

ISSN 1860-0387

DISSERTATION 10|2017

DISSERTATION 10|2017  
Helmholtz Zentrum für Umweltforschung – UFZ  
Department Analytik

Christina Riemenschneider

## Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft – Untersuchungen zum Verbleib von organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen mittels LC-MS

Helmholtz Zentrum für  
Umweltforschung – UFZ  
Permoserstraße 15  
04318 Leipzig  
[www.ufz.de](http://www.ufz.de)

NICHT ZUM VERKAUF BESTIMMT.

Christina Riemenschneider | Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der ...

10|2017

# **Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft – Untersuchungen zum Verbleib von organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen mittels LC-MS**

Von der Fakultät für Chemie und Mineralogie  
der Universität Leipzig  
genehmigte

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Christina Riemenschneider, M. Sc.

geboren am 13. Juni 1988 in Fritzlar

Angenommen aufgrund der Gutachten von: Prof. Dr. Thorsten Reemtsma

Prof. Dr. Gerd Hamscher

Tag der Verleihung: 8. September 2017



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2013 bis Mai 2017  
am  
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ  
Department Analytik  
Permoserstraße 15  
04318 Leipzig  
unter der Leitung von Prof. Dr. Thorsten Reemtsma angefertigt.



## Vorwort

Diese kumulative Dissertation basiert auf zwei bereits veröffentlichten Fachartikeln in Peer-Review-Zeitschriften und einem Manuskript, welches zur Publikation in einer Fachzeitschrift eingereicht wurde.

### Publikation 1:

Riemenschneider, C., Seiwert, B., Goldstein, M., Al-Raggad, M., Salameh, E., Chefetz, B., Reemtsma, T. An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater, *Analytical Methods*, **2017**, 9, 1273-1281. © 2017 Royal Society of Chemistry.

### Publikation 2:

Riemenschneider, C., Al-Raggad, M., Moeder, M., Seiwert, B., Salameh, E., Reemtsma, T. Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2016**, 64, 5784-5792. © 2016 American Chemical Society.

### Manuskript:

Riemenschneider, C., Seiwert, B., Moeder, M., Schwarz, D., Reemtsma, T. Extensive metabolization of neutral pharmaceuticals following uptake into agricultural plants – carbamazepine in tomato, *Environmental Science and Technology*, **2017**, *accepted*.

Die Royal Society of Chemistry und die American Chemical Society gestatten den Autoren die Verwendung der Artikel in Dissertationen in gedruckter und digitaler Form.



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit war Teil des Projektes „Pollutants of emerging concern originating from reclaimed wastewater: plant uptake, translocation and transformation – PECtake“. Die Finanzierung erfolgte durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Projekt-Nr. Re 1290/7-1).

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thorsten Reemtsma für die Möglichkeit in diesem sehr spannenden, vielseitigen und anwendungsbezogenen Projekt mitarbeiten zu dürfen. Ich danke Ihnen für Ihr Vertrauen und die Betreuung meiner Arbeit, sowie die stetige Gesprächsbereitschaft während dieser Zeit. Ihre stets freundliche und humorvolle Art haben entscheidend die gute Zusammenarbeit geprägt.

Ein herzlicher Dank gilt Dr. Monika Möder und Dr. Bettina Seiwert für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit. Eure zahlreichen Anregungen und fachlichen Gespräche waren immer hilfreich und motivierend und hatten maßgeblichen Einfluss auf das Fortschreiten meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Hilke Maas und Nadja Triesch, die ich im Rahmen ihrer Vertiefungs- bzw. Diplomarbeit betreuen durfte, bedanken. Zusammen sind wir der Suche nach den Arzneimitteln im Gemüse zumindest ein wenig näher gekommen.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Dietmar Schwarz und Frau Gundula Aust vom Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) in Großbeeren für die Bereitstellung und Pflege der Hydrokulturen. Ohne Ihre tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten wäre die Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht möglich gewesen.

Frau Steffi Schrader danke ich sehr für die Hilfe und vielfältigen Ratschläge bei labor- und gerätetechnischen Problemen.

Ich danke den PECtake-Projektpartnern Prof. Dr. Benny Chefetz, Prof. Dr. Yitzhak Hadar, Prof. Dr. Elias Salameh und Dr. Marwan Al-Raggad für die fachlichen und konstruktiven Diskussionen, welche im Rahmen des Projektes und insbesondere der Projekttreffen in Istanbul und Berlin geführt wurden.

## Danksagung

---

Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher danke ich für die begeisternde Vermittlung der Umweltchemie während des Studiums. Durch die Betreuung meiner Masterarbeit haben Sie den Stein für diese Arbeit ins Rollen gebracht.

Ihnen und Herrn Prof. Dr. Wilhelm Georg Lorenz gilt mein Dank außerdem für die Bereitschaft das Zweitgutachten für die vorliegende Arbeit zu übernehmen.

Abschließend möchte ich allen weiteren Mitarbeitern des Departments Analytik und insbesondere meinen Mitdoktoranden für das gute Arbeitsklima, die unterhaltsamen Dienstreisen zu Tagungen und die immerwährende Hilfe danken.

## Bibliographische Beschreibung

Christina Riemenschneider

### **Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft – Untersuchungen zum Verbleib von organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen mittels LC-MS**

Universität Leipzig, Fakultät für Chemie und Mineralogie

Dissertation

160 Seiten, 12 Abbildungen, 5 Tabellen, 224 Literaturstellen

#### **Kurzfassung**

Der Verbleib von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen ist, vor dem Hintergrund der Wasserknappheit in (semi)ariden Regionen und der damit verbundenen Wiederverwendung von behandeltem Abwasser für landwirtschaftliche Bewässerungszwecke, zunehmend von Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Verhalten von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in landwirtschaftlich genutzten Pflanzen untersucht.

Hierzu wurde zunächst ein spurenanalytisches Verfahren für die qualitative und quantitative Bestimmung von 28 organischen Spurenstoffen in pflanzlichen Matrices entwickelt und validiert (s. **Publikation 1**). Das analytische Verfahren ermöglichte nicht nur die Bestimmung von Arzneimitteln, Röntgenkontrastmitteln und Industriechemikalien in Nutzpflanzen, sondern berücksichtigte auch mögliche pflanzliche Metaboliten dieser Spurenstoffe.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die entwickelte Methode in einer Feldstudie angewandt. Mittels dieser Studie konnte erstmals die Exposition des Verbrauchers gegenüber organischen Spurenstoffen beim Verzehr von mit behandeltem Abwasser bewässertem Gemüse unter realen Bedingungen abgeschätzt werden. Zudem erfolgte eine Risikobewertung der dabei detektierten Verbindungen anhand des Threshold of Toxicological Concern (TTC)-Konzepts. Auf diese Weise konnte schließlich das Gesundheitsrisiko der Bevölkerung beim Verzehr des untersuchten Gemüses abgeschätzt werden (s. **Publikation 2**).

Im dritten Teil der Arbeit wurde das Verhalten von drei ausgewählten organischen Spurenstoffen (Carbamazepin, Lamotrigin und Simvastatinsäure) in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen umfassend untersucht. Dabei wurden teilweise bekannte aber auch bislang unbekannte Erkenntnisse über die Aufnahme, die Verteilung und den Metabolismus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen gewonnen. So liegt die Vermutung nahe, dass neben der Lipophilie und Ladung einer Verbindung, das Molekulargewicht und die Anzahl an Donatoren und Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül entscheidend für die Aufnahme einer Substanz in Pflanzen sind. Für den in Pflanzen am häufigsten detektierten organischen Spurenstoff Carbamazepin konnte erstmals das Ausmaß des Metabolismus abgeschätzt und ein möglicher Stoffwechselweg in Pflanzen beschrieben werden (s. **Manuskript**).

## Bibliographic Description

Christina Riemenschneider

### **Reuse of treated wastewater in agriculture – Investigations on the fate of micropollutants in crop plants by LC-MS**

University of Leipzig, Faculty of Chemistry and Mineralogy

PhD thesis

160 Pages, 12 Figures, 5 Tables, 224 References

#### **Abstract**

Due to the water scarcity in semiarid and arid regions the reuse of treated municipal wastewater for agricultural irrigation is increasing and thus, the fate of wastewater-derived organic micropollutants is of growing interest. Hence, the present study aimed to investigate the behavior of wastewater-derived organic micropollutants in crop plants.

First of all, a trace-analytical method for the qualitative and quantitative determination of 28 micropollutants in plant material was developed and validated (s. **Publikation 1**). The method enables the analysis of pharmaceuticals, X-ray contrast media and industrial chemicals and allows the determination of possible plant metabolites of micropollutants.

Secondly, the application of the developed method was tested in a field study. In the course of this study the human exposure to micropollutants and possible metabolites by consumption of vegetables irrigated with treated municipal wastewater and grown under real field conditions were assessed for the first time. Based on the threshold of toxicological concern (TTC)-concept, risk-assessment of the detected micropollutants was performed and the potential health risk to the population was estimated (s. **Publikation 2**).

Finally, the behaviour of three selected organic micropollutants (i.e. carbamazepine, lamotrigine, and simvastatin acid) was investigated using hydroponically grown tomato plants. In this way, new insights into the uptake, translocation and metabolism of micropollutants in plants were gained. For instance, the results suggest that the uptake of micropollutants by plants is not only influenced by the lipophilicity and charge of a compound but also by its molecular weight and number of H-bond donors and acceptors. With regard to carbamazepine, being the most frequently detected and wastewater-derived trace substances in plants, a large variety of metabolites were identified and partially quantified. The extent of plant metabolism of carbamazepine could be estimated for the first time and a possible metabolic pathway in plants was proposed (s. **Manuskript**).

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	I
Danksagung .....	III
Bibliographische Beschreibung .....	V
Bibliographic Description .....	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Allgemeine Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Vor- und Nachteile .....	4
2.1.2 Rechtliche Grundlagen .....	5
2.1.3 Jordanien und Israel .....	6
<b>2.2 Abwasserbürtige organische Spurenstoffe in Pflanzen.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Aufnahme und Verteilung .....	9
2.2.1.1 Aufnahme- und Verteilungsmechanismen .....	9
2.2.1.2 Einfluss der physikochemischen Eigenschaften einer Verbindung.....	11
2.2.1.3 Aufnahmestudien.....	14
2.2.2 Metabolismus .....	17
2.2.3 Kultivierungssysteme zur Untersuchung von Aufnahme, Verteilung und Metabolismus .....	21
<b>2.3 Ausgewählte abwasserbürtige organische Spurenstoffe .....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Carbamazepin .....	23
2.3.2 Lamotrigin.....	26
2.3.3 Simvastatinsäure .....	28
<b>2.4 Analytik.....</b>	<b>30</b>
2.4.1 Probenvorbereitung .....	30
2.4.2 Nachweis und Quantifizierung von Verbindungen mittels LC-MS/MS .....	31
2.4.3 Nachweis und Identifizierung unbekannter Verbindungen mittels LC-HRMS .....	32
<b>3 Forschungsbedarf &amp; Zielsetzung.....</b>	<b>36</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Zusammenfassung der Publikationen und des Manuskripts .....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Entwicklung eines HPLC-ESI-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Pflanzen.....	38

4.1.2	Nachweis von organischen Spurenstoffen und deren Metaboliten in Nutzpflanzen kultiviert unter Freilandbedingungen .....	43
4.1.3	Untersuchungen zum Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen.....	49
<b>4.2</b>	<b>Unveröffentlichte Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Aufnahme und Verteilung von Lamotrigin und Simvastatinsäure in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen .....	54
4.2.2	Untersuchung des Metabolismus von Lamotrigin und Simvastatinsäure in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen .....	57
4.2.3	Zusammenfassende Diskussion .....	60
<b>5</b>	<b>Originalarbeiten und Manuskript .....</b>	<b>64</b>
5.1	Publikation 1 .....	64
5.2	Publikation 2 .....	82
5.3	Manuskript .....	103
<b>6</b>	<b>Umweltchemische Relevanz der Arbeit &amp; Ausblick .....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>ii</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>iii</b>
A.1	<b>Physikochemische Eigenschaften von Carbamazepin, Lamotrigin und Simvastatinsäure .....</b>	<b>iii</b>
A.2	<b>Ergänzende Daten zu den hydroponischen Experimenten .....</b>	<b>iv</b>

## Abkürzungsverzeichnis

10-OH-CBZ	10-Hydroxy-Carbamazepin
2-OH-CBZ	2-Hydroxy-Carbamazepin
3-OH-CBZ	3-Hydroxy-Carbamazepin
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
ASE	<i>accelerated solvent extraction</i> (beschleunigte Lösemittelextraktion)
BCF	Biokonzentrationsfaktor ( <i>bioconcentration factor</i> )
CBZ	Carbamazepin
CE	collision energy (Kollisionsenergie)
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i> (Europäisches Komitee für Normung)
C <sub>org</sub>	organischer Kohlenstoffgehalt
EP-CBZ	Carbamazepin-10,11-epoxid
ESI	Elektrospray-Ionisation
FM	Frischmasse
FT-ICR	<i>fourier transform ion cyclotron resonance</i> (Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz)
FWHM	<i>full width at half maximum</i> (Halbwertsbreite)
GC	Gaschromatographie
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPLC-MS/MS	<i>high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRMS	<i>high-resolution mass spectrometry</i> (hochauflösende Massenspektrometrie)
JRC	<i>Joint Research Centre</i> (Gemeinsame Forschungsstelle der Europäischen Kommission)
K <sub>d</sub>	Boden-Wasser-Verteilungskoeffizient
KG	Körpergewicht
K <sub>oc</sub>	Boden-Wasser-Verteilungskoeffizient bezogen auf den organischen Kohlenstoffgehalt
K <sub>ow</sub>	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

## Abkürzungsverzeichnis

---

LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie, wird auch synonym für HPLC verwendet)
LC-HRMS	<i>liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie)
LOD	limit of detection (Nachweisgrenze)
LOEL	<i>lowest observed effect level</i> (Dosis, bei der die geringste messbare Wirkung beobachtet werden kann)
LOQ	limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
ME	Matrixeffekt
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NOEL	<i>no observed effect level</i> (Dosis, bei der keine statistisch signifikante Wirkung beobachtet werden kann)
QqQ	Triple-Quadrupol
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i> (Extraktionsmethode)
RA	<i>absolute recovery</i> (absolute Wiederfindung)
RCF	<i>root concentration factor</i> (Wurzelkonzentrationsfaktor)
RE	extraction recovery (Extraktionswiederfindung)
Rf	Responsefaktor
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RSA	relative Standardabweichung
Rt	Retentionszeit
SLE	<i>solid-liquid extraction</i> (Fest-Flüssig-Extraktion)
SPE	<i>solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
TDI	<i>tolerable daily intake</i> (tolerierbare tägliche Aufnahmemenge)
TM	Trockenmasse
TOF-MS	<i>time-of-flight mass spectrometry</i> (Flugzeit-Massenspektrometrie)
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	<i>trans</i> -10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin
TSCF	<i>transpiration stream concentration factor</i> (Transpirationsstromkonzentrationsfaktor)
TTC	<i>Threshold of Toxicological Concern</i>
ULE	<i>ultrasonically assisted liquid extraction</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

UPLC-QTOF-MS	<i>ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry</i> (Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie)
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (US-amerikanische Umweltbehörde)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)



## 1 Einleitung

In Zeiten des weltweiten Klimawandels und der steigenden Bevölkerungszahl gewinnt die Nutzung globaler Süßwasserressourcen zunehmend an Bedeutung. Insbesondere in halbtrockenen (semiariden) und trockenen (ariden) Regionen mit geringem Niederschlag und hoher Bevölkerungsdichte, aber auch in Regionen mit gemäßigttem Klima, intensiver Landwirtschaft und starker industrieller Tätigkeit, kann die nachhaltige Wasserversorgung gefährdet werden. Viele Länder stehen daher vor der großen Herausforderung, Strategien zu entwickeln, um der Wasserknappheit entgegenzuwirken, ohne dabei die Umwelt zu schädigen oder die Gesundheit der Bevölkerung zu gefährden.

In der Landwirtschaft wird in zunehmendem Maße die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser für Bewässerungszwecke als eine Möglichkeit verstanden, der Wasserknappheit zu begegnen. In semiariden Regionen, wie dem Nahen Osten, Kalifornien oder Spanien, wurden im Jahre 2010 bis zu 70% (Israel) des gesamten behandelten Abwassers zur Bewässerung landwirtschaftlich genutzter Flächen wiederverwendet (NAVON *et al.* 2011, SATO *et al.* 2013).

Diese Art der Bewässerung stellt jedoch aus qualitativer und quantitativer Hinsicht ein großes Problem für das Agrarökosystem dar, da bei der konventionellen Abwasserbehandlung Schadstoffe meist nur unzureichend abgebaut oder zurückgehalten werden. Neben den hygienischen Risiken, das heißt der mikrobiellen Belastung des Abwassers durch Krankheitserreger, sind hierbei in den vergangenen Jahren zunehmend chemische Risiken - insbesondere organische Spurenstoffe wie Arzneimittelrückstände - in den Fokus der Öffentlichkeit gerückt. In einer Vielzahl an Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein Übergang von organischen Spurenstoffen aus dem Bewässerungswasser in Pflanzen möglich ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen innerhalb der Pflanzen verteilt werden und über die essbaren Teile in die Nahrungskette gelangen können. Neben der Aufnahme und Verteilung spielt die Metabolisierung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen eine zunehmend wichtige Rolle in Aufnahmestudien. In welchem Maße die aufgenommenen Substanzen dem pflanzlichen Metabolismus unterliegen und inwieweit der Eintragsweg von abwasserbürtigen organischen Verbindungen in pflanzliche Erzeugnisse Auswirkungen auf die Gesundheit der Bevölkerung haben kann, wurde bisher jedoch nur in wenigen Fällen untersucht. Die vorliegende Arbeit setzt daher an diesem Punkt der Forschung an und konzentriert sich auf die Interaktion im System Wasser-Pflanze.

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von organischen Spurenstoffen in biologischen Matrices haben sich vor allem massenspektrometrisch-gekoppelte Verfahren etabliert. Durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) bzw. der hochauflösenden Massenspektrometrie (HPLC-HRMS) stehen sehr selektive und zugleich sensitive spurenanalytische Nachweisverfahren zur Verfügung, um das Verhalten von organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte somit ein aktuelles Forschungsthema mit moderner, instrumenteller Analytik verbunden werden.

## 2 Allgemeine Grundlagen

Die vorliegende Arbeit war Teil eines drittmittelgeförderten Forschungsprojektes, welches mit Partnern<sup>1</sup> in Israel und Jordanien durchgeführt wurde. Der Hintergrund dieses trilateralen Kooperationsprojekts ist die Wasserknappheit in ariden und semiariden Regionen, wie dem Nahen Osten, die zu einer zunehmenden Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft führt. Im Folgenden werden daher zunächst die Rahmenbedingungen für die Nutzung von behandeltem Abwasser zur Bewässerung landwirtschaftlich genutzter Flächen, mit Schwerpunkt Jordanien und Israel, dargestellt (Kapitel 2.1). Aus dieser Problematik leitet sich der Schwerpunkt dieser Arbeit ab, die den Verbleib von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen untersucht. Der derzeitige Stand des Wissens bezüglich der Aufnahme, Verteilung und Metabolisierung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen wird daher in Kapitel 2.2 näher beleuchtet. In Kapitel 2.3 werden ausgewählte abwasserbürtige Spurenstoffe näher vorgestellt und abschließend die aktuellen analytischen Methoden für den Nachweis, die Quantifizierung und die Identifizierung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen aufgezeigt (Kapitel 2.4).

### 2.1 Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft

Für landwirtschaftliche Zwecke werden derzeit global gesehen etwa 70% des gesamten Wasserbedarfs benötigt. Damit ist die Landwirtschaft, gefolgt vom industriellen (20%) und häuslichen Sektor (10%), weltweit der wichtigste Wassernutzer (FAO 2011). Die zunehmende Wasserknappheit - bedingt durch physikalisch-geographische Gegebenheiten, klimatische Bedingungen und sozioökonomische Faktoren - stellt hierbei für viele Länder eine der größten Herausforderungen dar.

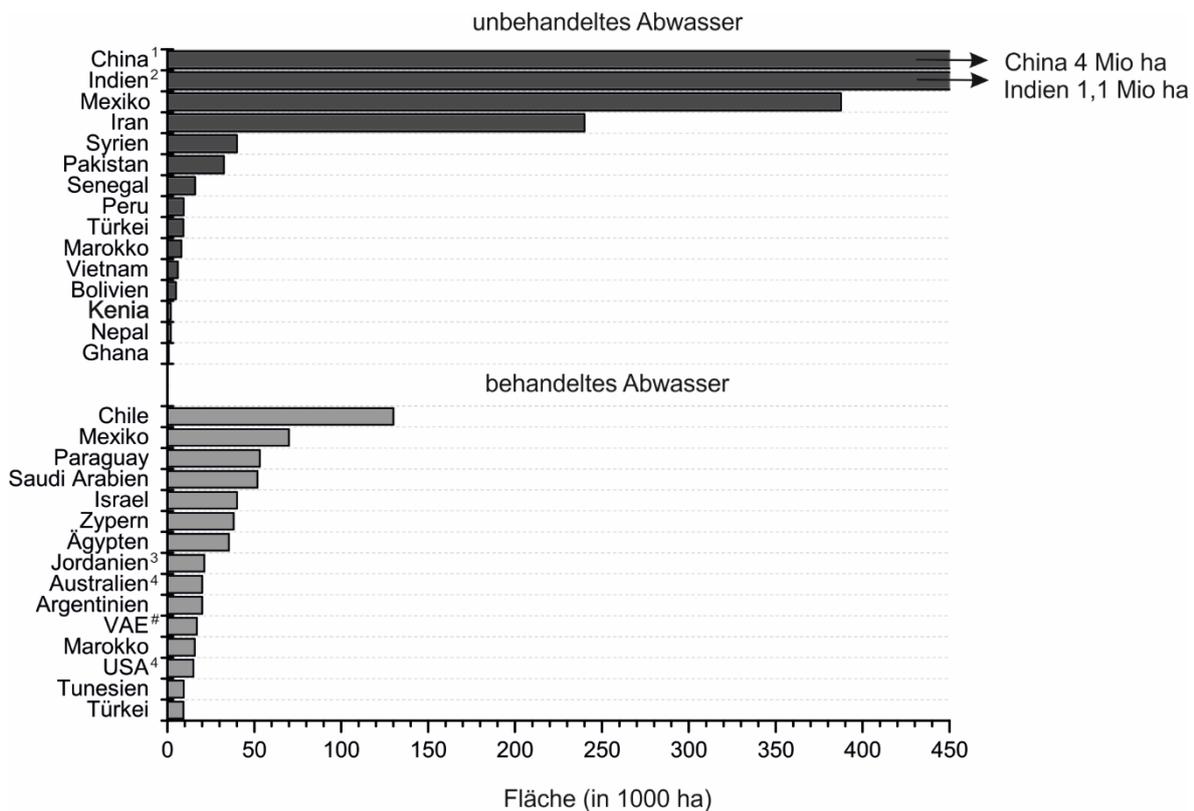
Trotz der beschränkten Datenlage zur Wiederverwendung von Abwasser in der Landwirtschaft werden Schätzungen zu Folge weltweit mehr als 20.000.000 ha landwirtschaftlich genutzte Fläche in 50 Ländern mit kontaminiertem Wasser bewässert (JIMENEZ und ASANO 2008). Dies entspricht etwa 7% der weltweit bewässerten Anbaufläche (DRECHSEL *et al.* 2010). Laut ENSINK *et al.* 2004 werden in Pakistan circa 26% des verzehrten Gemüses mit Abwasser bewässert. In Hanoi (Vietnam) stammen

---

<sup>1</sup> Prof. Dr. Benny Chefetz und Prof. Dr. Yitzhak Hadar von der Hebrew University of Jerusalem in Rehovot (Israel), sowie Prof. Dr. Elias Salameh und Dr. Marwan Al-Raggad von der University of Jordan in Amman (Jordanien)

sogar 80% des lokalen Marktgemüses von Anbauflächen, welche teilweise mit Abwasser bewässert wurden (LAI 2000).

Während in Deutschland die jährlichen Grundwasserneubildungsraten ausreichend hoch sind, um auf eine Zusatzbewässerung in der Landwirtschaft nahezu verzichten zu können, sind die von Wasserknappheit betroffenen Länder auf eine Bewässerungslandwirtschaft angewiesen. In **Abbildung 2-1** sind jene 15 Länder aufgeführt, welche weltweit flächenmäßig den größten Anteil an landwirtschaftlich genutzter Fläche mit behandeltem bzw. unbehandeltem Abwasser bewässern.



<sup>#</sup>Vereinigte Arabische Emirate

Quellen: FAO 2016 (Hinweis: als landwirtschaftlich genutzt Fläche wird hier auch die Bewässerung von Wald- und Grünflächen verstanden), <sup>1</sup>XIE *et al.* 2009, <sup>2</sup>AMERASINGHE *et al.* 2013, <sup>3</sup>SEDER und ABDEL-JABBAR 2011, <sup>4</sup>SATO *et al.* 2013

**Abbildung 2-1:** Die Top-15 Länder, welche weltweit den höchsten Anteil an landwirtschaftlich genutzter Fläche mit behandeltem bzw. unbehandeltem Abwasser bewässern (berücksichtigt wurden alle Länder mit verfügbaren Daten ab dem Jahr 2004; aktualisiert und modifiziert nach JIMENEZ und ASANO 2008).

### 2.1.1 Vor- und Nachteile

Die Wiederverwendung von Abwasser in der Landwirtschaft ist nicht nur aufgrund der existierenden Wasserknappheit in den betroffenen Ländern seit vielen Jahren gängige Praxis. Abwasser stellt eine ganzjährig verfügbare Wasserressource dar, wodurch

einerseits höhere Ernteerträge erzielt werden können und andererseits ein ganzjähriger Anbau von Nutzpflanzen, unabhängig von Vegetationsperioden, möglich ist (RASCHID-SALLY *et al.* 2005, JIMENEZ 2006).

Darüber hinaus stellt Abwasser, aufgrund des hohen Nährstoffgehalts und der Nährstoffzusammensetzung, eine kostengünstige Alternative zu synthetisch hergestelltem Dünger dar (VAN DER HOEK *et al.* 2002, DRECHSEL *et al.* 2010). Nachteilig ist hierbei jedoch, dass die im Abwasser enthaltene Stickstoffmenge zu einer Überdüngung des Bodens und anschließender Immission in das Grundwasser führen kann. Zudem wirken zu hohe Konzentrationen an Spurenelementen wie Kupfer, Zink oder Molybdän auf Pflanzen toxisch (JIMENEZ 2006, WHO 2006).

Ein weiterer Nachteil, von weitaus größerer Bedeutung, ist, dass bei der konventionellen Abwasserbehandlung nicht alle Schadstoffe vollständig entfernt werden. Hierbei stellt vor allem die hohe Keimbelastung des Abwassers - darunter Krankheitserreger - eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Neben den Landwirten, welche unmittelbar mit dem Abwasser arbeiten, werden auf diese Weise auch nicht beteiligte Anlieger, sowie die Händler und Konsumenten erzeugter Produkte mit Krankheitserregern infiziert. Kinder, sowie ältere und immungeschwächte Menschen stellen dabei besonders gefährdete Bevölkerungsgruppen dar.

Doch nicht nur die Gefährdung durch pathogene Keime, sondern auch die Gefährdung durch organische Spurenstoffe wie Arzneimittel, Pflanzenschutzmittel, Reinigungsmittel oder Körperpflegeprodukte, wird zunehmend im Zusammenhang mit der Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft diskutiert (WHO 2006, DRECHSEL *et al.* 2010, SEIS *et al.* 2016).

### 2.1.2 Rechtliche Grundlagen

Die mit der Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft einhergehenden und in Kapitel 2.1.1 dargestellten Gesundheits- und Umweltrisiken führten weltweit zu einer Vielzahl an nationalen Regularien, auf die im Einzelnen in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann.

Darüber hinaus gibt es einige supranationale Regulierungsansätze, wie die Leitlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO)<sup>2</sup>, die australischen Leitlinien<sup>3</sup>, sowie die Leitlinien der US-amerikanischen Umweltbehörde (EPA)<sup>4</sup>. Diese Leitlinien sind nicht rechtsverbindlich, stellen jedoch für Länder ohne Regularien eine Empfehlung dar und werden im Folgenden kurz erläutert.

---

<sup>2</sup> "WHO Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater, Volume II Wastewater use in Agriculture (2006)"

<sup>3</sup> "Australian Guidelines for Water Recycling: Managing Health and Environmental Risks (2006)"

<sup>4</sup> "Guidelines for Water Reuse (2012)"

In den Leitlinien der WHO wird ausschließlich die sichere Wiederverwendung von Abwasser in der Landwirtschaft und Aquakultur thematisiert. In Bezug auf die Qualität des Bewässerungswassers sind keine konkreten Grenzwerte für chemische oder mikrobielle Risiken formuliert, da die Leitlinien nationalen Entscheidungsträgern lediglich als Empfehlung dienen sollen, eigene Grenzwerte abzuleiten (WHO 2006).

In den Leitlinien der EPA und Australiens werden neben der Bewässerung in der Landwirtschaft spezifische Aspekte der Abwasserwiederverwendung, wie die Grundwasseranreicherung und industrielle Nutzung, berücksichtigt. Bezüglich der Qualität des Bewässerungswassers sind Grenz- bzw. Richtwerte für organische Summenparameter, Salinität, Nährstoffgehalt, (Schwer)metalle und die hygienische Beschaffenheit vorgegeben (NWQMS 2006, EPA 2012).

Neben den zuvor genannten Leitlinien existiert auf internationaler Ebene seit August 2015 ein Normenwerk<sup>5</sup>, welches von der Internationalen Organisation für Normung erarbeitet wurde. In Teil 2 dieser Norm sind die Anforderungen an die Wasserqualität für verschiedene Anwendungen, darunter die landwirtschaftliche Bewässerung, aufgeführt (ISO 2015).

Allen zuvor genannten supranationalen Regulierungsansätzen gemein ist, dass für Bewässerungswässer bislang keine Anforderungen bezüglich organischer Spurenstoffe existieren.

Umfassende Übersichten zu existierenden Leitlinien und Regelungen hinsichtlich der Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft geben das Umweltbundesamt und die Gemeinsame Forschungsstelle der Europäischen Kommission (JRC, *Joint Research Centre*) (SANZ und GAWLIK 2014, SEIS *et al.* 2016).

### 2.1.3 Jordanien und Israel

Jordanien und Israel zählen zu den wasserärmsten Ländern der Welt. Die durchschnittlich verfügbare Süßwassermenge beträgt in Jordanien weniger als 100 m<sup>3</sup> pro Kopf und Jahr (2016) bzw. in Israel 282 m<sup>3</sup> pro Kopf und Jahr (2007) (KISLEV 2011, MWI 2016). Für den landwirtschaftlichen Sektor wurden im Jahre 2005 zwischen 58% (Israel) und 65% (Jordanien) des gesamten Wasserbedarfs benötigt (FAO 2016). Angesichts dessen wird in Jordanien und Israel die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft als eine Möglichkeit verstanden, behandelte Abwässer nutzbringend einzusetzen und die knappen Wasserressourcen zu schonen. Der Anteil an behandeltem Abwasser am gesamten zur Bewässerung landwirtschaftlich genutzter Flächen

---

<sup>5</sup> "Guidelines for treated wastewater use for irrigation projects - Part 3: Components of a reuse project for irrigation (ISO 16075-3:2015)"

verwendeten Bewässerungswasser liegt bei etwa 50% (ALFARRA *et al.* 2011, NAVON *et al.* 2011). Das behandelte Abwasser wird dabei meist nicht direkt, sondern nach Verdünnung durch die Einleitung in Oberflächengewässer oder dem Beimischen von Grund- und Regenwasser, wiederverwendet (ULIMAT 2012).

Jordanien zählt zu den Vorreitern bezüglich der Wiederverwendung von behandeltem Abwasser. Seit Anfang der 80er Jahre gilt der Grundsatz Abwasser aufzubereiten und direkt oder indirekt wiederzuverwenden (MWI 2009, ULIMAT 2012). Im Jahre 1997 wurde von der jordanischen Regierung das erste offizielle Dokument mit Maßnahmen zur Abwasserbehandlung und Wiederverwendung veröffentlicht. Es folgten zwei weitere Strategiepapiere „*Water for Life: Jordan's Water Strategy 2008-2022*“ im Jahre 2009 und zuletzt die „*National Water Strategy 2016-2025*“ im Jahre 2016. Neben Maßnahmen zur effizienteren Nutzung der Wasserressourcen für Bewässerungszwecke, soll unter anderem die Abwasserbehandlung qualitativ und quantitativ verbessert und die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft, unter Beachtung der nationalen umwelt- und gesundheitsrechtlichen Bestimmungen, erhöht werden (MWI 2009, MWI 2016).

Die Mindestanforderungen an behandeltes Abwasser, welches für landwirtschaftliche Bewässerungszwecke verwendet wird, sind in Jordanien in der „*Jordanian Standard No. 893/2006*“ geregelt. Demnach darf Gemüse, welches roh verzehrt wird, nicht mit behandeltem Abwasser bewässert werden. Der Einsatz von Beregnungssystemen ist unzulässig und Obstbäume dürfen bis maximal zwei Wochen vor Ernte der Früchte mit behandeltem Abwasser bewässert werden. Hinsichtlich der Wasserqualität sind Grenzwerte für spezifische Einzelionen, Salzgehalt, Nährstoffe, Schwermetalle und hygienische Parameter festgelegt - organische Spurenstoffe bleiben bislang unberücksichtigt (JISM 2006).

In Israel wurden im Jahre 2010 neue Standards für die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft veröffentlicht. Entsprechend den „*Effluent Quality Standards and Rules for Sewage Treatment*“ ist die uneingeschränkte Nutzung von behandeltem Abwasser zur Bewässerung von Obst und Gemüse zulässig, sofern das zur Bewässerung dienende Abwasser den Anforderungen der höchsten Behandlungsstufe entspricht. Die in den Standards festgelegten Mindestanforderungen an die Wasserqualität von behandeltem Abwasser orientieren sich an den Leitlinien der WHO (s. Kapitel 2.1.2). Für insgesamt 36 Parameter (physikalische, chemische und biologische) sind Grenzwerte gelistet - organische Spurenstoffe bleiben jedoch auch hier unberücksichtigt (MOEP 2010).

## 2.2 Abwasserbürtige organische Spurenstoffe in Pflanzen

Abwasser enthält eine Vielzahl organischer Spurenstoffe, welche in konventionellen Kläranlagen nur unzureichend entfernt oder abgebaut werden. Zu den in behandeltem Abwasser regelmäßig detektierten organischen Spurenstoffen zählen unter anderem Wirkstoffe aus Pflanzenschutzmitteln, Arzneimitteln, Wasch- und Reinigungsmitteln, Industriechemikalien und Körperpflegeprodukten (REEMTSMA *et al.* 2006, KÜMMERER 2010). Aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in der aquatischen Umwelt (maximal im  $\mu\text{g/L}$ -Bereich) werden sie auch als Mikroverunreinigungen oder Mikroschadstoffe bezeichnet (KÜMMERER 2010, SEIS *et al.* 2016).

Durch die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft gelangen organische Spurenstoffe in das Agrarökosystem (s. **Abbildung 2-2**). Dort wird der Verbleib dieser Stoffe durch Sorptions- und Transformationsprozesse im Boden, Immission in das Grundwasser, sowie die Aufnahme in Pflanzen, beeinflusst. Über den essbaren Teil von Nutzpflanzen gelangen die Spurenstoffe schließlich in die Nahrungskette von Mensch und Tier und werden im Hinblick auf die Produktsicherheit und den Gesundheitsschutz des Verbrauchers relevant.



**Abbildung 2-2:** Transferpfade von organischen Spurenstoffen bei der landwirtschaftlichen Bewässerung mit behandeltem Abwasser (blau hinterlegt: der in der vorliegenden Arbeit betrachtete Pfad).

### 2.2.1 Aufnahme und Verteilung

Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem System Wasser-Pflanze liegt, werden im Folgenden die Aufnahme und die Verteilung von organischen Spurenstoffen aus dem Bewässerungswasser in Pflanzen näher betrachtet.

#### 2.2.1.1 Aufnahme- und Verteilungsmechanismen

Zum besseren Verständnis der Aufnahme- und Verteilungsmechanismen werden zunächst die wichtigsten Transportprozesse von Wasser und gelösten Stoffen in Pflanzen dargestellt.

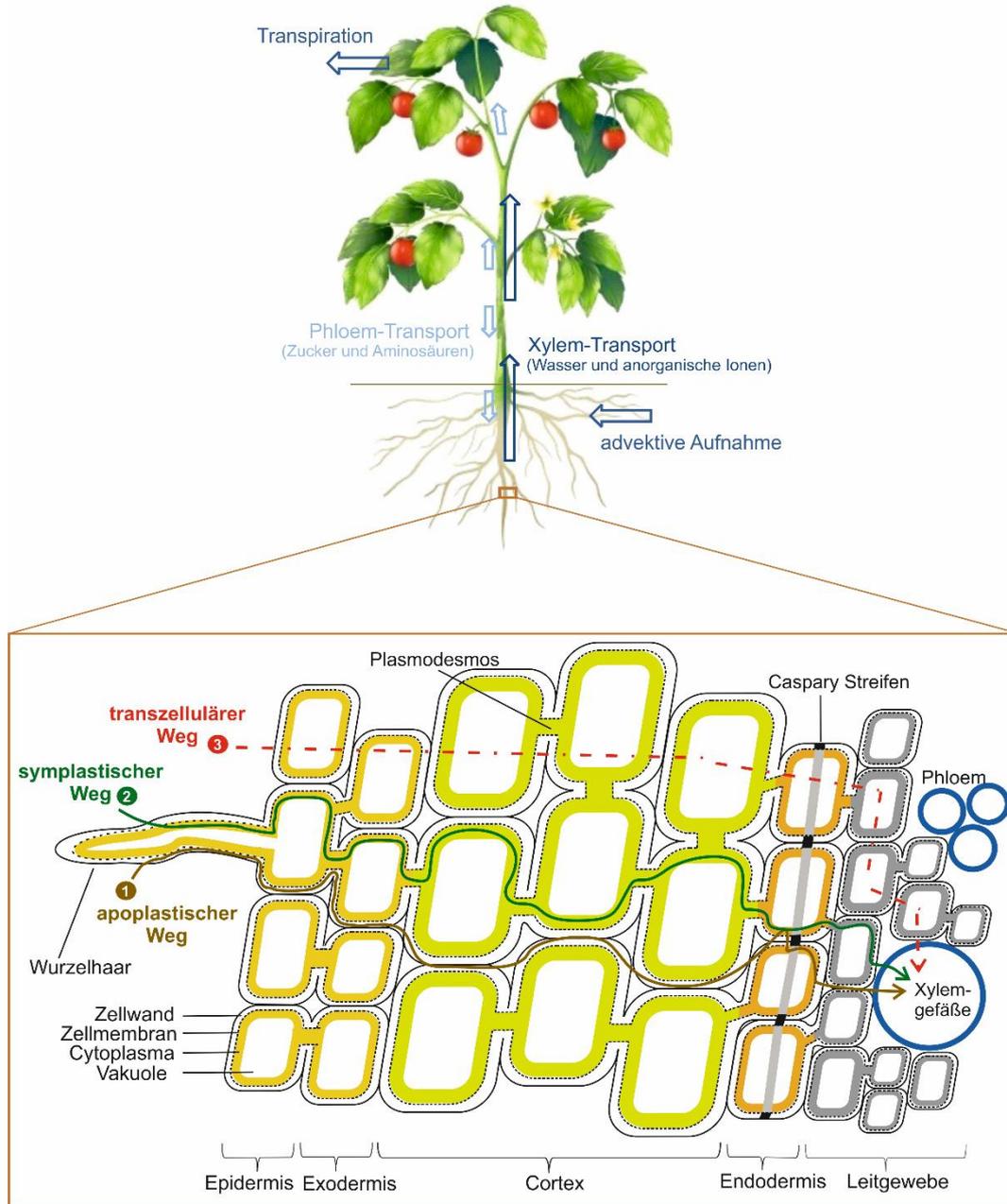
Pflanzen bestehen in der Regel aus den drei Grundorganen: Wurzel, Sprossachse und Blatt, gegebenenfalls Frucht. Über die Wurzeln erfolgt die Aufnahme des Wassers und der darin gelösten Stoffe. Diese werden anschließend, angetrieben von einem Transpirationssog, über ein Leitungssystem, welches die gesamte Pflanze durchzieht, aus den Wurzeln durch die Sprossachse in die Blätter und Früchte transportiert (**Abbildung 2-3**). Dieses Leitungssystem besteht aus den Transportsystemen Xylem und Phloem. Das Xylem, bestehend aus toten Zellen, ist in erster Linie für den Ferntransport des Wassers aus den Wurzeln in die Blätter und Früchte verantwortlich. Dementgegen besteht das Phloem aus lebenden Zellen und dient dem Transport von Assimilaten<sup>6</sup> von den Orten der Produktion (Blätter) zu den Orten des Verbrauchs, d.h. allen wachsenden Organen wie z. B. Wurzeln, Knospen, junge Blätter und Früchte (SCHOPFER und BRENNICKE 2006, TRAPP 2015).

Die Wurzel spielt aufgrund ihrer großen Oberfläche für die Aufnahme und Verteilung eine entscheidende Rolle. In der Wurzel stehen für den Transport von Wasser und den darin gelösten Stoffen prinzipiell drei Wege zur Verfügung: der apoplastische Weg, der symplastische Weg und der transzelluläre Weg (s. **Abbildung 2-3**). Der apoplastische Transport erfolgt passiv durch den Zellwandraum (Apoplast) und wird in der Endodermis durch den lipophilen Caspary-Streifen gestoppt. Der weitere Transport in das Leitgewebe ist ab hier ausschließlich über den symplastischen Weg möglich. Der symplastische Weg umgeht den Caspary-Streifen indem er durch das Cytoplasma (Symplast) erfolgt. Hierbei sind die Zellen über Plasmodesmen (Zellwandöffnungen) miteinander verbunden und ermöglichen so den Transport des Wassers von den Wurzelhaaren in das Xylem. Im Gegensatz zum Wassertransport erfolgt der Ionentransport dabei aktiv, d. h. die Aufnahme der Ionen in den Symplast wird mittels ionenspezifischen Membrantransportern unter Verbrauch von Energie ermöglicht, da die Zellmembran für Kationen und Anionen

---

<sup>6</sup> Photosyntheseprodukte; vor allem Kohlenhydrate wie Saccharose und Stickstoffverbindungen wie Aminosäuren und Amide

eine Diffusionsschranke darstellt. Der transzelluläre Weg wird als weniger bedeutsame Transportform betrachtet und erfolgt von Zelle zu Zelle (**Abbildung 2-3**) (GISI *et al.* 1997, JAVOT und MAUREL 2002, WILD *et al.* 2005, SCHOPFER und BRENNICKE 2006).



**Abbildung 2-3:** Transportprozesse von Wasser und gelösten Stoffen in Pflanzen. Ausschnitt: vereinfachte Darstellung eines Wurzelquerschnitts mit den Transportwegen des Wassers und den darin gelösten Stoffen von der Wurzeloberfläche zu den Xylemgefäßen (modifiziert nach SCHOPFER und BRENNICKE 2006, TRAPP 2009).

### 2.2.1.2 Einfluss der physikochemischen Eigenschaften einer Verbindung

Die zuvor beschriebenen Systeme ermöglichen nicht nur die Aufnahme und Verteilung von Wasser und Nährstoffen, sondern auch von Fremdstoffen in Pflanzen, wobei der Transport von organischen Spurenstoffen in der Regel passiv erfolgt. Vielfach untersucht, aber noch nicht vollständig verstanden ist dabei der Einfluss der physikochemischen Eigenschaften einer Verbindung. Im Folgenden wird der derzeitige Stand des Wissens bezüglich der Bioverfügbarkeit, sowie der Aufnahme und Verteilung organischer Spurenstoffe in Pflanzen in Abhängigkeit von ihren physikochemischen Eigenschaften näher erläutert.

#### *Bioverfügbarkeit*

Die Bioverfügbarkeit einer Verbindung hängt im Wesentlichen von ihrer Sorption an Bodenpartikel und dem Abbau im Boden ab. Die Sorption einer Verbindung an Bodenpartikel wird durch ihre Lipophilie (korreliert mit dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten  $K_{ow}$ ) und den Anteil an organischem Material im Boden beeinflusst (BROMILOW und CHAMBERLAIN 1995, FENET *et al.* 2012). Für ungeladene organische Verbindungen gilt, je lipophiler die Substanz und je höher der Anteil an organischem Material im Boden, desto stärker ist die Sorption an Bodenpartikel. Bei ionischen Verbindungen spielt die Ladung der Substanz eine entscheidende Rolle. Während polare und anionische Verbindungen über das Bodenwasser für Pflanzen verfügbar sind werden kationische Verbindungen an die überwiegend negativ geladenen Bodenpartikeln adsorbiert und stehen somit für die Aufnahme in Pflanzen in deutlich geringerem Maße zur Verfügung (BROMILOW und CHAMBERLAIN 1995).

Die Verteilung einer Verbindung zwischen Sediment bzw. Bodenpartikel und Bodenwasserphase wird durch den sogenannten Boden-Wasser-Verteilungskoeffizienten  $K_d$  bestimmt. Durch Normierung des Verteilungskoeffizienten  $K_d$  auf den organischen Kohlenstoffgehalt  $C_{org}$  des Bodens kann der sogenannte  $K_{OC}$ -Wert ermittelt werden (s. **Gleichung 1**). Dieser ist ein Maß für die Sorption eines organischen Stoffs an die organische Bodensubstanz, d. h. je höher der  $K_{OC}$ -Wert einer Verbindung, umso mehr Moleküle werden an Bodenpartikel gebunden und umso weniger Moleküle befinden sich relativ im Bodenwasser. Der  $K_{OC}$ -Wert ist proportional zum  $K_{OW}$ -Wert einer Verbindung (BROMILOW und CHAMBERLAIN 1995).

$$K_{OC} = \frac{K_d}{C_{org}} \times 100 \quad (1)$$

### *Aufnahme in die Wurzel und Verteilung innerhalb der Pflanze*

Die Aufnahmeeffizienz einer Verbindung aus dem umgebenden Medium in die Wurzel wird durch den Wurzelkonzentrationsfaktor (RCF, *root concentration factor*) beschrieben:

$$\text{RCF} = \frac{\text{Konzentration in der Wurzel}}{\text{Konzentration im umgebenden Medium}}$$

(2)

Entgegen der Bioverfügbarkeit einer Verbindung aus dem Boden und ihrer Konzentration im Wurzelraum, nimmt bei neutralen Substanzen die Aufnahme in die Wurzel mit steigender Lipophilie zu (BRIGGS *et al.* 1982). Gleichermaßen nimmt jedoch die Verteilung innerhalb der Pflanze, aufgrund der Sorption an lipophile Bestandteile der Wurzelzellen, ab (BRIGGS *et al.* 1982, TRAPP 2009).

Die Verteilungseffizienz einer Verbindung aus der Wurzel in den Stängel wird durch den Transpirationsstromkonzentrationsfaktor (TSCF, *transpiration stream concentration factor*) beschrieben:

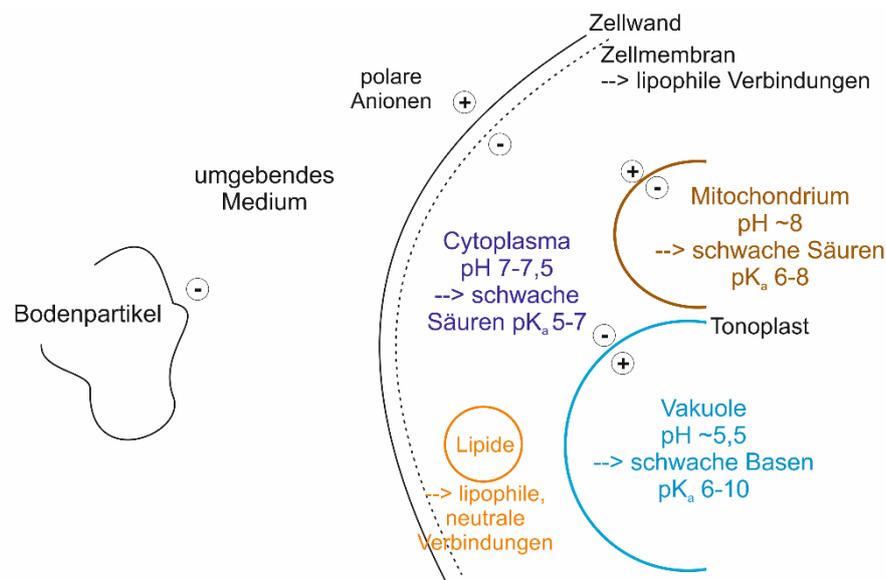
$$\text{TSCF} = \frac{\text{Konzentration im Xylemsaft}}{\text{Konzentration im umgebenden Medium}} \quad (3)$$

Auch hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen der Verteilung einer Verbindung und ihrer Lipophilie nachgewiesen werden. Laut BRIGGS *et al.* 1982 weisen neutrale Verbindungen mit einem  $\log K_{ow}$ -Wert im moderaten Bereich ( $\sim 1,8$ ) einen maximalen TSCF ( $\sim 0,9$ ) auf, während mit zunehmender Hydrophilie ( $\log K_{ow} < 1,8$ ) bzw. Lipophilie ( $\log K_{ow} > 1,8$ ) die Verteilung innerhalb der Pflanze abnimmt. Die Gründe für dieses Optimum sind bislang nicht ausreichend verstanden. Die abnehmende Verteilungseffizienz hydrophiler, neutraler Verbindungen kann jedoch durch die beschränkte Diffusion durch lipophile Zellmembranen begründet werden (BROMILOW und CHAMBERLAIN 1995). Dementgegen wird in neueren Studien von DETTENMAIER *et al.* 2009 von einem negativ sigmoidalen Zusammenhang zwischen dem TSCF und dem  $\log K_{ow}$ -Wert einer Substanz (im Bereich zwischen -2 und 6) ausgegangen. Das heißt hydrophile, neutrale organische Verbindungen werden tendenziell eher in den Stängel aufgenommen als lipophile Substanzen. Die Abweichungen zu BRIGGS *et al.* 1982 werden unter anderem durch Unterschiede bezüglich der verwendeten Modelpflanzen und der Expositionsdauer begründet (DETENMAIER *et al.* 2009).

Im Vergleich zu neutralen Verbindungen sind die Aufnahme- und Verteilungsmechanismen ionischer Verbindungen in Pflanzenzellen deutlich komplexer. Neben der zuvor erläuterten Sorption an lipophile Zellbestandteile spielen bei ionisierbaren Substanzen der pH-Wert des umgebenden Mediums, die unterschiedlichen pH-Werte einzelner Zellorganellen (wie Vakuole, Cytoplasma, Mitochondrien), sowie die

Ladung der Zellmembran eine entscheidende Rolle. Dies wird im Folgenden am Beispiel von schwachen Säuren erläutert.

Die Permeation einer schwachen Säuren in das Wurzelinnere wird bevorzugt dann erfolgen, wenn der pH-Wert des umgebenden Mediums niedriger ist als der  $pK_a$ -Wert der Verbindung, da schwache Säuren mit abnehmendem pH-Wert des umgebenden Mediums zunehmend undissoziiert vorliegen und somit die Zellwand und Zellmembran passieren können. Im Cytoplasma, welches einen pH von etwa 7,5 aufweist, wird die Verbindung dissoziieren und der Anteil des entsprechend polaren Anions überwiegen. Damit ist die Verbindung weniger mobil und es tritt der sogenannte Ionenfalleneffekt ein. Im Fall von schwachen Säuren bedeutet dies, dass eine Anreicherung der Verbindung in Bereichen mit höheren pH-Werten wie dem Cytoplasma, dem Mitochondrium oder dem Phloemsaft (pH 8) erfolgt (s. **Abbildung 2-4**) (BROMILOW und CHAMBERLAIN 1995, TRAPP 2000, TRAPP 2004, TRAPP 2009).



**Abbildung 2-4:** Kompartimente, pH-Werte und Ladungen in und um Pflanzenzellen, sowie Vorhersage der interzellularen Lokalisation von ionischen Verbindungen (nach TRAPP 2004).

### Modelle

Unter Berücksichtigung der physikochemischen Eigenschaften einer Verbindung wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an Modellen entwickelt, welche eine Abschätzung der Aufnahme und Verteilung von nicht untersuchten Stoffen in Pflanzen ermöglichen (TRAPP und MATTHIES 1995, TRAPP 2002, TRAPP 2004, TRAPP 2007). Nachteilig bei den Modellen ist jedoch, dass der metabolische Abbau einer Verbindung gänzlich unberücksichtigt bleibt. Dies liegt zum einen daran, dass sehr wenig über den

Metabolismus von organischen Spurenstoffen (ausgenommen Pestizide) in Pflanzen bekannt ist und zum anderen der Metabolismus sehr pflanzenspezifisch und somit schwer vorherzusagen ist (BROMILOW und CHAMBERLAIN 1995). Laut FANTKE *et al.* 2012 und JACOBSEN *et al.* 2015 ist der Metabolismus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen einer der wichtigsten Parameter, den es in zukünftigen Modellen zu berücksichtigen gilt und welcher weiterhin erheblichen Forschungsbedarf erfordert. Ein erstes Modell, welches eine Abschätzung des metabolischen Abbaus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen erlaubt, wurde kürzlich von HURTADO *et al.* 2016 veröffentlicht. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass das Modell die experimentelle Bestätigung nicht ersetzt.

### 2.2.1.3 Aufnahmestudien

Die Aufnahme und Verteilung von organischen Spurenstoffen aus dem Bewässerungswasser in Pflanzen wurde in den vergangenen Jahren in zahlreichen Studien beschrieben. Eine Literaturübersicht ist in **Tabelle 2-1** zusammengestellt.

Bezüglich der Vergleichbarkeit dieser Studien ist anzumerken, dass wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit der Bewässerung und der Qualität des verwendeten Bewässerungswassers (behandeltes Abwasser, Oberflächenwasser, etc.) bestehen. Zudem wird in hydroponischen Experimenten häufig mit deutlich höheren, nicht umweltrelevanten Konzentrationen an organischen Spurenstoffen im Bewässerungswasser gearbeitet, als in Feldstudien. Dies liegt darin begründet, dass hydroponische Kulturen in der Regel zur Priorisierung jener Verbindungen, die ein hohes Aufnahmepotenzial besitzen, eingesetzt werden.

Zu den in den vergangenen Jahren häufig in Aufnahmestudien untersuchten und in Pflanzen nachgewiesenen organischen Spurenstoffen zählen Carbamazepin, Diclofenac, Sulfamethoxazol, Triclosan und Trimethoprim. Neben der Aufnahme der Verbindungen konnte gezeigt werden, dass diese in oberirdische Pflanzenteile translokalisiert und in bestimmten Organen angereichert werden.

Das Ausmaß der Aufnahme einer Verbindung in Pflanzen wird dabei durch den Biokonzentrationsfaktor (BCF, *bioconcentration factor*) beschrieben. Dieser gibt das Verhältnis der Konzentration einer Testsubstanz im Organismus (z. B. einem Pflanzenorgan) zu der Konzentration des Stoffs im umgebenden Wasser an.

Die Biokonzentrationsfaktoren der in den in **Tabelle 2-1** aufgeführten Studien untersuchten organischen Spurenstoffe variieren stark in Abhängigkeit vom Analyt, den untersuchten Pflanzenspezies und -organen, sowie der Analytkonzentration im Bewässerungswasser.

Für Verbindungen, wie z. B. Triclosan, Triclocarban, Trimethoprim und Sulfamethoxazol, wurde jedoch mehrheitlich eine Anreicherung in der Wurzel (BCFs im Bereich von 0,3 bis 840 L/kg) und eine geringe Verteilung in oberirdische Pflanzenorgane (BCFs<sub>Blatt</sub> im Bereich von 0,03 bis 105 L/kg) verzeichnet (HERKLOTZ *et al.* 2010, TANOUE *et al.* 2012, WU *et al.* 2013).

Im Gegensatz dazu wurden beispielsweise für Carbamazepin, Dilantin und Diuron höhere BCFs in den Blättern (1,4 – 150 L/kg) als in den Wurzeln (0,2 – 90 L/kg) der untersuchten Pflanzen ermittelt (HERKLOTZ *et al.* 2010, SHENKER *et al.* 2011, TANOUE *et al.* 2012, WU *et al.* 2013). Für diese Verbindungen wird ein hohes Translokationspotenzial in Pflanzen angenommen.

Aufgrund einer Vielzahl an neueren Studien ab dem Jahr 2013, wird laut dem derzeitigen Stand des Wissens davon ausgegangen, dass die in Pflanzen nachgewiesenen Konzentrationen organischer Spurenstoffe meist im Bereich von einigen ng/g Pflanzenorgan liegen. Feldstudien waren darunter jedoch nur sehr wenige (s. **Tabelle 2-1**).

**Tabelle 2-1:** Übersicht von Studien zur Untersuchung der Aufnahme und Verteilung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen (Schwerpunkt: Übertragung durch das Bewässerungswasser).

Kultivierung	Art des Bewässerungswassers	untersuchte Substanzen/ Stoffklassen	Anzahl organischer Spurenstoffe		Einzelkonzentration organischer Spurenstoffe		Referenz
			untersucht	Aufnahme nachgewiesen	Wasser [ $\mu\text{g/L}$ ]	Pflanze [ng/g TM bzw. FM] <sup>a</sup>	
Hydroponik	Nährlösung	Arzneimittel	4	4	232,5	11 - 138 (TM) 13 - 440 (FM)	HERKLOTZ <i>et al.</i> 2010
Topf mit org. Substrat	Oberflächenwasser	Arzneimittel (Antibiotika)	3	3	0,0001 - 1	<10 - 115 (TM)	JONES-LEPP <i>et al.</i> 2010
Feld	behandeltes Abwasser		6	3	0,08 - 0,9	48 - 135 (TM)	
Hydroponik	Nährlösung	Carbamazepin	1	1	100	136 - 1087 (FM)	SHENKER <i>et al.</i> 2011
Topf mit org. Substrat	behandeltes Abwasser		1	1	3	1 - 20,4 (FM)	
Hydroponik	Nährlösung	Arzneimittel	13	13	250	9,1 - 19500 (FM)	TANOUE <i>et al.</i> 2012
Hydroponik	behandeltes Abwasser	u.a. Arzneimittel, Pestizide, Antioxidantien	20	19	0,003 - 22,4	1 - 540 (FM)	CALDERON-PRECIADO <i>et al.</i> 2013
Hydroponik	Nährlösung	Arzneimittel, Bisphenol A	4	4	0,05 - 0,24	0,2 - 927 (TM)	DODGEN <i>et al.</i> 2013
Hydroponik	Nährlösung	u.a. Arzneimittel, Pestizide	20	20	0,5 5	0,01 - 95 (TM) 0,01 - 128 (TM)	WU <i>et al.</i> 2013
Topf mit org. Substrat	behandeltes Abwasser	Arzneimittel	13	11	0,7 - 2,4	0,1 - 400 (TM)	GOLDSTEIN <i>et al.</i> 2014
Lysimeter	behandeltes Abwasser	Arzneimittel	14	10	<0,01 - 3	0,05 - 23 (TM)	MALCHI <i>et al.</i> 2014
Feld	behandeltes Abwasser	u.a. Arzneimittel, Pestizide	19	8	0,0003 - 0,2	0,01 - 4,3 (TM)	WU <i>et al.</i> 2014
Hydroponik	Nährlösung	Triclocarban, Triclosan	2	2	500	~100 - 900000 (TM)	MATHEWS <i>et al.</i> 2014
Feld	häusliches Abwasser, Wasser aus Fischteichen	Arzneimittel (Antibiotika)	5	5	4 - 234	0,7 - 22,4 (TM)	PAN <i>et al.</i> 2014
Hydroponik	behandeltes Abwasser	Arzneimittel, Flamm-schutzmittel	9	9	0,01 - 104	0,04 - 4657 (TM)	HYLAND <i>et al.</i> 2015

TM = Trockenmasse, FM = Frischmasse

<sup>a</sup> pro Pflanzenorgan (Wurzel, Stängel, Blatt, Frucht)

### 2.2.2 Metabolismus

Pflanzen sind, ähnlich wie Menschen und Tiere, in der Lage endogene und exogene Substanzen strukturell zu verändern, d. h. zu metabolisieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der pflanzliche Metabolismus, hinsichtlich der ablaufenden Prozesse und den daran beteiligten Enzymen, zahlreiche Parallelen zum Metabolismus von Säugern in der Leber aufweist (SANDERMANN JR. *et al.* 1977, SANDERMANN JR. 1994).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die in der Literatur verwendeten Begriffe Metabolismus und Transformation zu unterscheiden sind. Unter Metabolismus werden in der vorliegenden Arbeit all jene Prozesse verstanden, bei denen eine organische Verbindung strukturelle Veränderungen durch Stoffwechselprozesse in einem lebenden Organismus (Mensch, Tier und Pflanze) erfährt. Dementgegen wird der Begriff Transformation bei strukturellen Umwandlungen einer Ausgangssubstanz, aufgrund abiotischer Prozesse wie beispielsweise Photolyse und Hydrolyse, verwendet.

Der pflanzliche Metabolismus lässt sich, ebenso wie der menschliche und tierische Metabolismus, in drei Phasen unterteilen: Aktivierung (Phase I), Konjugation (Phase II) und Kompartimentierung (Phase III) (SANDERMANN JR. 1992, COLE 1994, KOMOBA *et al.* 1995).

#### *Phase I*

In Phase I erfolgt die Aktivierung einer Verbindung durch enzymatische Einführung einer polaren funktionellen Gruppe (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH). Dieser Aktivierungsschritt ist für viele organische Verbindungen notwendig, um anschließende Phase II-Reaktionen eingehen zu können. Sofern die Ausgangsverbindung bereits über eine entsprechende funktionelle Gruppe verfügt, entfallen die Reaktionen des Phase I-Metabolismus (COLEMAN *et al.* 1997).

Die Oxidation ist eine der am häufigsten beobachteten Phase I-Reaktionen und wird katalysiert durch Enzyme der Cytochrom P-450-Familie (COLEMAN *et al.* 1997). Unter den Oxidationsreaktionen stellen die Hydroxylierung am Aromaten oder Aliphaten, die Epoxidierung sowie die N- oder O-Dealkylierung wichtige Reaktionen dar. Eine weitere Phase I-Reaktion ist die Hydrolyse von beispielsweise Carbonsäureestern, Carbamaten oder Aniliden. Reduktionen treten hingegen vergleichsweise selten auf (LEVSEN *et al.* 2005).

Allen Phase I-Reaktionen gemein ist, dass die entstehenden Metaboliten in der Regel polarer sind als die Ausgangsverbindungen. Sie sind aber nicht zwangsläufig auch weniger phytotoxisch, wie am Beispiel einiger Herbizide (z. B. Bomoxynil), die ihre aktive

Form erst innerhalb des pflanzlichen Gewebes erlangen, gezeigt werden konnte (BUCKLAND *et al.* 1973, COLE 1994, COLEMAN *et al.* 1997).

### *Phase II*

In Phase II des pflanzlichen Metabolismus werden an die funktionellen Gruppen der Ausgangsverbindung bzw. Phase I-Metaboliten bestimmte Co-Substrate (z. B. Glucose, Glutathion, Aminosäuren) konjugiert. Diese Reaktionen erfolgen meist enzymkatalysiert und führen in der Regel zu einer Polaritätserhöhung (mit Ausnahme von Methylierungen und Acetylierungen), sowie Deaktivierung der Ausgangsverbindungen bzw. Phase I-Metaboliten (LEVSEN *et al.* 2005).

Die Konjugation mit Glutathion ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin) gehört, neben der Glycosylierung, zu den in Pflanzen am häufigsten beobachteten und untersuchten Konjugations-Reaktionen (KOMORBA *et al.* 1995). Sie kann sowohl spontan als auch enzymkatalysiert, durch verschiedene Isoenzyme der Glutathion-S-Transferase, erfolgen und stellt eine der wichtigsten Entgiftungsreaktionen für elektrophile Substanzen dar (COLE 1994, KOMORBA *et al.* 1995). Die Konjugation erfolgt über einen nukleophilen Angriff des Cystein-Schwefelatoms des Glutathions an ein elektrophiles Zentrum des Fremdstoffmoleküls und führt zur Ausbildung einer Thioetherbindung. Die entstandenen Glutathion-Konjugate werden anschließend aktiv mittels speziellen Membran-Transportproteinen in die Vakuole transportiert (HÖRTENSTEINER *et al.* 1993, MARTINOIA *et al.* 1993) und können dort zu Cystein-Konjugaten weiter metabolisiert werden (COLEMAN *et al.* 1997).

