.3 beschriebenen Instrumentierung und stationären Phase durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 5 μl , die Temperatur des Säulenofens 20 $^{\circ}\text{C}$ und die Fließgeschwindigkeit 0,2 ml min^{-1} . Die Eluenten setzten sich aus 5 mM Ammoniumacetat und 0,5 % Essigsäure in Wasser/Acetonitril 95/5 (v/v) (Eluent A) bzw. Acetonitril/Wasser 95/5 (v/v) (Eluent B) zusammen. Der Laufmittelgradient startete zwischen 0 und 9 min isokratisch mit 30 % B, stieg bis 12 min auf 50 % B, bis 25 min weiter auf 90 % B, blieb bis 40 min konstant, fiel bis 43 min auf 30 % B um bis 48 min konstant zu bleiben. Die Elektrospray-Ionisation im Negativ-Modus erfolgte bei einer Sprayspannung von -4500 V, einer Temperatur von 350 $^{\circ}\text{C}$ und einem *Declustering Potential* von -20 V. Unter diesen Bedingungen wurden zunächst Totalionenchromatogramme aufgezeichnet um im Folgenden durch Produktionen-Analysen Information über die Struktur der Metaboliten zu gewinnen.

A.3.5 MRM-Methode zur Bestimmung der Triclosanmetaboliten

Nachdem die in den Extrakten der Karottenzellen nachgewiesenen Triclosanmetaboliten mit Produktionen-Analysen untersucht wurden, wurden für jeden Metaboliten zwei Übergänge ausgewählt und eine MRM-Methode für ihren sensitiven Nachweis in Zellextrakten, Nährmedium und Pflanzenmaterial etabliert. Die Analysen wurden mit der im Abschnitt A.3.3 beschriebenen Instrumentierung und stationären Phase sowie der in Abschnitt A.3.4 beschriebenen Eluentenzusammensetzung durchgeführt. Die für die Detektion verwendeten Übergänge und Kollisionsenergien (CE) sind in Tabelle 10 aufgeführt. Das *Declustering Potential* (DP) betrug stets -100 V, das *Entrance Potential* (EP) -10 V und das *Collision Cell Exit Potential* (CXP) -13 V.

Tabelle 10. Retentionszeiten (RT), Übergänge und Kollisionsenergien (CE) für die LC-MS/MS Bestimmung der Triclosanmetaboliten in den Zellextrakten und Nähmedien der Karottenzellsuspensionskulturen und Extrakten intakter Pflanzen.

Metabolit	RT [min]	Vorläufer (m/z)	1. Übergang (m/z)	2. Übergang (m/z)	CE [V]
M1	22.1	655	287	595	-15
M2	22.7	667	287	623	-15
M3	23.1	641	287	581	-20
M4	23.2	697	287	653	-15
M5	23.3	783	287	695	-17
M6	25.3	535	287	491	-5
M7	26.1	509	287	449	-12
M8	28.8	367	287		-28
		369		289	

A.3.6 Bestimmung der Triclosanmetaboliten mittels UPLC-QToF-MS

Weitere Untersuchungen zur Metabolitidentifizierung und Strukturaufklärung wurden mit einem Waters Acquity UPLC System mit ACQUITY UPLC® BEH C18 Säule (100 × 2,1 mm, 1,7 µm Partikelgröße) und einem Waters Synapt G2-S Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt (Waters GmbH, Eschborn). Das Injektionsvolumen betrug 10 µl, die Eluenten A und B waren Wasser und Methanol mit 2 mM Ammoniumformiat und 0,1 % Ameisensäure bei einem konstanten Fluss von 0,6 ml min⁻¹ und einer Säulentemperatur von 60 °C. Der Gehalt an Eluent B während der chromatographischen Trennung startete bei 5 % und stieg innerhalb von acht Minuten auf 95 %, blieb eine Minute konstant und fiel daraufhin bis Minute zehn auf 5 %. Die Elektrospray-Ionisation wurde bei einer Kapillarspannung von -2,5 kV im Negativ-Modus bzw. 0,8 kV im Positiv-Modus, bei einer Ionenquellentemperatur von 120 °C und einer *Desolvation* Temperatur von 500 °C durchgeführt. Die *Sampling Cone*-Spannung betrug 35 V, der *Source Offset* 50 V. Stickstoff wurde als *Cone Gas* und Argon als Kollisionsgas verwendet, der *Desolvation Gas*-Fluss betrug 800 L h⁻¹. Die *Centroid*-Massenspektren wurde im *High Resolution* Modus (Auflösung 30 000) in einem Bereich von *m/z* 50 bis *m/z* 1200 aufgezeichnet. Die Genauigkeit der bestimmten *m/z* wurde durch die parallele Infusion von Leucin-Enkephalin im Lockspray und die Anwendung einer Zwei-Punkt-Kalibrierung sichergestellt. Durch die Anwendung der MS^E Technik wurden dabei für jede Probe gleichzeitig zwei Datensätze aufgezeichnet, einer bei geringer (4 eV) und ein weiterer bei hoher Kollisionsenergie (ansteigend 15 - 35 eV).

