

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Danksagung	X
1. BIOAKKUMULATION ORGANISCHER CHEMIKALIEN IM RAHMEN DER CHARAKTERISIERUNG DER UMWELTGEFÄHRLICHKEIT	1
1.1 Theorie der Aquatischen Bioakkumulation	3
1.1.1 Aufnahme von Chemikalien durch aquatische Organismen	4
1.1.2 Elimination von Chemikalien aus aquatischen Organismen	5
1.1.3 Quantitative Struktur-Wirkungs Analyse (QSAR)	6
1.1.4 Einflußfaktoren auf die Bioakkumulation	7
1.2 Mathematische Modelle der Bioakkumulation in aquatischen Organismen	10
1.2.1 Das Zweikompartimentmodell	10
1.2.2 Das Dreikompartimentmodell	12
1.3 Testverfahren zur Bestimmung von Biokonzentrationsfaktoren	14
1.4 Aufgabenstellung	16
2. BIOAKKUMULATION VON 5-CHLOR-2-(2,4-DICHLORPHENOXY)-PHENOL [IRGASAN DP 300, TRICLOSAN] BEI UNTERSCHIEDLICHEN PH-WERTEN DES WASSERS	18
2.1 Einleitung	18
2.1.1 Physikalisch-chemische Daten und Toxizitäten von Triclosan	18
2.1.2 Chemie und Umweltverhalten von Triclosan	19
2.1.3 Versuchsaufbau und Durchführung	20
2.2 Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche mit Triclosan	22
2.2.1 Ergebnisse	22
2.2.2 Biokonzentrationsfaktoren bezogen auf den Fettgehalt der Fische	28
2.3 Diskussion Triclosan	29
2.3.1 Diskussion der Analytik	29
2.3.2 Derivatisierung	31
2.3.3 Gaschromatographische Bestimmung	32
2.3.4 Fettbestimmung	33
2.3.5 Einstellung des pH-Wertes des Wassers in aquatischen Systemen	33
2.3.6 Statistische Bewertung der Biokonzentrationsfaktoren als Funktion des pH-Wertes	35
2.3.7 Diskussion der pH-Abhängigkeit der Bioakkumulation von Triclosan	38
3. BIOAKKUMULATION DER PYRETHROIDE CYFLUTHRIN, CYPERMETHRIN, DELTAMETHRIN UND PERMETHRIN IN REGENBOGENFORELLEN	41
3.1 Einleitung	41
3.1.1 Pyrethrum und Pyrethroide	42
3.1.2 Molekular Modelling – Raumstruktur von Pyrethroiden	44
3.1.3 Physikalische und chemische Eigenschaften	45
3.1.4 Marktanteil und Verwendung von Pyrethroiden	46

3.1.5 Wirkung und Neurotoxizität	46
3.1.6 Pyrethroide in der aquatischen Umwelt	47
3.1.7 Versuchsaufbau und Durchführung	48
3.2 Ergebnisse Pyrethroide	50
3.2.1 Ergebnisse der akuten Toxizität	50
3.2.2 Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Permethrin, Deltamethrin, Cypermethrin und Cyfluthrin in Regenbogenforellen	50
3.2.3 Bioakkumulation von Permethrin	51
3.2.4 Bioakkumulation von Deltamethrin	52
3.2.5 Bioakkumulation von Cypermethrin	53
3.2.6 Bioakkumulation von Cyfluthrin	54
3.2.7 Ergebnisse Pyrethroid-Metaboliten	55
3.2.7.1 Sekundärionenmassenspektrometrie der Pyrethroid-Metaboliten Cl ₂ CA, Br ₂ CA, 4F3PBA und 3PBA mit der Ionenfalle	55
3.2.8 Ergebnisse 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität (EROD)	62
3.3 Diskussion Bioakkumulation und Metabolismus der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin in Regenbogenforellen	64
3.3.1 Diskussion der Analytik von Pyrethroiden und deren Metaboliten	64
3.3.2 Im Rahmen der Biokonzentrationsversuche verwendete analytische Methoden	65
3.3.3 Akute Toxizität von Pyrethroiden in Fischen	67
3.3.4 Kinetik der Akkumulation und Elimination von Pyrethroiden / Biokonzentrationsfaktoren in Fischen	69
3.3.5 Metabolismus von Pyrethroiden	70
3.3.5.1 Prinzip der Analytik von Pyrethroid-Metaboliten	71
3.3.5.2 Literaturüberblick über Analytik von Pyrethroid-Metaboliten	72
3.3.5.3 Verwendete Analytik von Pyrethroid-Metaboliten	76
3.3.5.4 Methodenentwicklung GC-MS-MS Pyrethroid-Metaboliten	77
3.3.5.5 Anwendung der GC-MS-MS Methode auf Fischproben	78
3.3.6 QSAR der Bioakkumulation von Pyrethroiden in Regenbogenforellen	79
3.3.6.1 Bioverfügbarkeit von Pyrethroiden bzw. Relevanz der Biokonzentration	81
3.3.7 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität (EROD-Aktivität)	82
3.3.7.1 Wirkung von Pyrethroiden auf die EROD-Aktivität in Fischen	83
4. ZUSAMMENFASSUNG	85
5. LITERATUR	87
6. MATERIAL UND METHODEN	96
6.1 Geräte	96
6.2 Chemikalien	96
6.3 GC-ECD	98
6.4 GC-MS-MS	98
6.5 Triclosan	98
6.5.1 Fische	98
6.5.2 Wasser, Einstellen des pH-Wertes	98
6.5.3 Aufbau der Versuchsanlage Triclosan	99
6.5.4 Versuchsverlauf Bioakkumulation Triclosan	100
6.5.5 Triclosan-Wasser	101
6.5.6 Aufarbeitung der Fischproben Triclosan	101
6.5.7 Bestimmung des Triclosan-Gehaltes im Fisch	101
6.5.8 Bestimmung des Triclosan-Gehaltes im Wasser	101

6.5.9 Bestimmung des Triclosan-Gehaltes im Fischfutter	102
6.5.10 Darstellung von 0,1 mol/l Triethylsulfoniumhydroxid (TESH)	102
6.5.11 GC-Parameter Triclosan	102
6.5.12 Fettbestimmung	102
6.5.13 Wiederfindungsraten Triclosan	103
6.6 Pyrethroide	103
6.6.1 Fische	103
6.6.2 Wasser	103
6.6.3 Aufbau der Versuchsanlage Pyrethroide	104
6.6.4 Beschreibung Probennahme Fische	104
6.6.5 Beschreibung Probennahme Wasser	104
6.6.6 Pyrethroide im Wasser	105
6.6.7 Pyrethroide im Fisch	105
6.6.8 GC-Parameter für Pyrethroide	105
6.6.9 Wiederfindungsraten Pyrethroide	106
6.7 Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_2 und Biokonzentrationsfaktoren (BCF's) sowie von Halbwertszeiten	106
6.8 Pyrethroid-Metaboliten	106
6.8.1 Darstellung von Diazomethan in Toluol	106
6.8.2 Ausgangslösungen Pyrethroid-Metaboliten	107
6.8.3 Stammlösungen Pyrethroid-Metaboliten	107
6.8.4 Pyrethroid-Metaboliten im Fisch	107
6.8.5 GC-MS Parameter Pyrethroid-Metaboliten	108
6.9 EROD	109
6.9.1 Versuchsdurchführung Aktivität Mischfunktioneller Oxygenasen (EROD-Aktivität)	109
6.9.2 Stammlösungen für EROD-Aktivität	109
6.9.3 Berücksichtigung der Reinheit des Resorufin-Standards	110
6.9.4 Durchführung der EROD-Messung	110
6.9.5 Proteinbestimmung nach Lowry (Folin-Ciocalteu), modifiziert	112
7. ANHANG	113
7.1 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Triclosan bei pH 6 in Zebrafischarten	113
7.2 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Triclosan bei pH 7 in Zebrafischarten	114
7.3 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Triclosan bei pH 8 in Zebrafischarten	115
7.4 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Triclosan bei pH 9 in Zebrafischarten	116
7.5 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Permethrin in Regenbogenforellen	117
7.6 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Permethrin im Fett von Regenbogenforellen	118
7.7 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Cyfluthrin in Regenbogenforellen	119
7.8 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Deltamethrin in Regenbogenforellen und im Fett von Regenbogenforellen	120
7.9 Parameter der Bioakkumulation von Deltamethrin	121
7.10 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuchs von Cypermethrin in Regenbogenforellen	122
7.11 IUPAC-Name und CAS-Nummern der verwendeten Pyrethroide	123
7.12 Log Pow Berechnung für Deltamethrin, Permethrin, Cypermethrin und Cyfluthrin	124
7.12.1 Log Pow Berechnung für Deltamethrin	124
7.12.2 Log Pow Berechnung für Permethrin	124
7.12.3 Log Pow Berechnung für Cypermethrin	125
7.12.4 Log Pow Berechnung für Cyfluthrin	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vier-Säulen-Modell der Umweltgefährlichkeit von Chemikalien.....	1
Abbildung 2: Klassifizierung der Anreicherung von Xenobiotika in Organismen	3
Abbildung 3: Aufnahmewege für Chemikalien in Fische (van Leeuwen und Hermens 1995)	5
Abbildung 4: Sättigungskurve.....	10
Abbildung 5: Bioakkumulation nach dem Zweikompartimentmodell.....	10
Abbildung 6: Bioakkumulation nach dem Dreikompartimentmodell.....	12
Abbildung 7 : Struktur von 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol.....	18
Abbildung 8: Schema der Darstellung von 5-Chlor-2-(2,4-dichlor-phenoxy)-phenol (Hites und Lopez-Avila 1979)	19
Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß mit verschiedenen pH- Werten des Wassers	21
Abbildung 10: Zebrabärbling	21
Abbildung 11: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 6 des Wassers, Konzentration im Wasser $C_w = 35,9$ mg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase.....	23
Abbildung 12: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 7 des Wassers, Konzentration im Wasser $C_w = 41,6$ mg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase.....	23
Abbildung 13: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 8 des Wassers, Konzentration im Wasser $C_w = 48,6$ µg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase.....	24
Abbildung 14: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 9 des Wassers, Konzentration im Wasser $C_w = 46,7$ µg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase.....	24
Abbildung 15: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 6 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $C_w = 35,9$ µg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell	25
Abbildung 16: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 7 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $C_w = 41,6$ µg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell	25
Abbildung 17: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 8 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $C_w = 48,6$ µg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell	26
Abbildung 18: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 9 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $C_w = 46,7$ µg/l. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartimentmodell	26
Abbildung 19: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan bei pH 6, 7, 8 und 9 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $C_w \approx 50$ µg/l.....	27
Abbildung 20: Aufarbeitung einer Fischprobe auf Triclosan	31
Abbildung 21: Derivatisierung von Triclosan im Injektorblock mit TESH	32
Abbildung 22: Chromatogramm (GC-ECD) einer Fischprobe mit Triclosan und PCP (IS) nach flüssig- flüssig Aufarbeitung und TESH als Derivatisierungsreagenz	33
Abbildung 23: BCF_{kin} und BCF_{ss} in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers.....	35

Abbildung 24: Gewichtete lineare Regression: BCFs von Triclosan in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers	37
Abbildung 25: Geschwindigkeitskonstante k_1 der Akkumulation von Triclosan in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers.....	37
Abbildung 26: Die Aufnahme von ^3H -markiertem TFM durch Regenbogenforellen bei drei pH-Werten des Wassers, gemessen im gesamten Fisch (aus: Hunn und Allen 1974)	39
Abbildung 27: Struktur der synthetischen Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin.....	41
Abbildung 28: Die insektiziden Bestandteile des Pyrethrums.....	43
Abbildung 29: Strukturformel von Etofenprox [2-(4-Ethoxyphenyl)-2-methylpropyl-3-phenoxybenzylether	44
Abbildung 30: Durchflußanlage zur Bioakkumulation von Pyrethroiden in Regenbogenforellen in der Außenstelle Ahrensburg des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei ...	49
Abbildung 31: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Permethrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 4,0 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase.....	51
Abbildung 32: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Permethrin im Fett von Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 4,0 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase	52
Abbildung 33: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Deltamethrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $C_W = 0,40 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase. Für die Datenanpassung wurden nur Daten der Aufnahmephase (gestrichelte Linie) bzw. nur Daten der Clearancephase verwendet (durchgezogene Linie).....	52
Abbildung 34: Kinetik der Bioakkumulation von Deltamethrin im Fett von Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 0,40 \mu\text{g/l}$. Nur die Daten der Aufnahmephase konnten angepaßt werden	53
Abbildung 35: Kinetik der Elimination von Cypermethrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $C_W = 0,67 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase. Nur die Daten der Aufnahmephase konnten angepaßt werden.....	53
Abbildung 36: Kinetik der Bioakkumulation von Cyfluthrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 0,52 \mu\text{g/l}$. Nur die Daten der Aufnahmephase konnten angepaßt werden	54
Abbildung 37: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von Cl2CAME. Molpeak bei m/z 223, Fragmente m/z 187 und m/z 153.....	55
Abbildung 38: MS-MS Cl2CAME (Parention m/z 187 mit 0,4 V (res) CID-Energie).....	56
Abbildung 39: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von Br2CAME. Molpeak bei m/z 312, Fragmente bei m/z 253, 232 und 172.....	56
Abbildung 40: MS-MS von Br2CAME (Parention m/z 233 mit 0,4 V (res) CID-Energie).....	57
Abbildung 41: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von 3PBAME. Molpeak bei m/z 228, Fragmente bei m/z 197, 169.....	57
Abbildung 42: MS-MS von 3PBAME (Parention m/z 228 mit 0,4 V res. CID-Energie).....	58
Abbildung 43:Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von 4F3PBAME. Molpeak bei m/z 246, Fragmente bei m/z 215 und 187.....	58
Abbildung 44: MS-MS von 4F3PBAME (Parention m/z 246 mit 0,2 V res. CID-Energie)	59
Abbildung 45: Totalionenchromatogramm der Pyrethroid-Metaboliten Cl2CA-Me, Br2CA-Me, 2PBA-Me (IS), 4F3PBA-Me und 3PBA-Me (Konz. 10 $\mu\text{g/l}$).....	60
Abbildung 46: Totalionenchromatogramm von Cl2CA-Me mit MS-MS-Detektion. Parention m/z 187 und 0,4 V resonant CID-Energie, im Ausschnitt ist das MS-MS Spektrum im Bereich m/z 50 - 320 dargestellt (Konz. 10 $\mu\text{g/l}$).....	60
Abbildung 47: (oben) Totalionenchromatogramm mit MS-MS einer synthetischen Probe mit den Pyrethroid-Metaboliten Cl2CA-Me, Br2CA-Me, 2PBA-Me(IS) nur MS, 4F3PBA-Me und 3PBA-Me; (unten) Ionenspur m/z 123 zur Quantifizierung von Cl2CA-Me und Br2CA-Me (Konz. 10 $\mu\text{g/l}$).....	61

Abbildung 48: MS-MS einer mit 10 µg/l dotierten Fischprobe (von oben nach unten: Cl ₂ CA-Me m/z 123, 2PBA-Me (IS, nur MS) Fullscan, 4F3PBA-Me m/z 214 und 3PBA-Me m/z 196)	61
Abbildung 49: Pyrethroide im Fisch, Cleanup mit Kieselgel	66
Abbildung 50: Chromatogramm einer Fischprobe mit Permethrin nach säulenchromatographischer Aufarbeitung mit Bifenthrin als internem Standard	66
Abbildung 51: Metabolismus von Pyrethroiden in Fischen (Haya 1989)	71
Abbildung 52: Metaboliten der synthetischen Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin	71
Abbildung 53: Schema von Quadrupol (links) und Ionenfalle (engl. "Iontrap") (rechts)	78
Abbildung 54: Schematischer Versuchsaufbau Bioakkumulation im Durchfluß mit pH-Wert-Einstellung des Wassers durch Pufferlösungen	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die wichtigsten Pestizide metabolisierenden Enzymsysteme.....	9
Tabelle 2: OECD Verfahren zur Bestimmung von Biokonzentrationsfaktoren (Butte et al. 1988)	15
Tabelle 3: Mit dem Programm LOGKOW Version 1.57 (Meylan und Howard 1985) berechneter log P _{OW} von Triclosan	19
Tabelle 4: Charakteristika der durchgeführten Versuche zur pH-abhängigen Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß.....	22
Tabelle 5: Kinetische Parameter, biologische Halbwertszeiten und Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan in Zebraabräblingen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers	27
Tabelle 6: Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan, bezogen auf den mittleren Fettgehalt der Zebraabräblinge	28
Tabelle 7: Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan in Zebraabräblingen aus kinetischen Messungen, Messungen im Gleichgewichtszustand und bezogen auf den mittleren Fettgehalt der Fische.....	28
Tabelle 8: Berechnete und tabellierte t-Werte der Prüfung auf Gleichheit der BCF-Werte von Triclosan ..	35
Tabelle 9: BCF-Werte von Triclosan - Überblick	36
Tabelle 10: Biokonzentrationsfaktoren (BCF), auf Fett bezogene BCFs (BCF _L), Geschwindigkeitskonstanten für die Aufnahme (k ₁) und Elimination (k ₂) der hier untersuchten Pyrethroide (mit Standardabweichungen: s _{k1} , s _{k2} , s _{BCF})	54
Tabelle 11: Versuche zur Bestimmung des Einflusses von Pyrethroiden auf die EROD-Aktivität von Lebern der Regenbogenforelle	62
Tabelle 12: Ergebnisse der Messungen der EROD-Aktivität im Leberhomogenat von Regenbogenforellen aus Pyrethroid belastetem Wasser.....	62
Tabelle 13: LC ₅₀ -Werte (96 h) der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin für Fische.....	67
Tabelle 14: QSAR Gleichungen zur Abschätzung der Bioakkumulation auf der Basis des n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten log P _{OW}	79
Tabelle 15: n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten log P _{OW} der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin.....	80
Tabelle 16: Gemessene BCFs im Vergleich zu berechneten BCFs sowie n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten log P _{OW}	80
Tabelle 17: Volumina Pufferstammlösungen zur pH-Einstellung für 15 l Leitungswasser.	99
Tabelle 18: Probennahmezeitpunkte in Stunden für die Bioakkumulation von Triclosan bei variierenden pH-Werten des Wassers.	100
Tabelle 19: Probennahmezeitpunkte in Stunden für die verlängerte Bioakkumulation von Triclosan bei variierenden pH-Werten des Wassers.....	100
Tabelle 20: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebraabräblingen bei pH 6. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 35,95 \mu\text{g/l}$	113
Tabelle 21: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebraabräblingen bei pH 7. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 41,6 \mu\text{g/l}$	114
Tabelle 22: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebraabräblingen bei pH 8. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 48,6 \mu\text{g/l}$	115
Tabelle 23: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebraabräblingen bei pH 9. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 46,7 \mu\text{g/l}$	116
Tabelle 24: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Permethrin in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 4,0 \mu\text{g/l}$	117

Tabelle 25: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Permethrin im Fett von Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 4,0 \mu\text{g/l}$	118
Tabelle 26: Gemessene und berechnete Konzentrationen für Cyfluthrin der Bioakkumulation in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 0,52 \mu\text{g/l}$	119
Tabelle 27: Gemessene Konzentrationen für Deltamethrin der Bioakkumulation in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 0,40 \mu\text{g/l}$	120
Tabelle 28: Gemessene Konzentrationen für Deltamethrin der Bioakkumulation im Fett von Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 0,40 \mu\text{g/l}$	120
Tabelle 29: Gemessene Konzentrationen der Bioakkumulation von Cypermethrin in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $0,67 \mu\text{g/l}$	122
Tabelle 30: Trivialnamen, chemische Struktur, IUPAC-Name, Molgewicht und CAS-Nummer der verwendeten Pyrethroide.....	123
Tabelle 31: Berechnung des $\log P_{OW}$ von Cypermethrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 6.18	124
Tabelle 32: Berechnung des $\log P_{OW}$ von Permethrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 7.43	124
Tabelle 33: Berechnung des $\log P_{OW}$ von Cypermethrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 6.38	125
Tabelle 34: Berechnung des $\log P_{OW}$ von Cyfluthrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 5,74	125

Abkürzungsverzeichnis

2PBA	2-Phenoxybenzoesäure
3PBA	3-Phenoxybenzoesäure
4F3PBA	4-Fluor-3-Phenoxybenzoesäure
A, B	Konstanten (Dreikompartimentmodell)
BCF_{gew}	Mittlerer gewogener Biokonzentrationsfaktor
BCF_{kin}	Aus kinetischen Daten berechneter Biokonzentrationsfaktor
BCF_{ss}	Biokonzentrationsfaktor im Gleichgewicht Fisch/Wasser
Br2CA	3-(2,2-Dibromvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure
C	Konzentration
C, N, P	Elementsymbole für Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor
c_f	Konzentration im Fisch
CID	Collision Induced Dissociation, durch Stöße angeregter Zerfall
Cl2CA	3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure
c_w	Konzentration einer Substanz im Wasser
DDT,DDD	Dichlordiphenyltrichlorethan, Dichlordiphenyldichlorethan
ECD/ MS	Elektroneneinfangdetektor oder Massenselektiver Detektor
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
GC	Kapillargaschromatographie
k₁	Geschwindigkeitskonstante [h ⁻¹]
k₂	Geschwindigkeitskonstante [h ⁻¹]
P_{ow}	n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LC₅₀	Letale Konzentration im Wasser, bei der 50 % der Fische überleben
PAH	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PFB_rT	α-Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol
pH-Wert	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration, gibt den Säuregehalt des Wassers an - von pH 1 (sehr sauer) bis pH 14 (sehr basisch)
pK_a	Negativer Logarithmus der Dissoziationskraft einer org. Substanz
t	Zeit [h, min, s]
t*	Beginn der Clearancephase (Zweikompartimentmodell)
t^e	Beginn der Clearancephase (Dreikompartimentmodell)
α, β	Geschwindigkeitskonstanten (Dreikompartimentmodell)

Danksagung

Ich danke dem Umweltbundesamt, das im Rahmen des Forschungsvorhabens „Bioakkumulation dissoziierender Stoffe“ finanzielle Mittel zur Verfügung gestellt hat. Ich danke dem Institut für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei für die Personal- und Sachmittel, insbesondere Holmer Kuhlmann, für seine stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, und Jürgen Trenk für die Bestimmung von EROD-Aktivitäten in Forellenlebern.

Ich danke allen, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit entstehen zu lassen: Meinen Eltern, besonders meinem Doktorvater Werner Butte für seine stete Diskussionsbereitschaft und Hilfe, meinem Koreferenten Erich Zeeck, den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Jochen Eilers für seine stete Hilfsbereitschaft, und den Hochschulprofessoren, die mir dabei halfen, meinen Traum vom Chemiestudiums zu realisieren. Weiterhin danke ich Frank Hirschhausen für die Erstellung der Grafiken der Kompartimentmodelle.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht im Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit Forschungsbericht Nr. 106 04 143 (Bioakkumulation dissoziierender Stoffe).

Ein Teil des Themenfeldes Pyrethroide wurde als Poster auf der SETAC-Tagung (9th Annual Meeting der Society of Environmental Toxicology and Chemistry) vom 25. - 29. Mai 1999 in Leipzig, Deutschland, präsentiert. Ergebnisse zum Teil Triclosan wurden auf der Dioxin 99 (19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs) vom 12. - 17. September 1999 in Venedig, Italien, präsentiert. Weiterhin wurden Kurzbeschreibungen in den Jahresberichten 1995, 1997 und 1998 der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg veröffentlicht.

1. Bioakkumulation organischer Chemikalien im Rahmen der Charakterisierung der Umweltgefährlichkeit

Jede Tätigkeit des Menschen ist mit Wirkungen auf die Umwelt verbunden. Diese Wirkungen in Grenzen zu halten, insbesondere auch den Menschen selbst vor den Folgewirkungen seines eigenen Handelns zu schützen, ist Hauptanliegen des Umweltschutzes. Hierin eingeschlossen ist der Schutz der Natur und ihrer Ressourcen.

Rund acht Millionen chemischer Substanzen sind heute bekannt, mehr als 100 000 Chemikalien unterliegen derzeit dem Chemikalienrecht, und jährlich kommen mehrere hundert neue Stoffe hinzu. Weltweit werden ca. 300 Mio. t Chemikalien pro Jahr produziert. Sie dürfen keine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen (Umweltbundesamt 1997). Zur Beurteilung der Auswirkungen von Substanzen auf Mensch und Umwelt sind Kenntnisse ihrer Wirkung und der Exposition mit dieser Substanz nötig, d.h. der jährlichen Produktionsmenge und Freisetzung, der Verwendung, Verteilung, Akkumulation und Persistenz, des Abbaus in der Umwelt und im Organismus (Metabolismus) sowie der primären und sekundären toxischen Effekte (Parlar und Angerhöfer 1991, Günther 1975). Diese Abhängigkeit der Umweltgefährlichkeit einschließlich der Gefahr für den Menschen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



Abbildung 1: Vier-Säulen-Modell der Umweltgefährlichkeit von Chemikalien

Die Komplexität der physikalischen, chemischen und biologischen Vorgänge, mit denen sich das Verhalten einer Substanz in der Umwelt beschreiben lässt, führt zu dem Versuch, das Umweltverhalten anhand der chemischen Struktur bzw. mit chemisch-physikalischen Stoffkonstanten zu beschreiben. Im Rahmen des OECD¹-Prüfrichtlinien-

¹ Abk. für Organisation for Economic Cooperation and Development.

programms werden physikalisch-chemische, ökotoxikologische und toxikologische Prüfmethode für die Bewertung von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln neu entwickelt, fortlaufend aktualisiert und international harmonisiert (OECD 1981). Mit weltweit harmonisierten Prüfmethode und gegenseitiger Anerkennung der Ergebnisse ist der erhebliche Aufwand der Prüfungen und Beurteilung der Stoffe deutlich reduzierbar, gleichzeitig können überflüssige Tierversuche entfallen. Die OECD-Richtlinien sind Empfehlungen für die im Chemikaliengesetz vorgeschriebenen Prüfungen (Chemikaliengesetz 1980, 1990). Hiernach ist die Bestimmung der Bioakkumulation bei Produktionsmengen von 1000 t p.a. zwingend vorgeschrieben. Gibt es - z.B. aufgrund hoher Toxizitäten im Tierversuch oder einer starken Fettlöslichkeit - Verdachtsmomente auf eine starke Anreicherung in Biota, muß auch bei kleineren Produktionsmengen geprüft werden. Bei Pflanzenschutzmitteln muß bei einem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten größer als 1000 ($= \log P_{ow} > 3$) die Bioakkumulation des Wirkstoffes und ggf. seiner relevanten Metaboliten im Fisch nach international anerkannten Prüfmethode wie z.B. der OECD Test Guideline 305 E bestimmt werden. Untersuchungen können auch dann erforderlich werden, wenn bei einem $\log P_{ow} < 3$ unter bestimmten Voraussetzungen, insbesondere bei hoher Persistenz des Wirkstoffes bzw. seiner Abbauprodukte, eine Bioakkumulation nicht auszuschließen ist (Umweltbundesamt 1991). Biozide wie die antibakterielle Substanz Triclosan oder die zu den Insektiziden gehörenden Pyrethroide, die sich von dem natürlichen Insektizid Pyrethrum ableiten, gelangen durch ihren großen Nutzwert für Hygiene und Ernährung in zum Teil großen Mengen in die Umwelt, hauptsächlich durch Abwässer und die Landwirtschaft.

Die Tendenz von in Wasser gelösten Substanzen, sich in aquatischen Organismen anzureichern, wird durch den Biokonzentrationsfaktor (BCF) ausgedrückt. Der BCF ist ein wichtiger Parameter zur Abschätzung des Umweltverhaltens von Substanzen. Die Bioakkumulation ist seit mehr als 40 Jahren als Problem erkannt. In Studien zeigte sich, daß die Anreicherung von Pestiziden für Reproduktionsfehler in Vögeln verantwortlich war. Der Mensch kann über den Konsum von Fisch ebenfalls Substanzen anreichern, als Beispiel sei die Aufnahme von DDT genannt, das sich beim Menschen vor allem in der Muttermilch findet. Die Ermittlung der Bioakkumulation dient somit auch zur Risikoabschätzung der menschlichen Exposition durch Umweltchemikalien.

1.1 Theorie der Aquatischen Bioakkumulation

Der Mensch trägt jedes Jahr viele Millionen Tonnen chemischer Substanzen in die Biosphäre ein. Aquatische und terrestrische Organismen sind diesen Substanzen ausgesetzt. Besonders in aquatischen Organismen ist die Bioakkumulation ein Prozeß, der zu höheren Konzentrationen als im umgebenden Wasser führt; falls das Wasser die Hauptroute der Aufnahme darstellt, spricht man von Biokonzentration, falls die Nahrung die Hauptroute der Aufnahme darstellt, spricht man von Biomagnifikation (Abbildung 2). Das Ausmaß der Aufnahme von Chemikalien und die Aufnahme- und Abgabewege können sich je nach Art des Organismus unterscheiden. Die Eigenschaft, Substanzen zu speichern, ist eine Grundvoraussetzung stofflicher Kreisläufe; auch natürlich vorkommende Elemente werden angereichert (C, N, P). Chemikalien werden auf vielen verschiedenen Wegen aufgenommen, durch Luft, Wasser, Nahrung, Boden und Sediment. Die Aufnahme hängt von der Umgebung und physiologischen Faktoren ab. Säugetiere beispielsweise atmen und nehmen daher Chemikalien aus der Luft auf. Fische hingegen atmen Sauerstoff durch Kiemen und nehmen darum Chemikalien überwiegend aus dem Wasser auf.

Das Verhältnis der Konzentration eines Stoffes zur Konzentration in der Nahrung bzw. im umgebenden Medium nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes bezeichnet man als Anreicherungsfaktor (Biokonzentrationsfaktor, Bioakkumulationsfaktor, kurz BCF). Die Biokonzentration ist das Verhältnis von Aufnahme zur Abgabe, der Elimination. Ist das Verhältnis Anreicherung zu Abgabe größer eins, so spricht man von Bioakkumulation:

$$\text{BCF} = \frac{\text{Konzentration im Organismus}}{\text{Konzentration im Wasser / Nahrung}}$$

Der BCF wird üblicherweise in [kg/l] angegeben. Der kinetisch bestimmte BCF ist einheitslos, da hier der Quotient aus zwei Geschwindigkeitskonstanten gebildet wird.

Biokonzentration	Anreicherung einer Chemikalie durch Aufnahme aus dem umgebenden Medium ohne Berücksichtigung der Aufnahme über die Nahrung.
Biomagnifikation	Anreicherung einer Chemikalie durch Aufnahme mit der Nahrung ohne Berücksichtigung der Aufnahme über die Körperoberfläche.
Bioakkumulation	Anreicherung einer Chemikalie auf beiden o. g. Wegen.
Ökologische Magnifikation	Konzentrationszunahme einer Substanz in einem Ökosystem oder einer Nahrungskette.

Abbildung 2: Klassifizierung der Anreicherung von Xenobiotika in Organismen

Für die meisten aquatischen Lebewesen ist die Aufnahme aus dem Wasser und die Elimination in das Wasser der Hauptweg für den Stoffaustausch von Xenobiotika. In aquatischen Systemen laufen Biokonzentration und Biomagnifikation parallel ab, wobei im System Fisch/Wasser die Aufnahme über die Kiemen und die Körperoberfläche überwiegt (Barron 1990, Parlar und Angerhöfer 1991). Daher werden in dieser Arbeit die Begriffe Biokonzentration und Bioakkumulation synonym verwendet.

1.1.1 Aufnahme von Chemikalien durch aquatische Organismen

Verschiedene Prozesse sind an der Aufnahme von Chemikalien in aquatischen Organismen beteiligt. Jeder Prozeß beinhaltet die Passage einer Substanz durch eine biologische Membran, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Die passive Diffusion ist der Hauptaufnahmeweg für viele organische Substanzen sowie auch für manche Metalle und Organometalle. Die treibende Kraft ist ein Konzentrationsgefälle bzw. exakter ein Fugazitätsgefälle (van Leeuwen und Hermens 1995). Organismen haben eine höhere Speicherkapazität für Xenobiotika pro Volumeneinheit als Wasser: Metalle binden an Proteine und können daher in relativ großen Mengen im Organismus gespeichert werden. Lipophile organische Chemikalien werden im Fettgewebe abgelegt und können so hohe Konzentrationen im Gewebe erreichen. Organometalle werden sowohl in Lipiden als auch in Proteinen gespeichert. Die Konzentration von Xenobiotika im Wasser ist in der Umwelt meist gering. Da jedoch die Speicherkapazität (die Löslichkeit) ebenfalls gering ist, ist die Fugazität relativ groß. Die Konzentration im Organismus ist anfangs gering, sie kann aber während der Aufnahmephase deutlich höhere Werte erreichen als die Konzentration im Wasser.

Bei den Aufnahmewegen von Xenobiotika gibt es zusätzlich zur passiven Diffusion noch weitere Aufnahmewege in Organismen: Diffusion durch Proteinporen, den carriervermittelten aktiven Transport, Ionenkanäle, Ionenpumpen, oder Endocytose (Abbildung 3).

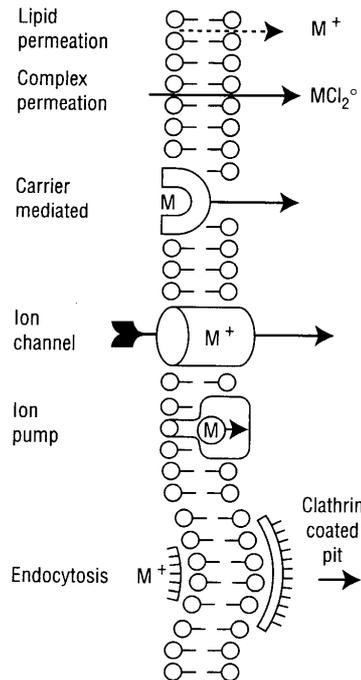


Abbildung 3: Aufnahmewege für Chemikalien in Fische (van Leeuwen und Hermens 1995)

Die Aufnahme von Chemikalien durch passive Diffusion ist nicht beeinflussbar, Organismen können aber die Aufnahme durch andere, aktive Aufnahmeprozesse beeinflussen. Die Aufnahme hydrophober Substanzen ist innerhalb einer Spezies relativ konstant, bei Metallen und Organometallen differiert die Aufnahme je nach Umweltbedingung durch Liganden stark.

1.1.2 Elimination von Chemikalien aus aquatischen Organismen

Eine Reihe von verschiedenen Prozessen verringert die Konzentration von Chemikalien in Organismen. Wiederum sind sowohl passive als auch aktive Mechanismen für die Elimination von Chemikalien verantwortlich. Ein Großteil der hydrophoben Substanzen wird durch passive Diffusion entfernt, entweder direkt in das umgebende Wasser oder über andere Ausscheidungswege abgegeben. Eine andere Möglichkeit zur deutlichen Verringerung der Konzentration von Chemikalien in Organismen ist das Wachstum sowie die Reproduktion (durch die Milchproduktion oder in Form von Eiern). Eine Biotransformation (Metabolismus) wandelt Substanzen zu hydrophileren Substanzen um, die leicht ausgeschieden werden können, und verringert so die Chemikalienkonzentration im Fisch.

1.1.3 Quantitative Struktur-Wirkungs Analyse (QSAR)

Aus dem Modellansatz einer einfachen Verteilung einer Substanz zwischen Fischlipid und Wasser (hydrophobes Modell) folgt, daß die Aufnahmegeschwindigkeit einer Substanz in den Fisch linear mit der Hydrophobie einer Substanz ansteigen sollte (angegeben als Logarithmus des n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$). Diese Annahme besitzt jedoch nur bis zu etwa einem $\log P_{OW}$ von 6 Gültigkeit, dann sinkt der BCF wieder ab, die Beziehung zwischen BCF und $\log P_{OW}$ hat eine Parabelform (Nendza 1998). Faktoren wie Molekülgröße, Molekülladung, pH-Wert, Größe der Testorganismen und Metabolismus (s.u.) spielen zusätzlich eine Rolle. Der BCF kann daher bei lipophilen Substanzen nicht ausschließlich aus der Hydrophobie vorhergesagt werden. Die Extrapolation des BCF aus dem $\log P_{OW}$ dient somit nur zur ersten Risikoabschätzung einer Substanz, genauere Daten müssen für jede Substanzklasse experimentell ermittelt werden. Die Berechnung und Vorhersage des BCF aus physiko-chemischen Parametern wird als quantitative Struktur-Wirkungs-Analyse bezeichnet (QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship). Diese Beschreibung der biologischen Wirkung von Chemikalien mit Hilfe der physikalisch-chemischen Strukturparameter ist an zahlreichen Beispielen belegt (Hansch et al. 1995, Hathway 1982, Ikemoto et al. 1992, Könemann 1991, Mangelsdorf und Pölloth 1997, Nendza 1998, Schüürmann und Klein 1988, Schüürmann und Marsmann 1991, Seydel und Schaper 1979). So korreliert der BCF für viele organische Substanzen für ein bestimmtes biologisches System mit dem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Der Einsatz von QSARs als Voraussageinstrument hat als Vorteile schnell verfügbare Ergebnisse, die Einsparung von Prüfkosten und die Einschränkung von Tierversuchen.

Die Notwendigkeit, trotz dieser zahlreichen bekannten Beziehungen zwischen dem BCF und dem Verteilungskoeffizienten weitere Biokonzentrationsfaktoren experimentell zu bestimmen, liegt zum einen an der Synthese und dem Inverkehrbringen immer neuer Substanzen oder gänzlich neuer Substanzklassen sowie in den unterschiedlichen Beobachtungen bei der Bioakkumulation. Als Resultat zeigt sich, das mit nur einer Korrelationsgleichung und bei sehr unterschiedlichen Substanzklassen die realen Abweichungen ganz erheblich sein können. Nachfolgend sind einige Korrelationsgleichungen für die Beziehung zwischen dem BCF und dem $\log P_{OW}$ zusammengestellt (aus: Umweltbundesamt 1991):

$$\log \text{BCF} = 0,542 \log P_{OW} + 0,124 \quad (\text{Neely et al. 1974})$$

$$\log \text{BCF} = 1,16 \log P_{OW} - 0,75 \quad (\text{Metcalf et al. 1975})$$

$$\log \text{BCF} = 1,0 \log P_{OW} - 1,32 \quad (\text{Mackay 1982})$$

$$\log \text{BCF} = 1,02 \log P_{OW} - 1,82 \quad (\text{Saarikoski und Viluksela 1982})$$

$$\log \text{BCF} = 0,75 \log P_{\text{OW}} - 0,32 \quad (\text{Schüürmann und Klein 1988})$$

$$\log \text{BCF} = 0,416 \log P_{\text{OW}} + 0,120 \quad (\text{Butte et al. 1988})$$

$$\log \text{BCF} = 0,550 \log P_{\text{OW}} + 0,132 - 1,50 D \quad (\text{Butte et al. 1988})$$

[D: für bestimmte Strukturen]

$$\log \text{BCF} = 0,77 \log P_{\text{OW}} - 0,70 + \sum F_i \quad (\text{Meylan et al. 1999})$$

[F_i: Korrekturfaktor für bestimmte Substanzen bzw. Substanzgruppen]

Neben den Beziehungen zwischen dem $\log P_{\text{OW}}$ und dem $\log \text{BCF}$ gibt es weitere Modelle und Korrelationsgleichungen, die auf Beziehungen zwischen dem BCF und verschiedenen molekularen Parametern basieren, wie z.B. Molekulargewicht, Molekülquerschnitt, Moleküloberfläche, Konnektivitätsindices u.a.m.

Allen bisher vorgestellten Modellen ist gemeinsam, das sie trotz vielfältiger Modifikationen und Verbesserungen den teilweise hohen Varianzen experimenteller Daten nicht gerecht werden.

Die Ursachen für Abweichungen von einer linearen $\log P_{\text{OW}} / \log \text{BCF}$ –Beziehung sind vielfältig:

- Molekülgröße: reduzierte Membranpermeation durch Moleküle mit einem Molekulgewicht > 450, oder bei räumlicher Betrachtung des Moleküls bei einem zweitgrößter Durchmesser von mehr als 1,05 nm,
- Dissoziation der Substanz bei ionisierbaren Verbindungen; hier scheint der Dissoziationsgrad den BCF -Wert zu beeinflussen,
- Grenzflächenaktivität von Substanzen (Detergentien),
- reduzierte Bioverfügbarkeit aufgrund sehr geringer Wasserlöslichkeit,
- starke Variabilität in der Morphologie, innerhalb von Individuen und Arten,
- methodische Fehler z.B. aufgrund von Diskrepanzen zwischen der Nominal- und der Effektivkonzentration,
- sehr hohe Lipophilie, d.h. $\log P_{\text{OW}} > 6$,
- unklarer Bezug der BCF -Werte (keine Angabe, worauf der BCF bezogen wurde, z.B. Frischgewicht, Trockengewicht, Lipid u.a.),
- Metabolismus im Organismus.

1.1.4 Einflußfaktoren auf die Bioakkumulation

Molekülgröße: Die Akkumulation beginnt immer mit der Aufnahme der Substanz durch die Kiemen. Nach der Abgabe der Chemikalie an die Körperflüssigkeit wird sie zu den Geweben transportiert und dort, z.B. im Fett, gespeichert. Auf diesem vereinfacht dargestellten Weg vom Wasser in das Fettgewebe müssen viele Barrieren passiert werden. So bestehen z. B. die Kiemen aus biologischen Membranen und Schichten

unterschiedlicher Zusammensetzung. Membranen sind, bei einfacher Betrachtung, aus einer zentralen Lipiddoppelschicht und einem äußeren und inneren Proteinfilm aufgebaut. Die Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht sind in das Membranzentrum gerichtet, die hydrophilen Enden nach innen und außen (Abbildung 3, Seite 5). Der Membrandurchgang einer hydrophoben Substanz kann als passive Diffusion betrachtet werden. Jedoch müssen für den Eintritt einer Substanz in das Membrannere Löcher auf der polaren Membranseite geschaffen werden. Der Durchgang einer Substanz ist daher von der Größe dieser Membranporen abhängig. Aufbau und Molekülgröße sind daher wesentliche Faktoren, wenn ein Molekül durch die Membran transportiert werden soll (Butte et al. 1993, Sijm und van der Linde 1995). In Guppys ist die kritische Größe ein Moleküldurchmesser von 0,95 nm, oberhalb der keine Aufnahme mehr stattfindet. Beispiele sind die Nichtaufnahme von Hexabrombenzol, Oktachlornaphtalin, Oktachlordibenzo-p-dioxin und Dekadibrombiphenyl (Gobas et al. 1986). Für andere Fische, wie zum Beispiel Goldfische oder Regenbogenforellen konnte beobachtet werden, daß auch größere Moleküle akkumuliert werden (Gobas et al. 1986).

Auch die Moleküllänge ist entscheidend: Polydimethylsiloxane und n-Alkane länger als 4,3 nm können nicht mehr aufgenommen werden. Die Länge von 4,3 nm entspricht der mittleren Distanz zwischen den polaren Endgruppen der Lipiddoppelschicht in einer Membran.

Molekülladung: Viele Xenobiotika kommen in der Umwelt als negativ oder positiv geladen Moleküle vor. Die Ladung hat einen großen Einfluß auf die Bioakkumulation, da geladene Moleküle viel langsamer durch die Membran transportiert werden. Der Einfluß vom pH-Werte des Wassers auf die Bioakkumulation wird in dieser Arbeit ausführlich am Beispiel der Bioakkumulation von Triclosan untersucht.

Bioverfügbarkeit: Der tatsächlich frei verfügbare Anteil einer Substanz ist entscheidend für die Bioakkumulation, je stärker eine Substanz von Substanzen oder gelöstem Material adsorbiert wird, desto geringer ist der frei verfügbare Anteil.

Oberfläche-Volumen-Verhältnis: Die Größe der Testorganismen hat ebenfalls einen Einfluß auf die Akkumulation. Größere Organismen benötigen weniger Sauerstoff pro Volumeneinheit und haben im Verhältnis kleinere Atmungsorgane. Der Austausch von Substanzen in oder aus dem Organismus hängt mit der Austauschoberfläche über das Fick'sche Gesetz zusammen. Kleinere Organismen akkumulieren und eliminieren Substanzen schneller als Größere, so nimmt die Kiemenoberfläche bei Forellen von 3 cm²/g bei einem Fischgewicht von 3 g auf 1,97 cm²/g bei Forellen mit einem Gewicht von 1000 g ab (Fishbase 1997).