Glycosylierungen werden in Pflanzen durch spezifische Glycosyltransferasen (O-, N-, S- und C-Glycosyltransferasen) katalysiert (FREAR 1968, WETZEL und SANDERMANN JR. 1994, SCHWITZGUÉBEL und VANEK 2003) und ähneln der Glucuronidierung in Säugern (SANDERMANN JR. 1992). Verbindungen, die alkoholische oder phenolische Hydroxygruppen enthalten, werden zu  $\beta$ -O-D-Glucosiden konjugiert, während primäre und sekundäre Amine zur Bildung von N-Glucosiden führen. Aus Carbonsäuren können zudem die entsprechenden Glucoseester entstehen (KOMORBA *et al.* 1995). Die so gebildeten Glucose-Konjugate stellen jedoch häufig nur Zwischenprodukte des Phase II-Metabolismus dar. Die Addition weiterer Zuckermoleküle wie Glucose, Xylose und Arabinose wird in vielen Studien berichtet und führt zur Bildung von Di- und Oligoglycosiden (EDWARDS *et al.* 1982, SANDERMANN JR. *et al.* 1997, DAY und SAUNDERS 2004, MACHERIUS *et al.* 2012). Zudem können durch Acylierung mit Malonsäure an der 6-OH-Gruppe der Glucoside die entsprechenden O-Malonylglucoside gebildet werden, welche als chemisch labil gelten und daher bei der Analyse pflanzlicher Extrakte lange Zeit übersehen wurden (EDWARDS *et al.* 1982, COLE 1994, SANDERMANN JR. 1994,

KOMOBA *et al.* 1995). Die Malonylierung gilt als finaler Schritt dieser Reaktionen und dient als Signal für den Transport der Konjugate in die Vakuole oder den Apoplast (SCHMITT und SANDERMANN JR. 1982, SCHMITT *et al.* 1985, SANDERMANN JR. 1992).

Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften können Phase II-Metaboliten nur in beschränktem Maße lipophile Biomembranen passieren und werden somit in geringerem Maße in Pflanzen verteilt als ihre Ausgangsverbindungen (COLEMAN *et al.* 1997). Die Glycosylierung stellt jedoch, im Gegensatz zur Glutathion-Konjugation, einen reversiblen Prozess dar, sodass durch Hydrolyse die jeweilige Ausgangsverbindung wieder freigesetzt und innerhalb der Pflanze verteilt werden kann (EDWARDS *et al.* 1982, COLE 1994).

### *Phase III*

In Phase III des Metabolismus bestehen wesentliche Unterschiede zwischen dem pflanzlichen und dem tierischen Fremdstoffmetabolismus. Während im Säugerorganismus eine direkte Ausscheidung der hydrophilen Metaboliten über Urin oder Fäzes erfolgt, werden in Pflanzen die gebildeten Phase II-Metaboliten in der Vakuole oder dem Apoplast gespeichert (COLE 1994, KOMOBA *et al.* 1995, COLEMAN *et al.* 1997). Darüber hinaus ist in Pflanzen die Einlagerung der Ausgangsverbindungen bzw. Metaboliten in die Zellwand möglich. Durch kovalente Bindung an Zellwandbestandteile wie Lignin, Pektin, Zellulose, Hemicellulose oder Proteine kommt es zur Bildung unlöslicher bzw. gebundener Rückstände (SANDERMANN JR. 1987, KOMOBA *et al.* 1995, COLEMAN *et al.* 1997, SCHMIDT 1999), welche analytisch häufig schwer zu erfassen sind (BURKEN 2003).

Der Transfer der Fremdstoffe bzw. Metaboliten durch die entsprechenden Biomembranen (Tonoplast und Zellmembran) in die jeweiligen Speicherorgane (Vakuole, Apoplast und Zellwand) wird durch einen aktiven Transport mittels Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Transportproteinen ermöglicht (COLEMAN *et al.* 1997).

### *Metabolismus-Studien*

Der zuvor dargestellte Stand des Wissens bezüglich des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus resultiert überwiegend aus Pestizid-Studien. Dies liegt darin begründet, dass Pestizide vorsätzlich auf Pflanzen aufgebracht werden und Rückstände dieser Verbindungen in Lebensmitteln verbleiben können.

Mit der zunehmenden Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft ist jedoch ein neuer Eintragsweg weiterer organischer Spurenstoffe wie Arzneimittel, Industriechemikalien oder Waschmittel entstanden. Infolgedessen wurden insbesondere in den vergangenen drei Jahren zunehmend Wirkstoffe von Arzneimitteln

und Industriechemikalien in pflanzlichen Metabolismus-Studien untersucht. Eine Zusammenfassung bisheriger Studien ist in **Tabelle 2-2** gegeben.

Erste Studien zum Metabolismus von pharmakologisch wirksamen Substanzen in Pflanzen wurden von HUBER *et al.* und BARTHA *et al.* 2010 durchgeführt. Dabei wurden ein Glutathion- und ein Glucose-Konjugat von Acetaminophen (Paracetamol) (HUBER *et al.* 2009, BARTHA *et al.* 2010), sowie 4-OH-Diclofenac und 4-OH-Diclofenac-Glucose in Meerrettich-Haarwurzelkulturen identifizieren (HUBER *et al.* 2012).

Der Metabolismus von Triclosan (Bakterizid) wurde in zwei Arbeiten von MACHERIUS *et al.* untersucht. Dabei konnten in Karotten-Zellkulturen und Meerrettich-Haarwurzelkulturen bis zu 23 Metaboliten identifiziert werden (MACHERIUS *et al.* 2012, MACHERIUS *et al.* 2014). Bei den identifizierten Metaboliten handelt es sich mehrheitlich um Saccharid- und Sulfosaccharid-Konjugate.

SUN *et al.* 2015 konnten in Salat, Erdbeere und Karotte die Hydrolyse der Weichmacher Bis(2-ethylhexyl)phthalat und Dibutylphthalat in ihre Monoester nachweisen.

LEFEVRE *et al.* 2015 konnten nicht nur Glucose- und Aminosäure-Konjugate von Benzotriazol (Korrosionsinhibitor) in hydroponisch kultiviertem Acker-Schmalwand nachweisen, sondern auch eine Analogie zum Auxin/Tryptophan-Metabolismus aufzeigen. Ausschließlich Phase I-Metaboliten wurden für Carbamazepin (Arzneimittel) in Karottenzellkulturen identifiziert (WU *et al.* 2016).

Für Oxybenzon (UV Filter in Kosmetika) ist die Bildung von Oxybenzon-Malonyl-Glucose aus Oxybenzon-Glucose in Meerrettich-Haarwurzelkulturen beschrieben (CHEN *et al.* 2016).

In einer aktuellen Studie von FU *et al.* 2017 wurde in Zellkulturen erneut der Metabolismus von Diclofenac untersucht. In dieser Arbeit konnte durch die Verwendung von radioaktiv markiertem (<sup>14</sup>C) Diclofenac nachgewiesen werden, dass mehr als 40% des dotierten Diclofenacs in Form von gebundenen Rückständen in die Zellen eingelagert werden.

Schließlich konnten in einer kürzlich erschienen Studien von EMHOFER *et al.* 2017 überwiegend Saccharid- (Malonyl-Glucose-Konjugate) und Aminosäuren-Konjugate (Glutamin- und Glutaminsäure-Konjugate) von Ketoprofen, Mefenamin-Säure, Naproxen und Diclofenac in hydroponisch kultivierter Kresse identifiziert werden.

**Tabelle 2-2:** Zusammenstellung von Studien zum Metabolismus von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen (ausgenommen Pestizide) in Pflanzen.

Substanz	Pflanze	Kultivierung	Metaboliten		Referenz
			n	Art	
Acetaminophen	Meerrettich	Haarwurzelkultur	2	Phase II	HUBER <i>et al.</i> 2009
Acetaminophen	Brauner Senf	Hydroponik	2	Phase II	BARTHA <i>et al.</i> 2010
Diclofenac	Meerrettich	Haarwurzelkultur	2	Phase I/II	HUBER <i>et al.</i> 2012
Triclosan	Karotte	Zellkultur	8	Phase II	MACHERIUS <i>et al.</i> 2012
	Meerrettich	Haarwurzelkultur	23	Phase I/II	
Bis(2-ethylhexyl)phthalat, Dibutylphthalat	Salat, Erdbeere, Karotte	Topfexperiment (Sand), Karotten-Zellkultur	1	Phase I	SUN <i>et al.</i> 2015
Benzotriazol	Acker-Schmalwand ( <i>Arabidopsis</i> )	Hydroponik	6	Phase II	LEFEVRE <i>et al.</i> 2015
Carbamazepin	Karotte	Zellkultur	5	Phase I	WU <i>et al.</i> 2016
Oxybenzon	Meerrettich	Haarwurzelkultur	2	Phase II	CHEN <i>et al.</i> 2016
Diclofenac	Acker-Schmalwand ( <i>Arabidopsis</i> )	Zellkultur	10	Phase I/II	FU <i>et al.</i> 2017
Ketoprofen	Kresse	Hydroponik	4	Phase II	EMHOFER <i>et al.</i> 2017
Mefenamin-Säure			3	Phase I/II	
Naproxen			4	Phase II	
Diclofenac			5	Phase I/II	

### 2.2.3 Kultivierungssysteme zur Untersuchung von Aufnahme, Verteilung und Metabolismus

Untersuchungen zum Verhalten von organischen Spurenstoffen in Pflanzen können unter verschiedenen Bedingungen erfolgen: im Labor, im Gewächshaus und im Freiland. Je nach Ziel- und Aufgabenstellung sind bestimmte Kultivierungssysteme vorzuziehen. Im Folgenden werden die in der Literatur am häufigsten verwendeten Kultivierungssysteme vorgestellt und die jeweiligen Vor- und Nachteile (s. **Tabelle 2-3**) erläutert.

Im Labor erfolgt die Kultivierung in der Regel mittels *in vitro*-Systemen. Zu den *in vitro*-Systemen zählen beispielsweise Zellsuspensionskulturen und Haarwurzelkulturen. *In vitro*-Systeme bieten gegenüber anderen Kultivierungssystemen den Vorteil, dass die Wachstumsbedingungen leicht zu kontrollieren und standardisieren sind und der Zeit-, Platz- und Ausrüstungsbedarf relativ gering ist (SANDERMANN JR. *et al.* 1984, DORAN 2009). Außerdem können mikrobielle und abiotische Transformationsprozesse

weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Kultivierung steril und unter Lichtausschluss erfolgt (SANDERMANN JR. *et al.* 1977). Voraussetzung für die Verwendung von *in vitro*-Systemen ist jedoch, dass eine etablierte Kultur vorhanden ist. *In vitro*-Systeme wurden in der Vergangenheit größtenteils zur Untersuchung des pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus eingesetzt (HARMS und LANGEBARTELS 1986, KOMOŔA *et al.* 1995, HÜCKELHOVEN *et al.* 1997, MACHERIUS *et al.* 2012, MACHERIUS *et al.* 2014).

Im Gewächshaus kultivierte Pflanzen werden üblicherweise in Töpfen mit organischem Substrat (z. B. Erde) oder hydroponisch (d. h. in Nährlösung, TREJO-TÉLLEZ und GÓMEZ-MERINO 2012) angebaut. Der Vorteil hydroponischer Experimente gegenüber der Verwendung von organischem Substrat oder Feldstudien ist, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse höher und der experimentelle Aufwand geringer ist. Außerdem lassen sich Stoffverteilungen einfacher studieren als in matrixreichen Bodenkulturen, in denen der Einfluss der Bodenpassage, und damit die Bioverfügbarkeit einer Verbindung, berücksichtigt werden muss. Im Gegensatz zu *in vitro*-Systemen kann in Gewächshausexperimenten das Verhalten einer Verbindung in intakten Pflanzen untersucht werden. Zudem können Aufnahme- und Verteilungsprozesse innerhalb der Pflanzen berücksichtigt werden. Gewächshausexperimente werden daher in der Regel zur Untersuchung der Aufnahme und Verteilung von Fremdstoffen in Pflanzen eingesetzt.

Eine weitere Form der Kultivierung stellt das Freiland dar. Sogenannte Feldstudien bieten sich insbesondere dann an, wenn eine Untersuchung unter möglichst realen Wachstumsbedingungen und -szenarien erfolgen soll. Dies ist beispielsweise dann erforderlich, wenn die Exposition der Bevölkerung gegenüber bestimmten Substanzen oder Substanzklassen abgeschätzt werden soll (MALCHI *et al.* 2014).

**Tabelle 2-3:** Vor- und Nachteile verschiedener Kultivierungssysteme zur Untersuchung der Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen

	Labor	Gewächshaus		Freiland
	<i>in vitro</i> (Zellkulturen)	Hydroponik	Topf mit org. Substrat	Lysimeter, Feld
Komplexität	-	+	++	+++
Reproduzierbarkeit	+++	++	+	-
experimenteller Aufwand (Zeit und Raum)	+	++	++	+++
Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren	-	+	++	+++
mikrobielle Transformation	-	+	++	+++
Übertragbarkeit in die Realität	+	+	++	+++
Aufnahme	-	++	+++	+++
Verteilung	-	+++	+++	+++
Metabolismus	+++	+++	++	+

- = gering, +++ = hoch

### 2.3 Ausgewählte abwasserbürtige organische Spurenstoffe

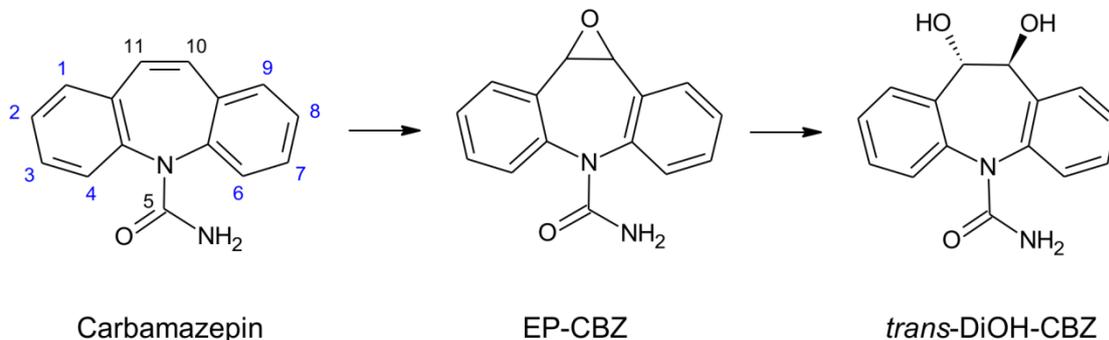
In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem das Verhalten von drei abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Pflanzen untersucht. In diesem Kapitel werden die ausgewählten Substanzen Carbamazepin, Lamotrigin und Simvastatinsäure näher vorgestellt und der Stand des Wissens hinsichtlich des Umweltverhaltens dieser Stoffe eingehend betrachtet.

#### 2.3.1 Carbamazepin

##### *Eigenschaften und Verwendung*

Carbamazepin (CBZ) ist ein weltweit verbreiteter Wirkstoff, der vor allem in Arzneimitteln gegen Epilepsie enthalten ist. Darüber hinaus wird Carbamazepin zur medikamentösen Behandlung von bipolaren Störungen (manisch-depressive Erkrankungen), Schizophrenie und Trigeminusneuralgie (Gesichtsschmerz) eingesetzt (ALBANI *et al.* 1995). Die verordnete Tagesdosis liegt im Durchschnitt bei 1000 mg/d (WIDO 2016). Im Jahr 2010 lag in Deutschland die Verkaufsmenge bei circa 60 t (SCHWABE und PAFFRATH 2011). Aufgrund der Entwicklung neuer Antiepileptika wie Oxcarbazepin, Lamotrigin, Topiramaten oder Gabapentin, denen in Einzelfällen eine bessere Verträglichkeit zugeschrieben wird (BAUER 1997, MCCORRY *et al.* 2004), sind die Verschreibungsmengen von Carbamazepin seit 2003 leicht rückläufig (SCHWABE und PAFFRATH 2011).

Carbamazepin wird im menschlichen Körper größtenteils (~71%) metabolisiert; nur etwa 1% des Pharmazeutikums werden unverändert mit dem Urin und etwa 28% mit dem Fäzes ausgeschieden (FAIGLE *et al.* 1976, RICHTER *et al.* 1978). Der Hauptabbauweg erfolgt im menschlichen Organismus über den noch aktiven Primärmetaboliten Carbamazepin-10,11-epoxid (EP-CBZ) zum inaktiven *trans*-10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin (*trans*-DiOH-CBZ, **Abbildung 2-5**) (FRIGERIO *et al.* 1972, BAKER *et al.* 1973). Darüber hinaus sind 31 weitere Humanmetaboliten bekannt (LERTRATANANGKON und HORNING 1982), wobei *trans*-DiOH-CBZ, CBZ-N-Glucuronid und hydroxyliertes Carbamazepin (2-OH-, 3-OH-CBZ) im Urin anteilmäßig (im Mittel etwa 25%, 11% bzw. je 5%) die Hauptmetaboliten darstellen (FAIGLE *et al.* 1976, RICHTER *et al.* 1978, EICHELBAUM *et al.* 1982, BERNUS *et al.* 1994).



**Abbildung 2-5:** Hauptabbauweg von Carbamazepin im menschlichen Körper.

#### *Verhalten und Vorkommen in der Umwelt*

Carbamazepin wird in Kläranlagen nur unzureichend eliminiert oder abgebaut. Untersuchungen zum biologischen Abbau bzw. zur Adsorption von Carbamazepin an Klärschlamm verzeichneten eine Carbamazepin-Abnahme von weniger als 10% (TERNES 1998, JOSS *et al.* 2005, CELIZ *et al.* 2009). In zahlreichen Studien wird sogar von einer Zunahme der Carbamazepin-Konzentration während der Klärwerkspassage berichtet (ZUEHLKE *et al.* 2004, VIENO *et al.* 2007). Dies ist vermutlich auf die Spaltung des CBZ-N-Glucuronids zurückzuführen, welches im Zulauf, nicht jedoch im Ablauf nachgewiesen wurde (VIENO *et al.* 2007). Neuere Studien deuten darauf hin, dass etwa 90% des im Abwasser enthaltenen Carbamazepins durch eine Behandlung mit Ozon abgebaut werden können (GEBHARDT und SCHRÖDER 2007, HÜBNER *et al.* 2014). Als Hauptabbauprodukt wurde dabei 1-(2-Benzaldehyd)-4-hydro-(1H,3H)-chinazolin-2-on (BQM) identifiziert (HÜBNER *et al.* 2014).

Carbamazepin ist eines der am häufigsten detektierten Arzneimittel in behandelten Abwässern und Oberflächengewässern und kann aufgrund seiner hohen Persistenz in der

aquatischen Umwelt als anthropogener Marker für kommunale Abwässer dienen (CLARA *et al.* 2004, SCHRAMM *et al.* 2006, JEKEL *et al.* 2015). Die durchschnittliche Carbamazepin-Konzentration deutscher Klärwerksabläufe liegt bei etwa 1,5 µg/L (BAHLMANN 2012). Ein weltweiter Vergleich zeigt, dass die Carbamazepin-Konzentration im Abwasser üblicherweise im oberen ng/L- bzw. unteren µg/L-Bereich liegt (REEMTSMA *et al.* 2006, ZHANG *et al.* 2008, BAHLMANN 2012).

Neben Carbamazepin wurden bereits einige Carbamazepin-Humanmetaboliten, darunter EP-CBZ, *trans*-DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ, in behandeltem Abwasser nachgewiesen (MIAO *et al.* 2005, LECLERCQ *et al.* 2009, BAHLMANN *et al.* 2014). Die Konzentration des Hauptmetaboliten *trans*-DiOH-CBZ ist, sowohl in Abwässern als auch in Oberflächengewässern, in der Regel um den Faktor 2 bis 5 höher als die von Carbamazepin (MIAO und METCALFE 2003, MIAO *et al.* 2005, KAHLE *et al.* 2009, LECLERCQ *et al.* 2009).

Der Carbamazepin-Gehalt europäischer Oberflächengewässer liegt meist im mittleren bis oberen ng/L-Bereich (TERNES 1998, ÖLLERS *et al.* 2001, LIEBIG *et al.* 2006, LOOS *et al.* 2009, CALDERON-PRECIADO *et al.* 2011). Langzeituntersuchungen (3-10 Jahre) im Rhein und in der Elbe ergaben eine durchschnittliche Carbamazepin-Konzentration von 0,078 µg/L (Rhein) bzw. im Median 0,055 µg/L (Elbe) (WIEGEL *et al.* 2004, SACHER *et al.* 2008). Deutsche Oberflächengewässer zählen im weltweiten Vergleich zu den am höchsten mit Carbamazepin belasteten Gewässern - die durchschnittliche Carbamazepin-Konzentration liegt in Deutschland bei etwa 0,5 µg/L (LIEBIG *et al.* 2006, ZHANG *et al.* 2008). In semiariden Regionen, wie Jordanien, wurde im Median eine Konzentration von 0,8 µg/L verzeichnet (ZEMANN *et al.* 2014).

Carbamazepin weist, aufgrund seiner mäßig lipophilen Eigenschaften ( $\log K_{OW} = 2,45$ ) eine geringe Adsorption an Bodenpartikel und eine hohe Mobilität in der ungesättigten Zone auf. Zudem wurden Sediment/Boden-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ -Werte, s. Kapitel 2.2.1.2) in einem Bereich von 0,08 - 25 L/kg bzw.  $K_{OC}$ -Werte zwischen 80 und 365 L/kg ermittelt, welche auf eine geringe bis moderate Bodenretention hinweisen (TERNES *et al.* 2004, CHEFETZ *et al.* 2008, GIELEN *et al.* 2009). Folglich kann Carbamazepin regelmäßig im Uferfiltrat und Grundwasser nachgewiesen werden (HEBERER *et al.* 2001, BLAC 2003, FENZ *et al.* 2005). Eine europaweite Studie, in der 164 Grundwasserproben aus 23 Ländern untersucht wurden, ergab, dass Carbamazepin in 42% der Proben über der Nachweisgrenze von 0,5 ng/L detektiert werden konnte. Die durchschnittliche Konzentration betrug dabei 12 ng/L (LOOS *et al.* 2010).

Neben dem Sorptionsverhalten wurde in zahlreichen Laborversuchen auch der mikrobielle Abbau von Carbamazepin im Boden untersucht. Dabei erwies sich Carbamazepin unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit einer Halbwertszeit von mehr als 200 Tagen als

äußerst persistent (MAENG *et al.* 2011, YU *et al.* 2013, GROSSBERGER *et al.* 2014, DURAN-ALVAREZ *et al.* 2015).

In Untersuchungen zum photolytischen Abbau von Carbamazepin wurden Halbwertszeiten von 3 bis 122 Stunden ermittelt (LAM und MABURY 2005, MATAMOROS *et al.* 2009, CALISTO *et al.* 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein niedriger pH-Wert, ein erhöhter Chloridgehalt, sowie ein hoher Anteil an gelöstem organischem Kohlenstoff den photolytischen Abbau von Carbamazepin fördern (DOLL und FRIMMEL 2003, CHIRON *et al.* 2006, CALISTO *et al.* 2011).

Schließlich konnte auch die Aufnahme von Carbamazepin aus dem Bewässerungswasser und die anschließende Verteilung in Pflanzen in Labor- und Gewächshausstudien nachgewiesen werden (s. **Tabelle 2-1** in Kapitel 2.2.1.3). Dabei wird mehrheitlich von einer Anreicherung des Carbamazepins in den Blättern der Pflanzen berichtet. Die in Blättern ermittelten Biokonzentrationsfaktoren liegen in einem Bereich von 5,1 – 120 L/kg und damit deutlich über den in Wurzeln (<10 L/kg) und Früchten (0,8 - 1 L/kg) ermittelten BCFs (HERKLOTZ *et al.* 2010, SHENKER *et al.* 2011, WU *et al.* 2013, HYLAND *et al.* 2015).

Carbamazepin gilt, aufgrund seines log  $K_{ow}$  von 2,45, als mäßig lipophil und liegt zudem über den gesamten pH-Bereich ungeladen vor. Wie in Kapitel 2.2.1.1 dargestellt, können mäßig lipophile, neutrale Verbindungen weitestgehend ungehindert durch Zellmembranen diffundieren und somit in Pflanzen aufgenommen und verteilt werden. Innerhalb der Pflanze erfolgt der Transport vorwiegend im Xylem und somit in Richtung des Transpirationsstroms, was letztlich zu einer Anreicherung von Carbamazepin in den Blättern führt. Dieses Verhalten von Carbamazepin führte dazu, dass die Substanz eine der am häufigsten detektierten und quantitativ bedeutsamsten abwasserbürtigen Verbindungen in Pflanzen ist.

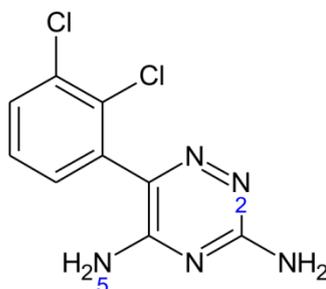
Der pflanzliche Metabolismus von Carbamazepin ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch weithin unverstanden. Bisherige Untersuchungen beschränken sich auf eine Metabolismus-Studie von WU *et al.* 2016 mittels Karotten-Zellkulturen (s. **Tabelle 2-2** in Kapitel 2.2.2).

### 2.3.2 Lamotrigin

#### *Eigenschaften und Verwendung*

Lamotrigin (**Abbildung 2-6**) wird, häufig in Kombination mit Carbamazepin, zur medikamentösen Behandlung von Epilepsie und Depressionen eingesetzt (VAJDA *et al.* 2013). Der Wirkstoff ist unter dem Handelsnamen Lamictal<sup>®</sup> erhältlich und gehört chemisch gesehen zur Klasse der Phenyltriazine (FDA 2016a). Die verordnete Tagesdosis liegt in einem Bereich zwischen 25 und 400 mg (SARACINO *et al.* 2007).

Lamotrigin wird im menschlichen Körper zu etwa 90% metabolisiert. Der Hauptabbau erfolgt durch Glucuronidierung zum Lamotrigin-2N-Glucuronid (76%) und Lamotrigin-5N-Glucuronid (10%). Als weitere Metaboliten wurden 2N-Methyl-Lamotrigin (0,14%) und Lamotrigin-2N-Oxid identifiziert (BECK *et al.* 2006, SIDHU *et al.* 2006, LU und UETRECHT 2007, SARACINO *et al.* 2007).



**Abbildung 2-6:** Strukturformel von Lamotrigin

### *Verhalten und Vorkommen in der Umwelt*

Da Lamotrigin ein vergleichsweise neuer Wirkstoff ist, wurde sein Verhalten in der Umwelt bisher nur in wenigen Studien untersucht. Im Jahr 2010 wurden Lamotrigin und sein Haupthumanmetabolit, das 2N-Glucuronid, erstmals in den USA in behandeltem Abwasser, Oberflächen-, Grund- und sogar Trinkwasser nachgewiesen (FERRER und THURMAN 2010). Dabei wurde Lamotrigin in 94% und das 2N-Glucuronid in 21% der untersuchten Klärwerksabläufe (insgesamt 34 Proben) mit einer durchschnittlichen Konzentration von 488 ng/L (Median 443 ng/L) bzw. 209 ng/L (Median <50 ng/L) detektiert. In Grundwässern wurden im Median aller untersuchten Proben 366 ng/L Lamotrigin ermittelt, in Oberflächenwässern 19 ng/L und in Trinkwässern <10 ng/L (FERRER und THURMAN 2010). Nachfolgende Untersuchungen von 24 Klärwerksabläufen und ca. 100 Oberflächenwässern in den USA haben gezeigt, dass Lamotrigin, neben Carbamazepin, zu den am häufigsten detektierten Verbindungen zählt und eine hohe Persistenz in der aquatischen Umwelt aufweist (FERRER und THURMAN 2012, WRITER *et al.* 2013).

In einer Studie zum photolytischen Abbau wurde, bei pH 7, eine Halbwertszeit für Lamotrigin von über 100 h ermittelt, was auf eine ebenfalls hohe Beständigkeit in der Umwelt hinweist (YOUNG *et al.* 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Lamotrigin in Kläranlagen keinem nennenswerten Abbau unterliegt (ZONJA *et al.* 2015). Selbst durch zusätzliche Behandlungsverfahren, wie Ozonung und UV-Bestrahlung, wird Lamotrigin nicht entfernt (KEEN *et al.* 2014).

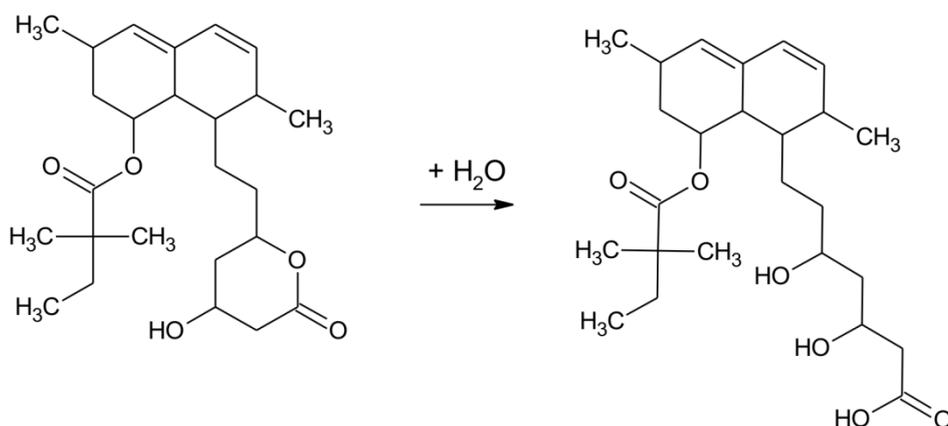
In Untersuchungen zum biologischen Abbau von Arzneimitteln in landwirtschaftlichen Böden, welche mit behandeltem Abwasser bewässert wurden, weist Lamotrigin eine ähnlich hohe Persistenz auf wie Carbamazepin (GROSSBERGER *et al.* 2014). Die Sorption an Bodenpartikel ( $K_{OC}$ -Werte im Bereich von 200 bis 800 L/kg) ist jedoch stärker und die Bioverfügbarkeit somit geringer als die von Carbamazepin (BORGMAN und CHEFETZ 2013, PAZ *et al.* 2016).

Eine Aufnahme und Verteilung von Lamotrigin in Pflanzen konnte in Studien von GOLDSTEIN *et al.* 2014 und MALCHI *et al.* 2014 nachgewiesen werden. Die Substanz wurde dabei in allen untersuchten Pflanzenorganen von Tomate (Blätter und Früchte), Gurke (Blätter und Früchte), Süßkartoffel und Karotte (jeweils Wurzel und Blatt), mit Ausnahme der Tomatenfrüchte, nachgewiesen. Biokonzentrationsfaktoren von Lamotrigin wurden in diesen Arbeiten nicht berechnet. Bezüglich des Metabolismus von Lamotrigin in Pflanzen sind zum jetzigen Zeitpunkt keine Arbeiten bekannt.

### 2.3.3 Simvastatinsäure

#### *Eigenschaften und Verwendung*

Die Simvastatinsäure ist der aktive Humanmetabolit des Wirkstoffs Simvastatin (**Abbildung 2-7**). Simvastatin zählt zur Wirkstoffgruppe der Statine und wird weltweit in cholesterinsenkenden Arzneimitteln eingesetzt. Mit 66 Millionen Verschreibungen zählte Simvastatin in den USA 2015 zu den am häufigsten verschriebenen Wirkstoffen (OTTMAR *et al.* 2010, AITKEN *et al.* 2016). Nach oraler Aufnahme wird Simvastatin in der Leber nahezu vollständig (~83%) zur Simvastatinsäure hydrolysiert (s. **Abbildung 2-7**) und als solche über den Urin (15%) und Fäzes (85%) ausgeschieden (VICKERS *et al.* 1990a, VICKERS *et al.* 1990b, DESAGER und HORSMANS 1996). Die empfohlene Tagesdosis liegt bei 5 - 40 mg Simvastatin (FDA 2016b).



**Abbildung 2-7:** *In vivo* Reaktion von Simvastatin (links) zur Simvastatinsäure (rechts).

### *Verhalten und Vorkommen in der Umwelt*

Trotz der hohen Verschreibungsraten von Simvastatin und der nahezu vollständigen Ausscheidung des aktiven Metaboliten Simvastatinsäure, ist über das Umweltverhalten beider Verbindungen wenig bekannt.

Untersuchungen zum Verhalten von Simvastatin während der Klärwerkspassage haben ergeben, dass 85-90% der Substanz durch eine zweistufige Behandlung entfernt werden können; davon ca. 90% aufgrund eines biologischen Abbaus und etwa 10% durch Sorption an Klärschlamm. Transformationsprodukte wurden in dieser Arbeit nicht identifiziert (OTTMAR *et al.* 2010, OTTMAR *et al.* 2012).

In dem Zu- und Ablauf eines Klärwerks in Las Vegas wurde eine Simvastatin-Konzentration von weniger als 2,5 ng/L bzw. <0,5 ng/L ermittelt, was eine gute Eliminierung der Verbindung in Kläranlagen bestätigt. Im Vergleich dazu lag die Konzentration an Simvastatinsäure in diesen Proben bei 10 ng/L bzw. <0,5 ng/L. In einem nahegelegenen Oberflächengewässer, welches mit behandeltem Abwasser dieser und einer weiteren Kläranlage gespeist wird, wurde die Simvastatinsäure mit einer Konzentration von 0,74 ng/L und Simvastatin <0,25 ng/L nachgewiesen (VANDERFORD und SNYDER 2006).

Im Rahmen einer Studie von LANGFORD und THOMAS 2009 wurden vergleichbare Simvastatin-Konzentrationen (im unteren ng/L-Bereich) im Zu- und Ablauf einer norwegischen Kläranlage berichtet. Obwohl die Simvastatinsäure bei der Analyse dieser Proben nicht betrachtet wurde, wird vermutet, dass ihre Konzentration über der Simvastatin-Konzentration liegt.

In einer nachfolgenden Studie von LANGFORD und THOMAS 2011 wurde neben Simvastatin auch die Simvastatinsäure berücksichtigt. Beide Verbindungen waren weder in den Zu- noch in den Abläufen zweier Klärwerke in Oslo und Tromsø nachweisbar. In selbiger Studie wurden außerdem Oberflächenwasser und Sediment von acht Probenahmestellen im Oslofjord analysiert. Die Simvastatinsäure wurde dabei in 50% der Oberflächenwasser- und 25% der Sedimentproben in einem Konzentrationsbereich zwischen 27 und 66 ng/L bzw. im Mittel 3 ng/g Trockengewicht nachgewiesen.

Arbeiten zur Untersuchung des Verhaltens von Simvastatinsäure in Pflanzen sind zum jetzigen Zeitpunkt keine bekannt. Ausgehend von den physikochemischen Eigenschaften der Simvastatinsäure (s. Anhang A.1) wird eine Aufnahme und Verteilung der Verbindung in Pflanzen angenommen, da (1) die Simvastatinsäure mit einem log D von 2,69 (bei pH 6) mäßig lipophil ist, (2) die Verbindung nicht volatil ist, und (3) sollte es aufgrund des  $pK_a$  von 4,2 zu einer Ionenfalle (s. Kapitel 2.2.1.2) im Phloem (pH 8) kommen und somit eine Verteilung der Simvastatinsäure in die Früchte und Wurzeln erfolgen.

### 2.4 Analytik

In den vergangenen Jahren wurde in der Literatur eine Vielzahl an spurenanalytischen Verfahren beschrieben, die eine qualitative und quantitative Bestimmung von organischen Spurenstoffen in pflanzlichen Matrices ermöglichen. Je nach Polarität und Flüchtigkeit des Analyten, haben sich dabei die Gas- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (GC und HPLC), als chromatographische Trennverfahren, gekoppelt mit einer massenspektrometrischen Detektion etabliert. Für diese Verfahren ist jedoch zunächst eine adäquate Probenvorbereitung notwendig. Die für pflanzliche Proben am häufigsten verwendeten Probenvorbereitungstechniken sind im Folgenden kurz dargestellt. Für einen umfassenden Überblick sei auf ein Review von MATAMOROS *et al.* 2012 verwiesen.

#### 2.4.1 Probenvorbereitung

Da Pflanzen eine sehr diverse und komplexe Probenmatrix darstellen, ist bei der Analyse von organischen Spurenstoffen in Pflanzen der mit Abstand bedeutsamste Schritt die Probenvorbereitung. Sie umfasst, neben der möglichst vollständigen und reproduzierbaren Extraktion der zu untersuchenden Analyten, die Abtrennung störender Matrixbestandteile und die Anreicherung der Analyten für eine nachfolgende Analyse.

##### *Extraktion*

Das am häufigsten verwendete Extraktionsverfahren von organischen Spurenstoffen aus pflanzlichen Matrices ist die Fest-Flüssig-Extraktion (SLE, *solid liquid extraction*). Hierbei wird durch die Verwendung geeigneter Lösungsmittel (z. B. Wasser, Methanol, Acetonitril) ein Übergang der Analyten aus der festen in die flüssige Phase erzielt. Durch Zugabe entsprechender Säuren, Puffer oder Salze kann die Phasenverteilung der Analyten in das Extraktionsmittel begünstigt werden (MATAMOROS *et al.* 2012).

Darüber hinaus kann durch Ultraschall (ULE, *ultrasonic liquid extraction*) oder Druck und erhöhte Temperaturen eine effizientere Extraktion erzielt werden (ASE, *accelerated solvent extraction*) (CALDERON-PRECIADO *et al.* 2009, WU *et al.* 2012).

##### *Aufreinigung und Anreicherung*

Dem zuvor genannten Extraktionsschritt folgt üblicherweise eine Aufreinigung (*clean up*) und Anreicherung der Analyten mittels Festphasenextraktion (SPE, *solid phase extraction*) (BOTITSI *et al.* 2011, MATAMOROS *et al.* 2012). Hierbei wird der Extrakt auf eine SPE-Kartusche gegeben, welche mit einem bestimmten Sorbens (z. B. modifizierte Silicagel-Phasen (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) oder Polymere) gefüllt ist. Aufgrund der unterschiedlichen

Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase kann so eine Abtrennung der Analyten von begleitenden Matrixverbindungen erzielt werden.

### *QuEChERS-Methode*

Eine weitere, häufig eingesetzte Probenvorbereitungstechnik, welche ursprünglich als Multimethode für die Bestimmung von Pestiziden in Obst und Gemüse entwickelt wurde, ist die QuEChERS-Methode (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*). In drei direkt aufeinander folgenden Schritten wird dabei die homogenisierte Pflanzenprobe zunächst mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, anschließend die wässrige und organische Phase durch Zugabe von Salzen getrennt, und schließlich der Extrakt mittels dispersiver Festphasenextraktion aufgereinigt (ANASTASSIADES *et al.* 2003). Die QuEChERS-Methode stellt eine national (im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung) und international (von der Association of Official Analytical Chemists (AOAC) und dem Europäischen Komitee für Normung (CEN)) anerkannte Extraktionsmethode für Pestizide in Lebensmitteln dar (AOAC 2007, LEHOTAY 2007, CEN 2008).

### 2.4.2 Nachweis und Quantifizierung von Verbindungen mittels LC-MS/MS

Heutzutage stellt die Flüssigchromatographie (LC, *liquid chromatography*) gekoppelt mit der Massenspektrometrie die am weitesten verbreitete instrumentelle Analysentechnik zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von organischen Spurenstoffen in pflanzlichen Matrices dar (BOTITSI *et al.* 2011, MATAMOROS *et al.* 2012). Mit der Massenspektrometrie steht nicht nur ein universelles, sondern auch empfindliches und selektives Detektionsverfahren zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die LC gekoppelt mit einem Triple-Quadrupol (QqQ)-Massenspektrometer und einer Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) verwendet. Abhängig von der Zielsetzung und der zu untersuchenden Analyten bieten sich aber auch andere Ionisationsmethoden (z. B. APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) und Massenanalysatoren (z. B. Ionenfallen-, Flugzeitanalysatoren) an. Durch Kopplung mehrerer Massenanalysatoren hintereinander können sogenannte MS/MS-Experimente ermöglicht werden, welche die Selektivität und Sensitivität einer quantitativen Analyse zusätzlich erhöhen. Diese, auch als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnete Technik, wird nachfolgend am Beispiel eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers erläutert.

Bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern dienen sowohl der erste als auch der dritte Quadrupol als Massenanalysator. Der zweite Quadrupol fungiert als Kollisionszelle, in der die Ionen durch Stöße mit einem Inertgas (z. B. Argon) in für ihre Struktur spezifische Fragmentationen gespalten werden (GROSS 2004). Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

können in verschiedenen Messmodi betrieben werden: Vorläuferionen-Analyse (*precursor ion scan*), Produktionen-Analyse (*product ion scan*), Neutralverlust-Analyse (*neutral loss scan*) und *multiple reaction monitoring* (MRM). In der vorliegenden Arbeit erfolgten der Nachweis und die Quantifizierung der Zielanalyten im MRM-Modus. Dieser erlaubt im ersten Quadrupol die selektive Auswahl eines Vorläufer-Ions, welches in der Kollisionszelle fragmentiert wird. Im dritten Quadrupol können ein oder mehrere der so entstandenen Produkt-Ionen ausgewählt, an den Detektor geleitet daraus ein MRM-Spektrum generiert werden (GROSS 2004). Für die eindeutige Identifizierung einer Verbindung sollten mindestens zwei Produkt-Ionen berücksichtigt werden (EC 2015).

Trotz der hohen Empfindlichkeit und Selektivität der Tandem-Massenspektrometrie können Matrixbestandteile Einfluss auf die Quantifizierung haben. Die sogenannten Matrixeffekte entstehen bereits in der Ionenquelle durch koeluiierende Matrixbestandteile, welche die Ionenausbeute der Analyt-Ionen während der Ionisierung verringern (Ionenunterdrückung) oder erhöhen (Ionenverstärkung) können. Dies führt dazu, dass sich das MS-Signal eines Analyten in einer Probe signifikant von dem in einem matrixfreien Standard unterscheidet und schließlich zu Fehlern bei der Quantifizierung führt (STAHNKE *et al.* 2009).

Sofern Matrixeffekte durch die Probenvorbereitung, die Chromatographie oder eine Verdünnung der Probe nicht ausreichend minimiert werden können, können sie durch eine Reihe von Maßnahmen kompensiert werden:

- Quantifizierung über externe Matrixstandards,
- Quantifizierung über Standardadditionsverfahren,
- Quantifizierung über interne isotoopenmarkierte Standards,
- oder Quantifizierung mittels Echo-Peak-Technik (HAJSLOVA und ZROSTLIKOVA 2003, MATUSZEWSKI *et al.* 2003, ALDER *et al.* 2004, STÜBER und REEMTSMA 2004).

### 2.4.3 Nachweis und Identifizierung unbekannter Verbindungen mittels LC-HRMS

Der Nachweis und die Identifizierung von beispielsweise Metaboliten organischer Spurenstoffe gestaltet sich, aufgrund mangelnder Standardsubstanzen, oft schwierig und erfordert den Einsatz hochauflösender (HR, *high-resolution*) Massenspektrometer. Im Gegensatz zu Quadrupol-Massenspektrometern, welche Nominalmassen detektieren, können z. B. mittels Flugzeit (TOF, *time-of-flight*)-, Orbitrap- oder Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz (FT-ICR, *fourier transform ion cyclotron resonance*)-Massenspektrometern exakte Massen detektiert werden. Diese Techniken zeichnen sich im Wesentlichen durch ihre hohe Massenauflösung und Massengenauigkeit aus.

Als Auflösung ( $R$ ) wird die Fähigkeit eines Massenspektrometers bezeichnet zwei Massen voneinander zu trennen. Sie ist definiert als  $R = M/\Delta M$ , wobei  $\Delta M$  der Peakbreite bei 50% Höhe (FWHM, *full width at half maximum*) entspricht (GROSS 2004). Die Auflösung eines Flugzeit-Massenspektrometers liegt in der Regel bei  $> 10.000$ , d. h. bei einer Auflösung von 10.000 können beispielsweise Ionen mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) von 200,00 und 200,02 noch unterschieden werden. Mittels Orbitrap-Analysatoren können sogar Werte  $> 100.000$  und mittels FT-ICR-Massenspektrometern Werte bis zu 1.000.000 erreicht werden (XIAN *et al.* 2012).

Die Massengenauigkeiten liegen bei FT-ICR-Massenspektrometern üblicherweise in einem Bereich von 0,1-0,5 ppm, von 0,5-5 ppm bei der Orbitrap und 1-10 ppm bei Flugzeitanalysatoren (GROSS 2004).

Durch die Verwendung hochauflösender Massenspektrometer können somit Substanzgemische gleicher Nominalmasse, aber unterschiedlichen exakten Massen, getrennt und eine eindeutige Peakzuordnung getroffen werden. Der Bestimmung der Summenformel einer unbekannteren Verbindung anhand der Messung der exakten Masse kam in den letzten Jahren eine zentrale Bedeutung zu.

Die Vorgehensweise bei der Identifizierung unbekannter Verbindungen in einem Probengemisch wird im Folgenden näher erläutert:

Generell können bei der Identifizierung unbekannter Verbindungen laut KRAUSS *et al.* 2010 drei unterschiedliche Vorgehensweisen unterschieden werden: *target*-Analyse, *suspect*-Screening und *non-target*-Screening (s. **Abbildung 2-8**). Während bei der *target*-Analyse die Identifizierung einer Verbindung anhand von Referenzstandards erfolgt, stehen ebensolche beim *suspect*- und *non-target*-Screening nicht zur Verfügung. Das *suspect*-Screening unterscheidet sich vom *non-target*-Screening dahingehend, dass eine gewisse Vorkenntnis darüber besteht, welche Verbindungen in der Probe enthalten sein könnten. Dementgegen bestehen beim *non-target*-Screening keinerlei Vorinformationen über mögliche Verbindungen (KRAUSS *et al.* 2010, SCHYMANSKI *et al.* 2015). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifizierung der Metaboliten mittels *suspect*-Screening.

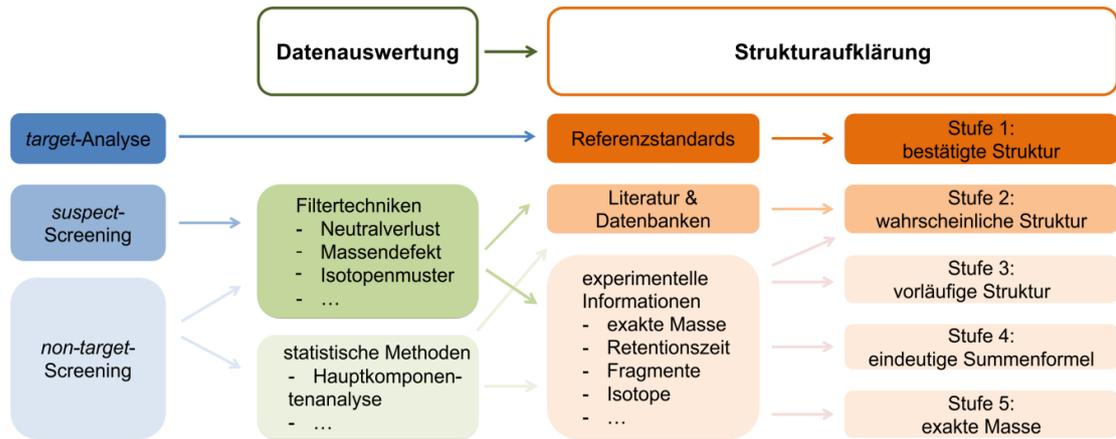
Nachdem eine Probe mittels LC-HRMS vermessen wurde erfolgt die Datenauswertung. Aufgrund der Fülle an Informationen, die sich aus einem HRMS-Datenfile ergeben, erfolgt die Auswertung üblicherweise mittels eigens dafür entwickelten Softwarepaketen (z. B. UNIFI oder MetaboLynx der Firma Waters). Bei einem *non-target*-Screening empfiehlt sich eine statistische Auswertung der Daten, z. B. mittels der Hauptkomponentenanalyse. Hierbei werden durch die Software die generierten MS-Daten von mindestens zwei unterschiedlichen Probengruppen miteinander verglichen (z. B. Kontrolle vs. Exposition) und, basierend auf einer Diskriminanzanalyse, die Unterschiede beider Gruppen

graphisch dargestellt. Hinzu kommt der Einsatz spezieller Filtertechniken (z. B. Massendefekt- und Isotopenfilter), wodurch die Anzahl falsch positiver Resultate deutlich reduziert werden kann (MACHERIUS *et al.* 2014, SEIWERT *et al.* 2015).

Dementgegen kann bei einem *suspect*-Screening, aufgrund entsprechender Vorkenntnisse, in den MS-Daten gezielt nach Fragmenten der Ausgangsverbindungen, bestimmten Transformationsprodukten und Konjugaten (z. B. Glucose, Glutathion, Sulfat) gesucht werden. Von der Software werden alle Signale, die die vorgegebenen Neutralverluste bzw. Massendifferenzen aufweisen, aus einem massenspektrometrischen Datensatz extrahiert und gelistet. Die Liste falsch positiver Resultate kann ebenfalls durch die Anwendung weiterer Filtertechniken, wie Massendefekt- und Isotopenfilter, minimiert werden.

Schlussendlich werden alle relevanten Signale mit ihren Summenformeln, exakten Massen, Retentionszeiten, Massendefekten, Isotopenmustern, Fragmenten und sonstigen vorab definierten Parametern aufgeführt (SEIWERT *et al.* 2015, BROX *et al.* 2016).

Die darauf folgende Strukturaufklärung der generierten Summenformeln stellt eine besondere Herausforderung dar. Laut SCHYMANSKI *et al.* 2014 werden bei der Aufklärung einer Struktur fünf sogenannte Bestätigungs-Stufen unterschieden (s. **Abbildung 2-8**). So gilt eine Substanz als eindeutig identifiziert (Stufe 1), wenn diese als Referenzstandard vorliegt und das unbekannte, gemessene Spektrum mit dem Referenzspektrum übereinstimmt. Beruht die Strukturaufklärung auf einem Vergleich des gemessenen Spektrums mit Referenzspektren aus der Literatur oder einem Datenbankabgleich, gilt die Substanz als wahrscheinlich identifiziert (Stufe 2). Dies ist auch dann der Fall, wenn keine Referenzspektren vorhanden sind, jedoch aufgrund der experimentellen Informationen (Fragmente, Retentionszeit, etc.) keine andere Struktur in Frage kommt. Dementgegen gilt eine Verbindung als vorläufig identifiziert (Stufe 3), wenn keine exakte Struktur angegeben werden kann und mehrere Strukturvorschläge möglich sind. Zum Beispiel kann die Position eines Substituenten, ohne eindeutige Referenzspektren, häufig nicht exakt bestimmt werden (PRASSE *et al.* 2011, BIJLSMA *et al.* 2013, BROX *et al.* 2016). Sofern aufgrund fehlender experimenteller Informationen die Angabe eines Strukturvorschlags nicht möglich ist, kann eine eindeutige Summenformel (Stufe 4) oder die exakte Masse (Stufe 5) angegeben werden (SCHYMANSKI *et al.* 2014).



**Abbildung 2-8:** Schematische Darstellung unterschiedlicher Vorgehensweisen für den Nachweis und die Identifizierung unbekannter Verbindungen mittels LC-HRMS (modifiziert nach KRAUSS *et al.* 2010, SCHYMANSKI *et al.* 2014).

### 3 Forschungsbedarf & Zielsetzung

Der Verbleib abwasserbürtiger organischer Spurenstoffe in Pflanzen ist, vor dem Hintergrund der Wasserknappheit in (semi)ariden Regionen und der Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft, zunehmend von Interesse. Insbesondere der Nachweis dieser Verbindungen in den essbaren Teilen von Nutzpflanzen führte in den vergangenen Jahren dazu, dass die Verunsicherung der Verbraucher steigt und Unklarheit darüber besteht, welche Risiken mit den Lebensmitteln verbunden sind. Bisher ist wenig darüber bekannt, inwieweit die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft sicher ist. Zudem ist das Verhalten, d. h. die Aufnahme, Verteilung und Metabolisierung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen, nur unzureichend verstanden und somit schwer vorhersagbar. Diesbezüglich bestehen erhebliche Wissenslücken über Art und Ausmaß des Metabolismus. Die Berücksichtigung des Metabolismus ist jedoch für die Abschätzung des Aufnahmepotentials einer Verbindung unerlässlich und könnte zudem aus toxikologischer Sicht relevant sein.

Dank fortschrittlicher Analyseverfahren sind heutzutage geringe Konzentrationen organischer Spurenstoffe in Pflanzen nachweisbar und die Identifizierung unbekannter Verbindungen möglich. Für die vorliegende Arbeit ergab sich daher folgender Forschungsbedarf:

- Die Frage, ob durch den Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, im Hinblick auf organische Spurenstoffe ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht, war von hoher Relevanz.
- Des Weiteren sollten Erkenntnisse über das Verhalten organischer Spurenstoffe in Nutzpflanzen gewonnen werden. Informationen über den Mechanismus der Aufnahme, Verteilung und Metabolismus würden dazu beitragen, das Verhalten nicht untersuchter Stoffe besser vorhersagen zu können.

Aus den zuvor genannten Fragestellungen ergaben sich folgende Zielsetzungen:

- Zunächst sollten geeignete analytische Verfahren zur quantitativen Bestimmung von organischen Spurenstoffen in wässrigen und pflanzlichen Matrices entwickelt und validiert werden. Die für die Pflanzenproben entwickelte Probenvorbereitungsmethode sollte zudem eine Identifizierung von unbekanntem Metaboliten mittels LC-HRMS erlauben.

- Mittels des zuvor entwickelten analytischen Verfahrens sollten im zweiten Teil der Arbeit die erforderlichen Daten für eine Expositionsabschätzung (Nahrung) der Bevölkerung gegenüber organischen Spurenstoffen gewonnen werden. Dies erfordert die Quantifizierung von organischen Spurenstoffen in repräsentativen Pflanzenproben, d. h. Pflanzen die unter regionalen landwirtschaftlichen Standardbedingungen gewachsen sind und die tatsächliche Exposition einer Bevölkerung wiedergeben. Durch eine Zusammenarbeit mit Projektpartnern in Jordanien und Israel und eine Beprobung entsprechender Felder vor Ort sollte dieser Aspekt gewährleistet werden. Anhand der gewonnenen Daten sollte das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers gegenüber organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, abgeschätzt werden.
- Mit bisherigen Modellen kann lediglich die Aufnahme und Verteilung einer Verbindung anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften abgeschätzt werden. Abbauraten konnten, aufgrund mangelnder experimenteller Daten, bislang nicht implementiert werden. Im dritten Teil der Arbeit sollte daher die Aufnahme, die Verteilung und der Metabolismus ausgewählter organischer Spurenstoffe experimentell untersucht werden, um eine verbesserte Datengrundlage für Modelle zu schaffen und bekannte Aufnahme- und Verteilungsmechanismen zu prüfen. Hierfür sollte die Durchführung hydroponischer Experimente besonders geeignet sein. Die Auswahl der Verbindungen sollte unter Berücksichtigung ihrer physikochemischen Eigenschaften (d. h. in Theorie sollte eine Aufnahme möglich sein) und ihrer Umweltrelevanz erfolgen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Diese Dissertation basiert auf zwei bereits veröffentlichten Fachartikeln in Peer-Review-Zeitschriften und einem Manuskript, welches zur Publikation in einer Fachzeitschrift eingereicht wurde. Die wesentlichen Ergebnisse dieser drei Arbeiten, sowie zusammenfassende Diskussionen der Ergebnisse sind in dem nachfolgenden Kapitel 4.1 aufgeführt. Im Anschluss werden weitere, bisher unveröffentlichte Ergebnisse dargestellt und diskutiert (Kapitel 4.2). Die Originalarbeiten und das Manuskript sind in Kapitel 5 aufgeführt.

### 4.1 Zusammenfassung der Publikationen und des Manuskripts

#### 4.1.1 Entwicklung eines HPLC-ESI-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Pflanzen

(s. Publikation 1: “An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater”)

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit stellt die Entwicklung und Validierung eines HPLC-MS/MS-Verfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von 28 ausgewählten organischen Spurenstoffen - darunter Arzneimittel, Röntgenkontrastmittel, Industriechemikalien (s. Tabelle 1 in Publikation 1) - und Metaboliten in pflanzlichen Matrices dar. Die Auswahl der Analyten beruhte zum einen auf ihrem Vorkommen in jordanischem Oberflächenwasser, da dies für die in Publikation 2 aufgeführte Realstudie von Bedeutung war. Zum anderen wurden neun Carbamazepin-Metaboliten, welche als Referenzstandards kommerziell erhältlich sind und deren Vorkommen in Pflanzen prinzipiell möglich ist, in die Methodenentwicklung einbezogen.

Für die qualitative und quantitative Bestimmung der Zielanalyten war die HPLC-ESI-MS/MS die Methode der Wahl. Hierfür musste zunächst eine chromatographische Trennmethode entwickelt werden, welche eine ausreichende Trennung der 28 Zielanalyten erlaubt. Da unter den Carbamazepin-Metaboliten vier Konstitutionsisomere waren, wovon jeweils drei die Massenübergänge  $m/z$  253  $\rightarrow$  210 bzw.  $m/z$  253  $\rightarrow$  208 aufwiesen, war die massenspektrometrische Detektion im MRM-Modus für eine hinreichende Unterscheidung dieser Verbindungen nicht ausreichend. Folglich war eine chromatographische Trennung der Isomere unerlässlich. Dies konnte durch eine entsprechend lange Gradientenelution von 50 min an einer RP-C18-Phase unter

Verwendung eines binären Fließmittelsystems, bestehend aus 0,1% Essigsäure in Wasser und 0,1% Essigsäure in Methanol, erzielt werden (s. Abbildung 1 in Publikation 1). Für eine eindeutige Identifizierung der Analyten wurden neben der Retentionszeit die Verhältnisse der relativen Intensitäten der Fragmentationen herangezogen.

Im Fokus der Arbeit lag die Entwicklung einer Probenvorbereitungsmethode, welche sowohl die Extraktion der 28 Zielanalyten - darunter saure, neutrale und basische Verbindungen mit unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften ( $\log K_{ow}$  -3,1 - 4,1) - als auch die Extraktion unbekannter Metaboliten aus pflanzlichen Matrices erlaubt. Da in der Literatur eine Vielzahl an Probenvorbereitungstechniken beschrieben ist, konnten bereits bestehende Methoden getestet und gegebenenfalls den Anforderungen entsprechend modifiziert werden.

Als Probenvorbereitungstechnik der Wahl empfahl sich zunächst die von ANASTASSIADES *et al.* 2003 entwickelte QuEChERS-Methode (**Abbildung 4-1**), da diese im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung als Multikomponentenmethode für Pestizide etabliert ist. Mittels dieser Methode wurden die absoluten Wiederfindungen (RA, *absolute recovery*, s. **Gleichung 4**) der 28 Zielanalyten in zwei unterschiedlichen Matrices (Blätter von Salat und Kohl) bestimmt. Die ermittelten Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich von 1-91%, wobei insbesondere für saure Analyten (Mefenaminsäure, Diclofenac und Gemfibrozil) eine unzureichende Wiederfindung (RA < 20%) verzeichnet wurde. Zudem konnten die sehr polaren und hydrophilen Röntgenkontrastmittel Iohexol, Iopromid, Iopamidol und Iomeprol nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich dazu wurde eine einfache, ultraschallgestützte Fest-Flüssig-Extraktion (SLE) mit Methanol und Methanol/Wasser (50/50, v/v) als Lösungsmittel getestet (**Abbildung 4-1**). Auf den der Extraktion üblicherweise folgenden Aufreinigungsschritt mittels SPE wurde bei dieser Methode verzichtet, um die Probenvorbereitungsschritte auf ein Mindestmaß zu reduzieren und größere Analytverluste zu vermeiden. Mittels dieser SLE-Methode konnten einerseits die Extraktion sehr polarer und hydrophiler Röntgenkontrastmittel ermöglicht (RA zwischen 17 - 65%) und andererseits hohe Wiederfindungsraten (RA > 60%) für saure Analyten ermittelt werden. Die absoluten Wiederfindungen für 22 der 28 Zielanalyten lagen in einem Bereich von 60 - 98%, mit einer relativen Standardabweichung unter 20%. Dies ist unter Berücksichtigung der erreichten Bestimmungsgrenzen im Bereich von 0,2-10 ng/g Trockenmasse (TM), der sehr unterschiedlichen Analyteigenschaften und der komplexen pflanzlichen Matrices als gut anzusehen.

$$RA [\%] = \frac{Rf_2}{Rf_1} \times 100 \quad (4)$$

mit:

*RA = absolute Wiederfindung,*

*Rf<sub>1</sub> = mittlerer Responsefaktor einer 6-Punkt-Kalibrierung (im Konzentrationsbereich von 0,5 – 50 ng/mL) der Analyten in MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v),*

*Rf<sub>2</sub> = mittlerer Responsefaktor der Analyten im Probenextrakt. Die Analyten wurden vor der Extraktion mittels Standardaddition (50 ng/g) zu analytfreien Salat- bzw. Kohlblättern dotiert.*

Die SLE-Methode wurde anschließend im Konzentrationsbereich von 5 - 50 ng/g TM für die Matrizes Tomatenfrüchte und -blätter im Hinblick auf die absolute Wiederfindung, Extraktionswiederfindung (RE, *extraction recovery*, berechnet nach REEMTSMA und QUINTANA 2006, s. **Gleichung 5**), Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität und Matrixeffekte validiert. Bei diesen Versuchen lag sowohl die absolute Wiederfindung als auch die Extraktionswiederfindung für die Mehrheit der Analyten (> 68%) bei über 60%, mit einer relativen Standardabweichung unter 10%. Die Bestimmungsgrenze lag, mit Ausnahme der Röntgenkontrastmittel (10 ng/g TM), für alle Analyten unter 2 ng/g TM. Zudem wurden mögliche Matrixefflüsse, welche aufgrund des fehlenden Aufreinigungsschritts zu erwarten waren, untersucht. Hierbei wurden starke Matrixeffekte (berechnet nach REEMTSMA *et al.* 2013, s. **Gleichung 6**) in einem Bereich von -17% (Ionenverstärkung) bis 78% (Ionenunterdrückung) ermittelt. Diese wurden bei der quantitativen Analyse berücksichtigt und durch Maßnahmen, wie die Quantifizierung mittels Standardadditionsverfahren (s. Kapitel 2.4.2), kompensiert.

$$RE [\%] = \frac{Rf_2}{Rf_3} \times 100 \quad (5)$$

mit:

*RE = Extraktionswiederfindung,*

*Rf<sub>2</sub> = s. Gleichung (4),*

*Rf<sub>3</sub> = mittlerer Responsefaktor einer 4-Punkt-Kalibrierung („matrix-matched“) der Analyten. Die Analyten wurden nach der Extraktion mittels Standardaddition (im Konzentrationsbereich von 1 - 25 ng/mL) zu analytfreien Extrakten von Salat- bzw. Kohlblättern dotiert.*

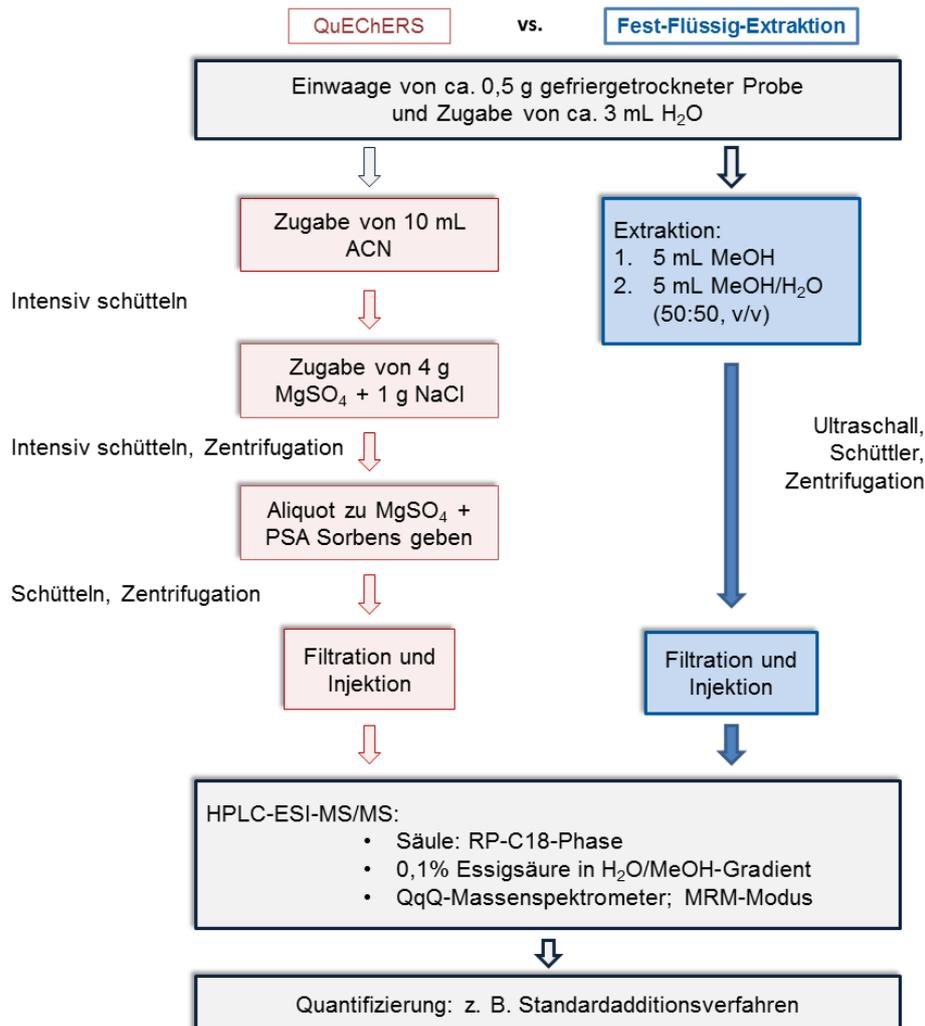
$$ME [\%] = \left(1 - \frac{Rf_3}{Rf_1}\right) \times 100 \quad (6)$$

mit:

$ME$  = Matrixeffekt,

$Rf_1$  = s. Gleichung (4),

$Rf_3$  = s. Gleichung (5).