A.4 Verwendete Chemikalien

A.4.1 Analyten, Stammlösungen und Lösemittel

Als Referenzverbindungen wurden bei den Untersuchungen 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol (beide „Analytical Standard“, Supelco, Bellefonte, PA, USA), Triclosan ($\geq 97,0\%$), Methyltriclosan (99,7 %, beide Fluka, Buchs, Schweiz) und Triclocarban (99,5 %, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg) verwendet. Von den Verbindungen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von ca. 1 mg ml^{-1} hergestellt, die zu Mixstandards kombiniert wurden. Standards für die GC-MS Analyse wurden in n-Hexan/Aceton 65/35 (v/v), für die LC-MS Analyse in Acetonitril und für das Dotieren der Zell- und Haarwurzelkulturen in Methanol hergestellt. Alle Standardlösungen wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert.

Für die Herstellung der Standardlösungen, die Probenvorbereitung der Zellkulturen und als Eluenten für die LC-MS-Analysen wurden folgende Lösemittel verwendet: Acetonitril (Hypergrade), n-Hexan, Aceton, Ethylacetat und Methanol (alle Suprasolv), Essigsäure (100 %, p.a.) und Salzsäure (30 %, Suprapur, alle Merck KGaA, Darmstadt). Das Ammoniumacetat (HPLC-Grade, $\geq 99,0\%$) wurde von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

Für die Analysen der Karottenzellextrakte am UPLC-QToF-MS System wurde Methanol und Ammoniumformiat (beide ULC/MS Grade) der Firma Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) eingesetzt. Das verwendete destillierte Wasser wurde mit einer Metalldestille hergestellt.

A.4.2 Nährmedium der Karottenzellsuspensionskulturen

Das für die Karottenzellsuspensionskulturen verwendete Nährmedium nach Narayan (Narayan et al., 2005) setzte sich aus der Murashige-Skoog-Basisatzmischung (Tabelle 11), der Murashige-Skoog-Vitaminmischung (beide DUCHEFA Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande), Indol-3-essigsäure (IAA), 6-Furfurylaminopurin (Kinetin) und Saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Tabelle 12) in deionisiertem Wasser zusammen und wurde mit Salzsäure auf pH 5,5 eingestellt.

Tabelle 11. Bestandteile des Murashige-Skoog-Basissalzmischung und ihrer Konzentrationen im Narayan-Nährmedium der Karottenzellsuspensionskulturen.

Makronährelemente	c [mg l⁻¹]	Mikronährelemente	c [mg l⁻¹]
Kaliumnitrat KNO ₃	1900	Dinatriumethylendiamintetraacetat Na ₂ H ₂ - EDTA	37,3
Ammoniumnitrat NH ₄ NO ₃	1650	Eisensulfat Heptahydrat FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8
Calciumchlorid Dihydrat CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440	Mangansulfat Tetrahydrat MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3
Magnesiumsulfat Heptahydrat MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	Zinksulfat Heptahydrat ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,6
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	170	Borsäure H ₃ BO ₃	6,2
		Kaliumiodid KI	0,83
		Natriummolybdat Dihydrat Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
		Kupfersulfat Pentahydrat CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
		Cobaltchlorid Hexahydrat CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025

Tabelle 12. Konzentrationen von Phytohormonen, Vitaminen und weiteren Organika im Narayan-Nährmedium der Karottenzellsuspensionskulturen.

Vitamine und Organika	c [mg l⁻¹]	Phytohormone	c [mg l⁻¹]
myo-Inosit	100	Indol-3-essigsäure (IAA)	2
Nicotinsäure (Niacin)	0,5	6-Furfurylaminopurin (Kinetin)	0,2
Pyridoxinhydrochlorid	0,5		
Thiaminhydrochlorid	0,1		
Glycin	2	Saccharose	20.000

Publikationen und Tagungsbeiträge

Artikel in Peer-Review-Fachzeitschriften

- Macherius A., Seiwert B., Schröder P., Huber C., Lorenz W., Reemtsma T. Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The in Vitro Metabolism of Triclosan in Horseradish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (2014) 1001-1009.
- Macherius A., Lapen D. R., Reemtsma T., Römbke J., Topp E., Coors A. Triclocarban, triclosan and its transformation product methyl triclosan in native earthworm species four years after a commercial-scale biosolids application. *Science of The Total Environment* 472 (2014) 472: 235-238.
- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Moeder M., Ondruschka J., Reemtsma T. Metabolization of Bacteriostatic Personal Care Products in Edible Plants and its Consequences for Plant Uptake. *Environmental Science & Technology* 46 (2012) 10797-10804.
- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Reemtsma T., Winkler U., Moeder M. Uptake of Galaxolide, Tonalide and Triclosan by Carrot, Barley and Meadow Fescue Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012) 7785-7791.
- Macherius A., Kusch P., Haertig C., Moeder M., Shtemenko N. I., Heredia Bayona A., Heredia Guerrero J. A., Gey M. Composition changes in the cuticular surface lipids of the helophytes *Phragmites australis* and *Juncus effuses* as result of pollutant exposure. *Environmental Science and Pollution Research* 18 (2011) 727-733.