Morphologie: Die Aufnahme von Substanzen in aquatischen Organismen geschieht nicht nur über die Kiemen, sondern auch über die Haut. Die Zusammensetzung und Dicke der Haut spielt genauso eine Rolle wie die Größe der Hautoberfläche im Vergleich zur Kiemenoberfläche.

Biotransformation: Der Metabolismus von Substanzen verringert ebenfalls die Konzentration von Xenobiotika im Organismus. Die Biotransformation findet im Organismus hauptsächlich in der Leber statt, aber auch in der Haut. Diverse Enzymsysteme bilden polare Produkte in zwei Phasen, die als Phase I und II bezeichnet werden. Phase I Reaktionen umfassen Hydrolyse, Reduktion und Oxidation; in Phase II finden üblicherweise Konjugationen statt. Während der Phase I wird das Molekül durch den Einbau polarer Gruppen wie die Hydroxy- (-OH), Carboxyl- (-COOH) oder Amino- (-NH₂) Gruppe modifiziert. Diese Produkte der Phase I sind meist reaktive Substanzen, die dann in der Phase II zum Glucuronid, Sulfat, Acetylkongugat oder Glutathionkongugat konjugiert werden können. Diese konjugierten Produkte werden dann leicht ausgeschieden. In Tabelle 1 ist ein Überblick über die wichtigsten Enzymsysteme dargestellt. Eine weiterführende Darstellung ist in Lehrbüchern der Biochemie oder bei van Leeuwen und Hermens (1995) zu finden.

Tabelle 1: Die wichtigsten Pestizide metabolisierenden Enzymsysteme

Enzymsystem	Lokation	Metabolisierte Verbindung
<i>Phase I-Reaktionen</i>		
Mischfunktionelle Oxidasen	Mikrosomen, bekannt in Lebern von Vertebraten und dem Körperfett von Insekten	Viele fettlösliche Pestizide
Phosphatasen	In nahezu allen Geweben und Zellfraktionen vorhanden	Organophosphorinsektizide und Nervengasen
Carboxyesterasen	In den meisten Geweben von Insekten und Vertebraten	Malathion und Malaoxon
Epoxidhydroxilase	Mikrosomen, teilweise in der Säugetierleber	Dieldrin, Heptachlor und Epoxide
DDT-dehydrochlorinase	Nahezu alle Insekten und Vertebraten	pp'-DDT und p,p'-DDD
<i>Phase II-Reaktionen</i>		
Glucuronyltransferase	Hauptsächlich in Mikrosomen, verbreitet in Vertebraten und Insekten	Verbindungen mit labilem Wasserstoff, auch hydroxylierten Metaboliten
Glutathion-S-transferase	70 000 g Überstand von Vertebraten und Insekten	Chlorierte Verbindungen, z.B. γ-HCH, ebenso manche Epoxide

1.2 Mathematische Modelle der Bioakkumulation in aquatischen Organismen

Zur Beschreibung der Kinetik der Biokonzentration organischer Substanzen in Fischen werden mathematische Modelle herangezogen. Diese beruhen auf der Annahme einer unterschiedlichen Anzahl von Kompartimenten (auch: Kompartments) und auf unterschiedlichen Beschreibungen der Kinetik des Stoffaustausches zwischen den Kompartimenten (Kinetik nullter, erster oder zweiter Ordnung). Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Aufnahme einer lipophilen Substanz im Fisch aus dem Wasser, dann erhält man typischerweise eine sog. Sättigungskurve (Abbildung 4):

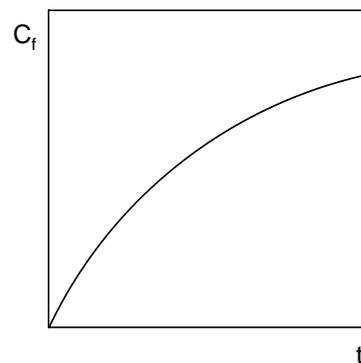


Abbildung 4: Sättigungskurve

Die Geschwindigkeit der Konzentrationszunahme hängt von den Geschwindigkeiten der Aufnahme und der Ausscheidung ab. Zur mathematischen Beschreibung der Verteilung von Chemikalien zwischen Fisch und Wasser werden Zwei- und Dreikompartimentmodelle herangezogen (Abbildung 5 und Abbildung 6, Seite 12):

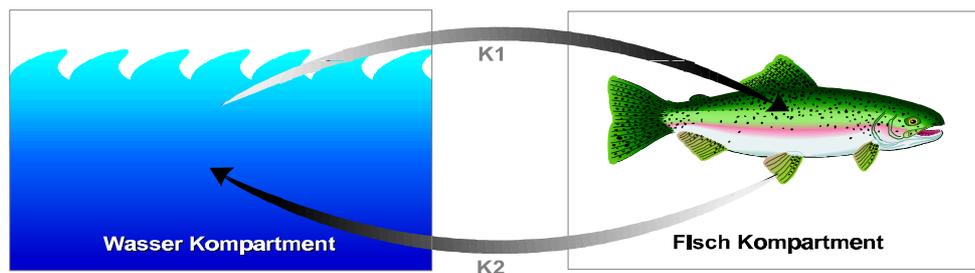


Abbildung 5: Bioakkumulation nach dem Zweikompartimentmodell

1.2.1 Das Zweikompartimentmodell

Für organische Chemikalien kann man oft von einem Zweikompartimentmodell ausgehen (Kompartiment 1: Wasser, Kompartiment 2: Fisch). Dabei wird sowohl für die Aufnahme als auch für die Abgabe der Chemikalie eine Kinetik erster Ordnung im Fisch zugrunde gelegt.

$$\text{Aufnahme: } \frac{dc_f}{dt} = k_1 \cdot c_w \quad (\text{Gl. 1})$$

$$\text{Abgabe: } \frac{dc_f}{dt} = -k_2 \cdot c_f \quad (\text{Gl. 2})$$

- C_f : Konzentration im Fisch
 C_w : Konzentration im Wasser (als konstant angenommen)
 k_1 : Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme
 k_2 : Geschwindigkeitskonstante der Abgabe
 t : Zeit

Die zeitliche Änderung der Konzentration der Substanz im Fisch lässt sich wie folgt beschreiben:

$$\frac{dc_f}{dt} = k_1 \cdot c_w - k_2 \cdot c_f \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Gleichung (Gl. 3) gilt für die Aufnahmephase. Für die Eliminationsphase mit $C_w=0$ reduziert sie sich zu Gleichung (Gl. 2). Im Gleichgewichtszustand ($t \rightarrow \infty$) ist die Geschwindigkeit der Aufnahme einer Substanz aus dem Wasser gleich der Geschwindigkeit der Abgabe in das Wasser, d.h. $dc_f / dt = 0$. Aus Gleichung (Gl. 3) folgt dann:

$$BCF = \lim_{t \rightarrow \infty} \left(\frac{c_f}{c_w} \right) = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{Gl. 4})$$

(Anmerkung: Die BCF_{kin} -Werte aus kinetischen Daten sind demzufolge ohne Einheiten anzugeben, da BCF-Werte üblicherweise aus Gleichgewichtsmessungen stammen, wird der BCF im allgemeinen in [kg/l] angegeben).

Die Lösungen der Differentialgleichungen für das Zweikompartimentmodell wurden von Blau et al. (1975) beschrieben. Für die Akkumulationsphase ergibt sich als Lösung:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} c_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Gl. 5})$$

Für die Eliminationsphase, die zum Zeitpunkt $t = t^*$ beginnt, gilt:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} c_w [e^{-k_2(t-t^*)} - e^{-k_2 t}] \quad (\text{Gl. 6})$$

Da die Gleichungen nicht linearisiert werden können, erfolgt die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten durch nichtlineare, iterative Regressionsanalyse. Das speziell zu diesem Zweck entwickelte BASIC-Programm „Biokonz“ berücksichtigt für die Modellierung sowohl die Akkumulations- als auch die Eliminationsphase und lässt zudem variierende Konzentrationen im Wasser zu (Butte 1991, Butte und Blum 1984).

Die biologische Halbwertszeit ($t_{1/2}$) einer Chemikalie in einem Organismus kann aus der Geschwindigkeitskonstante für die Elimination k_2 berechnet werden. Sie ist die Zeit, die benötigt wird, bis sich die Konzentration einer Chemikalie halbiert hat. Aus (Gl. 2) ergibt sich die Halbwertszeit:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} \quad (\text{Gl. 7})$$

1.2.2 Das Dreikompartimentmodell

In vielen Fällen ist das Zweikompartimentmodell gut geeignet, die experimentellen Daten eines Bioakkumulationsversuches zu beschreiben. Es existieren jedoch Fälle, bei denen es zu einer lange anhaltenden, langsamen Ausscheidung der Substanz aus einem „tiefen“ Kompartiment kommt. Dieses Verhalten wird dann durch das Dreikompartimentmodell besser beschrieben:

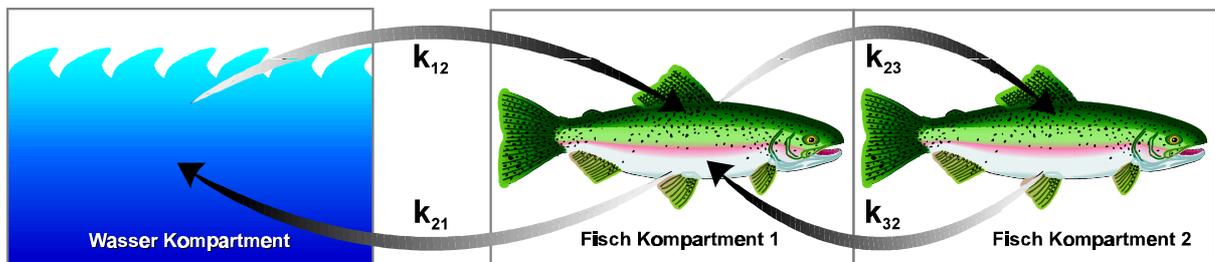


Abbildung 6: Bioakkumulation nach dem Dreikompartimentmodell

Es wird davon ausgegangen, daß im Fisch zwei mathematisch klar unterscheidbare, anatomisch aber nicht näher definierte Kompartimente bestehen. Zum Kompartiment des Wassers und dem „offenen“ Fischkompartiment kommt hier ein drittes, „tiefes“ Fischkompartiment hinzu. Dem „tiefen“ Kompartiment kann allerdings keinerlei anatomische bzw. stoffwechselphysiologische Bedeutung zugeordnet werden. Weist das Modell auf ein „tiefes“ Kompartiment hin, so obliegt es dem Forscher ihm eventuell eine solche Bedeutung zuzuweisen.

Ausgehend von einer Kinetik erster Ordnung und konstanten Konzentrationen einer Substanz im Wasser ($dc_w / dt = 0$) lauten die Differentialgleichungen zur Beschreibung der Akkumulation einer Substanz aus dem Wasser durch den Fisch in das „offene“ Fischkompartiment 2 (Gl. 8) und in das „tiefe“ Fischkompartiment 3 (Gl. 9) wie folgt:

$$\frac{dc_2}{dt} = k_{12} \cdot c_1 - k_{21} \cdot c_2 + k_{32} \cdot c_3 - k_{23} \cdot c_2 \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\frac{dc_3}{dt} = k_{23} \cdot c_2 - k_{32} \cdot c_3 \quad (\text{Gl. 9})$$

Unter der gleichen Voraussetzung gilt für die Elimination für die Fischkompartimente 2 und 3 (Gl. 10) und (Gl. 11):

$$\frac{dc_2}{dt} = -k_{21} \cdot c_2 + k_{32} \cdot c_3 \quad (\text{Gl. 10})$$

$$\frac{dc_3}{dt} = k_{23} \cdot c_2 - k_{32} \cdot c_3 \quad (\text{Gl. 11})$$

Die Lösungen dieser Differentialgleichungen lauten für die Akkumulation (Könemann und van Leeuwen 1980):

$$c_f = A \cdot (1 - e^{-a \cdot t}) + B \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) \quad (\text{Gl. 12})$$

Wenn die Eliminationsphase unter steady-state-Bedingungen beginnt, so gilt unter Verwendung einer neuen Zeitskala ($t = t_e$):

$$c_f = A \cdot e^{-a \cdot t_e} + B \cdot e^{-b \cdot t_e} \quad (\text{Gl. 13})$$

Werden die steady-state-Bedingungen nicht erreicht, so kann die Konzentration der Substanz im Fisch während der Eliminationsphase folgendermaßen beschrieben werden (Butte 1991):

$$c_f = A \cdot \left[e^{-a \cdot (t-t^*)} - e^{-a \cdot t} \right] + B \cdot \left[e^{-b \cdot (t-t^*)} - e^{-b \cdot t} \right] \quad (\text{Gl. 14})$$

Dabei entspricht t^* dem Zeitpunkt des Beginns der Eliminationsphase.

Der Biokonzentrationsfaktor ist dann:

$$BCF = \frac{A + B}{c_w} \quad (\text{Gl. 15})$$

Nach nichtlinearer Regression, das heißt nach Schätzung von A , B , α und β im Sinne einer optimalen Beschreibung der Meßdaten, können die Geschwindigkeitskonstanten nach folgenden Gleichungen errechnet werden (Könemann und van Leeuwen 1980):

$$k_{12} = \frac{a \cdot A + b \cdot B}{c_w} \quad (\text{Gl. 16})$$

$$k_{21} = a + b - \frac{a \cdot b}{c_w} \cdot \frac{A + B}{c_w} = a + b - \frac{a \cdot b \cdot BCF}{k_{12}} \quad (\text{Gl. 17})$$

$$k_{32} = \frac{a \cdot b}{k_{21}} \quad (\text{Gl. 18})$$

$$k_{23} = a + b - k_{21} - k_{32} \quad (\text{Gl. 19})$$

Die mathematischen Methoden, das heißt graphische und lineare sowie nichtlineare Regressionsanalyse zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Kinetik der Akkumulation und Elimination, sowie des Biokonzentrationsfaktors wurden bereits ausführlich beschrieben (Butte 1991).

1.3 Testverfahren zur Bestimmung von Biokonzentrationsfaktoren

Biokonzentrationsfaktoren (BCF's) werden nach internationalen, standardisierten Testverfahren vor allem im System Fisch / Wasser, aber auch mit anderen Testorganismen wie Daphnien, Algen, Klärschlamm oder Tubifiziden ermittelt. Man unterscheidet dabei zwischen **statischen Verfahren** (OECD No. 305 A, B, D) und **dynamischen Verfahren** (OECD No. 305 C, E) (Tabelle 2, Seite 15). Als Testfische werden Zebrabärblinge, Doppelkopffritzen, Guppies oder Regenbogenforellen empfohlen. Bei den statischen Verfahren unterscheidet man:

- "Static Fish Test" (OECD No. 305 D): Die Fische werden acht Tage einer definierten Konzentration der zu untersuchenden Chemikalie im Wasser ausgesetzt. Das Wasser wird während des Versuchs nicht erneuert. Parallel zur Fischprobennahme werden aus einem Kontrollbecken, das keine Testorganismen enthält, sonst aber unter identischen Bedingungen gehalten wird, Wasserproben zur Kontrolle über einen möglichen Substanzverlust entnommen. Nach acht Tagen wird der BCF als Quotient aus der Chemikalienkonzentration im Fischgewebe und der Konzentration der Chemikalie im Wasser ermittelt.
- "Sequential Static Fish Test" (OECD No. 305 B): Dieser Test ähnelt dem "Static Fish Test", allerdings ist die Expositionszeit nicht festgelegt. In Vorversuchen wird die ungefähre Zeitspanne ermittelt, die zur Gleichgewichtseinstellung der Substanzkonzentration im System Fisch / Wasser benötigt wird. Außerdem schließt sich eine höchstens zehn Tage dauernde Eliminationsphase an, um die Geschwindigkeitskonstante der Abgabe zu bestimmen.
- "Semi Static Fish Test" (OECD No. 305 A): Wie beim "Sequential Static Fish Test" ist die Dauer des Versuchs nicht festgelegt, sondern wird in Vorversuchen ermittelt. Um eine konstante Chemikalienkonzentration im Wasser während des Versuchs zu gewährleisten, werden die Fische alle 48 Stunden in ein Becken mit "erneuertem" Testwasser umgesetzt.

Die BCF-Werte, die an Hand dieser statischen Methoden erhalten werden, können verfälscht sein, denn die Gleichgewichtseinstellung zwischen Aufnahme und Abgabe der Substanz (steady state) kann besonders bei sehr lipophilen Stoffen nicht immer vollständig in der Expositionszeit gewährleistet werden. Außerdem ist bei flüchtigen,

schwer wasserlöslichen oder stark akkumulierenden Substanzen das Einhalten einer konstanten Konzentration der Testchemikalie im Wasser schwierig. Diese Probleme treten bei den dynamischen Fischtestverfahren nicht auf, da mit Hilfe eines dynamischen Durchflusssystems für eine konstante Chemikalienkonzentration im Wasser gesorgt wird.

Die dynamischen Verfahren ("Flow Through Fish Test") sind:

- "Plateau Methode" (OECD No. 305 C): Die Fische werden einer konstanten Konzentration der Testchemikalie in einem Durchflusssystem (Flow-Through) ausgesetzt. Der Versuch ist beendet, wenn keine Konzentrationsveränderungen im Fischgewebe mehr auftreten (steady state). Die Expositionszeit ist auf maximal 56 Tage (8 Wochen) limitiert.
- "Kinetische Methode" (OECD No. 305 E): Die Bedingungen sind ähnlich wie bei der "Plateau-Methode", allerdings schließt sich eine Eliminationsphase an. Die Expositionszeiten sind wesentlich kürzer, da hier der Biokonzentrationsfaktor aus kinetischen Daten berechnet wird und somit keine Gleichgewichtseinstellung (steady state) erforderlich ist. Zudem lassen sich nahezu unlösliche, sehr lipophile oder stark an Feststoffe adsorbierende Substanzen wie z.B. Pyrethroide oder auch andere Stoffe mit statischen Versuchsanordnungen nicht mehr untersuchen.

Tabelle 2: OECD Verfahren zur Bestimmung von Biokonzentrationsfaktoren (Butte et al. 1988)

Fischtest	Experimenteller Aufwand	Bestimmung des BCF	Information
Static OECD Nr. 305 D	gering	c_f / c_w	BCF (BCF ₈)
Sequential Static OECD Nr. 305 B	gering – mittel	c_f / c_w	BCF = f(c _w), k ₂
Semi Static OECD Nr. 305 A	gering – mittel	c_f / c_w	BCF ₂₈
Flow Through Plateau OECD Nr. 305 C	mittel	c_f / c_w	BCF / BCF ₅₆
Flow Through Kinetic OECD Nr. 305 E	hoch	k_1 / k_2	BCF _∞ , k ₁ , k ₂

c_f Konzentration im Fisch, c_w Konzentration im Wasser, k₁ Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k₂ Geschwindigkeitskonstante der Elimination, BCF Biokonzentrationsfaktor, mit Angabe der Versuchsdauer

1.4 Aufgabenstellung

Bei der Bioakkumulation von dissoziierenden Substanzen scheint der BCF außer von den lipophilen Eigenschaften auch von der Säurestärke, dem pK_a -Wert, abzuhängen. Saarikoski und Viluksela (1982) beobachteten eine unterschiedlich starke Akkumulation einer sauren Substanz bei Variation des pH-Wertes des Wassers. Dieser pH-Effekt wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Dave 1984, Kobayashi und Kishino 1980 b, Lohner und Fischer 1990, Lydy et al. 1990, Spehar et al. 1983, Zhao et al. 1996), wobei die Akkumulation der untersuchten Substanzen in statischen Systemen gemessen wurde. Dabei wurde generell bei bekanntem pK_a -Wert eine Abnahme der Bioakkumulation und der Toxizität mit steigendem pH-Wert des Wassers beobachtet. Hingegen konnten Butte et al. (1988), die Biokonzentrationswerte (BCF-Werte) zahlreicher Phenole aus kinetischen Daten im Durchflußsystem bestimmten, keine Korrelation zwischen dem pK_a -Wert und dem Biokonzentrationsfaktor feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob der Dissoziationsgrad, der bei dissoziierenden Verbindungen vom pH-Wert des Wassers abhängig ist, einen Einfluß auf die Kinetik der Bioakkumulation dissoziierender Verbindungen im System Fisch/Wasser hat. Dazu sollte die Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan, ein Trichlorphenoxyphenol, an Zebraabräblingen (*brachydanio rerio*) bei unterschiedlichen pH-Werten des Wassers untersucht werden. Der BCF sollte dabei aus kinetischen Daten berechnet werden.

Bisherige Untersuchungen zur Bioakkumulation von Pyrethroiden führten, trotz der sehr lipophilen Eigenschaften (mit $\log P_{OW}$ -Werten von 6 bis 7) zu eher geringen BCF-Werten zwischen 50 (statische Systeme) bis 3000 (Durchflußsysteme). Einige der Messungen waren jedoch wenig aussagekräftig, da wegen der geringen Wasserlöslichkeit, der starken Adsorption an Oberflächen und der akuten Toxizität der Pyrethroide für Fische nur geringe Konzentrationen eingesetzt werden konnten, was die Analytik und einen verlässlichen Versuchsverlauf schwierig macht.

In dieser Arbeit sollten die Kinetik der Akkumulation und Clearance und die daraus zu berechnenden BCF-Werte der Pyrethroide Cypermethrin, Cyfluthrin, Deltamethrin und Permethrin untersucht werden. Als Testfische sollten Regenbogenforellen eingesetzt werden. Sie standen in der Außenstelle Ahrensburg des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg aus institutseigener Zucht zur Verfügung und sind eine der in internationalen Testvorschriften vorgesehene Spezies (OECD 1996). Da Pyrethroide extrem toxisch für Fische sind, insbesondere für Regenbogenforellen, sollten zudem die akuten Toxizitäten der Pyrethroide als LC_{50} -Werte (96 Stunden) überprüft werden. In weiteren Versuchen sollte der Einfluß der

einzelnen Pyrethroide auf die mischfunktionelle Oxidasen Aktivität von Forellenlebern (MFO-Aktivität) untersucht werden. Dazu sollten die Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivitäten (EROD-Aktivitäten) in Leberpräparationen von Forellen bestimmt werden. Zum Nachweis eines eventuellen Metabolismus sollten zudem die Abbauprodukte der eingesetzten Pyrethroide in Forellen untersucht werden. Voraussetzung dafür war dabei die Entwicklung einer Methode zur Spurenanalytik von Pyrethroid-Metaboliten in fetthaltiger Matrix.

1. Bioakkumulation organischer Chemikalien im Rahmen der Charakterisierung der Umweltgefährlichkeit

Jede Tätigkeit des Menschen ist mit Wirkungen auf die Umwelt verbunden. Diese Wirkungen in Grenzen zu halten, insbesondere auch den Menschen selbst vor den Folgewirkungen seines eigenen Handelns zu schützen, ist Hauptanliegen des Umweltschutzes. Hierin eingeschlossen ist der Schutz der Natur und ihrer Ressourcen.

Rund acht Millionen chemischer Substanzen sind heute bekannt, mehr als 100 000 Chemikalien unterliegen derzeit dem Chemikalienrecht, und jährlich kommen mehrere hundert neue Stoffe hinzu. Weltweit werden ca. 300 Mio. t Chemikalien pro Jahr produziert. Sie dürfen keine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen (Umweltbundesamt 1997). Zur Beurteilung der Auswirkungen von Substanzen auf Mensch und Umwelt sind Kenntnisse ihrer Wirkung und der Exposition mit dieser Substanz nötig, d.h. der jährlichen Produktionsmenge und Freisetzung, der Verwendung, Verteilung, Akkumulation und Persistenz, des Abbaus in der Umwelt und im Organismus (Metabolismus) sowie der primären und sekundären toxischen Effekte (Parlar und Angerhöfer 1991, Günther 1975). Diese Abhängigkeit der Umweltgefährlichkeit einschließlich der Gefahr für den Menschen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

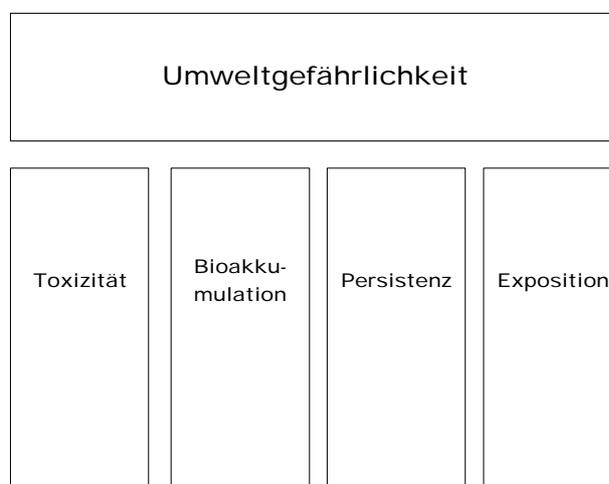


Abbildung 1: Vier-Säulen-Modell der Umweltgefährlichkeit von Chemikalien

Die Komplexität der physikalischen, chemischen und biologischen Vorgänge, mit denen sich das Verhalten einer Substanz in der Umwelt beschreiben lässt, führt zu dem Versuch, das Umweltverhalten anhand der chemischen Struktur bzw. mit chemisch-physikalischen Stoffkonstanten zu beschreiben. Im Rahmen des OECD¹-Prüfrichtlinien-

¹ Abk. für Organisation for Economic Cooperation and Development.

programms werden physikalisch-chemische, ökotoxikologische und toxikologische Prüfmethoden für die Bewertung von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln neu entwickelt, fortlaufend aktualisiert und international harmonisiert (OECD 1981). Mit weltweit harmonisierten Prüfmethoden und gegenseitiger Anerkennung der Ergebnisse ist der erhebliche Aufwand der Prüfungen und Beurteilung der Stoffe deutlich reduzierbar, gleichzeitig können überflüssige Tierversuche entfallen. Die OECD-Richtlinien sind Empfehlungen für die im Chemikaliengesetz vorgeschriebenen Prüfungen (Chemikaliengesetz 1980, 1990). Hiernach ist die Bestimmung der Bioakkumulation bei Produktionsmengen von 1000 t p.a. zwingend vorgeschrieben. Gibt es - z.B. aufgrund hoher Toxizitäten im Tierversuch oder einer starken Fettlöslichkeit - Verdachtsmomente auf eine starke Anreicherung in Biota, muß auch bei kleineren Produktionsmengen geprüft werden. Bei Pflanzenschutzmitteln muß bei einem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten größer als 1000 ($= \log P_{ow} > 3$) die Bioakkumulation des Wirkstoffes und ggf. seiner relevanten Metaboliten im Fisch nach international anerkannten Prüfmethoden wie z.B. der OECD Test Guideline 305 E bestimmt werden. Untersuchungen können auch dann erforderlich werden, wenn bei einem $\log P_{ow} < 3$ unter bestimmten Voraussetzungen, insbesondere bei hoher Persistenz des Wirkstoffs bzw. seiner Abbauprodukte, eine Bioakkumulation nicht auszuschließen ist (Umweltbundesamt 1991). Biozide wie die antibakterielle Substanz Triclosan oder die zu den Insektiziden gehörenden Pyrethroide, die sich von dem natürlichen Insektizid Pyrethrum ableiten, gelangen durch ihren großen Nutzwert für Hygiene und Ernährung in zum Teil großen Mengen in die Umwelt, hauptsächlich durch Abwässer und die Landwirtschaft.

Die Tendenz von in Wasser gelösten Substanzen, sich in aquatischen Organismen anzureichern, wird durch den Biokonzentrationsfaktor (BCF) ausgedrückt. Der BCF ist ein wichtiger Parameter zur Abschätzung des Umweltverhaltens von Substanzen. Die Bioakkumulation ist seit mehr als 40 Jahren als Problem erkannt. In Studien zeigte sich, daß die Anreicherung von Pestiziden für Reproduktionsfehler in Vögeln verantwortlich war. Der Mensch kann über den Konsum von Fisch ebenfalls Substanzen anreichern, als Beispiel sei die Aufnahme von DDT genannt, das sich beim Menschen vor allem in der Muttermilch findet. Die Ermittlung der Bioakkumulation dient somit auch zur Risikoabschätzung der menschlichen Exposition durch Umweltchemikalien.

1.1 Theorie der Aquatischen Bioakkumulation

Der Mensch trägt jedes Jahr viele Millionen Tonnen chemischer Substanzen in die Biosphäre ein. Aquatische und terrestrische Organismen sind diesen Substanzen ausgesetzt. Besonders in aquatischen Organismen ist die Bioakkumulation ein Prozeß, der zu höheren Konzentrationen als im umgebenden Wasser führt; falls das Wasser die Hauptroute der Aufnahme darstellt, spricht man von Biokonzentration, falls die Nahrung die Hauptroute der Aufnahme darstellt, spricht man von Biomagnifikation (Abbildung 2). Das Ausmaß der Aufnahme von Chemikalien und die Aufnahme- und Abgabewege können sich je nach Art des Organismus unterscheiden. Die Eigenschaft, Substanzen zu speichern, ist eine Grundvoraussetzung stofflicher Kreisläufe; auch natürlich vorkommende Elemente werden angereichert (C, N, P). Chemikalien werden auf vielen verschiedenen Wegen aufgenommen, durch Luft, Wasser, Nahrung, Boden und Sediment. Die Aufnahme hängt von der Umgebung und physiologischen Faktoren ab. Säugetiere beispielsweise atmen und nehmen daher Chemikalien aus der Luft auf. Fische hingegen atmen Sauerstoff durch Kiemen und nehmen darum Chemikalien überwiegend aus dem Wasser auf.

Das Verhältnis der Konzentration eines Stoffes zur Konzentration in der Nahrung bzw. im umgebenden Medium nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes bezeichnet man als Anreicherungsfaktor (Biokonzentrationsfaktor, Bioakkumulationsfaktor, kurz BCF). Die Biokonzentration ist das Verhältnis von Aufnahme zur Abgabe, der Elimination. Ist das Verhältnis Anreicherung zu Abgabe größer eins, so spricht man von Bioakkumulation:

$$\text{BCF} = \frac{\text{Konzentration im Organismus}}{\text{Konzentration im Wasser / Nahrung}}$$

Der BCF wird üblicherweise in [kg/l] angegeben. Der kinetisch bestimmte BCF ist einheitslos, da hier der Quotient aus zwei Geschwindigkeitskonstanten gebildet wird.

Biokonzentration	Anreicherung einer Chemikalie durch Aufnahme aus dem umgebenden Medium ohne Berücksichtigung der Aufnahme über die Nahrung.
Biomagnifikation	Anreicherung einer Chemikalie durch Aufnahme mit der Nahrung ohne Berücksichtigung der Aufnahme über die Körperoberfläche.
Bioakkumulation	Anreicherung einer Chemikalie auf beiden o. g. Wegen.
Ökologische Magnifikation	Konzentrationszunahme einer Substanz in einem Ökosystem oder einer Nahrungskette.

Abbildung 2: Klassifizierung der Anreicherung von Xenobiotika in Organismen

Für die meisten aquatischen Lebewesen ist die Aufnahme aus dem Wasser und die Elimination in das Wasser der Hauptweg für den Stoffaustausch von Xenobiotika. In aquatischen Systemen laufen Biokonzentration und Biomagnifikation parallel ab, wobei im System Fisch/Wasser die Aufnahme über die Kiemen und die Körperoberfläche überwiegt (Barron 1990, Parlar und Angerhöfer 1991). Daher werden in dieser Arbeit die Begriffe Biokonzentration und Bioakkumulation synonym verwendet.

1.1.1 Aufnahme von Chemikalien durch aquatische Organismen

Verschiedene Prozesse sind an der Aufnahme von Chemikalien in aquatischen Organismen beteiligt. Jeder Prozeß beinhaltet die Passage einer Substanz durch eine biologische Membran, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Die passive Diffusion ist der Hauptaufnahmeweg für viele organische Substanzen sowie auch für manche Metalle und Organometalle. Die treibende Kraft ist ein Konzentrationsgefälle bzw. exakter ein Fugazitätsgefälle (van Leeuwen und Hermens 1995). Organismen haben eine höhere Speicherkapazität für Xenobiotika pro Volumeneinheit als Wasser: Metalle binden an Proteine und können daher in relativ großen Mengen im Organismus gespeichert werden. Lipophile organische Chemikalien werden im Fettgewebe abgelegt und können so hohe Konzentrationen im Gewebe erreichen. Organometalle werden sowohl in Lipiden als auch in Proteinen gespeichert. Die Konzentration von Xenobiotika im Wasser ist in der Umwelt meist gering. Da jedoch die Speicherkapazität (die Löslichkeit) ebenfalls gering ist, ist die Fugazität relativ groß. Die Konzentration im Organismus ist anfangs gering, sie kann aber während der Aufnahmephase deutlich höhere Werte erreichen als die Konzentration im Wasser.

Bei den Aufnahmewegen von Xenobiotika gibt es zusätzlich zur passiven Diffusion noch weitere Aufnahmewege in Organismen: Diffusion durch Proteinporen, den carriervermittelten aktiven Transport, Ionenkanäle, Ionenpumpen, oder Endocytose (Abbildung 3).

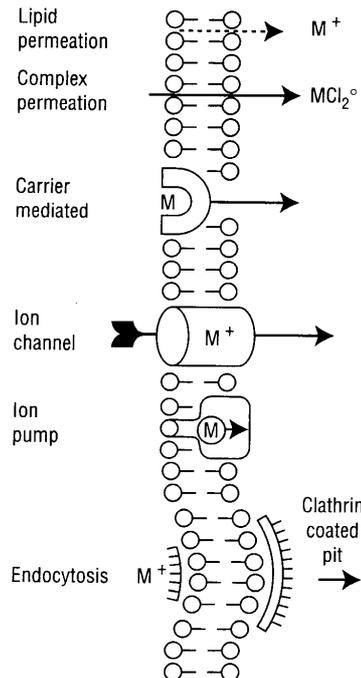


Abbildung 3: Aufnahmewege für Chemikalien in Fische (van Leeuwen und Hermens 1995)

Die Aufnahme von Chemikalien durch passive Diffusion ist nicht beeinflussbar, Organismen können aber die Aufnahme durch andere, aktive Aufnahmeprozesse beeinflussen. Die Aufnahme hydrophober Substanzen ist innerhalb einer Spezies relativ konstant, bei Metallen und Organometallen differiert die Aufnahme je nach Umweltbedingung durch Liganden stark.

1.1.2 Elimination von Chemikalien aus aquatischen Organismen

Eine Reihe von verschiedenen Prozessen verringert die Konzentration von Chemikalien in Organismen. Wiederum sind sowohl passive als auch aktive Mechanismen für die Elimination von Chemikalien verantwortlich. Ein Großteil der hydrophoben Substanzen wird durch passive Diffusion entfernt, entweder direkt in das umgebende Wasser oder über andere Ausscheidungswege abgegeben. Eine andere Möglichkeit zur deutlichen Verringerung der Konzentration von Chemikalien in Organismen ist das Wachstum sowie die Reproduktion (durch die Milchproduktion oder in Form von Eiern). Eine Biotransformation (Metabolismus) wandelt Substanzen zu hydrophileren Substanzen um, die leicht ausgeschieden werden können, und verringert so die Chemikalienkonzentration im Fisch.

1.1.3 Quantitative Struktur-Wirkungs Analyse (QSAR)

Aus dem Modellansatz einer einfachen Verteilung einer Substanz zwischen Fischlipid und Wasser (hydrophobes Modell) folgt, daß die Aufnahmegeschwindigkeit einer Substanz in den Fisch linear mit der Hydrophobie einer Substanz ansteigen sollte (angegeben als Logarithmus des n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$). Diese Annahme besitzt jedoch nur bis zu etwa einem $\log P_{OW}$ von 6 Gültigkeit, dann sinkt der BCF wieder ab, die Beziehung zwischen BCF und $\log P_{OW}$ hat eine Parabelform (Nendza 1998). Faktoren wie Molekülgröße, Molekülladung, pH-Wert, Größe der Testorganismen und Metabolismus (s.u.) spielen zusätzlich eine Rolle. Der BCF kann daher bei lipophilen Substanzen nicht ausschließlich aus der Hydrophobie vorhergesagt werden. Die Extrapolation des BCF aus dem $\log P_{OW}$ dient somit nur zur ersten Risikoabschätzung einer Substanz, genauere Daten müssen für jede Substanzklasse experimentell ermittelt werden. Die Berechnung und Vorhersage des BCF aus physiko-chemischen Parametern wird als quantitative Struktur-Wirkungs-Analyse bezeichnet (QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship). Diese Beschreibung der biologischen Wirkung von Chemikalien mit Hilfe der physikalisch-chemischen Strukturparameter ist an zahlreichen Beispielen belegt (Hansch et al. 1995, Hathway 1982, Ikemoto et al. 1992, Könemann 1991, Mangelsdorf und Pölloth 1997, Nendza 1998, Schüürmann und Klein 1988, Schüürmann und Marsmann 1991, Seydel und Schaper 1979). So korreliert der BCF für viele organische Substanzen für ein bestimmtes biologisches System mit dem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Der Einsatz von QSARs als Voraussageinstrument hat als Vorteile schnell verfügbare Ergebnisse, die Einsparung von Prüfkosten und die Einschränkung von Tierversuchen.

Die Notwendigkeit, trotz dieser zahlreichen bekannten Beziehungen zwischen dem BCF und dem Verteilungskoeffizienten weitere Biokonzentrationsfaktoren experimentell zu bestimmen, liegt zum einen an der Synthese und dem Inverkehrbringen immer neuer Substanzen oder gänzlich neuer Substanzklassen sowie in den unterschiedlichen Beobachtungen bei der Bioakkumulation. Als Resultat zeigt sich, das mit nur einer Korrelationsgleichung und bei sehr unterschiedlichen Substanzklassen die realen Abweichungen ganz erheblich sein können. Nachfolgend sind einige Korrelationsgleichungen für die Beziehung zwischen dem BCF und dem $\log P_{OW}$ zusammengestellt (aus: Umweltbundesamt 1991):

$$\log \text{BCF} = 0,542 \log P_{OW} + 0,124 \quad (\text{Neely et al. 1974})$$

$$\log \text{BCF} = 1,16 \log P_{OW} - 0,75 \quad (\text{Metcalf et al. 1975})$$

$$\log \text{BCF} = 1,0 \log P_{OW} - 1,32 \quad (\text{Mackay 1982})$$

$$\log \text{BCF} = 1,02 \log P_{OW} - 1,82 \quad (\text{Saarikoski und Viluksela 1982})$$

$$\log \text{BCF} = 0,75 \log P_{\text{OW}} - 0,32 \quad (\text{Schüürmann und Klein 1988})$$

$$\log \text{BCF} = 0,416 \log P_{\text{OW}} + 0,120 \quad (\text{Butte et al. 1988})$$

$$\log \text{BCF} = 0,550 \log P_{\text{OW}} + 0,132 - 1,50 D \quad (\text{Butte et al. 1988})$$

[D: für bestimmte Strukturen]

$$\log \text{BCF} = 0,77 \log P_{\text{OW}} - 0,70 + \sum F_i \quad (\text{Meylan et al. 1999})$$

[F_i: Korrekturfaktor für bestimmte Substanzen bzw. Substanzgruppen]

Neben den Beziehungen zwischen dem $\log P_{\text{OW}}$ und dem $\log \text{BCF}$ gibt es weitere Modelle und Korrelationsgleichungen, die auf Beziehungen zwischen dem BCF und verschiedenen molekularen Parametern basieren, wie z.B. Molekulargewicht, Molekülquerschnitt, Moleküloberfläche, Konnektivitätsindices u.a.m.

Allen bisher vorgestellten Modellen ist gemeinsam, das sie trotz vielfältiger Modifikationen und Verbesserungen den teilweise hohen Varianzen experimenteller Daten nicht gerecht werden.

Die Ursachen für Abweichungen von einer linearen $\log P_{\text{OW}} / \log \text{BCF}$ –Beziehung sind vielfältig:

- Molekülgröße: reduzierte Membranpermeation durch Moleküle mit einem Molekulargewicht > 450, oder bei räumlicher Betrachtung des Moleküls bei einem zweitgrößter Durchmesser von mehr als 1,05 nm,
- Dissoziation der Substanz bei ionisierbaren Verbindungen; hier scheint der Dissoziationsgrad den BCF -Wert zu beeinflussen,
- Grenzflächenaktivität von Substanzen (Detergentien),
- reduzierte Bioverfügbarkeit aufgrund sehr geringer Wasserlöslichkeit,
- starke Variabilität in der Morphologie, innerhalb von Individuen und Arten,
- methodische Fehler z.B. aufgrund von Diskrepanzen zwischen der Nominal- und der Effektivkonzentration,
- sehr hohe Lipophilie, d.h. $\log P_{\text{OW}} > 6$,
- unklarer Bezug der BCF -Werte (keine Angabe, worauf der BCF bezogen wurde, z.B. Frischgewicht, Trockengewicht, Lipid u.a.),
- Metabolismus im Organismus.

1.1.4 Einflußfaktoren auf die Bioakkumulation

Molekülgröße: Die Akkumulation beginnt immer mit der Aufnahme der Substanz durch die Kiemen. Nach der Abgabe der Chemikalie an die Körperflüssigkeit wird sie zu den Geweben transportiert und dort, z.B. im Fett, gespeichert. Auf diesem vereinfacht dargestellten Weg vom Wasser in das Fettgewebe müssen viele Barrieren passiert werden. So bestehen z. B. die Kiemen aus biologischen Membranen und Schichten

unterschiedlicher Zusammensetzung. Membranen sind, bei einfacher Betrachtung, aus einer zentralen Lipiddoppelschicht und einem äußeren und inneren Proteinfilm aufgebaut. Die Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht sind in das Membranzentrum gerichtet, die hydrophilen Enden nach innen und außen (Abbildung 3, Seite 5). Der Membrandurchgang einer hydrophoben Substanz kann als passive Diffusion betrachtet werden. Jedoch müssen für den Eintritt einer Substanz in das Membrannere Löcher auf der polaren Membranseite geschaffen werden. Der Durchgang einer Substanz ist daher von der Größe dieser Membranporen abhängig. Aufbau und Molekülgröße sind daher wesentliche Faktoren, wenn ein Molekül durch die Membran transportiert werden soll (Butte et al. 1993, Sijm und van der Linde 1995). In Guppys ist die kritische Größe ein Moleküldurchmesser von 0,95 nm, oberhalb der keine Aufnahme mehr stattfindet. Beispiele sind die Nichtaufnahme von Hexabrombenzol, Oktachlornaphtalin, Oktachlordibenzo-p-dioxin und Dekadibrombiphenyl (Gobas et al. 1986). Für andere Fische, wie zum Beispiel Goldfische oder Regenbogenforellen konnte beobachtet werden, daß auch größere Moleküle akkumuliert werden (Gobas et al. 1986).

Auch die Moleküllänge ist entscheidend: Polydimethylsiloxane und n-Alkane länger als 4,3 nm können nicht mehr aufgenommen werden. Die Länge von 4,3 nm entspricht der mittleren Distanz zwischen den polaren Endgruppen der Lipiddoppelschicht in einer Membran.

Molekülladung: Viele Xenobiotika kommen in der Umwelt als negativ oder positiv geladen Moleküle vor. Die Ladung hat einen großen Einfluß auf die Bioakkumulation, da geladene Moleküle viel langsamer durch die Membran transportiert werden. Der Einfluß vom pH-Werte des Wassers auf die Bioakkumulation wird in dieser Arbeit ausführlich am Beispiel der Bioakkumulation von Triclosan untersucht.

Bioverfügbarkeit: Der tatsächlich frei verfügbare Anteil einer Substanz ist entscheidend für die Bioakkumulation, je stärker eine Substanz von Substanzen oder gelöstem Material adsorbiert wird, desto geringer ist der frei verfügbare Anteil.

Oberfläche-Volumen-Verhältnis: Die Größe der Testorganismen hat ebenfalls einen Einfluß auf die Akkumulation. Größere Organismen benötigen weniger Sauerstoff pro Volumeneinheit und haben im Verhältnis kleinere Atmungsorgane. Der Austausch von Substanzen in oder aus dem Organismus hängt mit der Austauschoberfläche über das Fick'sche Gesetz zusammen. Kleinere Organismen akkumulieren und eliminieren Substanzen schneller als Größere, so nimmt die Kiemenoberfläche bei Forellen von 3 cm²/g bei einem Fischgewicht von 3 g auf 1,97 cm²/g bei Forellen mit einem Gewicht von 1000 g ab (Fishbase 1997).