**Abbildung 4-1:** Gegenüberstellung der QuEChERS-Methode nach ANASTASSIADES *et al.* 2003 und der in dieser Arbeit entwickelten Fest-Flüssig-Extraktion (SLE-Methode) zur Probenvorbereitung von Pflanzenproben.

Das entwickelte HPLC-MS/MS-Verfahren wurde anschließend zur quantitativen Bestimmung von Carbamazepin-Metaboliten in Tomaten- und Gurkenpflanzen, welche unter Gewächshausbedingungen in Israel kultiviert wurden, angewandt. Hierbei konnten fünf Carbamazepin-Metaboliten erstmalig in intakten Pflanzen nachgewiesen werden. Mittels dieser Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die

Gesamtkonzentration von Carbamazepin und seinen Metaboliten um das 2-fache (in Tomaten) bzw. 3,5-fache (in Gurken) höher ist als die von Carbamazepin.

### *Zusammenfassende Diskussion*

In der vorliegenden Arbeit konnte ein HPLC-MS/MS-Verfahren entwickelt werden, welches die simultane Bestimmung von 28 organischen Spurenstoffen (darunter neun Carbamazepin-Metaboliten) mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften ( $\log K_{ow}$  -3,1 - 4,1) in pflanzlichen Matrices ermöglicht. Obwohl in der Literatur bereits eine Vielzahl an Analyseverfahren zum Nachweis von organischen Spurenstoffen in Pflanzen beschrieben ist, sind diese entweder auf Verbindungen spezieller Anwendungsbereiche und ähnlichen Moleküleigenschaften (z. B. Antibiotika oder Pestizide) beschränkt oder stellen keine Multikomponentenmethode<sup>7</sup> dar. Darüber hinaus ist bislang kein spurenanalytisches Verfahren für pflanzliche Matrices bekannt, welches neben abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen (ausgenommen Pestizide) auch deren Metaboliten berücksichtigt. Letzteres ist insbesondere bei einem *suspect-screening*- oder *non-target*-Ansatz zur Identifizierung unbekannter Metaboliten mittels LC-HRMS von Bedeutung.

Als Probenvorbereitungstechnik wurde zunächst die originale QuEChERS-Methode nach ANASTASSIADES *et al.* 2003 untersucht, da diese im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung als Multikomponentenmethode für Pestizide etabliert ist. Mittels dieser Methode wurden jedoch erhebliche Analytverluste bezüglich polarer und saurer Verbindungen verzeichnet. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass das für die dispersive Festphasenextraktion eingesetzte PSA-Sorbens (*primary secondary amine*) ein schwacher Anionenaustauscher ist, welcher nicht nur störende Matrixbestandteile wie organische Säuren, Zucker und Fettsäuren, sondern auch saure Analyten zurückhält (ANASTASSIADES *et al.* 2003, DIEZ *et al.* 2006, KOESUKWIWAT *et al.* 2008). Zum anderen gilt die QuEChERS-Methode für sehr polare Analyten (mit einem  $\log K_{ow} < -2$ ) als ungeeignet, da eine Verteilung dieser Verbindungen in das organische Lösungsmittel Acetonitril nur beschränkt möglich ist (REJCZAK und TUZIMSKI 2015). In Abhängigkeit von den zu untersuchenden Analyten und Matrices sind in der Literatur modifizierte QuEChERS-Methoden beschrieben (REJCZAK und TUZIMSKI 2015). So wurde von KOESUKWIWAT *et al.* 2008 für die Bestimmung von sauren Herbiziden in Reis ein C18-Sorbens anstelle von PSA verwendet. Alternativ kann bei der Bestimmung von sauren Analyten auf die dispersive Festphasenextraktion gänzlich verzichtet und der Extrakt direkt vermessen werden (DIEZ *et al.* 2006, REJCZAK und TUZIMSKI 2015). Die Extraktionseffizienz polarer

---

<sup>7</sup> Unter einer Multikomponentenmethode wird in der vorliegenden Arbeit eine Methode, welche mehr als 10 Analyten berücksichtigt, verstanden.

Analyten kann möglicherweise durch einen Zusatz von Methanol zum Lösungsmittel erhöht werden (STEVENS und JONES 2010).

Modifikationen der QuEChERS-Methode, welche die dispersive Festphasenextraktion beinhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da die Herausforderung dieser Arbeit darin bestand eine Probenvorbereitungsmethode für die gleichzeitige Bestimmung von Verbindungen mit unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften zu entwickeln. Die original QuEChERS-Methode erschien für diesen Zweck ungeeignet.

Die in dieser Arbeit entwickelte Probenvorbereitungsmethode (SLE-Methode) stellt eine einfache, aber effiziente, Fest-Flüssig-Extraktion dar. Durch den Zusatz von Wasser im zweiten Extraktionsschritt konnte die Extraktion polarer Analyten und Metaboliten gewährleistet werden. Durch den Verzicht auf den Aufreinigungsschritt können nicht nur ein breites Spektrum an Verbindungen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften nachgewiesen, sondern auch Analytverluste unbekannter Metaboliten vermieden werden. Nachteilig ist jedoch die hohe Matrixbelastung der Extrakte, welche bei der quantitativen Analyse berücksichtigt werden muss und zudem zu Empfindlichkeitsverlusten bei der massenspektrometrischen Detektion führen kann.

Erste Anwendungen dieses Verfahrens haben gezeigt, dass bis zu sieben Carbamazepin-Metaboliten in Pflanzen, welche unter Gewächshausbedingungen kultiviert und mit behandeltem Abwasser bewässert wurden, nachgewiesen werden können. Die Gesamtkonzentration von Carbamazepin und seinen Metaboliten lag dabei deutlich über der von Carbamazepin allein (bis zu 3,5-fach höher). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass, im Fall von Carbamazepin, eine Nichtbeachtung von Metaboliten in Pflanzenaufnahmestudien zu einer deutlichen Unterschätzung der Aufnahmemenge führen kann.

Zudem konnte durch den Einsatz des Verfahrens in einer Feldstudie (Publikation 2) gezeigt werden, dass die erreichten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die 28 Zielanalyten ausreichend sind und das Verfahren für diesen Zweck geeignet ist.

### 4.1.2 Nachweis von organischen Spurenstoffen und deren Metaboliten in Nutzpflanzen kultiviert unter Freilandbedingungen

(s. Publikation 2: "Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater")

Ziel der vorliegenden Studie war die Beantwortung der Frage, ob durch den Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht. Hierfür wurden zunächst Nutzpflanzen, welche unter

Freilandbedingungen angebaut und mit behandeltem Abwasser bewässert wurden, im Hinblick auf ihre Konzentrationen an 28 ausgewählten organischen Spurenstoffen untersucht. Anhand der gewonnenen Daten wurde die Exposition der Bevölkerung abgeschätzt. Abschließend wurde eine Risikobewertung der detektierten Verbindungen mittels des Threshold of Toxicological Concern (TTC)-Konzepts durchgeführt und das Gesundheitsrisiko der Bevölkerung gegenüber organischen Spurenstoffen abgeschätzt.

Zur Erhebung der erforderlichen Daten wurden zwei Probenahme-Kampagnen (im Oktober 2014 und Mai 2015) in Jordanien durchgeführt. Dabei wurden an drei Standorten zehn verschiedene Gemüsesorten (u. a. Zucchini, Tomate, Karotte, Salat) beprobt, welche unter regional-typischen Feldbedingungen gewachsen sind. Hierbei waren insbesondere Gemüsesorten von Interesse, die üblicherweise roh verzehrt werden und zudem zur täglichen Ernährung der jordanischen Bevölkerung beitragen.

Die Bewässerung der jeweiligen Felder erfolgte mit Oberflächenwasser des Zarqa Flusses, welches einen hohen Anteil an behandeltem, häuslichem Abwasser enthält. Zum Teil erfolgte eine Beimischung von Grundwasser, welches aufgrund seiner hohen Salinität und der regional bedingten Wasserknappheit nicht als alleinige Bewässerungsgrundlage dienen kann. Zur Ermittlung der Konzentrationen an organischen Spurenstoffen im Bewässerungswasser wurde der Zarqa Fluss über einen Zeitraum von 10 Monaten (August 2014 – Mai 2015) fünfmal an drei entsprechenden Wasserentnahmestellen beprobt.

Die Wasser- und Pflanzenproben wurden anschließend mittels des zuvor entwickelten HPLC-MS/MS-Verfahrens (Publikation 1) im Hinblick auf 28 Zielanalyten untersucht. Hierbei konnten 21 Analyten in mehr als 50% der untersuchten Wasserproben und 18 Analyten in mindestens einer Gemüsesorte nachgewiesen werden.

In den Wasserproben wurden Median-Konzentrationen der organischen Spurenstoffe im Bereich von 0,08 - 6,4  $\mu\text{g/L}$  ermittelt (s. Tabelle 1 in Publikation 2).

Bezüglich der untersuchten Pflanzenproben wurde eine Anreicherung der organischen Spurenstoffe in den Wurzeln bzw. Blättern festgestellt. Die höchsten Konzentrationen wurden für Carbamazepin (216 ng/g TM in Salatblättern), Acesulfam (186 ng/g TM in Karottenblättern) und Koffein (169 ng/g TM in Zucchiniwurzeln) ermittelt. Carbamazepin wurde als einziger organischer Spurenstoff in allen untersuchten Gemüsesorten und Pflanzenorganen (Wurzel, Stängel, Blatt, Frucht) nachgewiesen. Von neun Carbamazepin-Metaboliten konnten sechs - darunter vier erstmalig unter Freilandbedingungen - in mindestens einer Gemüsesorte nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die essbaren Teile der untersuchten Nutzpflanzen war die durchschnittliche Gesamtkonzentration an organischen Spurenstoffen in Blattgemüsen (~233 ng/g TM) 3-fach höher als in Wurzelgemüsen (~73 ng/g TM) und 6-fach höher als in Fruchtgemüsen (~37 ng/g TM). Höchstkonzentrationen von Einzelverbindungen wurden für EP-CBZ (90 ng/g TM) und Carbamazepin (216 ng/g TM) in Salatblättern ermittelt.

Bezüglich der untersuchten Carbamazepin-Metaboliten waren EP-CBZ und *trans*-DiOH-CBZ die am häufigsten detektierten Verbindungen in den essbaren Teilen. Zudem wurden in den Früchten der Zucchini höhere Konzentrationen an EP-CBZ und 3-OH-CBZ ermittelt als an Carbamazepin selbst (s. Abbildung 3 in Publikation 2).

Unter Berücksichtigung der Lebensmittelverzehrdaten für Spanien wurde die Menge eines jeden organischen Spurenstoffs berechnet, der über die Ernährung von der Bevölkerung aufgenommen wird. Dieser Ansatz ermöglicht die Abschätzung der Exposition einer Bevölkerungsgruppe durch die Nahrung. Die so ermittelte jährliche Exposition eines durchschnittlichen Erwachsenen (70 kg) lag in einem Bereich von 0,25-388 µg.

Zur Abschätzung des Gesundheitsrisikos der Bevölkerung erfolgte zusätzlich eine Risikobewertung der detektierten Verbindungen anhand des TTC-Konzepts.

### *Exkurs: Threshold of Toxicological Concern (TTC)-Konzept*

Das TTC-Konzept ermöglicht dem Anwender eine erste Bewertung von Stoffen, die in niedrigen Konzentrationen in Lebensmitteln vorkommen und für die nur sehr wenige oder gar keine Toxizitätsdaten zur Verfügung stehen. Das Konzept ist ein wissenschaftliches Instrument zur Priorisierung jener Verbindungen für die eine umfassende Risikobewertung erforderlich ist und trägt somit zur Reduzierung unnötiger Tierversuche bei.

Das Prinzip des TTC-Konzepts beruht auf der Festlegung generischer Schwellenwerte (TTC-Werte) unterhalb derer, selbst bei lebenslanger oraler Aufnahme, eine generelle toxikologische Unbedenklichkeit angenommen wird.

Das Konzept basiert im Wesentlichen auf Arbeiten von CRAMER und FORD 1976, MUNRO 1990 und MUNRO 1996. Anhand des sogenannten Cramer-Entscheidungsbaumes werden, abhängig von der Struktur einer Verbindung, drei Substanzklassen unterschieden: nicht toxisch (Cramer-Klasse I), moderat toxisch (Cramer-Klasse II) und toxisch (Cramer-Klasse III). Zur Ableitung der für die jeweilige Substanzklasse spezifischen TTC-Werte entwickelte MUNRO 1996 die sogenannte Munro-Datenbank, welche die NOEL- und LOEL-Werte (*no* und *lowest observed effect level*) von insgesamt 613 Substanzen enthält. Aus dem fünften Perzentil der Verteilung der NOEL- und LOEL-Werte und Anwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 wurde ein TTC-Wert von

1800  $\mu\text{g}/\text{Person}$  (60 kg KG)/Tag für Cramer-Klasse I, 540  $\mu\text{g}/\text{Person}/\text{Tag}$  für Cramer-Klasse II und 90  $\mu\text{g}/\text{Person}/\text{Tag}$  für Cramer-Klasse III abgeleitet (MUNRO 1996, KROES *et al.* 2000). Das TTC-Konzept wurde einige Jahre später weiter ausgearbeitet und gesonderte Substanzklassen für potenziell genotoxische Substanzen (TTC = 0,15  $\mu\text{g}/\text{Person}/\text{Tag}$ ) und Organophosphate (TTC = 18  $\mu\text{g}/\text{Person}/\text{Tag}$ ) festgelegt (KROES *et al.* 2004).

Eine ungeprüfte Substanz mit bekannter Struktur wird letztlich anhand eines Vergleichs ihrer strukturellen Eigenschaften mit Substanzen ähnlicher Struktur einer der Substanzklassen zugeteilt. Sofern die menschliche Exposition gegenüber der Substanz unterhalb des für ihre Strukturklasse spezifischen TTC-Werts liegt, wird davon ausgegangen, dass das Gesundheitsrisiko vernachlässigbar gering ist.

Das TTC-Konzept darf nicht für Lebensmittelzusatzstoffe und Pestizide angewendet werden, da hierfür entsprechend der EU-Gesetzgebung die Vorlage toxikologischer Daten erforderlich ist. Zudem ist die zugrundeliegende Datenbasis nicht ausreichend für die Bewertung von u. a. akkumulierenden Stoffen (wie Schwermetalle), endokrinen Disruptoren und allergenen Substanzen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Eingruppierung der detektierten organischen Spurenstoffe in die jeweilige Substanzklasse mittels der Toxtree Software (PATLEWICZ *et al.* 2008). Dabei wurden sieben Verbindungen (u. a. Gabapentin, Carbamazepin und *trans*-DiOH-CBZ) der Cramer-Klasse III zugeteilt und zwei Substanzen (EP-CBZ und Ciprofloxacin) als potenziell genotoxische Verbindungen eingestuft.

Bei den in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen der in Cramer-Klasse III zugeteilten Verbindungen müsste, für eine Überschreitung des TTC-Werts, ein durchschnittlicher Erwachsener (70 kg KG) täglich mindestens 9 kg des untersuchten Gemüses verzehren. Dementgegen würde durch den täglichen Verzehr von etwa 177 g der in dieser Arbeit untersuchten Auberginen der TTC-Wert von EP-CBZ bereits überschritten (s. Tabelle 2 in Publikation 2).

### *Zusammenfassende Diskussion*

Aus Gewächshaus- und Laboruntersuchungen ist bereits bekannt, dass eine Aufnahme von organischen Spurenstoffen aus dem Bewässerungswasser in Pflanzen möglich ist. Untersuchungen von organischen Spurenstoffen in Pflanzen, welche unter Freilandbedingungen kultiviert wurden, gibt es bisher jedoch nur sehr wenige. Aufgrund dessen bestanden erhebliche Wissenslücken bezüglich der Exposition der Bevölkerung gegenüber organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde. Mittels der in dieser Arbeit durchgeführten

Feldstudie konnte erstmals das Vorkommen und Verhalten von 28 organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen, welche für den Verzehr durch den Menschen bestimmt waren und eine Expositionsabschätzung der Bevölkerung erlauben, untersucht und eine Bewertung der Befunde durchgeführt werden.

Die Untersuchungen des für die Felder verwendeten Bewässerungswassers (Wasser des Zarqa Flusses, Jordanien) zeigten bezüglich der nachgewiesenen organischen Spurenstoffe in qualitativer und quantitativer Hinsicht Übereinstimmung mit Erhebungen zum King Abdullah Kanal (Jordanien) (ZEMANN *et al.* 2014). Insofern konnte im Hinblick auf das Bewässerungswasser von einer für jordanisches Oberflächenwasser repräsentativen Konzentration an organischen Spurenstoffen (im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich) ausgegangen werden.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit nachgewiesenen Konzentrationen an organischen Spurenstoffen in den essbaren Teilen von Nutzpflanzen mit Literaturwerten ist nur begrenzt möglich, da bisher kaum vergleichbare Feldstudien durchgeführt wurden.

In einer Feldstudie aus Kalifornien konnten acht von 19 Umweltkontaminanten (darunter ebenfalls Carbamazepin und Koffein) in den essbaren Teilen von acht Nutzpflanzen (u. a. Salat, Tomaten, Karotten), welche mit behandeltem Abwasser bewässert wurden, nachgewiesen werden (WU *et al.* 2014). Dabei lag die Gesamtkonzentration an organischen Spurenstoffen in den essbaren Teilen der Pflanzen in einem Bereich von 0,01-3,87 ng/g TM und somit deutlich unter den in der vorliegenden Studie ermittelten Werten (37-233 ng/g TM). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei WU *et al.* 2014 die Konzentrationen an organischen Spurenstoffen im Bewässerungswasser ebenfalls deutlich geringer waren (0,4-181 ng/L). Eine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers wird, aufgrund der geringen jährlichen Expositionen (0,01-1,25  $\mu\text{g}$ ), verglichen mit den minimalen therapeutischen Tagesdosen (10-200 mg), für eher unwahrscheinlich gehalten (WU *et al.* 2014).

In einer weiteren Feldstudie aus China wird über die Aufnahme von fünf Antibiotika (u. a. Chloramphenicol, Norfloxacin und Sulfamethazin) in fünf Nutzpflanzen (u. a. Chinakohl, Reis, Mais) berichtet (PAN *et al.* 2014). Die Bewässerung der Felder erfolgte dabei entweder mit überwiegend unbehandeltem, häuslichem Abwasser oder Wasser aus Fischteichen (Antibiotika-Konzentrationen von 4,0-234 ng/L). In den essbaren Pflanzenteilen wurden Antibiotika-Gesamtkonzentrationen von 8,4-46,4 ng/g TM ermittelt. Auch hier wird eine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers für unwahrscheinlich gehalten, da die geschätzte jährliche Exposition im Bereich von 1,1-7950  $\mu\text{g}$  liegt und damit deutlich unter den therapeutischen Tagesdosen (10-200 mg). Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass bei einer Akkumulation von Antibiotika in Pflanzen langfristige

Auswirkungen auf die Gesundheit und Resistenzentwicklungen nicht ausgeschlossen werden können.

JONES-LEPP *et al.* 2010 haben gezeigt, dass von acht untersuchten Kontaminanten lediglich der Aromastoff N,N-Dimethylphenethylamin in den essbaren Teilen von vier verschiedenen Nutzpflanzen (u. a. Spinat, Wassermelone) nachweisbar (48 - 180 ng/g TM) ist. Die Bewässerung der Versuchsfelder erfolgte dabei mit behandeltem, häuslichem Abwasser (Konzentrationen der organischen Spurenstoffe im Bereich von 21 - 880 ng/L). Eine Expositionsabschätzung der Bevölkerung erfolgte in dieser Arbeit nicht.

Da der zeitliche und räumliche Aufwand für die Durchführung von Feldversuchen sehr hoch sind, wurde in den vergangenen Jahren das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers anhand von Daten, die auf Gewächshaus- und Lysimeter-Experimenten basieren, abgeschätzt. Neben der Expositionsabschätzung erfolgte dabei auch teilweise eine Risikobewertung der detektierten Verbindungen.

So wurde beispielsweise von DODGEN *et al.* 2013 und WU *et al.* 2013 die Exposition des Menschen gegenüber insgesamt 22 organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Blattgemüsen (Salat, Kohl und Spinat) mittels hydroponischen Kulturen abgeschätzt. Die dabei ermittelten jährlichen Expositionen eines durchschnittlichen Erwachsenen (70 kg KG) lagen in einem Bereich von 0,32 - 13,7  $\mu\text{g}$  (DODGEN *et al.* 2013) bzw. 0,04 - 350  $\mu\text{g}$  (WU *et al.* 2013). Diese Expositionsdaten sind vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten (0,25-388  $\mu\text{g}$ ). Verglichen mit den durchschnittlich verabreichten Tagesdosen (20-200 mg) der detektierten Arzneimittel wurde das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers auch hier als vernachlässigbar gering eingestuft (WU *et al.* 2013).

Einen mit der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Ansatz zur Risikobewertung der in Pflanzen detektierten organischen Spurenstoffe wählten MALCHI *et al.* 2014. Mittels Lysimeter-Experimenten wurde zunächst das Verhalten von 14 Umweltkontaminanten in Süßkartoffeln und Karotten untersucht und anschließend ebenfalls eine gesundheitliche Bewertung anhand des TTC-Konzepts durchgeführt. Für die in Cramer-Klasse III zugeteilten Verbindungen wurde eine Überschreitung des TTC-Wertes beim Verzehr des untersuchten Gemüses ausgeschlossen (MALCHI *et al.* 2014). Die als potenziell genotoxisch eingestuft Substanzen Lamotrigin und EP-CBZ stellen jedoch laut MALCHI *et al.* 2014 für Kinder und Erwachsene ein gesundheitliches Risiko dar, da bereits durch den täglichen Verzehr von zwei Karotten der Strukturklassen spezifische TTC-Wert von 2,5 ng/kg KG und Tag überschritten würde.

Bezüglich des TTC-Konzepts ist anzumerken, dass dieses in der Regel auf Substanzen angewendet wird, die in geringen Konzentrationen in Lebens- oder Futtermitteln vorkommen und zu denen nicht ausreichend Toxizitätsdaten zur Verfügung stehen (z. B. Metaboliten und Transformationsprodukte von organischen Spurenstoffen). In der vorliegenden Arbeit wurde das TTC-Konzept als Screening-Instrument zur Risikobewertung aller detektierten Verbindungen angewandt. Dabei wurde, ebenso wie bei MALCHI *et al.* 2014, für die untersuchten Verbindungen, mit Ausnahme von Ciprofloxacin und EP-CBZ, kein gesundheitliches Risiko erwartet. Für Ciprofloxacin und EP-CBZ müssen jedoch für eine abschließende Risikobewertung weitere toxikologische Daten hinzugezogen werden.

Im Hinblick auf Ciprofloxacin kann einer toxikologischen Beurteilung die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI, *tolerable daily intake*) von Enrofloxacin, einem strukturverwandten Antibiotikum, zugrunde gelegt werden. Diese liegt bei 372  $\mu\text{g}/\text{Person}$  und Tag bzw. 6,2  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  und Tag (EMA 2002). Damit ergibt sich für die in dieser Studie ermittelten Ciprofloxacin-Konzentrationen (0,3 bzw. 0,4  $\text{ng}/\text{kg KG}$  und Tag) eine maximale Ausschöpfung des TDI-Wertes von 0,006%. Ein toxikologisches Risiko für den Verbraucher ist somit sehr gering; die Gefahr der Ausbildung einer Antibiotikaresistenz besteht jedoch auch bei einer Exposition gegenüber geringen Konzentrationen. Für EP-CBZ sind zum jetzigen Zeitpunkt keine zusätzlichen Toxizitätsdaten bekannt.

Zusammenfassend ergibt sich, dass, nach dem derzeitigen Stand des Wissens, das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers gegenüber abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, eher gering ist. Für bestimmte Bevölkerungsgruppen, wie Kinder oder ältere Menschen, sowie bestimmte Substanzklassen (z. B. Antibiotika) können langfristige Auswirkungen auf die Gesundheit jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zudem sind für den Carbamazepin-Metaboliten EP-CBZ zusätzliche toxikologische Daten erforderlich, um gesundheitliche Bedenken ausschließen zu können.

### 4.1.3 Untersuchungen zum Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen

(s. eingereichtes Manuskript: "Extensive metabolization of neutral pharmaceuticals following uptake into agricultural plants – carbamazepine in tomato")

Carbamazepin ist nicht nur einer der am häufigsten, sondern auch mengenmäßig bedeutsamsten abwasserbürtigen organischen Spurenstoffe in Pflanzen. Während die Aufnahme und Verteilung von Carbamazepin in Pflanzen bereits gut untersucht sind, ist der pflanzliche Metabolismus von Carbamazepin zum jetzigen Zeitpunkt weithin unverstanden und sollte daher das Ziel dieser Studie sein.

In der hier durchgeführten Arbeit wurde der Verbleib von Carbamazepin in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen untersucht. Dabei war insbesondere die Quantifizierung bereits bekannter und die Identifizierung unbekannter Carbamazepin-Metaboliten von Interesse, um Aussagen über die Art und das Ausmaß der Metabolisierung treffen zu können.

Für die Durchführung der hydroponischen Experimente wurden die untersuchten Pflanzen über die Nährlösungen in einem Zeitraum von 35 Tagen dreimal, im Intervall von etwa zwei Wochen, gegenüber Carbamazepin (je 500 µg/L) exponiert (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2). Anschließend wurde mittels des in Publikation 1 dargestellten HPLC-MS/MS-Verfahrens das Vorkommen von 12<sup>8</sup> möglichen Phase I-Carbamazepin-Metaboliten in den Pflanzenorganen Wurzel, Stängel, Blatt und Frucht zum Erntezeitpunkt untersucht.

Dabei wurden 11 Metaboliten in den Blättern, 8 in den Stängeln und je 7 in den Wurzeln und Früchten nachgewiesen (s. Abbildung 1 im Manuskript). Als Hauptmetaboliten wurden EP-CBZ (in Blatt und Stängel), 3-OH-CBZ (in der Wurzel) und 2-OH-CBZ (in den Früchten) identifiziert. Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass etwa 80% des dotierten Carbamazepins von den Tomatenpflanzen aufgenommen und 33% der aufgenommenen Menge metabolisiert wurden. 9% der dotierten Carbamazepinmenge konnten zum Erntezeitpunkt in der Nährlösung nachgewiesen werden (s. Abbildung 3 im Manuskript).

Des Weiteren wurde eine Akkumulation von Carbamazepin in der Reihenfolge Blatt > Stängel > Wurzel > Frucht festgestellt. Interessant ist in dieser Hinsicht, dass das Verhältnis der Gesamtkonzentration an Metaboliten zur Carbamazepin-Konzentration in den unreifen Früchten, gefolgt von den reifen Früchten und Blättern am höchsten war (s. Abbildung 2 im Manuskript). Dies lässt vermuten, dass die Metabolisierung von Carbamazepin verstärkt in den Tomatenfrüchten und weniger in den Blättern, Stängeln und Wurzeln erfolgt.

Da mittels LC-MS/MS und quantitativer *target*-Analytik lediglich 90% der dotierten Carbamazepinmenge wiedergefunden werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass weitere, bisher unberücksichtigte Metaboliten gebildet wurden. Daher erfolgte im zweiten Teil dieser Studie eine Identifizierung unbekannter Carbamazepin-Metaboliten mittels LC-HRMS und *suspect-Screening* (s. Kapitel 2.4.3).

Hierzu wurden die pflanzlichen Extrakte mittels LC-HRMS vermessen und, wie in Kapitel 2.4.3 dargestellt, ausgewertet. Auf diese Weise konnten insgesamt zehn weitere

---

<sup>8</sup> In Publikation 1 wird von neun Carbamazepin-Metaboliten berichtet. Für die hier durchgeführte Arbeit wurde die Methodik hinsichtlich drei weiterer Carbamazepin-Metaboliten (10,11-Dihydrocarbamazepin, Acridin-9-carbaldehyd und Acridin-9-carbonsäure), welche ebenfalls als Referenzstandards verfügbar sind, validiert.

Carbamazepin-Metaboliten erstmalig in Pflanzen nachgewiesen werden (s. Tabelle 1 im Manuskript). Alle Metaboliten waren ausschließlich in den Proben exponierter Tomatenpflanzen enthalten und stellen somit keine natürlichen Stoffwechselprodukte der Tomate dar.

Bei den identifizierten Metaboliten handelt es sich überwiegend um Phase II-Konjugate des Carbamazepins, darunter vier Konstitutionsisomere eines Glucose- und zwei eines Cystein-Konjugats. Drei weitere Metaboliten können einem Phase I-Metabolismus zugeschrieben werden. Hierbei handelt es sich um ein Oxidationsprodukt des Carbamazepins (4-OH-CBZ), welches bereits in europäischen Klärwerkszuläufen nachgewiesen wurde (BAHLMANN *et al.* 2014), sowie zwei neuartige Reduktionsprodukte (M241a und b, Abbildung 5 im Manuskript). Für einen Metabolit konnte, aufgrund fehlender experimenteller Informationen, lediglich eine eindeutige Summenformel und die exakte Masse angegeben werden (s. Tabelle 1 im Manuskript).

Basierend auf diesem und einem weiteren Experiment, in welchem die hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen über die Nährlösungen einmalig (48 h vor der Ernte) gegenüber EP-CBZ exponiert wurden (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2), konnte schließlich ein möglicher Stoffwechselweg von Carbamazepin in Pflanzen beschrieben werden (s. Abbildung 5 im Manuskript).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die in dieser Studie neu identifizierten Carbamazepin-Metaboliten in einer nachträglichen Untersuchung der in Publikation 2 (Feldstudie) analysierten Pflanzen (darunter Tomaten) nicht nachgewiesen werden konnten. Die Konzentrationen der Metaboliten waren in diesen Proben zu gering, um mittels LC-HRMS detektiert werden zu können.

### *Zusammenfassende Diskussion*

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Metabolismus von Carbamazepin in intakten Pflanzen umfassend untersucht und aufgeklärt werden. Carbamazepin wurde aufgrund seiner hohen Persistenz und der daraus folgenden ubiquitären Verbreitung in der aquatischen und terrestrischen Umwelt ausgewählt. Zudem ist bereits aus vielen Labor- und Gewächshausstudien bekannt, dass Carbamazepin, aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften (s. Anhang A.1), eine gute Aufnahme und Verteilung in Pflanzen aufweist (s. Kapitel 2.3.1). Der Metabolismus der Verbindung blieb in bisherigen Untersuchungen jedoch nahezu unberücksichtigt und galt daher als weithin unverstanden.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten insgesamt 11 Phase I-Carbamazepin-Metaboliten in den Organen (Wurzel, Stängel, Blatt und Frucht) von Tomatenpflanzen nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei wurden die höchsten Konzentrationen für EP-CBZ, 3-OH-CBZ

und 2-OH-CBZ ermittelt und diese als Hauptmetaboliten identifiziert. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse zeigen zudem, dass eine Nichtbeachtung von Carbamazepin-Metaboliten in Aufnahmestudien zu einer deutlichen Unterschätzung der Aufnahmemenge, von etwa 33%, führen kann. Im zweiten Teil der Studie konnten weitere 10 Metaboliten, darunter bisher unbekannte Phase II-Metaboliten von Carbamazepin, in Pflanzen identifiziert und ein möglicher Stoffwechselweg von Carbamazepin beschrieben werden.

Bisherige Studien zum Metabolismus von Carbamazepin beschränken sich auf eine aktuelle Studie von WU *et al.* 2016 mittels Karottenzellkulturen. Bezüglich der detektierten Metaboliten decken sich die Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit. Der Carbamazepin-Metabolismus scheint jedoch entweder in Karotten oder in *in vitro* Kulturen weniger vielfältig zu sein. Von 8 untersuchten Phase I-Metaboliten konnten nach 22 Tagen Exposition lediglich 5 (EP-CBZ, *trans*-DiOH-CBZ, 3-OH-CBZ, 10-OH-CBZ und 10,11-Dihydrocarbamazepin) in Karottenzellen nachgewiesen werden. Am Beispiel Triclosan konnte bereits gezeigt werden, dass der Metabolismus einer Verbindung sehr pflanzenspezifisch ist (MACHERIUS *et al.* 2012, MACHERIUS *et al.* 2014). Somit können durchaus Unterschiede bezüglich der Metabolisierung von Carbamazepin in Karotten und Tomaten bestehen. Als Hauptmetabolit wurde bei WU *et al.* 2016 ebenfalls EP-CBZ ermittelt. Eine Identifizierung unbekannter Metaboliten mittels LC-HRMS erfolgte in der Studie nicht. Zudem konnten WU *et al.* 2016 eine Verteilung der Metaboliten in unterschiedliche Pflanzenorgane, aufgrund der Verwendung von Zellkulturen, nicht untersuchen.

Studien zum Aufnahmeverhalten aus den vergangenen Jahren deuteten bereits darauf hin, dass Carbamazepin in Pflanzen metabolisiert wird. So konnten GOLDSTEIN *et al.* 2014 und MALCHI *et al.* 2014 die Metaboliten EP-CBZ und *trans*-DiOH-CBZ in Tomaten, Gurken, Karotten und Süßkartoffeln unter Gewächshaus- bzw. Freilandbedingungen (Lysimeter) nachweisen. In diesen Studien wurde ebenfalls EP-CBZ als Hauptmetabolit in den Blättern beschrieben, während in den Früchten von Tomate und Gurke überwiegend *trans*-DiOH-CBZ nachgewiesen wurde. Weitere Metaboliten wurden in diesen Arbeiten jedoch nicht untersucht.

Das Vorkommen von insgesamt neun Carbamazepin-Metaboliten in Tomatenpflanzen wurde zudem in der in Publikation 2 dargestellten Feldstudie untersucht. Auch in dieser Studie war EP-CBZ der Hauptmetabolit in der Tomate. In den Wurzeln konnte ausschließlich EP-CBZ und in den Stängeln/Blättern (hier erfolgte keine Unterscheidung) zusätzlich *trans*-DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ nachgewiesen werden. In den Früchten wurden keine Metaboliten detektiert (s. Publikation 2).

Dies ist in guter Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie zum Metabolismus von Carbamazepin, in welcher EP-CBZ, 3-OH-CBZ und 2-OH-CBZ als Hauptmetaboliten in Tomatenpflanzen identifiziert wurden. Bezüglich des Ausmaßes des Metabolismus ist ein Vergleich der Felddaten mit den Daten der vorliegenden Studie nicht möglich, da in der Feldstudie keine Massenbilanzierung des Carbamazepins erfolgte. Ein Vergleich der Verhältnisse der Gesamtkonzentration an Metaboliten zur Carbamazepin-Konzentration in den Wurzeln bzw. Stängeln/Blättern deckt sich jedoch mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. So betrug dieses Verhältnis in den Wurzeln der Tomaten unter Feldbedingungen 0,13 bzw. 0,7 (Stängel/Blätter) und in den hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen 0,17 (Wurzel) bzw. 0,5 (Blätter).

Allen Untersuchungen zum Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen gemein ist, dass die detektierten Metaboliten mehrheitlich einem Phase I-Metabolismus zugeschrieben werden können. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Carbamazepin, aufgrund des Azepin-Rings und der beiden Benzolringe, eine Vielzahl an Phase I-Reaktionen zulässt und zunächst einer Aktivierung durch Einführung einer polaren funktionellen Gruppe bedarf. Die dabei am häufigsten beschriebene Phase I-Reaktion ist die Oxidation am Azepine-Ring, welche zur Bildung von EP-CBZ führt. Dieses wird anschließend zum *trans*-DiOH-CBZ hydrolysiert. Somit ähnelt, bezüglich des Hauptabbauwegs, der pflanzliche Carbamazepin-Metabolismus dem menschlichen Metabolismus.

Unter den darauf folgenden Phase II-Reaktionen dominierte in der vorliegenden Arbeit die O-Glycosylierung. Glycosylierungen zählen zu den in Pflanzen am häufigsten beobachteten Konjugations-Reaktionen (KOMORŔA *et al.* 1995).

Während der Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen in der vorliegenden Arbeit weitestgehend aufgeklärt werden konnte, steht eine toxikologische Beurteilung der detektierten Metaboliten noch aus. Besorgniserregend könnte in dieser Hinsicht Acridin sein, da die Substanz möglicherweise mutagen und kanzerogen wirksam ist (BRENNER *et al.* 1961). Zudem wurde in Publikation 2 darauf hingewiesen, dass der Hauptmetabolit EP-CBZ Strukturhinweise auf ein genotoxisches Potenzial aufweist.

### 4.2 Unveröffentlichte Ergebnisse

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse wurden von Nadja Triesch im Rahmen ihrer Diplomarbeit am UFZ (Department Analytik) erzielt. Das Thema der Arbeit wurde von mir gestellt und betreut. Die Durchführung der Experimente und Analysen erfolgte durch Nadja Triesch in Absprache mit mir und Dr. Monika Möder.

Aufbauend auf den Untersuchungen zum Verhalten von neutralen Verbindungen (Beispiel Carbamazepin) in Pflanzen (s. Manuskript) sollte nun das Verhalten von ionisierbaren organischen Spurenstoffen untersucht werden, da die Ladung einer Verbindung deren Aufnahme und Verteilung in Pflanzen wesentlich beeinflusst (Kapitel 2.2.1.2). Die Ergebnisse der Experimente sollten zu einem besseren Verständnis der Aufnahme- und Verteilungsmechanismen in Pflanzen beitragen, sowie weitere Erkenntnisse zu Art und Ausmaß des pflanzlichen Metabolismus liefern.

Als Testsubstanzen wurden Lamotrigin (Kapitel 2.3.2) und Simvastatinsäure (Kapitel 2.3.3) ausgewählt, da beide Verbindungen theoretisch - aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften (s. Anhang A.1) - über das Bewässerungswasser in Pflanzen aufgenommen und verteilt werden sollten. Experimentell bestätigt wurde dieses Verhalten bislang nur für Lamotrigin (GOLDSTEIN *et al.* 2014, MALCHI *et al.* 2014).

Im Folgenden werden nur die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt und diskutiert. Für detaillierte Informationen zur Kultivierung und Exposition der Pflanzen, LC-MS/MS- und LC-HRMS-Messungen sei auf TRIESCH 2016 verwiesen.

#### 4.2.1 Aufnahme und Verteilung von Lamotrigin und Simvastatinsäure in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen

Analog zu den im Manuskript beschriebenen hydroponischen Experimenten wurden für diese Arbeit hydroponisch kultivierte Tomatenpflanzen gezüchtet und über die Nährlösungen dreimal, im Intervall von etwa drei Wochen, gegenüber Lamotrigin (100 µg/L) bzw. Simvastatinsäure (50 µg/L) exponiert (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2).

Ziel der Arbeit war zunächst, mittels des bereits entwickelten LC-MS-Verfahrens (Publikation 1), die Aufnahme und Verteilung von Lamotrigin und Simvastatinsäure in Tomatenpflanzen zu untersuchen. Hierzu musste das Verfahren zusätzlich für Simvastatinsäure getestet und validiert werden.

Die dabei ermittelten absoluten Wiederfindungen (berechnet nach Gleichung 4 in Kapitel 4.1.1) lagen im Mittel bei 44% und die Extraktionswiederfindungen (berechnet nach Gleichung 5 in Kapitel 4.1.1) im Mittel bei 76% mit einer relativen Standardabweichung unter 10%. Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens lag für Simvastatinsäure bei

10 ng/g TM (**Tabelle 4-1**). Zudem wurden deutliche Matrixeffekte (Ionenunterdrückung) im Bereich von 27 - 68% verzeichnet, welche bei der Quantifizierung berücksichtigt wurden. In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung von Lamotrigin und Simvastatinsäure mittels externen Matrixstandards ("matrix-matched calibration").

Bezüglich der quantitativen Bestimmung der Simvastatinsäure ist anzumerken, dass in der Literatur von einer Lactonisierung der Simvastatinsäure zu Simvastatin während der Elektrospray-Ionisation berichtet wird (JEMAL *et al.* 2000). Zudem ist bekannt, dass während der Probenaufarbeitung in Abhängigkeit von pH und Temperatur die Simvastatinsäure zu Simvastatin lactonisiert bzw. eine Hydrolyse von Simvastatin zu Simvastatinsäure erfolgen kann (ZHAO *et al.* 2000, ZHANG *et al.* 2010).

Infolgedessen sind in dieser Arbeit die Simvastatinsäure-Gehalte in den Pflanzen und Nährlösungen immer als die Summe aus Simvastatinsäure und Simvastatin angegeben.

**Tabelle 4-1:** Absolute Wiederfindungen (RA), Extraktionswiederfindungen (RE), relative Standardabweichungen (RSA, n = 3), Matrixeffekte (ME) sowie Nachweis (LOD)- und Bestimmungsgrenzen (LOQ) für die Bestimmung von Simvastatinsäure in Tomatenpflanzen.

<b>Matrix</b> (Tomate)	<b>RA [%]</b> (bei 50 ng/g TM)	<b>RE [%]</b>	<b>RSA</b> [%]	<b>ME<sup>a</sup></b> [%]	<b>LOD</b> [ng/g TM]	<b>LOQ</b> [ng/g TM]
Wurzel	50 ± 2	68 ± 3	4,7	27	1	10
Stängel	49 ± 1	82 ± 2	2,4	40	2	10
Blatt	26 ± 1	81 ± 3	3,4	68	1	10
Frucht	50 ± 2	73 ± 3	3,9	32	1	10

TM = Trockenmasse

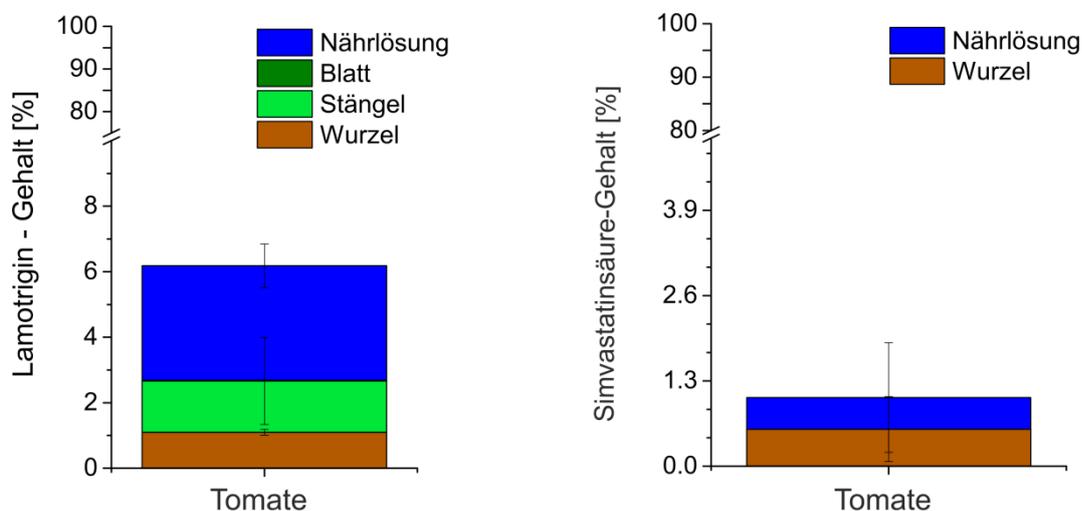
<sup>a</sup> Ionenunterdrückung, berechnet nach Gleichung 6 in Kapitel 4.1.1.

Die Aufnahme und Verteilung von Lamotrigin und Simvastatinsäure in die entsprechenden Organe (Wurzel, Stängel, Blatt und Frucht) von Tomatenpflanzen wurde zum Erntezeitpunkt untersucht.

Im Fall von Lamotrigin wurden im Mittel 2,7% der gesamten dotierten Menge von den Tomatenpflanzen (n = 3) aufgenommen und in die oberirdischen Pflanzenorgane Stängel und Blatt verteilt (**Abbildung 4-2**). Dabei war der Anteil an Lamotrigin in den Blättern (0,02% der dotierten Menge) deutlich geringer als in den Stängeln (1,6% der dotierten Menge) und Wurzeln (1,1% der dotierten Menge). In den Nährlösungen wurde zum Erntezeitpunkt eine mittlere Lamotriginmenge von 3,5% nachgewiesen.

Im Vergleich dazu wurden im Mittel lediglich 0,6% der dotierten Simvastatinsäure in den Wurzeln der Tomatenpflanzen (n = 3) und 0,4% in den entsprechenden Nährlösungen

nachgewiesen. Eine Verteilung der Simvastatinsäure in oberirdische Pflanzenorgane wurde nicht festgestellt (**Abbildung 4-2**).



**Abbildung 4-2:** Analytgehalte von Lamotrigin und Simvastatinsäure zum Erntezeitpunkt in den Nährlösungen und Pflanzenorganen von Tomaten, welche unter hydroponischen Bedingungen kultiviert und gegen insgesamt  $1500 \mu\text{g}$  Lamotrigin bzw.  $750 \mu\text{g}$  Simvastatinsäure pro Pflanze (je  $n = 3$ ) exponiert wurden.

Zur Aufklärung der Massenbilanzlücke von ca. 94% Lamotrigin bzw. 99% Simvastatinsäure, welche nicht durch die Aufnahme in Pflanzen und den Verbleib in der Nährlösung erklärt werden können, wurden weitere Experimente durchgeführt. Mögliche Ursachen sind (1) eine Adsorption der Verbindungen an die Gefäßwände der für die Nährlösungen verwendeten Pflanzgefäße (Plastikeimer), (2) eine Adsorption der Verbindungen an die Wurzeloberfläche und (3) eine Metabolisierung der Ausgangsverbindungen in den Pflanzen und Nährlösungen.

#### *Adsorption an der Gefäßwand*

Um eine Adsorption von Lamotrigin und Simvastatinsäure an den Gefäßwänden, der zur Kultivierung der Pflanzen verwendeten Plastikeimer, zu untersuchen, wurden entsprechende Kontrollexperimente (Dotierung der Nährlösung ohne Pflanze, s. **Tabelle A-2** in Anhang A.2) durchgeführt. Dabei wurden in den Nährlösungen im Mittel 108% der dotierten Lamotriginmenge und 58% der dotierten Simvastatinsäure-Menge detektiert. Demzufolge konnte bei Lamotrigin eine Adsorption an der Gefäßwand ausgeschlossen werden. Bezüglich der Simvastatinsäure wird jedoch eine deutliche Affinität zur Adsorption an der Gefäßoberfläche vermutet.

### *Adsorption an der Wurzeloberfläche*

Um lediglich die von den Pflanzen aufgenommene Analytmenge zu ermitteln wurden die Wurzeln vor der Probenaufarbeitung gründlich mit Leitungswasser abgespült. Da dieses Waschwasser jedoch nicht aufgefangen wurde, kann die Adsorption der Analyten an die Wurzeloberfläche in dieser Arbeit nur abgeschätzt werden.

Zur Abschätzung einer möglichen Adsorption der Analyten wurde der Analytgehalt in den Nährlösungen der hydroponischen Kulturen, welche 30 min nach jeder Exposition beprobt wurden, ermittelt. Dabei wurde nach der 2. und 3. Exposition eine Abnahme der dotierten Lamotriginmenge um etwa 30% gegenüber der 1. Exposition ermittelt (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2). Da zwischen der 1. und 2. Exposition ein Zeitraum von drei Wochen lag (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2), kann diese Abnahme durch eine Zunahme der Adsorption der Analyten an die Wurzeloberfläche, aufgrund des zunehmenden Wurzelwachstums und der somit vergrößerten Wurzeloberfläche, begründet werden. Nach der 3. Exposition wurde keine weitere Abnahme der dotierten Lamotriginmenge beobachtet, da in diesem Wachstumsstadium vermutlich kein ausgeprägtes Wurzelwachstum mehr erfolgte.

Obwohl dieser Trend bei der Simvastatinsäure nicht beobachtet wurde, ist eine Adsorption der Analyten an der Wurzeloberfläche nicht ausgeschlossen. 30 min nach der jeweiligen Exposition wurden lediglich zwischen 0,9 und 4,9% der dotierten Analytmenge in den Nährlösungen nachgewiesen (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2).

Schließlich wurde eine Metabolisierung der Ausgangsverbindungen in den Pflanzen und Nährlösungen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im nachfolgenden Kapitel 4.2.2 zusammenfassend dargestellt.

### 4.2.2 Untersuchung des Metabolismus von Lamotrigin und Simvastatinsäure in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Nährlösungen und pflanzlichen Extrakte mittels LC-HRMS im Hinblick auf eine Identifizierung unbekannter Metaboliten vermessen.

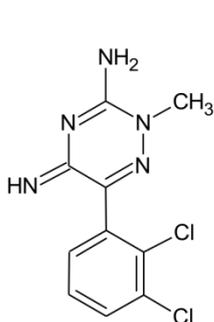
Nach Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus und *suspect-Screening* konnten drei Lamotrigin-Metaboliten, welche ausschließlich in den pflanzlichen Extrakten exponierter Tomatenpflanzen enthalten waren, detektiert und vorläufig identifiziert werden (**Abbildung 4-3**). Bei den identifizierten Metaboliten handelte es sich um Phase II-Metaboliten. Neben 2N-Methyl-Lamotrigin wurden zwei Konstitutionsisomere eines Lamotrigin-Glycosylamins identifiziert (**Tabelle 4-2, Abbildung 4-3**).

Für Simvastatinsäure wurden keine Metaboliten detektiert; weder im Positiv- noch im Negativ-ESI-Modus und weder in den Nährlösungen noch in den pflanzlichen Extrakten.

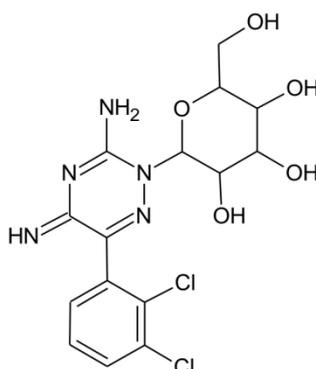
Möglicherweise waren die Konzentrationen der Metaboliten zu gering, um mittels LC-HRMS nachgewiesen werden zu können.

**Tabelle 4-2:** Mittels LC-HRMS detektierte und vorläufig identifizierte Lamotrigin-Metaboliten in den Wurzeln von hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen.

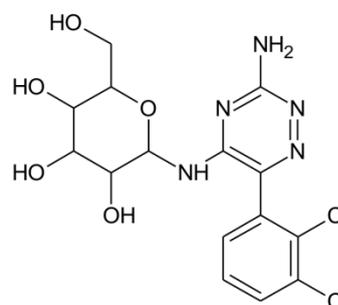
Metaboliten	Rt [min]	$m/z$ der $[M+H]^+$ -Ionen ( $\Delta$ ppm)	Summenformel der $[M+H]^+$ -Ionen	$m/z$ der Fragmentionen ( $\Delta$ ppm)	Summenformel der Fragmentionen
Lamotrigin	6,06	256,0155 (-1,2)	$C_9H_8^{35}Cl_2N_5$	210,9827 (-1,4) 158,9761 (-5,0)	$C_9H_5^{35}Cl_2N$ $C_7H_5^{35}Cl_2$
2N-Methyl-Lamotrigin	6,45	270,0308 (-2,2)	$C_{10}H_{10}^{35}Cl_2N_5$		
Lamotrigin - Glycosylamin	4,80/ 4,89	418,0684 (0,0)	$C_{15}H_{18}^{35}Cl_2N_5O_5$	256,0161 (1,6) 210,9836 (3,3) 166,0294 (-2,4)	$C_9H_8^{35}Cl_2$ $C_9H_5^{35}Cl_2N_2$ $C_8H_7ClN_2$



2N-Methyl-Lamotrigin



Lamotrigin-2N-Glycosylamin



Lamotrigin-5N-Glycosylamin

**Abbildung 4-3:** Strukturvorschläge für die in den Wurzeln der hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen identifizierte Lamotrigin-Metaboliten.

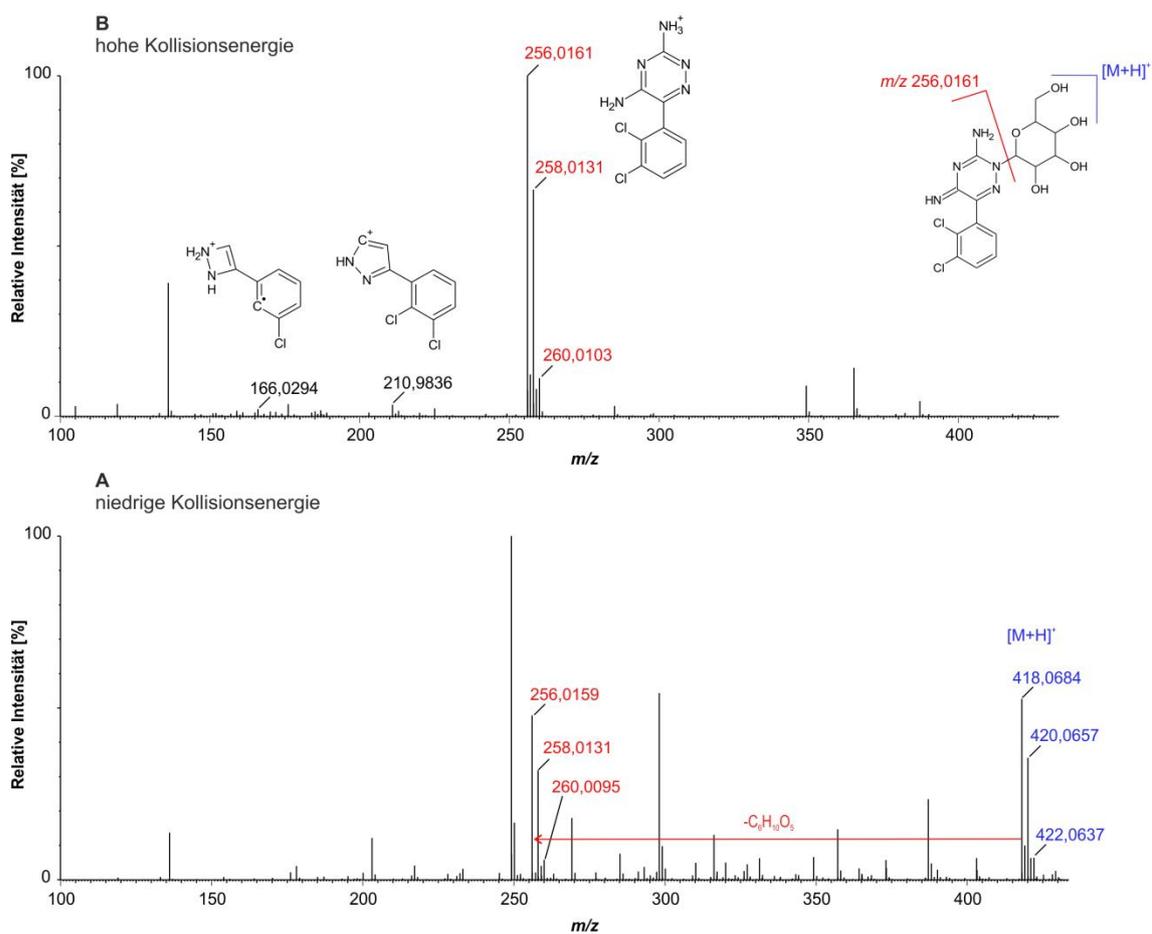
Am Beispiel der Glucose-Konjugate Lamotrigin-Glycosylamin wird nachfolgend die Strukturaufklärung der Lamotrigin-Metaboliten näher erläutert.

Neben den exakten Massen der Molekül- und Fragmentionen, aus denen die Summenformel der detektierten Ionen abgeleitet werden konnte, lieferte das Chlor-Isotopenmuster und typische Massendifferenzen zwischen den Molekülionen und den generierten Fragmentionen Informationen über die Strukturen der Lamotrigin-Metaboliten. So wurde beispielsweise für den Metaboliten Lamotrigin-Glycosylamin ein Molekülion mit einem typischen Chlorisotopenmuster bei  $m/z$  418,068 detektiert (**Abbildung 4-4**). Durch Verwendung einer hohen Kollisionsenergie (15 - 30 eV) wurde ein

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Fragmentationenspektrum des  $[M+H]^+$ -Ions generiert, welches bei  $m/z$  256,016 ebenfalls das für zwei Chloratome typische Chlorisotopenmuster aufweist. Dieses Fragmention kann der Ausgangsverbindung Lamotrigin zugeordnet werden und ist auf die Abspaltung von Glucose (-162,052 Da) von  $[M+H]^+$  zurückzuführen. Weiterhin wurden zwei Fragmentionen bei  $m/z$  210,984 und  $m/z$  166,029 detektiert, welche durch die weitere Fragmentierung von Lamotrigin entstanden sind.

Die Zuordnung der Fragmentionen zu dem entsprechenden Molekülion erfolgte durch das Elutionsprofil der Ionen, indem zusätzlich zur Retentionszeit der Ionen auch die Peakformen verglichen wurden (s. **Abbildung A-1** in Anhang A.2).



**Abbildung 4-4:** Molekülionenspektrum (A), Fragmentationenspektrum (B) und Strukturvorschlag des  $[M+H]^+$ -Ions zur Strukturaufklärung der Lamotrigin-Glycosylamin-Metaboliten. Aufgenommen mittels UPLC-QTOF-MS im Positiv-Modus bei niedriger Kollisionsenergie (A, CE = 6 eV) bzw. hoher Kollisionsenergie (B, CE = 15-35 eV).

Während 2N-Methyl-Lamotrigin ausschließlich in den Wurzeln der exponierten Pflanzen detektiert wurde, wurden die Lamotrigin-Glucose-Konjugate auch in den Blättern nachgewiesen. Eine Quantifizierung dieser Metaboliten war aufgrund fehlender Referenzstandards nicht möglich. Ein Vergleich der Peakflächen der Lamotrigin-Glucose-

Konjugate zeigte jedoch, dass die Konzentration dieser beiden Metaboliten in den Wurzeln höher war als in den Blättern.

### 4.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Neben dem Verhalten von neutralen Verbindungen (Beispiel Carbamazepin), welche im Allgemeinen besser von Pflanzen aufgenommen und verteilt werden können als ionische Spezies, wurde in dieser Arbeit das Verhalten von ionisierbaren Spurenstoffen in Pflanzen untersucht. Hierzu wurden Lamotrigin und Simvastatinsäure, aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften (s. Anhang A.1), als Testsubstanzen ausgewählt.

#### *Lamotrigin*

Im Fall von Lamotrigin wurden durchschnittlich 2,7% der dotierten Menge (entspricht einer Absolutmenge von 40,5  $\mu\text{g}$  Lamotrigin) von den Pflanzen aufgenommen. Verglichen mit der Aufnahme von Carbamazepin (ca. 80% der dotierten Menge = 6000  $\mu\text{g}$  Carbamazepin) scheint die Aufnahme von Lamotrigin in Pflanzen nur begrenzt möglich zu sein. Dies lässt sich zum Teil dadurch begründen, dass Lamotrigin aufgrund seines log D-Wertes von 2,24 (bei pH 6) zwar in Pflanzen aufgenommen werden kann, jedoch aufgrund seines  $\text{pK}_a$ -Wertes von 5,4 in den Nährlösungen (pH ~5,6) der hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen zu etwa 65% dissoziiert (+1) vorliegt und somit nur in begrenztem Maße durch die Zellwand und Zellmembran permeieren kann. Dadurch ist die Aufnahme von Lamotrigin gegenüber Carbamazepin deutlich gehindert. Eine höhere Aufnahme von Lamotrigin in Pflanzen sollte demnach unter basischen Bedingungen erfolgen. Dieser Aspekt wäre bei Feldstudien mit kalkhaltigem Boden zu berücksichtigen.

Lamotrigin und Carbamazepin sind mäßig lipophile Verbindungen (log  $K_{ow}$ -Wert 2,1 bzw. 2,5) mit einem vergleichbaren Molekulargewicht (s. Anhang A1). Da ca. 35% der dotierten Lamotriginmenge in den Nährlösungen undissoziiert vorlagen wurde für Lamotrigin eine prozentual höhere Aufnahme erwartet. Die alleinige Betrachtung der Ladung reicht also nicht aus, um die deutlich verminderte Aufnahme von Lamotrigin, verglichen mit Carbamazepin, begründen zu können. Weitere Faktoren müssen somit einen Einfluss auf die Aufnahme der Verbindungen in Pflanzen haben.

Neben den physikochemischen Eigenschaften einer Verbindung können pflanzenspezifische Parameter, wie die Wurzeloberfläche und -struktur, die Wachstums- oder die Transpirationsrate einen signifikanten Einfluss auf die Stoffaufnahme haben (TRAPP 2000). Obwohl für die Carbamazepin-Experimente eine andere Tomatensorte verwendet wurde als für die Lamotrigin- und Simvastatinsäure-Experimente (s. **Tabelle A-1** in Anhang A.2), sind pflanzenspezifische Parameter laut TRAPP 2000 bei der Untersuchung der gleichen Pflanzenart (wie z. B. Tomate) von geringer Bedeutung. Die

Verwendung von zwei unterschiedlichen Tomatensorten ist somit keine Begründung für die schwächere Aufnahme von Lamotrigin verglichen mit Carbamazepin.

Aus der Pharmaforschung ist bekannt, dass nicht nur das Molekulargewicht und die Lipophilie, sondern auch die Anzahl an Donatoren bzw. Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (OH, NH, O, N) in einem Molekül, die Aufnahme und Bioverfügbarkeit einer Substanz im menschlichen Organismus entscheidend beeinflussen (LIPINSKI *et al.* 1997, GHOSE *et al.* 1999). Es ist somit nicht unwahrscheinlich, dass auch bei Pflanzen eine zu hohe Anzahl an Donatoren bzw. Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen die Aufnahme einer Verbindung begrenzen. Möglicherweise tragen die fünf H-Brückenbindung-Donatoren und -Akzeptoren im Lamotrigin dazu bei, dass die Verbindung deutlich schlechter aufgenommen wurde als Carbamazepin, welches nur über drei dieser Donatoren und Akzeptoren verfügt.

Die beschränkte Aufnahme von Lamotrigin im Vergleich zu Carbamazepin konnte auch durch Studien von GOLDSTEIN *et al.* 2014 und MALCHI *et al.* 2014 belegt werden. In diesen Arbeiten war die Aufnahme von Lamotrigin in Tomaten, Gurken, Süßkartoffeln und Karotten um das 5 bis 100-fache geringer als die von Carbamazepin.

Neben der Aufnahme in die Wurzeln wurde eine Verteilung von Lamotrigin in die Stängel, und in geringem Maße in die Blätter, verzeichnet. Dieses Verhalten lässt sich anhand der physikochemischen Eigenschaften (s. Anhang A.1) von Lamotrigin erklären. Lamotrigin, welches aufgrund seines  $pK_a$ -Wertes eine schwache Base ist, liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zellorganellen teilweise geladen (+1) vor. Dies kann in Zellorganellen die einen pH von 5 - 6 aufweisen (z. B. Xylem und Vakuole) zu einer Anreicherung, dem sogenannten Ionenfalleneffekt (Kapitel 2.2.1.2), führen. Eine Verteilung in die oberirdischen Pflanzenorgane Blätter und Früchte ist dadurch nur noch begrenzt möglich. Dieses Verhalten von Lamotrigin bestätigen auch die Daten der in Publikation 2 dargestellten Feldstudie. In dieser Studie wurde Lamotrigin ausschließlich in den Wurzeln und Stängeln der untersuchten Pflanzen nachgewiesen. Eine Translokation in die Blätter und Früchte wurde nicht beobachtet. Es wurde daraufhin vermutet, dass Lamotrigin hauptsächlich als Kontaminante in Wurzelgemüsen von Bedeutung sei (Publikation 2).