Vorträge

- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Möder M., Reemtsma T. Transformation von Kontaminanten in Nahrungspflanzen: Das Beispiel Triclosan in Karotte. 23. Regionalverbandstagung Lebensmittelchemische Gesellschaft (RV Süd-Ost), 14.-15. März 2013, Dresden
- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Möder M., Reemtsma T. Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von Xenobiotika in Karotten und Karottenzellkulturen. Gemeinsame Jahrestagung der SETAC GLB und der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh, 10. - 13. September 2012, Leipzig
- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Möder M., Seiwert B., Reemtsma T. Transformation von Triclosan in Pflanzen: Identifizierung von Metaboliten mittels LC-MS. Kolloquium LC-MS in der Umweltanalytik, 11. - 13. Juni 2012, Leipzig
- Macherius A. Aufnahme, Verteilung und Transformation von Xenobiotika in Karotten und Karottenzellkulturen. Doktorandenseminar des AK Separation Science, 08. - 10. Januar 2012, Hohenroda
- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Reemtsma T., Möder M. Uptake and Transformation of Xenobiotics in Carrot Plants and Carrot Cell Cultures. EmCon2011 Conference, 22. - 26. August 2011, Kopenhagen
- Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Reemtsma T., Möder M. Unknown Ingredients - About the Uptake of Xenobiotics into the Food Chain. HIGRADE Conference 2011, 13. - 14. April 2011, Leipzig

Macherius A., Lorenz W., Möder M., Eggen T. Aufnahme und Transformation von Xenobiotika in landwirtschaftlich genutzten Pflanzen: Ein möglicher Eintragspfad in die Nahrungskette. 21. Regionalverbandstagung Lebensmittelchemische Gesellschaft (RV Süd-Ost), 24. - 25. März 2011, Halle (Saale)

Macherius A., Möder M., Eggen T. From Plants to Humans – Plant Accumulation and Transfer of Organic Foreign Compounds in Primary Food Chain. Annual CITE Conference 2010, 23. März 2010, Leipzig

Posterbeiträge

Macherius A., Eggen T., Lorenz W., Reemtsma T., Möder M. Uptake and Transformation of Xenobiotics in Carrot plants and Carrot Cell Cultures. EmCon2011 Conference, 22. - 26. August 2011, Kopenhagen

Macherius A., Shtemenko N. I., Heredia Bayona A., Gey M., Kuschk P., Härtig C., Möder M. Changes in the Composition of Cuticular Surface Lipids of the Helophytes *Phragmites australis* and *Juncus effusus* as a Result of Pollutant Exposure. Annual CITE Conference 2010. 23. März 2010, Leipzig

Macherius A., Gey M., Härtig C., Kuschk P., Shtemenko N. I., Schrader S., Möder M. GC-MS Characterization of the Composition of Cuticular Waxes of Wetland Plants After Exposure to VOC Contaminated Water. ISC 2008 - 27th International Symposium on Chromatography. 21. - 25. September 2008, Münster

Angaben zur Person

Persönliche Daten

Name: André Macherius
Geburtsdaten: 08.03.1986 in Marienberg

Studium und beruflicher Werdegang

01/2009 – 01/2014

Wissenschaftlicher Mitarbeiter, wissenschaftliche Hilfskraft und Gastwissenschaftler im Department Analytik am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH- UFZ

Anfertigung einer Dissertation:

„Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von anthropogenen klärschlammbürtigen organischen Verbindungen in landwirtschaftlich genutzten Pflanzen“

Fachgebiet der angestrebten Promotion: Chemie

09/2004 – 12/2008

Chemiestudium an der Hochschule Zittau/Görlitz (FH)
Vertiefung im Hauptstudium: Bioorganische Chemie

Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ:

„Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen (GC/MS) zur Veränderung kutikularer Wachse von Feuchtbiotop-Pflanzen nach Schadstoffexposition“

Abschluss: Diplom-Chemiker (FH)

Schulische Ausbildung

08/2002 - 07/2004

Fachoberschule am Beruflichen Schulzentrum in Zschopau
Abschluss: Fachhochschulreife

08/1996 – 07/2002

Realschule an der „Mittelschule am Mühlberg“ in Marienberg
Abschluss: Realschulabschluss

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt. Ich habe bisher keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen.

André Macherius