Morphologie: Die Aufnahme von Substanzen in aquatischen Organismen geschieht nicht nur über die Kiemen, sondern auch über die Haut. Die Zusammensetzung und Dicke der Haut spielt genauso eine Rolle wie die Größe der Hautoberfläche im Vergleich zur Kiemenoberfläche.

Biotransformation: Der Metabolismus von Substanzen verringert ebenfalls die Konzentration von Xenobiotika im Organismus. Die Biotransformation findet im Organismus hauptsächlich in der Leber statt, aber auch in der Haut. Diverse Enzymsysteme bilden polare Produkte in zwei Phasen, die als Phase I und II bezeichnet werden. Phase I Reaktionen umfassen Hydrolyse, Reduktion und Oxidation; in Phase II finden üblicherweise Konjugationen statt. Während der Phase I wird das Molekül durch den Einbau polarer Gruppen wie die Hydroxy- (-OH), Carboxyl- (-COOH) oder Amino- (-NH₂) Gruppe modifiziert. Diese Produkte der Phase I sind meist reaktive Substanzen, die dann in der Phase II zum Glucuronid, Sulfat, Acetylkongugat oder Glutathionkongugat konjugiert werden können. Diese konjugierten Produkte werden dann leicht ausgeschieden. In Tabelle 1 ist ein Überblick über die wichtigsten Enzymsysteme dargestellt. Eine weiterführende Darstellung ist in Lehrbüchern der Biochemie oder bei van Leeuwen und Hermens (1995) zu finden.

Tabelle 1: Die wichtigsten Pestizide metabolisierenden Enzymsysteme

Enzymsystem	Lokation	Metabolisierte Verbindung
<i>Phase I-Reaktionen</i>		
Mischfunktionelle Oxidasen	Mikrosomen, bekannt in Lebern von Vertebraten und dem Körperfett von Insekten	Viele fettlösliche Pestizide
Phosphatasen	In nahezu allen Geweben und Zellfraktionen vorhanden	Organophosphorinsektizide und Nervengasen
Carboxyesterasen	In den meisten Geweben von Insekten und Vertebraten	Malathion und Malaoxon
Epoxidhydroxilase	Mikrosomen, teilweise in der Säugetierleber	Dieldrin, Heptachlor und Epoxide
DDT-dehydrochlorinase	Nahezu alle Insekten und Vertebraten	pp'-DDT und p,p'-DDD
<i>Phase II-Reaktionen</i>		
Glucuronyltransferase	Hauptsächlich in Mikrosomen, verbreitet in Vertebraten und Insekten	Verbindungen mit labilem Wasserstoff, auch hydroxylierten Metaboliten
Glutathion-S-transferase	70 000 g Überstand von Vertebraten und Insekten	Chlorierte Verbindungen, z.B. γ-HCH, ebenso manche Epoxide

1.2 Mathematische Modelle der Bioakkumulation in aquatischen Organismen

Zur Beschreibung der Kinetik der Biokonzentration organischer Substanzen in Fischen werden mathematische Modelle herangezogen. Diese beruhen auf der Annahme einer unterschiedlichen Anzahl von Kompartimenten (auch: Kompartments) und auf unterschiedlichen Beschreibungen der Kinetik des Stoffaustausches zwischen den Kompartimenten (Kinetik nullter, erster oder zweiter Ordnung). Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Aufnahme einer lipophilen Substanz im Fisch aus dem Wasser, dann erhält man typischerweise eine sog. Sättigungskurve (Abbildung 4):

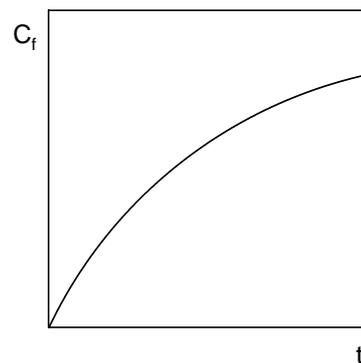


Abbildung 4: Sättigungskurve

Die Geschwindigkeit der Konzentrationszunahme hängt von den Geschwindigkeiten der Aufnahme und der Ausscheidung ab. Zur mathematischen Beschreibung der Verteilung von Chemikalien zwischen Fisch und Wasser werden Zwei- und Dreikompartimentmodelle herangezogen (Abbildung 5 und Abbildung 6, Seite 12):

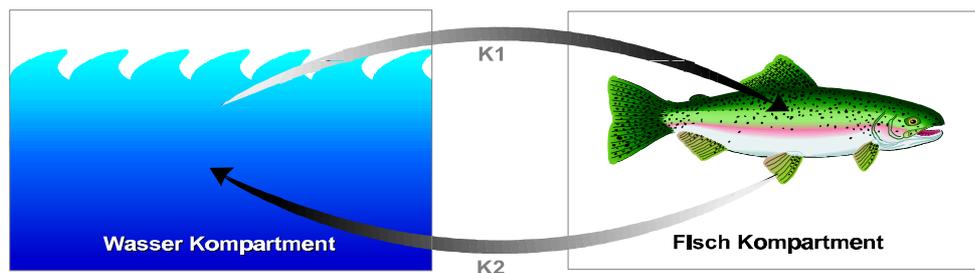


Abbildung 5: Bioakkumulation nach dem Zweikompartimentmodell

1.2.1 Das Zweikompartimentmodell

Für organische Chemikalien kann man oft von einem Zweikompartimentmodell ausgehen (Kompartiment 1: Wasser, Kompartiment 2: Fisch). Dabei wird sowohl für die Aufnahme als auch für die Abgabe der Chemikalie eine Kinetik erster Ordnung im Fisch zugrunde gelegt.

$$\text{Aufnahme: } \frac{dc_f}{dt} = k_1 \cdot c_w \quad (\text{Gl. 1})$$

$$\text{Abgabe: } \frac{dc_f}{dt} = -k_2 \cdot c_f \quad (\text{Gl. 2})$$

- C_f : Konzentration im Fisch
 C_w : Konzentration im Wasser (als konstant angenommen)
 k_1 : Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme
 k_2 : Geschwindigkeitskonstante der Abgabe
 t : Zeit

Die zeitliche Änderung der Konzentration der Substanz im Fisch lässt sich wie folgt beschreiben:

$$\frac{dc_f}{dt} = k_1 \cdot c_w - k_2 \cdot c_f \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Gleichung (Gl. 3) gilt für die Aufnahmephase. Für die Eliminationsphase mit $C_w=0$ reduziert sie sich zu Gleichung (Gl. 2). Im Gleichgewichtszustand ($t \rightarrow \infty$) ist die Geschwindigkeit der Aufnahme einer Substanz aus dem Wasser gleich der Geschwindigkeit der Abgabe in das Wasser, d.h. $dc_f / dt = 0$. Aus Gleichung (Gl. 3) folgt dann:

$$BCF = \lim_{t \rightarrow \infty} \left(\frac{c_f}{c_w} \right) = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{Gl. 4})$$

(Anmerkung: Die BCF_{kin} -Werte aus kinetischen Daten sind demzufolge ohne Einheiten anzugeben, da BCF-Werte üblicherweise aus Gleichgewichtsmessungen stammen, wird der BCF im allgemeinen in [kg/l] angegeben).

Die Lösungen der Differentialgleichungen für das Zweikompartmentmodell wurden von Blau et al. (1975) beschrieben. Für die Akkumulationsphase ergibt sich als Lösung:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} c_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Gl. 5})$$

Für die Eliminationsphase, die zum Zeitpunkt $t = t^*$ beginnt, gilt:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} c_w [e^{-k_2(t-t^*)} - e^{-k_2 t}] \quad (\text{Gl. 6})$$

Da die Gleichungen nicht linearisiert werden können, erfolgt die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten durch nichtlineare, iterative Regressionsanalyse. Das speziell zu diesem Zweck entwickelte BASIC-Programm „Biokonz“ berücksichtigt für die Modellierung sowohl die Akkumulations- als auch die Eliminationsphase und lässt zudem variierende Konzentrationen im Wasser zu (Butte 1991, Butte und Blum 1984).

Die biologische Halbwertszeit ($t_{1/2}$) einer Chemikalie in einem Organismus kann aus der Geschwindigkeitskonstante für die Elimination k_2 berechnet werden. Sie ist die Zeit, die benötigt wird, bis sich die Konzentration einer Chemikalie halbiert hat. Aus (Gl. 2) ergibt sich die Halbwertszeit:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} \quad (\text{Gl. 7})$$

1.2.2 Das Dreikompartimentmodell

In vielen Fällen ist das Zweikompartimentmodell gut geeignet, die experimentellen Daten eines Bioakkumulationsversuches zu beschreiben. Es existieren jedoch Fälle, bei denen es zu einer lange anhaltenden, langsamen Ausscheidung der Substanz aus einem „tiefen“ Kompartiment kommt. Dieses Verhalten wird dann durch das Dreikompartimentmodell besser beschrieben:

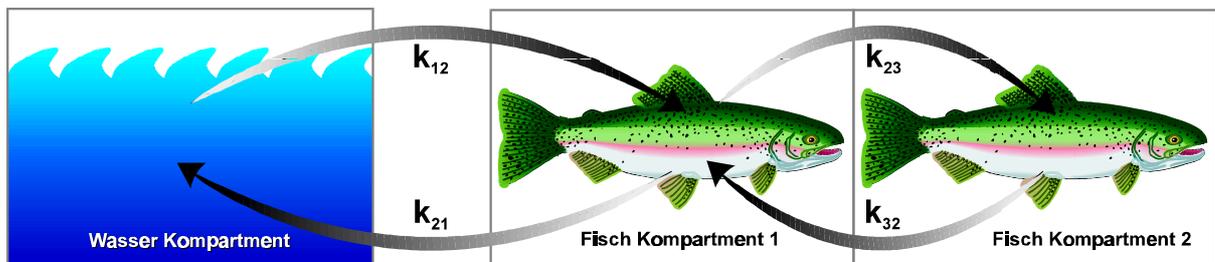


Abbildung 6: Bioakkumulation nach dem Dreikompartimentmodell

Es wird davon ausgegangen, daß im Fisch zwei mathematisch klar unterscheidbare, anatomisch aber nicht näher definierte Kompartimente bestehen. Zum Kompartiment des Wassers und dem „offenen“ Fischkompartiment kommt hier ein drittes, „tiefes“ Fischkompartiment hinzu. Dem „tiefen“ Kompartiment kann allerdings keinerlei anatomische bzw. stoffwechselphysiologische Bedeutung zugeordnet werden. Weist das Modell auf ein „tiefes“ Kompartiment hin, so obliegt es dem Forscher ihm eventuell eine solche Bedeutung zuzuweisen.

Ausgehend von einer Kinetik erster Ordnung und konstanten Konzentrationen einer Substanz im Wasser ($dc_w / dt = 0$) lauten die Differentialgleichungen zur Beschreibung der Akkumulation einer Substanz aus dem Wasser durch den Fisch in das „offene“ Fischkompartiment 2 (Gl. 8) und in das „tiefe“ Fischkompartiment 3 (Gl. 9) wie folgt:

$$\frac{dc_2}{dt} = k_{12} \cdot c_1 - k_{21} \cdot c_2 + k_{32} \cdot c_3 - k_{23} \cdot c_2 \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\frac{dc_3}{dt} = k_{23} \cdot c_2 - k_{32} \cdot c_3 \quad (\text{Gl. 9})$$

Unter der gleichen Voraussetzung gilt für die Elimination für die Fischkompartimente 2 und 3 (Gl. 10) und (Gl. 11):

$$\frac{dc_2}{dt} = -k_{21} \cdot c_2 + k_{32} \cdot c_3 \quad (\text{Gl. 10})$$

$$\frac{dc_3}{dt} = k_{23} \cdot c_2 - k_{32} \cdot c_3 \quad (\text{Gl. 11})$$

Die Lösungen dieser Differentialgleichungen lauten für die Akkumulation (Könemann und van Leeuwen 1980):

$$c_f = A \cdot (1 - e^{-a \cdot t}) + B \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) \quad (\text{Gl. 12})$$

Wenn die Eliminationsphase unter steady-state-Bedingungen beginnt, so gilt unter Verwendung einer neuen Zeitskala ($t = t_e$):

$$c_f = A \cdot e^{-a \cdot t_e} + B \cdot e^{-b \cdot t_e} \quad (\text{Gl. 13})$$

Werden die steady-state-Bedingungen nicht erreicht, so kann die Konzentration der Substanz im Fisch während der Eliminationsphase folgendermaßen beschrieben werden (Butte 1991):

$$c_f = A \cdot \left[e^{-a \cdot (t-t^*)} - e^{-a \cdot t} \right] + B \cdot \left[e^{-b \cdot (t-t^*)} - e^{-b \cdot t} \right] \quad (\text{Gl. 14})$$

Dabei entspricht t^* dem Zeitpunkt des Beginns der Eliminationsphase.

Der Biokonzentrationsfaktor ist dann:

$$BCF = \frac{A + B}{c_w} \quad (\text{Gl. 15})$$

Nach nichtlinearer Regression, das heißt nach Schätzung von A , B , α und β im Sinne einer optimalen Beschreibung der Meßdaten, können die Geschwindigkeitskonstanten nach folgenden Gleichungen errechnet werden (Könemann und van Leeuwen 1980):

$$k_{12} = \frac{\mathbf{a} \cdot A + \mathbf{b} \cdot B}{c_w} \quad (\text{Gl. 16})$$

$$k_{21} = \mathbf{a} + \mathbf{b} - \frac{\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}}{c_w} \cdot \frac{A + B}{c_w} = \mathbf{a} + \mathbf{b} - \frac{\mathbf{a} \cdot \mathbf{b} \cdot BCF}{k_{12}} \quad (\text{Gl. 17})$$

$$k_{32} = \frac{\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}}{k_{21}} \quad (\text{Gl. 18})$$

$$k_{23} = \mathbf{a} + \mathbf{b} - k_{21} - k_{32} \quad (\text{Gl. 19})$$

Die mathematischen Methoden, das heißt graphische und lineare sowie nichtlineare Regressionsanalyse zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Kinetik der Akkumulation und Elimination, sowie des Biokonzentrationsfaktors wurden bereits ausführlich beschrieben (Butte 1991).

1.3 Testverfahren zur Bestimmung von Biokonzentrationsfaktoren

Biokonzentrationsfaktoren (BCF's) werden nach internationalen, standardisierten Testverfahren vor allem im System Fisch / Wasser, aber auch mit anderen Testorganismen wie Daphnien, Algen, Klärschlamm oder Tubifiziden ermittelt. Man unterscheidet dabei zwischen **statischen Verfahren** (OECD No. 305 A, B, D) und **dynamischen Verfahren** (OECD No. 305 C, E) (Tabelle 2, Seite 15). Als Testfische werden Zebrabärblinge, Doppelkopffritzen, Guppies oder Regenbogenforellen empfohlen. Bei den statischen Verfahren unterscheidet man:

- "Static Fish Test" (OECD No. 305 D): Die Fische werden acht Tage einer definierten Konzentration der zu untersuchenden Chemikalie im Wasser ausgesetzt. Das Wasser wird während des Versuchs nicht erneuert. Parallel zur Fischprobennahme werden aus einem Kontrollbecken, das keine Testorganismen enthält, sonst aber unter identischen Bedingungen gehalten wird, Wasserproben zur Kontrolle über einen möglichen Substanzverlust entnommen. Nach acht Tagen wird der BCF als Quotient aus der Chemikalienkonzentration im Fischgewebe und der Konzentration der Chemikalie im Wasser ermittelt.
- "Sequential Static Fish Test" (OECD No. 305 B): Dieser Test ähnelt dem "Static Fish Test", allerdings ist die Expositionszeit nicht festgelegt. In Vorversuchen wird die ungefähre Zeitspanne ermittelt, die zur Gleichgewichtseinstellung der Substanzkonzentration im System Fisch / Wasser benötigt wird. Außerdem schließt sich eine höchstens zehn Tage dauernde Eliminationsphase an, um die Geschwindigkeitskonstante der Abgabe zu bestimmen.
- "Semi Static Fish Test" (OECD No. 305 A): Wie beim "Sequential Static Fish Test" ist die Dauer des Versuchs nicht festgelegt, sondern wird in Vorversuchen ermittelt. Um eine konstante Chemikalienkonzentration im Wasser während des Versuchs zu gewährleisten, werden die Fische alle 48 Stunden in ein Becken mit "erneuertem" Testwasser umgesetzt.

Die BCF-Werte, die an Hand dieser statischen Methoden erhalten werden, können verfälscht sein, denn die Gleichgewichtseinstellung zwischen Aufnahme und Abgabe der Substanz (steady state) kann besonders bei sehr lipophilen Stoffen nicht immer vollständig in der Expositionszeit gewährleistet werden. Außerdem ist bei flüchtigen,

schwer wasserlöslichen oder stark akkumulierenden Substanzen das Einhalten einer konstanten Konzentration der Testchemikalie im Wasser schwierig. Diese Probleme treten bei den dynamischen Fischtestverfahren nicht auf, da mit Hilfe eines dynamischen Durchflusssystems für eine konstante Chemikalienkonzentration im Wasser gesorgt wird.

Die dynamischen Verfahren ("Flow Through Fish Test") sind:

- "Plateau Methode" (OECD No. 305 C): Die Fische werden einer konstanten Konzentration der Testchemikalie in einem Durchflusssystem (Flow-Through) ausgesetzt. Der Versuch ist beendet, wenn keine Konzentrationsveränderungen im Fischgewebe mehr auftreten (steady state). Die Expositionszeit ist auf maximal 56 Tage (8 Wochen) limitiert.
- "Kinetische Methode" (OECD No. 305 E): Die Bedingungen sind ähnlich wie bei der "Plateau-Methode", allerdings schließt sich eine Eliminationsphase an. Die Expositionszeiten sind wesentlich kürzer, da hier der Biokonzentrationsfaktor aus kinetischen Daten berechnet wird und somit keine Gleichgewichtseinstellung (steady state) erforderlich ist. Zudem lassen sich nahezu unlösliche, sehr lipophile oder stark an Feststoffe adsorbierende Substanzen wie z.B. Pyrethroide oder auch andere Stoffe mit statischen Versuchsanordnungen nicht mehr untersuchen.

Tabelle 2: OECD Verfahren zur Bestimmung von Biokonzentrationsfaktoren (Butte et al. 1988)

Fischtest	Experimenteller Aufwand	Bestimmung des BCF	Information
Static OECD Nr. 305 D	gering	c_f / c_w	BCF (BCF ₈)
Sequential Static OECD Nr. 305 B	gering – mittel	c_f / c_w	BCF = f(c _w), k ₂
Semi Static OECD Nr. 305 A	gering – mittel	c_f / c_w	BCF ₂₈
Flow Through Plateau OECD Nr. 305 C	mittel	c_f / c_w	BCF / BCF ₅₆
Flow Through Kinetic OECD Nr. 305 E	hoch	k_1 / k_2	BCF _∞ , k ₁ , k ₂

c_f Konzentration im Fisch, c_w Konzentration im Wasser, k₁ Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k₂ Geschwindigkeitskonstante der Elimination, BCF Biokonzentrationsfaktor, mit Angabe der Versuchsdauer

1.4 Aufgabenstellung

Bei der Bioakkumulation von dissoziierenden Substanzen scheint der BCF außer von den lipophilen Eigenschaften auch von der Säurestärke, dem pK_a -Wert, abzuhängen. Saarikoski und Viluksela (1982) beobachteten eine unterschiedlich starke Akkumulation einer sauren Substanz bei Variation des pH-Wertes des Wassers. Dieser pH-Effekt wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Dave 1984, Kobayashi und Kishino 1980 b, Lohner und Fischer 1990, Lydy et al. 1990, Spehar et al. 1983, Zhao et al. 1996), wobei die Akkumulation der untersuchten Substanzen in statischen Systemen gemessen wurde. Dabei wurde generell bei bekanntem pK_a -Wert eine Abnahme der Bioakkumulation und der Toxizität mit steigendem pH-Wert des Wassers beobachtet. Hingegen konnten Butte et al. (1988), die Biokonzentrationswerte (BCF-Werte) zahlreicher Phenole aus kinetischen Daten im Durchflußsystem bestimmten, keine Korrelation zwischen dem pK_a -Wert und dem Biokonzentrationsfaktor feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob der Dissoziationsgrad, der bei dissoziierenden Verbindungen vom pH-Wert des Wassers abhängig ist, einen Einfluß auf die Kinetik der Bioakkumulation dissoziierender Verbindungen im System Fisch/Wasser hat. Dazu sollte die Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan, ein Trichlorphenoxyphenol, an Zebraabrärlingen (*brachydanio rerio*) bei unterschiedlichen pH-Werten des Wassers untersucht werden. Der BCF sollte dabei aus kinetischen Daten berechnet werden.

Bisherige Untersuchungen zur Bioakkumulation von Pyrethroiden führten, trotz der sehr lipophilen Eigenschaften (mit $\log P_{OW}$ -Werten von 6 bis 7) zu eher geringen BCF-Werten zwischen 50 (statische Systeme) bis 3000 (Durchflußsysteme). Einige der Messungen waren jedoch wenig aussagekräftig, da wegen der geringen Wasserlöslichkeit, der starken Adsorption an Oberflächen und der akuten Toxizität der Pyrethroide für Fische nur geringe Konzentrationen eingesetzt werden konnten, was die Analytik und einen verlässlichen Versuchsverlauf schwierig macht.

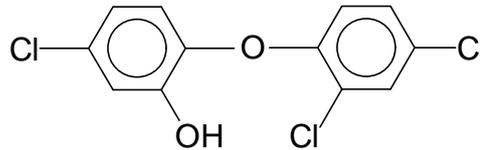
In dieser Arbeit sollten die Kinetik der Akkumulation und Clearance und die daraus zu berechnenden BCF-Werte der Pyrethroide Cypermethrin, Cyfluthrin, Deltamethrin und Permethrin untersucht werden. Als Testfische sollten Regenbogenforellen eingesetzt werden. Sie standen in der Außenstelle Ahrensburg des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg aus institutseigener Zucht zur Verfügung und sind eine der in internationalen Testvorschriften vorgesehene Spezies (OECD 1996). Da Pyrethroide extrem toxisch für Fische sind, insbesondere für Regenbogenforellen, sollten zudem die akuten Toxizitäten der Pyrethroide als LC_{50} -Werte (96 Stunden) überprüft werden. In weiteren Versuchen sollte der Einfluß der

einzelnen Pyrethroide auf die mischfunktionelle Oxidasen Aktivität von Forellenlebern (MFO-Aktivität) untersucht werden. Dazu sollten die Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivitäten (EROD-Aktivitäten) in Leberpräparationen von Forellen bestimmt werden. Zum Nachweis eines eventuellen Metabolismus sollten zudem die Abbauprodukte der eingesetzten Pyrethroide in Forellen untersucht werden. Voraussetzung dafür war dabei die Entwicklung einer Methode zur Spurenanalytik von Pyrethroid-Metaboliten in fetthaltiger Matrix.

2. Bioakkumulation von 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol [Irgasan DP 300, Triclosan] bei unterschiedlichen pH-Werten des Wassers

2.1 Einleitung

5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol (Abbildung 7) – Handelsname: **Irgasan DP 300**, Internationaler Freiname Triclosan – ist ein chlororganisches, phenolisches Desinfektionsmittel, das wegen seiner antibakteriellen Wirkung als Konservierungsmittel vor allem in Kosmetika eingesetzt wird, wie z.B. in Deodorants, Shampoos, Seifen, Zahncremes, wie in der Zahncreme *Colgate Total*[®] oder im Geschirrspülmittel *Fairy antibakteriell*[®], aber auch als Hautdesinfektionsmittel und Konservierungsmittel. Es ist in Körperpflegemitteln in Konzentrationen bis 0,2 % zugelassen (Römpp 1995).



Irgasan DP 300, Triclosan

Abbildung 7 : Struktur von 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol

2.1.1 Physikalisch-chemische Daten und Toxizitäten von Triclosan

5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol [Irgasan DP 300, Triclosan], CAS-No. 3380-34-5, Mol.-Gew. 289,5, Festpunkt 54-57 °C, ist ein weißes kristallines Pulver, das in Wasser zu 0,001% löslich ist und gut löslich in Ethanol, Isopropanol, Propylenglykol, Polyethylenglykol, Triethanolamin, Tween 20,80 und Triton X-100 ist. Triclosan ist lichtempfindlich, stabil bis 280 °C, wirksam gegen grampositive und gramnegative Bakterien, wirkt nicht gegen Pseudomonasarten, doch gegen Hefen und Pilze. Der LD-50 (Lethale Dosis, bei der 50 % der Testtiere sterben) für Ratten ist 4,53 bis > 5 g/kg. Die akute Toxizität für Fische liegt für Forellen bei 1 mg/l LC₅₀ - 48h, der LC₀ Wert für 48 h bei 2 mg/l (Schmidt 1990). Triclosan ist nicht karzinogen.

Der pK_a-Wert von Triclosan wird mit 7,9 angegeben (Schmidt 1990). Hersteller ist Ciba-Geigy, die Synthese erfolgt wie in Abbildung 8 dargestellt (Janistyn 1978, Kabara 1984).

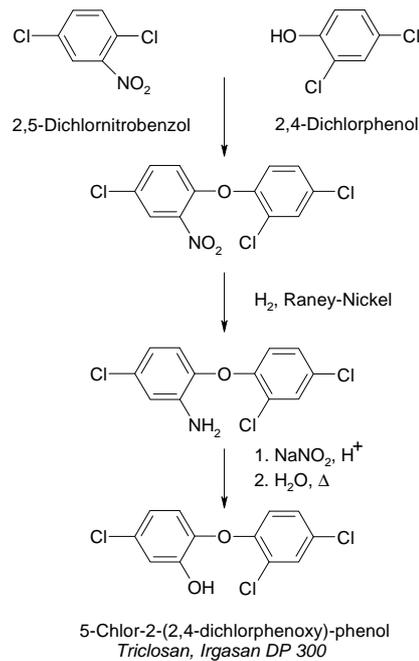


Abbildung 8: Schema der Darstellung von 5-Chlor-2-(2,4-dichlor-phenoxy)-phenol (Hites und Lopez-Avila 1979)

Der $\log P_{OW}$ -Wert wird mit 4,2 angegeben (ermittelt nach $\log P_{OW} = 5,00 - 0,670 \log S$, $r=0,985$ mit experimentell bestimmter Wasserlöslichkeit $S=1,25 \mu\text{mol/l}$ [Lopez-Avila und Hites 1980]), Berechnungen ergaben einen $\log P_{OW}$ -Wert von 4,66 (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mit dem Programm LOGKOW Version 1.57 (Meylan und Howard 1985) berechneter $\log P_{OW}$ von Triclosan

TYPE	NUM	LOGKOW FRAGMENT DESCRIPTION	COEFF	VALUE
Frag	12	Aromatic Carbon	0,2940	3,5280
Frag	3	-CL [chlorine, aromatic attach]	0,6445	1,9335
Frag	1	-OH [hydroxy, aromatic attach]	-0,4802	-0,4802
Frag	1	-O- [aliphatic O, two aromatic attach]	0,2923	0,2923
Factor	1	Ortho-subst on di-aromatic ether (non-cyl)	-0,8396	-0,8396
Const		Equation Constant		0,2290
			Log Pow=	4,6630

2.1.2 Chemie und Umweltverhalten von Triclosan

Triclosan ist ein chlororganisches Phenoxyphenol. Über 200 000 t Chlorphenole werden jährlich produziert und als Herbizide, Insektizide, Fungizide, Bakterizide und Holzschutzmittel in die Umwelt eingebracht. Triclosan ist sehr stabil, es wurde in industriellen Abwässern noch nach der Kläranlage, in Flußwässern und im Sediment entdeckt, weiterhin fanden sich auch Rückstände in Fischen (Paasivirta et al. 1980, Comor et al. 1995, Miyazaki et al. 1984, Lopez-Avila und Hites 1980). In Gegenwart

von Basen, UV-Licht oder thermischer Anregung entstehen aus Triclosan leicht polychlorierte Dioxine und Furane, es gehört damit zur Klasse der Prädioxine (Nilsson et al. 1974). Kanetoshi et al. zeigten dies, indem sie mit Triclosan behandelte Textilprodukte dem Sonnenlicht aussetzten und die entstandenen Produkte mittels Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC-MS) analysierten (Kanetoshi et al. 1988).

Als Metabolisierungsprodukt wurde das methylierte Etherderivat von Triclosan, 4-Chlor-1-(2,4-dichlorphenoxy)-2-methoxybenzol, in Fischen gefunden (Miyazaki et al. 1984).

Triclosan wirkt durch die spezifische Blockade der Fettsynthese in Bakterien (McMurry et al. 1998). Aufgrund der lipophilen Eigenschaften und der daraus resultierenden Bioakkumulationstendenz muß mit hohen Konzentrationen in Biota, speziell Fischen gerechnet werden. Da Triclosan dissoziierende Eigenschaften besitzt (pK_a 7,9), wurde diese Substanz zur Untersuchung des Einflusses vom pH-Wert des Wassers auf die Kinetik der Akkumulation und Clearance ausgewählt.

2.1.3 Versuchsaufbau und Durchführung

Die Bioakkumulationsanlage bestand in Anlehnung an internationale Standardtestvorschriften [OECD 305 E (OECD 1996)], wie auch bereits von Butte et al. (1993) beschrieben, aus einem Akkumulationsbecken, in dem Zebrabärblinge unter Durchflußbedingungen der Chemikalie Triclosan ausgesetzt wurden und dem Clearancebecken, in denen die Chemikalie von den Fischen wieder in das Umgebungswasser ausgeschieden wurde (Abbildung 9 und Abbildung 54, Seite 99). Der Zebrabärbling (Abbildung 10) wurde als Testfisch ausgewählt, da er ein relativ homogenes Testmaterial darstellt und während des gesamten Jahres zur Verfügung steht (OECD 1996). Um möglichst konstante Temperaturbedingungen einzuhalten, wurde das Wasser im Vorratsbecken thermostatisiert. Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Wassers wurden während der Akkumulation- und Clearancephase kontinuierlich aufgezeichnet und kontrolliert. Der pH-Wert des Wassers wurde mit Pufferlösungen im Wasserzulauf reguliert, die mit Hilfe zweier Peristaltikpumpen zugeführt wurden. Das in Methanol gelöste Triclosan wurde mittels einer Peristaltikpumpe in das Akkumulationsbecken zugesetzt, die Konzentration des Lösungsvermittlers im Akkumulationsbecken betrug 0,05 %. Der Wasserdurchlauf wurde durch die Differenz des Höhenniveaus zwischen Vorratsbehälter und dem Wassereinlauf für die Testbecken reguliert. Die Planung der Dauer eines Bioakkumulationsexperimentes, die Zahl und der Zeitpunkt der Fischentnahmen erfolgte in Anlehnung an die Vorschläge der OECD auf der Basis der lipophilen

Eigenschaften von Triclosan, wobei die Zahl der Fischartnahmen zum einen erhöht und des weiteren eine verlängerte Akkumulationsphase angesetzt wurde, um evtl. Feinheiten der Kinetik besser modellieren zu können.

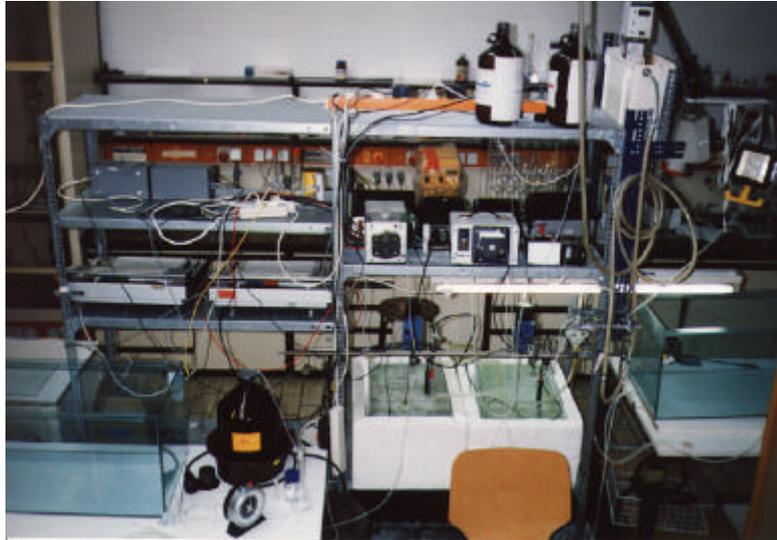


Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß mit verschiedenen pH-Werten des Wassers



Abbildung 10: Zebrabärbling

2.2 Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche mit Triclosan

2.2.1 Ergebnisse

Eine Übersicht über die Bedingungen zu den Experimenten zur Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan in Zebrafisch, bestimmt im Durchflußverfahren, ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Charakteristika der durchgeführten Versuche zur pH-abhängigen Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß.

Versuch	Versuchsdauer [d]	\bar{C}_w ^{a)} [µg/l]	Akk. ^{b)} >98 % ^{c)} nach Tagen	Anzahl Meßpunkte			Anzahl Fische
				Akk.	+ Akk.	Clear. ^{d)}	
pH 6	9	35,9	3	11	4	13	147
pH 7	11	41,6	6	9	3	9	94
pH 8	20	48,6	10	11	3	10	138
pH 9	26	46,7	13	11	3	7	131

^{a)} Durchschnittliche Konzentration an Triclosan im Wasser. ^{b)} Akkumulation,

^{c)} Akkumulationsdauer berechnet nach Schmidt 1990, ^{d)} Clearance = Elimination.

In den Abbildung 11 bis Abbildung 14 ist die Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan in Zebraabräblingen bei verschiedenen pH-Werten des Wassers von pH 6 bis pH 9 dargestellt. Für alle pH-Werten des Wassers war eine schnelle Akkumulation während der Exposition mit Triclosan (mit einer durchschnittlichen Konzentration \bar{C}_w im Wasser von 36 bis 47 µg/l) zu beobachten, es war aber deutlich eine schnellere Aufnahme bei niedrigeren pH-Werten zu sehen. Die toxikokinetischen Parameter sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Bei der verlängerten Akkumulation (Abbildung 15 bis Abbildung 18) wurde der Gleichgewichtszustand relativ schnell erreicht, bei pH 8 und 9 bereits während des normalen Versuchsverlaufs (Abbildung 13 und Abbildung 14). In der verlängerten Akkumulationsphase wurde bei allen pH-Werten der Gleichgewichtszustand erreicht (Abbildung 19), er lag bei pH 6 am höchsten mit einer durchschnittlichen Konzentration von ~ 325 mg/kg Triclosan im Fisch und sank bei steigendem pH-Wert auf durchschnittlich ~ 175 mg/kg bei pH 9. Die aus der verlängerten Akkumulation erhaltenen Gleichgewichtsbiokonzentrationsfaktoren sind in Tabelle 5 dargestellt. Die aus der Kinetik errechneten Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan in Zebraabräblingen betragen für pH 6, 7, 8 und 9 ungefähr 8700, 8200, 6400, 6800 und 3700, die entsprechenden Gleichgewichts-bioakkumulationsfaktoren betragen 7900, 6700, 6800 und 3700, auf den mittleren Fettgehalt bezogen betragen die errechneten BCFs ungefähr 163 500, 132 000, 165 000 und 49 300.

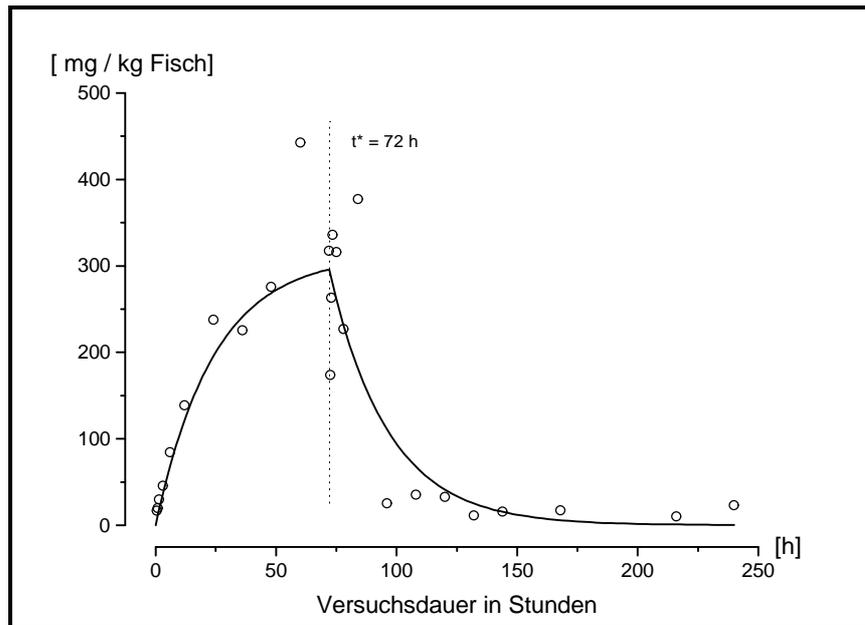


Abbildung 11: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 6 des Wassers, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 35,9 \text{ mg/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase

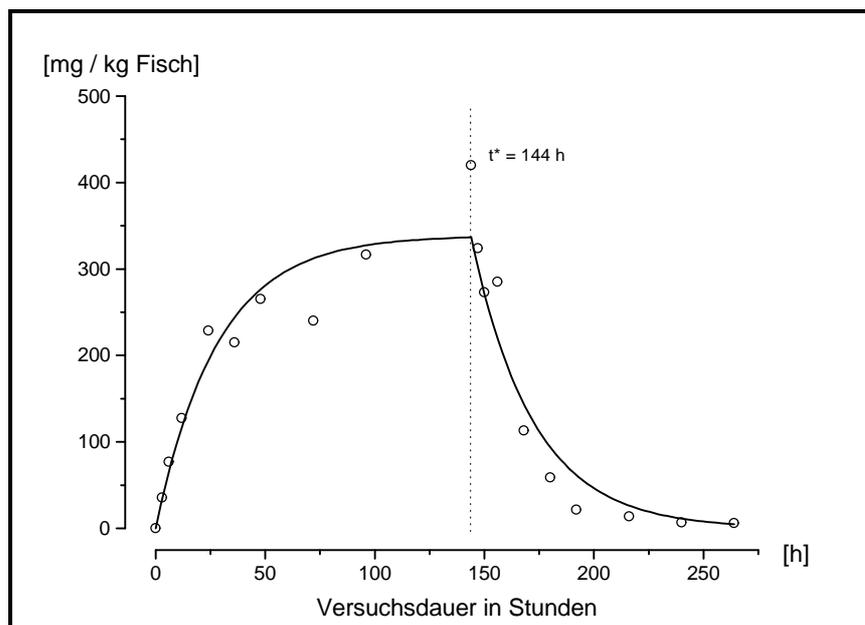


Abbildung 12: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 7 des Wassers, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 41,6 \text{ mg/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase

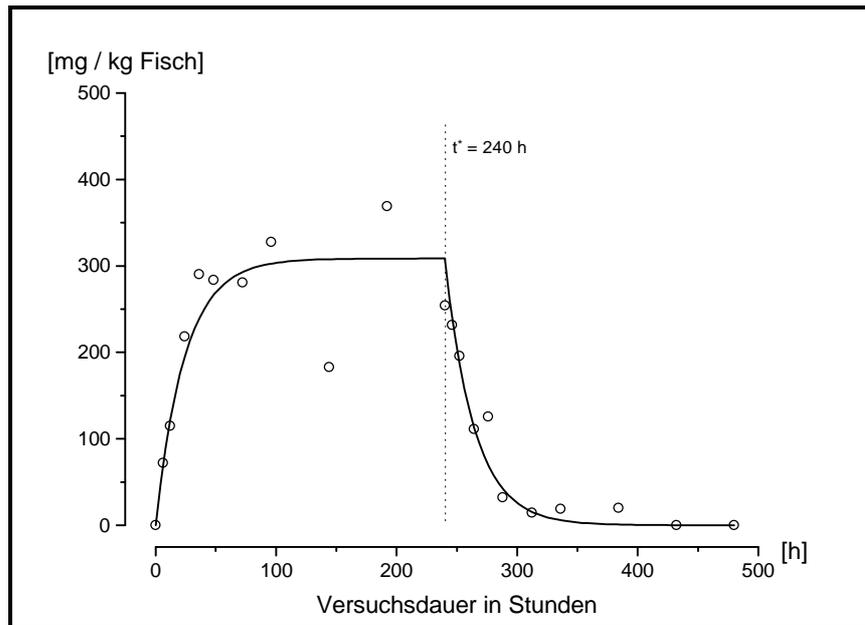


Abbildung 13: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 8 des Wassers, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 48,6 \mu\text{g/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase

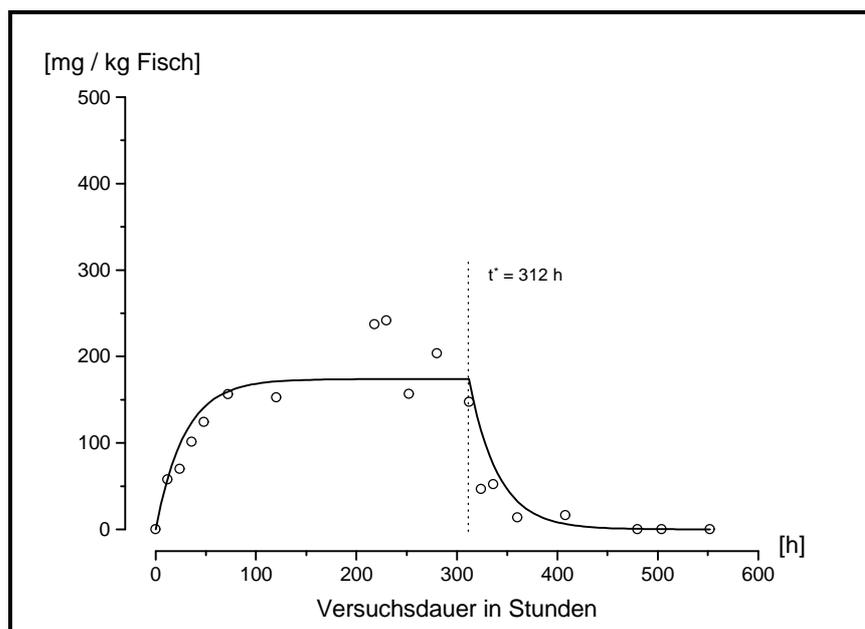


Abbildung 14: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Triclosan im Durchfluß bei pH 9 des Wassers, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 46,7 \mu\text{g/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell. t^* : Beginn der Clearancephase

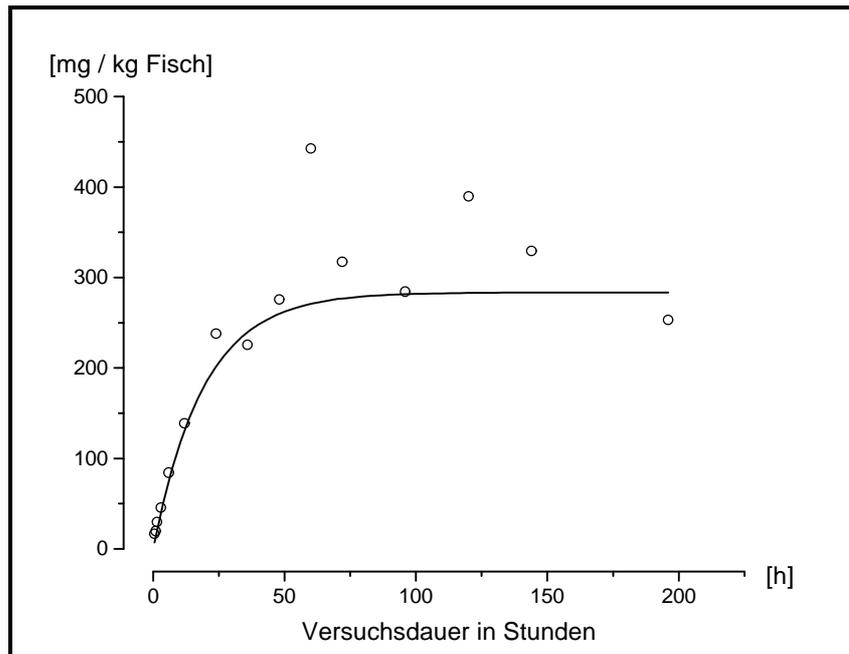


Abbildung 15: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 6 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 35,9 \mu\text{g/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell