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals der Metabolismus von Lamotrigin in Pflanzen untersucht. Dabei wurden ausschließlich Phase II-Metaboliten detektiert und vorläufig identifiziert. Lamotrigin, welches aufgrund seiner Struktur bereits über polare funktionelle Gruppen verfügt, unterliegt keinem Phase I-Metabolismus, sondern geht direkt einen Phase II-Metabolismus ein. Dies ist in guter Übereinstimmung mit aktuellen Metabolismus-Studien zu Acetaminophen, Benzotriazol, Oxybenzon, Ketoprofen und Naproxen (HUBER *et al.* 2009, LEFEVRE *et al.* 2015, CHEN *et al.* 2016, EMHOFER *et al.*

2017). Die zuvor genannten Verbindungen verfügen alle über polare funktionelle Gruppen (z. B. -OH, -NH) und gehen ausschließlich einen Phase II-Metabolismus ein (s. **Tabelle 2-2** in Kapitel 2.2.2). Dem widersprechen jedoch Untersuchungen zum Metabolismus von Triclosan, Diclofenac und Mefenamin-Säure. Obwohl diese Verbindungen ebenfalls über geeignete funktionelle Gruppen verfügen, konnten in diesen Studien sowohl Phase I- als auch Phase II-Metaboliten identifiziert werden (s. **Tabelle 2-2** in Kapitel 2.2.2). Die Anzahl an Phase II-Metaboliten überwog jedoch auch in diesen Studien (MACHERIUS *et al.* 2014, EMHOFER *et al.* 2017, FU *et al.* 2017), sodass anzunehmen ist, dass Verbindungen, die bereits über polare funktionelle Gruppen verfügen, vornehmlich Phase II-Reaktionen eingehen.

Wie bereits bei Carbamazepin, konnten auch bei Lamotrigin Glucose-Konjugate identifiziert werden. Als weiterer Phase II-Metabolit wurde 2N-Methyl-Lamotrigin identifiziert, welcher als Humanmetabolit bekannt ist und bereits in Oberflächengewässern nachgewiesen werden konnte (ZONJA *et al.* 2015). Bezüglich der gebildeten Metaboliten scheint somit der pflanzliche Lamotrigin-Metabolismus dem menschlichen Metabolismus (Kapitel 2.3.2) sehr ähnlich zu sein.

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine Quantifizierung der drei Lamotrigin-Metaboliten nicht möglich war, wird davon ausgegangen, dass Lamotrigin, verglichen mit Carbamazepin (21 Metaboliten), in geringerem Maße metabolisiert wird. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Bildung von beispielsweise Glucose- oder Sulfat-Konjugaten in Pflanzen ein reversibler Prozess ist, d. h. durch Hydrolyse kann eine Freisetzung der Ausgangsverbindung erfolgen (EDWARDS *et al.* 1982, COLE 1994). Zudem kann innerhalb der Pflanzen eine Bildung gebundener Rückstände erfolgen (COLE 1994), welche analytisch nicht erfasst wurden.

### *Simvastatinsäure*

Neben Lamotrigin wurde in dieser Arbeit erstmals das Verhalten der Simvastatinsäure in Pflanzen untersucht.

Ausgehend von den physikochemischen Eigenschaften (Anhang A.1) der Simvastatinsäure wurde eine Aufnahme und anschließende Verteilung in die Früchte der Pflanzen angenommen (s. Kapitel 2.3.3).

Die Untersuchungen ergaben, dass durchschnittlich 0,6% der dotierten Simvastatinsäure (entspricht einer Absolutmenge von 4,5 µg Simvastatinsäure) von den Pflanzen aufgenommen wurde. Eine Verteilung in die oberirdischen Pflanzenorgane wurde nicht festgestellt. Zudem wurden keine Metaboliten der Simvastatinsäure identifiziert.

Somit war, von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spurenstoffen (Carbamazepin, Lamotrigin und Simvastatinsäure), die Simvastatinsäure die Verbindung, welche am schlechtesten von den Pflanzen aufgenommen wurde. Die Annahme, dass eine Verteilung der Simvastatinsäure in die Früchte der Pflanzen erfolgt, konnte nicht bestätigt werden.

Zudem decken sich diese experimentell ermittelten Daten nicht mit den Ergebnissen einer Modellierung aus Dänemark. HOJRUP 2014 hat unter Verwendung eines dynamischen Aufnahmemodells die Aufnahme und Verteilung von 15 organischen Spurenstoffen aus behandeltem Abwasser in Pflanzen abgeschätzt. Von allen untersuchten Verbindungen wurden für Simvastatinsäure, Sulfamethizol und Carbamazepin die höchsten Konzentrationen ( $> 1 \mu\text{g}/\text{kg TM}$ ) in den pflanzlichen Organen Wurzel, Stängel, Blatt und Frucht vorhergesagt. Dabei wurden für Simvastatinsäure in den Wurzeln, Stängeln und Früchten sogar höhere Werte vorhergesagt als für Carbamazepin.

Während in bisherigen Aufnahmemodellen davon ausgegangen wird, dass das Molekulargewicht einer Verbindung weniger entscheidend für deren Aufnahme in Pflanzen ist, unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Resultate einer Studie von REITZ *et al.* 2016, welche eine hohe Korrelation zwischen der Wasser- und Analytaufnahme in Pflanzen für Verbindungen mit einem Molekulargewicht  $< 390 \text{ g/mol}$  feststellten. Die Simvastatinsäure ( $437 \text{ g/mol}$ ) weist, verglichen mit Lamotrigin ( $256 \text{ g/mol}$ ) und Carbamazepin ( $236 \text{ g/mol}$ ), das höchste Molekulargewicht auf und scheint nur beschränkt durch Zellwände und Zellmembranen diffundieren zu können, was eine Aufnahme in Pflanzen erschwert. Zudem verfügt die Simvastatinsäure über sechs Donatoren und Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül, was vermutlich, wie bei Lamotrigin, zu einer schwachen Aufnahme der Verbindung in Pflanzen beiträgt.

## 5 Originalarbeiten und Manuskript

### 5.1 Publikation 1

#### **An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater**

Christina Riemenschneider, Bettina Seiwert, Myah Goldstein, Marwan Al-Raggad, Elias Salameh, Benny Chefetz, Thorsten Reemtsma

Analytical Methods, **2017**, 9, 1273-1281

Der Artikel ist abrufbar unter:

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ay/c6ay02984a/unauth#!divAbstract>

Erklärung zum Eigenanteil an der Publikation:

Das in der Publikation beschriebene analytische Verfahren wurde von mir entwickelt und validiert. Sämtliche Versuche, sowie die Datenauswertung wurden von mir eigenständig durchgeführt. Das Manuskript habe ich erstellt. Die Co-Autoren Dr. Bettina Seiwert, Myah Goldstein, Dr. Marwan Al-Raggad, Prof. Elias Salameh und Prof. Benny Chefetz haben das Manuskript korrekturgelesen und kommentiert. Die Idee das Manuskript zu erstellen hatte Prof. Thorsten Reemtsma. Als korrespondierender Autor hat Prof. Reemtsma das Manuskript korrekturgelesen, kommentiert und war zudem an der Formulierung beteiligt.

Cite this: *Anal. Methods*, 2017, 9, 1273

## An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater†

Christina Riemenschneider,<sup>a</sup> Bettina Seiwert,<sup>a</sup> Myah Goldstein,<sup>b</sup> Marwan Al-Raggad,<sup>c</sup> Elias Salameh,<sup>c</sup> Benny Chefetz<sup>b</sup> and Thorsten Reemtsma<sup>\*a</sup>

An analytical method for the simultaneous determination of 28 wastewater-derived contaminants and possible metabolites (e.g. carbamazepine, 10,11-epoxy-carbamazepine, benzotriazole, lamotrigine, and diclofenac) in common plant tissues with high water content (lettuce, cabbage, and tomato) was developed and validated. The developed method combines solid–liquid extraction, without the need for a clean-up step, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with electrospray ionization in positive and negative modes. This method was compared with the known QuEChERS method and exhibited better analytical performance. Method detection limits of  $\leq 2.0$  ng g<sup>-1</sup> dry weight and absolute recoveries of >60% with high intra- and inter-day precision (RSD < 10%) could be achieved for 71% of the target analytes in four different matrices (cabbage, lettuce and tomato leaves, and tomato fruits). Compared to the QuEChERS method, the developed method allows the determination of a wide range of compounds with different physical–chemical properties (neutral, acidic, and basic) and considers even possible metabolites of pharmaceuticals in plant materials. The developed method was successfully applied to analyse wastewater-derived contaminants and their metabolites in plants which were grown under greenhouse and real field conditions. It could be shown that this method is suitable for the sensitive determination of environmental contaminants originating from treated wastewater and a range of their metabolites in irrigated plants and their edible parts. Due to its broadness the extraction method should also be suitable for screening of unknown contaminants and metabolites by LC high-resolution mass spectrometry.

Received 1st November 2016  
Accepted 26th January 2017

DOI: 10.1039/c6ay02984a

rsc.li/methods

### Introduction

As a consequence of water scarcity the use of treated municipal wastewater for crop irrigation is of growing interest and has already been practised widely in semiarid and arid countries around the world.<sup>1–3</sup> When using treated municipal wastewater for crop irrigation, pollutants of emerging concern (e.g. pharmaceuticals and personal care products), with low removal efficiency in wastewater treatment plants, are introduced into the agro-ecosystem. They may eventually be transferred into the crops and their edible parts and thus may enter the food chain.<sup>4–8</sup> Recent studies have shown that not only the parent

compound but also metabolites of contaminants can be detected in crops and should therefore be considered in uptake studies.<sup>4,6,9</sup> Micropollutants such as pharmaceuticals and personal care products represent a new class of contaminants in food and in animal feed and increase public interest. However, until now, guidelines on the quality of irrigation water concerning organic contaminants are not available. In case that considerable amounts of emerging contaminants would be taken up by plants from the wastewater used for irrigation such quality standards may become important. Consequently, the analysis of plant tissues for contaminants originating from wastewater will become of growing importance when irrigation with reclaimed wastewater continues to increase. Furthermore, analytical methods are required to learn how contaminants are distributed in plants and where they are metabolized.

The determination of wastewater-derived contaminants and their possible metabolites in crops requires an appropriate analytical method that covers a broad spectrum of compounds in various plant tissues and complex matrices. While a huge number of publications focus on the determination of pesticide

<sup>a</sup>Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Department of Analytical Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany. E-mail: thorsten.reemtsma@ufz.de; Fax: +49-341235 450822; Tel: +49-34123 51261

<sup>b</sup>The Hebrew University of Jerusalem, Department of Soil and Water Sciences, P.O. Box 12, Rehovot 7610001, Israel

<sup>c</sup>University of Jordan, Water, Energy and Environment Center, Amman 11942, Jordan

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ay02984a

residues in plants only few reports consider environmental contaminants in crops. In this context, liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) have become the methods of choice for sensitive and selective detection.<sup>3</sup> With regard to sample preparation various methods for the determination of micropollutants in plant materials have been described. These include solid-liquid extraction (SLE), matrix solid-phase dispersion (MSPD),<sup>10</sup> QuEChERS,<sup>9,11</sup> pressurized liquid extraction (PLE) and ultrasonic liquid extraction (ULE) in combination with a clean-up step using liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) or gel permeation chromatography (GPC). As far as wastewater derived contaminants are concerned, these studies are limited to specific compound classes,<sup>9,12</sup> do not consider possible metabolites or, in the case of multi-residue methods, provide only low recovery (to below 40%) of certain substances.<sup>13,14</sup>

Hence, the aim of the present work was to develop a multi-residue method for the analysis of a wide range of environmental contaminants in common vegetables, including possible metabolites formed in the plants. Especially for metabolites of micropollutants validated analytical methods are still lacking. Besides that, the developed method should be sensitive enough to allow the analysis of contaminants in crops grown under real field conditions. The developed method is comprised of solid-liquid extraction combined with an ultrasonic step followed by the LC-MS/MS measurement. In contrast to conventional methods (such as QuEChERS) the advantage of this method is that it does not require any clean-up step and thus the analysis of various compounds covering a wide range of physico-chemical properties with low detection limits could be achieved. Finally, this method was applied to study the behaviour of environmental contaminants under greenhouse and field conditions.

## Materials and methods

### Chemicals

All used chemicals were of analytical grade (97–99% purity). Reagent details are provided in the ESI.†

A stock solution of CBZ-d10 (2000 ng mL<sup>-1</sup>) and a mixed stock solution (500 µg L<sup>-1</sup>) including 28 target compounds were prepared in methanol and stored in the dark at -20 °C.

### Chromatography and mass spectrometry

LC-MS/MS analysis was performed with an Agilent (1260 Infinity series, Böblingen, Germany) HPLC system consisting of a pump with a binary high-pressure gradient mixer, a degasser, a thermostated autosampler (set at 15 °C) and a column oven (set at 30 °C). Compounds were separated using an Ascentis Express reversed-phase column (10 cm × 3.0 mm, 2.7 µm; Sigma-Aldrich) with a SecurityGuard C18 guard column (4 mm × 2.0 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup> under a gradient elution comprising of two mobile phases: 0.1% acetic acid in water (A) and 0.1% acetic acid in methanol (B). The following gradient program was used: 90% A; 2–5 min:

90–60% A; 5–40 min: 60–50% A; 40–41 min: 50–10% A; 41–46 min: 10% A; 46–50 min: 90% A. The total analysis time was 50 min. The injection volume was 5 µL of each sample.

Detection of analytes was carried out using a QTrap 5500 mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) with a TurboIon-Spray interface operated in positive and negative ionization modes. The operation conditions for the analysis in positive and negative ionization modes were the following: ion spray voltage, 5500 V (positive mode) and -4500 V (negative mode); curtain gas, 40 psi; GS1 and GS2, 30; source temperature, 400 °C and entrance potential, 10 and -10 V, respectively. Nitrogen served as a nebulizer, desolvator as well as collision gas in both modes. Scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) mode was used to obtain the maximum sensitivity for the detection of the target analytes. The optimized MS parameters such as collision energy (CE), declustering potential (DP) and the selected MRM transitions are given in Table S1.† Confirmation of the compounds was performed by means of retention times and MRM ion transitions to authentic reference standards.

### Method development

An analytical method for the determination of 28 organic micropollutants, including nine carbamazepine metabolites, in plant materials was developed. For this purpose recovery experiments were performed using lettuce and cabbage leaves, purchased from a local supermarket and free of target analytes. Initially, the leaves were freeze-dried and ground to a fine powder. For spiking, 1 mL stock solution (500 µg L<sup>-1</sup>) was mixed with 10 mL acetone which was finally added to 10 g freeze-dried plant material to reach a concentration of 50 ng g<sup>-1</sup> d.w. Afterwards, the suspension was mixed thoroughly in order to adjust a homogenous distribution of the analytes and was stored approximately eight hours at ambient temperature to allow the evaporation of the residual acetone and methanol. Subsequently, 0.5 g of spiked material was extracted using either solid-liquid extraction (SLE) or the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) methodology.<sup>15</sup>

For solid-liquid extraction the plant material was weighed out in a 50 mL glass centrifuge tube and was soaked in 3 mL Milli-Q water. Subsequently, 10 µL carbamazepine-d10 (2000 ng mL<sup>-1</sup>) was added as surrogate standard and the plant material was extracted with 5 mL methanol and sonicated for 20 min in an ultrasonic water bath followed by shaking for 30 min. After a centrifugation step of 5 min at 1700g the liquid supernatant was separated and the same plant material was extracted with 5 mL methanol : water (50 : 50) using the same extraction procedure. Finally, the liquid supernatants were combined and filtered using a 0.2 µm syringe RC filter (Sartorius GmbH, Goettingen, Germany).

For the QuEChERS procedure 0.5 g spiked plant material was placed in a 50 mL glass centrifuge tube and was soaked in 3 mL Milli-Q water. Subsequently, 10 µL carbamazepine-d10 (2000 ng mL<sup>-1</sup>) was added as surrogate standard and mixed by vortexing for 20 s. After addition of 10 mL acetonitrile the sample was vigorously shaken by hand for 1 min. 4 g anhydrous MgSO<sub>4</sub> and 1 g NaCl were added and immediately shaken by hand for

2 min. The extracts were centrifuged for 5 min at 1700g. Afterwards, 6 mL of the supernatant was transferred into a 15 mL glass centrifuge tube containing 150 mg PSA sorbent and 900 mg MgSO<sub>4</sub>. The samples were shaken by hand for 1 min and centrifuged at 1700g for 5 min. The supernatants were filtered using a 0.2 µm syringe RC filter.

All samples were prepared in triplicate and analyzed by LC-MS/MS.

### Method validation

Method validation was performed by determining instrumental detection limits (IDL), method detection and quantification limits (MDL/MQL), linear range, matrix effects (ME), absolute recoveries (RA) and relative standard deviations (RSD).

Linear range and IDL were determined *via* diluting the mixed stock solution (consisting of 28 target analytes) with MeOH/H<sub>2</sub>O (50 : 50) in the range of 0.01–50 ng mL<sup>-1</sup>. The average response factors ( $R_f$ ) of these calibration standards are referred to as  $R_{f_i}$  (eqn (1)). IDLs were estimated for each analyte using the diluted standards and obtained a signal to noise (S/N) ratio of 3.

In addition, matrix-matched standards (in the concentration range of 0.2–1000 ng g<sup>-1</sup>) were prepared by spiking small amounts of the mixed stock solution in the matching extraction matrices using the extracts from analyte-free lettuce and cabbage leaves analysed by the SLE method. The average response factors of these calibration standards are referred to as  $R_{f_e}$  (eqn (1)). The lowest acceptable calibration point with a response of S/N = 3 was referred to as the MDL and the response of S/N = 6 as the MQL.

Absolute recoveries were determined using contaminant-free lettuce and cabbage leaves which were fortified with target analytes at a concentration of 50 ng g<sup>-1</sup> d.w. before extraction. The plant material was extracted by the SLE method, and the RSD was obtained by using the results from triplicate samples. In this study, absolute recoveries cover extraction efficiency and matrix effects.

ME were calculated relative to MeOH/H<sub>2</sub>O (50 : 50) according to eqn (1) (adopted from<sup>16</sup>).

$$ME [\%] = \left(1 - \frac{R_{f_2}}{R_{f_1}}\right) \times 100 \quad (1)$$

Further method validation was performed by applying the developed method to freeze-dried tomato fruits and leaves at three spiking levels (5, 25 and 50 ng g<sup>-1</sup> d.w.), originating from greenhouse-grown tomato plants, which were free of target analytes. Method detection limits, method quantification limits and matrix-effects were determined as described above. Absolute recoveries and relative standard deviations were calculated from three replicates at each spiking concentration. In addition, the inter-day precision of the method was tested by determining the relative standard deviations of repeated analysis of three replicates at each spiking level after seven days.

### Method application

The developed SLE method was subsequently applied to two different experiments. First of all, the method was applied to

analyse CBZ and nine of its metabolites in leaves and fruits of tomato and cucumber plants grown under greenhouse conditions in Israel. Detailed growing conditions and parameters were reported in a previous study.<sup>4</sup> In brief, the plants were grown under greenhouse conditions in sandy soil and were irrigated daily with 1 L spiked treated municipal wastewater (CBZ at a concentration of 2.0 µg L<sup>-1</sup>, Table S2†).<sup>4</sup> Cucumbers were harvested after 71 days and tomatoes after 78 days. Secondly, the whole method was applied to study the occurrence of 28 environmental contaminants in 10 common vegetables (tomato, eggplant, zucchini, pepper, cabbage, lettuce, parsley, rucola, potato and carrot) which were grown under real field conditions and irrigated with water of the Zarqa River. Further details are reported elsewhere.<sup>17</sup> Quantification of the analytes was always performed by standard addition to account for matrix-induced signal suppression or enhancement in electrospray ionization.

## Results and discussion

### LC-MS/MS method

Method development was performed for 28 common micro-pollutants occurring at highest concentrations in the irrigation water of a later field study (water of the Zarqa River, Jordan) and thus, having the possibility to be present also in the irrigated plants. In addition, compounds were selected to represent different physico-chemical properties (Table S3†). Furthermore, nine metabolites of carbamazepine (acridone, EP-CBZ, 10-OH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, *trans*-DiOH-CBZ, *cis*-DiOH-CBZ, oxcarbazepine and acridine) which are all commercially available as reference compounds were included. Moreover, these metabolites have previously been reported as human metabolites or as transformation products generated in wastewater treatment.<sup>18–20</sup> The analysis of these metabolites would allow us to study CBZ metabolism in plants in more detail, which has previously been shown to be of relevance.<sup>4</sup>

The determination relies on LC-MS/MS using the multiple reaction monitoring (MRM) mode due to its high selectivity and sensitivity. Chromatography was optimized to ensure sufficient separation of isomers that are poorly distinguished by mass spectrometry, namely 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, EP-CBZ and oxcarbazepine (Table S1†). This was achieved (except for 4- and 5-methylbenzotriazole) within 50 min (Fig. 1). In addition, the ion ratio of the most characteristic fragments of a compound was a useful tool to ensure the identification of the metabolites.

### Extraction method

Solid–liquid extraction for the 28 polar pollutants and metabolites in plant materials was compared to the standard QuEChERS method<sup>15</sup> originally developed for the determination of pesticides in food. Although it is known that QuEChERS with primary–secondary amine (PSA) clean-up is less suitable for acidic analytes,<sup>13,15,21</sup> it was selected as a reference method because (1) it has been adopted as an official extraction method by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) in 2007, and (2) it has been approved for the determination of

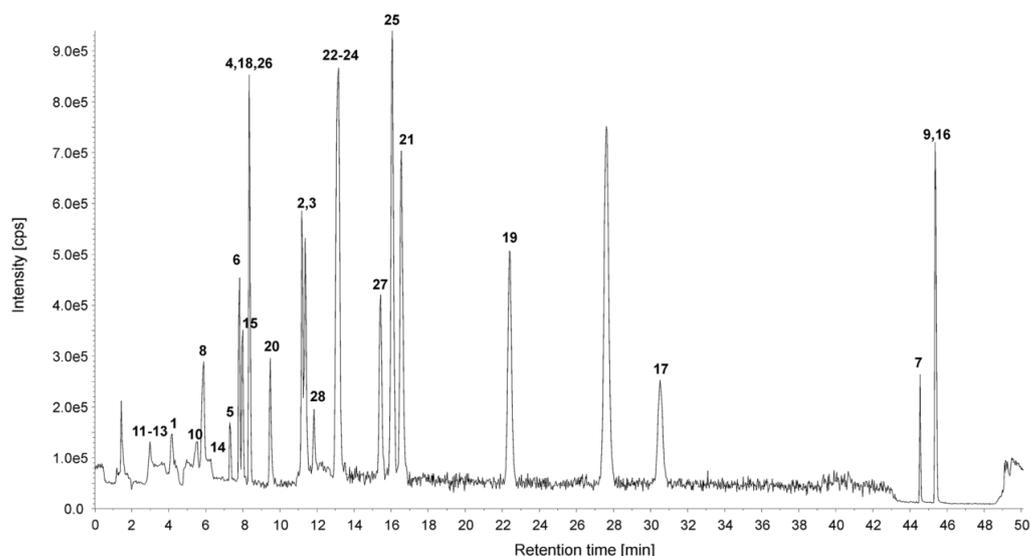


Fig. 1 Chromatogram of a mix of the 28 analytes in MeOH/H<sub>2</sub>O (50 : 50) at 10 ng mL<sup>-1</sup> obtained by MRM-detection in positive and negative modes. For compound names, see Table 1.

pesticide residues in food by the European Committee for Standardization in 2008.<sup>22,23</sup> In addition, modified QuEChERS methods have been used for the determination of pharmaceuticals and personal care products in celery, lettuce<sup>24</sup> and carrot.<sup>9</sup>

Recovery rates were determined for both extraction methods at 50 ng g<sup>-1</sup> dry weight in two different matrices (lettuce and cabbage leaves). Absolute recoveries ranged between 60 and 98% for SLE with relative standard deviations (RSDs) of below 20% ( $n = 3$ ) for the majority of analytes (82%, Fig. 2, Table S4†).

Lower recoveries were observed for the highly polar X-ray contrast media iohexol, iomeprol and iopamidol (17–50%), only. For CBZ and its metabolites the extraction efficiencies of SLE and QuEChERS were comparable (Fig. 2). As expected, the acidic compounds (such as mefenamic acid, diclofenac and gemfibrozil) showed lower recovery by QuEChERS (Fig. 2). Moreover, the X-ray contrast media iohexol, iomeprol, iopamidol and iopromide could not be recovered at all by this method (Fig. 2). The recovery of other hydrophilic and polar compounds

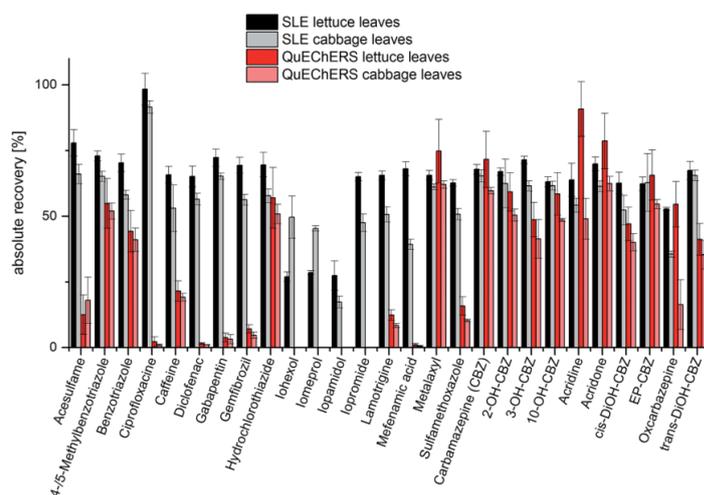


Fig. 2 Absolute recoveries of 28 analytes spiked at a concentration of 50 ng g<sup>-1</sup> dry weight in lettuce and cabbage leaves and extracted with solid–liquid extraction (SLE) or QuEChERS. Error bars indicate standard deviations ( $n = 3$ ).

**Table 1** Instrument detection limit (IDL), method detection limit (MDL), method quantification limit (MQL), linear ranges and correlation coefficients ( $R^2$ ) for the analysis of 28 compounds by LC-MS/MS

Number	Analyte	IDL MeOH/H <sub>2</sub> O (50 : 50) (ng mL <sup>-1</sup> )	Linear range ( $R^2$ ) MeOH/H <sub>2</sub> O (50 : 50) (ng mL <sup>-1</sup> )	MDL lettuce/cabbage leaves (ng g <sup>-1</sup> d.w.)	MQL lettuce/cabbage leaves (ng g <sup>-1</sup> d.w.)	Linear range ( $R^2$ ) lettuce/ cabbage leaves (ng g <sup>-1</sup> d.w.)
1	Acetufame	0.01	0.01–50 (1.0000)	<0.2	0.2	0.2–1000 (0.9999)
2 and 3	4-/5-Methylbenzotriazole	0.05	0.05–50 (0.9981)	0.2	1.0	0.2–1000 (0.9999)
4	Benzotriazole	0.05	0.05–50 (0.9990)	<2.0	2.0	2.0–1000 (1.0000)
5	Ciprofloxacin	0.05	0.05–50 (0.9998)	0.2	1.0	0.2–1000 (0.9997)
6	Caffeine	0.1	0.01–50 (0.9973)	2.0	10.0	2.0–1000 (0.9992)
7	Diclofenac	0.01	0.01–50 (0.9999)	0.2	2.0	0.2–1000 (0.9998)
8	Gabapentin	0.05	0.05–50 (0.9998)	<2.0	10.0	2.0–1000 (0.9997)
9	Gemfibrozil	0.05	0.05–50 (1.0000)	<0.2	1.0	0.2–1000 (0.9999)
10	Hydrochlorothiazide	0.01	0.01–50 (0.9996)	<0.2	0.2	0.2–1000 (1.0000)
11	Iohexol	0.5	0.5–50 (0.9997)	2.0	<100.0	2.0–1000 (0.9994)
12	Iomeprol	0.1	0.01–50 (0.9997)	<2.0	20.0	2.0–1000 (1.0000)
13	Iopamidol	0.05	0.05–50 (0.9999)	<2.0	2.0	2.0–1000 (0.9991)
14	Iopromide	0.1	0.01–50 (0.9999)	<2.0	2.0	2.0–1000 (0.9999)
15	Lamotrigine	0.05	0.05–50 (0.9988)	0.2	<1.0	0.2–1000 (0.9998)
16	Metenamic acid	<0.1	0.1–50 (1.0000)	<0.2	<1.0	0.2–1000 (1.0000)
17	Metaxyl	0.05	0.05–50 (0.9999)	2.0	10.0	2.0–1000 (0.9999)
18	Sulfamethoxazole	0.01	0.01–50 (0.9999)	<0.2	1.0	0.2–1000 (1.0000)
19	Carbamazepine	0.01	0.01–50 (0.9999)	<0.2	1.0	0.2–1000 (1.0000)
20	Acridine	0.05	0.05–50 (1.0000)	2.0	10.0	2.0–1000 (0.9995)
21	Acridone	<0.01	0.01–50 (1.0000)	<0.2	<0.2	0.2–1000 (0.9999)
22	EP-CBZ	0.05	0.05–50 (0.9989)	<0.2	0.2	0.2–1000 (0.9999)
23	10-OH-CBZ	0.01	0.01–50 (0.9995)	<0.2	<0.2	0.2–1000 (0.9999)
24	2-OH-CBZ	<0.1	0.1–50 (0.9995)	<0.2	<0.2	0.2–1000 (0.9999)
25	3-OH-CBZ	0.05	0.05–50 (0.9993)	<0.2	<0.2	0.2–1000 (0.9999)
26	cis-DIOH-CBZ	0.05	0.05–50 (0.9987)	0.2	1.0	0.2–1000 (0.9998)
27	Oxcarbazepine	<0.05	0.05–50 (0.9997)	0.2	1.0	0.2–1000 (0.9999)
28	trans-DIOH-CBZ	0.05	0.05–50 (0.9999)	0.2	1.0	0.2–1000 (0.9999)

(i.e. ciprofloxacin, acesulfame and gabapentin) was also much lower for QuEChERS compared to SLE (Fig. 2). Generally, the QuEChERS methodology showed lower recoveries (<20%) and higher RSD values (>20%) (Table S4†). The relatively low extraction efficiencies by QuEChERS are likely due to the clean-up step by dispersive solid phase extraction (d-SPE) using PSA, as this removes acid components.<sup>15,25</sup> Thus, the extraction of predominantly polar and acidic analytes requires either modified QuEChERS methods (e.g. without the clean-up step<sup>13</sup>) or alternatives.

While the clean-up may reduce matrix effects and improve method robustness it conflicts with the concept of a broad analytical method that covers anionic, non-ionic and cationic contaminants and their metabolites. Although the QuEChERS extracts were less colored than those obtained by SLE their matrix effects were comparable (Table S4†). Moreover, the second SLE step with aqueous methanol (50 : 50) ensured the extraction of more polar analytes and metabolites.

### Method validation

**Method performance.** The method was validated for the 28 target compounds for commodities with high water content. Most of the irrigated crops, such as vegetables, fall into this category and methods can be validated for representative crops of this commodity group.<sup>26</sup> Method instrument detection limits (IDLs), method detection limits (MDLs), method quantification limits (MQLs), linear ranges and correlation coefficients ( $R^2$ ) were determined from lettuce and cabbage leaves. Excellent linearity (with  $R^2 > 0.995$ ) in the range between 0.01 and 50 ng mL<sup>-1</sup> in MeOH/H<sub>2</sub>O and IDLs of less than 0.1 ng mL<sup>-1</sup> were obtained for most of the analytes under the used instrumental conditions (Table 1).

The MDLs and MQLs were similar for lettuce and cabbage leaves and ranged from <0.2 to 2.0 ng g<sup>-1</sup> d.w. (MDL) and from <0.2 to <100 ng g<sup>-1</sup> d.w. (MQL), respectively. Linear calibration curves for lettuce and cabbage leaves were obtained for the studied compounds at concentrations ranging from 0.2 to 1000 ng g<sup>-1</sup> d.w. (Table 1).

The MDLs for carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole, gemfibrozil and caffeine determined in the current study (<0.2–2.0 ng g<sup>-1</sup> d.w.) compare well to those reported by Wu *et al.* for iceberg lettuce (between 0.2 and 1.0 ng g<sup>-1</sup> d.w.).<sup>14</sup> In contrast, Chuang *et al.*<sup>24</sup> reported MDL values of carbamazepine, sulfamethoxazole and caffeine for celery which were up to 80 times higher for sulfamethoxazole (15.8 ng g<sup>-1</sup> d.w.), while the MDL of caffeine (2.3 ng g<sup>-1</sup> d.w.) was comparable to this study (2.0 ng g<sup>-1</sup> d.w.). In addition, the MDL values of carbamazepine, diclofenac and sulfamethoxazole obtained in this study were on average more than one order of magnitude lower than those previously published for fresh pea tissues.<sup>27</sup>

**Recoveries.** Absolute recoveries (RA) of all target analytes in cabbage and lettuce leaves (spiked at 50 ng g<sup>-1</sup> d.w.) were determined to further validate the developed SLE method. The absolute recoveries were >60% for the majority of compounds with relative standard deviations (RSD) of less than 20% (Table S4†). This is in accordance with the requirements of the European Commission for pesticide residues analysis in food and feed

which suggested mean recovery values within the range of 70–120% with RSD < 20%, while a range of 60–140% is still acceptable in routine multi-residue analysis.<sup>26</sup> Moreover, considering that this method included 28 analytes with a wide range of physico-chemical properties, the recoveries obtained were still satisfactory. Besides, relative standard deviations (RSD) from recovery experiments ( $n = 3$ ; 50 ng g<sup>-1</sup> d.w.) of <10% for 53% of the analytes demonstrated the good precision of the method. In addition, the absolute recoveries of carbamazepine and caffeine, obtained in this study, compare well to those previously reported, while the values of sulfamethoxazole (63%) and gemfibrozil (69%), for instance, were notably higher (compared to 16% and 26% by Wu *et al.*).<sup>14</sup> As in this study, Wu *et al.* used ultrasound SLE but followed by a clean-up step using SPE.<sup>14</sup>

Finally, the method was further validated for tomato leaves and fruits. Absolute recoveries at three different spiking levels (5, 25, and 50 ng g<sup>-1</sup> d.w.) and intra-day and inter-day precision were determined (Tables S5 and S6†). Recovery rates of >60% with RSD < 10% ( $n = 3$ ) could be achieved for the majority of analytes (68%) at all concentration levels in tomato leaves and fruits (Tables S5 and S6†), demonstrating again the good precision of the method. Until now, metabolites of contaminants usually remained unconsidered in method development and no validated method for the quantification of metabolites of pharmaceuticals in vegetables has been published yet.

**Matrix effects.** Matrix effects are one of the main parameters influencing the quantitation of analytes in biological samples analyzed by LC-MS/MS.<sup>28–30</sup> After sample preparation residual matrix components can interfere with analytes during the MS ionization process and can lead to an enhancement or suppression of the signal. In this study, matrix effects were calculated according to Reemtsma *et al.*<sup>16</sup> The results are expressed as relative matrix effects as a percentage of suppression (+) or enhancement (–) for both tested methods (SLE and QuEChERS) and two matrices (lettuce and cabbage leaves) (Fig. 3a, Table S4†).

Generally, signal enhancement was the dominant effect on most of the target analytes in lettuce and cabbage leaves (Fig. 3a). Strong matrix effects were observed for both, lettuce and cabbage leaf extracts (Fig. 3a). Matrix effects were largely comparable for the two commodities, but highly variable for the different analytes, e.g. from +73% to –153% for the extracts obtained by SLE. Astonishingly, most of the 28 analytes experienced signal enhancement in the cabbage and lettuce extracts, among them all analytes that were detected in negative mode (Fig. 3a). In the extracts obtained by the QuEChERS method, signal suppression was more frequent (9 analytes instead of 4 for SLE). Although the clean-up steps of the QuEChERS method (partitioning and PSA) reduced the color of the final extracts, matrix effects were not significantly weaker (+86% to –76%) than those observed after SLE (Fig. 3a).

In addition, matrix effects were determined in extracts of tomato fruits and leaves obtained by SLE (Fig. 3b, Tables S5 and S6†). In contrast to lettuce and cabbage leaves signal suppression was predominantly observed in both matrices (tomato fruits and leaves) for most of the analytes (Fig. 3b). All in all, matrix effects ranged between –17% and 78% in tomato fruit

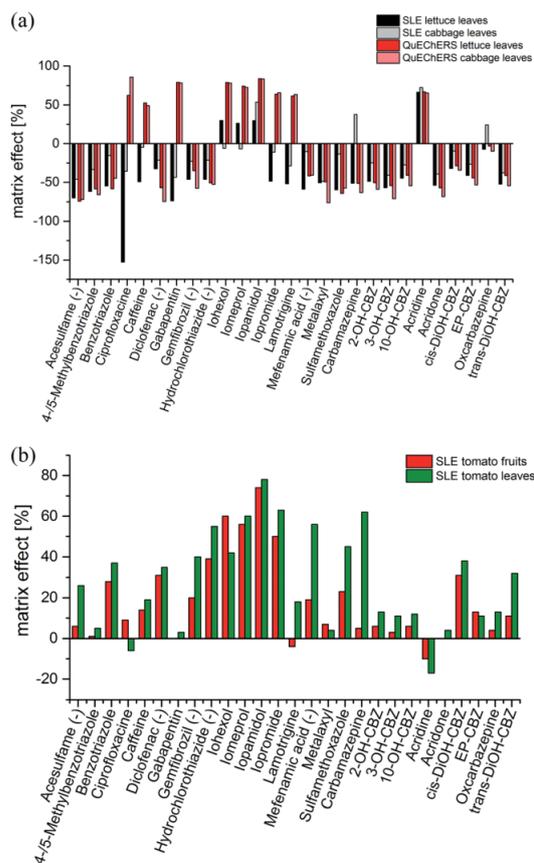


Fig. 3 Matrix effects of 28 analytes in extracts of lettuce and cabbage leaves obtained by solid–liquid extraction (SLE) or QuEChERS (a) and in extracts of tomato fruits and leaves obtained by SLE (b). (–) indicates analytes determined in negative ESI mode.

and leaf extracts (Tables S5 and S6†). The reason why SLE of lettuce and cabbage resulted in signal enhancement but in signal suppression for the same analytes in tomato is unknown. The difference is not due to compositional differences of the major components (water, protein, fat, carbohydrates, and minerals) because those are comparable.<sup>31</sup>

These data illustrate that matrix effects have to be considered in method validation for quantitative analysis of micro-pollutants in plant materials. As far as labelled standards are not available standard addition or matrix matched calibration is recommended to obtain reliable quantitative data. While standard addition was used in this method development study, matrix matched calibration may be more convenient in routine application.

#### Method application

As a first application, the developed method was used to analyze carbamazepine and nine of its possible metabolites in tomato

and cucumber leaves and fruits. The investigated samples have been analyzed before by Goldstein *et al.*<sup>4</sup> with regard to the uptake and translocation of 13 pharmaceutical compounds. Due to the translocation of CBZ from roots into leaves (up to 400 ng g<sup>-1</sup> d.w.) and fruits (up to 40 ng g<sup>-1</sup> d.w.) and the additional detection of two CBZ metabolites (EP-CBZ and *trans*-DiOH-CBZ)<sup>4</sup> these samples were chosen to search for further metabolites with this new method.

A total of seven metabolites could be detected in both plants (Fig. 4). Interestingly the spectrum of metabolites was wider in tomato (7 metabolites) than in cucumber (4 metabolites) indicating a plant specific metabolism. 2-OH-CBZ could be identified and quantified as one of the main metabolites in addition to EP-CBZ and *trans*-DiOH-CBZ in tomato leaves. However, this metabolite was not present in cucumber, neither in leaves nor in fruits. The overall concentration of CBZ and its metabolites was comparable for the leaves of both plant species (1920 ng g<sup>-1</sup> d.w. for cucumber and 2390 ng g<sup>-1</sup> d.w. for tomato), while it was 6-fold higher in cucumber fruits (152 ng g<sup>-1</sup> d.w.) than in tomato fruits (25 ng g<sup>-1</sup> d.w.). The better translocation of CBZ in cucumber fruits than in tomato fruits is in good agreement with findings of Goldstein *et al.* and ascribed to differences in fruit/leaf transpiration.<sup>4</sup> Considering all plant compartments, the concentration of CBZ and its metabolites was 2-fold (for cucumber) and 3.5-fold (for tomato) higher compared to that of CBZ alone. These results clearly illustrate the need to identify and moreover to quantify possible metabolites of micro-pollutants in future plant uptake studies.

Furthermore, the developed method was successfully applied to study the occurrence of 28 environmental contaminants in 10 common vegetables grown under field conditions. The results of this study are reported elsewhere.<sup>17</sup> Both the spectrum of metabolites as well as their relative distribution found in the leaves of field grown tomatoes<sup>17</sup> compare well to those grown under greenhouse conditions (Fig. 4). In addition,

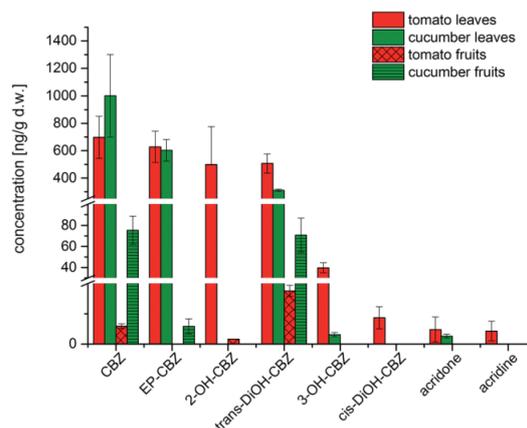


Fig. 4 Concentration of carbamazepine (CBZ) and its metabolites in tomato and cucumber plants grown under greenhouse conditions ( $n = 3$ ). Samples were extracted with solid–liquid extraction and analyzed by LC-MS/MS.

as in the greenhouse experiments, 2-OH-CBZ was one of the main metabolites in leaves of field grown tomatoes.<sup>17</sup> However, the concentration of analytes in leaves was about one order of magnitude lower in the field experiment<sup>17</sup> and might be a consequence of the very different conditions of growing and irrigation in pots in the greenhouse compared to the field.

With this application it could be demonstrated that the developed method is suitable for the determination of selected contaminants even under real field conditions, where the exposure concentrations tend to be lower than in most hydroponic or greenhouse experiments.

## Conclusion

A rapid and sensitive multi-residue method for the simultaneous determination of 28 common micropollutants with a wide range of physico-chemical properties and originating from treated municipal wastewater was developed for plant materials and validated for commodities with high water content (cabbage, lettuce, and tomato). This method is the first validated method for the determination of nine possible CBZ metabolites in plant tissues. MDLs between 0.2 and 2.0 ng g<sup>-1</sup> d.w. for all analytes in the investigated matrices could be achieved. This sensitivity allows for the quantification of the target compounds in agricultural plants grown under field conditions. Due to matrix effects matrix-matched calibration or standard addition is recommended for reliable quantification, as stable isotope-labelled internal standards are not available for all analytes.

This method covers the largest number of wastewater-derived contaminants (>25), with a wide range of physico-chemical properties (neutral, acidic and basic) and highest sensitivity yet published. In contrast to the common QuEChERS method solid-liquid extraction without further clean-up is effective for a broad range of contaminants. Therefore, this extraction should also be suitable for the screening of unknown contaminants and metabolites in plants. The application of this method to vegetables grown in greenhouse and on agricultural fields showed that a large number of CBZ metabolites are indeed present in vegetable irrigated with treated municipal wastewater. The total concentration of CBZ metabolites even equals or exceeded the concentration of the parent compound in tomato and cucumber and thus highlights the need for validated analytical methods considering metabolites of micropollutants in plant tissues. The developed method suits the growing need to determine polar contaminants originating from treated wastewater in irrigated plants and their edible parts. Such methods are required to ensure that the worldwide growing reuse of treated municipal wastewater as irrigation water in agriculture is performed in a way that is in accordance with consumer safety.

## Acknowledgements

The project "Pollutants of emerging concern originating from reclaimed wastewater: plant uptake, translocation and transformation" (PECTake) was funded by the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn, Germany, grant Re1290/7-1). Hilke Maas is gratefully acknowledged for her support in laboratory work.

## References

- 1 A. Alfara, E. Kemp-Benedict, H. Hotzl, N. Sader and B. Sonneveld, *Water Resour. Manage. Ser.*, 2011, **25**, 1153–1167.
- 2 State Water Resources Control Board (SWRCB) and Department of Water Resources (DWR), *Results, Challenges, and Future Approaches to California's Municipal Wastewater Recycling Survey*, 2009.
- 3 X. Wu, L. K. Dodgen, J. L. Conkle and J. Gan, *Sci. Total Environ.*, 2015, **536**, 655–666.
- 4 M. Goldstein, M. Shenker and B. Chefetz, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 5593–5600.
- 5 K. C. Hyland, A. C. Blaine, E. R. Dickenson and C. P. Higgins, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2015, **34**, 2213–2221.
- 6 T. Malchi, Y. Maor, G. Tadmor, M. Shenker and B. Chefetz, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 9325–9333.
- 7 M. Shenker, D. Harush, J. Ben-Ari and B. Chefetz, *Chemosphere*, 2011, **82**, 905–910.
- 8 X. Wu, J. L. Conkle, F. Ernst and J. Gan, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 11286–11293.
- 9 A. Macherius, T. Eggen, W. G. Lorenz, T. Reemtsma, U. Winkler and M. Moeder, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 7785–7791.
- 10 D. Calderon-Preciado, C. Jimenez-Cartagena, G. Penuela and J. Maria Bayona, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1319–1327.
- 11 P. Paya, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tassdelen, J. Oliva and A. Barba, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 1697–1714.
- 12 M. Pan, C. K. C. Wong and L. M. Chu, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 11062–11069.
- 13 C. Diez, W. A. Traag, P. Zommer, P. Marinero and J. Atienza, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1131**, 11–23.
- 14 X. Q. Wu, J. L. Conkle and J. Gan, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1254**, 78–86.
- 15 M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher and F. J. Schenck, *J. AOAC Int.*, 2003, **86**, 412–431.
- 16 T. Reemtsma, L. Alder and U. Banasiak, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1271**, 95–104.
- 17 C. Riemenschneider, M. Al-Raggad, M. Moeder, B. Seiwert, E. Salameh and T. Reemtsma, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 5784–5792.
- 18 A. Bahlmann, W. Brack, R. J. Schneider and M. Krauss, *Water Res.*, 2014, **57**, 104–114.
- 19 U. Huebner, B. Seiwert, T. Reemtsma and M. Jekel, *Water Res.*, 2014, **49**, 34–43.
- 20 M. Leclercq, O. Mathieu, E. Gomez, C. Casellas, H. Fenet and D. Hillaire-Buys, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2009, **56**, 408–415.
- 21 U. Koesukiwat, K. Sanguankaew and N. Leepipatiboon, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **626**, 10–20.
- 22 European Committee for Standardization, Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS

- and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – QuEChERS – method, EN 15662, 2008.
- 23 S. J. Lehotay, *J. AOAC Int.*, 2007, **90**, 485–520.
- 24 Y. H. Chuang, Y. J. Zhang, W. Zhang, S. A. Boyd and H. Li, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1404**, 1–9.
- 25 K. Maštovská and S. J. Lehotay, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1040**, 259–272.
- 26 European Commission, *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*, Document No. SANCO/12571/2013, 2013.
- 27 R. Tanoue, Y. Sato, M. Motoyama, S. Nakagawa, R. Shinohara and K. Nomiya, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 10203–10211.
- 28 I. Marchi, V. Viette, F. Badoud, M. Fathi, M. Saugy, S. Rudaz and J. L. Veuthey, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 4071–4078.
- 29 L. Schlittenbauer, B. Seiwert and T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1415**, 91–99.
- 30 H. Stahnke, T. Reemtsma and L. Alder, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 2185–2192.
- 31 S. Souci, F. Senser and H. Scherz, *Lebensmitteltabelle für die Praxis: Der kleine Souci/Fachmann/Kraut*, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 1987.

**Electronic Supplementary Material**

An LC-MS/MS method for the determination of 28 environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater

Christina Riemenschneider<sup>1</sup>, Bettina Seiwert<sup>1</sup>, Myah Goldstein<sup>2</sup>, Marwan Al-Raggad<sup>3</sup>, Elias Salameh<sup>3</sup>, Benny Chefetz<sup>2</sup>, Thorsten Reemtsma<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Analytical Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig

<sup>2</sup> The Hebrew University of Jerusalem, Department of Soil and Water Sciences, P.O. Box 12, Rehovot 7610001, Israel

<sup>3</sup> University of Jordan, Water, Energy and Environment Center, Amman 11942, Jordan

\* Corresponding author: Thorsten Reemtsma (thorsten.reemtsma@ufz.de)

### Chemicals

Acesulfame, acridine, benzotriazole, caffeine, carbamazepine, carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ), carbamazepine-d10, diclofenac, gabapentin, hydrochlorothiazide, 4-methyl-1H-benzotriazole, 5-methyl-1H-benzotriazole, oxcarbazepine, sulfamethoxazole and trimethoprim were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). 2-hydroxy carbamazepine (2-OH-CBZ), 3-hydroxy carbamazepine (3-OH-CBZ), 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (10-OH-CBZ), *cis*-10,11-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine (*cis*-DiOH-CBZ), *rac trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine (*trans*-DiOH-CBZ), lamotrigine and acridone were obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Ciprofloxacin was ordered from Bioforsk (Saerheim, Norway), gemfibrozil from ICV-Biomedicals (Eschwege, Germany), mefenamic acid from ABCR (Karlsruhe, Germany) and iohexol from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). lomeprol and metalaxyl were purchased from Dr. Ehrendorfer (Augsburg, Germany) and iopamidol and iopromide were obtained from EDQM (Straßburg, France). Bondensil-PSA and anhydrous magnesium sulfate were from Agilent Technologies (Santa Clara, US), acetone from AppliChem (Darmstadt, Germany) and sodium chloride from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol, acetonitrile and acetic acid (Biosolve, Valkenswaard, The Netherlands) were of analytical and UPLC grade. All aqueous solutions were prepared by using ultrapure water from a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany).

**Table S1:** Optimized parameters for the QTrap-MS/MS analysis of the target compounds: declustering potential (DP), collision energy (CE) and mean retention time (RT).

compound	ESI polarity	Precursor ion (m/z)	DP (V)	MRM 1	CE 1 (eV)	MRM 2	CE 2 (eV)	RT (min)
Acesulfame	-	162	-50	82	-20	78	-40	4.2
4-/5-Methylbenzotriazole	+	134	71	77	31	78	29	11.3
Benzotriazole	+	120	126	65	29	92	23	8.4
Ciprofloxacin	+	332	106	314	29	231	51	7.3
Caffeine	+	195	80	138	27	110	31	7.7
Diclofenac	-	295	-40	252	-16	250	-16	44.5
Gabapentin	+	172	36	154	19	137	21	6.3
Gemfibrozil	-	249	-60	121	-24	127	-16	45.4
Hydrochlorothiazide	-	295	-110	268	-28	205	-32	5.5
Iohexol	+	821	136	803	27	603	35	3.5
lomeprol	+	777	76	686	29	558	33	3.9
lopamidol	+	777	76	558	33	686	29	2.4
lopromide	+	791	46	572	33	773	27	6.3
Lamotrigine	+	256	91	211	39	109	63	8.2
Mefenamic acid	-	240	-65	196	-24	180	-38	45.3
Metaxyl	+	280	71	220	19	160	33	30.1
Sulfamethoxazole	+	254	56	156	21	92	35	8.4
Carbamazepine (CBZ)	+	237	106	194	25	193	47	22.4
Acridine	+	180	40	152	47	-	-	9.6
Acridone	+	196	126	167	49	-	-	16.1
carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ)	+	253	31	180	41	236	15	12.8
10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (10-OH-CBZ)	+	255	51	194	31	237	15	12.8
2-hydroxy carbamazepine (2-OH-CBZ)	+	253	61	210	29	208	35	12.9
3-hydroxy carbamazepine (3-OH-CBZ)	+	253	61	210	27	208	29	15.7
10,11-dihydro-10,11-cis-dihydroxycarbamazepine (cis-DiOH-CBZ)	+	271	86	180	43	210	21	7.9
Oxcarbazepine	+	253	71	236	19	208	27	15.1
10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazepine (trans-DiOH-CBZ)	+	271	26	180	49	253	11	11.6

S3

**Table S2:** Concentration of carbamazepine (CBZ) and its metabolites in treated wastewater (TWW) and the irrigation water of greenhouse experiments (spiked TWW). Analysis was performed by LC-MS/MS.

	concentration in TWW [ $\mu\text{g/L}$ ] <sup>#</sup>	concentration in spiked TWW [ $\mu\text{g/L}$ ]
		greenhouse experiment
CBZ	1.06	1.99
EP-CBZ	N.A.*	0.07
2-OH-CBZ	N.A.	0.23
3-OH-CBZ	N.A.	0.08
10-OH-CBZ	N.A.	0.76
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	N.A.	2.44

<sup>#</sup> M. Goldstein, M. Shenker and B. Chefetz, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 5593-5600.

\* Not analyzed.

**Table S3:** Physico-chemical properties and application of target analytes

Compound	Molecular weight (g/mol)	Formula	log <i>D</i> (pH 7)*	pKa	Application
Acesulfame	163.15	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNO <sub>4</sub> S	-3.12	-	artificial sweetener
4-/5-Methylbenzotriazole	133.15	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	1.67	1.7; 8.5	corrosion inhibitor
Benzotriazole	119.12	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub>	1.59	1.2; 8.4	corrosion inhibitor
Ciprofloxacin	331.34	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-2.47	6.4; 8.7	antibacterial agent
Caffeine	194.19	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	0.42	-	stimulant
Diclofenac	296.15	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	1.83	4.2	antirheumatic agent
Gabapentin	171.24	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	-1.47	4.7; 10.3	anticonvulsant
Gemfibrozil	250.34	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	1.86	4.8	pharmaceutical
Hydrochlorothiazide	297.74	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	0.02	9.0; 9.6	diuretic
Iohexol	821.14	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	-3.03	>11.3	x-ray contrast agent
Iomeprol	777.09	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	-2.55	>11.3	x-ray contrast agent
Iopamidol	777.09	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	-2.35	>10.9	x-ray contrast agent
Iopromide	791.11	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	-1.98	>10.6	x-ray contrast agent
Lamotrigine	256.10	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	2.32	5.4	anticonvulsant
Mefenamic acid	241.29	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	2.14	3.7	antirheumatic agent
Metalaxyl	279.33	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	1.81	1.4	pesticide
Sulfamethoxazole	253.28	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	-0.30	1.4; 5.8	antibacterial agent
Carbamazepine (CBZ)	236.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	2.17	-	anticonvulsant
Acridine	179.22	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> N	3.30	5.6	CBZ metabolite
Acridone	195.22	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> NO	4.08	-	CBZ metabolite
carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ)	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.37	-	CBZ metabolite
10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (10-OH-CBZ)	254.28	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.69	-	CBZ metabolite
2-hydroxy carbamazepine (2-OH-CBZ)	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.87	10.3	CBZ metabolite
3-hydroxy carbamazepine (3-OH-CBZ)	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.22	10.0	CBZ metabolite
10,11-dihydro-10,11- <i>cis</i> -dihydroxycarbamazepine ( <i>cis</i> -DiOH-CBZ)	270.28	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	CBZ metabolite
Oxcarbazepine	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.00	-	CBZ metabolite
10,11-dihydro-10,11- <i>trans</i> -dihydroxy-carbamazepine ( <i>trans</i> -DiOH-CBZ)	270.28	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.71	-	CBZ metabolite

\*predicted from ACD/Percepta, 2015

**Table S4:** Matrix-effects (ME)<sup>#</sup>, absolute recovery (RA) and relative standard deviations (RSD, n=3) of solid-liquid extraction (SLE) and QuEChERS method for the extraction of 28 polar pollutants from plant material

Analyte	SLE			QuEChERS		
	ME [%]	lettuce leaves / cabbage leaves RA [%] 50 ng/g	RSD [%] 50 ng/g	ME [%]	lettuce leaves / cabbage leaves RA [%] 50 ng/g	RSD [%] 50 ng/g
Acesulfame	-70 / -46	77.9 / 66.1	6.5 / 5.6	74 / 72	12.6 / 18.1	59.8 / 27.5
4-/5-	-62 / -33	73.0 / 65.2	2.2 / 11.5	59 / 66	54.9 / 52.0	17.3 / 6.0
Methylbenzotriazole						
Benzotriazole	-55 / -15	70.4 / 58.2	4.7 / 10.1	58 / 45	44.2 / 41.0	17.9 / 10.8
Ciprofloxacin	-153 / -36	98.4 / 91.5	6.2 / 2.5	-63 / -86	2.2 / 1.0	86.3 / 35.3
Caffeine	-49 / -5	65.9 / 53.0	4.8 / 16.8	-53 / -49	21.6 / 19.2	17.8 / 7.8
Diclofenac	-32 / -21	65.2 / 56.5	6.1 / 4.0	57 / 75	1.5 / 1.1	23.9 / 5.7
Gabapentin	-74 / -44	72.3 / 65.3	4.5 / 17.8	-79 / -79	3.8 / 3.2	44.8 / 54.6
Gemfibrozil	-46 / -23	69.4 / 56.2	4.3 / 3.6	35 / 58	7.2 / 4.7	22.2 / 25.3
Hydrochlorothiazide	-46 / -21	69.6 / 57.8	6.6 / 16.9	51 / 53	57.1 / 50.9	20.3 / 7.3
Iohexol	30 / -6	27.1 / 49.7	6.5 / 16.1	-79 / -78	- / -	- / -
Iomeprol	26 / -7	28.6 / 45.4	2.6 / 2.3	-74 / -73	- / -	- / -
Iopamidol	30 / 54	27.5 / 17.4	17.8 / 13.1	-84 / -83	- / -	- / -
Iopromide	-49 / -11	65.1 / 47.5	2.5 / 7.0	-64 / -66	<MQL / -	- / -
Lamotrigine	-52 / -29	65.6 / 50.7	2.6 / 5.8	-62 / -63	12.4 / 8.4	16.3 / 9.6
Mefenamic acid	-59 / -10	68.1 / 39.2	3.2 / 4.9	42 / 41	1.1 / 0.6	49.0 / 42.4
Metaxyl	-50 / -49	65.7 / 61.2	2.8 / 1.8	49 / 76	74.8 / 62.1	16.1 / 2.3
Sulfamethoxazole	-60 / -14	62.8 / 50.8	2.0 / 4.2	64 / 57	15.9 / 10.3	21.7 / 2.1
Carbamazepine (CBZ)	-51 / -38	67.9 / 65.1	3.4 / 16.5	51 / 63	71.7 / 59.7	14.8 / 2.1
Acridine	67 / 73	63.9 / 54.2	10.0 / 5.0	-67 / -66	90.8 / 49.0	11.5 / 16.0
Acridone	-54 / -39	70.0 / 61.4	3.6 / 3.3	57 / 68	78.7 / 62.5	13.4 / 4.4
EP-CBZ	-41 / -26	62.4 / 62.9	4.1 / 17.4	44 / 54	65.7 / 54.6	14.6 / 3.3
10-OH-CBZ	-45 / -28	63.1 / 61.7	3.0 / 16.3	41 / 54	58.5 / 48.6	13.9 / 1.3
2-OH-CBZ	-49 / -25	67.0 / 62.5	2.1 / 14.8	50 / 59	59.3 / 50.4	12.4 / 4.5
3-OH-CBZ	-57 / -41	71.4 / 61.6	3.6 / 3.2	54 / 71	48.7 / 41.4	13.5 / 17.7
cis-DiOH-CBZ	-32 / -10	62.6 / 52.3	6.6 / 10.9	29 / 34	47.1 / 40.1	13.6 / 8.2
Oxcarbazepine	-7 / 24	52.8 / 35.5	1.2 / 3.2	3 / 10	54.6 / 16.4	15.9 / 5.2
trans-DiOH-CBZ	-52 / -38	67.5 / 65.6	5.1 / 17.4	41 / 55	41.2 / 35.4	14.8 / 15.3

<sup>#</sup>Signal suppression (+) and enhancement (-)

**Table S5:** Method validation parameters for solid-liquid extraction of 28 environmental contaminants from freeze-dried tomato fruits: method detection limit (MDL), method quantitation limit (MQL), matrix-effects (ME)<sup>#</sup>, absolute recoveries (RA) and relative standard deviations (RSD, n = 3) at three different spiking concentrations.

Analyte	MDL [ng/g d.w.]	MQL [ng/g d.w.]	ME [%]	Absolute recovery			Intra-day			Inter-day		
				5 ng/g d.w. [%]	25 ng/g d.w. [%]	50 ng/g d.w. [%]	RSD [%] 5 ng/g d.w.	RSD [%] 25 ng/g d.w.	RSD [%] 50 ng/g d.w.	RSD [%] 5 ng/g d.w.	RSD [%] 25 ng/g d.w.	RSD [%] 50 ng/g d.w.
4,5-Methylbenzotriazole	0.2	1.0	1	80.4	70.3	73.2	3.0	3.0	3.5	2.0	2.6	3.9
Acesulfame	1.0	2.0	6	78.5	75.5	79.0	13.6	3.4	1.2	2.1	3.3	0.3
Benzotriazole	1.0	2.0	28	43.0	51.4	55.2	20.9	6.5	4.6	8.3	7.0	4.3
Caffeine	1.0	2.0	14	100.3	63.7	68.7	9.2	6.3	11.5	4.4	4.8	2.2
Ciprofloxacin	1.0	2.0	9	40.5	34.6	46.2	8.9	3.3	13.7	16.4	12.0	10.8
Diclofenac	1.0	2.0	31	71.7	63.4	71.9	14.9	5.5	2.5	11.1	3.2	0.8
Gabapentin	1.0	2.0	0	48.8	48.7	76.5	0.9	1.6	4.9	3.9	3.3	5.6
Gemfibrozil	0.2	1.0	20	66.3	61.4	66.5	8.0	1.2	1.8	6.4	2.2	2.5
Hydrochlorothiazide	<0.2	0.2	39	53.6	50.1	54.9	5.7	0.9	3.7	2.2	0.9	3.2
Iohexol	2.0	10.0	60	<MQL	24.9	32.9	-	14.1	3.3	-	10.1	4.5
Ioperol	2.0	10.0	56	<MQL	26.7	39.5	-	3.9	2.8	-	10.3	3.4
Iopamidol	2.0	10.0	74	<MQL	19.8	20.4	-	1.4	16.8	-	10.9	19.8
Iopromide	2.0	10.0	50	<MQL	40.4	44.7	-	7.0	2.8	-	4.1	7.7
Lamotrigine	0.2	1.0	-4	74.0	71.1	79.5	8.0	3.2	3.5	4.9	5.8	1.4
Mefenamic acid	1.0	2.0	19	64.8	53.3	60.1	9.6	2.2	0.9	1.9	2.8	2.0
Metaxyl	1.0	2.0	7	96.5	93.5	97.9	3.1	4.5	4.5	8.5	1.6	0.9
Sulfamethoxazole	0.2	1.0	23	51.9	51.8	49.8	10.3	5.2	13.2	16.7	7.9	11.5
Carbamazepine												
(CBZ)	0.2	1.0	5	88.6	87.2	91.0	0.7	2.9	0.0	1.6	2.3	1.3
Acridine	0.2	1.0	-10	82.5	78.3	86.6	3.0	1.2	2.0	7.6	1.3	4.2
Acridone	<0.2	<0.2	0	91.9	89.4	96.1	2.1	2.2	0.7	2.2	0.9	2.0
EP-CBZ	0.2	1.0	13	76.2	77.0	79.7	1.9	4.3	0.7	2.1	3.1	0.7
10-OH-CBZ	0.2	1.0	6	86.8	86.2	89.4	4.0	3.8	2.9	3.1	2.1	2.4
2-OH-CBZ	0.2	1.0	6	82.5	79.1	82.7	2.7	0.9	2.6	4.3	1.9	1.6
3-OH-CBZ	<0.2	0.2	3	89.8	88.0	93.1	2.3	0.8	1.1	1.3	0.8	0.6
cis-DiOH-CBZ	0.2	1.0	31	52.5	53.4	57.4	2.0	4.7	2.0	3.9	3.1	3.6
Oxcarbazepine	0.2	1.0	4	81.4	88.9	92.8	1.3	2.5	0.8	5.1	1.1	1.9
trans-DiOH-CBZ	0.2	1.0	11	72.4	71.5	75.2	4.6	4.3	1.2	6.3	5.3	2.0

<sup>#</sup>Signal supression (+) and enhancement (-)

S7

**Table S6:** Method validation parameters for solid-liquid extraction of 28 environmental contaminants from freeze-dried tomato leaves: method detection limit (MDL), method quantitation limit (MQL), matrix-effects (ME)<sup>#</sup>, absolute recoveries (RA) and relative standard deviations (RSD, n = 3) at three different spiking concentrations.