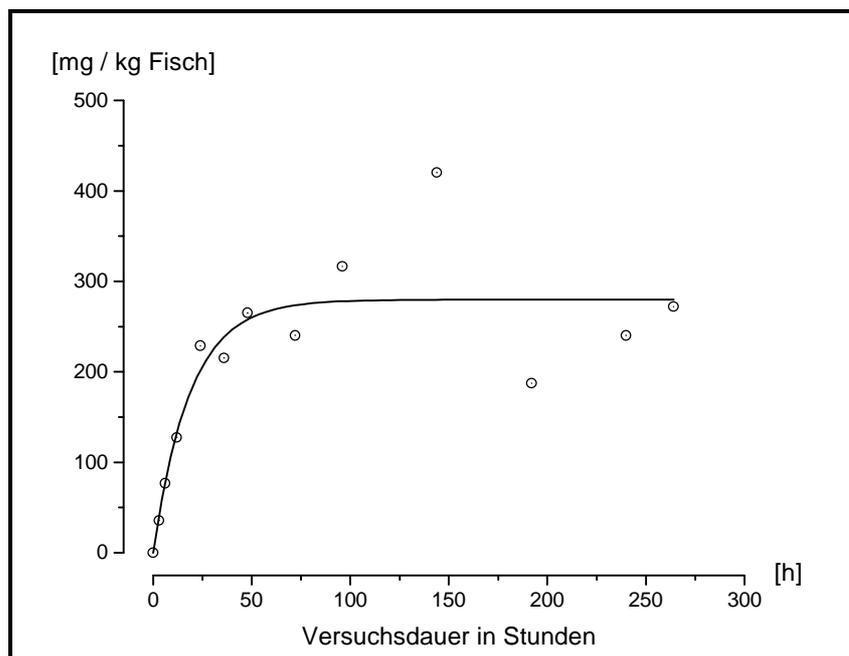


Abbildung 16: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 7 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 41,6 \mu\text{g/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell

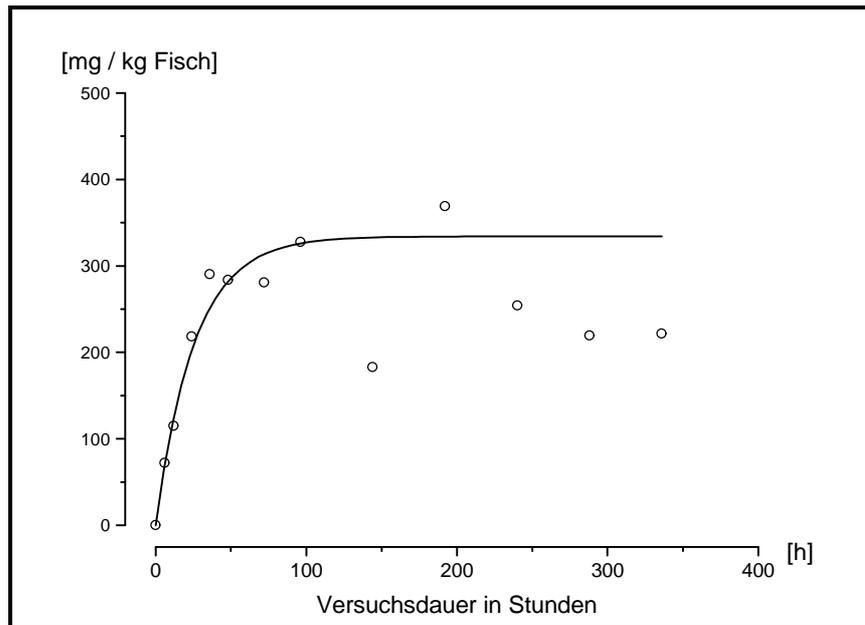


Abbildung 17: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 8 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 48,6 \mu\text{g/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell

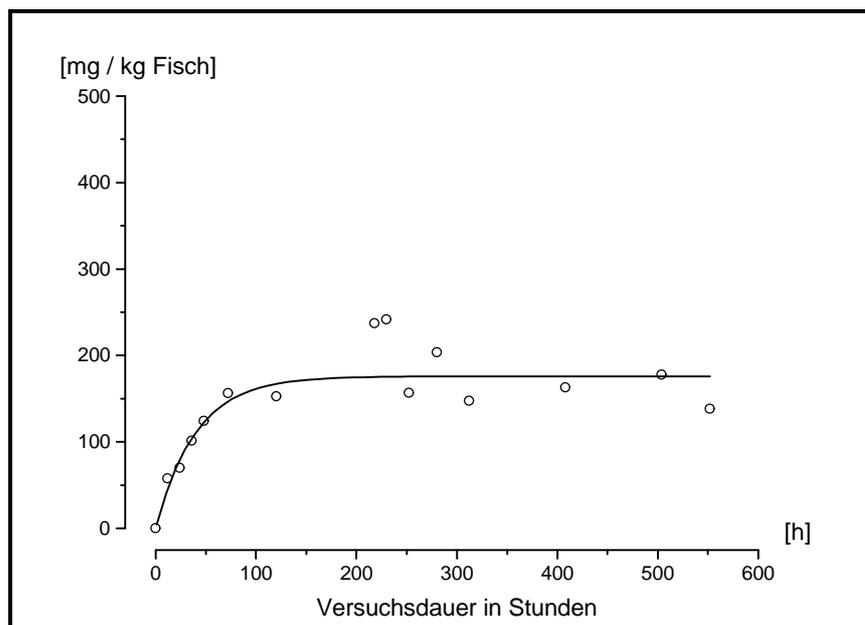


Abbildung 18: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan im Durchfluß bei pH 9 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 46,7 \mu\text{g/l}$. Berechnung der Kurve nach dem Zweikompartmentmodell

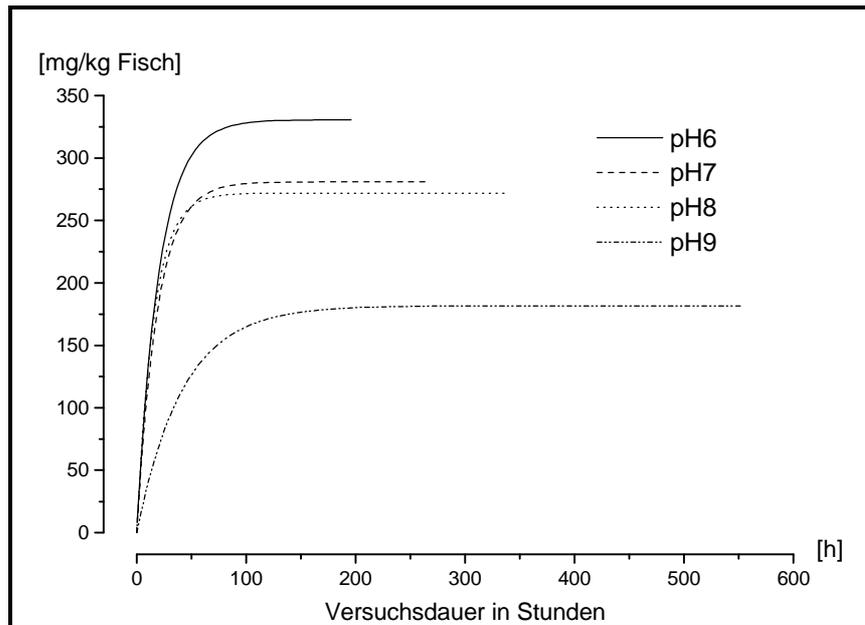


Abbildung 19: Kinetik der Bioakkumulation von Triclosan bei pH 6, 7, 8 und 9 des Wassers mit verlängerter Aufnahmephase, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w \approx 50 \mu\text{g/l}$

Tabelle 5: Kinetische Parameter, biologische Halbwertszeiten und Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan in Zebrafischarten in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers

<i>pH</i>	k_1 [h ⁻¹]	s_{k_1}	k_2 [h ⁻¹]	s_{k_2}	$t_{1/2}$ [h]	BCF_{kin}	s_{kin}	BCF_{ss}	s_{ss}
6	356	72	0,0410	0,0093	16,9	8700	2630	7900	3580
7	288	35	0,0354	0,0044	19,6	8150	1420	6660	3390
8	262	28	0,0413	0,0045	16,8	6350	963	6820	2610
9	129	30	0,0347	0,0083	19,9	3700	1230	3740	1720

k_1 : Geschwindigkeitskonstante der Aufnahmephase (s_{k_1} : Standardfehler), k_2 : Geschwindigkeitskonstante der Clearancephase (s_{k_2} : Standardfehler), $t_{1/2}$: Halbwertszeit der Elimination, BCF_{kin} : aus kinetischen Daten berechneter Biokonzentrationsfaktor (s_{kin} : Standardfehler), BCF_{ss} : Biokonzentrationsfaktor im Gleichgewicht Fisch/Wasser (s_{ss} : Standardfehler), (Anmerkung: die Daten wurden auf 3 signifikante Stellen gerundet)

2.2.2 Biokonzentrationsfaktoren bezogen auf den Fettgehalt der Fische

Der Biokonzentrationsfaktor wird in der Literatur oft auf den Fettgehalt bezogen, in der Annahme, daß lipophile Verbindungen bevorzugt im Fett akkumulieren. Daher wurde der Gesamtlipidgehalt der Fische bestimmt. Der Biokonzentrationsfaktor bezogen auf das Fettgewicht (BCF_L) ergibt sich als Quotient aus dem kinetisch bestimmten Biokonzentrationsfaktor und dem mittleren Fettgehalt (in %) der Fische:

$$BCF_L = \frac{100 \times BCF_{kin}}{Fettgehalt}$$

Die mittleren Fettgehalte der Fische für die Bioakkumulationsversuche mit Triclosan sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Zum Vergleich sind in Tabelle 7 nochmals alle Biokonzentrationsfaktoren zusammengefaßt.

Tabelle 6: Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan, bezogen auf den mittleren Fettgehalt der Zebrabärblinge

<i>pH-Wert</i>	<i>mittlerer Fettgehalt [%]</i>	<i>BCF_L</i>	<i>S_{BCFL}</i>
6	5,32	163 500	49 500
7	6,18	131 700	23 000
8	3,86	164 430	25 000
9	7,55	49 300	16 300

BCF_L: auf den Fettgehalt bezogener BCF (S_{BCFL}: Standardfehler)

Tabelle 7: Biokonzentrationsfaktoren von Triclosan in Zebrabärblingen aus kinetischen Messungen, Messungen im Gleichgewichtszustand und bezogen auf den mittleren Fettgehalt der Fische

<i>pH-Wert</i>	<i>C_w [µg/l]</i>	<i>BCF_{kin}</i>	<i>BCF_{ss}</i>	<i>BCF_L</i>
6	35,9	8700	7900	163 500
7	41,6	8140	6660	131 700
8	48,6	6350	6820	164 430
9	46,7	3710	3740	49 300

C_w: Durchschnittliche Konzentration an Triclosan im Wasser, BCF_{kin}: aus kinetischen Daten berechneter Biokonzentrationsfaktor, BCF_{ss}: Biokonzentrationsfaktor im Gleichgewicht Fisch/Wasser, BCF_L: auf den mittleren Fettgehalt bezogener BCF

2.3 Diskussion Triclosan

2.3.1 Diskussion der Analytik

Zum Nachweis von Rückständen im Spurenbereich muß bei der Probenaufarbeitung eine möglichst quantitative Abtrennung der zu untersuchenden Substanz von der Matrix gewährleistet sein. Weiterhin müssen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, hohe Wiederfindungsraten, sowie leichte und effiziente Handhabbarkeit bei großer Probenzahl beachtet werden. Inhomogene Proben müssen zerkleinert und homogenisiert werden. Zur Abtrennung der zu untersuchenden Substanz in der Matrix wird die Probe entweder mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert oder die Substanz an entsprechendem Material adsorbiert. Zur weiteren Abtrennung mitextrahierter Begleitstoffe schließt sich als weitere Schritt eine Reinigung des erhalten Rohextraktes an, das sog. Cleanup (Thier und Frehse 1986).

Bei Triclosan handelt es sich um ein Chlorphenol, für die sich zahlreiche publizierte Methoden finden, die alle auf den sauren Eigenschaften der Phenole beruhen. Im sauren Bereich liegen Phenole zum größten Teil undissoziiert vor, im alkalischen dissoziiert. Vor der Extraktion werden die zu untersuchenden Proben daher angesäuert, das undissoziierte Phenol ist nun lipophil und kann mit unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan (Miyazaki et al. 1984, Sephar et al. 1985), Acetonitril (Nishikawa und Okumura 1996), Benzol (Comor et al. 1995) bzw. Toluol (Schmidt 1990, Wegman und Hofstee 1979) oder Lösungsmittelgemischen (Hara und Radin 1978, Saarikoski und Viluksela 1982, Paasivirta et al. 1980) extrahiert werden.

Nishikawa und Okumura analysierten Triclosan in Wasser-, Sediment- und Fischproben: Wasserproben wurden mit Natriumhydroxid versetzt, mit Hexan gewaschen, angesäuert und mit Hexan extrahiert. Dann wurde mit Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und mit Diazomethan derivatisiert. Die Analytik wurde mit der GC-MS im SIM-Mode (Selected Ion Monitoring) durchgeführt. Sedimentproben wurden mit Aceton extrahiert, mit Wasser, Natronlauge und Hexan gewaschen und die wäßrige Phase nach dem Ansäuern mit Hexan extrahiert und wie oben weiterverfahen. Fischproben wurden mit Acetonitril homogenisiert, nach dem Zentrifugieren mit Hexan gewaschen und mit Natronlauge extrahiert. Nach dem Ansäuern wurde mit Hexan extrahiert und nach der Aufarbeitung mit Diazomethan methyliert. Dann wurde mit Kaliumhydroxidlösung in Ethanol verseift, angesäuert, mit Hexan extrahiert und über eine Florisilsäule gereinigt, mit Diethylether-Hexan eluiert und wie oben mit der GC-MS im SIM-Mode gemessen (Nishikawa und Okumura 1996).

Comor et al. untersuchten Abwässer von Schlachthäuser in Jugoslawien auf Triclosan, das zur Desinfektion der Werkzeuge verwendet wird. Abwasserproben wurden mit

Natronlauge auf pH 11 gebracht und mit Petrolether gewaschen, dann mit Phosphorsäure angesäuert und mit Benzol extrahiert. Die organische Phase wurde dann über Natriumsulfat und getrocknetem Kieselgel gereinigt, mit Benzol nachgewaschen, eingengt und mit Diazomethan methyliert. Zur Analytik wurde der GC mit Elektroneneinfangdetektor (ECD) verwendet (Comor et al. 1995).

Matsushima (1988) untersuchte medizinische Abwässer aus dem Hamamatsu University Medical Center auf Triclosan, das als Desinfektionsmittel eingesetzt wird. Abwässer wurden mit Natronlauge versetzt und über Extrelut gegeben, mit Hexan gewaschen und dann mit Ethylacetat eluiert. Zur Derivatisierung wurde N,O-bis-Trimethylsilyl)-trifluoracetamid (TMS) eingesetzt. Zur Detektion wurde die GC-MS im SIM-Mode verwendet. Als interner Standard wurde Bithionol verwendet, die Nachweisgrenze lag bei 30 bis 50 pg, bezogen auf das Injektionsvolumen.

Für diese Arbeit wurde die Extraktion von Triclosan aus Fisch mit Hexan-Isopropanol (HIP) und anschließender Aufreinigung mit Natronlauge gewählt: Eine Extraktion mit dem Lösungsmittelgemisch HIP eignet sich besonders, da zusätzlich zur Substanz auch das Fett gut extrahiert wird und es sich um ungiftige Lösungsmittel handelt (Hara und Radin 1978). Da sich hydrophobe Substanzen bevorzugt im Fett anreichern, sollte auch der Fettgehalt im Fisch bestimmt werden. Mit dem erhaltenen HIP-Extrakt lässt sich einfach und schnell eine photometrische Fettbestimmung zur Bestimmung des Gesamtfettgehaltes durchführen (Merck 1974).

Zur Probenaufreinigung macht man sich nun die sauren Eigenschaften des Phenols zu nutze: Das Cleanup erfolgt durch Ausschütteln mit Natronlauge, Triclosan gelangt in die wässrige Phase und wird auf diesem Weg von den meisten lipophilen, neutralen Bestandteilen der Fischmatrix abgetrennt. Nach dem Ansäuern gelangt das Triclosan durch Ausschütteln mit Toluol wieder in die organische Phase. Über eine geeignete Wahl der Volumina bei diesen Extraktionsschritten kann eine Aufkonzentrierung der nachzuweisenden Substanz erreicht werden. Eine weitere Aufreinigung und Aufkonzentrierung ist durch die Wahl der Derivatisierung möglich. Die Aufarbeitung der Wasserproben ist aufgrund der geringen Mengen störender Begleitstoffe unproblematisch, die direkte Extraktion der angesäuerten Wasserproben mit Toluol genügt. Das Schema der Aufarbeitung ist in Abbildung 20 zu sehen (Schmidt 1990).

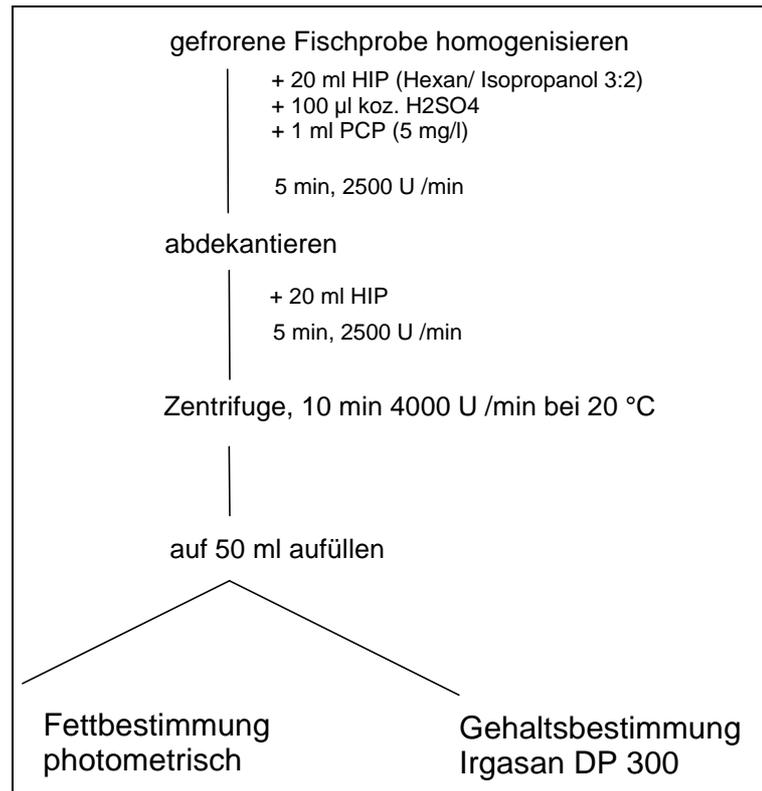


Abbildung 20: Aufarbeitung einer Fischprobe auf Triclosan

2.3.2 Derivatisierung

Durch die polare Hydroxylgruppe des Triclosans ist die direkte kapillargaschromatographische Bestimmung problematisch, durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen sind hohe Verdampfungstemperaturen erforderlich und es kommt zu Adsorptionen auf der Säule. Die Hydroxylfunktion muß daher derivatisiert werden. Phenole können zu Acyl- oder Alkylderivaten umgesetzt werden. Als Acylierungsreagenzien sind Acetanhydrid und Pentafluorbenzoylchlorid gebräuchlich. Die am häufigsten verwendeten Alkylierungsreagenzien sind Diazomethan bzw. Diazoethan. Zusätzlich gibt es Varianten mit Methanol/Schwefelsäure und BF₃/Methanol. Die Bildung der Methylester mit Diazomethan ist die am häufigsten angewandte Veresterung, da die Derivatisierung sehr einfach durchzuführen ist und sehr gut reproduzierbare Ergebnisse liefert (Begerow und Dunemann 1998). Nachteil sind die kancerogenen Eigenschaften sowohl von Diazomethan als auch seiner Synthesestufen. Daher wurden alternative Alkylierungsmethoden entwickelt. Eine Methode ist die von Butte entwickelte pyrolytische Alkylierung mit Trimethyl- bzw. Triethylsulfoniumhydroxid (TMSH bzw. TESH) (Butte et al. 1982). Diese Methode bietet einige Vorteile gegenüber der Derivatisierung mit Diazomethan: Wäßrige TMSH- bzw. TESH-Lösungen, die leicht herzustellen sind, besitzen einen pH-Wert größer 12 und eignen sich daher gleichzeitig als Extraktionsmittel für Chlorphenole, d.h. es findet eine

weitere Aufreinigung statt. Die Alkylierung erfolgt erst im Injektorblock des Gaschromatographen (Abbildung 21). Das Alkylierungsreagenz läßt sich sehr gut bei standardisierten Reihenuntersuchungen einsetzen, da es im Gegensatz zu Diazomethan über einen längeren Zeitraum gelagert und daher in größeren Mengen hergestellt werden kann. Zudem sind Trialkylsulfoniumverbindungen nicht als toxisch bekannt.

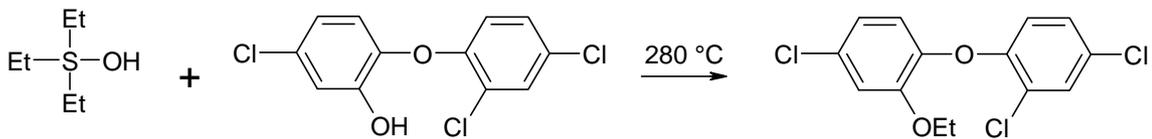


Abbildung 21: Derivatisierung von Triclosan im Injektorblock mit TESH

2.3.3 Gaschromatographische Bestimmung

Analytik im Spurenbereich erfordert nachweisstarke Analysenmethoden. Die quantitative Bestimmung von halogenhaltigen organischen Substanzen erfolgt am häufigsten mit der Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD) (Comor et al. 1995). Der ECD ist ein sehr selektiv arbeitender Detektor, der auf der Verminderung eines konstanten Elektronenstroms durch elektroneneinfangende Substanzen beruht, z.B. Substanzen mit elektronegativen Halogenatomen als Substituenten. Triclosan besitzt drei Chloratome, damit ist es im ECD leicht zu detektieren und der ECD wurde daher hier verwendet. Zur Detektion kann auch die GC-MS verwendet werden. Diese Methode hat den Vorteil der Substanzidentifikation über die Molmasse bzw. durch Fragmente, ist jedoch aufwendiger und teurer (Matsushima 1988, Nishikawa und Okumura 1996).

Da die Chromatogramme mit Hilfe eines internen Standards ausgewertet werden sollten, der eventuelle Substanzverluste während der Aufarbeitung korrigiert, mußte vor der Probenaufarbeitung ein geeigneter interner Standard gefunden werden, der von ähnliche chemischer Struktur wie die zu untersuchende Substanz ist und ähnliche Retentionszeiten hat. Als interner Standard (IS) wurde Pentachlorphenol (PCP) gewählt. Ein typisches Chromatogramm der Bestimmung von Triclosan im Fisch ist in Abbildung 22 dargestellt.

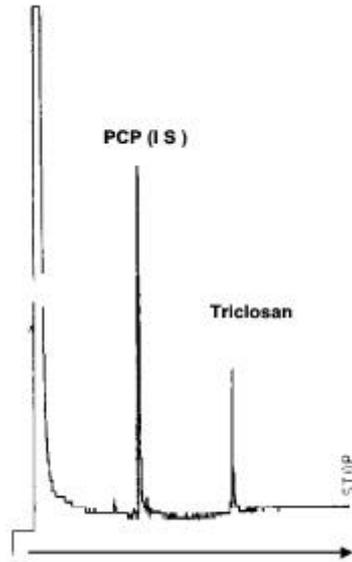


Abbildung 22: Chromatogramm (GC-ECD) einer Fischprobe mit Triclosan und PCP (IS) nach flüssig-flüssig Aufarbeitung und TESH als Derivatisierungsreagenz

2.3.4 Fettbestimmung

Der Gesamtfettgehalt wurde photometrisch nach Aufschluß mit konz. Schwefelsäure und Farbkomplexbildung mit Vanillin-Phosphorsäure (rote Färbung) bei $\lambda = 546$ nm Hg-Lampe bestimmt (Merck 1974). Diese Art der Fettbestimmung ist relativ schnell durchführbar und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz. Bei der Sulfo-phosphovanillin-Reaktion bilden die Lipide einen rosa Farbstoff, der nach Zöllner und Kirsch (1962) photometrisch gemessen wird (aus: Merck 1974). Der Gesamtlipidgehalt wird dann durch Vergleich mit einem Lipidstandard bestimmt.

2.3.5 Einstellung des pH-Wertes des Wassers in aquatischen Systemen

Für die Einstellung des pH-Wertes des Wassers in aquatischen Systemen hat man mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Häufig findet sie nur über Säuren und Basen statt. Dalelal et al. und Kobayashi und Kishino verwendeten bei ihren pH-abhängigen Toxizitätsmessungen Salzsäure bzw. Natronlauge (Dalela et al. 1980, Kobayashi und Kishiko 1980 b), während Sephar et al. Salpetersäure zur Einstellung der niedrigen pH-Werte benutzten (Sephar et al. 1985). Unter statischen Bedingungen schwankten die pH-Werte höchstens um 0,3 Einheiten. Da die Testorganismen Säuren, Basen und Kohlendioxid abgeben, kann diese Art der Justierung in Durchflusssystemen zu erheblichen Schwankungen führen. Mit Puffern aus organischen oder anorganischen Salzen lassen sich diese Schwierigkeiten umgehen, dabei sollten die resultierenden Salzkonzentrationen im Wasser nicht zu groß werden, da Fische sehr empfindlich auf hohe Ionenkonzentrationen reagieren. Für die Einstellung im alkalischen Bereich

wurden Borat- und Borsäuresysteme (Dave 1984) oder häufig auch Dihydrogenphosphat- oder Phosphatlösungen als Puffer eingesetzt (Lohner und Fischer 1990). Das "Comittee on Methods for Toxicity Test with Aquatic Organisms" (Comittee 1975) schlägt als Puffersysteme für pH-abhängige Bioakkumulationsmessungen in Durchflußsystemen Natronlauge/Kaliumdihydrogenphosphat (pH-Bereich 6 - 8) und Natronlauge/Borsäure vor (pH-Bereich 9 - 10). In Anlehnung daran wurden für den pH-Wert 6 das System Salzsäure/Kaliumdihydrogenphosphat, für pH 7 Natronlauge/Kaliumdihydrogenphosphat, für pH 8 das normale Leitungswasser und für pH 9 Natronlauge/Borsäure verwendet (Schmidt 1990).

2.3.6 Statistische Bewertung der Biokonzentrationsfaktoren als Funktion des pH-Wertes

Für die kinetisch bestimmten BCF-Werte ergaben sich für die jeweiligen pH-Werte ähnlichen Daten wie für die Gleichgewichts-BCFs (Abbildung 23):

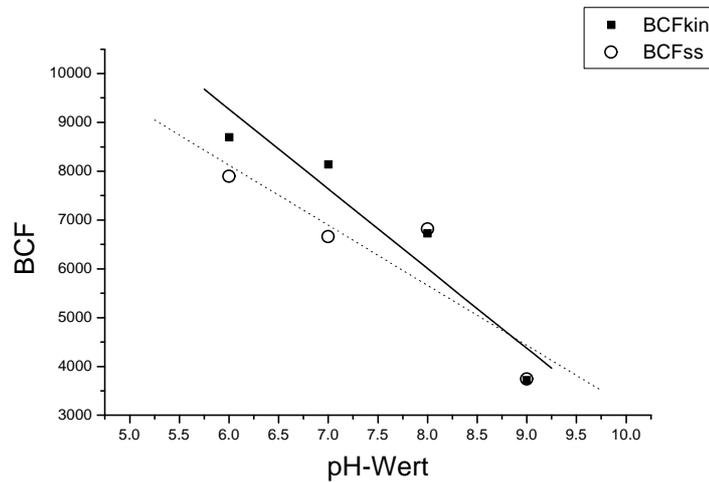


Abbildung 23: BCF_{kin} und BCF_{ss} in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers

Um zu entscheiden, ob die Unterschiede nur zufallsbedingt sind und deshalb eventuell „zusammengefaßt“ werden können, wurde ein Mittelwertvergleich durchgeführt ($H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$). Ein Vergleich zweier empirisch bestimmter Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten mit unterschiedlichen Varianzen läßt sich nach folgender Gleichung durchführen (Fischer-Behrens Problem) (Sachs 1997, S. 355):

$$\hat{t} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{mit } v \text{ Freiheitsgraden} \quad v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1+1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2+1}} - 2 \quad (\text{Gl. 20})$$

Dabei ist $\hat{t}_{v,a=0,05}$ die Prüfgröße. Für alle pH-Werte ergab sich, daß die Hypothese, die Mittelwerte entstammten der selben Grundgesamtheit, beibehalten werden durfte (Tabelle 8). Sie wurden deshalb zu je einem BCF zusammengefaßt.

Tabelle 8: Berechnete und tabellierte t -Werte der Prüfung auf Gleichheit der BCF-Werte von Triclosan

pH-Wert	\hat{t}	n	$t_{n,a=0,05}$
6	0,75	24,36	2,06
7	1,43	14,05	2,14
8	0,11	16,31	2,12
9	0,89	24,07	2,06

mit:

\hat{t} : berechneter t-Wert,

v : Freiheitsgrade,

$t_{n,a=0,05}$: tabellierter t-Wert

Um mehrere Meßreihen mit verschiedenen Probenumfängen, Mittelwerten und Standardabweichungen, wie hier vorliegend, zu einer Reihe zu vereinigen, verwendet man das gewogene arithmetische Mittel und die gewogene Varianz der Gesamtmeßreihe (Sachs 1997, S.137).

Das gewogene arithmetische Mittel \bar{X}_{gew} wird nach (Gl. 21),

$$\bar{X}_{gew} = \frac{n_1 \cdot \bar{X}_1 + n_2 \cdot \bar{X}_2 + \dots + n_k \cdot \bar{X}_k}{n} \quad (\text{Gl. 21})$$

die gewogene Varianz nach (Gl. 22) bestimmt.

$$s_{gew}^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum_i (n_i - 1) s_i^2 + \sum_i n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 \right] \quad \begin{array}{l} \text{mit: } X_{gew}: \text{ gew. Mittel} \\ s^2: \text{ Varianz} \\ n: \text{ Probenumfang} \end{array} \quad (\text{Gl. 22})$$

Für die Bioakkumulation von Triclosan ergaben sich aus den Einzelwerten folgende gewogene Mittelwerte und gewogene Standardabweichungen:

Tabelle 9: BCF-Werte von Triclosan - Überblick

pH	BCF_{kin}	s₁	n₁	BCF_{ss}	s₂	n₂	BCF_{gew}	s_{gew}
6	8700	2630	25	7900	3580	15	8400	3000
7	8140	1420	18	6660	3390	12	7550	2470
8	6350	963	20	6820	2610	13	6760	1870
9	3710	1230	18	3740	1720	14	3730	1440

BCF_{kin}: aus kinetischen Daten berechneter Biokonzentrationsfaktor (s₁: Standardfehler), BCF_{ss}: Biokonzentrationsfaktor im Gleichgewicht Fisch/Wasser (s₂: Standardfehler), BCF_{gew}: Gesamt-Biokonzentrationsfaktor (gewogenes Mittel mit s_{gew}: Standardfehler), n₁, n₂: Stichprobenumfänge (Anzahl der Daten zum jeweiligen Biokonzentrationsversuch), (Anmerkung: die Daten wurden auf 3 signifikante Stellen gerundet)

Werden die gewogenen BCF-Werte gegen den pH-Wert des Wassers aufgetragen (Abbildung 24), so fallen die unterschiedlich großen Standardabweichungen der einzelnen BCF-Werte auf. Bei einer linearen Regression können diese unterschiedlichen Standardabweichungen berücksichtigt und eine gewichtete lineare Regression mit dem Wichtungsfaktor $w = \frac{1}{s^2}$ durchgeführt werden (Caulcutt und Boddy 1983). Die Regressionsgerade ist in Abbildung 24 dargestellt.

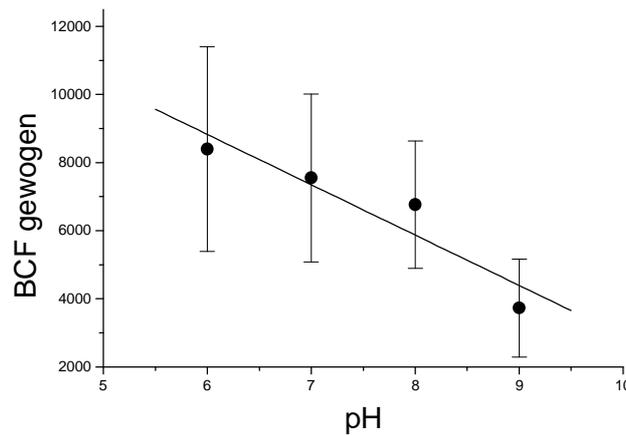


Abbildung 24: Gewichtete lineare Regression: BCFs von Triclosan in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers

Um zu prüfen, ob die lineare Abnahme des BCF mit dem pH-Wert des Wassers statistisch signifikant war, wurde der t-Test mit einseitiger Fragestellung eingesetzt (Gl. 23) (Sachs 1997, S. 537):

$$\hat{t} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Gl. 23})$$

Da der berechnete \hat{t} -Wert $> t_{tab}$ ist (für $n = 4$ ergab sich $\hat{t} = 3,96$ und $\hat{t} \geq t_{n-2; \alpha=0.05} = 2,92$), kann mit 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß die BCF-Werte mit dem pH-Wert des Wassers linear abnehmen. Ähnliches galt für die Geschwindigkeitskonstante k_1 der Aufnahme ($\hat{t} = 3,67$, $\hat{t} \geq t_{n-2; \alpha=0.05} = 2,92$).

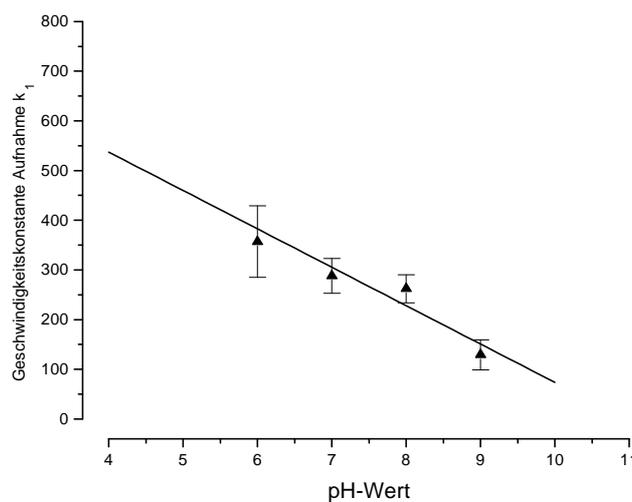


Abbildung 25: Geschwindigkeitskonstante k_1 der Akkumulation von Triclosan in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wassers

2.3.7 Diskussion der pH-Abhängigkeit der Bioakkumulation von Triclosan

Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß der pH-Wert des Wassers die Toxizität dissoziierender organischer Verbindungen in aquatischen Organismen beeinflusst (Dalela et al. 1980, Könemann und Musch 1981, Saarikoski und Viluksela 1981,1982). Vielfach wurden substituierte Phenole für die Untersuchungen eingesetzt, da sie aufgrund ihrer breiten Verwendung in großem Umfang im Abwasser vorkommen. Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Akkumulation anderer dissoziierender Chemikalien vom pH-Wert des Wassers sind eher selten.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen zeigte sich, daß die Bioakkumulation von Triclosan im Fisch rasch bei allen pH-Werten des Wassers erfolgte. Die Geschwindigkeitskonstanten der Aufnahme- und somit die Biokonzentrationsfaktoren, sowohl die kinetisch bestimmten als auch die Gleichgewichtsbiokonzentrationsfaktoren, unterschieden sich bei den verschiedenen pH-Werten: Die Geschwindigkeitskonstante der Akkumulation k_1 sank von 360 h^{-1} bei pH 6 um mehr als die Hälfte auf 130 h^{-1} bei pH 9, damit sank auch der BCF von ~ 8400 bei pH 6 auf ~ 3700 bei pH 9. Die Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Eliminationsphase hingegen wiesen alle einen Wert in der Größenordnung von $0.035 - 0.041 \text{ h}^{-1}$ auf. Die statistische Betrachtung der BCF's zeigte, daß die kinetisch bestimmten BCFs und Gleichgewichts-BCFs zusammengefaßt werden dürfen und ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem Biokonzentrationsfaktor bzw. der Aufnahmegeschwindigkeit besteht. Diese Abhängigkeit der Kinetik der Akkumulation und des BCF-Wertes vom pH-Wert steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen in der Literatur.

Hunn und Allen (1974) beschreiben die Akkumulation von ^3H -markiertem 3-Trifluormethyl-4-nitrophenol (TFM, pK_a 6,07) in Regenbogenforellen bei verschiedenen pH-Werten des Wassers. Die Aufnahme von TFM bei pH 6 war deutlich größer als die Aufnahme bei pH 7.4 und noch geringer bei pH 9 (Abbildung 26).

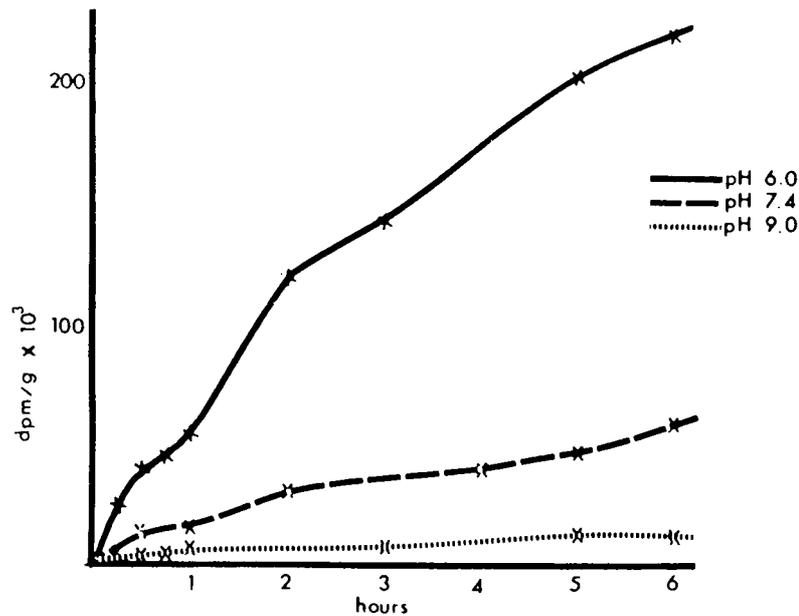


Abbildung 26: Die Aufnahme von ^3H -markiertem TFM durch Regenbogenforellen bei drei pH-Werten des Wassers, gemessen im gesamten Fisch (aus: Hunn und Allen 1974)

Saarikoski und Viluksela bestimmten die BCF-Werte verschiedener Phenole bei bekanntem pH-Wert unter Gleichgewichtsbedingungen im statischen System und stellten fest, daß mit fallendem pK_a -Wert der Substanzen der BCF abnahm. Anscheinend wurde hauptsächlich die undissoziierte Substanz in den Fisch aufgenommen, mittels Ionenkanäle oder Ionenpumpen (Hayton und Barron 1990). Für die ionische Form der Substanz besteht zwar die Möglichkeit, die Epithelienmembran durch die Schlußleisten (tight junctions) zwischen den Zellen zu durchdringen, da die Epithelienmembran an diesen Stellen auch für Ionen permeabel ist, dieser Weg der Aufnahme scheint aber in sehr viel geringerem Ausmaß zur Akkumulation beizutragen, was nicht zuletzt an der sehr viel geringeren Gesamtfläche der Schlußleisten im Vergleich zur Gesamtfläche der Epithelie liegen könnte (Saarikoski und Viluksela 1982). In weiterführenden Untersuchungen stellten Saarikoski und Viluksela fest, daß mit steigendem pH-Wert die Aufnahmegeschwindigkeit sank, während bei pH-Werten, die um mehr als zwei Einheiten unter dem pK_a der entsprechenden Verbindung lagen, keine pH-Abhängigkeit mehr festgestellt werden konnte. Hier war die Aufnahmegeschwindigkeit nur noch von der Lipophilität abhängig (Saarikoski et al. 1986).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Könemann und Musch, die den Einfluß des pH-Wertes auf die Toxizität von Chlorphenolen gegenüber Fischen (Guppies) untersuchten. Sie maßen eine starke Abhängigkeit der Toxizität vom pH-Wert des Mediums und dem pK_a -Wert der untersuchten Chlorphenole. Ein Grund dafür ist nach

Aussage der Autoren der Einfluß von pH-Wert des Wassers und pK_a -Wert der Chemikalie auf die Akkumulationsgeschwindigkeit im Fisch: Die molekulare Form einer Säure kann die hydrophoben Membranen der Kiemen wesentlich schneller passieren als die ionische Form. Deshalb sind die Geschwindigkeitskonstanten der Aufnahme- und Eliminationsphase abhängig von pH- und pK_a -Wert. Somit ist auch die Bioakkumulation von diesen Parametern abhängig. Bei einer gegebenen Gesamtkonzentration der Säure erhöht sich die Aufnahmegeschwindigkeit in den Fischen mit abnehmendem pH-Wert des Wassers, weil sich die relative Konzentration der nicht-ionisierten Form außerhalb des Fisches erhöht und sich ein höherer Konzentrationsgradient einstellt. Die Aufnahmegeschwindigkeit erreicht somit maximale Werte, wenn die Dissoziation der Säure im Wasser vernachlässigt werden kann ($pH - 2 > pK_a$). Da auch die Verteilung von PCP im System organisches Lösungsmittel/Wasser eine pH-Abhängigkeit aufweist, lag es nahe, den Einfluß des Ionisationsgrades auf den n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$) und auf die Bioakkumulation miteinander zu vergleichen. Dabei wurde eine lineare Beziehung zwischen dem BCF im Fisch und dem Verteilungsverhältnis im System n-Oktanol/Wasser festgestellt. Nach Meinung der Autoren ist dies ein Hinweis dafür, daß der Übergang von PCP aus dem Wasser in den Fisch durch Diffusion, hauptsächlich der molekularen Form bestimmt wird, während die Phenolationen nur wenig - vermutlich über Wasserstoffbrückenbindungen mit den polaren Fetten der Kiemenmembranen (wie z.B. Phosphatidylcholin) - in den Fisch diffundieren (Könemann und Musch 1981).

Der Zebraärbling kann längere Zeit bei pH 5 leben, daher kann er wahrscheinlich den pH-Wert seines Blutes in Grenzen puffern (Dively et al. 1977). Die Veränderung des pH-Wertes im umgebenden Wasser ist daher nicht von großer Bedeutung für die Verteilung, die eigentliche Aktivität oder den Metabolismus von Triclosan im Fisch. Weil Phenole im Fisch hauptsächlich als neutrale Konjugate ausgeschieden werden (Barber et al. 1997, Ensenbach und Nagel 1991, Kobayashi und Kishino 1980a), ist die Elimination weitgehend unabhängig vom pH-Wert des umgebenden Wassers. Dafür spricht auch, daß sich die Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Elimination von Triclosan für alle pH-Werte gleichen. Die Aufnahmegeschwindigkeit k_1 ist somit der bestimmende Faktor für die Bioakkumulation und hängt vom pH-Wert des umgebenden Wasser ab, da k_1 mit abnehmendem pH-Wert ansteigt. Die Ursache ist primär die schnellere Aufnahme von undissoziiertem Triclosan durch passive Diffusion, so ist der Anteil an undissoziiertem Triclosan bei pH 6 um 100 %, bei zunehmendem pH-Wert des Wassers wird er geringer, bis er bei pH 9 nur noch rund 10 % ausmacht, aber auch bei hohen pH-Werten des Wassers findet die Anreicherung durch andere Aufnahmewege noch statt.

3. Bioakkumulation der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin in Regenbogenforellen

3.1 Einleitung

Die Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin (Abbildung 27) sind synthetische Insektizide, die sich strukturell von den natürlichen Pyrethrinen (Pyrethrum-Wirkstoffe) ableiten, und sich durch Lichtstabilität, hohe Wirksamkeit, geringe Aufwandsmenge und relativ geringe Toxizität gegenüber Säugetieren auszeichnen. Seit 1972 werden sie vor allem in der Landwirtschaft als Insektizide eingesetzt, wo sie Organochlor- und Organophosphatpestizide ersetzen und haben inzwischen einen Marktanteil von 23 % erreicht (Casida und Quistad 1998). Aufgrund der sehr starken lipophilen Eigenschaften (mit $\log P_{OW}$ -Werten von 6 bis 7) sollten Pyrethroide sehr hohe Biokonzentrationsfaktoren haben. Bisherige Untersuchungen führten jedoch - wie bereits erwähnt - zu deutlich geringeren BCF-Werten. Daher wurde in dieser Arbeit die Bioakkumulation der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin im Durchflußsystem untersucht.

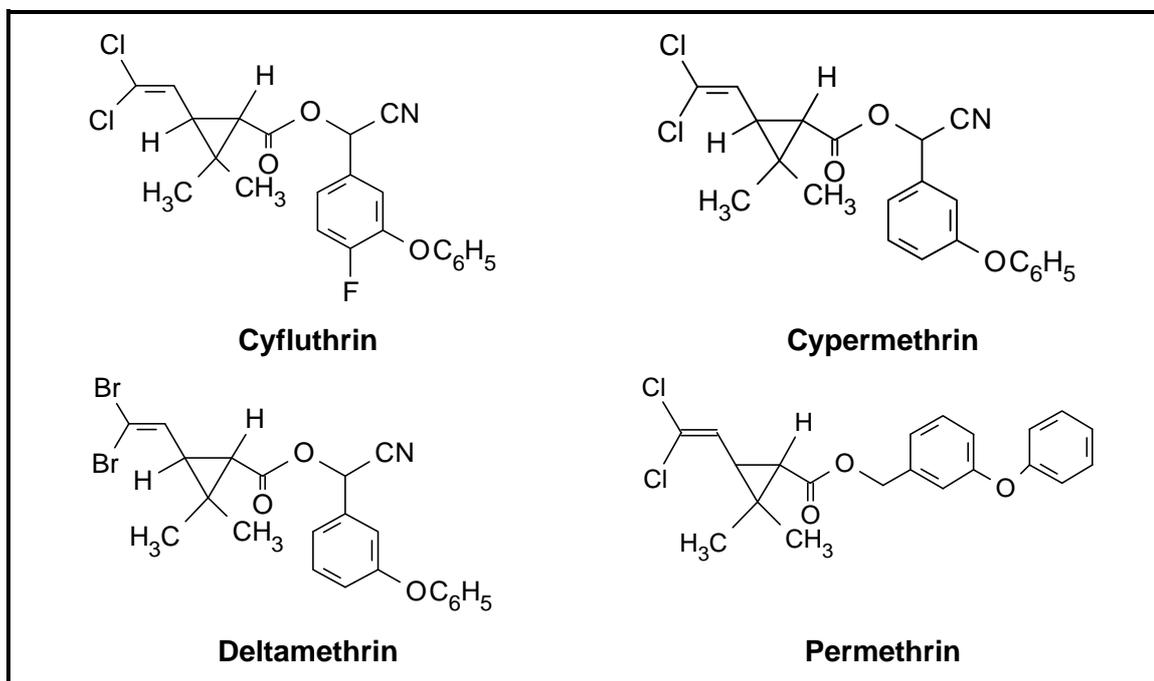


Abbildung 27: Struktur der synthetischen Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin

3.1.1 Pyrethrum und Pyrethroide

Der Extrakt aus Blüten verschiedener Chrysanthemenarten, das Pyrethrum, ist seit Jahrhunderten als Insektenbekämpfungsmittel bekannt. Mit dem kommerziellen Anbau, vor allem von *Chrysanthemum cinerariaefolium*, wurde aber erst etwa 1840 in Dalmatien begonnen. Von dort gelangten die getrockneten Blüten als wirksames Insektenpulver (Dalmatiner Pulver) nach Europa und Amerika.

Pyrethroide wurden nach dem Vorbild des in der Natur vorkommenden Pyrethrums entwickelt, ein Vorgang, der für neuere Synthesen der Organischen Chemie beispielhaft ist. Im folgenden wird die Entwicklung der Pyrethroide sowie die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der ökonomisch bedeutenden Pyrethroide beschrieben.

Pyrethrum ist in den Blüten der Chrysanthemum-Pflanzen *Chrysanthemum cinerariaefolium* und *C. roseum* sowie *C. coccineum* (Naumann 1981), *C. balsamita*, *C. coronarium*, *C. marshalli* und *C. seticuspe* (Jäger-Mischke und Wollny 1988) enthalten, wobei das *C. cinerariaefolium* am häufigsten kommerziell angebaut wird. Heute werden vor allem Rohextrakte aus Kenia, dem Haupterzeuger, Tansania und Japan importiert. In warmwäbrigem Klima wie in Kenia oder Tansania kann der Pyrethrum-Gehalt pro Blüte bis zu 2 % betragen (Jäger-Mischke und Wollny 1988). Kenia und Tansania produzierten 1983 mit ca. 25 000 t über 90 % der Welternte. Das durch Kalt-Extraktion aus den Blüten gewonnene Pyrethrum wird entwachst und entfärbt, bevor es als Wirkstoff in Aerosolen, Sprays und Pudern weiterverarbeitet wird. 1912 entdeckten Staudinger und Ruzicka die chemische Struktur des Pyrethrums und ebneten damit den Weg für die Synthese der Pyrethroide. Etwa 50 Jahre später wurde die Stereochemie der Alkoholkomponente und damit endgültig die Struktur der Pyrethrine bestimmt (Naumann 1981).

Aus dem Pyrethrum-Konzentrat lassen sich sechs insektizide Verbindungen, die Pyrethrine, isolieren und charakterisieren (Abbildung 28), bei denen es sich um optisch aktive Ester der (+)-*trans*-Chrysanthemumsäure oder der (+)-*trans*-Pyrethrinsäure, und der Hydroxyketone (+)-Pyrethrolon, (+)-Cinerolon und (+)-Jasmolin handelt.

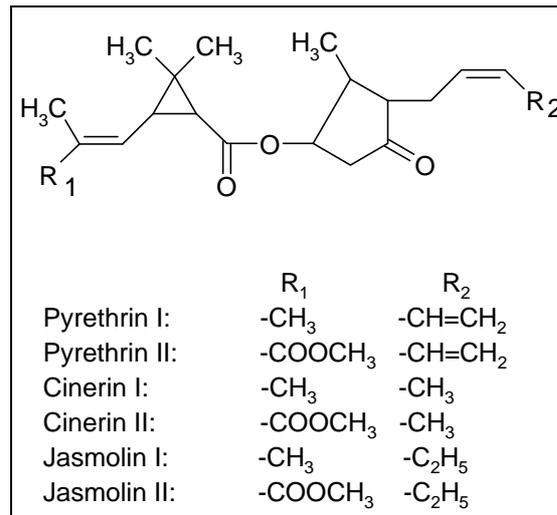


Abbildung 28: Die insektiziden Bestandteile des Pyrethrums

Der aus Chrysanthemen gewonnene Pyrethrum-Extrakt enthält ca. 40 % Pyrethrin (I+II), ca. 10 % Cinerin (I+II) und ca. 5 % Jasmolin (I+II) (Jäger-Mischke und Wollny 1988). Der als Insektizid wirksamste Bestandteil ist Pyrethrin I, es ist 100 mal wirksamer als die anderen Komponenten; Pyrethrin II wirkt am schnellsten betäubend (Naumann 1981).

Unter Luft-, Licht- und Hitzeeinfluß zerfallen die Pyrethrine schnell zu ungiftigen Produkten, Stabilisatoren wie Antioxidantien, UV-Absorber, Bor-Verbindungen, Kieselgel und andere organische Träger werden deshalb Pyrethrum-haltigen Produkten ebenso zugesetzt wie Synergisten wie Piperonylbutoxid (PBO), um die Wirksamkeit als Insektizid zu erhöhen. Die geringe Stabilität und die hohen Herstellungskosten stehen einem ökonomisch sinnvollen Einsatz in der Landwirtschaft entgegen.

Die Synthese von photostabilen Pyrethroiden mit stärkerer insektizider Wirkung und hoher Stabilität führte in den zurückliegenden Jahren zu einer rasanten Produktionssteigerung und zur Entwicklung zahlreicher pyrethroider Wirkstoffe, die vorwiegend als Insektizide im landwirtschaftlichen Bereich, im Holzschutz und in Innenräumen, aber auch zur Vektorkontrolle und in der Medizin zur Behandlung parasitärer Hauterkrankungen eingesetzt werden. Das erste photostabile Pyrethroid war das Permethrin, das im Jahre 1973 von Elliott synthetisiert wurde (Elliott et al. 1973). Die 3-Phenoxybenzylfunktion des Permethrins wirkt als intramolekularer UV-Filter; es ist 100 mal stabiler als die halogenfreien Homologen, was erstmals einen pyrethroiden Einsatz im agrarischen Sektor erlaubte.

Im Jahre 1975 wurde in α -Stellung zur Phenoxybenzylgruppe eine Cyanogruppe eingeführt, um die Alkoholfunktion des Permethrins zu stabilisieren. Dadurch wurde der Ester eines primären Alkohols wie des Permethrins in einen stabileren Ester eines

sekundären Alkohols umgewandelt. Das Produkt ist das Cypermethrin. Eine Modifikation der Phenoxybenzylgruppe zur 4-Fluor-3-phenoxybenzylgruppe schuf das Cyfluthrin im Jahre 1974. Durch die Substitution der Dichlorvinylgruppe des Cypermethrins durch eine Dibromvinylgruppe erhält man das Deltamethrin (Elliott et al. 1974). Von den acht möglichen Stereoisomeren besitzen zwei insektizide Wirkung, nur ein Isomer (α -S, 1R *cis*) wird als Deltamethrin verwendet. Deltamethrin ist gegenüber diversen Schädlingsarten das wirksamste bekannte Insektizid. Die gegenüber den anderen Pyrethroiden gesteigerte Wirksamkeit des Deltamethrins wird von Glomot damit begründet, das Deltamethrin nur aus einem wirksamen Isomer besteht, während in Cyfluthrin, Cypermethrin und Permethrin auch unwirksame Isomere enthalten sind. Die akuten orale Toxizitäten der wirksamen Isomere sind jedoch fast identisch (Glomot 1982).

Auch Verbindungen ohne den typischen Dreiring der Cyclopropanfunktion wirken als pyrethroide Insektizide, wie z.B. Fenvalerat. Auch Nicht-Ester-Pyrethroide wurden synthetisiert, exemplarisch ist hier das Etofenprox dargestellt (Abbildung 29):

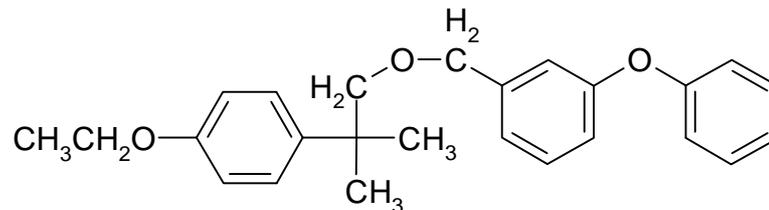


Abbildung 29: Strukturformel von Etofenprox [2-(4-Ethoxyphenyl)-2-methylpropyl-3-phenoxybenzylether

Heute sind mehr als 1000 verschiedene Pyrethroide bekannt, deren molekulare Struktur häufig nur noch wenig Ähnlichkeit mit derjenigen der Pyrethrine aufweist, bei den meisten handelt es sich um halogenierte Kohlenwasserstoffe. Einen ausführlicheren Überblick über die historische Entwicklung findet sich bei Davies (Davies 1985) sowie bei Naumann (Naumann 1998). Nur ca. zehn pyrethroide Wirkstoffe haben eine ökonomische Bedeutung erlangt, unter ihnen vor allem das Permethrin, Deltamethrin, Cypermethrin und Cyfluthrin (Abbildung 27, Seite 41) (Casida und Quistad 1998, Pap et al. 1996).

3.1.2 Molekular Modelling – Raumstruktur von Pyrethroiden

Die wichtigsten Strukturnotwendigkeiten für die insektizide Wirkung der Pyrethroide sind: Eine Gruppierung von der Raumerfüllung einer methylsubstituierten Cyclopropan- bzw. iso-Propanfunktion, ebenso notwendiger Bestandteil der Pyrethroide ist ein lipophiles substituiertes π -System. Dies ist auch für Etofenprox gültig (Naumann 1990).

Davies definiert Pyrethroide als Verbindungen, deren chemische Struktur sich von derjenigen des Pyrethrums herleitet, und deren biologischen Eigenschaften in beträchtlichem Maße mit denen der existierenden Pyrethroide übereinstimmen (Davies 1985). Die Berechnung von Raumstruktur und aktiven Komponenten bzw. eine Vorhersage der Toxizität aufgrund der Struktur als Grundlage zur Synthese neuer Pyrethroide ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Byberg et al. 1987, Elliott et al. 1988, Ford et al. 1989, Hopfinger et al. 1984, Hudson et al. 1992, Nisha und Kalyanasundaram 1992, Russom et al. 1997, Taylor und Mullaey 1994). Eine effektive Vorhersage von biologischen Effekten könnte die Anzahl der benötigten Tierversuche verringern. Weiterhin ist man auch bestrebt, andere Organismen wie Tubifiziden, Daphnien, Algen, Klärschlamm, Leuchtbakterien, Zellkulturen einzusetzen. Ein Problem bleibt jedoch stets die Aussagekraft von Test mit diesen Organismen oder des Molekular Modellings und die Übertragbarkeit auf höhere Organismen und Ökosystem.

3.1.3 Physikalische und chemische Eigenschaften

Permethrin und Deltamethrin sind in der von Dr. Ehrendorfer gelieferten Reinheit ein weiße, kristalline Pulver; Cyfluthrin und Cypermethrin sind bei Raumtemperatur gelbbraune viskose Flüssigkeiten. Gegenüber thermischen Einflüssen sind sie relativ stabil. So wird z.B. Deltamethrin durch 24-stündiges Erhitzen auf 100 °C nicht nennenswert abgebaut, leichter Abbau wird bei 150 °C, deutlicher Abbau erst bei 190 °C beobachtet (Tessier 1982). Die genannten Pyrethroide sind mit Dampfdrücke von $2 \cdot 10^{-8}$ bis $2 \cdot 10^{-6}$ mm Hg/20 °C schwerflüchtig, und aufgrund ihrer Lipophilität sehr wenig wasserlöslich mit 0,003 ppm (Permethrin), 0,01 ppm (Deltamethrin), 0,1 ppm (Cypermethrin und Cyfluthrin) (Naumann 1990) und gut löslich in organischen Lösungsmitteln. Schimmel bestimmte die Löslichkeit von Permethrin in Seewasser mit 50 µg/l (Schimmel 1983), für Cypermethrin wird eine Wasserlöslichkeit von 5-10 µg/l im Temperaturbereich 15 - 25 °C angegeben (Stephenson 1982).

Die Esterfunktion der Pyrethroide kann im sauren und alkalischen Medium gespalten werden, wobei die genannten Pyrethroide unter sauren Bedingungen eine gewisse Stabilität aufweisen. Unter milden alkalischen Bedingungen racemisiert Deltamethrin am C-Atom in α -Stellung zur 3-Phenoxybenzylgruppe, bevor die Estergruppe gespalten wird, die Nitrilgruppe reagiert mit Schwefelwasserstoff bzw. Cystein unter basischen Reaktionsbedingungen in einer Additions-Reaktion; an die pyrethroide Doppelbindung lassen sich Halogene addieren (Tessier 1982). Die Photolyse der Pyrethroide führt zu einer Vielzahl von Produkten. Die Photolysereaktionen können unterteilt werden in: Spaltung der Cyclopropanbindung, Spaltung der Bindung von α -C-Atom und Sauerstoff sowie Spaltung der Esterbindung (WHO 1989, 1990).

3.1.4 Marktanteil und Verwendung von Pyrethroiden

Pyrethroide hatten 1995 einen Anteil von 23 % am Weltmarkt an Insektiziden und ein Weltmarktvolumen von 2100 Millionen US-Dollar, mit steigender Tendenz aufgrund ihres hohen Wirkungsgrades, dem breiten Einsatzspektrum, der geringen Säugetier-toxizität und der biologischen Abbaubarkeit. Der Patentschutz der NRDC (UK's National Research Development Corporation) für die ersten Pyrethroide ist vor kurzem ausgelaufen, so daß viele kleine Hersteller in den Wettbewerb treten, mit der Folge fallender Preise. Zudem ist der Zeit- und Geldaufwand für die Entwicklung neuer Wirkstoffe sehr groß und kontinuierlich ansteigend (Casida und Quistad 1998, Lászlo et al. 1996, Pap et al. 1996).

Mehr als 95 % der Pyrethroide werden in der Landwirtschaft eingesetzt, hauptsächlich für Baumwolle, Früchte und Gemüse, Cyfluthrin z.B. für Baumwolle, Getreide, Mais, Kartoffeln, Sojabohnen, Zuckerrüben, Raps, Obst, Gemüse (Bayer 1996, 1999), Deltamethrin wird bevorzugt im Waldbau verwendet. Kleinere Mengen an Pyrethroiden werden für die Tiergesundheit, die öffentliche Gesundheit und im Haushalt eingesetzt. Während bei Insektiziden aus der Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe, Carbamate u. Phosphorsäureester Aufwandmengen von ca. 1 kg/ha nötig sind, kommt man bei den Pyrethroiden mit rund 50 – 200 g/ha, teilweise sogar mit nur bis zu 10 - 25 g/ha aus. Die Pyrethroide besitzen in der Regel eine starke, schnell einsetzten Kontakt- und Fraßgiftwirkung gegen fast alle Insekten (ausgenommen Schildläuse, Milben und bodenlebende Arten). Neben einer schnellen Anfangswirkung verfügen die Pyrethroide über eine lange Wirkungsdauer. Von Nachteil ist ihre Giftigkeit gegenüber Bienen, die jedoch zum Teil durch eine gleichzeitige Repellent-Wirkung nicht zum Tragen kommt, und ihre Toxizität gegenüber Fischen.

3.1.5 Wirkung und Neurotoxizität

Pyrethroide sind reine Kontaktgifte, die rasch in das Nervensystem gelangen und bei dem Insekt charakteristische Symptome hervorrufen: starke Erregung, gefolgt von Koordinationsstörungen, Lähmung und schließlich Tod. Die Anfangswirkung setzt dabei sehr schnell ein, d.h. das Insekt ist innerhalb weniger Minuten bewegungs-unfähig. Dieser „knock-down“-Effekt wird besonders bei Fliegen nur von wenigen Insektiziden erreicht. Die hierfür nötige Dosis reicht aber meist nicht für eine tödliche Wirkung aus, da die Wirkstoffe des Pyrethrums und die Pyrethroide im Insekt durch enzymatische Oxidation schnell entgiftet werden, so daß sich ein Teil der Tiere wieder erholen kann. Die erwünschte insektentötende Wirkung wird meist erst durch den Zusatz von Synergisten wie Piperonylbutoxid, das allein nicht biozid wirkt, oder weiterer Insektizide, wie Carbamate oder Organophosphate erreicht.

Die ausgeprägte neurotoxische Wirkung wird hauptsächlich auf eine Beeinflussung der Natriumpermeabilität von Nervenmembranen zurückgeführt (Narahashi 1986, Narahashi et al. 1995, Ray 1991). Pyrethroide haben eine hohe Affinität zu den Natriumkanälen in Nervenmembranen (Dissoziationskonstanten in der Größe von 4×10^{-8} M) und verursachen Veränderungen in ihrer Funktion: die Aktivierung funktioniert weiterhin, der Kanal bleibt aber weitaus länger geöffnet, die Erregung klingt langsamer ab ("tail"). Bei hohen Pyrethroidkonzentrationen kommt es dann zu einer kompletten Depolarisierung und Blockade des Nervs, bei geringeren Konzentrationen kommt es durch den "tail" zu wiederholten Aktionen. Obwohl Pyrethroide eine hohe Affinität zu aktiven Natriumkanälen haben, haben sie nur wenig Einfluß auf inaktive oder geschlossene Kanäle und werden daher auch als "open channel blockers" bezeichnet. Pyrethroide werden aufgrund ihrer sich unterscheidenden molekularen Struktur sowie der daraus resultierenden andersartigen toxikologischen Wirkung auf Säugetiere in zwei Gruppen, Typ I und Typ II, unterteilt. Typ I-Pyrethroide bewirken die einfachsten Vergiftungserscheinungen und einen Natrium-"tail" von kurzer Dauer. Die Vergiftungserscheinungen ähneln denen von DDT. Bei Insekten werden Unrast, unkoordinierte Bewegungen, Paralyse, bei Säugetieren auch primäre Aggressivität, erhöhte Erregbarkeit, höhere Empfindlichkeit auf äußere Reize, Tremor und Temperaturanstieg bis 40 °C hervorgerufen (Tremor-Syndrom). Pyrethroide mit α -Cyano-Substitution (Typ II) bewirken lang anhaltende Folgen von Nervenimpulsen. Die durch Typ II-Pyrethroide hervorgerufenen Symptome zeigen sich bei der Schabe durch Hyperaktivität, unkontrollierten Bewegungen und Krämpfen, bei der Ratte durch Grab- und Kratzverhalten, grobschlägigem Tremor. Die Dauer der durch verzögerte Inaktivierung verlängerten Offenhaltung des spannungsabhängigem Natriumkanals steigt mit fallender Temperatur und ist charakteristisch für das eingesetzte Pyrethroid sowie dessen absolute Konfiguration (Stereospezifität) (Vijverberg und van den Bercken 1990, Vijverberg et al. 1986).

3.1.6 Pyrethroide in der aquatischen Umwelt

Pyrethroide können über die Felderentwässerung nach einer landwirtschaftlichen Anwendung, durch Abdrift beim Besprühen von Wäldern und durch direkte Besprühung von Wasserflächen z.B. beim Reisanbau in die aquatische Umwelt gelangen. Auch ein Eintrag durch Kläranlagen ist denkbar, besonders aus der Wolle verarbeitenden Industrie. Die großflächigen Anwendung, wie es beispielsweise beim Besprühen von Wäldern erfolgt, muß bei der Betrachtung des Risikos für die aquatische Umwelt berücksichtigt werden. Die Pyrethroide sind sehr toxisch für Fische mit LC_{50} -Werten, die in der Größenordnung von unter ein Mikrogramm pro Liter liegen

(Zitko et al. 1977, 1979, 1980). Die Wirkung von Pyrethroiden auf Nichtzielorganismen ist in einer Reihe von Übersichtsarbeiten zusammengestellt worden (Bradbury und Coats 1989a,b, Edwards und Milburn 1985a,b, Hill 1985, Stratton und Smith 1986, WHO 1990).

3.1.7 Versuchsaufbau und Durchführung

Die Bioakkumulationsanlage bestand in Anlehnung an internationale Standardtestvorschriften (OECD 1996) aus einem Akkumulationsbecken, in dem juvenile Regenbogenforellen unter Durchflußbedingungen den jeweiligen Pyrethroiden ausgesetzt wurden und dem Clearancebecken, in denen die Chemikalien von den Fischen wieder in das Umgebungswasser ausgeschieden wurde. Die Regenbogenforelle wurde als Testfisch ausgewählt, da sie in der Außenstelle Ahrensburg des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg aus institutseigener Zucht zur Verfügung standen. Um möglichst konstante Temperaturbedingungen einzuhalten, wurde die Aquarien durch ein Wasserbad thermostatisiert. Die Temperatur wurde mehrmals täglich, die chemischen Parameter wie pH-Wert, der Sauerstoff-, Eisen-, Mangan- und Nitratgehalt wurden täglich kontrolliert. Die in Methanol gelösten Pyrethroide wurde mittels einer Peristaltikpumpe in das Akkumulationsbecken zugesetzt, die Konzentration des Lösungsvermittlers im Akkumulationsbecken betrug 0,2 %. Der Wasserdurchlauf wurde durch die Differenz des Höhenniveaus zwischen Vorratsbehälter und dem Wassereinlauf für die Testbecken reguliert (Abbildung 30). Die Planung der Dauer eines Bioakkumulationsexperimentes, die Zahl und der Zeitpunkt der Fischartnahmen erfolgte in Anlehnung an die Vorschläge der OECD auf der Basis der lipophilen Eigenschaften der Pyrethroide bzw. unter Verwendung einer einheitlichen Akkumulationsdauer von 96 Stunden, um parallel die akute Toxizität zu bestimmen. Die Versuche zur Bestimmung des Einflusses von Pyrethroiden auf die MFO-Aktivität von Forellenlebern fanden ebenfalls in der oben beschriebenen Anlage statt.



Abbildung 30: Durchflußanlage zur Bioakkumulation von Pyrethroiden in Regenbogenforellen in der Außenstelle Ahrensborg des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei

3.2 Ergebnisse Pyrethroide

3.2.1 Ergebnisse der akuten Toxizität

Die akuten Toxizitäten der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin wurden als LC-50 Werte mit 96 Stunden Testdauer in Bioakkumulationsversuchen bzw. in weiteren Versuchen im Durchfluß nach OECD-Norm 203 (OECD 1992) bestimmt. Dabei wurden für die eigenen Versuche Brunnenwasser und 5 – 7 cm lange und ca. 5 Monate alte Regenbogenforellen verwendet. In den Versuchsbecken mit pyrethroidhaltigem Wasser zeigten sich teils schon nach kurzer Zeit toxische Symptome wie hektische Schwimmbewegungen, erhöhte Atemfrequenz, nach längerer Zeit kamen Symptome wie Orientierungslosigkeit, Verlust der Gleichgewichtskontrolle und ein weit geöffnetes Maul hinzu. Beim Eintreten des Todes waren die Kiemenklappen weit geöffnet, die Forellen lagen auf dem Grund und die Augen traten hervor. Die bekannten LC-50 Werte wurden bestätigt, die Pyrethroide waren alle akut toxisch in Konzentrationen unterhalb 1 µg/l (Deltamethrin 0,75 µg/l, Cypermethrin 1 µg/l, Cyfluthrin 0,5 µg/l) bzw. 5 µg/l beim Permethrin. Auf weitergehende Versuche wurde verzichtet, da die eigenen Daten die bereits publizierten Werte bestätigten und aus ethischen Erwägungen keine weiteren Tiere getötet werden sollten.

3.2.2 Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Permethrin, Deltamethrin, Cypermethrin und Cyfluthrin in Regenbogenforellen

Die Kinetik der Bioakkumulation und Elimination der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin in juvenilen Regenbogenforellen ist in den Abbildung 31 bis Abbildung 36 dargestellt. Bei allen Akkumulationsversuchen war eine schnelle Anreicherung der Pyrethroide zu beobachten, dies galt sowohl bei Bezug der Daten auf das Frischgewicht als auch bei Bezug auf den Fettgehalt der Fische. Die gemessenen Daten wurden nach dem Zweikompartmentmodell zufriedenstellend beschrieben. Dabei ergaben sich durch die nichtlineare Regression der Meßdaten nach dem Zweikompartmentmodell die Geschwindigkeitskonstanten der Aufnahme- und Clearancephasen. Eine Zusammenstellung aller Daten, die in den Biokonzentrationsversuchen mit Pyrethroiden erhoben oder errechnet wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Biokonzentrationsfaktoren betragen 860 für Deltamethrin, 1240 für Cyfluthrin, 1440 für Permethrin und 2210 für Cypermethrin. Auf Fett bezogen (Ø Fettgehalte der Fische im Versuch Cyfluthrin 4,57 %, Cypermethrin 3,45 %, Deltamethrin 1,94 % und Permethrin 4,22 %) betragen die BCF-Werte 42 000 für

Deltamethrin, 27 100 für Cyfluthrin, 57 200 für Permethrin und 64 000 für Cypermethrin. Die Pyrethroidkonzentrationen im Wasser betragen im Mittel für Permethrin $4,0 \mu\text{g/l}$, für Deltamethrin $0,40 \mu\text{g/l}$, für Cyfluthrin $0,52 \mu\text{g/l}$ und für Cypermethrin $0,67 \mu\text{g/l}$. Dabei schwankten die Konzentrationen gerade bei den niedrigen Konzentrationen zum Teil erheblich, die großen Streuungen der Konzentrationen in den Fischen sind daher vor allem auf die Konzentrationsschwankungen und auf die sehr geringen Konzentrationen im Wasser zurückzuführen.

3.2.3 Bioakkumulation von Permethrin

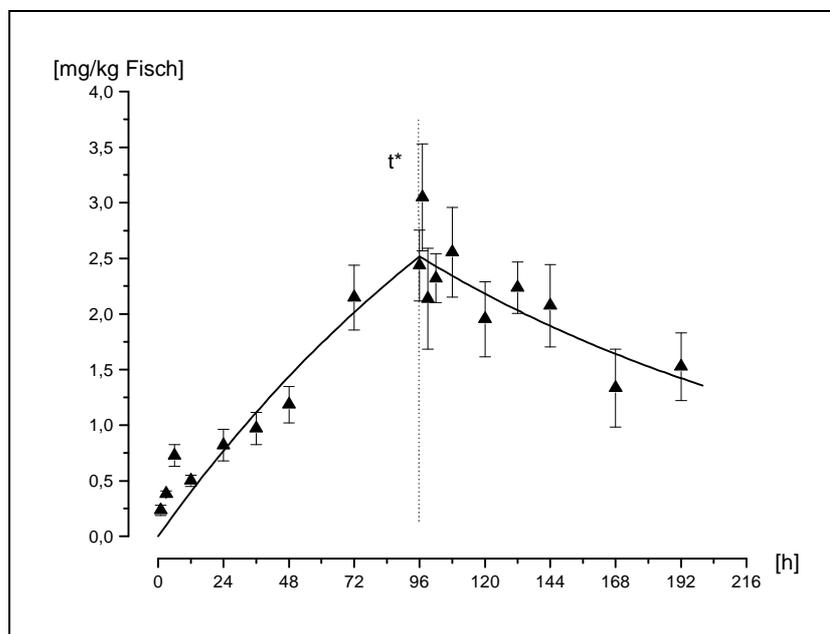


Abbildung 31: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Permethrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 4,0 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase

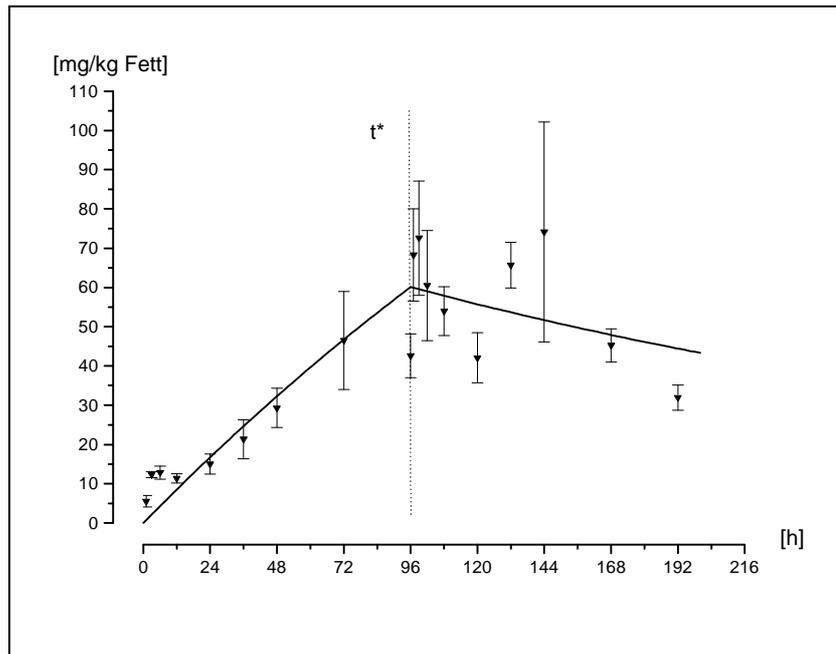


Abbildung 32: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Permethrin im Fett von Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_W = 4,0 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase

3.2.4 Bioakkumulation von Deltamethrin

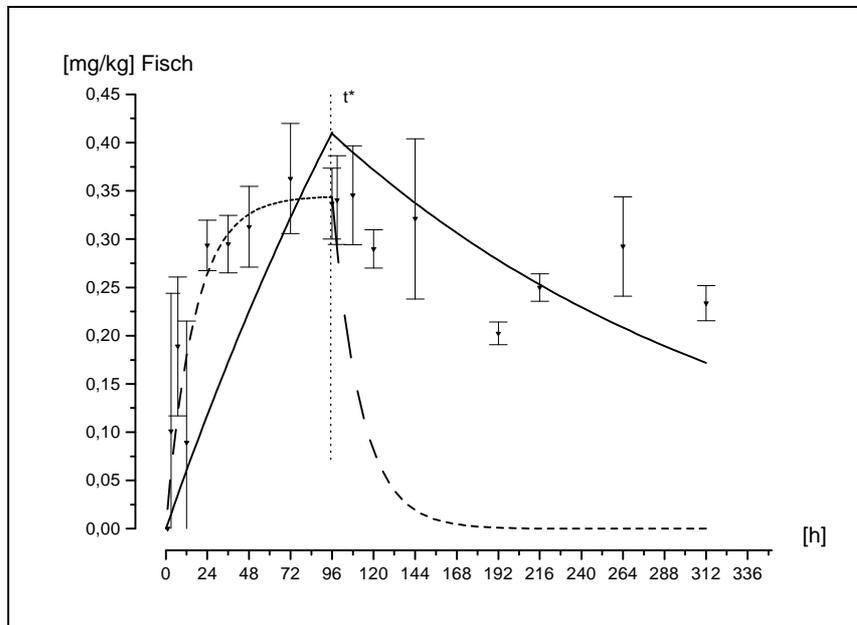


Abbildung 33: Kinetik der Bioakkumulation und Elimination von Deltamethrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $C_W = 0,40 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase. Für die Datenanpassung wurden nur Daten der Aufnahmephase (gestrichelte Linie) bzw. nur Daten der Clearancephase verwendet (durchgezogene Linie)

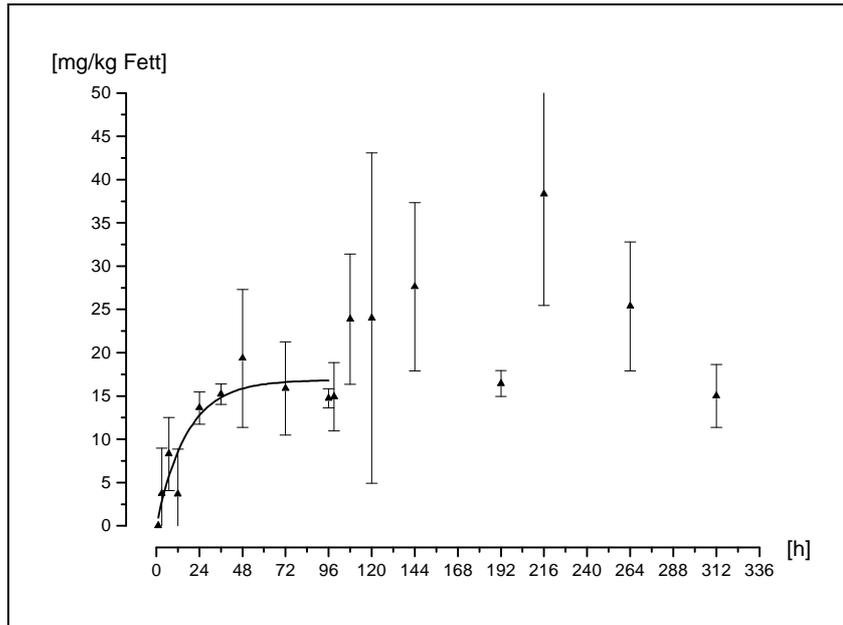


Abbildung 34: Kinetik der Bioakkumulation von Deltamethrin im Fett von Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 0,40 \mu\text{g/l}$. Nur die Daten der Aufnahmephase konnten angepaßt werden

3.2.5 Bioakkumulation von Cypermethrin

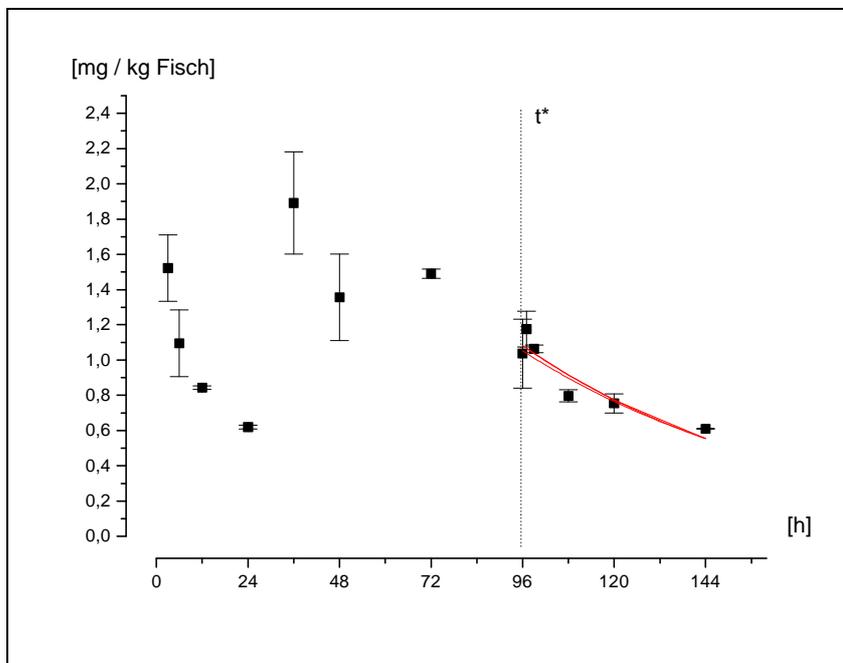


Abbildung 35: Kinetik der Elimination von Cypermethrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 0,67 \mu\text{g/l}$. t^* : Beginn der Clearancephase. Nur die Daten der Aufnahmephase konnten angepaßt werden

3.2.6 Bioakkumulation von Cyfluthrin

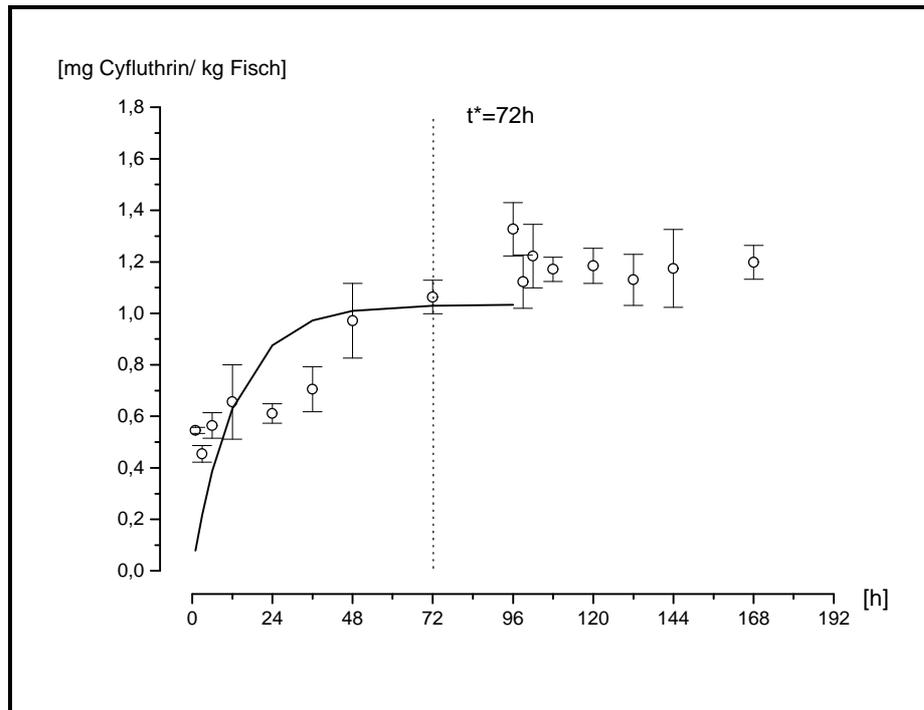


Abbildung 36: Kinetik der Bioakkumulation von Cyfluthrin in Regenbogenforellen, Konzentration im Wasser $\bar{c}_w = 0,52 \mu\text{g/l}$. Nur die Daten der Aufnahmephase konnten angepaßt werden

Tabelle 10: Biokonzentrationsfaktoren (BCF), auf Fett bezogene BCFs (BCF_L), Geschwindigkeitskonstanten für die Aufnahme (k_1) und Elimination (k_2) der hier untersuchten Pyrethroide (mit Standardabweichungen: s_{k_1} , s_{k_2} , s_{BCF})

Substanz	\bar{c}_w [$\mu\text{g/l}$]	k_1 [h^{-1}]	s_{k_1}	k_2 [h^{-1}]	s_{k_2}	BCF	s_{BCF}	BCF_L
Cyfluthrin*	0,52	41	17	0,0332	0,0206	1240	550	27 133
Cypermethrin**	0,67	29,5	4,8	0,0133	0,0034	2210	668	64 000
Deltamethrin*	0,40	52	13	0,0605	0,0187	860	366	42 130
Permethrin	4,0	8,5	0,77	0,0059	0,0014	1440	364	57 222

* berechnet aus der Aufnahmephase ** berechnet aus der Eliminationsphase

3.2.7 Ergebnisse Pyrethroid-Metaboliten

Zur Analytik der erwarteten Pyrethroid-Metaboliten, die während der Bioakkumulations-experimente gebildet worden sein konnten, wurde eine gaschromatographische Methode mit Sekundärionenmassenspektrometrie zur Detektion ausgearbeitet.

3.2.7.1 Sekundärionenmassenspektrometrie der Pyrethroid-Metaboliten Cl2CA, Br2CA, 4F3PBA und 3PBA mit der Ionenfalle

MS-MS Cl2CA: Zur Entwicklung einer MS-MS-Methode zur Analytik von Cl2CA (Molmasse Cl2CAME 222) wurde zunächst ein Massenspektrum (EI) im Bereich von m/z 160 - 300 aufgenommen (Abbildung 37). Die Hauptfragmente des Cl2CA-Methylester ergaben sich bei m/z 187 (M-35, Abspaltung eines Chloratoms²) und m/z 163 (M-59, Abspaltung der COOCH₃-Funktion). Dann wurde das Ion m/z 187 ausgewählt (die Ionenfalle isoliert ein Fenster von 3 Masseneinheiten) und erneut fragmentiert, da es das Hauptfragment darstellte und die meisten weiteren Fragmente erwarten ließ. Als optimaler Wert erwies sich eine resonante Fragmentierung mit 0,4 - 0,45 V und 20 ms Dauer. Für die MS-MS-Methode wurde der AGC-Target Wert ungefähr halbiert (35 000), die Multiplierspannung um 200 V erhöht (Varian 1995) und ein Scanbereich von m/z 100 bis m/z 200 eingestellt, um die aus der Masse m/z 187 entstehende Fragmente zu detektieren. Als Produktionen entstanden Ionen mit m/z 123, 127, 151. Das Produktion m/z 123 wurde zur Quantifizierung herangezogen (Abbildung 38).

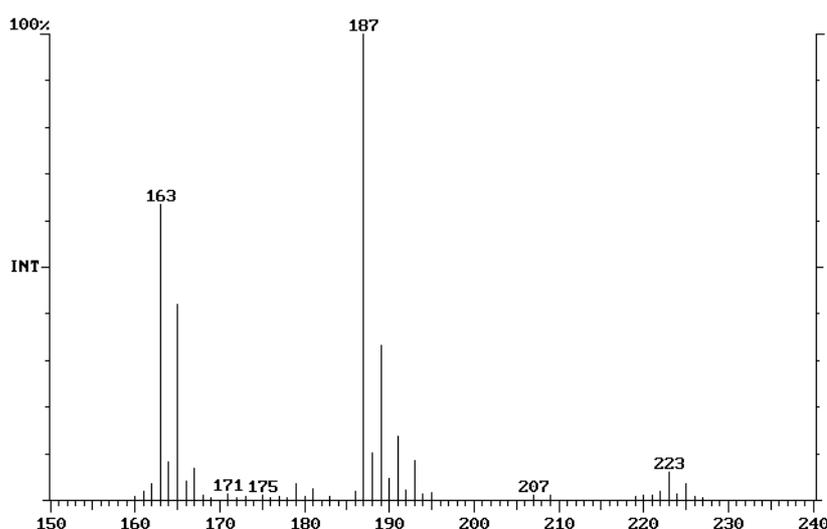


Abbildung 37: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von Cl2CAME. Molpeak bei m/z 223 (M+H), Fragmente m/z 187 und m/z 153

² Chlor liegt in zwei Isotopen vor im Verhältnis Cl-35 zu Cl-37 100 : 32.