Analyte	MDL [ng/g d.w.]	MQL [ng/g d.w.]	ME [%]	Absolute Recovery			Intra-day			Inter-day		
				[%] 5 ng/g d.w.	[%] 25 ng/g d.w.	[%] 50 ng/g d.w.	RSD [%] 5 ng/g d.w.	RSD [%] 25 ng/g d.w.	RSD [%] 50 ng/g d.w.	RSD [%] 5 ng/g d.w.	RSD [%] 25 ng/g d.w.	RSD [%] 50 ng/g d.w.
4,5-Methylbenzotriazole	0.2	2.0	5	72.6	66.6	66.9	4.1	5.2	7.1	3.5	0.6	2.1
Acesulfame	1.0	2.0	26	69.6	64.8	68.0	16.8	3.0	9.5	2.7	1.5	0.3
Benzotriazole	1.0	20.0	37	44.5	46.8	48.9	12.1	9.5	10.6	7.3	1.5	4.0
Caffeine	0.2	1.0	19	118.5	67.0	59.7	10.9	2.8	5.2	6.4	2.0	2.8
Ciprofloxacin	2.0	10.0	-6	<MQL	24.4	60.9	-	7.4	7.1	-	9.5	14.6
Diclofenac	1.0	2.0	35	68.3	48.6	53.8	20.6	3.9	7.9	29.9	5.8	8.6
Gabapentin	1.0	1.0	3	79.1	52.5	73.1	9.3	10.7	14.3	5.6	3.4	4.5
Gemfibrozil	0.2	1.0	40	51.6	39.8	43.5	10.7	2.3	1.5	6.0	1.1	1.7
Hydrochlorothiazide	0.2	1.0	55	42.9	39.3	41.6	5.9	4.3	11.3	6.6	0.8	1.2
Iohexol	2.0	2.0	42	<MQL	27.6	49.5	-	12.8	6.7	-	11.7	4.5
lopermol	2.0	10.0	60	<MQL	25.8	38.8	-	1.8	6.2	-	5.0	0.9
lepamidol	2.0	10.0	78	<MQL	19.3	21.9	-	7.0	11.7	-	5.6	4.7
lopromide	2.0	10.0	63	<MQL	32.3	38.4	-	9.0	9.4	-	7.4	3.9
Lamotrigine	0.2	10.0	18	51.3	58.3	63.9	4.2	2.3	14.6	17.4	3.9	0.6
Meftamic acid	1.0	2.0	56	33.2	28.9	32.8	2.8	2.0	6.4	7.4	2.4	2.0
Metaxyl	1.0	1.0	4	91.2	94.5	98.9	4.3	3.7	2.5	2.5	3.1	2.0
Sulfamethoxazole	1.0	2.0	45	28.6	29.4	29.1	9.0	12.2	19.4	16.8	7.9	12.5
Carbamazepine (CBZ)	0.2	1.0	62	35.2	31.9	33.3	3.5	2.8	2.1	3.8	0.5	1.9
Acridine	0.2	2.0	-17	97.2	95.4	95.3	3.8	6.8	10.9	4.7	3.1	2.2
Acridone	<0.2	1.0	4	87.1	85.3	87.7	2.2	5.3	3.9	2.4	1.2	1.3
EP-CBZ	0.2	1.0	11	81.0	75.2	79.0	4.7	5.0	5.5	1.6	2.7	2.2
10-OH-CBZ	0.2	0.2	12	86.5	80.2	83.6	2.8	4.7	5.5	2.8	2.0	2.7
2-OH-CBZ	0.2	1.0	13	76.3	79.8	81.6	5.1	4.0	2.7	6.5	3.9	2.3
3-OH-CBZ	<0.2	1.0	11	81.0	80.8	85.2	3.3	4.1	5.5	2.1	0.5	1.4
cis-DiOH-CBZ	1.0	1.0	38	55.3	47.5	49.3	1.9	11.4	5.1	11.3	4.8	3.2
Oxcarbazepine	0.2	<0.2	13	56.2	58.9	61.6	3.0	8.2	14.0	7.5	7.0	14.1
trans-DiOH-CBZ	0.2	1.0	32	64.5	64.4	66.9	10.0	1.7	7.0	5.8	2.5	1.1

<sup>#</sup>Signal suppression (+) and enhancement (-)

## 5.2 Publikation 2

### **Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater**

Christina Riemenschneider, Marwan Al-Raggad, Monika Moeder, Bettina Seiwert, Elias Salameh, Thorsten Reemtsma

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2016**, 64, 5784-5792

Der Artikel ist abrufbar unter:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b01696>

Erklärung zum Eigenanteil an der Publikation:

Die Idee der durchgeführten Studie ist in Zusammenarbeit aller Autoren entstanden. Die Entnahme repräsentativer Feldproben in Jordanien erfolgte durch mich, Prof. Thorsten Reemtsma und Dr. Bettina Seiwert. Ermöglicht und unterstützt wurde die Probenahme durch die jordanischen Kooperationspartner Dr. Marwan Al-Raggad und Prof. Elias Salameh. Die Analyse der Pflanzenproben wurde von mir, mit Unterstützung durch Hilke Maas, durchgeführt. Die Auswertung der Daten und Interpretation der Ergebnisse wurden von mir durchgeführt. Die Idee das Manuskript zu erstellen hatten Prof. Thorsten Reemtsma und ich. Als Erstautorin habe ich das Manuskript erstellt. Dr. Monika Möder und Prof. Thorsten Reemtsma waren an der Diskussion der Ergebnisse, der Ergebnispräsentation und Formulierung beteiligt.

## Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater

Christina Riemenschneider,<sup>†</sup> Marwan Al-Raggad,<sup>‡</sup> Monika Moeder,<sup>†</sup> Bettina Seiwert,<sup>†</sup> Elias Salameh,<sup>‡</sup> and Thorsten Reemtsma<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Department of Analytical Chemistry, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

<sup>‡</sup>Water, Energy, and Environment Center, University of Jordan, Amman 11942, Jordan

### Supporting Information

**ABSTRACT:** The reuse of treated municipal wastewater for crop irrigation is a necessity in arid and semiarid regions but a potential entrance for emerging contaminants into the food chain. However, little attention has yet been paid to the detection of micropollutants and possible metabolites in vegetables grown under realistic field conditions. In this study, the uptake of 28 micropollutants and carbamazepine metabolites in 10 different field-grown vegetable species (among them carrot, lettuce, potato, and zucchini) from Jordan was studied. A total of 12 micropollutants and six carbamazepine metabolites, four of which have never been analyzed before in plant-uptake studies, could be detected in all of the samples in concentrations ranging from 1.7 to 216 ng per g of dry weight. In edible tissues, the total concentration of micropollutants decreased in the order of leafy (247–533) > root (73–126) > fruit-bearing (5–76 ng per g of dry weight) vegetables. A preliminary health-risk assessment for nine compounds according to the TTC concept shows no risk for seven of the micropollutants; for ciprofloxacin and 10,11-epoxycarbamazepine, however, more-specific toxicity data would be required for a refined risk assessment.

**KEYWORDS:** human exposure, HPLC–MS/MS, benzotriazole, tomato, threshold of toxicological concern

### ■ INTRODUCTION

In the coming decades, water availability will be one of the main challenges, especially in semiarid and arid regions around the world. As an additional consequence of global environmental change, almost 2 billion people worldwide will be faced with absolute water scarcity by 2025.<sup>1</sup> Agriculture is the economic sector with the highest water consumption. Therefore, the use of treated municipal wastewater for agricultural irrigation is a necessity and already practiced widely (for example, in the Mediterranean, the Middle East, and California).<sup>2–4</sup> Many studies have shown that anthropogenic micropollutants, including pharmaceuticals (e.g., carbamazepine, diclofenac, and gabapentin), artificial sweeteners (e.g., acesulfame), X-ray contrast media (e.g., iohexol and iopromide), and corrosion inhibitors (e.g., benzotriazole) are removed only incompletely in conventional wastewater-treatment processes and are, therefore, widespread in the aquatic environment.<sup>5,6</sup> Hence, the fate of organic micropollutants in the agricultural environment has received growing interest. Over the past 5 years, several publications have reported that organic micropollutants will be transferred from treated wastewater (TWW) or spiked water<sup>7–11</sup> and biosolids<sup>12,13</sup> into crop plants and may finally enter the food chain. However, the majority of studies have been performed under controlled conditions such as in hydroponic cultures or in laboratory or greenhouse settings.<sup>7,9,10,14</sup> Real-world growing and irrigation conditions have scarcely been studied.<sup>4</sup>

Both the growth of plants (especially roots) and the bioavailability of pharmaceuticals to plants differ considerably

between hydroponic and soil systems. Reports have shown that the soil organic-carbon content and the soil microbiology affect the bioavailability and degradation rate of compounds in soil.<sup>7,15–17</sup> These are, therefore, important parameters in plant-uptake studies. Beyond that, solely field studies enable an appropriate risk assessment of wastewater-derived contaminants to consumers. Nevertheless, in field experiments, growing conditions are less controllable and less reproducible and may cause differences between individual plant samples. In contrast, hydroponic studies are more controllable and useful for studying the metabolism and the influence of physicochemical properties of micropollutants on plant uptake, as these systems exclude soil processes. Plant-cell cultures are also attractive for studying plant metabolism.<sup>18,19</sup> Thus, depending on the research question, a certain experimental approach (i.e., cell culture, hydroponic culture, or lysimeter or field experiment) is preferable.

Until now, the number of wastewater-derived contaminants for which uptake has been studied is still limited. Therefore, the focus of our study was set on the uptake of a larger number of micropollutants that are known to be poorly removed in wastewater treatment. Moreover, we considered possible metabolites because studies have shown that contaminants may be transformed by the plant's metabolism.<sup>20,21</sup> These

Received: April 14, 2016

Revised: July 1, 2016

Accepted: July 4, 2016

Published: July 4, 2016

metabolism pathways can be divided into three phases.<sup>21</sup> In phase I reactions, the parent compound is activated by hydrolysis or oxidation, which lead to the introduction of functional groups (e.g., hydroxyl or carboxyl) into the xenobiotic. In phase II, these primary metabolites may be conjugated by hydrophilic molecules (e.g., glucose, amino acids, or glutathione) to enhance the polarity of the compound for subsequent compartmentation and storage processes (phase III).<sup>20,21</sup> In contrast to phase I metabolites, phase II products are less-(phyto)toxic, and thus, conjugation is an important step in the plant-detoxification process.<sup>20</sup> Moreover, studies on CBZ<sup>7,22</sup> and on triclosan<sup>18</sup> highlighted the need to quantify the possible metabolites of micropollutants in plants for a correct assessment of both the plant uptake of contaminants and the potential health risks associated with it.

The research questions of the present study were as follows: (1) which polar organic contaminants can be determined in irrigation water stemming from TWW, (2) which contaminants and possible metabolites occur in crops irrigated with that water and grown regularly on fields, and (3) what is the exposure level of wastewater-derived contaminants to the population consuming these vegetables. In total, 28 analytes, among them pharmaceuticals, X-ray contrast reagents, and corrosion inhibitors, were investigated in 10 different vegetable species grown under standard farming practices in Jordan using mainly water from the Zarqa River (Jordan) for irrigation.

Although the quality of irrigation water is regulated in terms of hygienic parameters, salinity, and (heavy) metals in international and national regulations, there is no regulation for the occurrence of trace pollutants yet.<sup>23,24</sup> In this respect, results from real fields irrigated with TWW are fundamental to recognizing whether such regulations may be required to ensure the safe reuse of treated wastewater in agriculture.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Test Substances.** All used chemicals were of analytical grade (97–99% purity). Reagent details are provided in section S1.1 of the Supporting Information. A mixed stock solution (500 µg of each analyte per L) including 28 target compounds was prepared in methanol and stored in the dark at –20 °C.

**Analytical Conditions of LC–MS/MS.** The HPLC system (Agilent 1260 Infinity series; Böblingen, Germany) consisted of a pump with a binary high-pressure gradient mixer, a degasser, a thermostated autosampler (set at 15 °C), and a column oven (set at 30 °C). Chromatographic separation was performed on a Ascentis Express reverse-phase column (10 cm × 3.0 mm, 2.7 µm; Sigma-Aldrich) with a SecurityGuard C18 guard column (4 mm × 2.0 mm; Phenomenex; Aschaffenburg, Germany) at a flow rate of 0.3 mL/min under a gradient elution made of two mobile phases: 0.1% acetic acid in water (A) and 0.1% acetic acid in methanol (B). The gradient program was applied as follows: 0–2 min: 90% A; 2–5 min: 90–60% A; 5–40 min: 60–50% A; 40–4 min: 50–10% A; 41–46 min: 10% A; and 46–50 min: 90% A. The injection volume was 5 µL for all measurements.

A QTrap 5500 mass spectrometer (AB Sciex; Darmstadt, Germany) with a TurboIonSpray interface operated at positive- and negative-ionization mode was used for the identification and detection of all substances. Samples were analyzed in scheduled multiple-reaction-monitoring (sMRM) mode. The ion-spray voltage was set at 5.50 kV (positive mode) and –4.50 kV (negative mode), the source temperature was 400 °C, the ion source gases were 1 and 2 at 30 psi, the curtain gas was 40 psi, and the entrance potential was 10 and –10 V, respectively. Substance specific parameters are given in Table S2. Instrument control and data acquisition were performed using AB Sciex Analyst 1.6.2.

Nitrogen was used as the nebulizer for desolvation as well as collision gas.

**Sampling Site and Plant Material.** The Zarqa River is one of the largest rivers in Jordan (a flow path of approximately 60 km), with the effluent of the As Samra wastewater treatment plant being its major source water. Halfway downstream, the river water is stored in the King Talal Reservoir, from where it is released to King Abdullah Canal in the Jordan Valley area.<sup>25</sup>

In this study, 10 different vegetable species (tomato, eggplant, zucchini, pepper, cabbage, lettuce, parsley, rucola, potato, and carrot) were taken from fields that were irrigated regularly by drip irrigation with a mixture of surface water from the Zarqa River and groundwater. Full plants were harvested at the mature stage in October 2014 (tomato, pepper, and lettuce) and May 2015 (eggplant, zucchini, cabbage, parsley, rucola, potato, and carrot). Except for zucchini and eggplant, all species were repeatedly sampled and analyzed: tomato (2×), pepper (2×), cabbage (2×), potato (2×), lettuce (3×), carrot (4×), rucola (6×), and parsley (6×). Generally, replicates were of approximately the same size and were taken from different sites of the same field. The selection of crops was mainly based on the production volume and their importance for regional markets in Jordan. Root, leafy, and fruit-bearing vegetables were chosen to consider different edible tissues. Furthermore, vegetables that are often consumed raw (such as lettuce, tomato, pepper, rucola, parsley, and carrot) were of particular interest.

**Analysis of Zarqa River Water Samples.** In addition to plant material, water samples from the Zarqa River were taken five times (August 14, October 14, December 14, January 15, and May 15) at three sampling points in proximity to the studied field sites. Water samples were collected in 10 mL glass amber bottles with Teflon lined stoppers. About 7 mL of each sample was taken from the river (at the point having the highest flow rate) to ensure representative sampling. Prior to sample collection, sampling bottles were rinsed once with the water sample. Samples were filtered (0.45 µm RC syringe filters) immediately after collection. All of the samples were stored refrigerated (at 4 °C) and in the dark to minimize any potential for enzymatic processes. The average pH for all water samples was 7.8.

The samples were analyzed by LC–MS/MS approximately 1 week after collection. The analysis of all target compounds (Table S1) was performed by direct injection of 5 µL of each water sample into the LC–ESI-MS/MS system. However, CBZ metabolites (with the exception of *trans*-DiOH-CBZ) were only measured at the point of harvest (October 14 and May 15). Quantification of all analytes was carried out by the method of standard addition to account for matrix-induced signal suppression or enhancement in electrospray ionization.

The limit of detection (LOD) of all analytes was estimated via standard solutions (in the range of 0.01–50 ng/mL) prepared in methanol–water (1:1). The lowest acceptable calibration point with the response of signal-to-noise (S/N) ratio of 3 was referred to as the LOD and was in the range of 0.01 to 0.1 ng/mL (except iohexol, 0.5 ng/mL) for all analytes.

**Sample Preparation, Extraction, and Quantification.** Whole plants were separated into roots, shoots, leaves, and fruits. In the case of tomato and pepper, shoots and leaves were not separated and are expressed as shoots because the leaves were already withered. In addition, potato and carrot roots were analyzed unpeeled. Before extraction, the plant material was rinsed with tap water, freeze-dried, and ground to a fine powder. All replicates of each vegetable species were combined and homogenized before extraction.

The extraction of 28 target compounds (Table S1) from plant samples was performed by solid–liquid extraction (SLE). Method details are published elsewhere.<sup>26</sup> In brief, 0.5 g of freeze-dried plant material was extracted with 5 mL of methanol and sonicated for 20 min followed by shaking for 30 min. After 5 min of centrifugation at 1700g, the liquid supernatant was separated, and the same plant material was extracted with 5 mL of methanol–water (50:50) using the same extraction procedure. This step was added to ensure the extraction of more polar analytes and metabolites. Subsequently, the liquid supernatants were combined and filtered using a 0.2 µm syringe

RC filter (Sartorius GmbH; Goettingen, Germany). All of the samples were prepared in duplicate and analyzed by LC-MS/MS.

Identification of the analytes was carried out by means of retention times and MRM ion transitions (Table S2) to authentic reference standards. Quantification was performed by the method of standard addition to account for matrix-induced signal suppression or enhancement in ionization.

Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined via matrix-matched standards (in a concentration range of 0.2–1000 ng per g of dry weight (ng/g dw)) from analyte-free lettuce and cabbage leaves obtained by SLE. The lowest acceptable calibration point with the response of the signal-to-noise ( $S/N$ ) ratio of 3 was referred to as the LOD, and the response of  $S/N$  was 6 as the LOQ, respectively. The LOD was in the range of <0.2 and 2.0 ng/g dw, and the LOQ was between <0.2 and 20 (except for iohexol, <100 ng/g dw) for all analytes. In addition, absolute recoveries were in the range of 60 to 98% for 82% of the analytes in lettuce leaves.<sup>26</sup>

**Health-Risk Assessment.** To evaluate the human exposure, we conducted a health-risk assessment using the concept of “threshold of toxicological concern” (TTC) based on the decision trees of Cramer et al. (1976)<sup>27</sup> and Kroes et al. (2004).<sup>28</sup> The TTC approach is a useful tool for the prioritization of trace contaminants in, e.g., food and drinking water for which specific toxicological data are lacking.<sup>22,28–31</sup> The detected compounds were ascribed to one of three classes (I, II, and III), reflecting increasing toxicity, or substances having structural alerts for genotoxicity and carcinogenicity using Toxtree software.<sup>32</sup> The detected analytes carbamazepine, acesulfame, caffeine, diclofenac, gabapentin, benzotriazole, hydrochlorothiazide, *trans*-DiOH-CBZ, 2-hydroxy- (2-OH-CBZ), and 3-hydroxy-carbamazepine (3-OH-CBZ) represent class III compounds (TTC value of 1500 ng per kg of body weight per day), while 10,11-epoxycarbamazepine (EP-CBZ) and ciprofloxacin are potentially genotoxic compounds, having a TTC of 2.5 ng/kg body weight per day.<sup>28</sup> An exceedance of the TTC value for a micropollutant suggests that further toxicity data are required to assess the human health risk from that compound.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Occurrence of Micropollutants in Zarqa River.** In this study, water of the Zarqa River was used as main source water for irrigation. The water quality was studied in the growing period of vegetables (Aug 2014 – May 2015) and the selection of target analytes for crops was based on these data. Of the 28 pollutants included in the analysis, 21 were detected in  $\geq 50\%$  of the water samples (Table 1). Acesulfame, *trans*-DiOH-CBZ and the X-ray contrast media iomeprol and iopromide were present at highest median concentrations (from 4.4 to 6.4  $\mu\text{g/L}$ , Table 1). The concentration of further CBZ metabolites was in the lower  $\mu\text{g/L}$  range. *Trans*-DiOH-CBZ occurred as the primary metabolite at levels even three times higher than the parent compound (Table 1), which agrees with findings for TWW in France and Canada.<sup>33,34</sup> The concentration level of pharmaceuticals and X-ray contrast media in the Zarqa River compares well to those recently reported for the King Abdallah Channel in the Lower Jordan Valley.<sup>35</sup> As in that study, X-ray contrast media belong to the pollutants with highest concentrations. In addition, the types of organic micropollutants detected in the Zarqa River are similar to those typically found in German rivers. However, the concentration level in the Zarqa River is about 1 order of magnitude higher.<sup>36</sup> This may be due to the fact that the treated wastewater of As Samra WWTP is scarcely diluted by groundwater and rainfall on its way to King Talal Reservoir.

**Occurrence and Distribution of Micropollutants in Vegetables.** Knowledge on the concentration levels of micropollutants in crops grown under real field conditions and standard farming practices in arid regions is necessary to

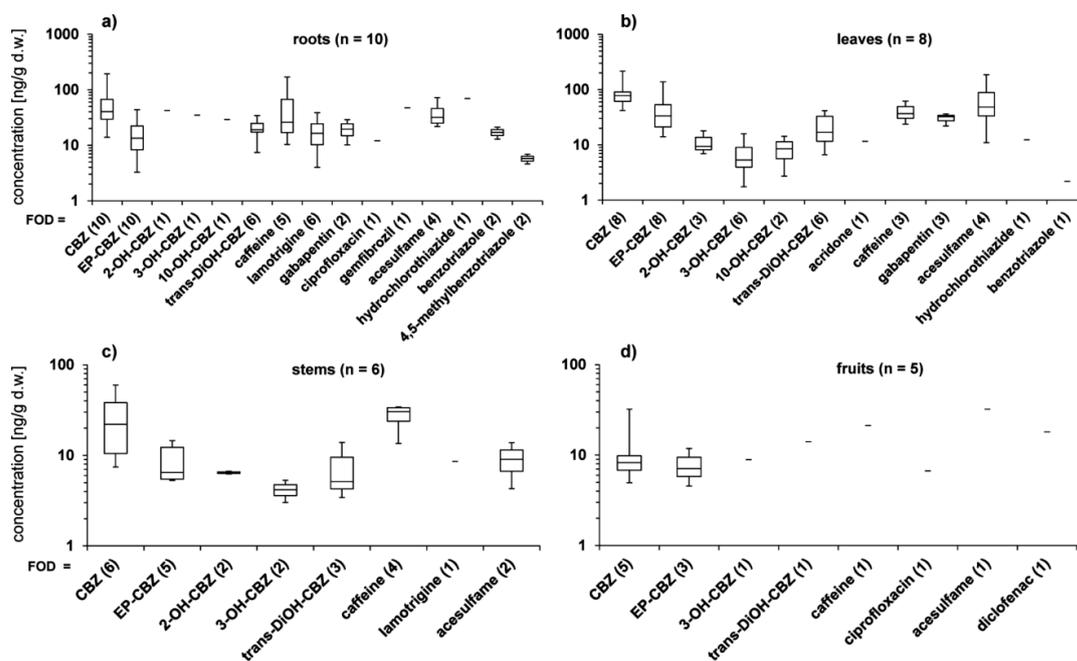
**Table 1. Level of Micropollutants in the Zarqa River with Median, Minimum, and Maximum Concentration and Frequency of Detection (FOD) of Five Samplings (Oct 2014–May 2015) at Three Different Sampling Sites**

analyte	concentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	FOD
acesulfame	5.9 (0.7–13.9)	15/15
carbamazepine	1.7 (1.2–2.4)	15/15
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	6.4 (2.1–7.2)	15/15
4-/5-methylbenzotriazole	0.4 (0.2–0.8)	15/15
benzotriazole	0.4 (0.1–0.6)	14/15
ciprofloxacin	0.3 (0.03–0.6)	6/15
caffeine	1.3 (0.5–17.0)	14/15
diclofenac	1.3 (0.1–1.6)	7/15
gabapentin	1.7 (0.6–2.1)	13/15
gemfibrozil	1.5 (0.001–3.3)	14/15
hydrochlorothiazide	1.3 (0.4–2.1)	15/15
iohexol	0.9 (0.2–2.0)	15/15
iomeprol	5.8 (0.3–8.2)	15/15
iopamidol	2.7 (0.1–5.3)	15/15
iopromide	4.4 (0.2–7.9)	15/15
lamotrigine	0.6 (0.3–1.3)	9/15
mefenamic acid	0.2 (0.1–1.5)	8/15
metaxyl	0.3 (0.2–0.4)	4/15
sulfamethoxazole	0.9 (0.4–1.4)	15/15
acridine <sup>a</sup>	0.4 (0.3–0.4)	2/6
acridone <sup>a</sup>	0.08 (0.02–0.2)	3/6
EP-CBZ <sup>a</sup>	0.5 (0.2–0.7)	6/6
10-OH-CBZ <sup>a</sup>	0.6 (0.4–0.9)	6/6
2-OH-CBZ <sup>a</sup>	0.7 (0.4–0.9)	6/6
3-OH-CBZ <sup>a</sup>	0.3 (0.1–0.5)	5/6

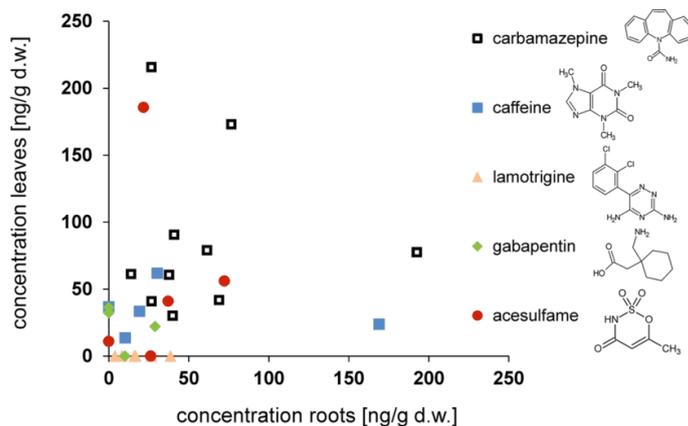
<sup>a</sup>Carbamazepine metabolite, analyzed only for two samplings (Oct 14 and May 15).

estimate the consequences of irrigation practice on the quality of food and feed. In this study, the occurrence of 28 target analytes (Table S1) in plant organs (roots, shoots, leaves, and fruits) of 10 different vegetable species was investigated. The crops were irrigated with water of the Zarqa River consisting of treated municipal wastewater (as the main component) and spring, and runoff water. The concentration levels of all of the detected analytes in the respective plant compartments are provided in Table S3.

A total of 18 out of the 28 compounds were detected in at least one plant. The highest concentrations, up to 216 ng/g dw, were observed for carbamazepine and acesulfame (up to 186 ng/g dw) in leaves and caffeine (up to 169 ng/g dw) in roots (Figure 1). An accumulation of micropollutants was observed in roots and leaves, whereas the overall concentration in shoots and fruits was about 1 order of magnitude lower (Figure 1). Carbamazepine was the only compound that could be detected in all vegetable species and plant organs, followed by caffeine and acesulfame (Figure 1). The X-ray contrast media (iohexol, iomeprol, iopamidol, and iopromide), as well as mefenamic acid and metaxyl, were not detected in any sample. Although the contrast reagents occurred at rather high concentrations in the Zarqa River water, their uptake is likely restricted due to the higher molecular weight (777–821 Da), which slows their diffusion through cellular membranes. In contrast, mefenamic acid and metaxyl were probably not detected due to their low median concentration (0.2 and 0.3  $\mu\text{g/L}$ ) and low detection frequency (53% and 27%) in the irrigation water (Table 1). The sorption of these two compounds to soil is rather low.<sup>37,38</sup>



**Figure 1.** Distribution of micropollutants in plant organs (a) roots, (b) leaves, (c) stems, and (d) fruits of 10 different vegetable species (cabbage, zucchini, eggplant, tomato, pepper, parsley, rucola, lettuce, carrot, and potato) irrigated with water of the Zarqa River (JO) under real field conditions. The box diagram corresponds to quartile ranges, whiskers represent minimum and maximum values, and the median value is represented by black squares. More information on the compounds is provided in Table S1. FOD indicates frequency of detection.



**Figure 2.** Concentration of five micropollutants in leaves vs roots of 10 different vegetable species (cabbage, zucchini, eggplant, tomato, pepper, parsley, rucola, lettuce, carrot, and potato).

In this study, the concentration level of caffeine and CBZ in plants is on average 2 orders of magnitude higher than that reported for the same vegetables (cabbage, carrot, tomato, lettuce, and pepper) in field experiments in California.<sup>11</sup> This corresponds, however, to the concentration level in the irrigation water, which was also about 2 orders of magnitude higher (20 and 7900 ng/L compared to 0.38 and 225 ng/L for CBZ and caffeine, respectively)<sup>11</sup> in this study.

In pot and lysimeter experiments using concentrations of carbamazepine and caffeine that were comparable to this study, the concentrations in plants (tomato and carrot) were also of

the same level found here.<sup>7,22</sup> The general decrease in concentration in the order of root > leaf > shoot > fruit is in good agreement with previous findings<sup>11</sup> and may be due to the limited distribution of ionic compounds in aerial plants organs.

The distribution of the most frequently detected compounds (carbamazepine, acesulfame, caffeine, lamotrigine, and gabapentin) between the roots and leaves in all vegetables is shown in Figure 2. The carbamazepine and caffeine concentrations in roots and leaves of the different plants appear to be well-correlated; those plants with elevated root concentrations exhibit elevated leaf concentrations (Figure 2). Lamotrigine,

**Table 2. Human Exposure and Outcome of the Health-Risk Assessment (Application of the Threshold of Toxicological-Concern Approach to the Edible Parts of 10 Different Vegetable Species and Nine Analytes Investigated in This Study)**

	estimated daily human intake of micropollutants (ng per kg of body weight per day) <sup>a</sup>									
	cabbage	eggplant	zucchini	tomato	pepper	parsley	lettuce	rucicola	potato	carrot
carbamazepine <sup>b</sup>	0.43	1.32	0.18	0.31	0.23	0.05	7.56	2.34	15.19	0.46
EP-CBZ <sup>c</sup>	0.20	0.48	0.19	–	–	0.01	3.13	1.29	2.20	0.26
<i>trans</i> -DiOH-CBZ <sup>b</sup>	–	0.57	–	–	–	0.01	1.45	–	–	0.25
3-OH-CBZ <sup>b</sup>	–	–	0.23	–	–	0.003	–	0.18	–	–
caffeine <sup>b</sup>	0.94	–	–	–	–	–	–	–	–	–
gabapentin <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	0.01	–	1.40	–	0.34
ciprofloxacin <sup>c</sup>	0.29	–	–	–	–	–	–	–	–	0.40
acesulfame <sup>b</sup>	1.42	–	–	–	–	0.02	–	–	–	0.72
diclofenac <sup>b</sup>	–	0.74	–	–	–	–	–	–	–	–
	required daily consumption (kg) by a 70 kg person to reach TTC									
carbamazepine <sup>b</sup>	142.61	39.05	339.90	350.39	210.90	9.52	9.03	17.98	8.78	54.35
EP-CBZ <sup>c</sup>	0.51	0.18	0.55	–	–	0.07	0.04	0.05	0.10	0.16
<i>trans</i> -DiOH-CBZ <sup>b</sup>	–	89.62	–	–	–	78.55	46.91	–	–	102.37
3-OH-CBZ <sup>b</sup>	–	–	260.44	–	–	143.07	–	237.22	–	–
caffeine <sup>b</sup>	65.89	–	–	–	–	–	–	–	–	–
gabapentin <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	39.10	–	30.08	–	74.70
ciprofloxacin <sup>c</sup>	0.35	–	–	–	–	–	–	–	–	0.11
acesulfame <sup>b</sup>	62.18	–	–	–	–	30.06	–	–	–	49.80
diclofenac <sup>b</sup>	–	69.74	–	–	–	–	–	–	–	–

<sup>a</sup>Human intake =  $c_{\text{crop}} [\text{ng per g of wet weight}] / D [\text{g}/(\text{kg of bw}/\text{day})]$ ;  $c$  = concentration of analytes in the investigated vegetables,  $D$  = mean consumption value of vegetables for Spain (available from the EFSA).<sup>45</sup> <sup>b</sup>TTC value of 1500 ng/kg of bw/day <sup>c</sup>TTC value of 2.5 ng/kg of bw/day

however, was solely found in roots (Figure 2). In contrast, no uniform distribution pattern was observed for gabapentin and acesulfame in the different vegetables.

As for uptake, the distribution of compounds in plants appears to be affected by the molecular size and charge of the contaminant. However, the pH in different plant organelles (vacuole, xylem, phloem, and cytosol) may differ from each other and from the pH in soil solution. Therefore, compounds taken up easily do not necessarily distribute well within plants.

Carbamazepine and caffeine are neutral within a wide range of pH. Hence, they can easily cross membranes<sup>39</sup> and are well-distributed in all investigated plants. For lamotrigine ( $pK_b$ , 5.34), the poor distribution may be explained by its positive charge in plant organelles having a low pH of 4–5 (e.g., vacuole and xylem sap). Although nonionic compounds are more likely to cross cell membranes, the permeability of ionic compounds through membranes is largely restricted.<sup>40</sup> The distribution of gabapentin (zwitterion) and acesulfame (neutral) differs from plant to plant. They are well-distributed in some plants (e.g., parsley, cabbage) and remain in the roots in others (e.g., rucicola and carrot). The mechanisms underlying this inconsistent behavior are yet unknown.

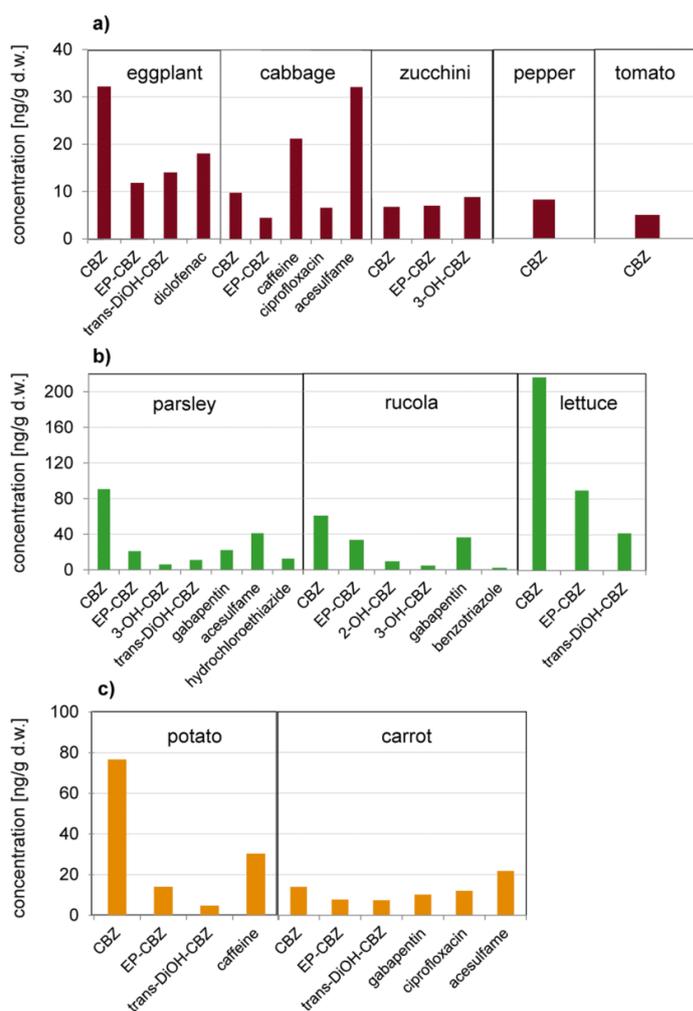
**Detection of CBZ Metabolites in Vegetables.** In addition to carbamazepine, the occurrence of nine metabolites (Table 2) mainly known from the human metabolism of CBZ<sup>41</sup> was investigated. Generally, the detection of metabolites of micropollutants in plant tissues often remains unconsidered in plant-uptake studies.<sup>4,10,42</sup> Such metabolites may occur in plants due to their presence in the irrigation water, their formation in the soil, or their formation in the plant after uptake of the parent compound. A distinction of these origins is hardly possible in field studies.

A total of six of the nine analyzed metabolites of CBZ (acridone, EP-CBZ, 10-OH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, and *trans*-DiOH-CBZ) could be detected in at least one vegetable species (Figure 1). Although EP-CBZ and *trans*-DiOH-CBZ

were the most frequently detected compounds in all plant compartments, acridone was only detected in carrot leaves (Table S3). A metabolic formation of acridone from CBZ in leaves was assumed because in plant roots, acridone was never detected, indicating no significant uptake via the rhizosphere. In addition, the concentration level of EP-CBZ and *trans*-DiOH-CBZ decreased in the order of leaves > roots > shoots and fruits (Figure 1). The occurrence of *trans*-DiOH-CBZ and EP-CBZ as the main transformation products in irrigated plants as well as their accumulation in leaves is in good agreement with studies under controlled conditions in lysimeter and pot experiments using nonspiked treated wastewater as irrigation water.<sup>7,22</sup> Due to the higher frequency of detection of metabolites in leaves compared to roots and shoots, it may be assumed that a metabolism of CBZ occurred in the plant leaves. This was also proposed by Goldstein et al. (2014)<sup>7</sup> and Malchi et al. (2014).<sup>22</sup>

However, in this study, an uptake of metabolites from the irrigation water and their preferential translocation into the plant (due to their neutral state and polar properties) is also likely because all of the metabolites were present in the irrigation water (Table 1). Moreover, these metabolites are more polar than the parent CBZ, favoring their transport toward the leaves with the transpiration stream. The diverse pattern of metabolites in different vegetables indicates that uptake and metabolism of micropollutants is plant-specific and difficult to predict.

This is the first study on the occurrence of the CBZ metabolites 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, 10-OH-CBZ, and acridone in crops grown under real field conditions. Although the detected metabolites in this study are phase I metabolites, other reports have shown that plants also form phase II metabolites of micropollutants,<sup>18,19,43</sup> which can even exceed the portion of the parent compound.<sup>18</sup> Thus, the search for phase II metabolites of CBZ by screening approaches,<sup>44</sup> as well as the



**Figure 3.** Concentration (ng per g of dry weight) of micropollutants and carbamazepine metabolites in the edible tissues of 10 different vegetables irrigated with water of the Zarqa River under real field conditions. (a) Fruit-bearing vegetables, (b) leafy vegetables, and (c) root vegetables.

elucidation of the metabolic pathway of CBZ in plants, merits further research.

#### Concentration of Micropollutants in Edible Parts.

Analysis of edible parts of crops is of particular interest due to their importance for consumer exposure. The vegetables investigated in this study are important parts of the local market in Jordan. Nonedible plant parts such as leaves and stems may be used as animal feed. Thus, an introduction of pollutants in the food web is possible also for the nonedible parts of agricultural plants.

Among the studied vegetables, the highest total concentrations of pollutants in edible parts were found for lettuce (347 ng/g dw), followed by parsley (204 ng/g dw) and rucola (147 ng/g dw), all being leafy crops (Figure 3). Generally, the sum concentration of micropollutants decreased in the order of leafy > root > fruit-bearing vegetables. Therefore, the sum concentration in leafy vegetables was on average 3.7 higher compared to that of the edible part of root and fruit-bearing vegetables, respectively.

Lamotrigine, gemfibrozil, and 4,5-methylbenzotriazole were found solely in roots and have to be considered finally as possible contaminants of root vegetables. CBZ was found in all vegetables (Figure 3). In addition, its metabolites EP-CBZ and *trans*-DiOH-CBZ were detected most frequently (80% and 50%, respectively). In zucchini, the concentration of EP-CBZ and 3-OH-CBZ even exceeded the concentration of CBZ (Figure 3).

In this study, the concentration level of CBZ in edible parts of lettuce, cabbage, carrot, tomato, and pepper is on average 50 times higher compared to that in a previous field study.<sup>11</sup> This can be explained by the different concentration of CBZ in the irrigation waters.

The total concentration of the detected phase I metabolites of CBZ amounts to 60% of the CBZ concentration (for all edible tissues). This confirms previous observations in a greenhouse study with triclosan in carrot, which concluded that neglect of plant metabolism would lead to an underestimation of the plant uptake of pollutants.<sup>18</sup>

**Estimation of Human Exposure and Risk Assessment.**

One of the main intentions of this study was to assess the human exposure to micropollutants and possible metabolites by consumption of vegetables irrigated with treated municipal wastewater. The human exposure was estimated based on the consumption data for Spain<sup>45</sup> for the crops investigated in this study (Table 2). According to this calculation, the daily human exposure through the consumption of these edible crops amounts to 0.003–15 ng/kg of body weight (bw) per day for nine of the pollutants (Table 2). Thus, the human exposure via consumption of food crops irrigated with treated municipal wastewater is very low. This is in agreement with previous studies investigating the uptake of antibiotics<sup>8</sup> and pharmaceuticals and personal-care products<sup>11</sup> in vegetables (e.g., cabbage, spinach, or rice) in field experiments.

For the pharmaceuticals (CBZ, gabapentin, ciprofloxacin, and diclofenac) the estimated annual doses are about 0.001% of the minimum daily doses (typically in the range of 10–200 mg per day for a 70 kg person) prescribed for common therapeutical treatment. A risk assessment requires consideration of exposure and possible toxic effects of micropollutants. In some cases, the metabolites might also have to be included: for example 10,11-epoxycarbamazepine is considered to be more toxic than the parent CBZ.<sup>46</sup> Therefore, the health risk of micropollutants in crops was assessed using the TTC approach.

The TTC concept is a risk-assessment tool that was developed to establish human-exposure threshold values for chemicals occurring at very low concentrations and lacking specific toxicological data. The TTC values are based on the calculated 5th percentile values of “No Observed Adverse Effect Levels” (NOAELs) divided by an uncertainty factor of 100 to derive an acceptable daily intake.<sup>47,48</sup> For potentially genotoxic compounds, the default TTC value is 2.5 ng per kg of bw per day corresponding to 175 ng/day for an adult (70 kg), whereas for Cramer Class III substances, a TTC of 1.5  $\mu\text{g}$  per kg of bw per day (corresponding to 105  $\mu\text{g}/\text{day}$  for an adult) was proposed. Exposure of a trace contaminant below the threshold level would imply that no specific toxicity testing is required and that only an abbreviated safety assessment is recommended.

The daily consumption of vegetables in this study that would be required for adults to reach the respective TTC is given in Table 2. With regard to Cramer class III compounds (e.g., carbamazepine, *trans*-DiOH-CBZ, and gabapentin), a daily consumption of at least 9 kg of vegetable material is allowable before the TTC level would be reached (Table 2). On the basis of the current state of knowledge, it is concluded that these substances in the irrigated vegetables do not pose a health risk to consumers, and no specific toxicological data is required.

In contrast, the health-risk assessment for EP-CBZ and ciprofloxacin appears to be more critical because both contaminants are considered potentially genotoxic compounds according to their structure.<sup>32</sup> Therefore, the TTC level of EP-CBZ and ciprofloxacin would be exceeded for a 70 kg person by the daily consumption of only one potato (100 g/day) or half an eggplant (177 g/day) (Table 2). Accordingly, more specific toxicological data would be required for ciprofloxacin and the carbamazepine metabolite EP-CBZ to assess the health risk associated with the consumption of these vegetables. With respect to EP-CBZ, this outcome agrees with a previous assessment on the basis of lysimeter experiments with sweet potato and carrot.<sup>22</sup> In that lysimeter study, in addition, the lamotrigine exposure turned out to exceed the TTC, while in

the present study, lamotrigine was not detected in the edible parts of the field-grown vegetable species.

This study is one of the broadest plant-uptake studies, covering a spectrum of 28 analytes (including 9 CBZ metabolites), 10 vegetable species, and 4 plant compartments (roots, shoots, leaves, and fruits). The results indicate that upon field irrigation with treated municipal wastewater, micropollutants may occur at measurable concentrations in edible parts of crops. Of the 28 analytes, a total of 18 compounds (among them six CBZ metabolites) could be detected in all of the investigated samples (concentrations ranged between 1.7–216 ng per g of dry weight for all plant organs and vegetables).

This study provides basic information on the occurrence of metabolites in plants. It shows that further research on the metabolic pathways of micropollutants in plants (including phase I and phase II metabolites) is necessary to adequately estimate the human exposure level. Furthermore, the impact of the physicochemical properties of contaminants and plant specificity on uptake and distribution are not well-understood yet. However, this is a prerequisite for the adequate modeling of plant uptake.

In addition, this study indicates that both the human exposure level as well as the health risk due to a consumption of vegetables irrigated with treated wastewater is low. For ciprofloxacin and the metabolite EP-CBZ, however, human toxicity should be considered in more detail to clarify the outcome of the structural-alert approach that considers them as being potentially genotoxic. It is therefore suggested to focus in further studies on the identification of potentially genotoxic substances with special consideration of metabolites.

**■ ASSOCIATED CONTENT****● Supporting Information**

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01696.

Additional details on chemical used, target analytes, analytical conditions of LC–MS/MS and occurrence of micropollutants in vegetables. Tables showing physicochemical properties, structure, and application of target analytes; LC–MS/MS parameters used for analysis; mean concentration ( $n = 2$ ) of micropollutants in plant organs of 10 different vegetables species. (PDF)

**■ AUTHOR INFORMATION****Corresponding Author**

\*Phone: +49-3412351261; fax: +49-341235 450822; e-mail: thorsten.reemtsma@ufz.de.

**Funding**

We are grateful for the financial support of this study by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn) through the project “Pollutants of Emerging Concern Originating from Reclaimed Wastewater: Plant Uptake, Translocation and Transformation” (PECTake; Re1290/7-1).

**Notes**

The authors declare no competing financial interest.

**■ ACKNOWLEDGMENTS**

Hilke Maas is gratefully acknowledged for her support in laboratory work.

## ■ ABBREVIATIONS USED

TWW, treated wastewater; TTC, threshold of toxicological concern

## ■ REFERENCES

- (1) UNDP. Human Development Report 2006. <http://hdr.undp.org/en/content/human-development-report-2006> (date of access 1 July 2016).
- (2) Alfara, A.; Kemp-Benedict, E.; Hotzl, H.; Sader, N.; Sonneveld, B. A Framework for Wastewater Reuse in Jordan: Utilizing a Modified Wastewater Reuse Index. *Water Resour. Manag.* **2011**, *25*, 1153–1167.
- (3) Newton, D.; Balgobin, D.; Badyal, D.; Mills, R.; Pezzetti, T.; Ross, H. M. *Results, Challenges, and Future Approaches to California's Municipal Wastewater Recycling Survey*; SWRCB: Sacramento, CA, 2009.
- (4) Wu, X.; Dodgen, L. K.; Conkle, J. L.; Gan, J. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. *Sci. Total Environ.* **2015**, *536*, 655–666.
- (5) Pal, A.; He, Y. L.; Jekel, M.; Reinhard, M.; Gin, K. Y. H. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environ. Int.* **2014**, *71*, 46–62.
- (6) Reemtsma, T.; Weiss, S.; Mueller, J.; Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barcelo, D.; Ventura, F.; Knepper, T. P. Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European perspective. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 5451–5458.
- (7) Goldstein, M.; Shenker, M.; Chefetz, B. Insights into the uptake processes of wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 5593–5600.
- (8) Pan, M.; Wong, C. K. C.; Chu, L. M. Distribution of Antibiotics in Wastewater-Irrigated Soils and Their Accumulation in Vegetable Crops in the Pearl River Delta, Southern China. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 11062–11069.
- (9) 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.
- (10) Tanoue, R.; Sato, Y.; Motoyama, M.; Nakagawa, S.; Shinohara, R.; Nomiya, K. Plant Uptake of Pharmaceutical Chemicals Detected in Recycled Organic Manure and Reclaimed Wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10203–10211.
- (11) Wu, X.; Conkle, J. L.; Ernst, F.; Gan, J. Treated wastewater irrigation: uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11286–93.
- (12) 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.
- (13) Wu, C. X.; Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Sridhar, B. B. M. Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *85*, 104–109.
- (14) Herklotz, P. A.; Gurung, P.; Heuvel, B. V.; Kinney, C. A. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* **2010**, *78*, 1416–1421.
- (15) Grossberger, A.; Hadar, Y.; Borch, T.; Chefetz, B. Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environ. Pollut.* **2014**, *185*, 168–177.
- (16) Lin, K. D.; Gan, J. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere* **2011**, *83*, 240–246.
- (17) Xu, J.; Wu, L.; Chang, A. C. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* **2009**, *77*, 1299–305.
- (18) 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.
- (19) Macherius, A.; Seiwert, B.; Schroder, 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. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1001–9.
- (20) Coleman, J. O. D.; BlakeKalf, M. M. A.; Davies, T. G. E. Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 144–151.
- (21) Sandermann, H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 82–84.
- (22) Malchi, T.; Maor, Y.; Tadmor, G.; Shenker, M.; Chefetz, B. Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 9325–9333.
- (23) WHO. 2006 WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/wastewater/gsuww/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/gsuww/en/) (date of access 1 July 2016).
- (24) JISM (Jordanian Institute for Standards and Metrology). *Jordanian Standard no. 893/2006*; JISM: Dobouq, Amman, 2006.
- (25) Shatanawi, M.; Fayyad, M. Effect of Khirbet As-Samra treated effluent on the quality of irrigation water in the Central Jordan Valley. *Water Res.* **1996**, *30*, 2915–2920.
- (26) Riemenschneider, C.; Seiwert, B.; Goldstein, M.; Al-Raggad, M.; Salameh, E.; Chefetz, B.; Reemtsma, T. An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater. Unpublished work, 2016.
- (27) Cramer, G. M.; Ford, R. A.; Hall, R. L. Estimation of toxic hazard - a decision tree approach. *Food Cosmet. Toxicol.* **1976**, *16*, 255–276.
- (28) 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.
- (29) Laabs, V.; Leake, C.; Botham, P.; Melching-Kollmuss, S. Regulation of non-relevant metabolites of plant protection products in drinking and groundwater in the EU: Current status and way forward. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *73*, 276–286.
- (30) Larsen, J. C. Risk assessment of chemicals in European traditional foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 471–481.
- (31) EFSA (European Food Safety Authority). *Threshold of Toxicological Concern Approach: Conclusions and Recommendations of the EFSA/WHO Expert Workshop*. Draft for public consultation; WHO: Geneva, Switzerland; 2015; available at: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/chemical-risks/TTC/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/TTC/en/).
- (32) Patlewicz, G.; Jeliakova, N.; Safford, R. J.; Worth, A. P.; Aleksiev, B. An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. *SAR QSAR Environ. Res.* **2008**, *19*, 495–524.
- (33) Leclercq, M.; Mathieu, O.; Gomez, E.; Casellas, C.; Fenet, H.; Hillaire-Buys, D. Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *56*, 408–415.
- (34) Miao, X. S.; Yang, J. J.; Metcalfe, C. D. Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 7469–7475.
- (35) Zemmann, M.; Wolf, L.; Poschko, A.; Schmidt, N.; Sawarieh, A.; Seder, N.; Tiehm, A.; Hotzl, H.; Goldscheider, N. Sources and processes affecting the spatio-temporal distribution of pharmaceuticals and X-ray contrast media in the water resources of the Lower Jordan Valley, Jordan. *Sci. Total Environ.* **2014**, *488–489*, 100–114.
- (36) Ternes, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **1998**, *32*, 3245–3260.
- (37) Sukul, P.; Lamshoft, M.; Zuhlke, S.; Spittler, M. Evaluation of sorption-desorption processes for metalaxyl in natural and artificial soils. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2013**, *48*, 431–441.
- (38) Yamamoto, H.; Nakamura, Y.; Moriguchi, S.; Nakamura, Y.; Honda, Y.; Tamura, I.; Hirata, Y.; Hayashi, A.; Sekizawa, J. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic

environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.* **2009**, *43*, 351–362.

(39) Briggs, G. G.; Bromilow, R. H.; Evans, A. A. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pestic. Sci.* **1982**, *13*, 495–504.

(40) Trapp, S. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Manage. Sci.* **2000**, *56*, 767–778.

(41) Lertratanangkoon, K.; Horning, M. G. Metabolism of carbamazepine. *Drug Metab. Dispos.* **1982**, *10*, 1–10.

(42) Miller, E. L.; Nason, S. L.; Karthikeyan, K. G.; Pedersen, J. A. Root Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Product Ingredients. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 525.

(43) Farkas, M. H.; Berry, J. O.; Aga, D. S. Chlortetracycline detoxification in maize via induction of glutathione S-transferases after antibiotic exposure. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1450–1456.

(44) Seiwert, B.; Golan-Rozen, N.; Weidauer, C.; Riemenschneider, C.; Chefetz, B.; Hadar, Y.; Reemtsma, T. Electrochemistry Combined with LC-HRMS: Elucidating Transformation Products of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine Generated by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 12342–12350.

(45) EFSA (European Food Safety Authority) Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment *EFSA J.* **2011** *10.2903/j.efsa.2011.2097*

(46) Bennett, G. D.; Amore, B. M.; Finnell, R. H.; Wlodarczyk, B.; Kalhorn, T. F.; Skiles, G. L.; Nelson, S. D.; Slattery, J. T. Teratogenicity of carbamazepine-10,11-epoxide and oxcarbazepine in the SWV mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 1237–1242.

(47) Munro, I. C.; Ford, R. A.; Kennepohl, E.; Sprenger, J. G. Correlation of structural class with no-observed-effect levels: A proposal for establishing a threshold of concern. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 829–867.

(48) Munro, I. C.; Kennepohl, E.; Kroes, R. A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 207–232.

**Supporting Information**

**Pharmaceuticals, their metabolites and other polar pollutants in field grown vegetables  
irrigated with reclaimed wastewater**

Christina Riemenschneider<sup>1</sup>, Marwan Al-Raggad<sup>2</sup>, Monika Moeder<sup>1</sup>, Bettina Seiwert<sup>1</sup>, Elias  
Salameh<sup>2</sup>, Thorsten Reemtsma<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Analytical Chemistry,  
Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig

<sup>2</sup> University of Jordan, Water, Energy and Environment Center, Amman 11942, Jordan

\* Corresponding author: Thorsten Reemtsma (thorsten.reemtsma@ufz.de)

## 1. Chemicals

Acesulfame, acridine, benzotriazole, caffeine, carbamazepine, carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ), diclofenac, gabapentin, hydrochlorothiazide, 4-methyl-1H-benzotriazole, 5-methyl-1H-benzotriazole, oxcarbazepine, sulfamethoxazole and trimethoprim were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). 2-hydroxy carbamazepine (2-OH-CBZ), 3-hydroxy carbamazepine (3-OH-CBZ), 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (10-OH-CBZ), *cis*-10,11-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine (*cis*-DiOH-CBZ), *rac trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine (*trans*-DiOH-CBZ), lamotrigine and acridone were obtained from Biozol (Eching, Germany). Ciprofloxacin was ordered from Bioforsk (Saerheim, Norway), gemfibrozil from ICV-Biomedicals (Eschwege, Germany), mefenamic acid from ABCR (Karlsruhe, Germany) and iohexol from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Iomeprol and metalaxyl were purchased from Dr. Ehrendorfer (Augsburg, Germany) and iopamidol and iopromide were obtained from EDQM (Straßburg, France). Acetone was from AppliChem (Darmstadt, Germany).

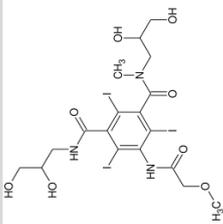
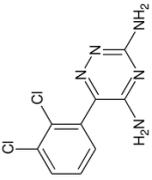
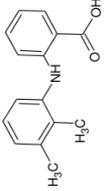
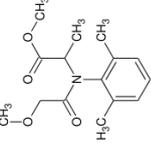
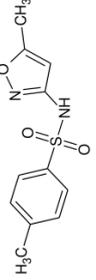
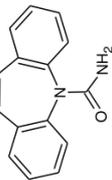
Methanol and acetic acid (Biosolve, Valkenswaard, The Netherlands) were of analytical and UPLC grade. All aqueous solutions were prepared by using ultrapure water from a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany).

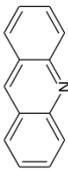
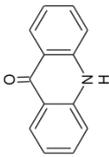
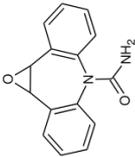
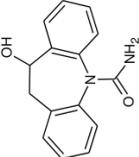
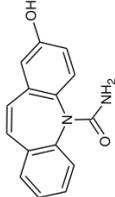
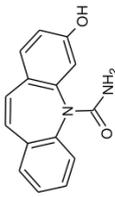
## 2. Target analytes

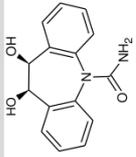
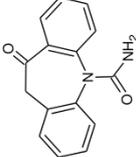
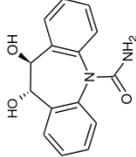
Table S1: Physico-chemical properties, structure and application of target analytes

Compound	Molecular weight (g/mol)	Formula	LogP*	pKa*	Application	Structure
Acesulfame	163.15	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNO <sub>4</sub> S	-1.12	-	artificial sweetener	
4-/5-Methylbenzotriazole	133.15	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	1.82	1.7; 8.5	corrosion inhibitor	
Benzotriazole	119.12	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub>	1.61	1.2; 8.4	corrosion inhibitor	
Ciprofloxacin	331.34	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-0.5	6.4; 8.7	antibacterial agent	
Caffeine	194.19	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	0.42	-	stimulant	
Diclofenac	296.15	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	4.61	4.2	antirheumatic agent	
Gabapentin	171.24	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	1.19	4.7; 10.3	anticonvulsant	

Compound	Molecular weight (g/mol)	Formula	LogP*	pKa*	Application	Structure
Gemfibrozil	250.34	$C_{15}H_{22}O_3$	4.39	4.8	pharmaceutical	
Hydrochlorothiazide	297.74	$C_7H_8ClN_3O_4S$ 2	0.03	9.0; 9.6	diuretic	
Iohexol	821.14	$C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$	< -2	>11.3	x-ray contrast agent	
Iomeprol	777.09	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$	< -2	>11.3	x-ray contrast agent	
Iopamidol	777.09	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$	< -2	>10.9	x-ray contrast agent	

Compound	Molecular weight (g/mol)	Formula	LogP*	pKa*	Application	Structure
Iopromide	791.11	$C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$	-1.98	>10.6	x-ray contrast agent	
Lamotrigine	256.10	$C_9H_7Cl_2N_5$	2.30	5.4 (pK <sub>b</sub> )	anticonvulsant	
Mefenamic acid	241.29	$C_{15}H_{15}NO_2$	4.91	3.7	antirheumatic agent	
Metalaxyl	279.33	$C_{15}H_{21}NO_4$	1.81	1.4	pesticide	
Sulfamethoxazole	253.28	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	0.58	1.4; 5.8	antibacterial agent	
Carbamazepine (CBZ)	236.27	$C_{15}H_{12}N_2O$	2.17	-	anticonvulsant	

Compound	Molecular weight (g/mol)	Formula	LogP*	pKa*	Application	Structure
Acridine	179.22	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> N	3.32	5.6	CBZ metabolite	
Acridone	195.22	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> NO	4.08	-	CBZ metabolite	
carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ)	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.37	-	CBZ metabolite	
10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (10-OH CBZ)	254.28	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.69	-	CBZ metabolite	
2-hydroxy carbamazepine (2-OH CBZ)	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.87	10.3	CBZ metabolite	
3-hydroxy carbamazepine (3-OH CBZ)	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.22	10.0	CBZ metabolite	

Compound	Molecular weight (g/mol)	Formula	LogP*	pKa*	Application	Structure
10,11-dihydro-10,11- <i>cis</i> -dihydroxycarbamazepine ( <i>cis</i> -DiOH CBZ)	270.28	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	CBZ metabolite	
Oxcarbazine	252.27	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.00	-	CBZ metabolite	
10,11-dihydro-10,11- <i>trans</i> -dihydroxy-carbamazepine ( <i>trans</i> -DiOH CBZ)	270.28	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.71	-	CBZ metabolite	

\*predicted from ACD/Percepta, 2015

## 3. Analytical conditions of LC-MS/MS

Table S2: LC-MS/MS parameters used for analysis: MRM Quantifier and qualifier ions, declustering potential (DP), collision energy (CE) and retention time (RT).

Analyte	ESI polarity	Quantifier	Qualifier	DP (V)	CE (eV)	RT (min)
Acesulfame	-	162 → 82	162 → 78	-50 -50	-20 -40	3.7
4-/5-Methylbenzotriazole	+	134 → 77	134 → 78	71 71	31 29	11.3
Benzotriazole	+	120 → 65	120 → 92	126 126	29 23	8.4
Ciprofloxacin	+	332 → 314	332 → 231	106 106	29 51	7.5
Caffeine	+	195 → 138	195 → 110	80 80	27 31	7.7
Diclofenac	-	295 → 252	295 → 250	-40 -40	-16 -16	44.5
Gabapentin	+	172 → 154	172 → 137	36 36	19 21	6.3
Gemfibrozil	-	249 → 121	249 → 127	-60 -60	-24 -16	45.4
Hydrochlorothiazide	-	295 → 268	295 → 205	-110 -110	-28 -32	5.5
Iohexol	+	821 → 803	821 → 603	136 136	27 35	3.5
Iomeprol	+	777 → 686	777 → 558	76 76	29 33	3.9
Iopamidol	+	777 → 558	777 → 686	76 76	33 29	2.4
Iopromide	+	791 → 572	791 → 773	46 46	33 27	6.3
Lamotrigine	+	256 → 211	256 → 109	91 91	39 63	8.2
Mefenamic acid	-	240 → 196	240 → 180	-65 -65	-24 -38	45.3
Metalaxyl	+	280 → 220	280 → 160	71 71	19 33	30.1
Sulfamethoxazole	+	254 → 156	254 → 92	56 56	21 35	8.4
Carbamazepine (CBZ)	+	237 → 194	237 → 193	106 106	25 47	21.8
Acridine	+	180 → 152		40	47	9.6
Acridone	+	196 → 167		126	49	16.1

Analyte	ESI polarity	Quantifier	Qualifier	DP (V)	CE (eV)	RT (min)
carbamazepine 10,11- epoxide (EP-CBZ)	+	253 → 180	253 → 236	31 31	41 15	12.8
10,11-dihydro-10- hydroxy carbamazepine (10-OH CBZ)	+	255 → 194	255 → 237	51 51	31 15	12.8
2-hydroxy carbamazepine (2-OH CBZ)	+	253 → 210	253 → 208	61 61	29 35	12.9
3-hydroxy carbamazepine (3-OH CBZ)	+	253 → 210	253 → 208	61 61	27 29	15.7
10,11-dihydro-10,11- <i>cis</i> - dihydroxycarbamazepine ( <i>cis</i> -DiOH CBZ)	+	271 → 180	271 → 210	86 86	43 21	7.9
Oxcarbazepine	+	253 → 236	253 → 208	71 71	19 27	15.1
10,11-dihydro-10,11- <i>trans</i> - dihydroxycarbamazepine ( <i>trans</i> -DiOH CBZ)	+	271 → 180	271 → 253	26 26	49 11	11.6

## 4. Occurrence of micropollutants in vegetables

Table S3: Mean concentration (n = 2) of micropollutants in plant organs of ten different vegetables species irrigated with water of the Zarqa River (JO) under real field conditions

	analyte	concentration [ng/g d.w.]			
		roots	shoots	leaves	fruits
cabbage	carbamazepine (CBZ)	61.4		79.0	9.8
	EP-CBZ	12.8		18.6	4.5
	caffeine	32.9		n.d.	21.3
	lamotrigine	16.0		n.d.	n.d.
	ciprofloxacin	n.d.		n.d.	6.7
	acesulfame	72.3		56.0	32.2
eggplant	carbamazepine	192.6	14.0	77.6	32.2
	EP-CBZ	22.1	14.5	45.4	11.8
	3-OH-CBZ	n.d.	n.d.	15.9	n.d.
	10-OH-CBZ	n.d.	n.d.	14.3	n.d.
	<i>trans</i> -DiOH-CBZ	17.3	13.9	37.1	14.0
	caffeine	n.d.	27.3	36.8	n.d.
	lamotrigine	16.8	8.6	n.d.	n.d.
	diclofenac	n.d.	n.d.	n.d.	18.0
zucchini	carbamazepine	69.0	9.3	41.9	6.8
	EP-CBZ	43.6	5.5	25.8	7.1
	2-OH-CBZ	42.2	n.d.	6.9	n.d.
	3-OH-CBZ	34.9	5.3	3.8	8.9
	<i>trans</i> -DiOH-CBZ	34.2	n.d.	6.6	n.d.
	caffeine	169.0	n.d.	23.7	n.d.
	lamotrigine	38.6	n.d.	n.d.	n.d.
	acesulfame	n.d.	13.9	n.d.	n.d.
tomato	carbamazepine	26.7	40.9		5.0
	EP-CBZ	3.3	12.3		n.d.
	2-OH-CBZ	n.d.	6.7		n.d.
	3-OH-CBZ	n.d.	3.0		n.d.
	<i>trans</i> -DiOH-CBZ	n.d.	5.1		n.d.
	caffeine	19.2	33.4		n.d.
	lamotrigine	4.0	n.d.		n.d.
	benzotriazole	12.9	n.d.		n.d.
	4,5-methylbenzotriazole	4.6	n.d.		n.d.
pepper	carbamazepine	40.0	30.2		8.3
	EP-CBZ	3.5	n.d.		n.d.
	caffeine	10.3	13.6		n.d.
	lamotrigine	8.3	n.d.		n.d.
	benzotriazole	21.3	n.d.		n.d.
	4,5-methylbenzotriazole	6.9	n.d.		n.d.

	analyte	concentration [ng/g d.w.]			
		roots	shoots	leaves	fruits
rucola	carbamazepine	37.6	7.5	60.7	
	EP-CBZ	22.4	6.5	33.5	
	2-OH-CBZ	n.d.	n.d.	9.4	
	3-OH-CBZ	n.d.	n.d.	4.6	
	gabapentin	n.d.	n.d.	36.3	
	acesulfame	26.3	n.d.	n.d.	
	benzotriazole	n.d.	n.d.	2.2	
parsley	carbamazepine	40.8		90.6	
	EP-CBZ	24.9		21.0	
	3-OH-CBZ	n.d.		6.0	
	10-OH-CBZ	29.2		n.d.	
	<i>trans</i> -DiOH-CBZ	24.8		11.0	
	lamotrigine	26.8		n.d.	
	gabapentin	29.0		22.1	
	gemfibrozil	47.1		n.d.	
	acesulfame	37.2		41.0	
	hydrochlorothiazide	69.4		12.4	
	lettuce	carbamazepine	26.7		215.7
EP-CBZ		10.1		89.4	
<i>trans</i> -DiOH-CBZ		19.1		41.5	
potato	carbamazepine	76.6	59.6	173.1	
	EP-CBZ	14.1	5.3	138.1	
	2-OH-CBZ	n.d.	6.2	17.9	
	3-OH-CBZ	n.d.	n.d.	1.7	
	10-OH-CBZ	n.d.	n.d.	2.7	
	<i>trans</i> -DiOH-CBZ	4.7	3.4	13.6	
	caffeine	30.3	34.2	61.8	
	gabapentin	n.d.	n.d.	32.4	
	acesulfame	n.d.	4.3	11.0	
carrot	carbamazepine	13.9		61.2	
	EP-CBZ	7.7		53.5	
	3-OH-CBZ	n.d.		10.0	
	<i>trans</i> -DiOH-CBZ	7.4		20.3	
	acridone	n.d.		11.6	
	gabapentin	10.1		n.d.	
	ciprofloxacin	12.0		n.d.	
	acesulfame	21.7		185.6	

n.d. = not detected

### 5.3 Manuskript

#### **Extensive metabolism of neutral pharmaceuticals following uptake into agricultural plants – carbamazepine in tomato**

Christina Riemenschneider, Bettina Seiwert, Monika Moeder, Dietmar Schwarz, Thorsten Reemtsma

Environmental Science & Technology, **2017**, *accepted*.