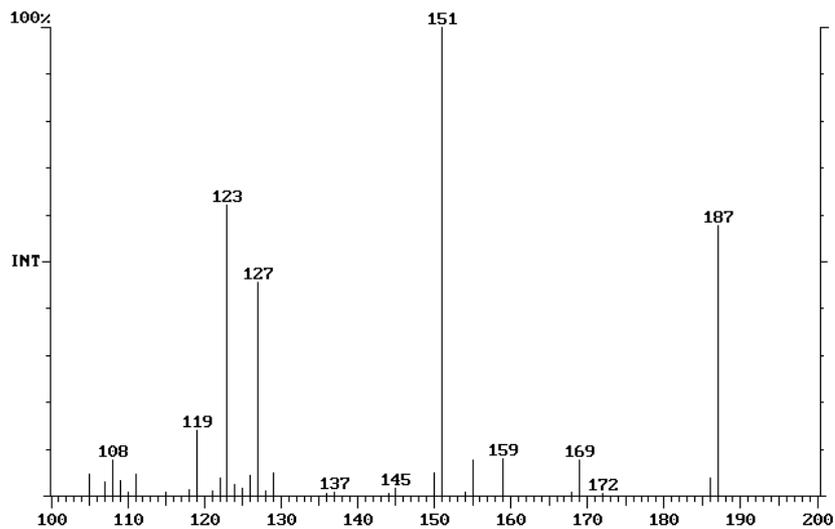


Abbildung 38: MS-MS Cl₂CAME (Parention m/z 187 mit 0,4 V (res) CID-Energie)

MS-MS Br₂CA: Zur Entwicklung einer MS-MS-Methode zur Analytik von Br₂CA (Molmasse Br₂CAME 312) wurde erst ein Massenspektrum (EI) von m/z 160 - 330 aufgenommen (Abbildung 39). Charakteristische Fragmente waren m/z 231 und m/z 233 (M-Br, Abspaltung eines Bromatoms³), m/z 253 (M-59, Abspaltung der COOCH₃-Funktion) und m/z 172 bzw. m/z 174 (M-139, Abspaltung der COOCH₃-Funktion und eines Bromatoms). Dann wurde das Ion m/z 233 ausgewählt und erneut fragmentiert. Als optimaler Wert erwies sich eine resonante Fragmentierung mit 0,4 V und 20 ms Dauer. Es wurden die Fragmente m/z 123, 151 und 173 gebildet. Zur Quantifizierung wurde die Produktion m/z 123 herangezogen (Abbildung 40).

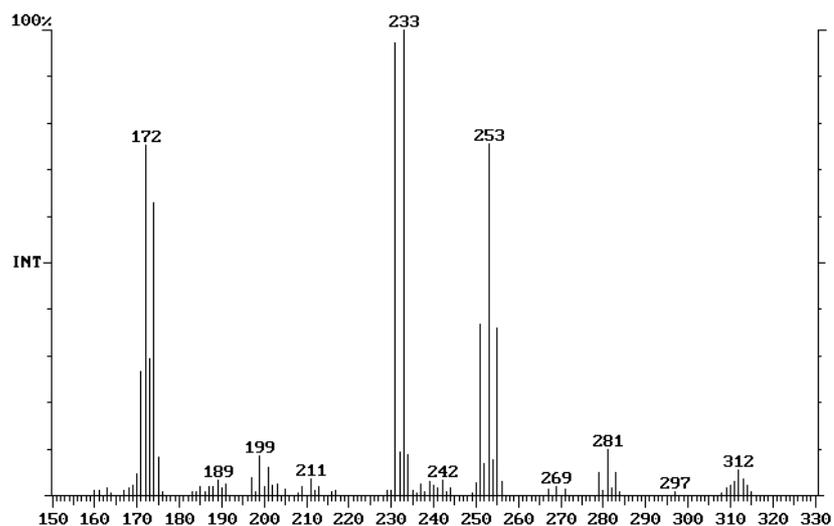


Abbildung 39: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von Br₂CAME. Molpeak bei m/z 312, Fragmente bei m/z 253, 233 und 172

³ Brom liegt in zwei Isotopen vor im Verhältnis Br-79 zu Br-81 100 : 98.

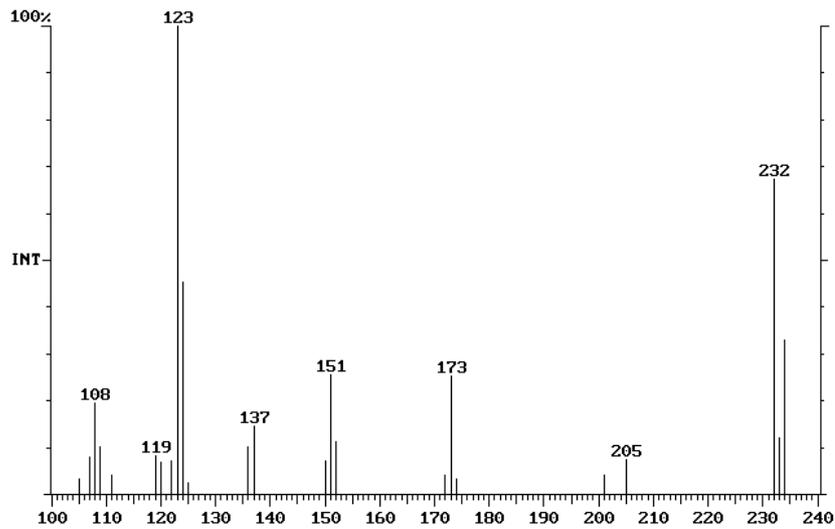


Abbildung 40: MS-MS von Br2CAME (Parention m/z 233 mit 0,4 V (res) CID-Energie)

MS-MS 3PBA: Zur Entwicklung einer MS-MS-Methode zur Analytik von 3PBA (Molmasse 3PBAME 228) wurde wie bei Cl2CA und Br2CA zuerst ein Massenspektrum von m/z 160 - 300 aufgenommen (Abbildung 41). Charakteristische Fragmente ergaben sich bei m/z 197 (M-31, Abspaltung der OCH₃-Gruppe) und m/z 169 (M-59, Abspaltung der COOCH₃-Funktion). Das Parention m/z 228 wurde ausgewählt und mit 20 V CID-Energie (non-resonant) fragmentiert, wodurch die Produktionen m/z 197 und m/z 169 entstanden (Abbildung 42). Zur Quantifizierung wurde das Produktion m/z 196 herangezogen.

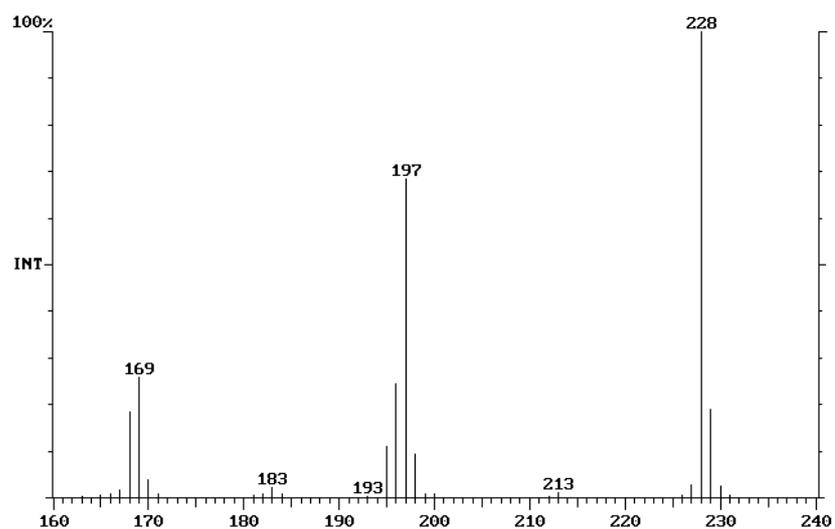


Abbildung 41: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von 3PBAME. Molpeak bei m/z 228, Fragmente bei m/z 197, 169

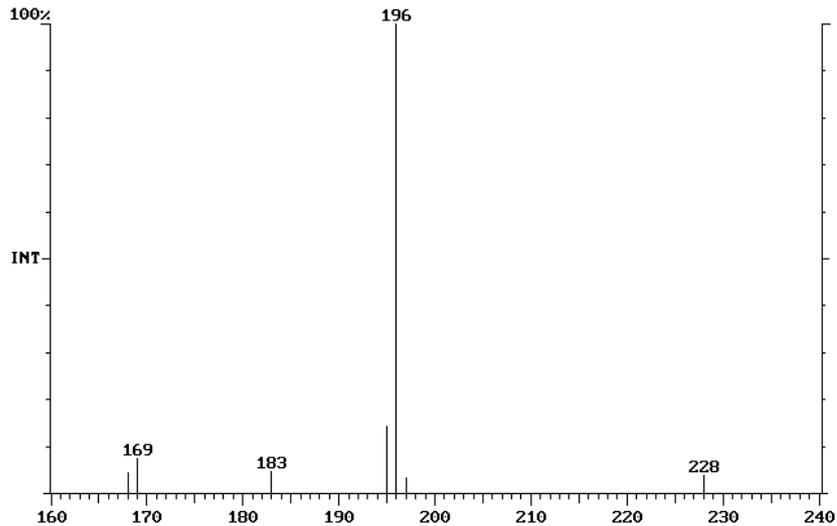


Abbildung 42: MS-MS von 3PBAMe (Parention m/z 228 mit 0,4 V res. CID-Energie)

MS-MS 4F3PBA: Zur Entwicklung einer MS-MS-Methode zur Analytik von 4F3PBA (Molmasse 4F3PBAMe 246) wurde wie bei Cl2CA, Br2CA und 3PBA zuerst ein Massenspektrum von m/z 160 - 300 aufgenommen (Abbildung 43), charakteristische Fragmente ergaben sich bei m/z 215 (M-31, Abspaltung der OCH₃-Gruppe) und m/z 187 (M-59, Abspaltung der COOCH₃-Gruppe). Das Parention m/z 246 wurde ausgewählt und mit 0,2 V CID-Energie (resonant) fragmentiert, wobei hauptsächlich das Produktion m/z 214 entstand (Abbildung 44). Zur Quantifizierung wurde das Produktion m/z 168 bzw. m/z 214 herangezogen.

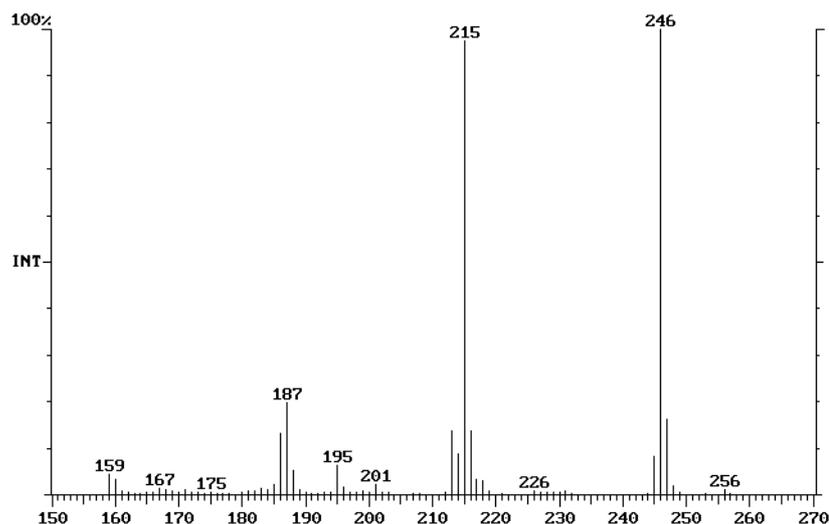


Abbildung 43: Ausschnitt aus dem Massenspektrum (EI) von 4F3PBAMe. Molpeak bei m/z 246, Fragmente bei m/z 215 und m/z 187

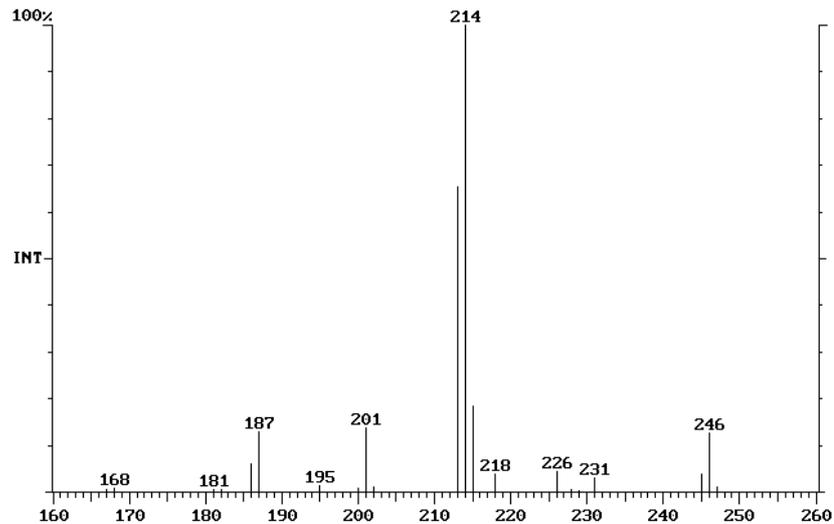


Abbildung 44: MS-MS von 4F3PBAME (Parention m/z 246 mit 0,2 V res. CID-Energie)

In den folgenden Abbildung 45 bis Abbildung 48 sind Totalionenchromatogramme und Ionenspuren von Standardadditionsversuchen der untersuchten Pyrethroid-Metaboliten zu sehen. Abbildung 45 zeigt ein Totalionenchromatogramm mit allen untersuchten Pyrethroid-Metaboliten, aufgenommen mit normaler massenselektiver Detektion. CI2CA lag als cis-/trans-Isomerengemisch vor, daher ist im Totalionenchromatogramm immer ein Doppelpeak zu erkennen. In Abbildung 46 ist ein Totalionenchromatogramm von cis-/trans-CI2CA-Methylester mit MS-MS-Detektion gezeigt, der Ausschnitt zeigt die erhaltenen Produktionen. In Abbildung 47 sieht man ein Chromatogramm einer synthetischen Fischprobe mit allen untersuchten Pyrethroid-Metaboliten, deutlich sind die unterschiedlichen Chromatogrammabschnitte zu sehen, die auf den verschiedenen MS-MS-Detektionsbedingungen der einzelnen untersuchten Parention beruhen. In Abbildung 48 sind alle Ionenspuren der zur Quantifizierung herangezogenen Produktionen in einer dotierten Fischprobe dargestellt.

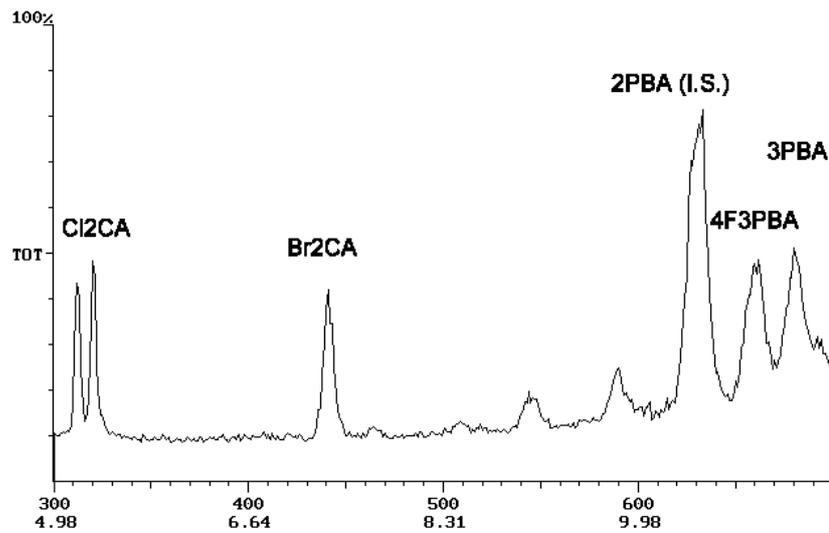


Abbildung 45: Totalionenchromatogramm der Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA-Me, Br₂CA-Me, 2PBA-Me (IS), 4F3PBA-Me und 3PBA-Me (Konz. 10 µg/l)

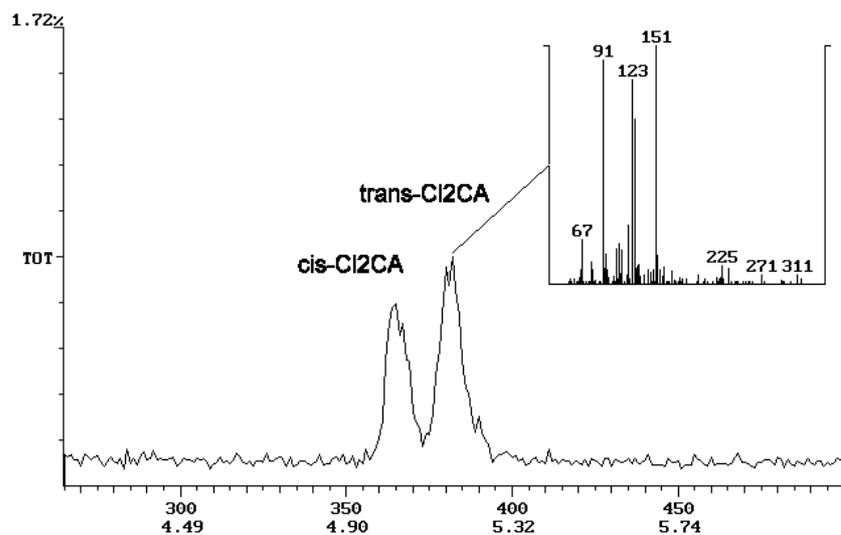


Abbildung 46: Totalionenchromatogramm von Cl₂CA-Me mit MS-MS-Detektion. Parention m/z 187 und 0,4 V resonant CID-Energie, im Ausschnitt ist das MS-MS Spektrum im Bereich m/z 50 - 320 dargestellt (Konz. 10 µg/l)

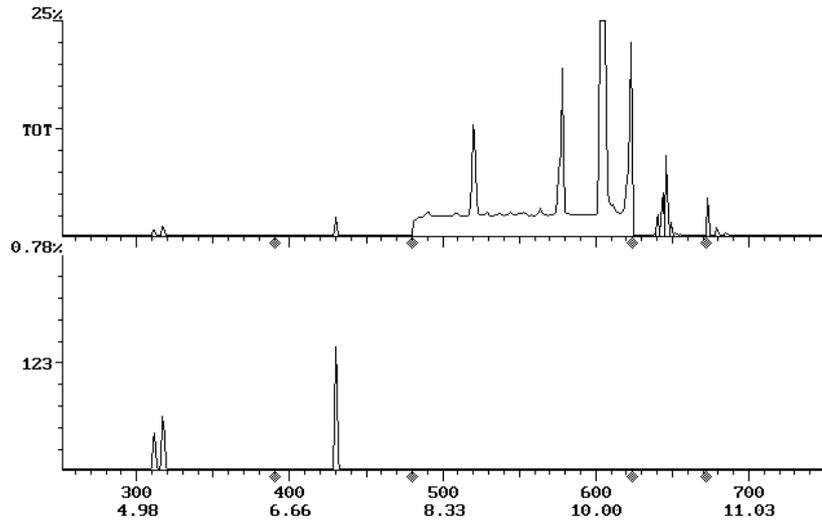


Abbildung 47: (oben) Totalionenchromatogramm mit MS-MS einer synthetischen Probe mit den Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA-Me, Br₂CA-Me, 2PBA-Me(IS) nur MS, 4F3PBA-Me und 3PBA-Me; (unten) Ionenspur m/z 123 zur Quantifizierung von Cl₂CA-Me und Br₂CA-Me (Konz. 10 µg/l)

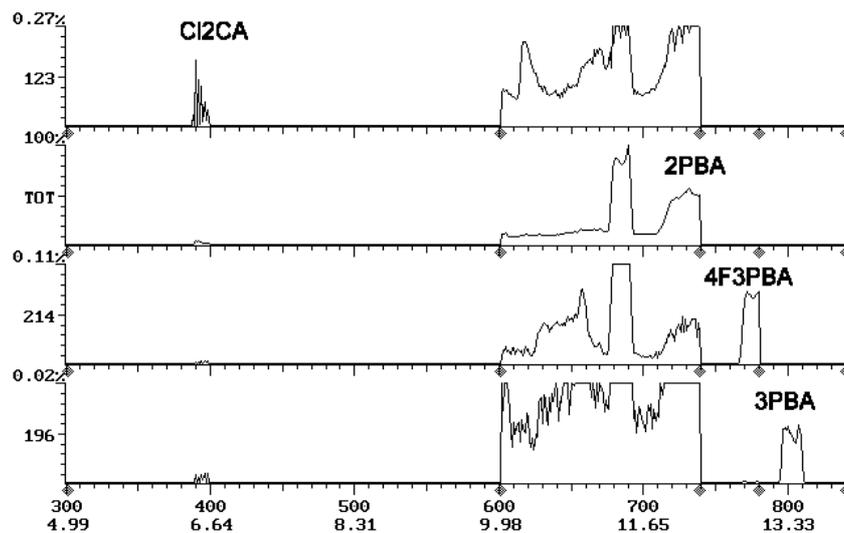


Abbildung 48: MS-MS einer mit 10 µg/l dotierten Fischprobe (von oben nach unten: Cl₂CA-Me m/z 123, 2PBA-Me (IS, nur MS) Fullscan, 4F3PBA-Me m/z 214 und 3PBA-Me m/z 196)

Die entwickelte Methodik wurde an Fischproben angewandt, die in den Bioakkumulationsversuchen der Pyrethroide gewonnen worden waren. Obwohl, wie durch Standardadditionen festgestellt wurde, die Methode prinzipiell zur Analytik von Pyrethroid-Metaboliten in Fischen geeignet ist (Abbildung 48), konnten bei einer Nachweisgrenze von 1 µg/l keine Metaboliten identifiziert werden.

3.2.8 Ergebnisse 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität (EROD)

Um den Einfluß von Pyrethroiden auf die Aktivität der mischfunktionellen Monooxygenasen (MFO) zu erkennen, wurde die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität (EROD-Aktivität) im Leberhomogenat von Fischen in mehreren Versuchen gemessen. Dazu wurden Regenbogenforellen aus Ahrensburger Zucht 72 h bzw. 356 h in Einzelstoffversuchen mit pyrethroidhaltigem Wasser verwendet (0,5 - 1 µg/l), siehe Tabelle 11:

Tabelle 11: Versuche zur Bestimmung des Einflusses von Pyrethroiden auf die EROD-Aktivität von Lebern der Regenbogenforelle

<i>Versuch</i>	<i>Pyrethroid</i>	<i>Anzahl Fische</i>	<i>Dauer</i>	<i>Konz.</i>
CS-20/24	Kontrolle	6 Fische	-	-
CS-21	Permethrin	5 Fische	72 h	1 µg/l
CS-22	Deltamethrin	5 Fische	72 h	1 µg/l
CS-23	Cyfluthrin	5 Fische	72 h	1 µg/l
CS-27	Kontrolle	-	-	-
CS-29	Permethrin	12 Fische	356 h	1 µg/l
CS-30	Cypermethrin	10 Fische	356 h	0,5 µg/l

Die Messungen der EROD-Aktivitäten der Forellenlebern ergaben die in Tabelle 12 zusammengestellten Werte. Sie wurde auf den Proteingehalt der Mikrosomenfraktion bezogen. Die Messungen fanden im Labor des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg-Sülldorf statt, da diese Methode dort etabliert ist und somit die Vergleichbarkeit bzw. Qualität der Methode gewährleistet war.

Tabelle 12: Ergebnisse der Messungen der EROD-Aktivität im Leberhomogenat von Regenbogenforellen aus Pyrethroid belastetem Wasser

<i>Probe</i>	<i>Pyrethroid</i>	<i>Versuchsdauer</i> <i>[h]</i>	<i>EROD-Meßwert</i>	<i>Proteingehalt</i> <i>[mg Protein/ml]</i>	<i>EROD-Aktivität</i> <i>[pmol Resorufin/mg mikros. Protein]</i>
CS-20 F3	Kontrolle	-	0,00575	2,856	82,14
CS-20 F4	Kontrolle	-	0,00169	1,816	37,97
CS-21 F1	Permethrin	72	-0,00012	1,418	0
CS-21 F2	Permethrin	72	0,00008	1,485	2,19
CS-21 F3	Permethrin	72	-0,00035	1,072	0
CS-21 F4	Permethrin	72	0,00019	1,5014	5,16
CS-21 F5	Permethrin	72	-0,00067	0,394	0

Fortsetzung der Tabelle

Probe	Pyrethroid	Versuchsdauer [h]	EROD-Meßwert	Proteingehalt [mg Protein/ml]	EROD-Aktivität [pmol Resorufin/mg mikros. Protein]
CS-22 F1	Deltamethrin	72	-0,00032	1,2204	0
CS-23 F1	Cyfluthrin	72	0,00124	1,816	27,85
CS-23 F2	Cyfluthrin	72	0,00049	1,452	13,76
CS-23 F3	Cyfluthrin	72	-0,00003	1,352	0
CS-23 F4	Cyfluthrin	72	-0,00026	0,9724	0
CS-24 F1	Kontrolle	-	0,00086	1,996	17,58
CS-24 F2	Kontrolle	-	-0,00016	1,352	0
CS-24 F3	Kontrolle	-	0,00070	1,468	19,45
CS-24 F4	Kontrolle	-	-0,00029	1,252	0
CS-24 F6	Kontrolle	-	-0,00005	1,384	0
CS-27F1	Kontrolle	-	0,00077	0,788	39,87
CS-27F2	Kontrolle	-	0,00113	1,317	35,00
CS-27F3	Kontrolle	-	0,00109	0,881	50,48
CS-27F4	Kontrolle	-	0,00009	0,726	5,058
CS-29F1	Permethrin	356	-0,00027	0,656	0
CS-29F2	Permethrin	356	0,00010	0,697	5,85
CS-29F4	Permethrin	356	0,00099	0,851	47,46
CS-29F5	Permethrin	356	-0,00002	0,7027	0
CS-29F6	Permethrin	356	0,00031	0,5136	24,63
CS-29F7	Permethrin	356	0,00017	0,5058	13,71
CS-29F8	Permethrin	356	-0,00037	0,5525	0
CS-29F9	Permethrin	356	-0,00023	0,446	0
CS-29F10	Permethrin	356	0,00041	0,5214	32,08
CS-29F11	Permethrin	356	0,00097	0,436	90,77
CS-30F1	Cypermethrin	356	0,00030	0,56	21,86
CS-30F2	Cypermethrin	356	0,00037	0,643	23,48
CS-30F3	Cypermethrin	356	-0,00009	0,542	0
CS-30F4	Cypermethrin	356	-0,00003	0,596	0
CS-30F5	Cypermethrin	356	0,00132	0,887	60,71
CS-30F6	Cypermethrin	356	-0,00006	0,464	0
CS-30F7	Cypermethrin	356	-0,00010	0,5188	0
CS-30F8	Cypermethrin	356	0,00004	0,6043	2,70
CS-30F9	Cypermethrin	356	0,00084	0,4851	70,64

In den Forellenlebern waren sowohl in den Kontrollen als auch in den Lebern von Forellen aus pyrethroidhaltigem Wasser insgesamt nur geringe EROD-Aktivitäten feststellbar. Vergleichende EROD-Messungen von Lebern aus Klischen (aus der Nordsee) zeigten nach dieser Methode teils weitaus höhere Werte, so das von Richtigkeit der angewandten Methode auszugehen war.

3.3 Diskussion Bioakkumulation und Metabolismus der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin in Regenbogenforellen

3.3.1 Diskussion der Analytik von Pyrethroiden und deren Metaboliten

Die Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin gehören zu den halogenhaltigen, lipophilen organischen Chemikalien. Für eine Vielzahl von Matrices wurden Methoden zur Rückstandsanalytik von Pyrethroiden entwickelt und publiziert. Methoden, die auf der Verwendung von radioaktiv markierten Pyrethroiden beruhen, werden im folgenden nicht berücksichtigt. Die meisten der analytischen Methoden basieren auf einer Extraktion der Pyrethroide mit organischen Lösungsmitteln, der Aufreinigung an Kieselgel- oder Florisilsäulen und der Detektion mit der GC-ECD oder die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), in einigen Fällen auch GC-MS (Argauer et al. 1997, Brodbelt et al. 1995, Papadopoulou-Mourkidou 1993, Class 1992, Blaß 1990). Auch immunologische Methoden sind bekannt (Bonwick et al. 1994, Weiler 1990). Methoden zur Rückstandsanalytik von Pyrethroiden in Wasser und Fischen bzw. tierischem Gewebe oder Fett sollen im folgenden kurz dargestellt werden: Zur Extraktion aus Wasserproben können Hexan (Kreuzweiser und Wood 1991, Kikuchi et al. 1984), C18-Säulen (Haberer und Köhle 1990, van der Hoff et al. 1996) oder Dichlormethan (Yasin et al. 1996) verwendet werden, wobei die Extrakte dann entweder direkt oder per GC-ECD oder GC-MS nachgewiesen werden. Für fetthaltiges tierisches Gewebe können als Extraktionsmittel Hexan (Oehler 1979, Marei et al. 1982), Hexan/Aceton (Chen et al. 1996), Aceton/Petrolether (Pang et al. 1994), Petrolether/Diethylether (Marti-Mestres et al. 1995), Acetonitril (Marti-Mestres et al. 1995) oder Acetonitril/Wasser (Bolygó und Hatfield 1990, Braun und Staneck 1982) eingesetzt werden. Speziell für Pyrethroide in Fischen finden sich die Extraktionsmittel Hexan (Bonwick et al. 1996), Hexan/Aceton (Kreuzweiser und Wood 1991, Kikuchi et al. 1984), oder auch Hexan/Dichlormethan (Yasin et al. 1995). Nach der Extraktion schließt sich dann in der Regel eine Aufreinigung mit Florisil, Kieselgel oder Aluminiumoxid bzw. Kombinationen aus diesen an. Die Detektion erfolgt meist mittels GC-ECD oder seltener GC-MS.

Kikuchi et al. (1984) untersuchten Fische aus Akkumulationsversuchen mit Permethrin, Fische wurden mit Wasser, Aceton und Hexan homogenisiert, geschüttelt und zentrifugiert. Die Hexanphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mit GC-ECD gemessen. Bei Wasserproben wurde mit Hexan geschüttelt, die Hexanphase zentrifugiert, getrocknet und der Pyrethroidgehalt mit GC-ECD bestimmt.

Yasin et al. bestimmten Pyrethroide in Fischen mittels Extraktion mit Hexan/Dichlormethan im Ultraschallbad, Filtration über Natriumsulfat, Cleanup über saure und basische Aluminiumoxidsäulen und Detektion per GC-MS (Yasin et al. 1995). Ähnlich verfahren Bonwick et al., jedoch mit Hexan als Extraktionsmittel (Bonwick et al. 1996).

Kreuzweiser analysierte Wasser und Fische nach Ausbringung von Permethrin auf einen Fluß in Kanada: Wasserproben wurden 10 cm unter der Oberfläche gesammelt, mit Hexan versetzt, geschüttelt und kühl aufbewahrt. Fische der Größe 25 - 50 g wurden in Alufolie tiefgefroren. Die Wasserproben wurden mehrfach mit Hexan gewaschen, die Probenflaschen und Schütteltrichter mit Hexan nachgewaschen, die Hexanphasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, mit Hexan aufgenommen und mit GC-ECD gemessen. Fische wurden mit Hexan/Aceton und Natriumsulfat zerrieben, filtriert und mit Hexan aufgenommen. Hexan wurde auf eine Kieselgelsäule/ Florisilsäule gegeben, dann wurde mit Hexan und Hexan/Diethylether (95:5) gewaschen, mit Hexan/Diethylether eluiert, einrotiert und mit GC-ECD gemessen (Kreuzweiser und Wood 1991).

3.3.2 Im Rahmen der Biokonzentrationsversuche verwendete analytische Methoden

Zur Analytik der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin in Wasser wurden die Wasserproben direkt nach der Probennahme mit Hexan versetzt, geschüttelt und kühl gelagert. Zur Aufarbeitung wurde mehrmals mit Hexan extrahiert, die Extrakte wurden per GC-ECD gemessen. Für die Analytik der Fischproben wurde eine Extraktion mit Hexan/Isopropanol (HIP 3:2), anschließender Aufreinigung über Kieselgel und die Detektion mit GC-ECD gewählt. Dazu waren für das Cleanup je nach Pyrethroid unterschiedliche Volumina Eluent nötig. Als Interner Standard wurde das Pyrethroid Bifenthrin verwendet (Abbildung 49). Der HIP-Extrakt wurde auch zur Fettbestimmung verwendet: Der Gesamtfettgehalt wurde photometrisch nach Aufschluß mit konz. Schwefelsäure und Farbkomplexbildung mit Vanillin-Phosphorsäure (rote Färbung) bei 546 nm bestimmt (Merck 1974).

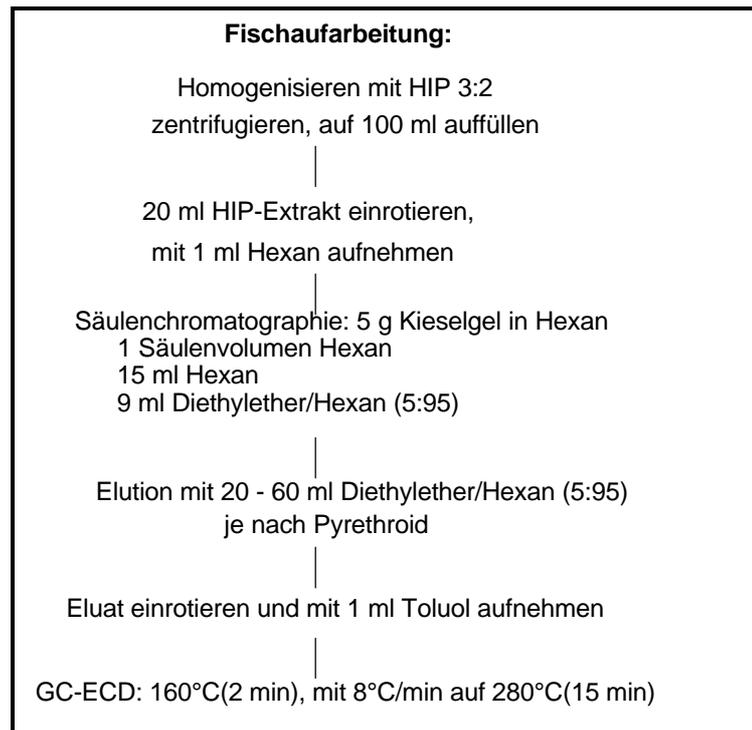


Abbildung 49: Pyrethroide im Fisch, Cleanup mit Kieselgel

Ein typisches Chromatogramm nach dem Cleanup einer Fischprobe aus einem Biokonzentrationsexperiment mit Permethrin ist in der folgenden Abbildung 50 zu sehen. Das Pyrethroid Permethrin liegt hier als cis-/trans-Isomerenmisch im Verhältnis 25 : 75 (Angabe in Prozent) vor.

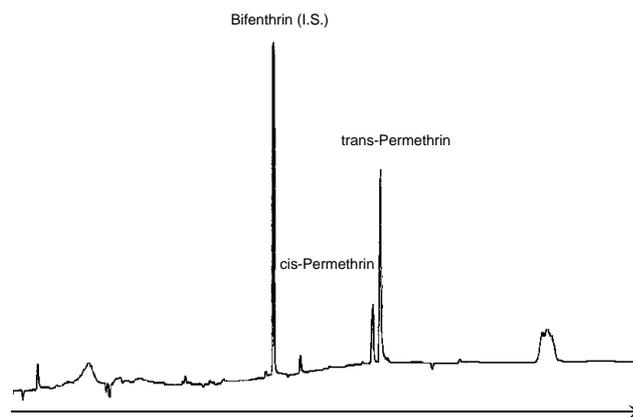


Abbildung 50: Chromatogramm einer Fischprobe mit Permethrin nach säulenchromatographischer Aufarbeitung mit Bifenthrin als internem Standard

3.3.3 Akute Toxizität von Pyrethroiden in Fischen

Pyrethroide gelten als sehr toxisch für Fische. Die akute Toxizität wird als LC_{50} -Wert angegeben, d.h. die Konzentration im Wasser, bei der 50 % der Fische sterben. Die Testdauer erfolgt als Zusatzangabe, typische Testdauern sind 24, 48, 72 oder 96 Stunden (OECD 1992). Bei den akuten toxischen Symptomen von Pyrethroiden auf Fische läßt sich im Wasser nur schwer zwischen Pyrethroiden des Typs I und II (s. Seite 47) unterscheiden. An toxischen Wirkungen läßt sich eine Veränderung des Verhaltens beobachten, eine schnellere Kiemenatmung, unkontrollierte Schwimmbewegungen, ein verändertes Gruppenverhalten und das Schwimmen auf der Wasseroberfläche (Holcombe 1982). Auch von anderen Autoren werden Hyperaktivität, heftige Körperzuckungen, Verlust der Gleichgewichtskontrolle und Kopfschütteln sowie erhöhte Atemfrequenz berichtet. Vor dem Tod sind die Fische inaktiv und schwimmen teilweise über Kopf (Bradbury und Coats 1989 a,b). Diese Symptome zeigten sich auch in den durchgeführten Versuchen zur Toxizität von Pyrethroiden auf Regenbogenforellen. Die Versuche wurden in Anlehnung an internationalen Testvorschriften durchgeführt (OECD 1996, Rippen 1998). Auch hier wurden nach kurzer Zeit hektische Schwimmbewegungen, eine erhöhte Atemfrequenz und nach längerer Zeit Symptome wie Orientierungslosigkeit beobachtet. Später kamen ebenfalls der Verlust der Gleichgewichtskontrolle und ein weit geöffnetes Maul hinzu. Die bereits publizierten LC_{50} -Werte konnten bestätigt werden. Auf eine genaue Bestimmung wurde verzichtet, da bereits hinreichend genaue Toxizitätswerte bekannt sind, aus Gründen des Tierschutzes möglichst wenig Tiere eingesetzt werden sollten und die Hauptfragesstellung auf der Untersuchung der Bioakkumulation der Pyrethroide lag. In der folgenden Tabelle sind die im Rahmen der durchgeführten Versuche zur Toxizität bestimmten LC_{50} -Werte (96 h) für Regenbogenforellen sowie Werte aus der Literatur zusammengefaßt:

Tabelle 13: LC_{50} -Werte (96 h) der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin für Fische

<i>Pyrethroid</i>	<i>Fisch</i>	<i>96 h LC_{50}^{a)} [mg/l]</i>	<i>Literatur [mg/l]</i>
Cyfluthrin	Forelle	~ 0,5	0,68 Worthing 1991
Cypermethrin	Forelle	~ 1	0,5-1,1, Rippen 1999 5,24 Philip et al. 1995
Deltamethrin	Forelle	~ 0,75	0.5 Bocquet und L'Hotellier 1985
Permethrin	Forelle	~ 5	0,62-314 Rippen 1999 9 Worthing 1991

a) Eigene Messungen

Die akute Toxizität nimmt mit zunehmender Größe und Alter von Forellen ab (Kimmich 1987). Eine Temperaturerhöhung bewirkt ebenfalls eine Abnahme der akuten Toxizität. Die 96 h LC₅₀-Werte von Permethrin auf Regenbogenforellen waren bei 5, 10, 15 und 20 °C 0,62, 0,69, 3,17 und 6,43 ppb (Kumaraguru und Beamish 1981). Weitere Werte für die akuten Toxizitäten von Pyrethroiden auf Fische finden sich bei Anderson (1989), Clark et al. (1989), Coats et al. (1989), Coats et al. (1997), Coats und O'Donnell-Jefferey (1979), Hansen et al. (1983), Mauck et al. (1976), Mulla et al. (1978), Rippen (1999), Schimmel et al. (1983), Stratton und Smith (1986) sowie bei Zitko et al. (1977, 1979, 1980).

3.3.4 Kinetik der Akkumulation und Elimination von Pyrethroiden / Biokonzentrationsfaktoren in Fischen

Ausgehend von den hohen n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Pyrethroide ($\log P_{OW}$ von 6 bis 7) erwartet man Biokonzentrationsfaktoren in der Größenordnung von 75 000 bei Cypermethrin bis 300 000 für Permethrin (ECETOC 1996). Dies ergibt sich nach Abschätzungen aus Struktur-Wirkungsbeziehungen, die für viele Substanzgruppen erstellt wurden ($\log BCF = \log P_{OW} - 1,32$, Mackay 1982), vgl. Kap. 1.2.3, Seite 6.

Experimentell bestimmte Biokonzentrationsfaktoren, sowohl Daten aus Literatur als auch die in den durchgeführten Biokonzentrationsexperimenten ermittelte BCF-Werte, lagen hingegen in der Größenordnung von **100** bis **3000**. Die ermittelten Biokonzentrationsfaktoren betragen zwischen **860** für Deltamethrin und **2200** für Cypermethrin. Auf den Fettgehalt bezogen betragen die BCF-Werte zwischen **27 100** für Cyfluthrin und **64 000** für Cypermethrin. Die sehr geringen Konzentrationen der Pyrethroide im Wasser bedingten dabei eine hohe analytische Varianz. Der verwendete Versuchsaufbau erwies sich als nicht optimal, besonders die Verwendung von Peristaltikpumpen zur Konzentrationseinstellung war unzuverlässig.

Muir et al. (1994) ermittelten Biokonzentrationsfaktoren in Forellen im statischen System bei 10 °C: **1940** für Permethrin, **782** für Deltamethrin und **832** für Cypermethrin. Die Elimination der Pyrethroide aus den Fischen erfolgte nach einer Kinetik erster Ordnung mit $t_{1/2}$ Permethrin 37 +/- 4 h, $t_{1/2}$ Cypermethrin und Deltamethrin 78 +/- 22 h. Stephenson fand bei Untersuchungen zur Bioakkumulation von Cypermethrin in Regenbogenforellen einen BCF von **1200** (Stephenson 1985). Spehar et al. berichten von einem BCF von Permethrin von **2800** +/- 700 bei Dickkopfritzen (*P. promelas*), bestimmt in einem Durchflußsystem bei 25 °C und 32 Tagen Expositionszeit (Spehar et al. 1983). Für Deltamethrin in Dickkopfritzen wurde ein BCF von **250 - 900** berichtet (Muir 1984, aus: Naumann 1990). Anderson bestimmte einen Biokonzentrationsfaktor von **43** bis **570** für Steinfliegen *Pteronarcys dorsata* (aus: Cooper 1991). Für Lachs fand man Biokonzentrationsfaktoren von **14** bis **73** für Permethrin und **3 - 7** für Cypermethrin (Zitko et al. 1980). In einem statischen Bioakkumulationsexperiment mit dem Fisch Himedaka, *Oryzias latipes*, bei 22 °C wurden BCFs von **37 - 70** für *cis*-Permethrin und **22 - 58** für *trans*-Permethrin bestimmt (Kikuchi et al. 1984).

In Kanadischen Waldgebieten wurden Flüsse mit Permethrin besprüht und die Elimination im Wasser und Fisch bestimmt, es wurden BCFs von **39** bis **613** bestimmt mit einem Median um **100** (Kreutzweiser und Wood 1991).

3.3.5 Metabolismus von Pyrethroiden

Pyrethroide sind lipophile Substanzen mit kurzer Verweildauer im Blut. Einerseits kommt es zu einer Akkumulation im Fett- und Nervengewebe, andererseits werden sie durch hydrolytische und oxidative Prozesse (Abbildung 51) hauptsächlich in der Leber zu polaren Metaboliten abgebaut (Hoppe und Köster 1994). Die Biotransformation der Pyrethroide erfolgt in Vertebraten zum Großteil über die Esterhydrolyse, gefolgt von einer Konjugation der entstandenen Hydrolyseprodukte mit Glucuroniden und Sulfaten und anschließender Ausscheidung (Tabelle 1, Seite 9). Der Abbau über eine Hydroxylierung der aromatischen Substituenten oder Alkylsubstituenten findet nur im geringen Maße statt.

α -Cyano-Pyrethroide wie Cyfluthrin, Cypermethrin und Deltamethrin, bilden bei der Esterspaltung α -Cyano-3-phenoxybenzylalkohol. Dieser ist sehr instabil und zerfällt in Cyanid und den korrespondierenden Aldehyd. Neben 3-Phenoxybenzylalkohol, das weiter zu 3-Phenoxybenzoesäure oxidiert wird, und 4-Hydroxy-3-phenoxybenzoesäure entsteht dabei Cyanid. Cyfluthrin unterscheidet sich strukturell nur durch die Einführung eines Fluoratoms von Cypermethrin und wird in seinem Verhalten ähnlich eingestuft.