Erklärung zum Eigenanteil am Manuskript:

Die Idee und das Versuchsdesign der durchgeführten Studie stammen von mir. Die Auswahl der Substanz (Carbamazepin) habe ich getroffen. Die Planung der hydroponischen Experimente erfolgte durch mich und Dr. Monika Möder. Die Kultivierung der hydroponischen Kulturen erfolgte am Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ, Großbeeren, DE) in Zusammenarbeit mit Dr. Dietmar Schwarz. Vor Ort wurden die Versuche von Gundula Aust (IGZ) betreut. Die Analyse der Pflanzenproben wurde von mir durchgeführt, wobei die Auswertung der LC-HRMS-Daten mit Unterstützung durch Dr. Bettina Seiwert erfolgte. Die Idee das Manuskript zu erstellen hatte ich. Als Erstautorin habe ich das Manuskript entworfen. Prof. Thorsten Reemtsma und Dr. Monika Möder waren an der Diskussion der Ergebnisse, der Ergebnispräsentation und Formulierung beteiligt.

**Extensive transformation of the pharmaceutical carbamazepine following uptake  
into intact tomato plants**

Christina Riemenschneider<sup>1</sup>, Bettina Seiwert<sup>1</sup>, Monika Moeder<sup>1</sup>, Dietmar Schwarz<sup>2</sup>,  
Thorsten Reemtsma\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Analytical  
Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany [thorsten.reemtsma@ufz.de](mailto:thorsten.reemtsma@ufz.de)

<sup>2</sup>Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops – IGZ, Theodor-Echtermeyer-Weg  
1, 14979 Großbeeren, Germany

*\*Corresponding author:*

Thorsten Reemtsma

Department of Analytical Chemistry

Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ

Permoserstrasse 15

04318 Leipzig, Germany

E-mail: [thorsten.reemtsma@ufz.de](mailto:thorsten.reemtsma@ufz.de)

Phone.: +49-3412351261

Fax: +49-341235 450822

### **Abstract**

Carbamazepine (CBZ) is an antiepileptic drug which is persistent in wastewater treatment plants and the environment. It has been frequently detected in plant material after irrigation with treated wastewater. To date, little information is, however, available on the transformation of CBZ in plants. In the present study, the uptake, translocation and transformation of CBZ was studied in hydroponically grown tomato plants. After 35 days of exposure > 80% of the total spiked amount of CBZ was taken by the tomato plants and mainly stored in the leaves. A total of 11 transformation products (TP) (mainly phase-I) were quantified by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and their total amount corresponded to 33% of the CBZ taken up. The ratio of CBZ metabolites to CBZ was highest in fruits (up to 2.5) and leaves (0.5), suggesting an intensive transformation of CBZ in these compartments. Further 10 TPs (phase-I and II) were identified by LC-high resolution mass spectrometry screening, likely comprising another 12% of CBZ. Based on these experiments and on an experiment with CBZ-10,11-epoxide a transformation pathway of CBZ in intact tomato plants is proposed that involves epoxidation, hydrolysis, hydroxylation, ring contraction or loss of the carbamoyl group, followed by conjugation to glucose or cysteine, but also reduction of CBZ. This transformation pathway and analytical data of CBZ transformation products allow for their determination also in field grown vegetable and for the generation of more accurate exposure data of consumers of vegetable irrigated with treated municipal wastewater.

### **Keywords**

Metabolism, structure elucidation, micropollutants, wastewater irrigation, agriculture

## Introduction

Carbamazepine (CBZ) is a pharmaceutical compound that is used for the treatment of epilepsy, trigeminal neuralgia and neuropsychiatric disorders.<sup>1</sup> A total amount of 13 tons of CBZ were prescribed in Germany in 2011.<sup>2</sup> The daily therapeutic dose of CBZ is in the range of 10 to 20 mg/kg/day.<sup>1</sup> Carbamazepine is extensively metabolized within the human body. Approximately 30% are excreted unmodified and reach the environment via wastewater. Due to its low removal efficiency in wastewater treatment plants it is commonly detected in treated municipal wastewater as well as in surface water and even in groundwater.<sup>3, 4</sup> In addition, 10 of at least 30 known human metabolites of carbamazepine have been found in treated municipal wastewater.<sup>5, 6</sup>

In semiarid and arid countries, water scarcity requires the use of nontraditional water resources such as treated wastewater for crop irrigation in agriculture. This kind of irrigation, however, poses potential risks because numerous studies have shown that micropollutants, e.g. pharmaceuticals, are taken up by plants.<sup>7-10</sup> Within the plant micropollutants may be translocated into edible plant parts and thus, enter the food chain. CBZ, which is known to be persistent in soils<sup>11</sup>, is predicted to be effectively taken up by plants due to its neutral state.<sup>12</sup> In the past years, considerable uptake and translocation of carbamazepine in crops irrigated with treated wastewater were reported.<sup>7, 10, 13, 14</sup> For instance, Shenker et al. (2011)<sup>13</sup> demonstrated an uptake of CBZ by cucumber plants in hydroponic culture and greenhouse experiments. The bioaccumulation of CBZ was significantly higher in the leaves (76-84% of total uptake) than in the stem and roots, suggesting that CBZ is predominantly translocated by the transpiration stream.<sup>13</sup> Recently, the uptake of CBZ by root (sweet potato and carrot) and fruit vegetables (tomato and cucumber) was studied and two transformation products (TPs) of CBZ were determined: 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine (DiOH-CBZ) and carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ).<sup>7, 14</sup> The concentration of EP-CBZ was notably higher in sweet potato and carrot leaves than the parent compound.<sup>14</sup> The determination of five CBZ TPs in carrot cell cultures<sup>15</sup> and six TPs in different vegetables grown under field conditions has also been reported<sup>16</sup>.

While xenobiotics may be transformed within plants<sup>17-19</sup>, metabolism pathways are hardly known and poorly predictable<sup>20</sup>. Plant metabolism is comparable to the liver metabolism and can be divided into three phases<sup>19, 21</sup>. In phase I reactions the xenobiotics undergo transformation processes such as oxidation, reduction, and hydrolysis. The compounds are commonly more reactive than the parent compound due to the introduction of functional groups such as -OH, -NH<sub>2</sub> or -SH. In phase II reactions the activated compounds were further conjugated with endogenous molecules e.g., carbohydrates,

malonic acid, or sulfate. These conjugation processes usually increase the hydrophilicity of compounds and thus lead to detoxification and allow compartmentation into the vacuole and the apoplast (phase III).<sup>21</sup>

Beyond pesticides not much is known about the plant metabolism of xenobiotics. Until now, the metabolism of e.g. acetaminophen<sup>17</sup>, diclofenac<sup>22</sup>, triclosan<sup>18, 23</sup>, benzotriazole<sup>24</sup> and oxybenzone<sup>25</sup> in plants have been investigated. The majority of these studies were performed using either hairy root or cell culture experiments.<sup>17, 18, 22, 23, 25</sup> Up to 23 TPs of triclosan have been identified.<sup>23</sup> In addition, it was assessed that the amount of TPs even exceeded the amount of the parent compound, e.g. by a factor of 5 for triclosan in carrots<sup>18</sup> and 1.5 (>60 %) for benzotriazole in *Arabidopsis*<sup>24</sup>, respectively. These studies clearly illustrated that for mass balances and toxicity studies not only the parent compound but also their TPs have to be considered and quantified in plant uptake studies. Since CBZ is one of the most frequently detected emerging contaminants in irrigated plants the fragmentary knowledge on its transformation in plants calls for completion. The previous determination of up to six TPs of CBZ in plants<sup>15, 16</sup> is a good basis to improve our knowledge on the extent and the pathway of CBZ transformation in plants.

Hence, the aim of the present work was (1) to study to which extent carbamazepine is transformed in intact plants by quantifying a large number of CBZ TPs which are available as reference compounds, (2) to detect and to identify yet unknown phase-I and phase-II TPs, (3) to propose a transformation pathway of carbamazepine in plants and (4) to assess in which plant compartment most of the transformation takes place. For this purpose hydroponic cultures of plants were chosen to ensure well-defined cultivation conditions and to consider the distribution of the parent compound and its TPs in different plant organs. Tomato was selected as model plant because tomatoes are the most popular and most cultivated vegetable worldwide (4.7 Million ha). In addition, it is easy to grow and often used as model plant.<sup>26</sup> Liquid chromatography coupled to either high resolution-mass spectrometry (LC-HRMS) or tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) allowed the identification of a larger number of yet unknown TPs (including phase-II) and the quantification of a larger number of CBZ TPs. This study provides deepened insights in the transformation of CBZ in plants, its extent and its pathways and the likely organs for these processes.

### **Material and methods**

#### Chemicals

Reagent details are provided in the Supporting Information.

## Hydroponic cultures

To study the uptake and transformation of carbamazepine by crops tomato plants were grown in a greenhouse at 24 °C for about three months.

Seeds of tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Ailsa Craig) were sown and cultivated five weeks in 1-L pots filled with coarse sand. Seedlings in the sixth-leaf stage were removed from the pots, rinsed with tap water, and placed in 10-L plastic buckets (one plant per bucket) containing 5 L nutrient solution (Table S1). The nutrient solution was aerated in order to assure an adequate oxygen concentration in the root environment. The buckets were covered with black/white plastic foil to prevent evaporation, exposure of roots to light, and to reduce algae formation. After 5 d of adaption, plants were exposed to CBZ. For this purpose the nutrient solution was fortified three times at intervals of 19 and 14 days, respectively, with 500 µg/L of CBZ (corresponds to 2.5 mg CBZ per plant on each day; in total 7.5 mg CBZ per plant). Within four days after each treatment the nutrient solution was only refilled to supply plants with sufficient water and nutrients and to avoid CBZ losses. Four days after each treatment the whole nutrient solution was replaced daily to minimize algae formation. The last spiking procedure was performed 48 h before harvesting. Plants were grown for a total of 89 d, among them 40 d under hydroponic conditions and 35 d after start of exposure. The total amount of the CBZ spiked in this study (7500 µg per plant) is about one order of magnitude higher than the amount a field grown tomato plant would be exposed to if it was irrigated daily with 5 L of treated wastewater (CBZ concentration of 1.7 µg/L) and a total growth time of 89 d. This higher amount was chosen in order to allow the detection and identification of yet unknown TPs. Negative effects on plant growth (compared to control plants) were not observed.

To elucidate the transformation pathway of CBZ an additional experiment with exposure to EP-CBZ (300 µg/L) was performed. Further details are reported in the Supporting Information.

Tomato plants grown in nutrient solution without fortification were used for control purposes. Both the control and test hydroponic systems were conducted in duplicate. Nutrient solutions were analyzed twice in terms of CBZ and its TPs once 30 min after the first spiking and later at the point of harvest. In addition, control experiments (nutrient solution in buckets without plants but spiked with CBZ) were performed in duplicate to investigate the adsorption of CBZ on the surface of the test vessels. An adsorption can be neglected because on average the amount of CBZ spiked was detected in the nutrient solutions without plants 30 min after spiking (Table S2).

### Plant harvesting and sample preparation

Whole plants were harvested and prepared for LC-MS analysis. Each plant was decapitated above the roots. The lowest 8 mm of the stem which were in direct contact with the nutrient solution were cut off and rejected to avoid contamination. Afterwards, roots, stems, leaves, and fruits were weighted to determine fresh mass. Before sample preparation, roots were rinsed thoroughly with tap water and fruits were additionally separated into mature (red) and immature (green) fruits. About one third of each plant compartment was freeze-dried and weighted to determine dry mass. Subsequently, the material was ground to a fine powder.

Sample extraction followed a method reported elsewhere<sup>27</sup>. In brief, a 0.5-g aliquot of freeze-dried plant material was extracted with 5 mL methanol in an ultrasonic water bath for 20 min. This was followed by shaking for 30 min and centrifugation at 1700 g for 5 min. The supernatant was decanted and the extraction repeated. The combined supernatants were filtered using a 0.2- $\mu$ m syringe RC filter (Sartorius GmbH, Goettingen, Germany). Each plant sample was prepared in duplicate. Limits of detection and quantification, absolute recoveries and relative standard deviations for carbamazepine and its TPs in tomato fruits and leaves are given in Table S3. Further validation parameters such as matrix-effects, intra- and inter-day precisions are reported elsewhere<sup>27</sup>.

Nutrient solutions were either directly injected into the LC-MS/MS system or after dilution (e.g. 1:100) with MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50) appropriate to the calibration range.

### Quantitative target analysis - HPLC-MS/MS analysis

Liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (QTrap 5500, Sciex, Darmstadt, Germany) and Analyst 1.6.2 software (Sciex) was used to quantify CBZ and 12 of its TPs (Table S3). Chromatographic separation was performed at 30 °C on an Ascentis Express reversed-phase column (10 cm x 3.0 mm, 2.7  $\mu$ m; Sigma-Aldrich) with a SecurityGuard C18 guard column (4 mm x 2.0 mm; Phenomenex). 0.1% acetic acid in water (A) and 0.1% acetic acid in methanol (B) were used as mobile phases. The gradient program was applied as follows: 0-2 min: 90% A; 2-5 min: 90-60% A; 5-40 min: 60-50% A; 40-41 min: 50-10% A; 41-46 min: 10% A; 46-50 min: 90% A. The flow rate was set at 0.3 mL/min and the injection volume was 5  $\mu$ L for all measurements. All compounds were analyzed in positive ESI and scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) mode. MRM transitions and substance specific parameters are given in Table S4. Quantification of the analytes in plant matrices was performed by matrix-matched calibration to account for matrix-induced signal suppression or enhancement in

electrospray ionization. For this purpose calibration standards were prepared in the range of 0.1 – 50 ng/mL by standard addition of all analytes to the extracts of non-exposed tomato roots, stems, leaves and fruits, respectively.

Quantification of the analytes in nutrient solutions was carried out by external calibration in MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50) since matrix effects were negligible.

### Suspect screening - UPLC-QTOF-MS analysis

Suspect screening of untargeted TPs was carried out with an ACQUITY UPLC system that was coupled to a Xevo G2-XS mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source (Waters Corp., Milford, USA). Chromatographic separation was performed using an ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 x 2.1 mm<sup>2</sup>, 1.8 μm) at a flow rate of 0.45 mL/min and a column temperature of 45 °C. The mobile phase consisted of (A) 10 mM ammonium acetate in water, pH 5 and (B) 10 mM ammonium acetate in methanol, pH 5. The gradient was as follows: 0-12.25, min 2-99% B; 12.25-15.00 min 99% B; 15.00-15.01 min, 99-2% B; 15.10-17.00 min 2% B. The injection volume was 10 μL for all samples.

Full scan spectra were collected from *m/z* 50-1200 in positive and negative mode (continuum and centroid). Ionization source conditions were set as follows: source temperature 140 °C, capillary voltage 3 kV and -0.8 kV, respectively, desolvation temperature 600 °C, sampling cone voltage 20 V and source offset 80 V. Nitrogen was used as cone gas and argon as collision gas. The cone gas flow was 50 L/h and desolvation gas flow 1000 L/h. To ensure accurate mass precision during MS analysis, leucine enkephalin was infused via the reference probe as lockspray, and a two-point calibration was applied. Two MS-data sets were collected in parallel using low collision energy (6 eV, effectively the accurate mass of precursors) and high collision energy (15-40 eV, all of the fragments) in order to obtain greatest extent of structural information on each TP.

### Data processing and identification of transformation products

For identification of untargeted TPs continuum raw MS data were processed using Unifi software version 1.7 (Waters). An automatic 3D peak picking was conducted using predefined criteria. The parameters used were as follows: target and fragment match tolerance of 5 ppm,  $\delta$  mass <5 ppm, retention time window 2-10 min, a lock mass (leucine enkephalin, *m/z* 556.2771) correction was carried out, and adducts (protonation, sodium, potassium, and ammonium) were allowed. The chromatogram of a control sample

was set as reference and only peaks presented in the treated samples were of further interest. Candidate TPs were listed with their chromatographic retention time,  $m/z$ , molecular formula and product ion spectrum.

The assignment of the chemical formula of precursor and fragment ions was assisted by MarkerLynx application manager for MassLynx 4.1 software. The criteria were set as follows: mass tolerance  $\leq 5$  ppm and element limits of: C (0-100), H (0-100), O (0-30), N (0-5), S (0-4), P (0-2).

Moreover, a common search for fragment ions was performed to detect further candidates.

### Results and discussion

#### Occurrence of CBZ and its transformation products in plant organs

To study CBZ transformation, 12 possible phase-I CBZ TPs (Table S3) which were either known from human metabolism<sup>28</sup> or environmental studies<sup>5, 29, 30</sup> and which were all commercially available as reference standards were considered for quantitative target analysis by LC-MS/MS.

The concentration and distribution of CBZ and TPs in the different plant organs of tomato (roots, stems, leaves, fruits) are shown in Fig. 1. Among the compounds studied, CBZ showed the highest concentration in all plant organs (Fig. 1). All of the TPs investigated, except acridine-9-carbaldehyde, could be detected in the plant although not always in all compartments. EP-CBZ was found to be the main TP in concentrations ranging from 1.1 (mature fruits) to 6025 ng/g fresh mass (leaves) (Fig. 1). The number of TPs decreased in the order: leaves (11) > stems (8) > roots and fruits (7). Oxcarbazepine and 10,11-Dihydrocarbamazepine were solely detected in leaves (Fig. 1). In both immature and mature fruits the types of TPs as well as their concentrations were comparable (Fig. 1).

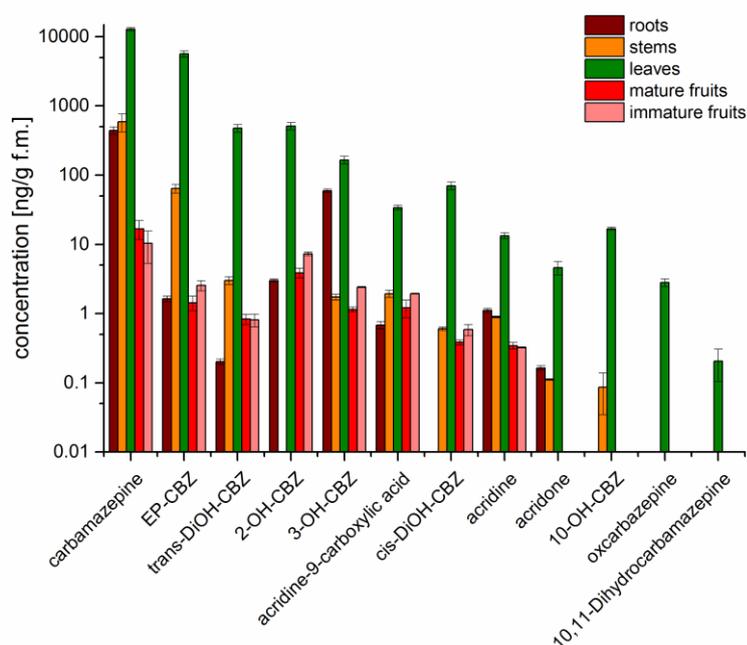


Figure 1: Concentration (ng/g fresh mass) and distribution of carbamazepine and its TPs in the plant organs of tomato (n = 2) grown under hydroponic conditions.

No TPs of CBZ were detected in the nutrient solution during exposure of the plants (Table S5). This agrees to the stability of CBZ in wastewater treatment<sup>31-33</sup> and indicates that TPs determined in tomato plants were, indeed, formed within the plants. At harvest time, however, EP-CBZ was detected in the nutrient solution at very low concentrations (0.45  $\mu\text{g/L}$ , Table S5). This, likely, indicates a release of EP-CBZ from the plants into the medium. A release of TPs from plants into the media has also been reported for triclosan in cell cultures<sup>18</sup> and for benzotriazole in hydroponic systems<sup>24</sup>. In the control experiments without exposure to CBZ, neither CBZ nor any of the TPs were detected in any plant organ or in the nutrient solution.

Figure 2 shows the concentration ratio of the sum of all 12 TPs to the concentration of the parent CBZ versus the sum concentration of TPs and CBZ in the respective plant organs. The ratio was highest in immature fruits (up to 2.5) followed by mature fruits and leaves (0.5 - 0.6), while it was below 0.2 for stems and roots. This suggests that CBZ transformation was most intense in developing fruits, followed by mature fruits and tomato leaves. While translocation from other plant organs into fruits cannot be ruled out, it is likely that this would affect both, CBZ and its TPs and would, therefore, not increase the TP to CBZ ratio. Moreover, some TPs (such as oxcarbazepine, TP241, TP437) were solely detected in one plant compartment, indicating that the translocation of TPs in the tomato plants was not particularly strong. Enzyme activity measurements in different plant

organs would be required to verify the suggested enhanced metabolic activity in fruits and leaves. These data also suggests that photolysis in the plants was not relevant for CBZ transformation. Otherwise one would have expected a higher TP to CBZ ratio in mature fruits than in immature fruits. Photolytic transformation in plants may become more important, however, under field conditions in semiarid and arid regions with strong sunlight.

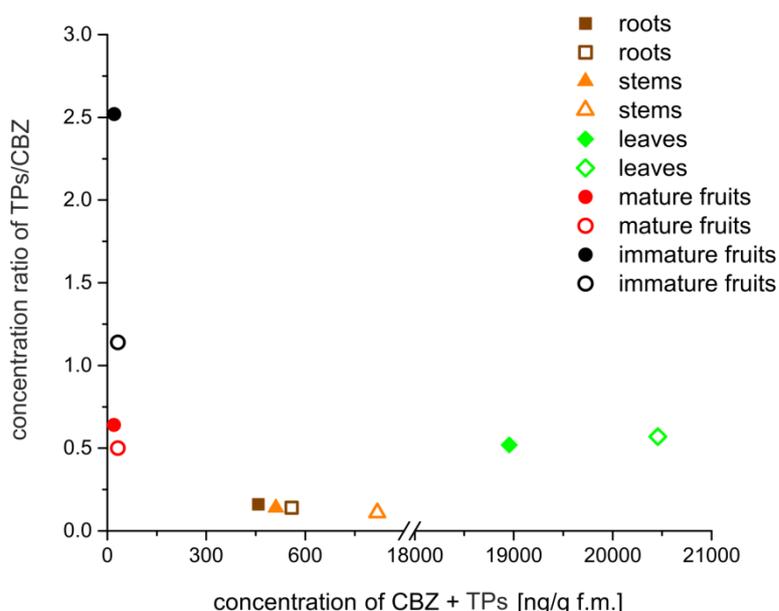


Figure 2: Concentration ratio of carbamazepine TPs to CBZ versus the sum of the concentrations (in ng/g fresh mass) of CBZ and its TPs in the different plant organs of two tomato plants (duplicates). Filled symbols are data obtained for plant 1 and open symbols are obtained for plant 2.

These data confirm previous findings that CBZ can be effectively taken up and distributed in tomato plants under various conditions (hydroponic, pots with soil, and field)<sup>7, 13, 16</sup> and that EP-CBZ and *trans*-DiOH-CBZ are among the main TPs in tomato<sup>7, 14, 16</sup>. 2-OH-CBZ and 3-OH-CBZ have also been determined in tomato plants grown under field conditions.<sup>16</sup> In addition, the TP to CBZ ratio in leaves and roots in this experiment are comparable to those calculated from data for field grown tomato (0.7 in leaves, 0.1 in roots)<sup>16</sup>. This is, however, the first report of the occurrence of the TPs *cis*-DiOH-CBZ, oxcabazepine, 10,11-Dihydrocarbamazepine, acridine-9-carboxylic acid, and acridine in tomato plants exposed to CBZ.

## Mass balance of CBZ

Hydroponic experiments are ideal to calculate a mass balance as the amount of the study compound to which the plant is exposed can be exactly determined. At harvest time, 54% of the total amount of CBZ spiked was detected as CBZ in plant material (Fig. 3). The majority of CBZ (43%) accumulated in leaves (BCF of 25.5, Table S6) followed by stems (8.9%), roots (1.5%), and fruits (0.1%). In addition, about 9% remained in the nutrient solution at harvest time. A portion of 27% of spiked CBZ was detected as phase-I TPs (Fig. 3), so that in total more than 80% of spiked CBZ was taken up by tomato plants and about 90% of the spiked CBZ was recovered from the experiment as either CBZ or its TPs (Fig. 3). Generally, phytovolatilization and mineralization may contribute to losses of the study compounds in plant uptake studies. However, CBZ is highly water soluble (130 - 260 mg/L)<sup>34-36</sup> and known as persistent compound in aqueous environment, so that these processes can be neglected for CBZ.

The quantities of CBZ and the TPs in the whole tomato plants and its different compartments were quite similar between the two plants analyzed, with differences ranging from 0 and 17%, except for immature fruits with ~21% (Table S8). This variability is well in the range one would expect for biological replicates.

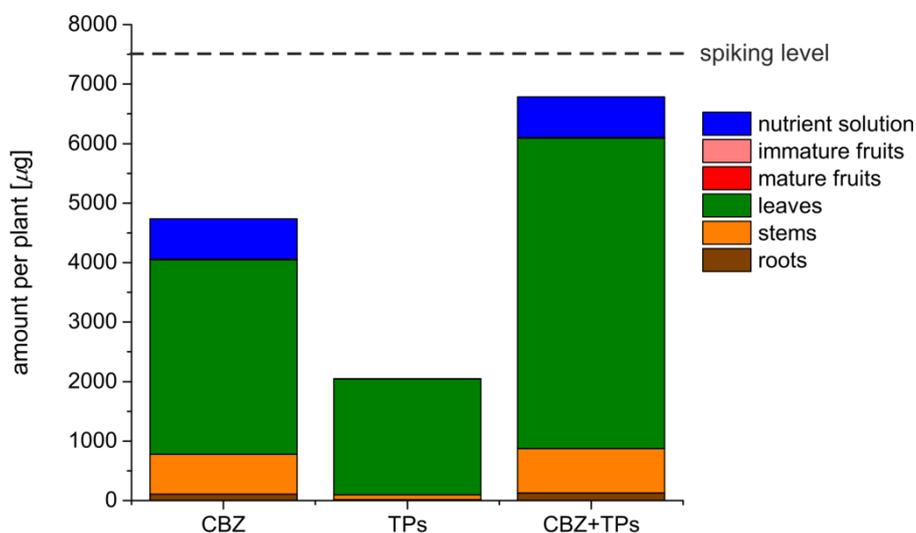


Figure 3: Average mass balance of carbamazepine in tomato plants (n = 2) which were exposed to a total amount of 7500 µg CBZ per plant and hydroponically grown in nutrient solution. CBZ and TPs were determined in the different plant organs of tomatoes and nutrient solutions at the time of harvest. Data of the single plants are given in Table S8.

In contrast to contaminants such as triclosan, oxybenzon or acetaminophen<sup>17, 18, 25</sup>, carbamazepine is not directly amenable to phase-II metabolism. Rather it needs to be functionalized in phase-I metabolism, first. This may be the reason why phase-I TPs are relatively prominent for CBZ.

Due to the high concentration of CBZ in the tomato leaves this compartment contributed most to the mass of TPs in the tomato plant (Fig. 3), even though the extent of transformation of CBZ in leaves was comparatively low (Fig. 2). An accumulation of CBZ in leaves was previously recorded for hydroponically grown cucumber plants<sup>13</sup> and ryegrass irrigated with urine<sup>37</sup>. Moreover, it is in agreement with uptake models predicting that nonionic compounds (such as CBZ) can easily cross membranes, are mainly translocated in the xylem and phloem, move predominantly in the direction of the transpiration stream and thus accumulate in leaves.<sup>38</sup>

A comparison of CBZ uptake into these plants with cell culture studies is not feasible because there no transpiration stream occurs and partitioning is the only driver for uptake. A similar extent of uptake as found here for CBZ in tomato was reported for the uptake of the non-ionic compound benzotriazole into hydroponically grown *Arabidopsis* (> 99%).<sup>24</sup> It appears that these hydrophilic non-ionic compounds of low molecular mass are taken up easily by plants through their roots together with the water in which they are dissolved<sup>12</sup>.

#### Suspect Screening by LC-HRMS – Identification of unknown transformation products

Plant extracts were also analysed by LC-HRMS and the data exploited by suspect screening strategies to detect yet unknown TPs of CBZ, which may account for the missing 10% of the mass balance (Fig. 3). In this way 10 novel CBZ TPs were detected in the plants after 35 d of exposure, which were not present in non-exposed control plants (Table 1). Their tentative identification was based on the respective molecular ions (exact mass), fragment ions and fragmentations, known from the analysis of the reference compounds (Table S4) or from literature<sup>39, 40</sup>. All TPs were detected in positive electrospray ionization (ESI) mode and had shorter retention times than CBZ (except TP252, Table 1) which indicates an increase in their polarity compared to the parent CBZ. Two to four isomers of TP241, TP437, and TP374 were distinguished by chromatography (Table 1). Based on the mass spectrometric data, structure proposals were elaborated for all TPs (Fig. 5).

The identification of TP374a, 10-hydroxy-10,11-dihydro-CBZ-S-cysteine, is exemplarily shown in Fig. 4. The signal at  $m/z$  374.118 represents the molecular ion of the conjugate. The fragment ion at  $m/z$  356.107 differs by 18.011 Da from the molecular cation and indicates the loss of water. The neutral loss of 121.019 Da (cysteine) leads to the core

structure of EP-CBZ (Fig. 4). The most intense fragment ion was  $m/z$  180.081 and further less intense ions were detected at  $m/z$  210.092 and  $m/z$  236.072 (Fig. 4), which are characteristic fragment ions of CBZ TPs<sup>40</sup>. The same fragmentation pattern was observed for the isomer TP374b (Table 1).

Four isomers of CBZ-O-glucosides (TP437a-d) could be detected (Table 1) as sodium adducts ( $m/z$  437.133; Table 1). Characteristic fragment ions ( $m/z$  253.098,  $m/z$  210.091) were observed for all isomers and represent the neutral loss of glucose (162.052 Da) and of the carbamoyl moiety (-CONH; 43.007 Da) from the molecular ion.

For TP253 ( $m/z$  of 253.098,  $C_{15}H_{13}N_2O_2$ ) the fragment ion  $m/z$  210.092 (Table 1) was observed. This TP is tentatively identified as 4-OH-CBZ due to its fragment ion spectrum (Fig. S1) and retention time.<sup>41</sup>

The two isomers TP241a and b, likely, are twofold reduced CBZ according to their exact mass ( $m/z$  241.1341) and the proposed formula  $C_{15}H_{17}N_2O$ .

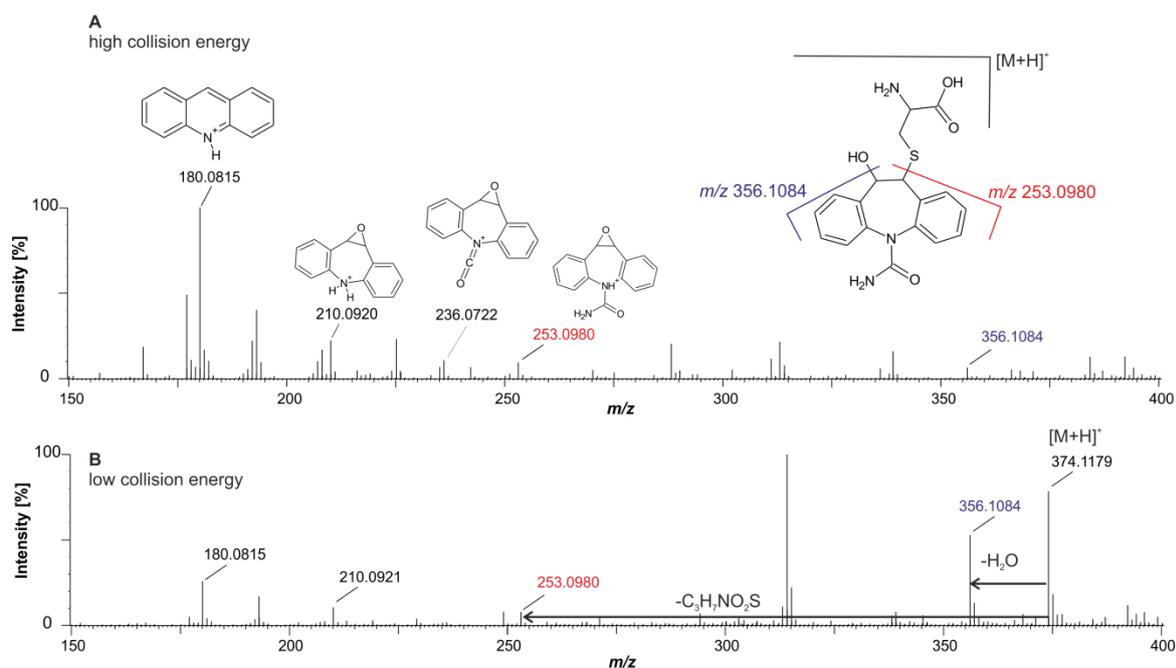


Figure 4: Structure elucidation of TP374a (cysteine-conjugate of CBZ) in extracts of tomato plants (leaves) exposed to carbamazepine. Mass spectra obtained at (A) high collision energy and (B) low collision energy in positive mode at the retention time of 5.42 min with a Xevo G2-XS QTOF mass spectrometer.

Table 1: Carbamazepine transformation products detected by LC-HRMS in tomato plants grown under hydroponic conditions.

Transformation product (TP)	R <sub>t</sub> (min)	accurate mass (m/z) (Δ ppm)	proposed formula [M+H] <sup>+</sup> /[M+Na] <sup>+</sup>	fragment ion (m/z) (Δ ppm)	proposed formula	confidence level*	plant compartment
Carbamazepine	8.17	237.104 (3.0)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O	194.098 (2.6)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N	Level 1: reference standard, R <sub>t</sub> and MS/MS confirmed	roots, stems, leaves, fruits
<b>TP241a</b>	5.29	241.134 (0.8)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O	-	-		roots
<b>TP241b</b>	5.42	241.134 (0.8)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O	-	-		roots
<b>TP437a</b>	5.42	437.133 (8.2)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Na	253.098 (2.0)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		fruits
CBZ-O-glucoside		415.151 (2.2)	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	210.092 (2.4)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		
<b>TP374a</b>	5.62	374.118 (0.8)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	356.107 (1.1)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		stems, leaves
10-hydroxy-10,11-dihydro-CBZ-S-cysteine				253.098 (2.0)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
				236.072 (3.8)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>		
				210.092 (1.0)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		
				180.081 (1.1)	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N		
<b>TP374b</b>	5.79	374.118 (-2.9)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	356.107 (1.1)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		stems, leaves
10-hydroxy-10,11-dihydro-CBZ-S-cysteine				253.098 (-0.8)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Level 3: tentative candidates, HR-MS, MS <sup>E</sup>	
				236.072 (2.5)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>		
				210.092 (0.5)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		
				180.081 (0.6)	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N		
<b>TP437b</b>	5.97	437.133 (1.1)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Na	253.098 (-3.2)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		leaves, mature fruits
CBZ-O-glucoside				210.092 (-1.4)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		
				180.081 (-1.1)	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N		
<b>TP437c</b>	6.32	437.133 (0.5)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Na	253.098 (0.0)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		leaves
CBZ-O-glucoside				210.091 (-2.9)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		
				180.081 (-2.2)	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N		
<b>TP437d</b>	6.49	437.133 (-0.2)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Na	253.098 (0.0)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		stems, leaves, fruits
CBZ-O-glucoside				210.091 (1.0)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		
<b>TP253</b>	7.61	253.098 (0.0)	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	210.092 (0.5)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> NO		leaves
4-OH-CBZ							
<b>TP252</b>	9.51	252.103 (-0.4)	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>	208.112 (-1.0)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N	Level 4: unequivocal	roots, stems
				192.081 (-0.5)	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N	molecular formula	

\*evaluated according to Schymanski et al.<sup>42</sup>

## Proposed pathway of CBZ transformation in tomato plants

At the time of harvest a total of 21 CBZ TPs were identified in tomato plants spiked with CBZ. On the basis of this experiment and an additional experiment where tomato plants were exposed to CBZ TP EP-CBZ a transformation pathway of CBZ in tomatoes is proposed (Fig. 5).

The main transformation pathway of CBZ is the formation of EP-CBZ which is further transformed to DiOH-CBZ (mainly *trans*-DiOH-CBZ) (Fig. 5). This would be largely comparable to the metabolism of CBZ in humans<sup>28</sup>, in the fungus *Pleurotus ostreatus*<sup>43</sup>, and in carrots<sup>15</sup>. As for *P. ostreatus* the oxidation of CBZ to EP-CBZ in tomato is likely catalysed by cytochrome P-450s, which have also been identified in the tomato genom<sup>44</sup>. Hydrolysis of EP-CBZ to DiOH-CBZ is most probably catalysed by epoxide hydrolase.<sup>43, 45</sup> The second main transformation pathway of CBZ in tomato is the hydroxylation to 2- and 3-OH-CBZ and, in much lower extent, to 4-OH-CBZ (Fig. 5), supposedly catalysed by the cytochrome P-450 system as well. These phase-I TPs may undergo further phase-II transformation by conjugation to glucose (TP437a-d). A total of four structural isomers of CBZ-O-glucoside were observed (Table 1). The reaction is catalysed by O-glucosyltransferase, a well-characterized plant enzyme<sup>46</sup>. Glycosylation is one of the most frequently reported phase-II reaction in plants and has been observed for a variety of xenobiotics (e.g. triclosan<sup>18</sup>, paracetamol<sup>17</sup>, benzotriazole<sup>24</sup>). Conjugation with glucose resembles the conjugation with glucuronic acid in mammals and is a significant detoxification mechanism in plants.

A third pathway, with EP-CBZ being the precursor, is the formation of acridone via 9-acridine-carboxaldehyd (proposed as intermediate), acridine-9-carboxylic acid, and acridine (Fig. 5). Parts of this pathway (starting from either CBZ, EP-CBZ or DiOH-CBZ) have been found previously for activated human leukocytes<sup>47</sup>, the white-rot fungus *P. ostreatus*<sup>43</sup>, activated sludge treatment<sup>30</sup>, and in electrochemical oxidation<sup>40</sup>. It is supposed that the loss of the carbamoyl group from EP-CBZ and a subsequent  $\alpha$ -ketol rearrangement, which leads to a ring contraction, led to the formation of 9-acridine-carboxaldehyd. Oxidation of its aldehyde group leads to the formation of acridine-9-carboxylic acid<sup>30</sup>. This is followed by decarboxylation to acridine which was further hydroxylated and oxidized to acridone<sup>40</sup>. The latter has already been observed for the fungus *P. ostreatus* with acridine as educt<sup>43</sup> and by electrochemistry<sup>40</sup>. Although 9-acridine-carboxaldehyd was not detected in this study, it is the most likely intermediate for the observed ring contraction.<sup>30, 40, 43, 47</sup> Possibly 9-acridine-carboxaldehyd was too reactive<sup>48</sup> to occur at measurable concentration (LOD in Table S3). However, a direct formation of 9-acridine-carboxaldehyd from CBZ has been observed under strong

oxidative conditions<sup>40, 47</sup> and cannot be ruled out completely for tomato. The results of the EP-CBZ experiment (Table S7) suggest that in tomato plants the acridone pathway starts from EP-CBZ rather than from CBZ.

Further TPs arise from EP-CBZ. A CBZ-O-glucoside and two isomers of TP374 (cysteine conjugates) are supposed to be formed directly from EP-CBZ and via an intermediate glutathione conjugate, respectively (Fig. 5). Apart from glycosylation the conjugation to amino groups and glutathione are common detoxification reactions of xenobiotics in plants.<sup>19, 21</sup> Glutathione S-transferases are widely distributed in plants and catalyse the nucleophilic addition of the cysteinyl thiol group of the tripeptide glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) to a wide range of electrophils (e.g. epoxides).<sup>49-52</sup> After conjugation to glutathione in the cytosol conjugates are deposited in the vacuole, where enzymatically degraded to cysteine conjugates may occur. In field situations, with a chronic exposure of CBZ via the irrigation water one may expect even larger portions of phase-II metabolites. By condensation *trans*-DiOH-CBZ is likely transformed to the enol-form of oxcarbazepine which is in equilibrium with its keto-form. As in humans oxcarbazepine is subsequently reduced to 10-OH-CBZ, its therapeutically active metabolite<sup>53</sup> (Fig. 5).

The TP 10,11-dihydrocarbamazepine can be explained by hydrogenation of the 10-11 double bond of CBZ. In contrast to oxidation and hydrolysis, which are well-known as major phase-I-reactions in plants<sup>21</sup>, reduction of contaminants occurs less frequently<sup>39</sup>. This reduction has also been observed previously in carrot cell cultures.<sup>15</sup> Another reduction product is TP241a and b, which can be formed directly from CBZ via internal cyclization of the carbamoyl group with the carbon in position 6, followed by the loss of two aromatic double bonds (Fig. 5). These TPs of CBZ have not been reported before under biotic conditions but appear to be related to products of the chemical reduction of CBZ<sup>54</sup>.

Glucose- and cysteine-conjugates of CBZ were predominantly detected in leaves and fruits of tomato plants (Table 1); this supports the hypothesis that transformation occurs mainly in these plant compartments.

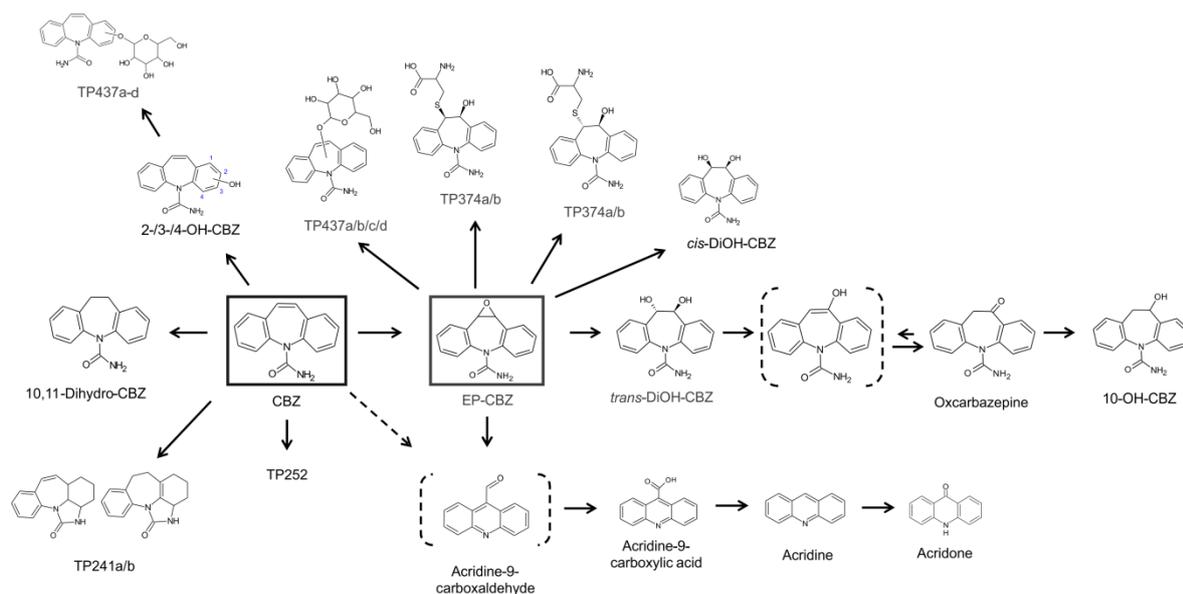


Figure 5: Confirmed and tentatively identified carbamazepine TPs and a possible transformation pathway of CBZ in hydroponically grown tomato plants. Structures in dotted parenthesis are proposed intermediates which were not detected.

#### Consequences for plant uptake modeling and consumer exposure

While uptake and distribution of CBZ is comparatively well-studied, little was known about its transformation in plants. Understanding the transformation processes of wastewater-derived organic contaminants in plants is, however, essential to correctly assess contaminant uptake into plants, translocation into its edible parts as well as the potential exposure of consumers. This study shows that carbamazepine can be extensively transformed: at least 33% of the CBZ taken up by the tomato plants were transformed to a large diversity of TPs.

The occurrence of a large number of phase-I (11) and phase-II (10) TPs in different plant compartments complicates the development of suitable uptake models for CBZ. Substance-specific and plant specific transformation rates would be required for such models and their generation would require excessive experimental work. Moreover one may assume that the extent of transformation is also influenced by the growth conditions. Instead it may be more feasible to do a targeted search for TPs and to determine their quantity in field grown plants.

Hydroponic experiments combined with LC-HRMS analyses are an ideal basis for the requested analysis of field grown plants, as they allow to detect and to tentatively identify previously unknown TPs generated in different plant compartments. For those TPs determined in field grown vegetables toxicological data should be searched for. In the

case of CBZ two TPs, EP-CBZ and acridine, have structural alerts that raise concern for potential genotoxicity.<sup>14, 16, 55</sup>

Eventually, the improved knowledge on both, the consumer exposure and potential health effects of contaminant TPs in agricultural plants would strengthen the assessment of health risks associated with the irrigation of agricultural plants with treated wastewater. This would be essential also for the setting of quality standards for organic contaminants in treated municipal wastewater for its use in agriculture.

### Supporting Information

Information about used chemicals, nutrient solutions used for the hydroponic cultures, the EP-CBZ experiment, method validation and instrument parameters for quantitative target analysis, concentrations of carbamazepine and TPs in the nutrient solutions and plant tissues, bioconcentration factors, total amount of CBZ and its TPs in the respective plant organs of tomato plants and supporting LC-HRMS data (chromatograms and mass spectra). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

### Acknowledgement

We thank Gundula Aust for her extensive assistance in plant cultivation. Financial support of this study by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn, Germany) through the project "Pollutants of Emerging Concern Originating from Reclaimed Wastewater: Plant Uptake, Translocation and Transformation" (PECtake; Re1290/7-1) is gratefully acknowledged. We thank four anonymous reviewers for their helpful comments.

### References

1. Albani, F.; Riva, R.; Baruzzi, A., Carbamazepine Clinical Pharmacology: A review. *Pharmacopsychiatry* **1995**, *28*, (6), 235-244.
2. Schwabe, U.; Antiepileptika. In *Arzneiverordnungs-Report 2012*; Schwabe, U., Paffrath, D., Eds.; Springer: Heidelberg 2012; pp. 387-402.
3. Reemtsma, T.; Weiss, S.; Mueller, J.; Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barcelo, D.; Ventura, F.; Knepper, T. P., Polar Pollutants Entry into the Water Cycle by Municipal Wastewater: A European Perspective. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, (17), 5451-5458.
4. Ternes, T. A.; Bonerz, M.; Herrmann, N.; Teiser, B.; Andersen, H. R., Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere* **2007**, *66*, (5), 894-904.
5. Leclercq, M.; Mathieu, O.; Gomez, E.; Casellas, C.; Fenet, H.; Hillaire-Buys, D., Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *56*, (3), 408-415.
6. Miao, X. S.; Yang, J. J.; Metcalfe, C. D., Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, (19), 7469-7475.

7. Goldstein, M.; Shenker, M.; Chefetz, B., Insights into the Uptake Processes of Wastewater-Borne Pharmaceuticals by Vegetables. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (10), 5593-5600.
8. Herklotz, P. A.; Gurung, P.; Heuvel, B. V.; Kinney, C. A., Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* **2010**, *78*, (11), 1416-1421.
9. Tanoue, R.; Sato, Y.; Motoyama, M.; Nakagawa, S.; Shinohara, R.; Nomiya, K., Plant Uptake of Pharmaceutical Chemicals Detected in Recycled Organic Manure and Reclaimed Wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, (41), 10203-10211.
10. Wu, X.; Conkle, J. L.; Ernst, F.; Gan, J., Treated Wastewater Irrigation: Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Common Vegetables under Field Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (19), 11286-11293.
11. Grossberger, A.; Hadar, Y.; Borch, T.; Chefetz, B., Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environ. Pollut.* **2014**, *185*, 168-177.
12. 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*, (5), 495-504.
13. 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.
14. Malchi, T.; Maor, Y.; Tadmor, G.; Shenker, M.; Chefetz, B., Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (16), 9325-9333.
15. Wu, X.; Fu, Q.; Gan, J., Metabolism of pharmaceutical and personal care products by carrot cell cultures. *Environ. Pollut.* **2016**, *211*, 141-147.
16. Riemenschneider, C.; Al-Raggad, M.; Moeder, M.; Seiwert, B.; Salameh, E.; Reemtsma, T., Pharmaceuticals, their metabolites and other polar pollutants in field grown vegetables irrigated with treated municipal wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, (29), 5784-5792.
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*, (2), 206-213.
18. 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*, (19), 10797-10804.
19. Sandermann Jr., H., Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, (2), 82-84.
20. Hurtado, C.; Trapp, S.; Bayona, J. M., Inverse modeling of the biodegradation of emerging organic contaminants in the soil-plant system. *Chemosphere* **2016**, *156*, 236-244.
21. Coleman, J. O. D.; Blake-Kalff, M. M. A.; Davies, T. G. E., Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, (4), 144-151.
22. Huber, C.; Bartha, B.; Schröder, P., Metabolism of diclofenac in plants - Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *243*, 250-256.
23. 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. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, (5), 1001-1009.
24. LeFevre, G. H.; Muller, C. E.; Li, R. J.; Luthy, R. G.; Sattely, E. S., Rapid Phytotransformation of Benzotriazole Generates Synthetic Tryptophan and Auxin Analogs in Arabidopsis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, (18), 10959-68.

25. Chen, F. R.; Huber, C.; May, R.; Schröder, P., Metabolism of oxybenzone in a hairy root culture: Perspectives for phytoremediation of a widely used sunscreen agent. *J. Hazard. Mater.* **2016**, *306*, 230-236.
26. Schwarz, D.; Thompson, A. J.; Klaring, H. P., Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Front Plant Sci.* **2014**, *5*, 1-16.
27. Riemenschneider, C.; Seiwert, B.; Goldstein, M.; Al-Raggad, M.; Salameh, E.; Chefetz, B.; Reemtsma, T., An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1273-1281.
28. Lertratanangkoon, K.; Horning, M. G., Metabolism of Carbamazepine. *Drug Metab. Dispos.* **1982**, *10*, (1), 1-10.
29. Hübner, U.; Seiwert, B.; Reemtsma, T.; Jekel, M., Ozonation products of carbamazepine and their removal from secondary effluents by soil aquifer treatment - Indications from column experiments. *Water Res.* **2014**, *49*, 34-43.
30. Kaiser, E.; Prasse, C.; Wagner, M.; Broder, K.; Ternes, T. A., Transformation of oxcarbazepine and human metabolites of carbamazepine and oxcarbazepine in wastewater treatment and sand filters. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (17), 10208-16.
31. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J., The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* **2009**, *43*, (2), 363-80.
32. Rosal, R.; Rodriguez, A.; Perdigon-Melon, J. A.; Petre, A.; Garcia-Calvo, E.; Gomez, M. J.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A. R., Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* **2010**, *44*, (2), 578-88.
33. Scheurer, M.; Storck, F. R.; Graf, C.; Brauch, H.-J.; Ruck, W.; Lev, O.; Lange, F. T., Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment. *J. Environ. Monit.* **2011**, *13*, (4), 966-973.
34. Douroumis, D.; Bouropoulos, N.; Fahr, A., Physicochemical characterization of solid dispersions of three antiepileptic drugs prepared by solvent evaporation method. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, (5), 645-653.
35. Loftsson, T.; Hreinsdottir, D.; Masson, M., Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, (1-2), 18-28.
36. Tsinman, K.; Avdeef, A.; Tsinman, O.; Voloboy, D., Powder Dissolution Method for Estimating Rotating Disk Intrinsic Dissolution Rates of Low Solubility Drugs. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, (9), 2093-2100.
37. Winker, M.; Clemens, J.; Reich, M.; Gulyas, H.; Otterpohl, R., Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, (8), 1902-1908.
38. Bromilow, R. H.; Chamberlain, K.; Evans, A. A., Physical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Science* **1990**, *38*, (3), 305-314.
39. 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*, (1-2), 55-72.
40. Seiwert, B.; Golan-Rozen, N.; Weidauer, C.; Riemenschneider, C.; Chefetz, B.; Hadar, Y.; Reemtsma, T., Electrochemistry Combined with LC-HRMS: Elucidating Transformation Products of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine Generated by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, (20), 12342-12350.
41. Bahlmann, A.; Brack, W.; Schneider, R. J.; Krauss, M., Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* **2014**, *57*, 104-114.
42. Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J., Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (4), 2097-2098.

43. Golan-Rozen, N.; Seiwert, B.; Riemenschneider, C.; Reemtsma, T.; Chefetz, B.; Hadar, Y., Transformation Pathways of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*: Effects of Growth Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, (20), 12351-12362.
44. Consortium, T. T. G., The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **2012**, *485*, (7400), 635-641.
45. Tybring, G.; Vonbahr, C.; Bertilsson, L.; Collste, H.; Glaumann, H.; Solbrand, M., Metabolism of carbamazepine and its epoxide metabolite in human and rat-liver *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* **1981**, *9*, (6), 561-564.
46. Wetzel, A.; Sandermann Jr., H., Plant Biochemistry of Xenobiotics - Isolation and Characterization of a Soybean O-Glucosyltransferase of DDT Metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *314*, (2), 323-328.
47. Furst, S. M.; Uetrecht, J. P., Carbamazepine metabolism to a reactive intermediate by the myeloperoxidase system of activated neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, (6), 1267-1275.
48. Furst, S. M.; Sukhai, P.; McClelland, R. A.; Uetrecht, J. P., Covalent binding of carbamazepine oxidative metabolites to neutrophils. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, *23*, (5), 590-594.
49. Dixon, D. P.; Laphorn, A.; Edwards, R., Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* **2002**, *3*, (3), 1-10.
50. Edwards, R.; Dixon, D. P.; Walbot, V., Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **2000**, *5*, (5), 193-198.
51. Marrs, K. A., The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **1996**, *47*, 127-158.
52. Shimabukuro, R. H.; Swanson, H. R.; Walsh, W. C., Glutathione conjugation - atrazine detoxication mechanism in corn. *Plant Physiol* **1970**, *46*, (1), 103-107.
53. Lloyd, P.; Flesch, G.; Dieterle, W., Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Oxcarbazepine. *Epilepsia* **1994**, *35*, S10-S13.
54. König, A.; Weidauer, C.; Seiwert, B.; Reemtsma, T.; Unger, T.; Jekel, M., Reductive transformation of carbamazepine by abiotic and biotic processes. *Water Res.* **2016**, *101*, 272-280.
55. Brenner, S.; Orgel, A.; Barnett, L.; Crick, F. H. C., The Theory of Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, (1), 121-124.
55. Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J., Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (4), 2097-2098.

## Supporting Information

### Extensive transformation of the pharmaceutical carbamazepine following uptake into intact tomato plants

*Christina Riemenschneider<sup>1</sup>, Bettina Seiwert<sup>1</sup>, Dietmar Schwarz<sup>2</sup>, Thorsten Reemtsma<sup>\*1</sup>*

<sup>1</sup>Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Analytical Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany [thorsten.reemtsma@ufz.de](mailto:thorsten.reemtsma@ufz.de)

<sup>2</sup>Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops – IGZ, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren, Germany

\*Corresponding author: Thorsten Reemtsma ([thorsten.reemtsma@ufz.de](mailto:thorsten.reemtsma@ufz.de))

This supporting information contains 8 tables and 12 figures on 19 pages:

### Content

<b>I. Material and methods</b> .....	<b>S2</b>
I.1. Chemicals.....	S2
I.2. Nutrient solutions .....	S3
I.3. Hydroponic cultures .....	S4
EP-CBZ experiment .....	S4
Control experiments.....	S4
I.4. Method validation and LC-MS/MS parameters .....	S5
<b>II. Results</b> .....	<b>S7</b>
II.1. Nutrient solutions .....	S7
II.2. Bioconcentration factor .....	S8
II.3. Concentration of carbamazepine and its transformation products in tomato plants .....	S9
II.4. Supporting LC-HRMS Data .....	S12

## I. Material and methods

### I.1. Chemicals

All used chemicals were of analytical grade (97-99% purity). UPLC/MS-grade methanol, glacial acetic acid and ammonium acetate were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Ultrapure water for aqueous solutions was obtained using a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany).

Analyte standards of carbamazepine (CBZ), carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ), oxcarbazepine, acridine, 10,11-dihydrocarbamazepine and acridine-9-carbaldehyde were supplied by Sigma-Aldrich (Munich, Germany), 2-hydroxy carbamazepine (2-OH-CBZ), 3-hydroxy carbamazepine (3-OH-CBZ), 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (10-OH-CBZ), *cis*-10,11-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine (*cis*-DiOH-CBZ), *rac trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine (*trans*-DiOH-CBZ), 9-acridinecarboxylic acid hydrate and acridone were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Stock solutions of all analytes and a mixed stock solution (500 µg of each analyte/L) containing 13 target compounds were prepared in methanol and stored in the darkness at -20 °C.

## I.2. Nutrient solutions

**Table S1:** Recipe of nutrient solutions for hydroponically grown tomato plants

Nutrient/element	Starter solution	Refilling solution
	mg/L	mg/L
EC* [dS m <sup>-1</sup> ]	1.5	1.5
pH	5.6	5 - 6
Ca	161.1	102.4
NO <sub>3</sub> -N	133.3	129.7
NH <sub>4</sub> -N	9.3	13.0
K	125.6	227.2
P	12.9	38.1
SO <sub>4</sub> -S	88.0	46.1
Mg	40.9	15.6
Mn	0.112	0.513
Zn	0.164	0.241
B	0.219	0.244
Cu	0.018	0.042
Mo	0.019	0.044

\*EC = electrical conductivity

The composition of elements and nutrients in the starter and refilling solution are empirical values meeting the demand of nutrients at different growth stages.

### I.3. Hydroponic cultures

#### EP-CBZ experiment

In addition to the CBZ experiment, tomato plants were exposed once to solely EP-CBZ since this transformation product is known to be highly reactive<sup>1, 2</sup> and the main TP of CBZ in plants<sup>3-5</sup>. For this purpose tomato plants were grown for a total of 89 days, among them 40 d under hydroponic conditions as described for the CBZ experiment. 48 h before harvest two plants, which have not been exposed to CBZ, were spiked once with EP-CBZ at a concentration of 300  $\mu\text{g/L}$  (in total 1.5 mg EP-CBZ per plant). Harvesting, sample preparation and analysis were performed according to the CBZ experiment. The results of this experiment were only used to elucidate the transformation pathway of CBZ by identifying those TPs that result immediately from EP-CBZ.

#### Control experiments

**Table S2:** Control experiment without plants. Concentration of carbamazepine (CBZ) in the nutrient solution 30 min after spiking of 2.5 mg CBZ per bucket (5 L).

	CBZ concentration [mg/5L]
bucket 1	2.48
bucket 2	2.43

## I.4. Method validation and LC-MS/MS parameters

**Table S3:** Limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), absolute recovery (RA) and relative standard deviation (RSD, n = 3) for carbamazepine and 12 of its TPs extracted by solid-liquid extraction from freeze-dried tomato fruits and leaves.

analyte	tomato fruits				tomato leaves			
	LOD [ng/g d.m.]	LOQ [ng/g d.m.]	RA [%] 50 ng/g d.m.	RSD [%] 50 ng/g d.m.	LOD [ng/g d.m.]	LOQ [ng/g d.m.]	RA [%] 50 ng/g d.m.	RSD [%] 50 ng/g d.m.
10,11-dihydro-10,11- <i>cis</i> -dihydroxycarbamazepine ( <i>cis</i> -DIOH-CBZ)	0.2	1.0	57.4	2.0	1.0	1.0	49.3	3.2
10,11-dihydro-10,11- <i>trans</i> -dihydroxy-carbamazepine ( <i>trans</i> -DIOH-CBZ)	0.2	1.0	75.2	1.2	0.2	1.0	66.9	1.1
10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine ( <b>10-OH-CBZ</b> )	0.2	1.0	89.4	2.9	0.2	0.2	83.6	2.7
10,11-Dihydrocarbamazepine	0.2	1.0	86.6	1.9	0.2	1.0	77.5	3.4
2-hydroxy carbamazepine ( <b>2-OH-CBZ</b> )	0.2	1.0	82.7	2.6	0.2	1.0	81.6	2.3
3-hydroxy carbamazepine ( <b>3-OH-CBZ</b> )	<0.2	0.2	93.1	1.1	<0.2	1.0	85.2	1.4
acridine	0.2	1.0	86.6	2.0	0.2	2.0	95.3	2.2
acridine-9-carboxaldehyde	20.0	40.0	22.7	19.4	20.0	40.0	54.4	3.0
acridine-9-carboxylic acid	<0.2	0.2	95.5	3.3	0.2	1.0	83.7	15.0
acridone	<0.2	<0.2	96.1	0.7	<0.2	1.0	87.7	1.3
carbamazepine ( <b>CBZ</b> )	0.2	1.0	91.0	0.0	0.2	1.0	33.3	1.9
carbamazepine 10,11-epoxide ( <b>EP-CBZ</b> )	0.2	1.0	79.7	0.7	0.2	1.0	79.0	2.2
oxcarbazepine	0.2	1.0	92.8	0.8	0.2	<0.2	61.6	14.1

d.m. = dry mass

**Table S4:** Optimized parameters for the QTrap-MS/MS analysis of carbamazepine and its transformation products: declustering potential (DP), collision energy (CE) and mean retention time (RT).

compound	ESI polarity	Precursor ion (m/z)	DP (V)	Quantifier	CE 1 (eV)	Qualifier	CE 2 (eV)	RT (min)
<i>cis</i> -DIOH-CBZ	+	271	86	180	43	210	21	7.9
<i>trans</i> -DIOH-CBZ	+	271	26	180	49	253	11	11.6
10-OH-CBZ	+	255	51	194	31	237	15	12.8
10,11-Dihydro-CBZ	+	239	116	180	31	194	57	26.0
2-OH-CBZ	+	253	61	210	29	208	35	12.9
3-OH-CBZ	+	253	61	210	27	208	29	15.7
acridine	+	180	40	152	47	-	-	9.6
acridine-9-carboxaldehyde	+	208	41	180	25	-	-	9.3
acridine-9-carboxylic acid	+	224	76	196	37	167	55	4.5
acridone	+	196	126	167	49	-	-	16.1
carbamazepine	+	237	106	194	25	193	47	22.4
EP-CBZ	+	253	31	180	41	236	15	12.8
oxcarbazepine	+	253	71	236	19	208	27	15.1

## II. Results

### II.1. Nutrient solutions

**Table S5:** Concentration of carbamazepine (CBZ) and its transformation product carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ) in the nutrient solution of hydroponically grown tomato plants which were exposed to CBZ. Sampling was performed at two different stages of growth.

	sampling time	concentration [mg/5L]	
		CBZ	EP-CBZ
<b>CBZ Plant 1</b>	Day 0 (30 min after first exposure)	1.73	n.d.
	Day 35 (harvest)	0.78	<LOQ*
<b>CBZ Plant 2</b>	Day 0 (30 min after first exposure)	1.08	n.d.
	Day 35 (harvest)	0.58	0.0044

n.d. = not detected

\*The LOQ of EP-CBZ in MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50) is given in Riemenschneider *et al.* 2016.

**II.2. Bioconcentration factor**

Bioconcentration factors (BCF) of carbamazepine were calculated according to equation 1 by using the concentration of CBZ in the respective plant tissue.

$$\text{BCF [L/kg]} = \frac{\text{concentration in plant tissue } (\mu\text{g/kg fresh mass})}{\text{concentration in nutrient solution } (\mu\text{g/L})} \quad (1)$$

**Table S6:** Bioconcentration factors (BCF) of carbamazepine in plant organs of tomato plants.

<b>plant tissue</b>	<b>BCF [L/kg] CBZ plant 1</b>	<b>BCF [L/kg] CBZ plant 2</b>
roots	0.79	0.98
stems	0.89	1.48
leaves	25.0	26.0
mature fruits	0.02	0.04
immature fruits	0.01	0.03

### II.3. Concentration of carbamazepine and its transformation products in tomato plants

**Table S7:** Mean concentration (n = 2) of carbamazepine (CBZ) and its transformation products in the respective plant compartments (roots, stems, leaves, mature fruits, and immature fruits) of tomato plants exposed to either CBZ or carbamazepine 10,11-epoxide (EP-CBZ).

Analyte	Concentration [ng/g fresh mass]			
	CBZ plant 1	CBZ plant 2	EP-CBZ plant 1	EP-CBZ plant 2
<b>roots</b>				
carbamazepine	394.1	489.1	8.9	n.d.
acridine	1.0	1.2	0.4	0.8
acridone	0.2	0.2	0.2	0.2
EP-CBZ	1.8	1.5	149.0	160.8
2-OH-CBZ	2.9	3.1	n.d.	n.d.
3-OH-CBZ	56.8	62.3	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	0.2	0.2	0.6	0.6
acridine-9-carboxylic acid	0.6	0.8	0.4	0.4
<b>stems</b>				
carbamazepine	446.6	737.5	9.9	16.5
acridine	0.9	0.9	n.d.	n.d.
acridone	0.1	0.1	n.d.	n.d.
EP-CBZ	56.4	71.9	49.6	136.8
10-OH-CBZ	0.04	0.1	n.d.	n.d.
3-OH-CBZ	1.6	1.9	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -DiOH-CBZ	0.6	0.6	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	2.7	3.3	0.2	1.1
acridine-9-carboxylic acid	1.7	2.1	n.d.	0.1
<b>leaves</b>				
carbamazepine	12511.2	13020.2	n.d.	n.d.
acridine	12.3	14.4	0.4	0.4
acridone	5.3	4.0	0.4	0.1
EP-CBZ	5264.1	6024.8	23.6	717.6
10-OH-CBZ	16.8	16.9	n.d.	n.d.
2-OH-CBZ	469.0	556.7	n.d.	n.d.
3-OH-CBZ	150.1	181.0	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -DiOH-CBZ	62.8	77.5	n.d.	n.d.
oxcarbazepine	2.9	2.7	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	428.2	523.7	1.5	8.9
acridine-9-carboxylic acid	32.3	35.8	0.7	1.0
10,11-Dihydro-CBZ	0.3	0.1	n.d.	n.d.
<b>mature fruits</b>				
carbamazepine	12.3	21.3	n.d.	n.d.
acridine	0.3	0.4	n.d.	n.d.
EP-CBZ	1.1	1.7	n.d.	n.d.
2-OH-CBZ	3.3	4.4	n.d.	n.d.

5 Originalarbeiten und Manuskript

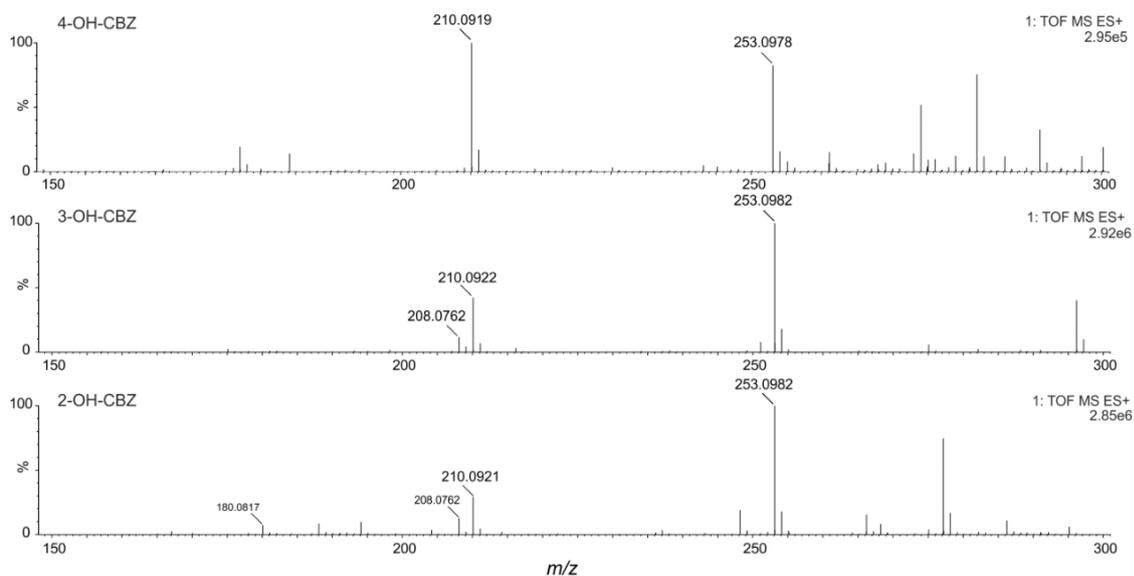
Analyte	Concentration [ng/g fresh mass]			
	CBZ plant 1	CBZ plant 2	EP-CBZ plant 1	EP-CBZ plant 2
3-OH-CBZ	1.1	1.2	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -DiOH-CBZ	0.4	0.4	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	0.7	1.0	n.d.	n.d.
acridine-9-carboxylic acid	0.9	1.5	n.d.	n.d.
<b>immature fruits</b>				
carbamazepine	6.0	14.8	n.d.	n.d.
acridine	0.3	0.3	n.d.	n.d.
EP-CBZ	2.2	2.9	0.1	5.5
2-OH-CBZ	7.0	7.6	n.d.	n.d.
3-OH-CBZ	2.4	2.4	n.d.	n.d.
<i>cis</i> -DiOH-CBZ	0.5	0.7	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	0.7	1.0	n.d.	0.3
acridine-9-carboxylic acid	1.9	1.9	n.d.	n.d.

n.d. = not detected

**Table S8:** Amount of carbamazepine (CBZ) and total amount of CBZ transformation products detected in the respective plant organs of tomato plants (n = 2) exposed to CBZ at the time of harvest.

	<b>amount per plant [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	
	plant 1	plant 2
<b>roots</b>		
carbamazepine	102.5	117.4
transformation products	16.5	16.6
<b>stems</b>		
carbamazepine	562.7	774.4
transformation products	80.7	85.0
<b>leaves</b>		
carbamazepine	3503.1	3038.1
transformation products	1804.3	2082.5
<b>mature fruits</b>		
carbamazepine	6.6	5.5
transformation products	4.2	2.7
<b>immature fruits</b>		
carbamazepine	2.0	2.8
transformation products	5.0	3.2

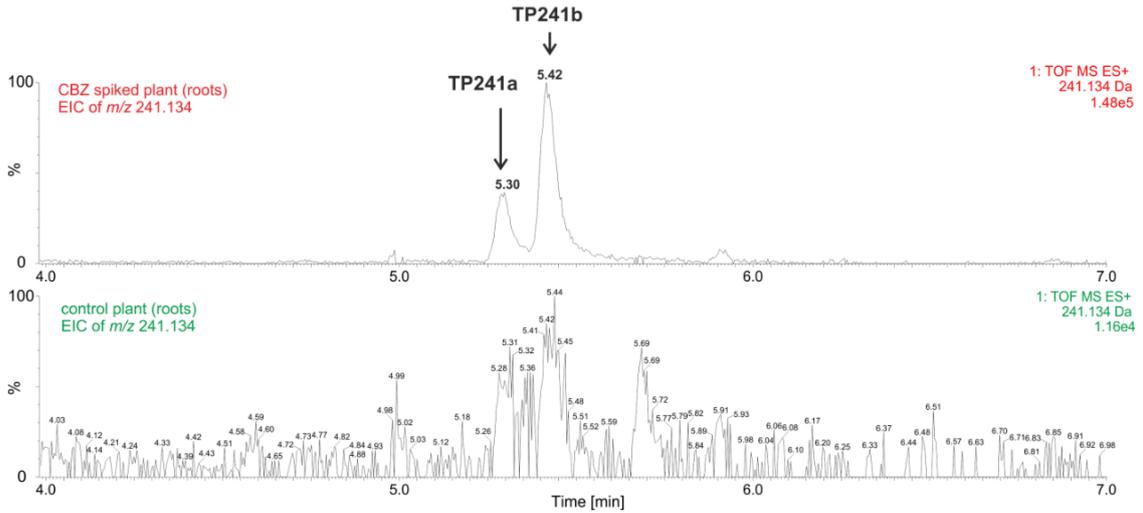
## II.4. Supporting LC-HRMS Data



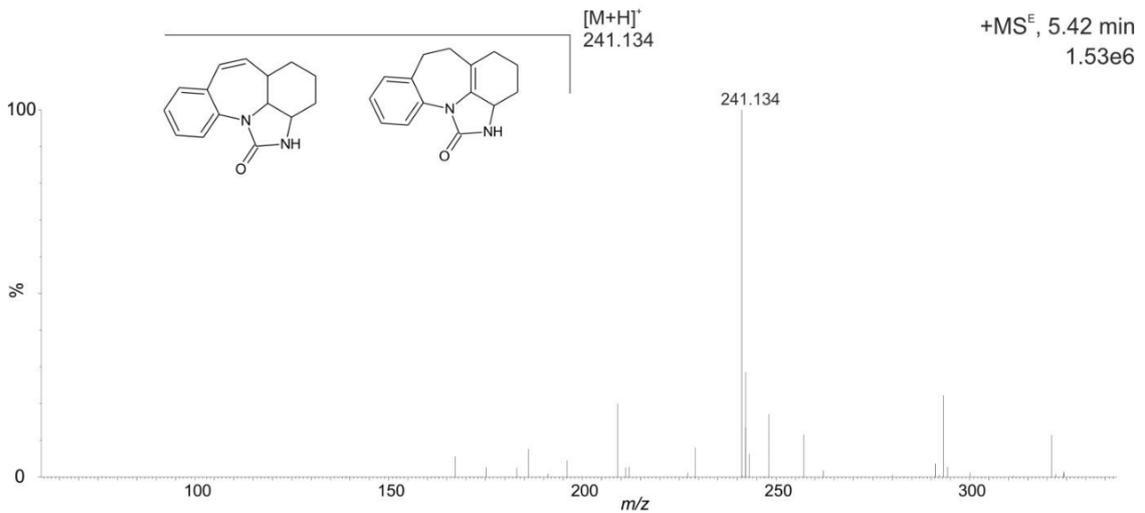
**Figure S1:** Comparison of low collision energy mass spectra of 2-OH-, 3-OH-, and 4-OH-CBZ in positive ionization mode in the extracts of tomato leaves. Data were generated on a Xevo G2-XS QTOF mass spectrometer.

## Identified TPs:

## TP241a/b

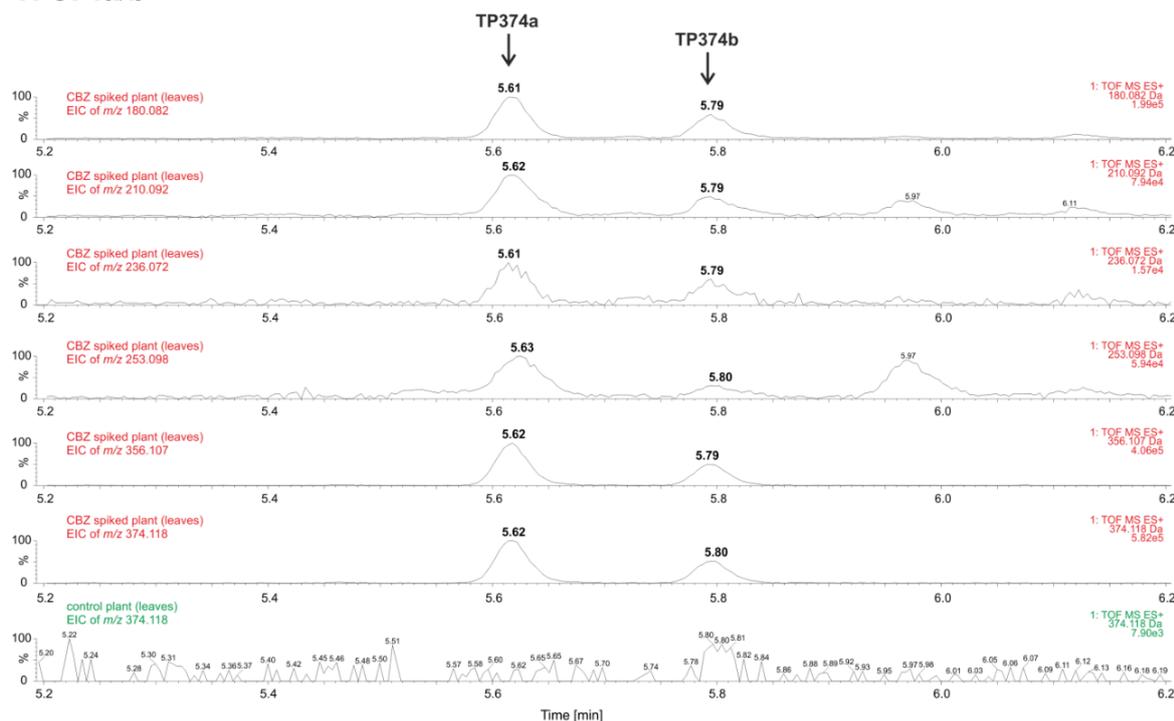


**Figure S2:** Low collision energy extracted ion chromatograms (EIC) of  $m/z$  241.134 in roots of control and CBZ spiked plants obtained by UPLC-QToF-MS (ESI positive mode). The peaks at 5.30 min and 5.42 min were tentatively identified as TP241a/b.



**Figure S3:** Structure proposals of TPs 241a and b and the low collision energy spectrum in positive ionization mode at the retention time of 5.42 min in extracts of roots of CBZ spiked plants.

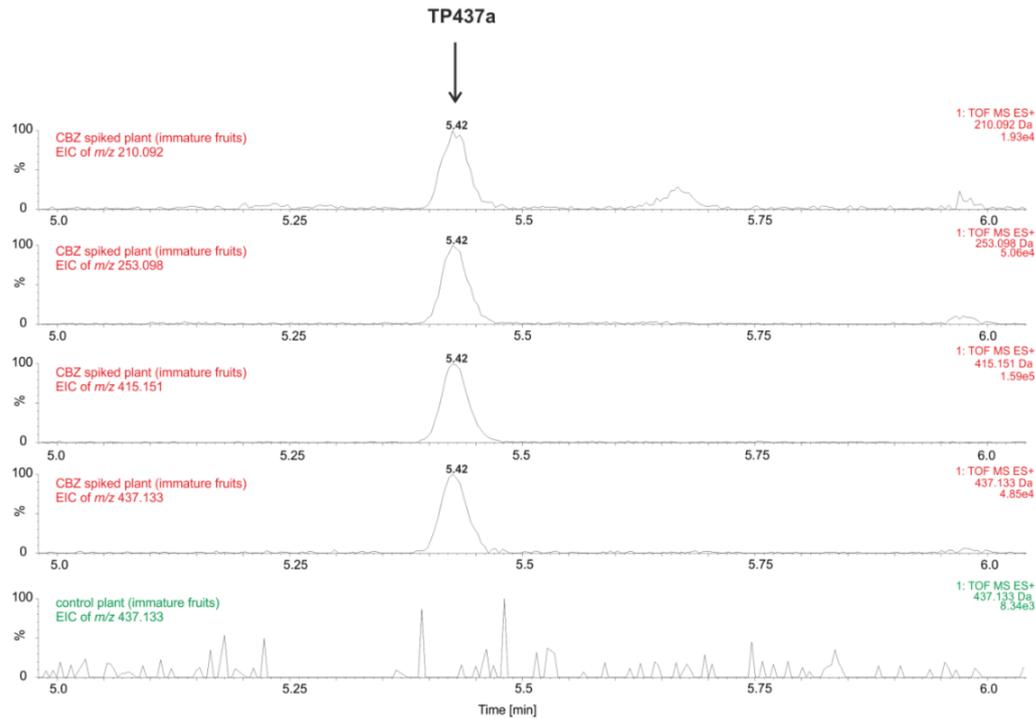
## TP374a/b



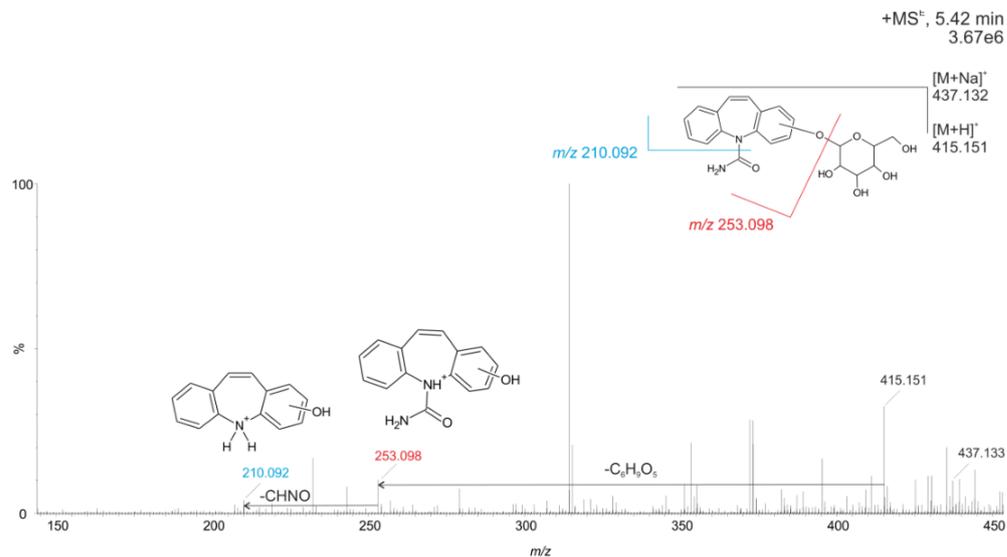
**Figure S4:** Low collision energy extracted ion chromatograms (EIC) of the molecular ion at  $m/z$  374.118 in leaves of control and CBZ spiked plants and of the fragment ions in leaves of CBZ spiked plants obtained by UPLC-QToF-MS (ESI positive mode). The peaks at 5.62 min and 5.79 min were tentatively identified as 10-hydroxy-10,11-dihydro-CBZ-S-cysteine (TP374a/b).

For structure proposal and mass spectra of TP374a/b see main text.

## TP437a

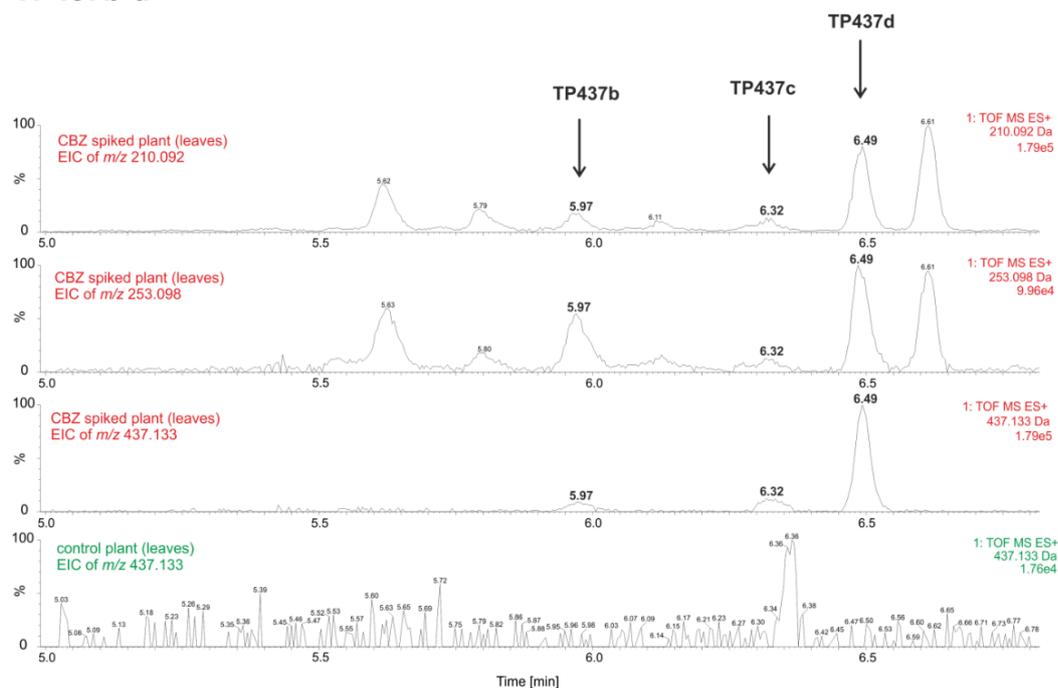


**Figure S5:** Low collision energy extracted ion chromatograms (EIC) of the molecular ion at  $m/z$  437.133 in immature fruits of control and CBZ spiked plants and of the fragment ions in immature fruits of CBZ spiked plants obtained by UPLC-QToF-MS (ESI positive mode). The peak at 5.42 min was tentatively identified as CBZ-O-glucoside (TP437a).

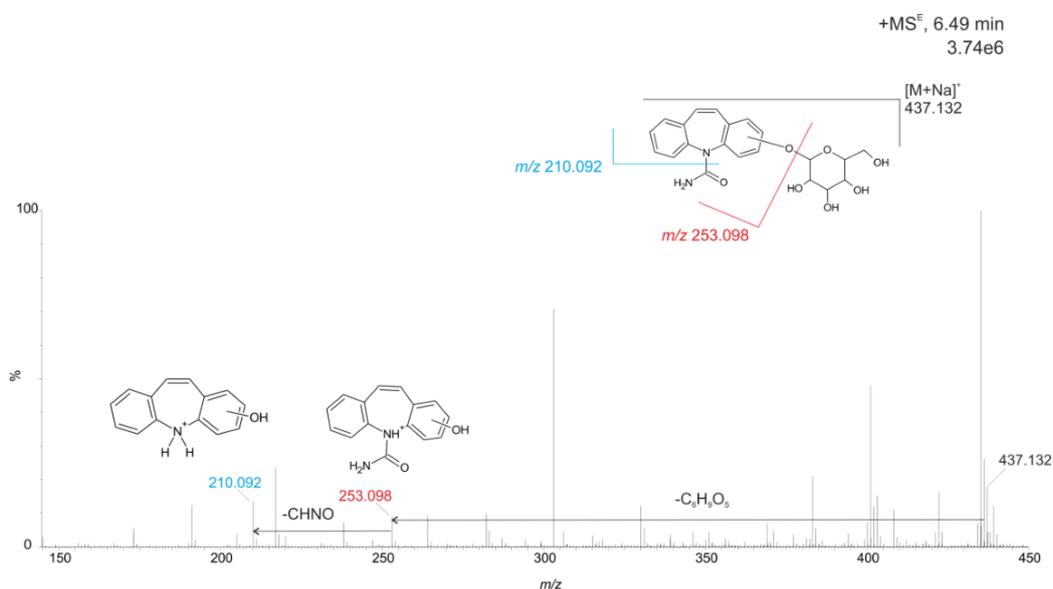


**Figure S6:** Possible structure of TP 437a based on the low collision energy spectrum in positive ionization mode at the retention time of 5.42 min in extracts of immature fruits of CBZ spiked plants.

## TP437b-d

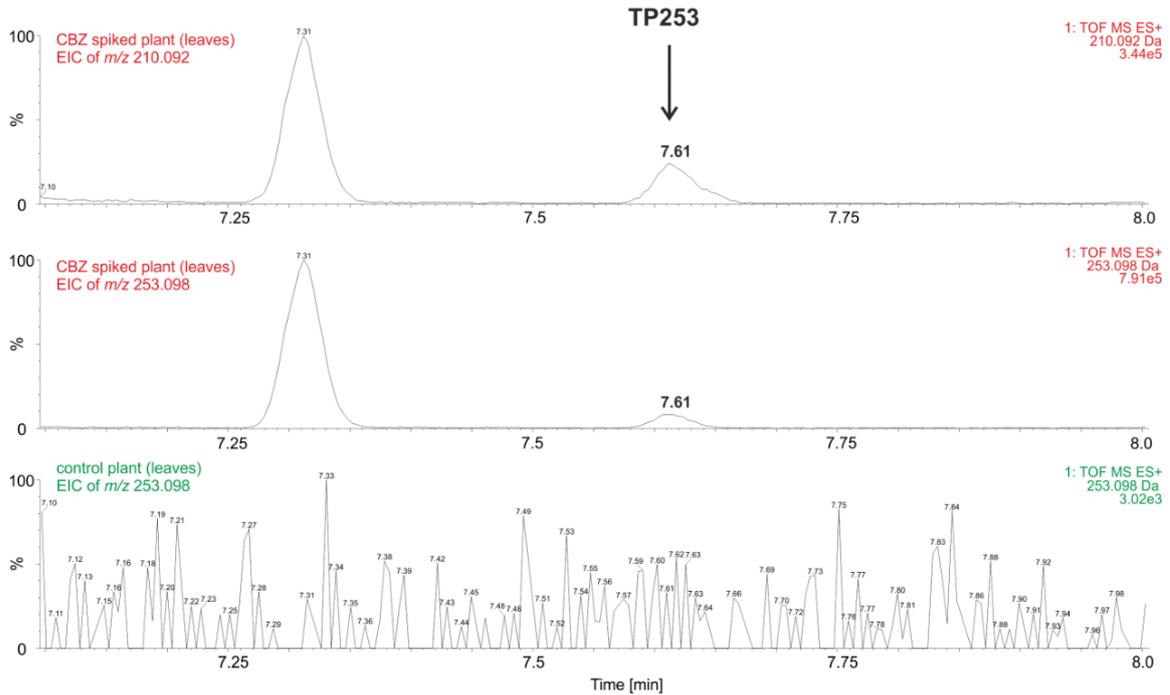


**Figure S7:** Low collision energy extracted ion chromatograms (EIC) of the molecular ion at  $m/z$  437.133 in leaves of control and CBZ spiked plants and of the fragment ions in leaves of CBZ spiked plants obtained by UPLC-QToF-MS (ESI positive mode). The peaks at 5.97 min, 6.32 min and 6.49 min were tentatively identified as CBZ-O-glucosides (TP437b-d).

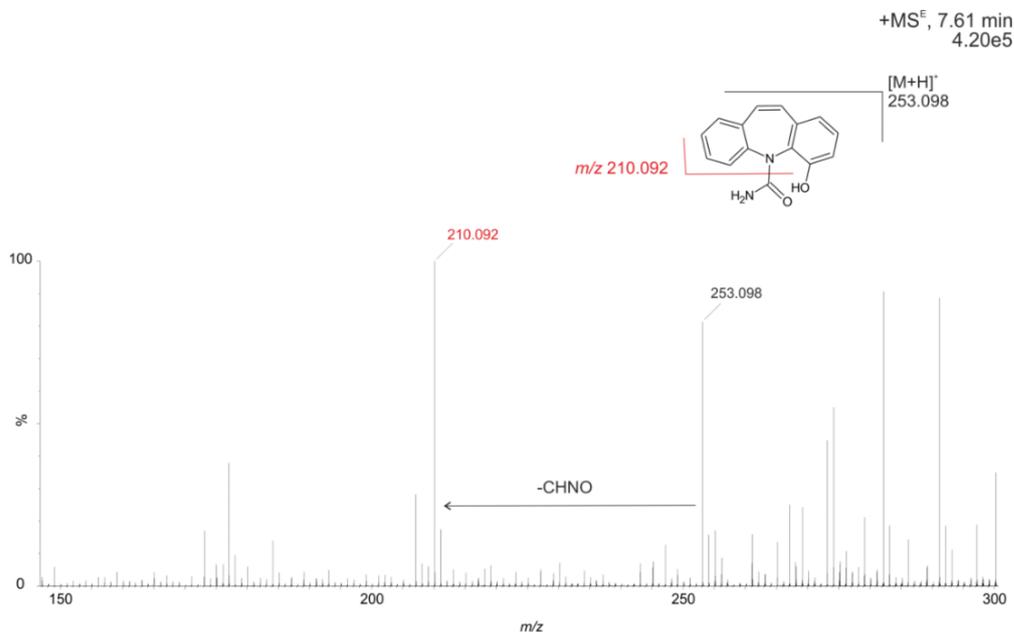


**Figure S8:** Structure elucidation of TPs 437b-d based on the low collision energy spectrum in positive ionization mode exemplarily shown for the peak at the retention time of 6.49 min in extracts of leaves of CBZ spiked plants. Analog spectra were obtained at the retention times of 5.97 min and 6.32 min.

## TP253

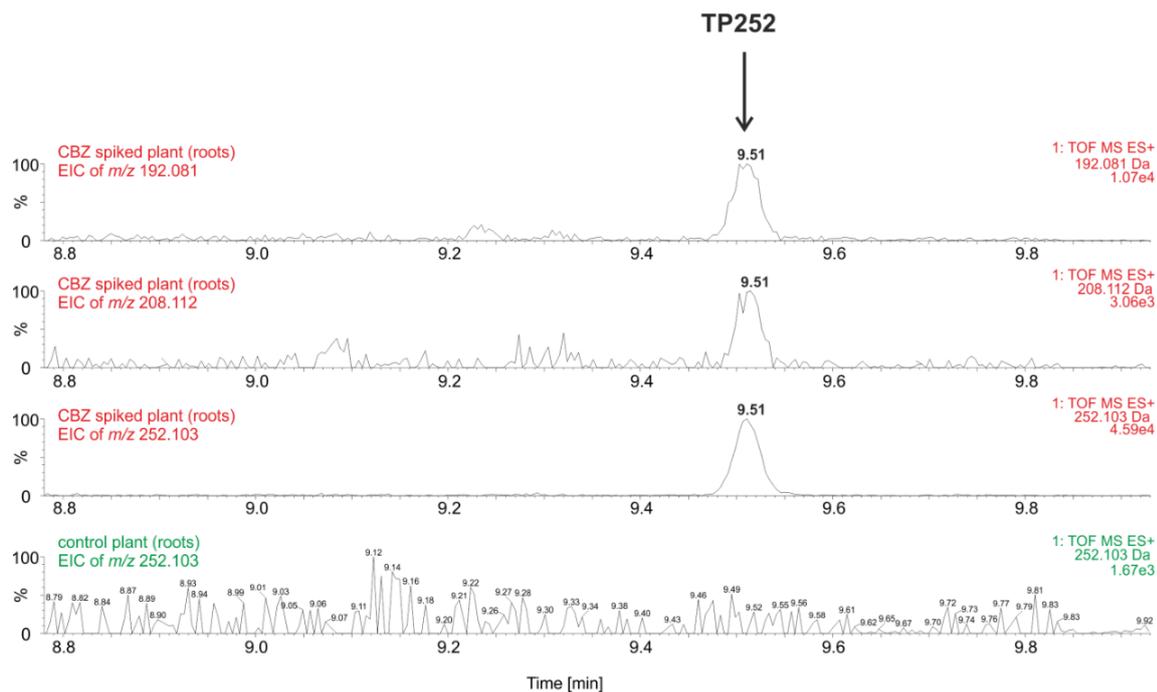


**Figure S9:** Low collision energy extracted ion chromatograms (EIC) of the molecular ion at  $m/z$  253.098 in leaves of control and CBZ spiked plants and of the fragment ion at  $m/z$  210.092 in leaves of CBZ spiked plant obtained by UPLC-QToF-MS (ESI positive mode). The peak at 7.61 min was tentatively identified as 4-OH-CBZ (TP253).

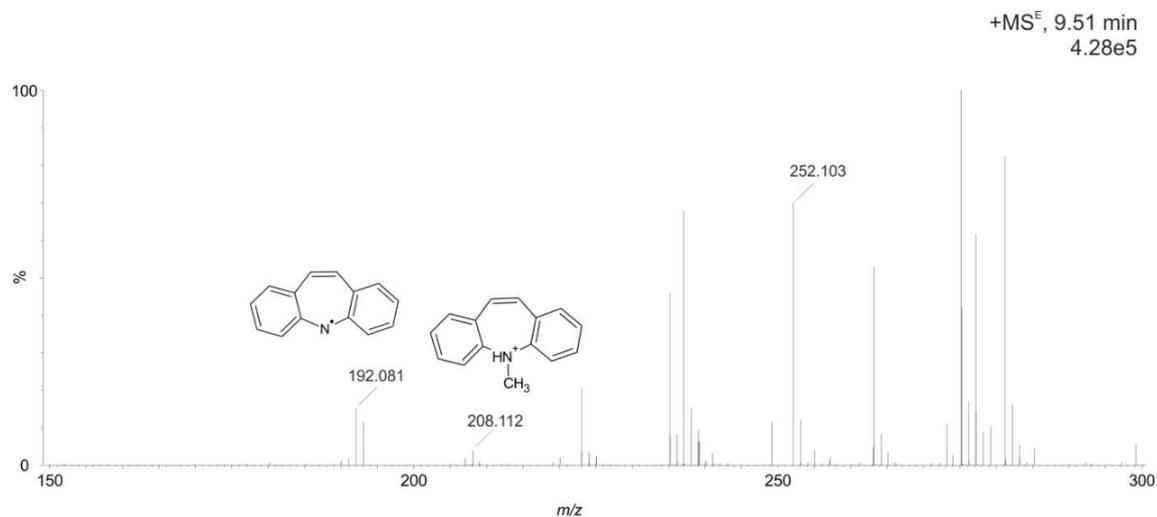


**Figure S10:** Structure elucidation of TP253 based on the low collision energy spectrum in positive ionization mode at the retention time of 7.61 min in extracts of leaves of CBZ spiked plants.

## TP252



**Figure S11:** Low collision energy extracted ion chromatograms (EIC) of the molecular ion at  $m/z$  252.103 in roots of control and CBZ spiked plants and of the fragment ions in roots of CBZ spiked plants obtained by UPLC-QToF-MS (ESI positive mode).



**Figure S12:** Low collision energy spectrum and structure proposals of fragments ions at  $m/z$  208.112 and  $m/z$  192.081 of TP252 in positive ionization mode at the retention time of 9.51 min in extracts of roots of CBZ spiked plants.

**References:**

1. Bu, H. Z.; Kang, P.; Deese, A. J.; Zhao, P.; Pool, W. F., Human in vitro glutathionyl and protein adducts of carbamazepine-10,11-epoxide, a stable and pharmacologically active metabolite of carbamazepine. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, (12), 1920-1924.
2. Golan-Rozen, N.; Seiwert, B.; Riemenschneider, C.; Reemtsma, T.; Chefetz, B.; Hadar, Y., Transformation Pathways of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*: Effects of Growth Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, (20), 12351-12362.
3. Goldstein, M.; Shenker, M.; Chefetz, B., Insights into the Uptake Processes of Wastewater-Borne Pharmaceuticals by Vegetables. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (10), 5593-5600.
4. Malchi, T.; Maor, Y.; Tadmor, G.; Shenker, M.; Chefetz, B., Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, (16), 9325-9333.
5. Riemenschneider, C.; Al-Raggad, M.; Moeder, M.; Seiwert, B.; Salameh, E.; Reemtsma, T., Pharmaceuticals, their metabolites and other polar pollutants in field grown vegetables irrigated with treated municipal wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, (29), 5784-5792.

## 6 Umweltchemische Relevanz der Arbeit & Ausblick

In semiariden und ariden Regionen ist, bedingt durch die Wasserknappheit, die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft von zunehmender Bedeutung. Da im Hinblick auf organische Spurenstoffe weltweit bislang keine Grenz- oder Richtwerte für Bewässerungswässer und die erzeugten Lebensmittel existieren, wird behandeltes Abwasser in vielen Ländern zumeist uneingeschränkt zur landwirtschaftlichen Bewässerung wiederverwendet. Die damit verbundene Aufnahme abwasserbürtiger organischer Spurenstoffe in Pflanzen ist von zunehmendem öffentlichem Interesse, da auf diese Weise ein neuer Eintragsweg von organischen Spurenstoffen in die Nahrungskette entsteht. Ob und inwieweit dadurch gesundheitliche Risiken für den Verbraucher entstehen ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Folglich ist es wichtig zu prüfen, ob eine Festlegung von Grenzwerten für organische Spurenstoffe im Bewässerungswasser und den erzeugten Lebensmitteln erforderlich ist, um das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers auf ein Minimum zu reduzieren. Dafür sind Untersuchungen zum Verbleib von organischen Spurenstoffen in mit behandeltem Abwasser bewässerten landwirtschaftlich genutzten Pflanzen unerlässlich.

Voraussetzung für die Untersuchung organischer Spurenstoffe in Pflanzen ist die Entwicklung geeigneter Analyseverfahren. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein spurenanalytisches Verfahren entwickelt werden, welches sowohl (1) neben den Ausgangsverbindungen auch mögliche Metaboliten eines organischen Spurenstoffs in Pflanzen berücksichtigt, als auch (2) eine Multikomponentenmethode darstellt, sowie (3) die simultane Bestimmung von organischen Spurenstoffen mit derart unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften ermöglicht und dazu 4) sehr niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ( $< 10 \text{ ng/g TM}$ ) aufweist (**Publikation 1**). Damit steht ein sehr sensitives analytisches Verfahren für die quantitative Bestimmung von einer Vielzahl an organischen Spurenstoffen in Pflanzen, selbst unter Freilandbedingungen, zur Verfügung.

Mittels der entwickelten Methode konnten im zweiten Teil dieser Arbeit die Aufnahme und Verteilung von organischen Spurenstoffen in die essbaren Teile von Nutzpflanzen (Zucchini, Tomate, Gurke, Paprika, Karotte, Aubergine, Kartoffel, Salat, Kohl und Rucola), welche unter realen Feldbedingungen angebaut und mit abwasserhaltigem Flusswasser bewässert wurden, nachgewiesen werden (**Publikation 2**). Diese Feldfrüchte werden auf lokalen Märkten in Jordanien angeboten und sind Bestandteil der täglichen Ernährung der

dortigen Bevölkerung. Anhand der gewonnenen Daten konnte die Exposition und das Gesundheitsrisiko der Bevölkerung abgeschätzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, zusammen mit aktuellen Studien von PAN *et al.* 2014, WU *et al.* 2014 und MALCHI *et al.* 2014, lassen darauf schließen, dass nach dem derzeitigen Kenntnisstand, das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers gegenüber organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, eher gering ist. Unzureichend scheint die derzeitige Datenlage im Hinblick auf mögliche pflanzliche Metaboliten der Ausgangsverbindungen. So ergaben erste Abschätzungen der Toxizität der detektierten Metaboliten mittels des Threshold of Toxicological Concern-Konzepts, dass der Hauptmetabolit Carbamazepin-10,11-epoxid, aufgrund seiner Struktur, ein genotoxisches Potenzial besitzt. Gesundheitliche Bedenken beim Verzehr, des in dieser Arbeit untersuchten Gemüses, können daher nicht ausgeschlossen werden. Für EP-CBZ sind für eine abschließende Bewertung zusätzliche toxikologische Daten erforderlich. Da der Metabolit als Referenzverbindung kommerziell erhältlich ist, können Genotoxizitätstests wie der Ames-Test, der HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)-Test, sowie der Chromosomenaberrationstest durchgeführt werden. Sofern alle drei Tests negativ ausfallen, kann EP-CBZ als "nicht genotoxisch" betrachtet werden und ein entsprechend höherer TTC-Wert zur Anwendung kommen.

Eine Ableitung von Grenzwerten für abwasserbürtige organische Spurenstoffe im Bewässerungswasser und erzeugten Lebensmitteln erscheint zum jetzigen Zeitpunkt nicht zwingend erforderlich. Jedoch, sind die Verbraucher beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, in der Regel mehreren Verbindungen gleichzeitig ausgesetzt. Eine Beurteilung der Kombinationswirkung der detektierten Verbindungen zur Ermittlung der Mischungstoxizität könnte in Betracht gezogen werden. Zudem stellt die hohe mikrobielle Keimbelastung des Bewässerungswassers eine Gefahr für die Gesundheit der Landwirte und Verbraucher erzeugter Lebensmittel dar. Beide Aspekte sollten, über die vorliegende Arbeit hinaus, im Zusammenhang mit der Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft und der menschlichen Gesundheit immer bedacht werden.

Den betroffenen Ländern sei ein regelmäßiges Monitoring von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen im Bewässerungswasser, sowie in Obst und Gemüse empfohlen, um eine unerwünschte chronische Exposition des Verbrauchers so gering wie möglich zu halten.

Um die Aufnahme und Verteilung von experimentell nicht untersuchten Verbindungen in Pflanzen abschätzen zu können, müssen entsprechende Modellrechnungen

vorgenommen werden. Problematisch ist hierbei jedoch, dass zunehmend von einer Metabolisierung der Ausgangsverbindungen in Pflanzen und damit von einer Unterschätzung der Aufnahmemenge berichtet wird (MACHERIUS *et al.* 2012, MALCHI *et al.* 2014, LEFEVRE *et al.* 2015). Der Metabolismus einer Verbindung kann sehr pflanzenspezifisch sein, ist somit schwer vorherzusagen und bleibt daher in bisherigen Modellen gänzlich unberücksichtigt. Eine Weiterentwicklung dieser Modelle durch Implementierung des metabolischen Abbaus wird derzeit angestrebt und kann nur erfolgen, wenn entsprechende experimentelle Daten zur Verfügung stehen (JACOBSEN *et al.* 2015). Im dritten Teil der Arbeit wurde daher das Verhalten von drei ausgewählten organischen Spurenstoffen in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen untersucht.

Durch die Untersuchung des Verhaltens von Carbamazepin (**Manuskript**), dem am häufigsten in Pflanzen detektierten und quantitativ bedeutsamsten, abwasserbürtigen organischen Spurenstoff, tragen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem wesentlich besseren Verständnis des Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen bei. So konnte einerseits anhand von hydroponischen Experimenten der Stoffwechselweg von Carbamazepin in Tomatenpflanzen aufgeklärt und darüber hinaus gezeigt werden, dass etwa 30% der aufgenommenen Carbamazepinmenge metabolisiert werden.

Andererseits konnte anhand einer Feldstudie (Publikation 2) gezeigt werden, dass ein Teil der identifizierten Carbamazepin-Metaboliten in der Tat in realem Marktgemüse nachweisbar sind und somit vom Verbraucher aufgenommen werden. Neben dem Hauptmetabolit Carbamazepin-10,11-epoxid, welcher ein genotoxisches Potenzial besitzt, gibt es Hinweise darauf, dass der Metabolit Acridin ebenfalls genotoxisch wirksam sein könnte (BRENNER *et al.* 1961). Insofern sollte nicht nur der Metabolismus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen untersucht, sondern auch die Toxizität der gebildeten Metaboliten berücksichtigt werden.

Für die Implementierung einer substanzspezifischen Abbaurate von Carbamazepin in Aufnahmemodellen sind über diese Arbeit hinaus weitere Daten erforderlich. So müsste eine Reihe kinetischer Experimente zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der gebildeten Carbamazepin-Metaboliten in jedem Pflanzenorgan diverser Pflanzenarten erfolgen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass ein hoher Zeit- und Arbeitsaufwand erforderlich sind, um den Metabolismus einer Verbindung in intakten Pflanzen zu untersuchen. Die Implementierung von substanzspezifischen Abbauraten in Modellen ist zwar wünschenswert, könnte aber durch die gezielte Analyse bereits bekannter und möglicherweise toxischer Metaboliten in Pflanzenproben ersetzt werden. Im Hinblick auf Carbamazepin wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende Metaboliten vorgeschlagen.

Die Untersuchungen zum Verhalten von Lamotrigin und Simvastatinsäure in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen (**Kapitel 4.2**) haben gezeigt, dass neben der Lipophilie und Ladung einer Verbindung weitere Parameter entscheidend für die Aufnahme in Pflanzen sind. So liegt die Vermutung nahe, dass die Aufnahme einer Verbindung ab einer Anzahl von fünf Donatoren und/oder Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (OH, NH, N und O) im Molekül deutlich begrenzt ist. Zudem wird vermutet, dass auch das Molekulargewicht einer Verbindung eine wesentliche Rolle für deren Aufnahme in Pflanzen spielt. Um basierend auf Modellrechnungen eine Überschätzung der Aufnahmemenge zu vermeiden, sollte den drei letztgenannten Parametern in Modellen eine größere Bedeutung zukommen.

Bezüglich des Metabolismus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen deuten diese und aktuelle Arbeiten von beispielsweise MACHERIUS *et al.* 2012, LEFEVRE *et al.* 2015 und EMHOFER *et al.* 2017 darauf hin, dass Verbindungen, die über ein oder mehrere Hydroxy-, Carboxy,- und/oder Aminogruppen verfügen, vornehmlich Phase II-Reaktionen eingehen. Ausgenommen von dieser Regelung scheinen Verbindungen, die aufgrund ihrer Struktur eine Vielzahl an Phase I-Reaktionen zulassen. So wurden für Carbamazepin, welches zwar über eine Aminogruppe verfügt, jedoch eine Vielzahl an reaktiven Stellen besitzt, mehrheitlich Phase I-Metaboliten identifiziert.

Während für Carbamazepin ein Teil der detektierten Metaboliten mittels Referenzverbindungen quantifiziert und das Ausmaß des Metabolismus abgeschätzt werden konnte war dies im Fall von Lamotrigin nicht möglich, da keine Referenzverbindungen der gebildeten Metaboliten kommerziell erhältlich sind. Eine Quantifizierung der Lamotrigin-Glucose-Konjugate könnte nach enzymatischer Hydrolyse und erneuter Quantifizierung der Ausgangsverbindung erfolgen. Weiterhin wären eine chemische Synthese der pflanzlichen Metaboliten oder ihre Synthese, Isolierung und Aufreinigung aus Zellkulturen denkbar. Darüber hinaus können durch die Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen nicht nur eine Quantifizierung von Metaboliten, sondern auch ein Nachweis und eine Quantifizierung von gebundenen Rückständen in Pflanzen erfolgen.

Hinsichtlich der Aufnahme und Verteilung von Lamotrigin und Simvastatinsäure in Tomatenpflanzen sind ebenfalls weitere Untersuchungen erforderlich, da für beide Verbindungen eine unvollständige Massenbilanz ermittelt wurde, die nicht auf einen pflanzlichen Metabolismus zurückzuführen ist. Eine Adsorption der Verbindungen an die Wurzeloberfläche der Tomatenpflanzen ist sehr wahrscheinlich und wird in derzeit laufenden Arbeiten am UFZ untersucht.

Im Fall der Simvastatinsäure ist zudem eine Adsorption an der Gefäßwand denkbar. Untersuchungen zur pH-abhängigen Stabilität der Simvastatinsäure und Komplexierung der Verbindung mit Metall-Kationen könnten Aufschluss über das Verhalten der Verbindung in der Nährlösung geben. Auch dies wird aktuell am UFZ in einer Weiterführung des Projektes untersucht.

Zusammenfassend konnten die drei wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit erreicht und zum Teil in entsprechenden Fachzeitschriften publiziert werden. Das Verhalten von einer Vielzahl an organischen Spurenstoffen konnte unter teilweise realen Bedingungen untersucht, eine insgesamt verbesserte Datengrundlage geschaffen und somit wichtige Beiträge zur Umweltproblematik von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Pflanzen geliefert werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- ACD/I-LAB, Advanced Chemistry Development, Inc.: Toronto, 2015; <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/index.php> (zuletzt abgerufen am 14.03.2017).
- AITKEN, M.; KLEINROCK, M.; PENNENTE, K.; LYLE, J.; NASS, D.; CASKEY, L. *Medicines Use and Spending in the U.S.: A Review of 2015 and Outlook to 2020*. IMS Institute for Healthcare Informatics: Parsippany, 2016.
- ALBANI, F.; RIVA, R.; BARUZZI, A. Carbamazepine Clinical Pharmacology: A review. *Pharmacopsychiatry* **1995** (28), 235-44.
- ALDER, L.; LÜDERITZ, S.; LINDTNER, K.; STAN, H.J. The ECHO technique - the more effective way of data evaluation in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* **2004** (1058), 67-79.
- ALFARRA, A.; KEMP-BENEDICT, E.; HÖTZL, H.; SADER, N.; SONNEVELD, B. A Framework for Wastewater Reuse in Jordan: Utilizing a Modified Wastewater Reuse Index. *Water Resour. Manag.* **2011** (25), 1153-67.
- AMERASINGHE, P.; BHARDWAJ, R.M.; SCOTT, C.; JELLA, K.; MARSHALL, F. *Urban wastewater and agricultural reuse challenges in India*. International Water Management Institute (IWMI): Colombo, 2013.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, 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), 412-31.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) *Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate - Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry - First Action 2007*. AOAC International: Rockville, 2007.
- BAHLMANN, A. *Entwicklung und Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) für die Quantifizierung von Carbamazepin in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser*. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Berlin, Dissertation 2012.
- BAHLMANN, A.; BRACK, W.; SCHNEIDER, R.J.; KRAUSS, M. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* **2014** (57), 104-14.
- BAKER, K.M.; CSETENYI, J.; FRIGERIO, A.; MORSELLI, P.L. 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide, a Metabolite of Carbamazepine isolated from Human and Rat Urine. *J. Med. Chem.* **1973** (16), 703-05.
- BARTHA, B.; HUBER, C.; HARPAINTNER, R.; SCHRÖDER, P. Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2010** (17), 1553-62.
- BAUER, J. Current treatment of epilepsies with new anticonvulsant drugs in adults. *Nervenheilkunde* **1997** (16), 66-71.
- BECK, O.; OHMAN, I.; NORDGREN, H.K. Determination of lamotrigine and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **2006** (28), 603-07.
- BERNUS, I.; DICKINSON, R.G.; HOOPER, W.D.; EADIE, M.J. Early stage autoinduction of carbamazepine metabolism in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1994** (47), 355-60.
- BIJLSMA, L.; BOIX, C.; NIESSEN, W.M.A.; IBANEZ, M.; SANCHO, J.V.; HERNANDEZ, F. Investigation of degradation products of cocaine and benzoylecgonine in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **2013** (443), 200-08.

- BLAC (Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit), *Arzneimittel in der Umwelt: Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Bericht an die 61. Umweltministerkonferenz (UMK) am 19./20. November 2003 in Hamburg*. Behörde für Umwelt und Gesundheit, Institut für Hygiene und Umwelt: Hamburg, 2003.
- BORGMAN, O.; CHEFETZ, B. Combined effects of biosolids application and irrigation with reclaimed wastewater on transport of pharmaceutical compounds in arable soils. *Water Res.* **2013** (47), 3431-43.
- BOTITSI, H.V.; GARBIS, S.D.; ECONOMOU, A.; TSIPI, D.F. Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. *Mass Spectrom. Rev.* **2011** (30), 907-39.
- BRENNER, S.; ORGEL, A.; BARNETT, L.; CRICK, F.H.C. The Theory of Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **1961** (3), 121-24.
- 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.
- BROMILOW, R.H.; CHAMBERLAIN, K. Principles Governing Uptake and Transport. In: Trapp, S. & McFarlane, J.C. (Hrsg.): *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers: Boca Raton 1995, S. 37-68.
- BROX, S.; SEIWERT, B.; HAASE, N.; KÜSTER, E.; REEMTSMA, T. Metabolism of clofibric acid in zebrafish embryos (*Danio rerio*) as determined by liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry. *Comp. Biochem. Phys. C* **2016** (185-186), 20-8.
- BUCKLAND, J.L.; COLLINS, R.F.; PULLIN, E.M. Metabolism of Bromoxynil Octanoate in Growing Wheat. *Pestic. Sci.* **1973** (4), 149-62.
- BURKEN, J.G. Uptake and Metabolism of Organic Compounds: Green-Liver Model. In: McCutcheon, S. & Schnorr, J.L. (Hrsg.): *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons. Inc.: Hoboken, 2003, S. 59-84.
- CALDERON-PRECIADO, D.; JIMENEZ-CARTAGENA, C.; PENUELA, G.; BAYONA, J.M. Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009** (394), 1319-27.
- CALDERON-PRECIADO, D.; JIMENEZ-CARTAGENA, C.; MATAMOROS, V.; BAYONA, J.M. Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Res.* **2011** (45), 221-31.
- CALISTO, V.; DOMINGUES, M.R.M.; ERNY, G.L.; ESTEVES, V.I. Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Res.* **2011** (45), 1095-104.
- CELIZ, M.D.; PEREZ, S.; BARCELO, D.; AGA, D.S. Trace Analysis of Polar Pharmaceuticals in Wastewater by LC-MS-MS: Comparison of Membrane Bioreactor and Activated Sludge Systems. *J. Chromatogr. Sci.* **2009** (47), 19-25.
- CEN (Comité Européen de Normalisation) *Pflanzliche Lebensmittel - Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC-MS und/oder LC-MS/MS nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und Reinigung mit dispersiver SPE - QuEChERS-Verfahren (EN 15662:2008)*. Europäisches Komitee für Normung: Brüssel, 2008.
- CHEFETZ, B.; MUALEM, T.; BEN-ARI, J. Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere* **2008** (73), 1335-43.
- CHEN, F.R.; HUBER, C.; MAY, R.; SCHRÖDER, P. Metabolism of oxybenzone in a hairy root culture: Perspectives for phytoremediation of a widely used sunscreen agent. *J. Hazard. Mater.* **2016** (306), 230-36.
- CHIRON, S.; MINERO, C.; VIONE, D. Photodegradation processes of the Antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* **2006** (40), 5977-83.
- CLARA, M.; STRENN, B.; KREUZINGER, N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* **2004** (38), 947-54.

- COLE, D.J. Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants. *Pestic. Sci.* **1994** (42), 209-22.
- COLEMAN, J.O.D.; BLAKE-KALFF, M.M.A.; DAVIES, T.G.E. Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **1997** (2), 144-51.
- CRAMER, G.M.; FORD, R.A. Estimation of toxic hazard - A decision tree approach. *Food Cosmet. Toxicol.* **1976** (16), 255-76.
- DAL POZZO, A.; DONZELLI, G.; RODRIQUEZ, L.; TAJANA, A. "In vitro" model for the evaluation of drug distribution and plasma protein-binding relationships. *Int. J. Pharm.* **1989** (50), 97-101.
- DAY, J.A.; SAUNDERS, E.M. Glycosidation of Chlorophenols by *Lemno minor*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004** (23), 613-20.
- DESAGER, J.P.; HORSMANS, Y. Clinical Pharmacokinetics of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* **1996** (31), 348-71.
- DETTENMAIER, E.M.; DOUCETTE, W.J.; BUGBEE, B. Chemical Hydrophobicity and Uptake by Plant Roots. *Environ. Sci. Technol.* **2009** (43), 324-29.
- DIEZ, C.; TRAAG, W.A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *J. Chromatogr. A* **2006** (1131), 11-23.
- DODGEN, L.K.; LI, J.; PARKER, D.; GAN, J.J. Uptake and accumulation of four PPCP/EDCs in two leafy vegetables. *Environ. Pollut.* **2013** (182), 150-56.
- DORAN, P.M. Application of Plant Tissue Cultures in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *Biotechnol. Bioeng.* **2009** (103), 60-76.
- DOLL, T.E.; FRIMMEL, F.H. Fate of pharmaceuticals-photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere* **2003** (52), 1757-69.
- DORAN, P.M. Application of Plant Tissue Cultures in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *Biotechnol. Bioeng.* **2009** (103), 60-76.
- DOUROUMIS, D.; BOUROPOULOS, N.; FAHR, A. Physicochemical characterization of solid dispersions of three antiepileptic drugs prepared by solvent evaporation method. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007** (59), 645-53.
- DRECHSEL, P.; SCOTT, C.A.; RASCHID-SALLY, L.; REDWOOD, M.; BAHRI, A. (Hrsg.) *Wastewater Irrigation and Health: Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries*. Earthscan: London, 2010.
- DURAN-ALVAREZ, J.C.; PRADO, B.; GONZALEZ, D.; SANCHEZ, Y.; JIMENEZ-CISNEROS, B. Environmental fate of naproxen, carbamazepine and triclosan in wastewater, surface water and wastewater irrigated soil - Results of laboratory scale experiments. *Sci. Total Environ.* **2015** (538), 350-62.
- EC (European Commission) *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015)*. Europäische Kommission: Brüssel, 2015.
- EDWARDS, V.T.; MCMINN, A.L.; WRIGHT, A.N. Sugar conjugates of pesticides and their metabolites in plants - current status. In: Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (Hrsg.): *Progress in Pesticide Biochemistry, Bd. 2*. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 1982, S. 71-125.
- EICHELBAUM, M.; KÖTHE, K.W.; HOFFMANN, F.; VONUNRUH, G.E. Use of Stable Labelled Carbamazepine to Study Its Kinetics During Chronic Carbamazepine Treatment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1982** (23), 241-44.
- EMA (European Medicines Agency) *Enrofloxacin (Extension to all food producing species) (5) (EMEA/MRL/820/02-FINAL)*. Europäische Arzneimittel-Agentur: London, 2002; [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014151.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014151.pdf) (zuletzt abgerufen am 12.03.2017).

- EMHOFFER, L.; HIMMELSBACH, M.; BUCHBERGER, W.; KLAMPFL, C.W. High-performance liquid chromatography - mass spectrometry analysis of the parent drugs and their metabolites in extracts from cress (*Lepidium sativum*) grown hydroponically in water containing four non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Chromatogr. A* **2017** (1491), 137-44.
- ENSINK, J.H.J.; MAHMOOD, T.; VAN DER HOEK, W.; RASCHID-SALLY, L.; AMERASINGHE, F.P. A nationwide assessment of wastewater use in Pakistan: an obscure activity or a vitally important one? *Water Policy* **2004** (6), 197-206.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency) *Guidelines for water reuse (EPA/600/R-12/618)*. U.S. Environmental Protection Agency: Washington, D.C., 2012.
- FAIGLE, J.W.; BRECHBÜHLER, S.; FELDMANN, K.F.; RICHTER, W.J. The biotransformation of carbamazepine. In: Birkmayer, W. (Hrsg.): *Epileptic seizures - behaviour - pain*. University Park Press: Baltimore, 1976, S. 127-40.
- FANTKE, P.; WIELAND, P.; JURASKE, R.; SHADDICK, G.; ITOIZ, E.S.; FRIEDRICH, R.; JOLLIET, O. Parameterization Models for Pesticide Exposure via Crop Consumption. *Environ. Sci. Technol.* **2012** (46), 12864-72.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) *The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rom and Earthscan: London, 2011.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) *AQUASTAT, Main Database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rom, 2016; [http://www.fao.org/nr/water/aquastat/countries\\_regions/ISR/index.stm](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/countries_regions/ISR/index.stm) (zuletzt abgerufen am 27.02.2017).
- FDA (U. S. Food and Drug Administration) *Prescribing Information Lamotrigine*. U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, 2016a; <https://www.drugs.com/pro/lamotrigine.html> (zuletzt abgerufen am 27.02.2017).
- FDA (U. S. Food and Drug Administration) *Prescribing Information Simvastatin*. U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, 2016b; <https://www.drugs.com/pro/lamotrigine.html> (zuletzt abgerufen am 27.02.2017).
- FENET, H.; MATHIEU, O.; MAHJOUR, O.; LI, Z.; HILLAIRE-BUYS, D.; CASELLAS, C.; GOMEZ, E. Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere* **2012** (88), 49-54.
- FENZ, R.; BLASCHKE, A.P.; CLARA, M.; KROIB, H.; MATTHIAS, Z.; MASCHER, D.G. Quantifizierung der Exfiltration aus undichten Kanalnetzen durch Analyse der Carbamazepin-Konzentrationen in Abwasser und Grundwasser. *KA - Abwasser, Abfall* **2005** (52), 388-98.
- FERRER, I.; THURMAN, E.M. Identification of a New Antidepressant and its Glucuronide Metabolite in Water Samples Using Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2010** (82), 8161-68.
- FERRER, I.; THURMAN, E.M. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012** (1259), 148-57.
- FREAR, D.S. Herbicide metabolism in plants-I. Purification and properties of UDP-Glucose: Arylamine N-glucosyl-transferase from soybean. *Phytochemistry* **1968** (7), 381-90.
- FRIGERIO, A.; GARATTINI, S.; BIANDRATE, P.; MORSELLI, P.L.; FANELLI, R.; PASSERINI, G. Mass Spectrometric Characterization of Carbamazepine-10,11-epoxide, a Carbamazepine Metabolite Isolated from Human Urine. *J. Pharm. Sci.* **1972** (61), 1144-47.
- FU, Q.; YE, Q.; ZHANG, J.; RICHARDS, J.; BORCHARDT, D.; GAN, J. Diclofenac in Arabidopsis cells: Rapid formation of conjugates. *Environ. Pollut.* **2017** (222), 383-92.
- GEBHARDT, W.; SCHRÖDER, H.F. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *J. Chromatogr. A* **2007** (1160), 34-43.

- GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999** (1), 55-68.
- GIELEN, G.J.H.P.; VAN DEN HEUVEL, M.R.; CLINTON, P.W.; GREENFIELD, L.G. Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land. *Chemosphere* **2009** (74), 537-42.
- GISI, U.; SCHENKER, R.; SCHULIN, R.; STADELMANN, F.X.; STICHER, H. *Bodenökologie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1997.
- GOLDSTEIN, M.; SHENKER, M.; CHEFETZ, B. Insights into the Uptake Processes of Wastewater-Borne Pharmaceuticals by Vegetables. *Environ. Sci. Technol.* **2014** (48), 5593-600.
- GROSS, J.H. *Mass Spectrometry*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2004.
- GROSSBERGER, A.; HADAR, Y.; BORCH, T.; CHEFETZ, B. Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environ. Pollut.* **2014** (185), 168-77.
- Hajslova, J.; Zrostlikova, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *J. Chromatogr. A* **2003** (1000), 181-97.
- HARMS, H.; LANGEBARTELS, C. Standardized plant-cell suspension test systems for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic-fate of xenobiotics. *Plant Sci.* **1986** (45), 157-65.
- HEBERER, T.; VERSTRAETEN, I.M.; MEYER, M.T.; MECHLINSKI, A.; REDDERSEN, K. Occurrence and fate of pharmaceuticals during bank filtration – preliminary results from investigations in Germany and the United States. *Water Resour. Update* **2001** (120), 4-17.
- HERKLOTZ, P.A.; GURUNG, P.; HEUVEL, B.V.; KINNEY, C.A. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* **2010** (78), 1416-21.
- HOJRUP, M. *Fate Modeling of Human Pharmaceuticals excreted to Wastewater*. Technical University of Denmark, Department of Environmental Engineering, Kongens Lyngby, Masterarbeit 2014.
- HÖRTENSTEINER, S.; VOGT, E.; HAGENBUCH, B.; MEIER, P.J.; AMRHEIN, N.; MARTINOI, E. Direct Energization of Bile Acid Transport into Plant Vacuoles. *J. Biol. Chem.* **1993** (268), 18446-49.
- HUBER, C.; BARTHA, B.; HARPAINNER, 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), 206-13.
- HUBER, C.; BARTHA, B.; SCHRÖDER, P. Metabolism of diclofenac in plants - Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *J. Hazard. Mater.* **2012** (243), 250-56.
- HÜBNER, U.; SEIWER, B.; REEMTSMA, T.; JEKEL, M. Ozonation products of carbamazepine and their removal from secondary effluents by soil aquifer treatment - Indications from column experiments. *Water Res.* **2014** (49), 34-43.
- HÜCKELHOVEN, R.; SCHUPHAN, I.; THIEDE, B.; SCHMIDT, B. Biotransformation of Pyrene by Cell Cultures of Soybean (*Glycine max L.*), Wheat (*Triticum aestivum L.*), Jimsonweed (*Datura stramonium L.*), and Purple Foxglove (*Digitalis purpurea L.*). *J. Agric. Food Chem.* **1997** (45), 263-69.
- HURTADO, C.; TRAPP, S.; BAYONA, J.M. Inverse modeling of the biodegradation of emerging organic contaminants in the soil-plant system. *Chemosphere* **2016** (156), 236-44.
- HYLAND, K.C.; BLAINE, A.C.; DICKENSON, E.R.; HIGGINS, C.P. Accumulation of contaminants of emerging concern in food crops-part 1: Edible strawberries and lettuce grown in reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.* **2015** (34), 2213-21.
- ISO (International Organization for Standardization) *Guidelines for treated wastewater use for irrigation projects - Part 3: Components of a reuse project for irrigation (ISO 16075-1-3:2015)*. International Organization for Standardization: Genf, 2015.

- JACOBSEN, R.E.; FANTKE, P.; TRAPP, S. Analysing half-lives for pesticide dissipation in plants. *SAR QSAR Environ. Res.* **2015** (26), 325-42.
- JAVOT, H.; MAUREL, C. The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Ann. Bot.* **2002** (90), 301-13.
- JEKEL, M.; DOTT, W.; BERGMANN, A.; DUNNBIER, U.; GNIRSS, R.; HAIST-GULDE, B.; HAMSCHER, G.; LETZEL, M., *et al.* Selection of organic process and source indicator substances for the anthropogenically influenced water cycle. *Chemosphere* **2015** (125), 155-67.
- JEMAL, M.; OUYANG, Z.; POWELL, M.L. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000** (23), 323-40.
- JIMENEZ, B. Irrigation in Developing Countries Using Wastewater. *IRES* **2006** (6), 229-50.
- JIMENEZ, B.; ASANO, T. *Water Reuse: An International Survey of Current Practice, Issues and Needs*. International Water Association (IWA): London, 2008.
- JISM (Jordanian Institute for Standards and Metrology) *Jordanian Standard No. 893/2006*. Jordanian Institute for Standards and Metrology: Amman, 2006.
- JONES-LEPP, T.L.; SANCHEZ, C.A.; MOY, T.; KAZEMI, R. Method Development and Application To Determine Potential Plant Uptake of Antibiotics and Other Drugs in Irrigated Crop Production Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2010** (58), 11568-73.
- JOSS, A.; KELLER, E.; ALDER, A.C.; GÖBEL, A.; MCARDELL, C.S.; TERNES, T.; SIEGRIST, H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* **2005** (39), 3139-52.
- KAHLE, M.; BUERGE, I.J.; MÜLLER, M.D.; POIGER, T. Hydrophilic anthropogenic markers for quantification of wastewater contamination in ground- and surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **2009** (28), 2528-36.
- KEEN, O.S.; FERRER, I.; THURMAN, E.M.; LINDEN, K.G. Degradation pathways of lamotrigine under advanced treatment by direct UV photolysis, hydroxyl radicals, and ozone. *Chemosphere* **2014** (117), 316-23.
- KISLEV, Y. *The water economy of Israel (Policy Paper 2011.15)*. Taub Center for Social Policy Studies in Israel: Jerusalem, 2011.
- KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2008** (626), 10-20.
- KOMOBA, 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*. Lewis Publishers: Boca Raton 1995, S. 69-103.
- KRAUSS, M.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010** (397), 943-51.
- KROES, R.; GALLI, C.; MUNRO, I.; SCHILTER, B.; TRAN, L.A.; WALKER, R.; WURTZEN, G. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food Chem. Toxicol.* **2000** (38), 255-312.
- KROES, R.; RENWICK, A.G.; CHEESEMAN, M.; KLEINER, J.; MANGELSDORF, I.; PIERSMA, A.; SCHILTER, B.; SCHLATTER, J., *et al.* 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.
- KÜMMERER, K. Neuartige Spurenstoffe im Wasser. *HyWa* **2010** (54), 349-59.
- Lai, T. V. *Perspectives of peri-urban vegetable production in Hanoi*. Background paper prepared for the Action Planning Workshop for the CGIAR Strategic Initiative for Urban and Peri-Urban Agriculture (SIUPA), Hanoi, 6-9 June, convened by the International Potato Centre, Lima, 2000.
- LANGFORD, K.; THOMAS, K.V. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *J. Environ. Monit.* **2011** (13), 416-21.

- LANGFORD, K.H.; THOMAS, K.V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* **2009** (35), 766-70.
- LECLERCQ, M.; MATHIEU, O.; GOMEZ, E.; CASELLAS, C.; FENET, H.; HILLAIRE-BUYS, D. Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2009** (56), 408-15.
- LEFEVRE, G.H.; MÜLLER, C.E.; LO, R.J.X.; LUTHY, R.G.; SATTELY, E.S. Rapid Phytotransformation of Benzotriazole Generates Synthetic Tryptophan and Auxin Analogs in Arabidopsis. *Environ. Sci. Technol.* **2015** (49), 10959-68.
- LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2007** (90), 485-520.
- LERTRATANANGKON, K.; HORNING, M.G. Metabolism of Carbamazepine. *Drug Metab. Dispos.* **1982** (10), 1-10.
- 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.
- LIEBIG, M.; MOLTMANN, J.F.; KNACKER, T. Evaluation of Measured and Predicted Environmental Concentrations of Selected Human Pharmaceuticals and Personal Care Products. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2006** (13), 110-19.
- LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997** (23), 3-25.
- LOFTSSON, T.; HREINSDOTTIR, D.; MASSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* **2005** (302), 18-28.
- LOOS, R.; GAWLIK, B.M.; LOCORO, G.; RIMAVICIUTE, E.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* **2009** (157), 561-68.
- LOOS, R.; LOCORO, G.; COMERO, S.; CONTINI, S.; SCHWESIG, D.; WERRES, F.; BALSAA, P.; GANS, O., *et al.* Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* **2010** (44), 4115-26.
- LU, W.; UETRECHT, J.P. Possible Bioactivation Pathways of Lamotrigine. *Drug Metab. Dispos.* **2007** (35), 1050-56.
- 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), 10797-804.
- 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. *J. Agric. Food Chem.* **2014** (62), 1001-9.
- MAENG, S.K.; SHARMA, S.K.; ABEL, C.D.; MAGIC-KNEZEV, A.; AMY, G.L. Role of biodegradation in the removal of pharmaceutically active compounds with different bulk organic matter characteristics through managed aquifer recharge: Batch and column studies. *Water Res.* **2011** (45), 4722-36.
- MALCHI, T.; MAOR, Y.; TADMOR, G.; SHENKER, M.; CHEFETZ, B. Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environ. Sci. Technol.* **2014** (48), 9325-33.
- MARTINOIA, E.; GRILL, E.; TOMMASINI, R.; KREUZ, K.; AMRHEIN, N. ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **1993** (364), 247-49.
- MATAMOROS, V.; DUHEC, A.; ALBAIGES, J.; BAYONA, J.M. Photodegradation of Carbamazepine, Ibuprofen, Ketoprofen and 17 alpha-Ethinylestradiol in Fresh and Seawater. *Water Air Soil Pollut.* **2009** (196), 161-68.

- MATAMOROS, V.; CALDERON-PRECIADO, D.; DOMINGUEZ, C.; BAYONA, J.M. Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Anal. Chim. Acta* **2012** (722), 8-20.
- MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003** (75), 3019-30.
- MCCORRY, D.; CHADWICK, D.; MARSON, A. Current drug treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol.* **2004** (3), 729-35.
- MIAO, X.S.; METCALFE, C.D. Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003** (75), 3731-38.
- MIAO, X.S.; YANG, J.J.; METCALFE, C.D. Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* **2005** (39), 7469-75.
- MOEP (Ministry of Environmental Protection) *Effluent Quality Standards and Rules for Sewage Treatment*. Ministry of Environmental Protection: Jerusalem, 2010.
- MUNRO, I.C. Safety assessment procedures for indirect food-additives - An overview. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **1990** (12), 2-12.
- MWI (Ministry of Water and Irrigation) *Water for Life - Jordan's Water Strategy, 2008-2022*. Ministry of Water and Irrigation: Amman, 2009.
- MWI (Ministry of Water and Irrigation) *National Water Strategy of Jordan, 2016-2025*. Ministry of Water and Irrigation: Amman, 2016.
- NAVON, R.; HERNANDEZ-RUIZ, S.; CHOROVER, J.; CHEFETZ, B. Interactions of Carbamazepine in Soil: Effects of Dissolved Organic Matter. *J. Environ. Qual.* **2011** (40), 942-48.
- NWQMS *National Water Quality Management Strategy - Australian Guidelines for Water Recycling: Managing Health and Environmental Risks (Phase 1)*. Natural Resource Management Ministerial Council, Environment Protection and Heritage Council, Australian Health Ministers' Conference: Canberra, 2006.
- ÖLLERS, S.; SINGER, H.P.; FÄSSLER, P.; MÜLLER, S.R. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *J. Chromatogr. A* **2001** (911), 225-34.
- OTTMAR, K.J.; COLOSI, L.M.; SMITH, J.A. Sorption of Statin Pharmaceuticals to Wastewater-Treatment Biosolids, Terrestrial Soils, and Freshwater Sediment. *J. Environ. Eng.* **2010** (136), 256-64.
- OTTMAR, K.J.; COLOSI, L.M.; SMITH, J.A. Fate and transport of atorvastatin and simvastatin drugs during conventional wastewater treatment. *Chemosphere* **2012** (88), 1184-89.
- PAN, M.; WONG, C.K.C.; CHU, L.M. Distribution of Antibiotics in Wastewater-Irrigated Soils and Their Accumulation in Vegetable Crops in the Pearl River Delta, Southern China. *J. Agric. Food Chem.* **2014** (62), 11062-69.
- PATLEWICZ, G.; JELIAZKOVA, N.; SAFFORD, R.J.; WORTH, A.P.; ALEKSIEV, B. An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. *SAR QSAR Environ. Res.* **2008** (19), 495-524.
- PAZ, A.; TADMOR, G.; MALCHI, T.; BLOTEVOGEL, J.; BORCH, T.; POLUBESOVA, T.; CHEFETZ, B. Fate of carbamazepine, its metabolites, and lamotrigine in soils irrigated with reclaimed wastewater: Sorption, leaching and plant uptake. *Chemosphere* **2016** (160), 22-29.
- PRASSE, C.; WAGNER, M.; SCHULZ, R.; TERNES, T.A. Biotransformation of the Antiviral Drugs Acyclovir and Penciclovir in Activated Sludge Treatment. *Environ. Sci. Technol.* **2011** (45), 2761-69.
- RASCHID-SALLY, L.; CARR, R.; BUECHLER, S. Managing wastewater agriculture to improve livelihoods and environmental quality in poor countries. *Irrig. and Drain.* **2005** (54), 11-22.

- REEMTSMA, T.; QUINTANA, J.B. *Organic Pollutants in the Water Cycle: Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim 2006, S. 33.
- REEMTSMA, T.; WEISS, S.; MUELLER, J.; PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELO, D.; VENTURA, F.; KNEPPER, T.P. Polar Pollutants Entry into the Water Cycle by Municipal Wastewater: A European Perspective. *Environ. Sci. Technol.* **2006** (40), 5451-58.
- REEMTSMA, T.; ALDER, L.; BANASIAK, U. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013** (1271), 95-104.
- REITZ, M.U.; LAMSHOEFT, M.; MCCALL, S.; RESSELER, H.; SUR, R.; SCHRIEVER, C.; WEBB, S.; ZILLGENS, B. *Effect of plant species and chemical substance properties on plant uptake*. Poster presented at the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 26<sup>th</sup> Annual Meeting, Nantes, 2016.
- REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.* **2015** (13), 980-1010.
- RICHTER, W.J.; KRIEMLER, P.; FAIGLE, J.W. Newer aspects of the biotransformation of carbamazepine: structural characterization of highly polar metabolites. In: Rigerio, A. (Hrsg.): *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Plenum Press: New York 1978, S. 1-14.
- SACHER, F.; EHMANN, M.; GABRIEL, S.; GRAF, C.; BRAUCH, H.J. Pharmaceutical residues in the river Rhine - results of a one-decade monitoring programme. *J. Environ. Monit.* **2008** (10), 664-70.
- SANDERMANN JR., H.; DIESPERGER, H.; SCHEEL, D. Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. In: Barz, W., Reinhard, E. & Zenk, M.H. (Hrsg.): *Plant tissue culture and its bio-technological application*. Springer-Verlag: Berlin 1977, S. 178-96.
- SANDERMANN JR., H. Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen: Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus. *Naturwissenschaften* **1987** (74), 573.
- SANDERMANN JR., H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* **1992** (17), 82-84.
- SANDERMANN JR., H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* **1994** (4), 225-41.
- SANDERMANN JR., H.; HAAS, M.; MESSNER, B.; PFLUGMACHER, S.; SCHRÖDER, P.; WETZEL, A. The Role of glucosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity. In: Hatzios, K.K. (Hrsg.): *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht 1997, S. 211-31.
- SANDERMANN JR., H.; SCHEEL, D.; v. D. TRENCK, T. Use of Plant Cell Cultures to Study the Metabolism of Environmental Chemicals. *Ecotox. Environ. Safe.* **1984** (8), 167-82.
- SANZ, L.A.; GAWLIK, B.M. *Water Reuse in Europe - Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation*. Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2014; <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC92582> (zuletzt abgerufen am 12.03.2017).
- SARACINO, M.A.; BUGAMELLI, F.; CONTI, M.; AMORE, M.; RAGGI, M.A. Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma. *J. Sep. Sci.* **2007** (30), 2249-55.
- SATO, T.; QADIR, M.; YAMAMOTO, S.; ENDO, T.; ZAHOR, A. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agr. Water Manage.* **2013** (130), 1-13.
- SCHMIDT, B. Non-extractable residues of pesticides and xenobiotics in plants - A review. *Recent Res. Devel. Agricultural & Food Chem.* **1999** (3), 329-54.
- SCHMITT, R.; KAUL, J.; v. D. TRENCK, T.; SCHALLER, E.  $\beta$ -D-Glucosyl and O-malonyl- $\beta$ -D-glucosyl Conjugates of Pentachlorophenol in Soybean and Wheat: Identification and Enzymatic Synthesis. *Pest. Biochem. Physiol.* **1985** (24), 77-85.
- SCHMITT, R.; SANDERMANN JR., H. Specific Localization of  $\beta$ -D-Glucoside Conjugates of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Soybean Vacuoles. *Z. Naturforsch.* **1982** (37c), 772-77.

- SCHOPFER, P.; BRENNICKE, A. *Pflanzenphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag: München, 2006.
- SCHRAMM, C.; GANS, O.; UHL, M.; GRATH, J.; SCHARF, S.; ZIERITZ, I.; KRALIK, M.; SCHEIDLEDER, A., *et al.* *Carbamazepin und Koffein - Potenzielle Screeningparameter für Verunreinigungen des Grundwassers durch kommunales Abwasser?* Report REP-0061, Umweltbundesamt: Wien, 2006.
- SCHWABE, U.; PAFFRATH, D. *Arzneiverordnungs-Report 2010*. Springer Medizin Verlag: Heidelberg, 2011.
- SCHWITZGUÉBEL, J.P.; VANEK, T. Some Fundamental Advances for Xenobiotic Chemicals. In: McCutcheon, S. & Schnorr, J.L. (Hrsg.): *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons. Inc.: Hoboken 2003, S. 123-57.
- SCHYMANSKI, E.L.; JEON, J.; GULDE, R.; FENNER, K.; RUFF, M.; SINGER, H.P.; HOLLENDER, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014** (48), 2097-98.
- SCHYMANSKI, E.L.; SINGER, H.P.; SLOBODNIK, J.; IPOLYI, I.M.; OSWALD, P.; KRAUSS, M.; SCHULZE, T.; HAGLUND, P., *et al.* Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015** (407), 6237-55.
- SEDER, N.; ABDEL-JABBAR, S. *Safe Use of Treated Wastewater in Agriculture: Jordan Case Study*. Arab Countries Water Utilities Association (ACWUA): Amman, 2011.
- SEIS, W.; LESJEAN, B.; MAABEN, S.; BALLA, D.; HOCHSTRAT, R.; DÜPPENBECKER, B. *Rahmenbedingungen für die umweltgerechte Nutzung von behandeltem Abwasser zur landwirtschaftlichen Bewässerung*. Umweltbundesamt: Dessau-Roßlau, 2016.
- SEIWERT, B.; GOLAN-ROZEN, N.; WEIDAUER, C.; RIEMENSCHNEIDER, C.; CHEFETZ, B.; HADAR, Y.; REEMTSMA, T. Electrochemistry Combined with LC-HRMS: Elucidating Transformation Products of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine Generated by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Sci. Technol.* **2015** (49), 12342-50.
- 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), 905-10.
- SIDHU, J.; JOB, S.; BULLMAN, J.; FRANCIS, E.; ABBOTT, R.; ASCHER, J.; THEIS, J.G.W. Pharmacokinetics and tolerability of lamotrigine and olanzapine coadministered to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2006** (61), 420-26.
- STAHNKE, H.; REEMTSMA, T.; ALDER, L. Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2009** (81), 2185-92.
- STEVENS, J.; JONES, D. *QuEChERS 101: The Basics and Beyond*. Agilent Technologies, 2010;  
[https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/QuEChERS\\_101\\_10\\_11\\_01.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/QuEChERS_101_10_11_01.pdf) (zuletzt abgerufen am 12.03.2017).
- STÜBER, M.; REEMTSMA, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004** (378), 910-16.
- SUN, J.Q.; WU, X.Q.; GAN, J. Uptake and Metabolism of Phthalate Esters by Edible Plants. *Environ. Sci. Technol.* **2015** (49), 8471-78.
- TANOUE, R.; SATO, Y.; MOTOYAMA, M.; NAKAGAWA, S.; SHINOHARA, R.; NOMIYAMA, K. Plant Uptake of Pharmaceutical Chemicals Detected in Recycled Organic Manure and Reclaimed Wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2012** (60), 10203-11.
- TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **1998** (32), 3245-60.
- TERNES, T.A.; HERRMANN, N.; BONERZ, M.; KNACKER, T.; SIEGRIST, H.; JOSS, A. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* **2004** (38), 4075-84.

- TRAPP, S.; MATTHIES, M. Generic One-Compartment Model for Uptake of Organic Chemicals by Foliar Vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **1995** (29), 2333-38.
- TRAPP, S. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Manag. Sci.* **2000** (56), 767-78.
- TRAPP, S. Dynamic root uptake model for neutral lipophilic organics. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002** (21), 203-06.
- TRAPP, S. Plant Uptake and Transport Models for Neutral and Ionic Chemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2004** (11), 33-39.
- TRAPP, S. Fruit Tree model for uptake of organic compounds from soil and air. *SAR QSAR Environ. Res.* **2007** (18), 367-87.
- TRAPP, S. Bioaccumulation of Polar and Ionizable Compounds in Plants. In: Devillers, J. (Hrsg.): *Ecotoxicology Modeling*. Springer: New York 2009, S. 299-353.
- TRAPP, S. *Uptake of Organic Chemicals into Plants: Models, equations and exercises*. Teaching material summer course DTU, Sixth edition, persönliche Handreichung, 2015.
- TREJO-TÉLLEZ, L.I.; GÓMEZ-MERINO, F.C. Nutrient Solutions for Hydroponic Systems. In: Asao, T. (Hrsg.): *Hydroponics - A Standard Methodology for Plant Biological Researchers*. InTech: Rijeka 2012, S. 1-18.
- TRIESCH, N. *Identifizierung von Transformationsprodukten anthropogener Spurenstoffe in hydroponischen Kulturen mittels LC-HR-MS*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie, Lebensmittelchemie und Umweltchemie, Halle, Diplomarbeit 2016.
- TSINMAN, K.; AVDEEF, A.; TSINMAN, O.; VOLOBOY, D. Powder Dissolution Method for Estimating Rotating Disk Intrinsic Dissolution Rates of Low Solubility Drugs. *Pharm. Res.* **2009** (26), 2093-100.
- ULIMAT, A.A. *Wastewater Production, Treatment, and Use in Jordan to 2<sup>nd</sup> Regional Workshop on 'Safe Use of Wastewater in Agriculture', 16–18 May 2012, New Delhi*, Amman, 2012; <http://www.ais.unwater.org/ais/mod/page/view.php?id=62> (zuletzt abgerufen am 12.03.2017).
- VAJDA, F.J.E.; DODD, S.; HORGAN, D. Lamotrigine in epilepsy, pregnancy and psychiatry - a drug for all seasons? *J. Clin. Neurosci.* **2013** (20), 13-16.
- VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2006** (40), 7312-20.
- VAN DER HOEK, W.; HASSAN, M.; ENSINK, J.; FEENSTRA, S.; RASCHID-SALLY, L.; MUNIR, S. *Urban wastewater: A valuable resource for agriculture. A Case Study from Haroonabad, Pakistan*. Research Report 63, International Water Management Institute (IWMI): Colombo, 2002.
- VICKERS, S.; DUNCAN, C.A.; CHEN, I.W.; ROSEGAY, A.; DUGGAN, D.E. Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug. *Drug Metab. Dispos.* **1990a** (18), 138-45.
- VICKERS, S.; DUNCAN, C.A.; VYAS, K.P.; KARI, P.H.; ARISON, B.; PRAKASH, S.R.; RAMJIT, H.G.; PITZENBERGER, S.M., *et al.* In vitro and in vivo biotransformation of simvastatin, an inhibitor of HMG COA reductase. *Drug Metab. Dispos.* **1990b** (18), 476-83.
- VIENO, N.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* **2007** (41), 1001-12.
- WETZEL, A.; SANDERMANN JR., H. Plant Biochemistry of Xenobiotics - Isolation and Characterization of a Soybean O-Glucosyltransferase of DDT Metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994** (314), 323-28.
- WHO (World Health Organization) *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater - Volume II: Wastewater use in agriculture*. World Health Organization: Genf, 2006.
- WIDO (Wissenschaftliches Institut der AOK) *Anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifikation mit Tagesdosen - Amtliche Fassung des ATC-Index mit DDD-*

- Angaben für Deutschland im Jahre 2016*. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information: Köln, 2016.
- WIEGEL, S.; AULINGER, A.; BROCKMEYER, R.; HARMS, H.; LÖFFLER, J.; REINCKE, H.; SCHMIDT, R.; STACHEL, B., *et al.* Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* **2004** (57), 107-26.
- WILD, E.; DENT, J.; THOMAS, G.O.; JONES, K.C. Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots. *Environ. Sci. Technol.* **2005** (39), 3695-702.
- WRITER, J.H.; FERRER, I.; BARBER, L.B.; THURMAN, E.M. Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Sci. Total Environ.* **2013** (461), 519-27.
- WU, X.; CONKLE, J.L.; ERNST, F.; GAN, J. Treated Wastewater Irrigation: Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Common Vegetables under Field Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2014** (48), 11286-93.
- WU, X.; FU, Q.; GAN, J. Metabolism of pharmaceutical and personal care products by carrot cell cultures. *Environ. Pollut.* **2016** (211), 141-7.
- WU, X.Q.; CONKLE, J.L.; GAN, J. Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *J. Chromatogr. A* **2012** (1254), 78-86.
- WU, X.Q.; ERNST, F.; CONKLE, J.L.; GAN, J. Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables. *Environ. Int.* **2013** (60), 15-22.
- XIAN, F.; HENDRICKSON, C.L.; MARSHALL, A.G. High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012** (84), 708-19.
- XIE, J.; LIEBENTHAL, A.; WARFORD, J.J.; DIXON, J.A.; WANG, M.; GAO, S.; WANG, S.; JIAN, Y., *et al.* *Addressing China's Water Scarcity: Recommendations for Selected Water Resource Management Issues*. The World Bank: Washington, D.C., 2009.
- YOUNG, R.B.; CHEFETZ, B.; LIU, A.; DESYATERIK, Y.; BORCH, T. Direct photodegradation of lamotrigine (an antiepileptic) in simulated sunlight - pH influenced rates and products. *Environ. Sci.: Process Impacts* **2014** (16), 848-57.
- YU, Y.; LIU, Y.; WU, L.S. Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013** (20), 4261-67.
- ZEMANN, M.; WOLF, L.; PÖSCHKO, A.; SCHMIDT, N.; SAWARIEH, A.; SEDER, N.; TIEHM, A.; HÖTZL, H., *et al.* Sources and processes affecting the spatio-temporal distribution of pharmaceuticals and X-ray contrast media in the water resources of the Lower Jordan Valley, Jordan. *Sci. Total Environ.* **2014** (488-489C), 100-14.
- ZHANG, J.; RODILA, R.; GAGE, E.; HAUTMAN, M.; FAN, L.; KING, L.L.; WU, H.; EL-SHOURBAGY, T.A. High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2010** (661), 167-72.
- ZHANG, Y.; GEIßEN, S.-U.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* **2008** (73), 1151-61.
- ZHAO, J.J.; XIE, I.H.; YANG, A.Y.; ROADCAP, B.A.; ROGERS, J.D. Quantitation of simvastatin and its beta-hydroxy acid in human plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000** (35), 1133-43.
- ZONJA, B.; PEREZ, S.; BARCELO, D. Human Metabolite Lamotrigine-N2-glucuronide Is the Principal Source of Lamotrigine-Derived Compounds in Wastewater Treatment Plants and Surface Water. *Environ. Sci. Technol.* **2015**.
- ZUEHLKE, S.; DUENNBIEER, U.; HEBERER, T. Determination of Polar Drug Residues in Sewage and Surface Water Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2004** (76), 6548-54.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1:** Die Top-15 Länder, welche weltweit den höchsten Anteil an landwirtschaftlich genutzter Fläche mit behandeltem bzw. unbehandeltem Abwasser bewässern (berücksichtigt wurden alle Länder mit verfügbaren Daten ab dem Jahr 2004; aktualisiert und modifiziert nach JIMENEZ und ASANO 2008). .....4
- Abbildung 2-2:** Transferpfade von organischen Spurenstoffen bei der landwirtschaftlichen Bewässerung mit behandeltem Abwasser (blau hinterlegt: der in der vorliegenden Arbeit betrachtete Pfad).....8
- Abbildung 2-3:** Transportprozesse von Wasser und gelösten Stoffen in Pflanzen. Ausschnitt: vereinfachte Darstellung eines Wurzelquerschnitts mit den Transportwegen des Wassers und den darin gelösten Stoffen von der Wurzeloberfläche zu den Xylemgefäßen (modifiziert nach SCHOPFER und BRENNICKE 2006, TRAPP 2009). .....10
- Abbildung 2-4:** Kompartimente, pH-Werte und Ladungen in und um Pflanzenzellen, sowie Vorhersage der interzellularen Lokalisation von ionischen Verbindungen (nach TRAPP 2004). .....13
- Abbildung 2-5:** Hauptabbauweg von Carbamazepin im menschlichen Körper.....24
- Abbildung 2-6:** Strukturformel von Lamotrigin .....27
- Abbildung 2-7:** *In vivo* Reaktion von Simvastatin (links) zur Simvastatinsäure (rechts). .28
- Abbildung 2-8:** Schematische Darstellung unterschiedlicher Vorgehensweisen für den Nachweis und die Identifizierung unbekannter Verbindungen mittels LC-HRMS (modifiziert nach KRAUSS *et al.* 2010, SCHYMANSKI *et al.* 2014). .....35
- Abbildung 4-1:** Gegenüberstellung der QuEChERS-Methode nach ANASTASSIADES *et al.* 2003 und der in dieser Arbeit entwickelten Fest-Flüssig-Extraktion (SLE-Methode) zur Probenvorbereitung von Pflanzenproben.....41
- Abbildung 4-2:** Analytgehalte von Lamotrigin und Simvastatinsäure zum Erntezeitpunkt in den Nährlösungen und Pflanzenorganen von Tomaten, welche unter hydroponischen Bedingungen kultiviert und gegen insgesamt 1500  $\mu\text{g}$  Lamotrigin bzw. 750  $\mu\text{g}$  Simvastatinsäure pro Pflanze (je  $n = 3$ ) exponiert wurden. ....56
- Abbildung 4-3:** Strukturvorschläge für die in den Wurzeln der hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen identifizierten Lamotrigin-Metaboliten. ....58
- Abbildung 4-4:** Molekülionenspektrum (A), Fragmentionenspektrum (B) und Strukturvorschlag des  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions zur Strukturaufklärung der Lamotrigin-Glycosylamin-Metaboliten. Aufgenommen mittels UPLC-QTOF-MS im Positiv-Modus bei niedriger Kollisionsenergie (A, CE = 6 eV) bzw. hoher Kollisionsenergie (B, CE = 15-35 eV). .....59

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2-1:</b> Übersicht von Studien zur Untersuchung der Aufnahme und Verteilung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen (Schwerpunkt: Übertragung durch das Bewässerungswasser).....	16
<b>Tabelle 2-2:</b> Zusammenstellung von Studien zum Metabolismus von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen (ausgenommen Pestizide) in Pflanzen. ....	21
<b>Tabelle 2-3:</b> Vor- und Nachteile verschiedener Kultivierungssysteme zur Untersuchung der Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von organischen Spurenstoffen in Pflanzen.....	23
<b>Tabelle 4-1:</b> Absolute Wiederfindungen (RA), Extraktionswiederfindungen (RE), relative Standardabweichungen (RSA, n = 3), Matrixeffekte (ME) sowie Nachweis (LOD)- und Bestimmungsgrenzen (LOQ) für die Bestimmung von Simvastatinsäure in Tomatenpflanzen. ....	55
<b>Tabelle 4-2:</b> Mittels LC-HRMS detektierte und vorläufig identifizierte Lamotrigin-Metaboliten in den Wurzeln von hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen. ....	58

## Anhang

### A.1 Physikochemische Eigenschaften von Carbamazepin, Lamotrigin und Simvastatinsäure

	Carbamazepin	Lamotrigin	Simvastatinsäure
Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>
Molgewicht [g/mol]	236,3	256,1	436,6
pK <sub>a</sub>	-	5,4 <sup>c</sup> (Base)	4,3 <sup>c</sup> (Säure)
log K <sub>ow</sub>	2,45 <sup>a</sup>	2,12 <sup>c</sup>	4,36 <sup>c</sup>
log D (pH 6)	2,45	2,24 <sup>c</sup>	2,69 <sup>c</sup>
Wasserlöslichkeit	130 - 260 mg/L <sup>b</sup>	170 mg/L <sup>d</sup>	241 mg/L (pH 6) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> DAL POZZO *et al.* 1989, <sup>b</sup> LOFTSSON *et al.* 2005, DOUROUMIS *et al.* 2007, TSINMAN *et al.* 2009, <sup>c</sup> berechnet durch ACD/I-LAB 2015, <sup>d</sup> FDA 2016b

## A.2 Ergänzende Daten zu den hydroponischen Experimenten

**Tabelle A-1:** Übersicht der in dieser Arbeit durchgeführten hydroponischen Experimente.

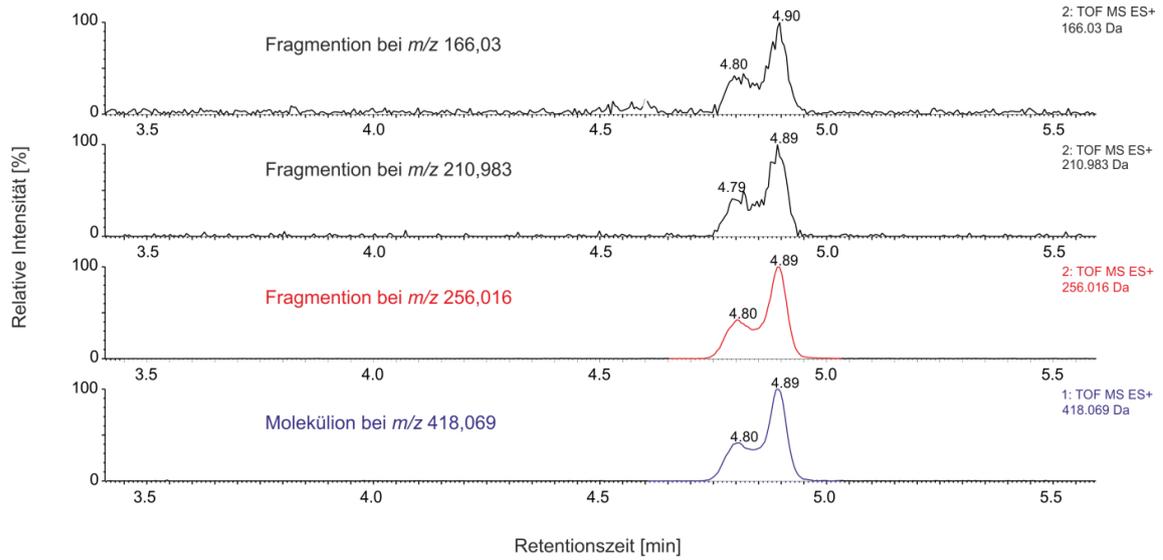
	<b>Carbamazepin</b>	<b>EP-CBZ</b>	<b>Lamotrigin</b>	<b>Simvastatin- säure</b>
Tomatensorte	Ailsa Crag	Ailsa Crag	Komeet	Komeet
Replikate	2	2	3	3
Bewässerung	täglich 5 L Nährlösung (pH ~5,6)			
1. Exposition (Datum)	500 µg/L (17.06.2015)	-	100 µg/L (27.07.2015)	50 µg/L (27.07.2015)
2. Exposition (Datum)	500 µg/L (06.07.2015)	-	100 µg/L (17.08.2015)	50 µg/L (17.08.2015)
3. Exposition (Datum)	500 µg/L (20.07.2015)	300 µg/L (20.07.2015)	100 µg/L (05.10.2015)	50 µg/L (05.10.2015)
Ernte	22.07.2015	22.07.2015	07.10.2015	07.10.2015
Σ Expositionszeit [d]	35	2	72	72
Σ dotierte Menge [µg]	7500	1500	1500	750
Aufnahmemenge in Pflanzen zum Erntezeitpunkt	81,4 ± 0,6%	n. u.	2,7 ± 1,3%	0,6 ± 0,5%
<b>Wiederfindungen in den Nährlösungen (30 min nach der Exposition):</b>				
1. Exposition	56,2 ± 13%	n. u.	69,6 ± 0,5%	0,9 ± 0,3%
2. Exposition	n. u.	n. u.	42,1 ± 6,5%	3,7 ± 2,5%
3. Exposition	n. u.	n. u.	41,5 ± 7,3%	4,9 ± 2,3%

n. u. = nicht untersucht

**Tabelle A-2:** Pflanzgefäße-Kontrollexperimente ohne Pflanzen.

	<b>Carbamazepin</b>	<b>Lamotrigin</b>	<b>Simvastatinsäure</b>
Gefäßmaterial	Plastik	Plastik	Plastik
Nährlösung (pH ~5,6)	5 L	5 L	5 L
Exposition	500 µg/L	100 µg/L	50 µg/L
Expositionsdauer (min)	30	30	30
Wiederfindung (n = 2)	98 ± 1%	108 ± 0,5%	58 ± 16%

## Anhang



**Abbildung A-1:** Extrahierte Ionenchromatogramme (EIC) der Lamotrigin-Glucose-Konjugate (Lamotrigin-Glycosylamine) zum Vergleich des Elutionsprofils der detektierten Fragmentationen mit dem Molekülion. Aufgenommen mittels UPLC-QTOF-MS im Positiv-Modus und niedriger Kollisionsenergie (Molekülion) bzw. hoher Kollisionsenergie (Fragmentationen).

# Lebenslauf

## □ Persönliche Daten

Name: Christina Riemenschneider  
Geburtsdatum: 13. Juni 1988  
Geburtsort: Fritzlar

## □ Wissenschaftlicher Werdegang

seit 12/2016 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
*Leibniz-Institut für Troposphärenforschung e.V. (TROPOS) –  
Abteilung Chemie der Atmosphäre, Leipzig*

12/2013 - 02/2017 **Promotionsstudium**  
*Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Department  
Analytik, Leipzig*

11/2012 - 10/2013 **2. Staatsexamen (berufspraktisches Jahr für  
Lebensmittelchemiker/-innen)**  
*Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL), Kassel*

## □ Schulische Ausbildung und Studium

10/2010 - 09/2012 **Studium der Lebensmittelchemie (Master)**  
*Justus-Liebig-Universität, Gießen*

- Titel der Masterarbeit: „Analyse von Colistin in Fermenterproben“, durchgeführt im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL), Kassel

10/2007 - 09/2010 **Studium der Lebensmittelchemie (Bachelor)**  
*Justus-Liebig-Universität, Gießen*

- Titel der Bachelorarbeit: „Ionenchromatographische Untersuchungen des Nährstoffbedarfs von submers kultiviertem *Pleurotus sapidus*“

1998 - 2007 **Abitur**  
*Theodor-Heuss-Gymnasium, Homberg/Efze*

1994 - 1998 **Grundschule**  
*Berlin-Tiergarten-Schule, Remsfeld*

Kurzfassung der wissenschaftlichen Ergebnisse  
zur Dissertation

**Wiederverwendung von behandeltem Abwasser in der Landwirtschaft –  
Untersuchungen zum Verbleib von organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen mittels  
LC-MS**

Der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig  
vorgelegt von  
Christina Riemenschneider, M.Sc.  
im Mai, 2017

Angefertigt am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ,  
Department Analytik

---

## **1. Einleitung, Motivation und Zielsetzung**

In halbtrockenen (semiariden) und trockenen (ariden) Regionen wird in zunehmendem Maße die Wiederverwendung von behandeltem Abwasser für landwirtschaftliche Bewässerungszwecke als eine Möglichkeit verstanden die knappen Wasserressourcen zu schonen. Dies hat jedoch zur Folge, dass organische Spurenstoffe - wie Arzneimittel, Röntgenkontrastmitteln oder Industriechemikalien - in das Agrarökosystem gelangen und aus dem Bewässerungswasser in Nutzpflanzen aufgenommen werden können. Innerhalb der Pflanzen können die Spurenstoffe verteilt und über den essbaren Teil von Nutzpflanzen schließlich in die Nahrungskette von Mensch und Tier gelangen. Da im Hinblick auf organische Spurenstoffe (ausgenommen Pestizide) weltweit bislang keine Grenz- oder Richtwerte für Bewässerungswässer und die erzeugten Lebensmittel existieren, ist der Verbleib dieser Substanzen in Nutzpflanzen von zunehmendem öffentlichem Interesse. Ob und inwieweit gesundheitliche Risiken für den Verbraucher entstehen, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

- Die Frage, ob durch den Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, im Hinblick auf organische Spurenstoffe ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht, war von hoher Relevanz.

Neben der Aufnahme und Verteilung spielt auch die Metabolisierung von organischen Spurenstoffen in Pflanzen eine zunehmend wichtige Rolle in Aufnahmestudien. In welchem Maße die aufgenommenen Substanzen dem pflanzlichen Metabolismus unterliegen wurde - mit Ausnahme von Pestiziden - bisher nur in wenigen Fällen untersucht. Die Berücksichtigung des Metabolismus ist jedoch für die Abschätzung des Aufnahmepotentials einer Verbindung unerlässlich. Zudem könnten die gebildeten Metaboliten aus toxikologischer Sicht relevant sein.

- Erkenntnisse über die Aufnahme, die Verteilung und den Metabolismus von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Nutzpflanzen sind unerlässlich um das Verhalten von bisher nicht untersuchten Stoffen anhand von Modellen besser vorhersagen zu können.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich daher folgende Zielsetzungen:

1. Entwicklung eines spurenanalytischen Verfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in wässrigen und pflanzlichen Matrices,
2. Anwendung des zuvor entwickelten analytischen Verfahrens auf Pflanzenproben aus einer Feldstudie, um die Exposition (Nahrung) und das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers gegenüber organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, abzuschätzen und
3. Durchführung hydroponischer Experimente zur Untersuchung der Aufnahme, der Verteilung und des Metabolismus ausgewählter organischer Spurenstoffe, um bekannte Aufnahme- und Verteilungsmechanismen zu prüfen, neue Erkenntnisse über die Art und das Ausmaß des Metabolismus zu erhalten und letztlich eine verbesserte Datengrundlage für Modelle zu schaffen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Threshold of Toxicological Concern (TTC)-Konzept**

Das TTC-Konzept ermöglicht dem Anwender eine toxikologische Bewertung von Stoffen, die in Lebensmitteln vorkommen und für die nur sehr wenige oder gar keine Toxizitätsdaten zur Verfügung stehen. Das Prinzip des TTC-Konzepts beruht auf der Festlegung generischer Schwellenwerte (TTC-Werte) unterhalb derer, selbst bei lebenslanger Aufnahme, eine generelle toxikologische Unbedenklichkeit angenommen wird. Insgesamt werden dabei sechs Substanzklassen (darunter die Cramer-Klassen I, II und III, welche als wenig, mäßig oder hoch toxisch definiert wurden, sowie potenziell genotoxische Substanzen) unterschieden, wobei für jede Klasse ein TTC-Wert abgeleitet wurde. Eine ungeprüfte Substanz mit bekannter Struktur wird letztlich anhand eines Vergleichs ihrer strukturellen Eigenschaften mit Substanzen ähnlicher Struktur und bekannten Toxizitätsdaten einer der sechs Substanzklassen zugeteilt. Sofern die menschliche Exposition gegenüber der Substanz unterhalb des für ihre Strukturklasse spezifischen TTC-Werts liegt, wird davon ausgegangen, dass das Gesundheitsrisiko vernachlässigbar gering ist.

### **2.2. Hydroponische Experimente**

Die Durchführung der hydroponischen Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) in Großbeeren. Tomatenpflanzen wurden im Gewächshaus über einen Zeitraum von mehreren Monaten unter hydroponischen Bedingungen (d.h. in Nährlösung) kultiviert. Die Pflanzen wurden über die Nährlösungen dreimal, im Intervall von etwa zwei Wochen, gegenüber der untersuchten Substanz (Carbamazepin (je 500 µg/L), Lamotrigin (je 100 µg/L) bzw. Simvastatinsäure (je 50 µg/L)) exponiert. Die letzte Exposition erfolgte jeweils 48 h vor der Ernte. Die Nährlösungen wurden

wenigstens 30 min nach der 1. Exposition und zum Erntezeitpunkt beprobt. Nach der Ernte wurden die Pflanzen in die entsprechenden Pflanzenorgane Wurzel, Stängel, Blatt und Frucht (reif und unreif) unterteilt und analysiert.

### 2.3. Instrumentelle Analytik

Zur quantitativen Bestimmung der untersuchten Substanzen in den wässrigen und pflanzlichen Matrices wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) eingesetzt. Die Detektion und Identifizierung unbekannter Metaboliten erfolgte mittels hochauflösender Massenspektrometrie (Verwendung eines UPLC-QTOF-MS-Systems, Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Entwicklung eines HPLC-ESI-MS/MS-Verfahrens zur Bestimmung von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen in Pflanzen

(s. Publikation: "An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater"; Riemenschneider, C., Seiwert, B., Goldstein, M., Al-Raggad, M., Salameh, E., Chefetz, B., Reemtsma, T. in *Anal Methods*, 2017, 9, 1273-1281)

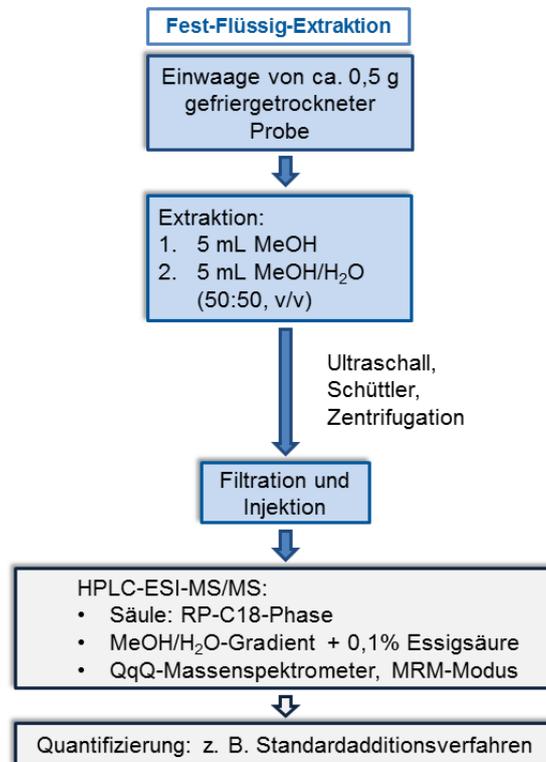
Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit stellt die Entwicklung und Validierung eines HPLC-MS/MS-Verfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von 28 ausgewählten organischen Spurenstoffen - darunter Arzneimittel, Röntgenkontrastmittel, Industriechemikalien - und Metaboliten in pflanzlichen Matrices dar. Die Auswahl der Analyten beruhte zum einen auf ihrem Vorkommen in jordanischem Oberflächenwasser, da dies für die anschließende Feldstudie (3.2) von Bedeutung war. Zum anderen wurden neun Carbamazepin (CBZ)-Metaboliten, welche als Referenzstandards kommerziell erhältlich sind und deren Vorkommen in Pflanzen prinzipiell möglich ist, in die Methodenentwicklung einbezogen.

Die Herausforderung dieser Arbeit bestand darin eine Probenvorbereitungsmethode zu entwickeln, welche die gleichzeitige Extraktion der 28 Zielanalyten - darunter saure, neutrale und basische Verbindungen mit unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften ( $\log K_{ow}$  -3,1 - 4,1) - als auch die Extraktion unbekannter Metaboliten aus pflanzlichen Matrices erlaubt.

Dies konnte durch die in **Abbildung 1** dargestellte Fest-Flüssig-Extraktion erzielt werden. Die Extrakte wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS vermessen. Die absoluten Wiederfindungen für 22 der 28 Analyten lagen für die Matrices Salat und Kohl (Blatt) in einem Bereich von 60-98%, mit einer relativen Standardabweichung unter 20%. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen im unteren bis mittleren ng/g Trockenmasse (TM)-Bereich.

Die entwickelte Methode wurde zudem im Konzentrationsbereich von 5-50 ng/g TM für die Matrices Tomatenfrüchte und -blätter validiert. Dabei lag die Wiederfindungsrate für die Mehrheit der Analyten (68%) bei über 60%, mit einer relativen Standardabweichung unter 10%. Die Bestimmungsgrenze lag, mit Ausnahme der Röntgenkontrastmittel (10 ng/g TM),

für alle Analyten unter 2 ng/g TM. Starke Matrixeffekte in einem Bereich von 17% Ionenverstärkung bis 78% Ionenunterdrückung wurden ermittelt und durch Maßnahmen, wie die Quantifizierung mittels Standardadditionsverfahren, kompensiert.



**Abbildung 1:** HPLC-MS/MS-Verfahren zur Quantifizierung von 28 organischen Spurenstoffen in pflanzlichen Matrices.

### 3.2. Nachweis von organischen Spurenstoffen und deren Metaboliten in Nutzpflanzen kultiviert unter Freilandbedingungen

(s. Publikation: "Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater", Riemenschneider, C., Al-Raggad, M., Moeder, M., Seiwert, B., Salameh, E., Reemtsma, T. in *J Agric Food Chem*, 2016, 64, 5784-5792)

Ziel dieser Studie war die Beantwortung der Frage, ob durch den Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, im Hinblick auf organische Spurenstoffe ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht. Zur Erhebung der erforderlichen Daten wurde das zuvor entwickelte HPLC-MS/MS-Verfahren (3.1.) auf Nutzpflanzen, welche unter Freilandbedingungen angebaut und mit Oberflächenwasser bewässert wurden, angewandt.

Hierfür wurden in Zusammenarbeit mit jordanischen Projektpartnern zwei Probenahme-Kampagnen (im Oktober 2014 und Mai 2015) in Jordanien durchgeführt. Dabei wurden an drei Standorten zehn verschiedene Gemüsesorten (Zucchini, Tomate, Gurke, Paprika, Karotte, Aubergine, Kartoffel, Salat, Kohl und Rucola) beprobt, welche unter regional-typischen Feldbedingungen gewachsen sind. Die Bewässerung der jeweiligen Felder erfolgte mit Oberflächenwasser des Zarqa Flusses, welches einen hohen Anteil an behandeltem,

häuslichem Abwasser enthält. Der Zarqa Fluss wurde zudem über einen Zeitraum von 10 Monaten (August 2014 - Mai 2015) fünfmal an den drei entsprechenden Wasserentnahmestellen beprobt.

Von den 28 Zielanalyten konnten 21 in mehr als 50% der untersuchten Wasserproben und 18 in mindestens einer Gemüsesorte nachgewiesen werden.

In den Wasserproben wurden Median-Konzentrationen der organischen Spurenstoffe im Bereich von 0,08 - 6,4 µg/L ermittelt.

Im Hinblick auf die essbaren Teile der untersuchten Nutzpflanzen war die durchschnittliche Gesamtkonzentration an organischen Spurenstoffen in Blattgemüsen (~233 ng/g TM) 3-fach höher als in Wurzelgemüsen (~73 ng/g TM) und 6-fach höher als in Fruchtgemüsen (~37 ng/g TM). Bezüglich der untersuchten Carbamazepin-Metaboliten waren Carbamazepin-10,11-epoxid (EP-CBZ) und *trans*-10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin (*trans*-DiOH-CBZ) die am häufigsten detektierten Verbindungen in den essbaren Teilen. Zudem wurden in den Früchten der Zucchini höhere Konzentrationen an EP-CBZ und 3-OH-CBZ ermittelt als an Carbamazepin selbst. Carbamazepin wurde als einziger organischer Spurenstoff in allen untersuchten Gemüsesorten und Pflanzenorganen (Wurzel, Stängel, Blatt, Frucht) nachgewiesen.

Unter Berücksichtigung der Lebensmittelverzehrdaten für Spanien wurde die Konzentration eines jeden organischen Spurenstoffs berechnet, der über die Ernährung von der Bevölkerung aufgenommen wird. Dieser Ansatz ermöglicht die Abschätzung der Exposition einer Bevölkerungsgruppe durch die Nahrung. Die so ermittelte jährliche Exposition eines durchschnittlichen Erwachsenen (70 kg KG) lag in einem Bereich von 0,25 - 388 µg.

Zur Abschätzung des Gesundheitsrisikos der Bevölkerung erfolgte zusätzlich eine Risikobewertung der detektierten Verbindungen anhand des TTC-Konzepts (2.1.). Mit Ausnahme von EP-CBZ wurde für die untersuchten Verbindungen kein gesundheitliches Risiko angenommen. Für EP-CBZ müssen jedoch für eine abschließende Risikobewertung weitere toxikologische Daten hinzugezogen werden.

Zusammenfassend ergibt sich, dass, nach dem derzeitigen Stand des Wissens, das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers gegenüber abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, eher gering ist.

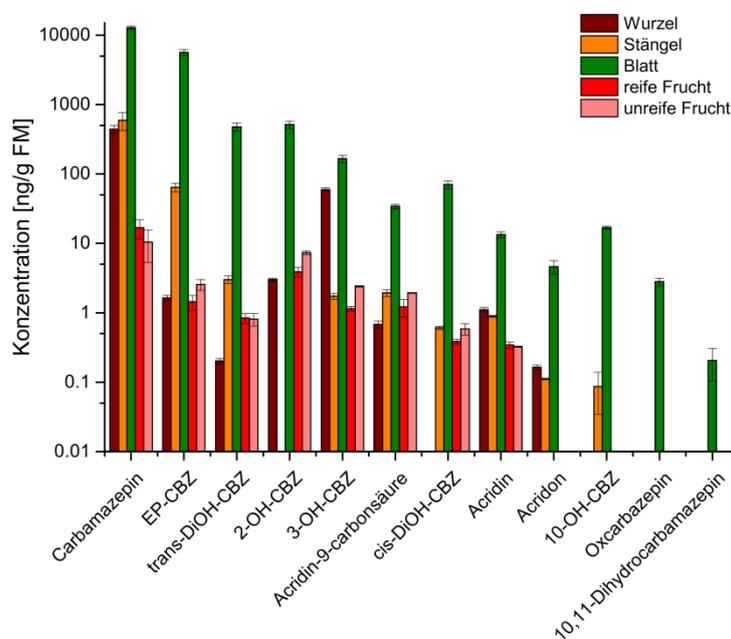
### **3.3. Untersuchungen zum Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen**

(Manuskript: "Extensive metabolization of neutral pharmaceuticals following uptake into agricultural plants – carbamazepine in tomato", Riemenschneider, C., Seiwert, B., Moeder, M., Schwarz, D., Reemtsma, T.)

Das Antiepileptikum und Antidepressivum Carbamazepin weist, aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften (ungeladen, log  $K_{OW}$  = 2,45), eine gute Aufnahme und Verteilung in Pflanzen auf und zählt daher zu den am häufigsten in Pflanzen detektierten abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen. Der pflanzliche Metabolismus von Carbamazepin ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch weithin unverstanden und sollte daher das

Ziel dieser Studie sein. Dabei war insbesondere die Quantifizierung bereits bekannter und die Identifizierung unbekannter CBZ-Metaboliten von Interesse, um Aussagen über die Art und das Ausmaß der Metabolisierung treffen zu können.

Mittels des entwickelten HPLC-MS/MS-Verfahrens (3.1) konnten zunächst die Aufnahme und Verteilung von 12 möglichen CBZ-Metaboliten in den entsprechenden Pflanzenorganen von hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen (2.2.) untersucht werden. Dabei konnten 11 CBZ-Metaboliten in den Blättern, 8 in den Stängeln und je 7 in den Wurzeln und Früchten der Tomatenpflanzen nachgewiesen und quantifiziert werden (**Abbildung 2**). Als Hauptmetaboliten wurden EP-CBZ (in Blatt und Stängel), 3-OH-CBZ (in Wurzeln) und 2-OH-CBZ (in Früchten) identifiziert. Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass etwa 80% der dotierten Carbamazepinmenge (insgesamt 7500 µg/Pflanze) von den Tomatenpflanzen aufgenommen und 33% der aufgenommenen Menge metabolisiert wurden (**Abbildung 3**). 9% der dotierten Carbamazepinmenge konnten zum Erntezeitpunkt in der Nährlösung nachgewiesen werden.



**Abbildung 2:** Konzentration in ng/g Frischmasse von Carbamazepin und seinen Metaboliten zum Erntezeitpunkt in den Pflanzenorganen von Tomaten (n = 2), welche unter hydroponischen Bedingungen kultiviert und gegen insgesamt 7500 µg Carbamazepin exponiert wurden.

Da mittels HPLC-MS/MS und quantitativer *target*-Analytik lediglich 90% der dotierten Carbamazepinmenge aufgeklärt werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass weitere, bisher unberücksichtigte Metaboliten gebildet wurden. Im zweiten Teil dieser Studie erfolgte daher eine Identifizierung unbekannter Carbamazepin-Metaboliten mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS). Auf diese Weise konnten insgesamt zehn weitere Carbamazepin-Metaboliten erstmalig in Pflanzen nachgewiesen und identifiziert werden. Bei den identifizierten Metaboliten handelt es sich überwiegend um Phase II-Konjugate des Carbamazepins, darunter vier Konstitutionsisomere eines Glucose- und zwei eines Cystein-Konjugats. Drei weitere Metaboliten können einem Phase I-Metabolismus zugeschrieben



Menge). Dies lässt sich dadurch begründen, dass Lamotrigin, aufgrund seines  $pK_a$ -Wertes, in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zellorganellen teilweise geladen (+1) vorliegt und dadurch nur begrenzt durch Zellwände und Zellmembranen permeieren und somit nur in geringem Maße in die oberirdischen Pflanzenorgane Blätter und Früchte verteilt werden kann.

Im Vergleich dazu wurden im Mittel lediglich 0,6% der dotierten Simvastatinsäure in den Wurzeln der Tomatenpflanzen ( $n = 3$ ) nachgewiesen. Eine Verteilung der Simvastatinsäure in oberirdische Pflanzenorgane wurde nicht festgestellt.

Lamotrigin und Carbamazepin sind mäßig lipophile Verbindungen ( $\log K_{ow}$ -Wert 2,1 bzw. 2,5) mit einem vergleichbaren Molekulargewicht. Da ca. 35% der dotierten Lamotriginmenge in den Nährlösungen undissoziiert vorlagen wurde für Lamotrigin eine prozentual höhere Aufnahme erwartet. Möglicherweise tragen die fünf Donatoren/Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (OH, NH, O, N) im Lamotrigin dazu bei, dass die Verbindung deutlich schlechter aufgenommen wurde als Carbamazepin, welches nur über drei dieser Donatoren und Akzeptoren verfügt.

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spurenstoffen (Carbamazepin, Lamotrigin und Simvastatinsäure), war die Simvastatinsäure die Verbindung, welche am schlechtesten von Pflanzen aufgenommen wurde. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass neben der Ladung auch das Molekulargewicht einer Verbindung entscheidend für die Aufnahme in Pflanzen ist. Die Simvastatinsäure (437 g/mol) weist, verglichen mit Lamotrigin (256 g/mol) und Carbamazepin (236 g/mol), das höchste Molekulargewicht auf und verfügt zudem über eine hohe Anzahl (sechs) an Donatoren/Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül, was eine Aufnahme in Pflanzen vermutlich erschwert.

Zur Aufklärung der Massenbilanzlücke von ca. 94% Lamotrigin bzw. 99% Simvastatinsäure, welche nicht durch die Aufnahme in Pflanzen und den Verbleib in den Nährlösungen erklärt werden können, wurden weitere Experimente durchgeführt. Diesbezüglich wurde (1) eine Adsorption der Verbindungen an die Gefäßwände der für die Nährlösungen verwendeten Pflanzgefäße, (2) eine Adsorption der Verbindungen an die Wurzeloberfläche und (3) eine Metabolisierung der Ausgangsverbindungen in den Nährlösungen und Pflanzen untersucht.

Die Experimente ergaben, dass bei Lamotrigin eine Adsorption an der Gefäßwand nicht jedoch an der Wurzeloberfläche, ausgeschlossen werden kann. Zudem konnten drei Lamotrigin-Metaboliten in den pflanzlichen Extrakten mittels LC-HRMS identifiziert, jedoch aufgrund fehlender Referenzstandards nicht quantifiziert werden. Bezüglich der Simvastatinsäure wird eine deutliche Affinität zur Adsorption an der Gefäß- und Wurzeloberfläche vermutet und in derzeit laufenden Arbeiten am UFZ näher untersucht. Eine Metabolisierung der Verbindung in den Pflanzen und Nährlösungen wurde hingegen ausgeschlossen, da keine Metaboliten mittels LC-HRMS identifiziert wurden.

#### 4. Schlussfolgerungen und Fazit

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ein spurenanalytisches Verfahren zur Bestimmung von organischen Spurenstoffen und deren Metaboliten in Pflanzen entwickelt werden. Damit steht ein sehr sensitives analytisches Verfahren für die quantitative Bestimmung von einer Vielzahl an organischen Spurenstoffen in Pflanzen, selbst unter Freilandbedingungen, zur Verfügung.

Mittels des entwickelten Verfahrens konnten im zweiten Teil der Arbeit die Exposition und das Gesundheitsrisiko der Bevölkerung beim Verzehr von Gemüse, welches mit behandeltem Abwasser bewässert wurde, abgeschätzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass nach dem derzeitigen Kenntnisstand, das Gesundheitsrisiko des Verbrauchers gegenüber organischen Spurenstoffen beim Verzehr des untersuchten Gemüses eher gering ist. Für den Carbamazepin-Metaboliten EP-CBZ sind jedoch für eine abschließende Bewertung zusätzliche toxikologische Daten erforderlich. Eine Ableitung von Grenzwerten für abwasserbürtige organische Spurenstoffe im Bewässerungswasser und erzeugten Lebensmitteln erscheint zum jetzigen Zeitpunkt nicht zwingend erforderlich. Den betroffenen Ländern sei aber ein regelmäßiges Monitoring von abwasserbürtigen organischen Spurenstoffen im Bewässerungswasser, sowie in Obst und Gemüse empfohlen, um eine unerwünschte chronische Exposition des Verbrauchers so gering wie möglich zu halten.

Durch die Untersuchung des Verhaltens von Carbamazepin, dem am häufigsten in Pflanzen detektierten und quantitativ bedeutsamsten, abwasserbürtigen organischen Spurenstoff, tragen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem wesentlich besseren Verständnis des Metabolismus von Carbamazepin in Pflanzen bei. Für die Implementierung einer substanzspezifischen Abbaurate von Carbamazepin in Aufnahmemodellen wäre jedoch noch eine Vielzahl an kinetischen Experimenten in intakten Pflanzen erforderlich. Die Implementierung von substanzspezifischen Abbauraten in Modellen ist zwar wünschenswert, könnte aber durch die gezielte Analyse bereits bekannter und möglicherweise toxischer Metaboliten in Pflanzenproben ersetzt werden. Im Hinblick auf Carbamazepin wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende Metaboliten vorgeschlagen.

Die Untersuchungen zum Verhalten von Lamotrigin und Simvastatinsäure in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen haben gezeigt, dass neben der Lipophilie und Ladung einer Verbindung weitere Parameter entscheidend für die Aufnahme in Pflanzen sind. So liegt die Vermutung nahe, dass die Aufnahme einer Verbindung ab einer Anzahl von fünf Donatoren und/oder Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül deutlich begrenzt ist. Zudem wird vermutet, dass auch das Molekulargewicht einer Verbindung eine wesentliche Rolle für deren Aufnahme in Pflanzen spielt. Um basierend auf Modellrechnungen eine Überschätzung der Aufnahmemenge zu vermeiden, sollte den drei letztgenannten Parametern in Modellen eine größere Bedeutung zukommen.

## 5. Eigene Publikationen

### Publikationen zum Promotionsthema:

**Riemenschneider, C.**, Seiwert, B., Moeder, M., Schwarz, D., Reemtsma, T. Extensive transformation of the pharmaceutical carbamazepine following uptake into intact tomato plants, *Environ Sci Technol*, **2017**, *accepted*.

**Riemenschneider, C.**, Seiwert, B., Goldstein, M., Al-Raggad, M., Salameh, E., Chefetz, B., Reemtsma, T. An LC-MS/MS method for the determination of 28 environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater, *Anal Methods*, **2017**, 9, 1273-1281.

**Riemenschneider, C.**, Al-Raggad, M., Moeder, M., Seiwert, B., Salameh, E., Reemtsma, T. Pharmaceuticals, their metabolites and other polar pollutants in field grown vegetables irrigated with treated municipal wastewater, *J Agric Food Chem*, **2016**, 64, 5784-5792.

### Weitere Publikationen:

Raeke, J., Lechtenfeld, O.J., Seiwert, B., Meier, T., **Riemenschneider, C.**, Reemtsma, R. Photochemically Induced Bound Residue Formation of Carbamazepine with Dissolved Organic Matter, *Environ Sci Technol*, **2017**, *accepted*.

Golan-Rozen, N., Seiwert, B., **Riemenschneider, C.**, Reemtsma, T., Chefetz, B., Hadar, Y. Transformation pathways of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*: Effects of growth conditions, *Environ Sci Technol*, **2015**, 49 (20), 12351-12362.

Seiwert, B., Golan-Rozen, N., Weidauer, C., **Riemenschneider, C.**, Chefetz, B., Hadar, Y., Reemtsma, T. Electrochemistry combined with LC–HRMS: Elucidating transformation products of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine generated by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Environ Sci Technol*, **2015**, 49 (20), 12342-12350.

**Riemenschneider, C.**, Zerr, W., Vater, N., Brunn, H., Mohring, S. A., Hamscher, G. Analysis and behavior of colistin during anaerobic fermentation, *Bioresour Technol*, **2014**, 170, 303-309.