Der Metabolit 3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure (Cl₂CA) kann bei Verwendung von Permethrin, Cyfluthrin und Cypermethrin entstehen. 3-(2,2-Dibromvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure (Br₂CA) ist ein Metabolit von Deltamethrin, der Metabolit 3-Phenoxybenzoesäure (3PBA) bildet sich bei Verwendung der Pyrethroide Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin. 4-Fluor-3-phenoxybenzoesäure (4F3PBA) entsteht bei der Metabolisierung von Cyfluthrin (Abbildung 52). Alle genannten Metaboliten sind stabil und analytisch nach Hydrolyse oder Glucuronid-Spaltung nachweisbar. Die einzelnen Metaboliten sind nicht toxisch und akkumulieren auch nicht in Biota (Hill 1985, Zitko et al. 1977).

Die abnehmende Toxizität von Pyrethroiden auf Vertebraten mit: Fisch > Amphibien >> Säugetiere > Vögel (Hutson et al. 1986) wurde mit der relativen Biotransformationsrate erklärt. Wenn die Geschwindigkeit der Biotransformation sinkt, steigt die Toxizität. Dennoch werden die Pyrethroide im Vergleich zu anderen Pestiziden z.B. Organochlorverbindungen relativ leicht metabolisiert und haben in den meisten Tieren kurze Halbwertszeiten (WHO 1990, Yu 1990). Fische bilden dabei eine Ausnahme, ihr Enzymsystem scheint ineffektiv zu sein (Edwards und Millburn 1985a, Haya 1989). Die Hauptroute für die Ausscheidung von Pyrethroid-Metaboliten ist die Galle (Hutson et al. 1986). Die Konjugate von hydroxylierten Pyrethroiden sind nach Glickmann die einzigen signifikanten Metaboliten (Glickman et al. 1982). Allerdings kann die selektive Toxizität der Pyrethroide, besonders die Empfindlichkeit von Fischen im Vergleich mit anderen Vertebraten, nicht nur mit der unterschiedlichen

Geschwindigkeit der Biotransformation allein erklärt werden. Andere Faktoren wie eigentliche Aktivität, Spezifität von Rezeptoren und spezielle Unterschiede in den Wirkungsweise können ebenso eine Rolle spielen.

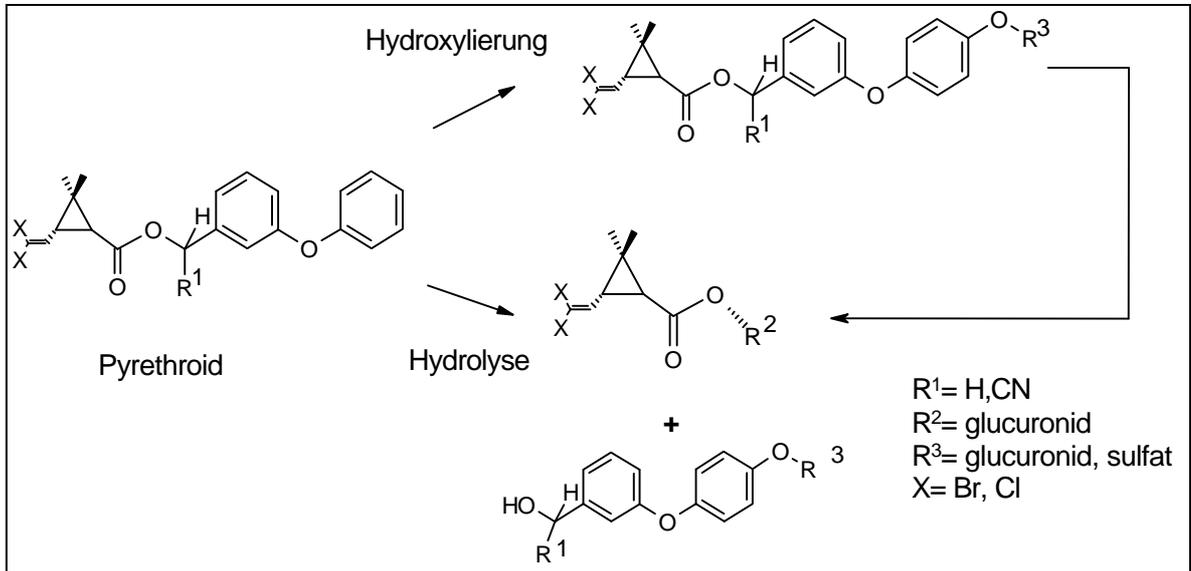


Abbildung 51: Metabolismus von Pyrethroiden in Fischen (Haya 1989)

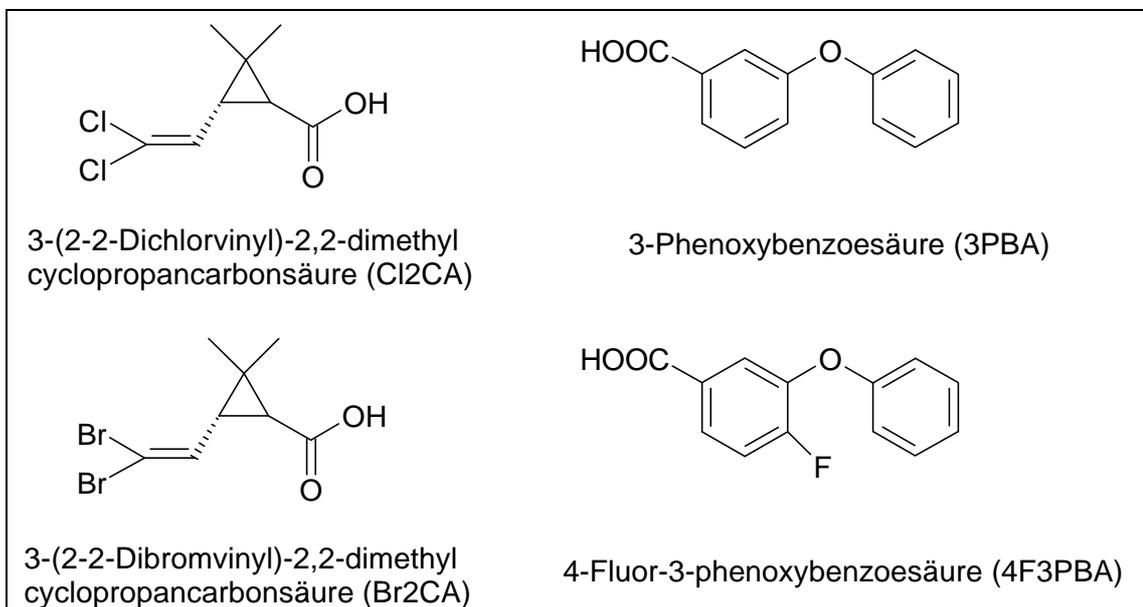


Abbildung 52: Metaboliten der synthetischen Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin

3.3.5.1 Prinzip der Analytik von Pyrethroid-Metaboliten

Die aus Permethrin, Deltamethrin, Cypermethrin und Cyfluthrin bei der Biotransformation entstehenden Pyrethroid-Metaboliten stellen Carbonsäuren dar, zum Teil Konjugate mit Schwefelsäure (Sulfate) oder Glucuronsäure (Glucuronide). Sowohl

die Carbonsäuren als auch die konjugierten Carbonsäuren sind wasserlöslich. Zur Probenvorbereitung wird, um die Konjugate zu spalten und die freien Säuren zu erhalten, eine saure Hydrolyse durchgeführt. Nachdem die freien Säuren in ein organisches Lösungsmittel extrahiert wurden, schließt sich eine Aufreinigung an. Die Aufreinigung kann durch flüssig-flüssig Verteilung oder flüssig-fest Adsorptionschromatographie erfolgen, mit anschließender Aufkonzentrierung und Derivatisierung, um so zu unpolaren Molekülen zu kommen, die mittels GC-ECD oder GC-MS detektiert werden. Dabei verwenden einige Autoren zur Derivatisierung mehrfach halogenierte Alkohole, um so die Empfindlichkeit bei Verwendung der GC-ECD noch zu steigern (Mortimer 1990). Die Esterbildung erfolgt entweder mit Hexafluor-isopropanol nach der Carbodiimidmethode (Mortimer 1990) oder mit α -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol (Chen et al. 1996, Webster und Jin 1998). Auch die Veresterung zum Methyl ester mit Methanol/Schwefelsäure bzw. mittels Diazomethan und dem Nachweis der methylierten Pyrethroid-Metaboliten mit der GC-MS wurden publiziert (Angerer und Ritter 1997, Butte et al. 1998).

3.3.5.2 Literaturüberblick über Analytik von Pyrethroid-Metaboliten

Die bisher publizierten analytischen Methoden zum Nachweis von Pyrethroid-Metaboliten verwenden die Extraktion von Pyrethroid-Metaboliten mit organischen Lösungsmitteln, Aufreinigung/Cleanup durch flüssig-flüssig Extraktion und/oder Adsorptionschromatographie und anschließende Quantifizierung durch die GC-ECD oder GC-MS. Der größte Teil der bisher publizierten Methoden befaßt sich dabei mit der Analytik von Pyrethroid-Metaboliten in pflanzlichem Material und im menschlichen Urin.

Mortimer schlägt für die Derivatisierung von Carbonsäuren wie den Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA, Br₂CA und 3PBA die Veresterung mit halogenhaltigen Alkoholen wie Hexafluorisopropanol vor, um den in jedem Labor zur Spurenanalytik vorhandenen GC mit ECD zu verwenden (Mortimer 1990). Mortimer untersuchte Pyrethroid-Metaboliten in pflanzlichem Material. Da Pyrethroide in pflanzlichem Material rasch in die entsprechenden Alkohole und Carbonsäuren hydrolysiert werden, die dann sofort an Glukose gebunden werden und längere Kohlenhydratketten bilden, ist stets eine Glycosidspaltung notwendig. Pflanzliches Material wurde zerkleinert, mit Aceton extrahiert, Natronlauge zur Glycosidspaltung zugefügt (30 min) und nach dem Waschen und Ansäuern mit Dichlormethan extrahiert. Die Derivatisierung erfolgte mit Hexafluorisopropanol und Diisopropylcarbodiimid und anschließendem Cleanup an Kieselgel und Elution mit Ethylacetat-Hexan (Mortimer und Shields 1995). Mortimer analysierte in einer weiteren Untersuchung Tee auf das Vorkommen an Pyrethroid-

Metaboliten *cis-/trans*-Cl₂CA; da nur 3 % eines Pyrethroids bei einem Teeaufguss extrahiert werden, ging er davon aus, dass ein größerer Anteil der leichter löslichen Pyrethroid-Metaboliten extrahiert werden müssten. Tee wurde aufgebrüht, wie oben zur Glycosidspaltung mit Natronlauge versetzt, angesäuert und mit Hexan extrahiert, getrocknet, eingeengt und mit Dichlormethan aufgenommen. Das Cleanup erfolgte mit einer Aminopropyl-Festphasenextraktion (SPE), Elution mit 1 % Ameisensäure in Dichlormethan, es wurde mit Stickstoff eingeengt und in Hexan aufgenommen. Dann wurde wie oben mit Hexafluorisopropanol und Diisopropylcarbodiimid derivatisiert (Mortimer et al. 1995). In einer anderen Arbeit erfolgte die Analytik des Pyrethroid-Metaboliten 3PBA in pflanzlichem Material durch Zerkleinern und Extraktion mit Aceton, dann wurde β -Glucosidase zur Glycosidspaltung zugegeben und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde mit Natriumchlorid und Dichlormethan gewaschen, die Dichlormethanphase gesammelt, eingeengt und mit Toluol versetzt, über eine Kieselgelsäule gereinigt und mit Methanol-Dichlormethan eluiert. Die Derivatisierung erfolgte mit Heptafluorbuttersäureanhydrid-Ethylacetat (1:5, 3 h bei 100 °C), dann wurde die Probe auf eine Kieselgelsäule gegeben und mit Toluol eluiert. Der Nachweis erfolgte mit GC-ECD (Mortimer und Shields 1996).

Webster und Jin untersuchten die Metaboliten von Cypermethrin Cl₂CA und 3PBA in Boden, Baumrinde und Stroh/Heu, wiederum unter Verwendung des GC-ECD. Boden, Baumrinde und Stroh wurde getrocknet und gemahlen, mit Methanol/ 0,6 M Salzsäure (25:5) 30 min geschüttelt und 20 min zentrifugiert. Der Methanolextrakt wurde mit Natriumchloridlösung, Dichlormethan und Salzsäure extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und mit Stickstoff getrocknet, dann wurde mit α -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol (PFB_rT) in Aceton und Natriumcarbonat derivatisiert, mit Toluol versetzt und die Toluolphase direkt per GC-ECD gemessen (Webster und Jin 1998).

Eadsforth untersuchte bei der Ausscheidung von Cypermethrin im Menschen den Metaboliten Cl₂CA im Urin. Eine Urinprobe wurde auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingeengt und anschließend mit 5 % Schwefelsäure in 25 ml Methanol für 1,5 Stunden erhitzt. Dadurch wurden sowohl Cl₂CA als auch das β -Glucuronid in die entsprechenden Methylester überführt. Mit Aceton wurde in einen Scheidetrichter überführt, mit Wasser versetzt und anschließend mehrfach mit Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanextrakte wurde mit Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen, über Kieselgel gereinigt und mit Aceton-Hexan (1:19) eluiert. Der Nachweis von Cl₂CA erfolgte mit GC-ECD und GC-MS zur Bestätigung, dabei werden stets die entsprechenden Methylester von Cl₂CA, Br₂CA, 3PBA, 4F3PBA für die GC-MS

eingesetzt, zur Vereinfachung wird dies im folgenden nicht mehr erwähnt (SIM-Mode⁴ Cl₂CA m/z 163,165,187) (Eadsforth und Baldwin 1983). Alternativ wurde Urin mit 10 %-iger Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingeeengt und anschließend 2 h mit einer 10 %-igen Schwefelsäure in Methanol unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde weiter wie oben verfahren (Eadsforth et al. 1988).

Hoppe und Köster untersuchten ebenfalls im Human-Urin die Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA, Br₂CA und 3PBA. Urin wurde mit konz. Salzsäure und 2PBA als internem Standard versetzt und 60 min bei 90 °C erhitzt. Dann wurde mit Hexan extrahiert, die Hexanphase mit 0,2 N Natronlauge 2 min rückextrahiert, die wäßrige Phase angesäuert und wieder mit Hexan extrahiert. Nach dem Einengen der Hexanphase im Stickstoffstrom wurde mit DMF-DMA⁵ in Toluol derivatisiert und mit der GC-MS die Metaboliten bestimmt (SIM-Modus Cl₂CA m/z 187, Br₂CA m/z 233, 3PBA m/z 228) (Hoppe 1996, Hoppe und Köster 1994).

Leng et al. untersuchten Urin auf die Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA, Br₂CA, 3PBA und 4F3PBA. Urin wurde mit konz. Salzsäure versetzt, 1 h bei 90 °C erhitzt, mehrfach mit Hexan extrahiert und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen im Stickstoffstrom wurde 1 h mit 10 %-iger Schwefelsäure in Methanol unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde mit Wasser und Natronlauge versetzt und mit Hexan extrahiert. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde bis zur Trockene eingeeengt und in Isooktan aufgenommen, dann wurden die Pyrethroid-Metaboliten mit Hilfe der GC-MS bestimmt: SIM-Modus, Cl₂CA m/z 187, Br₂CA m/z 253, 3PBA m/z 228 und 4F3PBA m/z 246 (Kühn 1997, Leng et al. 1996 a).

In einer arbeitsmedizinischen Studie analysierte Leng et al. Urin nach Exposition eines Schädlingbekämpfers mit Cypermethrin auf die Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA und 3PBA mit einer alternativen Aufarbeitung. Urin wurde mit 10 %-iger Natriumhydrogencarbonatlösung vermischt, bis zur Trockene aufkonzentriert und anschließend mit einer 10 %-igen Schwefelsäure in Methanol 2,5 h unter Rückfluß erhitzt, mit Wasser und 1 M Natronlauge versetzt und mehrfach mit Hexan extrahiert. Der vereinigte Hexanextrakt wurde getrocknet und mit Kieselgel gereinigt. Das Eluat (Aceton-Hexan 1:19) wurde eingeeengt und mit Hexan aufgenommen und mittels GC-MS im SIM-Mode die Pyrethroid-Metaboliten bestimmt (Leng et al. 1996 b).

Lewalter und Kahre untersuchten Urin auf die Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA, Br₂CA, 3PBA und 4F3PBA. Urin wurde mit 2PBA als internem Standard und Salzsäure versetzt und 2 h bei 100 °C hydrolisiert. Dann wurde mittels Festphasenextraktion mit

⁴ SIM-Mode: Selected Ion Monitoring, Detektion nur bestimmter Ionen im Quadrupol-Massenspektrometer.

⁵ DMF-DMA: N,N-Dimethylformamid-Dimethylacetal

C18-Säulen angereichert, mit Wasser-Salzsäure, Wasser-Methanol und Hexan gewaschen, getrocknet und mit Methanol eluiert, konz. Schwefelsäure hinzugegeben und 1 h bei 50 °C umgesetzt. Dann wurde mit Wasser versetzt und mit Hexan extrahiert, die Hexanphase bis zur Trockene eingengt und in Toluol aufgenommen. Die Pyrethroid-Metaboliten wurden mit der GC-MS im SIM-Mode bestimmt: Cl₂CA m/z 165, 187, Br₂CA m/z 231, 253, 3PBA m/z 197, 228 und 4F3PBA m/z 215, 246 (Lewalter und Kahre 1996).

Angerer und Ritter schlagen ebenfalls die Festphasenextraktion mit C18-Material zur Extraktion von Pyrethroid-Metaboliten vor. Urin wurde mit 2 ml konz. Schwefelsäure versetzt und 1 h bei 90 °C hydrolysiert, auf C18-Säulen gegeben, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Dann wurde mit Methanol direkt in konz. Schwefelsäure eluiert, 1 h bei 75 °C erhitzt und mit Hexan extrahiert. Nach dem Waschen mit Natriumchloridlösung wird die Hexanphase mit Toluol versetzt und eingengt. Die Bestimmung der Pyrethroid-Metaboliten erfolgte mit Hilfe der GC-MS im SIM-Mode: Cl₂CA m/z 163, 187, 222, Br₂CA m/z 231, 253, 312, 3PBA m/z 197, 228 und 4F3PBA m/z 215, 246 (Angerer und Ritter 1997).

Butte et al. verwendeten wiederum die flüssig-flüssig Extraktion zur Anreicherung der Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA und 3PBA aus Human-Urin. Urin wurde nach Zugabe von konz. Salzsäure und internem Standard 2PBA 1 h bei 95 °C hydrolysiert. Dann wurde zweimal mit Hexan extrahiert, die vereinigten Hexanextrakte mit 0,1 M Natronlauge reextrahiert, angesäuert und wieder mit Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphase wurde im Stickstoffstrom eingengt und mit Diazomethan in Toluol derivatisiert. Die Bestimmung erfolgte mit der GC-MS im SIM-Mode: Cl₂CA m/z 165, 189, 222 und 3PBA m/z 197, 228 (Butte et al. 1998).

Meierhenrich untersuchte u.a. auch Pyrethroid-Metaboliten in Human-Urin. Die dabei verwandte Methode basiert auf dem von Eadsforth und Baldwin (1983) sowie Eadsforth et al. (1988) verwandten Verfahren (s.o.): Konjugatspaltung mit Glucuronidase und Sulfatase, Eindampfung mit methanolischer Schwefelsäure zur Methylierung, Aufarbeitung mit anschließender Gelpermeationschromatographie und Kieselgelchromatographie. Zur Detektion wurde die GC-MS verwendet: Cl₂CA m/z 187 (Meierhenrich 1997).

Chen et al. untersuchten Cypermethrin und die Cypermethrin-Metaboliten Cl₂CA und 3PBA in Kuhmilch, Sahne, Niere, Leber, Muskel- und Fettgewebe. Dabei wurden die Pyrethroid-Metaboliten mit α -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol derivatisiert. Milchproben wurden mit Aceton gemischt, filtriert, das Aceton entfernt, mit Hexan und basischem Wasser versetzt und extrahiert. Die Pyrethroid-Metaboliten in der wäßrigen Phase wurden nun angesäuert und 1 h unter Rückfluß erhitzt. Das Cleanup erfolgte durch

C18-Säulen, eluiert wurde mit Dichlormethan und mit α -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol und Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat. Die Pyrethroid-Metaboliten wurden dann mit Kieselgel gereinigt (Elution mit 2,5 % Ethylacetat in Hexan). Das eingeeengte Eluat wurde direkt mit der GC-MS gemessen: Cl2CA m/z 353, 3PBA m/z 394. Gewebe- und Fettproben wurden zerkleinert und mit Aceton und Salzsäure 1 h unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde filtriert und das Aceton abrotiert. Nieren-, Leber- und Muskelgewebeproben wurden mit C18-Säulen angereichert und die Pyrethroid-Metaboliten mit 10 % Ethylacetat in Hexan eluiert und mit PFBrT derivatisiert. Fettproben wurden mit Ethylacetat-Hexan (10:90) extrahiert, die Hexanphase eingeeengt, mit Hexan versetzt und mit Acetonitril extrahiert. Dann wurde das Acetonitril eingeeengt, mit Hexan aufgenommen und mit Kieselgel gereinigt (Elution mit Ethylacetat-Hexan 60:40), eingeeengt im Stickstoffstrom und mit Dichlormethan aufgenommen und anschließend mit PFBrT derivatisiert und wie oben mittels GC-MS gemessen (Chen et al. 1996).

Durch die Verwendung von radioaktiv markierten Pyrethroiden sind ebenfalls sehr empfindliche Untersuchungen möglich. Gaughan et al. bestimmten im Urin von Kühen konjugierte Metabolite von ^{14}C markiertem Permethrin mittels DC und Szintillationszähler, wobei β -Glucuronidase und Sulfatase zur vorherigen Spaltung der Konjugate eingesetzt wurde (Gaughan et al. 1978).

Crawford et al. nutzten dieses Verfahren zur Bestimmung pyrethroider Metabolite im Urin von Ratten unter Verwendung von *Patella vulgata* β -Glucuronidase (Typ L1) und *Helix pomatia* Sulfatase (Typ H2) (Crawford et al. 1981 a,b).

Hutson et al. setzten in einer analogen Untersuchung an Mäusen die Enzyme *Escherichia coli* β -Glucuronidase (Typ II), *P. vulgata* β -Glucuronidase (Typ LII) und *H. pomatia* Sulfatase (Typ H2) ein (Hutson et al. 1981).

3.3.5.3 Verwendete Analytik von Pyrethroid-Metaboliten

Die gefrorenen Fischproben wurden mit internem Standard (2PBA) versetzt und in Anlehnung an die Methode von Chen et al. (1996) mit einem Gemisch aus Salzsäure und Aceton mehrfach extrahiert. Das Aceton wurde durch Einrotieren entfernt. Durch das Erhitzen bei 100 °C für 1 Stunde wurde die Konjugatspaltung durchgeführt, nach dem Abkühlen wurden dann die Carbonsäuren durch mehrfache pH-abhängige flüssig/flüssig-Verteilung aufgereinigt und nach dem Aufkonzentrieren mit Diazomethan zum Methylester derivatisiert. Die Gehaltsbestimmung erfolgte dann, um eine möglichst störungsfreie Analytik zu ermöglichen, mit der entwickelten GC-MS/MS Methode (s.u.).

3.3.5.4 Methodenentwicklung GC-MS-MS Pyrethroid-Metaboliten

MS/MS

Die GC-MS/MS-Analytik gilt als selektive und nachweisstarke Methode zur Analytik von geringen Konzentrationen eines Analyten in komplexen Matrizes. Hierzu wird zunächst eine von der GC-Säule in den Analysator gelangende Substanz ionisiert. Aus den entstehenden Fragmenten können jetzt Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses isoliert werden, indem alle Teilchen mit anderen Massen aus der Falle entfernt werden (Parention, Vorläuferion, Precursor). Das Vorläuferion wird dann weiter fragmentiert. Um einen geeigneten Precursor wählen zu können, muß das Massenspektrum bekannt sein, meist wählt man eines der Hauptfragmente. Die Precursorionen können prinzipiell aus verschiedenen Substanzen stammen, anhand der folgenden Fragmentierung ist jedoch meist eine eindeutige Zuordnung möglich, da jedes Fragment wiederum spezifisch für die jeweilige Substanz fragmentiert. Durch Zufuhr geeigneter Energiemengen erfolgen energiereiche Zusammenstöße mit sich ebenfalls in der Falle befindenden Gasmolekülen. Die Vorläuferionen zerfallen durch die Stöße (CID, collision induced dissociation) zu den Produktionen, die anschließend detektiert werden. Als Stoßgase werden Edelgase wie Helium, Argon oder Xenon, sowie Stickstoff eingesetzt. Das aus dem Precursor entstehende Spektrum enthält nur Fragmente, die üblicherweise aus der zu detektierenden Substanz entstehen. Der Einfluß störender Matrix ist äußerst gering, da diese fast immer eine unterschiedliche Fragmentierung aufweist, oder, bei geeigneter Wahl des Precursors, sich gar nicht in der Falle befindet.

Die auch als „Tandem-Massenspektrometrie“ bezeichnete MS/MS-Technik ist mit Hilfe zweier prinzipiell unterschiedlicher Bauweisen zu verwirklichen. Erfolgen die vier Schritte der MS/MS-Analyse (Ionenbildung, Precursor-Isolation, Dissoziation, Massenanalyse) an unterschiedlichen Orten im Strahlengang des Gerätes, so spricht man von „Tandem-in-Space“. Diese Bauweise ist z.B. bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern realisiert.

In einer Ionenfalle wie das hier verwendete Massenspektrometer (Abbildung 53) finden die genannten Prozesse am selben Ort statt. Bei solchen Geräten findet die Selektion der Vorläuferionen, die stoßinduzierte Dissoziation und die Detektion der Produktionen zwar am gleichen Ort, aber zeitlich gesteuert durch eine Sequenz unterschiedlicher Frequenz- und Spannungswerte an Ringelektrode und Polkappen statt. Man spricht hier im Gegensatz zur oben beschriebenen Technik von „Tandem-in-Time“.

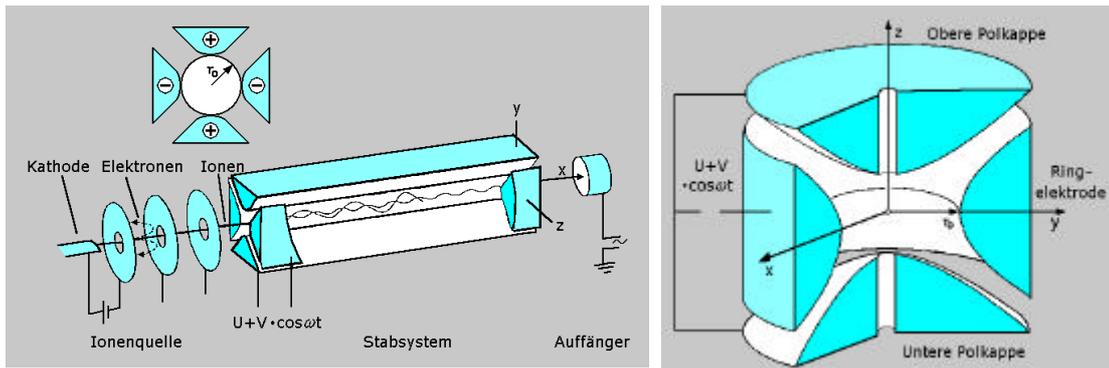


Abbildung 53: Schema von Quadrupol (links) und Ionenfalle (engl. "Iontrap") (rechts)

Die Precursorionen zerfallen durch Stoß mit den in der Falle befindlichen Gasatomen normalerweise nicht, da ihre kinetische Energie dazu nicht ausreicht. Erhöht man diese jedoch durch Einstrahlung einer zusätzlichen Wellenform, so genügt die beim Zusammenstoß mit Gasmolekülen freigesetzte Energie, um die Teilchen zerfallen zu lassen (CID). Diese zusätzliche Energie kann auf zwei Arten zugeführt werden, resonant und nonresonant:

Bei der nonresonanten Anregung werden die Energien aller Teilchen zugleich erhöht. Auch entstandene Produktionen können erneut angeregt werden und weiter zerfallen. Dieser Vorgang beruht auf der Erzeugung eines niederfrequenten Dipolfeldes entlang der z-Achse der Falle. Die Teilchen werden aus ihren Bahnen abgelenkt, was zu einer sofortigen Veränderung der potentiellen Energie aller Teilchen führt. Das Hochfrequenzfeld der Ringelektrode lenkt die Teilchen auf ihre Bahnen zurück und wandelt damit die gerade erst erhöhte potentielle Energie in kinetische Energie um. Dieser Vorgang wiederholt sich mit jeder Oszillation des niederfrequenten Feldes.

Im Gegensatz dazu wird bei der resonanten Anregung im Idealfall nur das Vorläuferion angeregt, Produktionen erfahren keine weitere Energiezufuhr und zerfallen deshalb auch nicht weiter. Hierzu wird ein hochfrequentes Dipolfeld an den Endkappen induziert. Die Frequenz muß der Oszillationsfrequenz der Ionen in der Falle entsprechen, welche unter anderem von ihrer Masse abhängt. Nur diese Teilchen werden durch die Resonanzfrequenz angeregt und zerfallen zu Produktionen. Um eine geeignete Resonanzfrequenz zu finden, muß sie empirisch ermittelt werden (Hübschmann 1996, Varian 1995).

3.3.5.5 Anwendung der GC-MS-MS Methode auf Fischproben

Für die Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA, Br₂CA, 3PBA und 4F3PBA wurde eine Detektion mit Hilfe der Sekundärionenmassenspektrometrie ausgearbeitet. Dazu wurde das jeweilige Hauptfragmente im Massenspektrum ausgewählt, isoliert und durch Zuführung von Energie weiter fragmentiert. Für Cl₂CA, Br₂CA und 4F3PBA erwiesen

sich 0,4 V und 20 ms, resonant, für 3PBA 20 V von 20 ms Dauer, non-resonant, als optimal. Über die entstandenen Produktionen konnte dann quantifiziert werden.

Die ausgearbeitete GC-Methode mit Sekundärionenmassenspektrometrie zur Detektion wurde dann zum Nachweis von Pyrethroid-Metaboliten in Fischproben aus den o.g. Versuchen verwendet. Die Fischproben wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Bei einer Nachweisgrenze von ca. 1 µg/kg konnten jedoch keine Pyrethroid-Metaboliten festgestellt werden. Da die Methode prinzipiell zur Detektion der untersuchten Pyrethroid-Metaboliten Cl₂CA, Br₂CA, 3PBA und 4F3PBA im Fisch geeignet ist, wird als Ursache die schnelle Ausscheidung der leicht wasserlöslichen, teils als Konjugate vorliegenden Pyrethroid-Metaboliten angenommen.

3.3.6 QSAR der Bioakkumulation von Pyrethroiden in Regenbogenforellen

Die experimentelle Bestimmung von BCFs ist zeitaufwendig und teuer. Aus diesem Grund wurden rechnerische Methoden zur Abschätzung der Bioakkumulation anhand von einfach zu bestimmenden physikalischen Parametern entwickelt (ECETOC 1996, Schüürmann 1991). Solche quantitativen Struktur-Wirkungs Beziehungen (Quantitative Structure-Activity Relationships - QSARs) basieren normalerweise auf experimentell bestimmter Biokonzentrationsfaktoren einer Reihe ähnlicher Substanzen. Für lipophile Substanzen wie z.B. PCBs, Chloraromaten oder PAHs wurden zahlreiche Beziehungen bekannt (Umweltbundesamt 1991, vgl. Kap. 1.2.3, Seite 6). Im folgenden wurden anhand von drei ausgewählten QSAR-Gleichungen (Tabelle 14) die Biokonzentrationsfaktoren der untersuchten Pyrethroide anhand ihrer n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (siehe Tabelle 15) abgeschätzt. Weitere QSAR-Untersuchungen für Pyrethroide finden sich bei Coats (1990), Ford et al. (1989) sowie bei Hudson et al. (1992). Die nach den Gleichungen I - III Tabelle 14 berechneten Werte wurden den experimentell ermittelten Biokonzentrationsfaktoren gegenübergestellt (Tabelle 16):

Tabelle 14: QSAR Gleichungen zur Abschätzung der Bioakkumulation auf der Basis des n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$.

I	$\log BCF = \log P_{OW} - 1,32$	Mackay (1982)
II	$\log BCF = 0,99 \log P_{OW} - 1,47 \log (4,97 \cdot 10^{-8} P_{OW} + 1) + 0,0135$	Nendza (1998)
III	$\log BCF = 0,77 \log P_{OW} - 0,7 + \sum F_1$ $F_1 (\text{Pyrethroide}) = -1,65$	Meylan et al. (1999)

Tabelle 15: n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$ der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin

<i>Pyrethroid</i>	<i>LOGKOW^{a)}</i>	<i>log P_{OW}^{b)}</i>	<i>log P_{OW}^{c)}</i>
Cyfluthrin	5,74	6,3	5,95 (Tomlin 1994)
Cypermethrin	6,38	6,2	6,00 (Sangster 1993) 6,2 (Wu 1998)
Deltamethrin	6,18	6,4 (6,2)	6,2 (Pomona 1987)
Permethrin	7,43	6,8	6,5 (Hansch 1985) 6,5 (Schimmel 1983)

a) mit dem Programm LOGKOW V 1.57 berechnete $\log P_{OW}$ -Werte (Meylan 1985), siehe auch im Anhang Seite 124ff.

b) Naumann 1990, c) Literaturwerte

Tabelle 16: Gemessene BCFs im Vergleich zu berechneten BCFs sowie n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$.

Substanz	$\log P_{OW}^*$	BCF _{gemessen}	BCF _{berechnet}		
			Mackay (1982)	Nendza (1998)	Meylan et al. (1999)
Cyfluthrin	6,3	1240	$9,45 \cdot 10^4$	$1,62 \cdot 10^6$	317
Cypermethrin	6,2	2210	$7,59 \cdot 10^5$	$1,31 \cdot 10^6$	265
Deltamethrin	6,4	870	$1,20 \cdot 10^5$	$1,99 \cdot 10^6$	378
Permethrin	6,8	1400	$3,02 \cdot 10^5$	$3,73 \cdot 10^6$	769

* nach Naumann 1990

Gleichung I ist eine „klassische“ lineare Beziehung nach Mackay, bei der der BCF mit steigendem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_{OW}$ ansteigt. Die nicht-lineare Korrelation nach Nendza (Gleichung II) führt zu hohen BCF-Werten. Sie stellt eine „Worst-Case“ Abschätzung dar, und geht von der Eingangs erwähnten empirisch postulierten Beziehung zwischen $\log BCF$ und $\log P_{OW}$ aus. Charakteristisch für diese Annahme ist ein Maximum der Bioakkumulation für Substanzen mit einem $\log P_{OW}$ von 7. Die Gleichung nach Meylan (III) führt einen Korrekturfaktor F_i für besondere funktionale Gruppen ein, für Substanzen mit einer Cyclopropylestergruppe wird der Korrekturfaktor $F_i = -1,65$ angegeben, wie sie z.B. auch bei den hier untersuchten Pyrethroiden vorkommen (s. Abbildung 27, Seite 41).

Die nach Mackay (I) und Nendza (II) berechneten Biokonzentrationsfaktoren liegen weit über den beobachteten BCF-Werten von 870 für Deltamethrin bis 2200 für Cypermethrin. Die Korrelation - hohe Lipophilie gleich hohe Bioakkumulation - muß durch einen Korrekturfaktor ergänzt werden, der die relativ schnelle Metabolisierung von Pyrethroiden im Organismus durch Esterasen berücksichtigt. Die in den

durchgeführten Bioakkumulationsexperimenten festgestellten BCF-Werte liegen in der Größenordnung bzw. sind etwas höher als die abgeschätzten Werte nach der Gleichung von Meylan (III). Die bisher veröffentlichten BCF-Werte, die in Durchflusssystemen bestimmt wurden, liegen ebenfalls in der Größenordnung von 100 bis 3000 (siehe Seite 69). Da der BCF oftmals auf den Fettgehalt bezogen wird, um einen Vergleich zwischen verschiedenen Spezies zu ermöglichen (Geyer et al. 1984), wurden die BCF-Werte auch auf den Fettgehalt der Fische bezogen. Die fettbasierten BCF-Werte (BCF_L) lagen zwischen 27 000 bis 64 000. Die Gleichungen I und II (Tabelle 14) liefern damit Werte in der Größenordnung der auf Fett bezogenen BCF-Werte.

Pyrethroide sind daher, nach der Klassifizierung des Umweltbundesamtes, mit BCF-Werten im Bereich von 600 bis 3000 als hoch bis sehr hoch akkumulierend einzustufen. Dies gilt im besonderen für einen Bezug auf den Fettgehalt der Fische (Umweltbundesamt 1991).

3.3.6.1 Bioverfügbarkeit von Pyrethroiden bzw. Relevanz der Biokonzentration

Biokonzentrationsfaktoren müssen von der realen Bioakkumulation abgegrenzt werden: durch die geringe Wasserlöslichkeit (Gobas und Russel 1991) und dem starken Adsorptionsvermögen an Oberflächen und organischem Material sind kaum freie Pyrethroide im Wasser vorhanden (Schrap 1991, Sharom und Soloman 1981, Zhou et al. 1995). In statischen Systemen und Systemen mit organischem Material wie Huminsäuren ist die Verfügbarkeit von Pyrethroiden minimal. Pyrethroide werden durch Sonnenlicht relativ schnell abgebaut (Miyamoto 1976, WHO 1990, 1989). Schon geringe Mengen gelösten organischen Kohlenstoffs genügen für eine 25 bis 80 %-ige Verringerung der Anreicherung (Day 1991, Muir et al. 1994). Die synthetische Pyrethroide reichern sich daher im allgemeinen wahrscheinlich nicht in der Nahrungskette an und stellen daher keine Gefahr für Ökosysteme dar: ihre starken Adsorption und Immobilisierung an Feststoffen und ihrer schnellen Eliminierung nach Beendigung einer Exposition bzw. eine hohe Biotransformationsrate verhindern bei diesen Chemikalien die Anreicherung durch die Nahrungskette in höheren Organismen. Dennoch können Pyrethroide sich sehr wohl im Organismus anreichern, besonders im Verlauf einer akuten und/oder auch chronischen Exposition in sublethalen oder letalen Konzentrationen. In Freilandexperimenten mit Cypermethrin fand man keine Anreicherung in Regenbogenforellen, Dickkopfritzen, Karpfen und Daphnien, ebenso wurden Freilandexperimente mit 13 g/ha Deltamethrin in großem Maßstab in England, Spanien, Taiwan, Mexiko und Afrika ohne Effekte durchgeführt

(Bocquet und L'Hotellier 1985). In Fischen aus Flüssen und Seen wurden Rückstände an Pyrethroiden gefunden: Cooper fand in Fischen im Moon Lake, Mississippi, Konzentrationen an Permethrin von 0,66 bis 4,68 µg/kg Fisch (Cooper 1991). Yasin et al. fanden in Fischen unterhalb einer Kläranlage Konzentrationen an Permethrin bis zu 5,7 mg/kg (Einzelwert, Mehrzahl unter 1000 µg/kg) und für Cyfluthrin bis zu 100 µg/kg, in Fischen aus dem Fluß Calder wurden alle häufigen Pyrethroide mit Konzentrationen von 400 - 1000 µg/kg (Permethrin), 17 - 120 µg/kg (Deltamethrin), 6 - 26 µg/kg (Cyfluthrin) und 3 - 63 µg/kg (Cypermethrin) gefunden (Yasin et al. 1995).

3.3.7 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität (EROD-Aktivität)

Die mikrosomale Monooxygenase-Aktivität (Mischfunktionelle Oxygenasen, MFO) umfaßt die Gesamtaktivität eines Multi-Enzym-Systems, welches im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist. Wesentlicher Bestandteil dieses Enzymsystems sind NADPH-Reduktase und Cytochrom P450. Cytochrom P450-Monooxygenasen sind in der Lage, eine Reihe von Substanzen (organische Schadstoffe⁶, Steroide und Fettsäuren) zu metabolisieren (siehe Seite 9).

In Säugetieren findet man eine ganze Reihe von Cytochrom P450 Isoenzymen (numeriert von P-450a bis P-450j). In Fischen sind es deutlich weniger, in Forellenlebern konnten bisher fünf Isoenzyme isoliert werden (Stegeman und Kloepper-Sams 1987). Die meisten Fischarten haben ein relativ ähnliches MFO-System. In Regenbogenforellen findet sich das Mikrosomale Protein P450CYP1A mit einem Molekulargewicht von 58 000 (Förlin und Goksøyr 1992). Das Cytochrom P450 1A-System ist selektiv für planare aromatische Moleküle und wird durch solche Substanzen auch induziert. Zu dieser Gruppe gehören Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH's), Polychlorierte Biphenyle (PCB's), Dioxine und Dibenzofurane (Huuskonen et al. 1996, Pluta 1991). 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) reagiert ausschließlich im Cytochrom P450 1A-System. Erhöhte EROD-Aktivitäten zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel lipophiler Schadstoffe und der Aktivität des Biotransformationssystems an. Die Messung schadstoffbedingter Effekte auf molekularer bzw. subzellularer Ebene ist hochempfindlich und substratspezifisch (Pluta 1991). Daher wird die EROD-Aktivität als Marker für das Biologische Effekt-Monitoring eingesetzt.

Eine erhöhte EROD-Aktivität sagt jedoch nicht zwangsläufig etwas über eine eventuell vorhandene akute toxische oder chronisch toxische Wirkung aus, sondern kann ein Indiz für einen äußeren „Streß“ auf einen Organismus sein. So hängt die EROD-

⁶ Als **Schadstoff** wird eine Chemikalie bezeichnet, wenn erkannt und nachgewiesen ist, daß sie die Umwelt in bestimmter Weise schädigt (Günther 1975).

Aktivität von Nordsee-Klischen stark von der Jahreszeit und damit von der Wassertemperatur ab, mit einer um ein vielfaches erhöhten EROD-Aktivität in den Sommermonaten (Kellermann und Vobach 1997). Weiterhin ist ein Vergleich von EROD-Werten aus verschiedenen Laboratorien oftmals schwierig (Stagg und Addison 1995), daher wurden die EROD-Werte nach einer Methode bestimmt, die im verwendeten Labor zu einer Routinemethode gehört.

Einzelstoffuntersuchungen der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin sollten einen eventuellen Einfluß von Pyrethroiden auf die MFO-Aktivität in Forellenlebern aufzeigen. Dazu wurden in zwei Versuchsreihen Regenbogenforellen zwischen 15 – 20 cm Länge (Bedingung war eine Lebergröße ab 0,5 g) den Pyrethroiden in einer Durchflußanlage ausgesetzt, mit Konzentrationen um 1 µg/l und 72 Stunden bzw. 356 Stunden Kontaminationsdauer. Die Aufarbeitung der Leberproben erfolgte in Anlehnung an die Methode von Pluta (1991): Sofort nach Tötung der Forellen wurden die Lebern entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die mikrosomale Fraktion wurde durch differentielle Zentrifugation gewonnen. Die Messung der EROD-Aktivität erfolgte mit 7-Ethoxyresorufin als Substrat. Das entstehende Reaktionsprodukt Resorufin wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektralphotometrie quantitativ gemessen. Als Substrat kann auch 7-Pentoxyresorufin (PROD) (Burke et al. 1985, Klotz et al. 1984) oder 7-Ethoxycoumarin (ECOD) (Prough et al. 1978) eingesetzt werden. Die Aktivität wird in Picomol gebildetes Resorufin pro Minute pro Milligramm mikrosomales Protein (pmol/(mg • min)) angegeben. Der mikrosomale Proteingehalt wurde nach einer modifizierten Lowry-Methode bestimmt (Lowry et al. 1951). Als Standard für die Proteinbestimmung wurde Rinderserumalbumin verwendet.

3.3.7.1 Wirkung von Pyrethroiden auf die EROD-Aktivität in Fischen

Die EROD-Aktivitäten der Regenbogenforellen, die Pyrethroid-haltigem Wasser ausgesetzt worden waren, waren im Vergleich zu den Kontrollfischen nicht bzw. nicht signifikant erhöht, sondern eher erniedrigt. Die EROD-Aktivitäten der Mikrosomenfraktion der Lebern der Kontrollfische als auch der Forellen aus den Kontaminationsversuchen waren sehr niedrig und lagen in der Größenordnung von 0 bis 50 pmol/(mg • min). Zum Vergleich: hohe EROD-Werte liegen in Bereichen von größer 100 bis zu mehreren 1000 pmol/(mg • min). 2,3,7,8-TCDD (Tetrachlordibenzo-p-dioxin) zum Beispiel erhöhte die EROD-Aktivität in Forellenlebern um 1450 % innerhalb von 9 Tagen (Hektoen et al. 1994). Die Beeinflussung der EROD-Aktivität in Fischen durch Pyrethroide wurde von Deér et al. untersucht: Sie stellten nur einen sehr geringen Effekt - eine leichte Erhöhung der EROD-Aktivität - von Deltamethrin bei 0,2 µg/l auf

die MFO-Aktivität von Karpfen fest, bei 2 µg/l Deltamethrin im Wasser verringerte sich die MFO-Aktivität (Deér et al.1996). Deér et al. führten dies auf die Induktion des Enzymsystems durch Deltamethrin bei geringen Konzentrationen zurück, bei höheren Konzentrationen zeigte sich die toxische Wirkung der Pyrethroide und hemmte die Enzymreaktionen. Über eine Hemmung der Mitochondrienaktivität durch das Pyrethroid Permethrin wurde ebenfalls berichtet (Gassner et al. 1997). Ebenfalls über ein verringerte Aktivität des Cytochrom P450 1A Systems in Lebern von Regenbogenforellen nach Kontamination mit PCBs berichten Förlin und Celandier (1995). In Zellkulturen aus Leberzellen von Ratten hingegen zeigte Cypermethrin nach 3 Tagen Inkubationszeit eine Erhöhung der EROD-Aktivität (Delescluse et al. 1998), Permethrin führte ebenfalls zu einer Erhöhung der EROD- und PROD-Aktivität (Kostka et al. 1997). Die starke Enzyminduktion des MFO-Systems durch andere Substanzen, wie z.B. durch planare Kohlenwasserstoffe, Dioxine u.a., findet sich in der Literatur (Celandier et al. 1993, Van der Oost et al. 1991).

Von großer Bedeutung für die Enzyminduktion ist auch die Expositionszeit, in der Literatur variiert sie von einer bis zu drei Wochen, zwei Wochen sind in der Regel für die Induktion ausreichend, z.B. wurden in einem Feldexperiment in Fischen, die in Käfigen zwei Wochen in einem Fluß gehältert worden waren, erhöhte EROD-Werte gemessen (Casellas et al. 1998). Daher wurde in der zweiten Versuchsreihe die Expositionsdauer von 72 Stunden, bei der eine geringe Verringerung der EROD-Aktivität festgestellt wurde, auf 356 Stunden verlängert, hier waren jedoch keine erhöhten EROD-Werte feststellbar.

Zusammenfassend läßt sich nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Expositionszeiten eher eine Hemmung als eine Steigerung des MFO-Systems durch Pyrethroide in Forellenlebern feststellen. Schon nach der kurzen Expositionszeit von 72 Stunden und auch nach 356 Stunden war die EROD-Aktivität geringer als die der Kontrollfische, wenn auch insgesamt auf sehr geringem Niveau. Eine große Rolle scheint dabei die starke toxische Wirkung der Pyrethroide speziell auf Fische zu spielen, die auch das Multienzymsystem in den Lebern beeinträchtigt. Pyrethroide „stressen“ den Fisch also nicht wie z.B. Dioxine und induzieren das MFO-Enzymsystem, sondern „stressen“ durch ihre toxische Wirkung. Die Bestimmung der EROD-Aktivität eignet sich daher nicht als Biomarker für eine eventuelle Pyrethroidbelastung in Fischen bzw. Forellen.

4. Zusammenfassung

Zur Beschreibung der Umweltgefährlichkeit von Chemikalien werden Parameter wie Toxizität, Exposition, Metabolismus und die Anreicherung in Biota herangezogen. Für die Anreicherung von Substanzen in Lebewesen ist die Bioakkumulation ausschlaggebend, die meist im System Fisch/Wasser als Biokonzentrationsfaktor bestimmt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Biokonzentrationsfaktoren (BCFs) von 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol [Triclosan, Irgasan DP 300] bei unterschiedlichen pH-Werten des Wassers an Zebrabärblingen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu früher erhobenen Befunden, sowohl die Kinetik der Akkumulation als auch die Biokonzentrationsfaktoren vom pH-Wert des Wasser abhängig sind. So nahm die Geschwindigkeit der Aufnahme von $129 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ bei pH 9 bis auf $356 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ bei pH 6 zu, zugleich stieg auch der BCF von 3730 bei pH 9 auf 8400 bei pH 6. Eine statistische Auswertung zeigte, daß sowohl der Zusammenhang zwischen dem pH-Wert des Wassers und dem BCF als auch zwischen dem pH-Wert des Wassers und der Aufnahmegeschwindigkeit signifikant war.

Als zweite Substanzgruppe wurden die Pyrethroide untersucht, synthetische Insektizide, die 1995 einen Anteil von 23 % der weltweit produzierten Insektizide ausmachten. Bei der Bestimmung der Biokonzentrationsfaktoren der Pyrethroide Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin an juvenilen Regenbogenforellen wurden im Durchflußsystem BCF-Werte zwischen 860 und 2200 gemessen. Bezogen auf den Fettgehalt der Fische betragen die BCF-Werte 27 000 bis 64 000. Die bereits in der Literatur beschriebene hohe Toxizität der Pyrethroide für Fische, speziell Regenbogenforellen, wurde bestätigt. Sie betrug für Permethrin ca. $5 \mu\text{g/l}$ und für die anderen Pyrethroide weniger als $1 \mu\text{g/l}$ (lethale Konzentration [LC50] im Wasser).

Zur Analytik von Pyrethroid-Metaboliten, die während der Bioakkumulationsexperimente gebildet worden sein konnten, wurde eine gaschromatographische Methode mit Sekundärionenmassenspektrometrie zur Detektion ausgearbeitet. Bei einer Nachweisgrenze von ca. $1 \mu\text{g/kg}$ konnten jedoch keine Pyrethroid-Metaboliten festgestellt werden. Als Ursache wurde die schnelle Ausscheidung der leicht wasserlöslichen, teils als Konjugate vorliegenden Pyrethroid-Metaboliten diskutiert.

Eine Vielzahl von Chemikalien induziert das mischfunktionelle Oxigenasen-System (MFO-System) in Fischen. Zur Frage, ob Pyrethroide ebenfalls einen solchen biochemischen Effekt induzieren, wurden die Ethoxyresorufin-Aktivitäten (EROD-Aktivitäten) in Forellenlebern-Präparationen analysiert. Hierzu wurden die Fische den einzelnen Pyrethroiden jeweils bis zu drei Wochen ausgesetzt, es zeigten sich jedoch

keine Erhöhungen der EROD-Aktivitäten, vielmehr ergaben sich tendenziell niedrigere Spiegel dieses Indikators für die Aktivität der mischfunktionellen Oxidasen. Ein Grund dafür könnte die hohe Toxizität der Pyrethroide auf Fische sein, die auch die Enzymaktivität in den Forellenlebern gehemmt haben könnte.

5. Literatur

- Anderson, R.L.** 1989. Toxicity of synthetic pyrethroids to freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**:403-410.
- Angerer, J., A. Ritter.** 1997. Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **695**:217-226.
- Argauer, R.J., S.J. Lehotay, R.T. Brown.** 1997. Determining lipophilic pyrethroids and chlorinated hydrocarbons in fortified ground beef using ion-trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **45**:3936-3939.
- Barber, J.T., H.A. Sharma, H.E. Ensley, M.A. Polito.** 1997. A comparison of the toxicity and metabolism of phenol and chlorinated phenols by *lemna gibba*, with special reference to 2,4,5-trichlorophenol. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:346-350.
- Barron, M.G.** 1990. Bioconcentration. *Environ. Sci. Technol.* **24**:1612-1618.
- Bayer.** 1996. Insektizide im Haushalt. Fakten kontra Vorurteile. Bayer Leverkusen. 31 Seiten.
- Bayer.** 1999. Beta-Cyfluthrin und Cyfluthrin Produktbeschreibungen. www.bayer.com. 1 Seite.
- Begerow, J., L. Dunemann.** 1998. Derivatisierung für die chromatographische Spurenanalytik. In: *Analytiker Taschenbuch*, Band 18, Springer Verlag, S. 67-111.
- Blaß, W.** 1990. Residues of pyrethroid insecticides and their analytical determination. In: *Chemistry of Plant Protection*. G. Haug, H. Hoffmann, Springer. 1-144.
- Blau, G.E., W.B. Neely, D.R. Brandson.** 1975. Ecokinetics: a study of the fate and distribution of chemicals in laboratory ecosystems. *AIChE Journal* **21**:854-861.
- Bocquet, J.-C., M. L'Hotellier.** 1985. The effect of deltamethrin on the aquatic environment. *Pestic. Sci.* **16**:198.
- Bolygó, E., S.T. Hadfield.** 1990. An on-column capillary gas chromatographic method for the analysis of synthetic pyrethroid residues on fish eggs. *J. High Resolut. Chromatogr.* **13**:457-460.
- Bonwick, G.A., M. Putman, P.J. Baugh, C.J. Smith, R. Armitage, D.H. Davies.** 1994. Immunoassay development for permethrin residues. *Food Agric. Immunol.* **6**:341-356.
- Bonwick, G.A., M. Yasin, P. Hancock, P.J. Baugh, J.H. Williams, C.J. Smith, R. Armitage, D.H. Davies.** 1996. Synthetic pyrethroid insecticides in fish: analysis by gas chromatography-mass spectrometry operated in the negative ion chemical ionization mode and ELISA. *Food Agric. Immunol.* **8**:185-194.
- Bradbury, S.P., J.R. Coats.** 1989a. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **108**:133-177.
- Bradbury, S.P., J.R. Coats.** 1989b. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**:373-380.
- Braun, H.E., J. Staneck.** 1982. Application of the AOAC multi-residue method to determination of synthetic pyrethroid residues in celery and animal products. *J. AOAC Int.* **65**:685-689.
- Broadbent, J.S., G.F. Bauerle, Jr., K.L. Ray.** 1995. Determination of pyrethroid insecticides by ion-trap GC-MS-MS. *Anal. Chim. Acta* **317**:137-148.
- Burke, M.D., S. Thompson, C.R. Elcombe, J. Halpert, T. Haaparanta, R.T. Mayer.** 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes p-450. *Biochem. Pharmacol.* **18**:3337-3345.
- Butte, W.** 1991. Mathematical description of uptake, accumulation and elimination of xenobiotics in a fish/water system. In R. Nagel and R. Loskill, *Bioaccumulation in aquatic systems*. VCH Weinheim. S.29-42.
- Butte, W., J.K. Blum.** 1984. Calculation of bioconcentration factors from kinetic data by non-linear iterative least squares regression analysis using a programmable minicalculator. *Chemosphere* **13**:151-160.
- Butte, W., J. Eilers, M. Kirsch.** 1982. Trialkylsulfonium- and trialkylselenonium-hydroxides for the pyrolytic alkylation of acidic compounds. *Anal. Lett.* **15**:841-850.
- Butte, W., K. Fox, A. Schmidt, G.-P. Zauke.** 1993. Bioakkumulation im Grenzbereich von Lipophilie und molekularen Strukturen, Forschungsbericht Nr. 106 03 91, Umweltbundesamt, Berlin.
- Butte, W., C. Paul, A. Willig, G.-P. Zauke.** 1988. Beziehung zwischen der Struktur von Phenolen und ihre Akkumulation gemessen im Flow-Through Fischttest (OECD Nr. 305 E) und ihre Korrelation mit Strukturparametern“, Forschungsbericht Nr. 106 02 053, Umweltbundesamt, Berlin.

- Butte, W., G. Walker, B. Heinzow.** 1998. Referenzwerte der Konzentration von Permethrin-Metaboliten Cl2CA [3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonsäure] und 3-PBA [3-Phenoxybenzoesäure] im Urin. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **3**:21-26.
- Byberg, J.R., F.S. Jørgensen, P.D. Klemmensen.** 1987. Towards an identification of the pyrethroid pharmacophore. A molecular modelling study of some pyrethroid esters. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1**:181-195.
- Casellas, C., H. Fenet, J. Bontoux.** 1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**:137-143.
- Casida, J.E., G.B. Quistad.** 1998. Golden age of insecticide research. *Annu. Rev. Entomol.* **43**:1-16.
- Caulcutt, R., R. Boddy.** 1983. *Statistics for analytical chemists.* Chapman and Hall. S. 100 ff.
- Celander, M., M.J. Leaver, S.G. George, L. Förlin.** 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: a time course study. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**:343-349.
- Chemikaliengesetz (ChemG).** 1980. Bundesgesetzblatt, Teil 1, S. 1718 ff.
- Chemikaliengesetz (ChemG).** 1990. Bundesgesetzblatt, Teil 1, S. 521 ff.
- Chen, A.W., J.M. Fink, D.J. Letinski.** 1996. Analytical methods to determine residual cypermethrin and its major acid metabolites in bovine milk and tissues. *J. Agric. Food Chem.* **44**:3534-3539.
- Clark, J.R., L.R. Goodman, P.W. Borthwick, J.M. Patrick, Jr., G.M. Cripe, P.M. Moody, J.C. Moore, E.M. Lores.** 1989. Toxicity of pyrethroids to marine invertebrates and fish: a literature review and test results with sediment-sorbed chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**:393-401.
- Class, T.J.** 1992. Gas chromatographic and mass spectrometric studies on pyrethroid photo- and biotransformation. *Fresenius J. Anal. Chem.* **342**:805-808.
- Coats, J.R., N.L. O'Donnell-Jeffery.** 1979. Toxicity of four synthetic pyrethroid insecticides to rainbow trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **23**: 250-255.
- Coats, J.R., D.M. Symonik, S.P. Bradbury, S.D. Dyer, L.K. Timson, G.J. Atchison.** 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**:671-679.
- Coats, J.R., P.J. Rice, C.D. Drewes, T.M. Klubertanz, S.P. Bradbury.** 1997. Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day-old japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 696-704.
- Coats, J.R.** 1990. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ. Health Perspect.* **87**:255-262.
- Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organism.** 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. *National Water Quality Laboratory*, PB-242 105, Washington.
- Comor, J.J., M. Graovac, M. Todorovic, M.I. Trtanj, M.M. Kopencni.** 1995. Gas chromatographic determination of 5-chloro-2-(2,3-dichlorphenoxy)-phenol in the waste water of a slaughterhouse. *J. Chromatogr. A* **705**:313-317.
- Cooper, C.M.** 1991. Insecticide concentrations in ecosystem components of an intensively cultivated watershed in Mississippi. *J. Freshwater Ecol.* **6**:237-247.
- Crawford, M.J., A. Croucher, D.H. Hutson.** 1981a. Metabolism of *cis*- and *trans*-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J. Agric. Food Chem.* **29**:130-135.
- Dalelal, R.C., S. Rani, S. Rani, S.R. Vebma.** 1980. Influence of pH on the toxicity of phenol and its two derivatives pentachlorophenol and dinitrophenol to some fresh water teleosts. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **8**:623-629.
- Dave, G.** 1984. Effect of pH on pentachlorophenol toxicity to embryos and larvae of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **33**:621-630.
- Davies, J.H.** 1985. The pyrethroids: an historical introduction. In: J.P. Leahey, ed., *The pyrethroid insecticides.* Taylor and Francis, London, U.K. S. 1-41.
- Day, K.E.** 1991. Effect of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus). *Environ. Toxicol. Chem.* **10**:91-101.
- Deér, K.A., L. Banka, J. Nemcsók, M. Ábrahám.** 1996. Effects of deltamethrin on hepatic microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in carp. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **31**:637-644.
- Delescluse, C., N. Ledirac, G. de Sousa, M. Pralavorio, P. Lesca, R. Rahmani.** 1998. Cytotoxic effects and induction of cytochromes P450 1A1/2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells: binding capability to the Ah receptor. *Toxicol. Lett.* **96,97**:33-39.

- Dively, J.L., J.E. Mudge, W.H. Neff, A. Anthony.** 1977. Blood pO₂ pCO₂ and pH changes in brook trout (*salvelinus fontinalis*) exposed to sublethal levels of acidity. *Comp. Biochem. Physiol.* **57A**, 347.
- Eadsforth, C.V., M.K. Baldwin.** 1983. Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Xenobiotica* **13**:67-72.
- Eadsforth, C.V., P.C. Bragt, N.J. van Sittert.** 1988. Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticide cypermethrin and alpha-cypermethrin: relevance for biological monitoring. *Xenobiotica* **18**:603-614.
- ECETOC Technical Report No. 67.** 1996. The role of bioaccumulation in environmental risk assesment: the aquatic environment and related food webs. *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*, Brussels. 130 Pages.
- Edwards, R., P. Millburn.** 1985a. The metabolism and toxicity of insecticides in fish. In: D.H. Hutson and T.R. Roberts, *Insecticides*. John Wiley Sons Ltd. S.249-274.
- Edwards, R., P. Millburn.** 1985b. Toxicity and metabolism of cypermethrin in fish. *Pestic. Sci.* **16**:201-202.
- Eells, J.T., J.L. Rasmussen, P. A. Bandettini, J.M. Propp.** 1993. Differences in the neuro-excitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel-specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **123**:107-119.
- Elliott, M., A.W. Farnham, N.F. Janes, B.P.S. Khambay.** 1988. The pyrethrins and related compounds. Part XXXII. Replacement of the central ester link. *Pestic. Sci.* **23**:215-230.
- Elliott, M., A.W. Farnham, N.F. Janes, P.H. Needham, D.A. Pulman, J.H. Stevenson.** 1973. A photostable pyrethroid. *Nature* **246**:169-170.
- Elliott, M., A.W. Farnham, N.F. Janes, P.H. Needham, D.A. Pulman.** 1974. Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature* **248**:710-711.
- Ensenbach, U., R. Nagel.** 1991. Toxicokinetics of xenobiotics in zebrafish- comparison between tap and river water. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**:49-53.
- Erickson, R.J., J.M. McKim.** 1990. A simple flow-limited model for exchange of organic chemicals at the fish gills *Environ. Toxicol. Chem.* **9**:159-165.
- Fishbase 1997.** Froese, R. and D. Pauly, Editors. Concepts, design and data sources. ICLARM, Manila, Philippines. ISBN 971-8709-06-1. ISSN 0116-6964. ICLARM Contribution No. 1402.
- Ford, M.G., R. Greenwood, C.H. Turner.** 1989. The structure/activity relationships of pyrethroid insecticides 1. A novel approach based upon the use of multivariate QSAR and computational chemistry. *Pestic. Sci.* **27**:305-326.
- Förlin, L., M. Celander.** 1995. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1 A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquat. Toxicol.* **33**:141-153.
- Förlin, L., A. Goksøyr.** 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22**:287-312.
- Franke, C.** 1996. How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* **32**:1897-1905.
- Franke, C., G. Studinger, G. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg, U. Jöhncke.** 1994. The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* **29**:1501-1514.
- Fugmann, B., U. Wachendorff, F. Lieb, K. Naumann, H. Moeschler.** 1991. Natürliche Pflanzenschutzwirkstoffe. *Chem. Unserer Zeit* **25**:317-330.
- Gassner, B., A. Wüthrich, G. Scholtysik, M. Solioz.** 1997. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**:855-860.
- Gaughan, L.C., M.E. Ackermann, T. Unal, J.E. Casida.** 1978. Distribution and metabolism of *trans*- and *cis*-permethrin in lactating jersey cows. *J. Agric. Food Chem.* **26**:613-618.
- Geyer, H.J., I. Scheunert, R. Brüggemann, M. Matthies, C.E.W. Steinberg, V. Zitko, A. Kettrup, W. Garrison.** 1984. The relevance of aquatic organisms' lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: toxicity of lindane to different fish species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **28**:53-70.
- Glickman, A.H., A.A.R. Hamid, D.E. Rickert, J.J. Lech.** 1981. Elimination and metabolism of permethrin isomers in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**:88-98.
- Glickman, A.H., J.J. Lech.** 1981. Hydrolysis of permethrin, a pyrethroid insecticide, by rainbow trout and mouse tissue in vitro: A comparative study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **60**:186-192.
- Glickman, A.H., S.D. Weitman, J.J. Lech.** 1982. Differential toxicity of *trans*-permethrin in rainbow trout and mice. I. Role of biotransformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**:153-161.
- Glickman, A.H., T. Shono, J.E. Casida, J.J. Lech.** 1979. In vitro metabolism of permethrin isomeres by carp and rainbow trout liver microsomes. *J. Agric. Food Chem.* **27**:1038-1041.

- Glomot, R.** 1982. Toxicity of deltamethrin to higher vertebrates. Roussel Uclaf: Deltamethrin monograph, 109-136.
- Gobas, F.A.P.C., A. Opperhuizen, O. Hutzinger.** 1986. Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish: relationship with membrane permeation. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**:637-646.
- Gobas, F.A.P.C., R.W. Russel.** 1991. Bioavailability of organochlorines in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**:17-20.
- Gray, A.J., D.M. Soderlund.** 1985. Mammalian toxicology of pyrethroids. In: D.H. Hutson and T.R. Roberts, *Insecticides*. John Wiley & Sons Ltd. S.193-248.
- Günther, K.-O.** 1975. Erkennung der Umweltgefährlichkeit von Stoffen. In: Ullmann Enzyklopädie, Bd. 6, VCH, Weinheim.
- Haberer, K. H. Köhle.** 1990. Multimethode zur gaschromatographischen Spurenbestimmung der Pyrethrine und Pyrethroide in Wasser. *Vom Wasser* **75**:75-82.
- Hanioka, N., H. Jinno, T. Nishimura, M. Ando.** 1997. Effect of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether on cytochrome P450 enzymes in the rat liver. *Chemosphere* **34**:719-730.
- Hansch, C., A.J. Leo.** 1985. MEDCHEM Project. Issue No. 26. Claremont, CA: Pomona College.
- Hansch, C., D. Hoeckman, A. Leo, L. Zhang, P. Li.** 1995. The expanding role of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in toxicology. *Toxicol. Lett.* **79**:45-53.
- Hansen, D.J., L.R. Goodmann, J.C. Moore, P.K. Higdon.** 1983. Effects of the synthetic pyrethroids AC 222, 705, permethrin and fenvalerate on sheepshead minnows in early life stage toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **2**:251-258.
- Hara, A. N.S. Radin.** 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* **90**:420-426.
- Hathway, D.E.** 1982. Structure-activity considerations: a synthesis of ideas. *Chem. Biol. Interact.* **42**:1-26.
- Haya, K.** 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**:381-391.
- Hayton, W.L., M.G. Barron.** 1990. Rate-limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**:151-157.
- Hektoen, H., A. Bernhoft, K. Ingebrigtsen, J. U. Skaare, A. Goksoyr.** 1994. Response of hepatic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and cod (*Gadus morhua*) to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD). *Aquat. Toxicol.* **28**:97-106.
- Hill, I.R.** 1985. Effects on non-target organisms in terrestrial and aquatic environments. In: J.P. Leahey, ed., *The pyrethroid insecticides*. Taylor and Francis, London, U.K. S. 151-262.
- Hites, R.A., V. Lopez-Avila.** 1979. Identification of organic compounds in an industrial wastewater. *Anal. Chem.* **51**:1452-1456.
- Hoff, G.R. van der, F. Pelusio, U.A.Th. Brinkmann, R.A. Baumann, P. van Zoonen.** 1996. Automated solid-phase extraction coupled to gas chromatography with electron-capture detection: a combination of extraction and clean-up of pyrethroids in the analysis of surface water. *J. Chromatogr. A.* **719**: 59-67.
- Holcombe, G.W., G.L. Phipps, D.K. Tanner.** 1982. The acute toxicity of permethrin. *Environ. Pollut.* **A29**:167-178.
- Hopfinger, A.J., D. Malhotra, R.D. Battershell, A.W. Ho.** 1984. Conformational behavior and thermodynamic properties of phenothrin analogue insecticides. *J. Pestic. Sci.* **9**:631-641.
- Hoppe, H.W., H.D. Köster.** 1994. Biomonitoring bei Pyrethroid-Exposition - Nachweis von Pyrethroid-Metaboliten im Harn. In: *WaBoLu-Hefte 3/94 Pyrethroide im Hausstaub - eine Übersicht*. 103-111.
- Hoppe.** 1996. Pyrethroide im Harn - Bestimmung der Leitmetaboliten Cl₂CA, Br₂CA und 3-PBA. Aus: *Mitteilungen der DFG*.
- Hübschmann, H.-J.** 1996. Handbuch der GC/MS. Grundlagen und Anwendung. VCH Weinheim. ISBN 3-527-28604-7. 586 Seiten.
- Hudson, B.D., A.R. George, M.G. Ford, D.J. Livingstone.** 1992. Structure-activity relationships of pyrethroid insecticides. Part 2. The use of molecular dynamics for conformation searching and average parameter calculation. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **6**:191-201.
- Hunn, J.B., J.L. Allen.** 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Annu. Rev. Pharmacol.* **14**: 47-55.
- Hutson, D.H., R. Edwards, P. Millburn.** 1986. Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse, and quail. *Toxicol. Pharmacol.* **84**:512-522.
- Hutson, D.H., L.C. Gaughan, J.E. Casida.** 1981. Metabolism of the *cis*- and *trans*-isomers of cypermethrin in mice. *Pestic. Sci.* **12**:385-398.
- Huuskonen, S., P. Lindström-Seppä, K. Koponen, S. Roy.** 1996. Effects of Non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls (congeners 77 and 126) on cytochrome P4501A and conjugation activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**: 205-213.
- Ikemoto, Y., K. Motoba, T. Suzuki, M. Uchida.** 1992. Quantitative structure-activity relationships of non-specific and specific toxicants in several organism species. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**:931-939.

- Jäger-Mischke, I., V. Wollny.** 1988. Pyrethrum und Pyrethroide – Ein Beitrag zur Naturstoffdiskussion. Öko-Institut Freiburg.
- Janistyn, H.** 1978. Handbuch der Kosmetika und Riechstoffe, 1. Bd., 3. Aufl. Dr. Alfred Hüthing Verlag, Heidelberg, 1057 S.
- Jinno, H., N. Hanioka, S. Onodera, T. Nishimura, M. Ando.** 1997. Irgasan DP 300 (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)-phenol) induces cytochrome P450s and inhibits hem biosynthesis in rat hepatocytes cultured on matrigel. *Xenobiotica* **27**:681-692.
- Kabara J.J.** 1984. Cosmetic and drug preservation, M. Dekker, Inc., New York, 465 S.
- Kanetoshi, A., H. Ogawa, E. Katsura, T. Okui, H. Kaneshima.** 1988. Disposition and excretion of Irgasan DP 300 and its chlorinated derivatives in mice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**:637-644.
- Kellermann, H.-J., M. Vobach.** 1997. Entgiftungstoffwechsel der Nordsee-Kliesche (*Limanda limanda*). *Inf. Fischwirtschaft.* **44**:13-17.
- Kikuchi, T., Y. Nagashima, M. Chiba.** 1984. Accumulation and excretion of permethrin by the himedeka *oryzias latipes* and biological significance of accumulated permethrin. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **50**:101-106.
- Kimmich, F.** 1987. Untersuchungen über die toxischen Auswirkungen des Insektizides Decis (Pyrethroid) auf Embryonal-, Larval- und Juvenilstadien der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*, Rich.) und der Bachforelle (*salmo trutta*, L.). *Dissertation.* Universität Tübingen.
- Klotz, A.V., J.J. Stegeman, C. Walsh.** 1984. An alternative 7-ethoxyresorufin o-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome p-450 monooxygenase activity. *Anal. Biochem.* **140**:138-145.
- Kobayashi, K., T. Kishino.** 1980a. A study on the absorption mechanism of pentachlorophenol in goldfish relating to its distribution between solvents and water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **46**:1165-1168.
- Kobayashi, K., T. Kishino.** 1980b. Effect of pH on the toxicity and accumulation of pentachlorophenol in goldfish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **46**:167-170.
- Könemann, H.** 1991. Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. Part 1: relationship for 50 industrial pollutants. *Toxicology* **19**:209-221.
- Könemann, H., A. Musch.** 1981. Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. Part 2: the influence of pH on the QSAR of chlorophenol. *Toxicology* **19**:223-228.
- Könemann, H., K. van Leeuwen.** 1980. Toxicokinetics in fish: accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere* **9**:3-19.
- Kostka, G., D. Palut, B. Wiadowska.** 1997. The effect of permethrin and DDT on the activity of cytochrome P-450 1A and 2B molecular forms in rat liver. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **48**:229-2237.
- Kreutzweiser, D.P., G.A. Wood.** 1991. Permethrin treatments in canadian forests. Part 3.: Environmental fate and distribution in streams. *Pestic. Sci.* **33**:35-46.
- Kühn, K.-H.** 1997. Bestimmung von Pyrethroiden und ihren Metaboliten in Blut und Urin mittels GC/MS und GC-ECD. *Dissertation*, TU Clausthal. 114 Seiten. ISBN 3-8265-2286-9.
- Kumaraguru, A.K., F.W.H. Beamish.** 1981. Lethal toxicity of permethrin (NRDC-143) to rainbow trout, *salmo gairdneri*, in relation to body weight and water temperature. *Water Res.* **15**:503-505.
- Lászlo P., D. Bajomi, I. Székely.** 1996. The pyrethroids, an overview. *Int. Pest Control* **38**:15-19.
- Leng, G., K.-H. Kühn, K.A. Bucholski, L. Dunemann, H. Idel.** 1996a. Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-mass Spectrometry. *Chromatographia* **43**:285-292.
- Leng, G., K.-H. Kühn, L. Dunemann, H. Idel.** 1996b. Gaschromatographische und massenspektrometrische Methode zum Nachweis ausgewählter Pyrethroidmetabolite im Urin. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **198**:443-451.
- Lewalter, J., Kahre, H.** 1996. Pyrethroid-Metabolite in Harn. Pers. Mitteilung. Institut für Biologisches Monitoring BAYER AG, Ärztliche Abteilung, 51368 Leverkusen-Bayerwerk.
- Ling, Y.-C., I.-P. Huang.** 1995. Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A* **695**:75-82.
- Lohner, T.W., S.W. Fisher.** 1990. Effects of pH and temperature on the acute toxicity and uptake of carbaryl in the midge, *Chironimus riparius*. *Aquat. Toxicol.* **16**:335-354.
- Lopez-Avila, V., R. Hites.** 1980. Organic compounds in an industrial wastewater, their transport to sediments. *Environ. Sci. Technol.* **14**:1382-1390.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Lydy, M., T.W. Lohner, S.W. Fisher.** 1990. Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquat. Toxicol.* **17**:27-44.
- Mackay, D.** 1982. Correlation of bio-concentration factors. *Environ. Sci. Technol.* **16**:274-278.

- Mangelsdorf, I., C. Pöloth.** 1997. Commentary on the application of (Q)SAR to the toxicological evaluation of existing chemicals. *Chemosphere* **35**:2525-2542.
- Marei, A.E.-S.M., L.O. Ruzo, J.E. Cassida.** 1982. Analysis and persistence of permethrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate in the fat and brain of treated rats. *J. Agric. Food Chem.* **30**:558-562.
- Marti-Mestres, G.N., J.-F.M. Cooper, J.-P.M. Mestres, G.D. Wilde, N.R. Wynn.** 1995. Effects of a supplemented deltamethrin and piperonyl butoxide diet on levels of residues in products of animal origin. 2. Feeding study in poultry. *J. Agric. Food Chem.* **43**:1039-1043.
- Matsushima, H.** 1988. A selected ion monitoring assay for triclosan in medical waste water. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **16**:225-257.
- Mauck, W.L., L.E. Olson, L.L. Marking.** 1976. Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **4**:18-29.
- McMurry, L.M., M. Oethinger, S.B. Levy.** 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **394**:531-532.
- Meierhenrich, Uwe.** 1997. Nachweis und Toxikologie pyrethroider Verbindungen. Untersuchungen für die Matrices Teppichfaser, Hausstaub, Raumluft sowie Urin. *Dissertation, Universität Bremen*, 167 Seiten.
- Merck, E.** 1974. Gesamtlipide. I. Photometrische Bestimmung. In: E. Merck, Klinisches Labor, Darmstadt, 12. Aufl., S. 247-249.
- Metcalfe, R.L., J.R. Sanborn, P.-Y. Lu, D. Nye.** 1975. Laboratory model ecosystem studies of the degradation and fate of radiolabeled tri-, tetra- and pentachlorobiphenyl compared with DDE. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **3**:151-165.
- Meylan, W.M., P.H. Howard, R.S. Boethling, D. Aronson, H. Printup, S. Gouchie.** 1999. Improved method for estimating bioconcentration/ bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:664-672.
- Meylan, W.M., P.H. Howard.** 1985. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients *J. Pharm. Sci.* **84**: 83-92.
- Microcal Origin 5.** 1997. Microcal Software Inc., Northampton, USA.
- Miyamoto, J.** 1976. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environ. Health Perspect.* **14**:15-28.
- Miyazaki, T., T. Yamagishi, M. Masumoto.** 1984. Residues of 4-chloro-1-(2,4-dichlorophenoxy)-2-methoxybenzene (triclosan methyl) in aquatic biota. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **32**:227-232.
- Mortimer, R.D.** 1990. Rapid method for esterification of trace levels of carboxylic acids for analysis by gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatogr.* **516**:427-432.
- Mortimer, R.D., D.F. Weber, W.F. Sun.** 1995. Analysis of total free and glucose-conjugated pyrethroid acid metabolites in tea infusions as hexafluoroisopropyl esters by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.* **78**:846-855.
- Mortimer, R.D., J.B. Shields.** 1995. Total, free, and glucose-conjugated acid metabolites from permethrin and cypermethrin in foods by gas chromatography-electron capture detection. *J. AOAC Int.* **78**:1302-1307.
- Mortimer, R.D., J.B. Shields.** 1996. Determination of total free and glucose-conjugated 3-phenoxybenzyl alcohol residues in foods by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.* **79**:967-971.
- Muir, D.C.G., B.R. Hobden, M.R. Servos.** 1994. Bioconcentration of pyrethroid insecticides and DDT by rainbow trout: uptake, depuration, and effect of dissolved organic carbon. *Aquat. Toxicol.* **29**:223-240.
- Mulla, M.S., H.A. Navvab-Gojrati, H.A. Darwazeh.** 1978. Toxicity of mosquito larvicidal pyrethroids to four species of freshwater fishes. *Environ. Entomol.* **7**:428-430.
- Narahashi, T.** 1986. Mechanisms of action of pyrethroids on sodium and calcium channel gating. In: Neuropharmacology and pesticide action. M.G. Ford, G.G. Lunt, R.C. Reay, P.N.R. Usherwood, VCH Weinheim, 36-60.
- Narahashi, T., D.B. Carter, J. Frey, K. Ginsburg, B.J. Hamilton, K. Nagata, M.L. Roy, J.-H. Song, H. Tatebayashi.** 1995. Sodium channels and GABA_A receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. *Toxicol. Lett.* **82/83**:239-245.
- Naumann, K.** 1981. Chemie der synthetischen Pyrethroid-Insektizide. In: R. Wegler, Hrsg. Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Band 7. Springer-Verlag.
- Naumann, K.** 1990. Synthetic pyrethroid insecticides: structure and properties. Chemistry of plant protection: 4. Springer, Berlin.
- Naumann, K.** 1998. Research into fluorinated pyrethroid alcohols - an episode in the history of pyrethroid discovery. *Pestic. Sci.* **52**:3-20.
- Neely, W.B., D.R. Branson, G.E. Blau.** 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ. Sci. Technol.* **8**:1113-1115.
- Nendza, M.** 1991. QSARs of bioconcentration: validity assessment of log Pow/log bcf correlations. In R. Nagel and R. Loskill, *Bioaccumulation in aquatic systems*. VCH Weinheim. S.43-66.

- Nendza, M.** 1998. Structure-activity relationships in environmental sciences. Chapman & Hall, London.
- Nilsson, C.-A., K. Andersson, C. Rappe, S.-O. Westermark.** 1974. Chromatographic evidence for the formation of chlorodioxins from chloro-2-phenoxyphenols. *J. Chromatogr.* **96**:137-147.
- Nisha, G., M. Kalyanasundaram.** 1992. Structure-activity relationships in pyrethroid esters derived from substituted 2-phenoxy-3-methylbutanoic acid. *Pestic. Sci.* **35**:21-25.
- Nishikawa, Y., T. Okumura.** 1996. Gas chromatography-mass spectrometry determination of triclosans in water, sediment and fish samples via methylation with diazomethan. *Anal. Chim. Acta* **325**:175-184.
- OECD.** 1981. OECD guidelines for testing of chemicals. OECD Paris.
- OECD Nr. 203.** Adopted 17.07.1992. Fish, acute toxicity test. In: OECD guideline for testing of chemicals, Paris, 1-9.
- OECD Nr. 204.** April 1984. Fish: Prolonged toxicity test: 14-day study. In: OECD guideline for testing of chemicals, Paris, 1-9.
- OECD Nr. 305.** June 1996. Bioconcentration: flow-through fish test. In: OECD guideline for testing of chemicals, Paris, 1-23.
- Oehler, D.D.** 1979. Gas-liquid chromatographic determination of permethrin in bovine tissues. *J. AOAC Int.* **62**:1309-1311.
- Paasivirta, J., J. Särkka, T. Leskijärvi, A. Roos.** 1980. Transportation and enrichment of chlorinated phenolic compounds in different aquatic food chains. *Chemosphere* **9**:441-456.
- Pang, G.-F., T.-S. Zhao, Y.-Z. Chao, C.-L. Fan.** 1994. Cleanup with two florisil columns for gas chromatographic determination of multiple pyrethroid insecticides in products of animal origin. *J. AOAC Int.* **77**:1634-1638.
- Pap, L., D. Bajomi, I. Székely.** 1996. The pyrethroids, an overview. *Int. Pest Control* **38**:15-19.
- Papadopoulou-Mourkidou, E.** 1993. The pyrethroid insecticides. In: Comprehensive analytical profiles of important pesticides. A volume in the series modern methods for pesticide analysis. Ed. J. Sherma, T. Cairns. CRC-Press, 3-40.
- Parlar, H., D. Angerhöfer.** 1991. Chemische Ökotoxikologie. Springer Berlin. ISBN 3-540-53625-6.
- Philip, G.H., P.M. Reddy, G. Sridevi.** 1995. Cypermethrin-induced *in vivo* alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *labeo rohita*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **31**:173-178.
- Pluta, H.-J.** 1991. Investigations on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In T. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner, Fish: ecotoxicology and ecophysiology. VCH Weinheim. S.13-28.
- Pomona.** 1987. Pomona College Medicinal Chemistry Project, Claremont, CA 91711, Log P Database, (C. Hansch and A. Leo), July 1987 edition.
- Prough, R.A., M.D. Burke, R.T. Mayer.** 1978. Direct fluorometric methods for measuring mixed-function oxidase activity. *Methods Enzymol.* **52c**:372-377.
- Ray, D.E.** 1991. Pesticides derived from plants and other organisms. In: W.J. Hayes, Jr. and E.R. Laws, Jr., Handbook of Pesticide Toxicology. Vol. 2. Academic Press. S. 585-598.
- Rickard, J., M.E. Brodie.** 1985. Correlation of blood and brain levels of the neurotoxic pyrethroid deltamethrin with the onset of symptoms in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**:143-156.
- Rippen.** 1998. Handbuch der Umwelt-Chemikalien EG-Richtlinien C: Methoden zur Bestimmung der Ökotoxizität.
- Rippen.** 1999. Handbuch der Umwelt-chemikalien Pyrethroide. Biomonitoring in Binnengewässern Punkt 8.11.3, S. 190-195.
- Römpp.** 1995. Chemie Lexikon. 9. Auflage. Paperback-Ausg., Thieme, Stuttgart.
- Russom, C.L., S.P. Bradbury, S.J. Broderius, D.E. Hammermeister, R.A. Drummond.** 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow (*pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:948-967.
- Saarikoski, J., R. Lindström, M. Tyynelä, M. Viluksela.** 1986. Factors affecting the absorption of phenolics and carboxylic acids in the guppy (*poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **11**:158-173.
- Saarikoski, J., M. Viluksela.** 1981. Influence of pH on the toxicity of substituted phenols to fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **10**:747-753.
- Saarikoski, J., M. Viluksela.** 1982. Relation between physicochemical properties of phenols and their toxicity and accumulation in fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **6**:501-512.
- Sachs, L.** 1997. Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. 8. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Sangster, J.** 1993. LOGKOW Databank. A databank of evaluated octanol-water partition coefficients (log P) on microcomputer diskette. Montreal, Quebec, Canada: Sangster Research Laboratories.

- Schimmel, S.C., R.L. Garnas, J.M. Patrick, Jr., J.C. Moore.** 1983. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food Chem.* **31**:104-113.
- Schmidt, A.** 1990. Messung der Bioakkumulationsfaktoren von 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol im System Fisch/Wasser bei unterschiedlichen pH-Werten des Wassers. *Diplomarbeit*, Universität Oldenburg.
- Schrap, S.M.** 1991. Bioavailability of organic chemicals in the aquatic environment. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**:13-16.
- Schüürmann, G., M. Marsmann.** 1991. QSAR-Modelle - Interpretation und Prognose der Biokonzentration und aquatische Toxizität. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **3**:42-47.
- Schüürmann, G., W. Klein.** 1988. Advances in bioconcentration prediction. *Chemosphere* **17**:1551-1574.
- Sephar, R.L., H.P. Nelson, M.J. Swanson, J.W. Renoos.** 1985. Pentachlorophenol toxicity to amphipods and fathead minnows at different test pH values. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**:389-397.
- Seydel, J.K., K.J. Schaper.** 1979. Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen. Verlag Chemie, Weinheim.
- Sharom, M.S., K.R. Soloman.** 1981. Adsorption-desorption, degradation, and distribution of permethrin in aqueous systems. *J. Agric. Food Chem.* **29**:1122-1125.
- Sijm, D.T.H.M., A. van der Linde.** 1995. Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffuse mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* **29**:2769-2777.
- Spehar, R.L., D.K. Tanner, B.R. Nordling.** 1983. Toxicity of the synthetic pyrethroids, permethrin and AC 222, 705 and their accumulation in early life stages of fathead minnows and snails. *Aquat. Toxicol.* **3**:171-182.
- Stagg, R.M., R.F. Addison.** 1995. An inter-laboratory comparison of measurements of ethoxyresorufin o-deethylase activity in dab (limanda limanda) liver. *Mar. Environ. Biol.* **40**:93-108.
- Stegeman, J.J., P.J. Kloepper-Sams.** 1987. Cytochrom P-450 isozymes and mono-oxygenase activity in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.* **71**:87-95.
- Stephenson, R.R.** 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicology to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquat. Toxicol.* **2**:175-185.
- Stephenson, R.R.** 1985. Assessing the hazard of pyrethroid insecticides in the aquatic environment. *Pestic. Sci.* **16**:199-201.
- Stratton, G.W., T.M. Smith.** 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. *Residue Rev.* **97**:93-120.
- Taylor, R., A. Mullailey.** 1994. Conformational properties of pyrethroids. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **8**:135-152.
- Tessier, J.** 1982. Structure, synthesis and physical-chemical properties of Deltamethrin. Roussel Uclaf: Deltamethrin monograph, 37-65.
- Thier, H.P., Frehse, H.** 1986. Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Tomlin, C.** 1994. The pesticide manual, tenth edition, crop protection publications; british crop protection council, 49 Downing St, Farnham, Surrey GU9 7PH, United Kingdom.
- Umweltbundesamt.** 1991. Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. Texte 42/91.
- Umweltbundesamt.** 1997. Jahresbericht. Umweltbundesamt, Berlin.
- Van der Oost, R., H. Heida, A. Opperhuizen, N.P.E. Vermeulen.** 1991. Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**:43-47.
- van Leeuwen, C.J., J.L.M. Hermens.** 1995. *Risk assessment of chemicals: an introduction.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Varian.** 1995. Handbuch MS-MS Toolkit. Varian GmbH, Darmstadt.
- Vijverberg, H.P.M., J. van den Bercken.** 1990. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit. Rev. Toxicol.* **21**:105-126.
- Vijverberg, H.P.M., J.R. de Weille, G.S.F. Ruigt, J. van den Bercken.** 1986. The effect of pyrethroid structure on the interaction with the sodium channel in the nerve membrane. In: *Neuropharmacology and pesticide action.* M.G. Ford, G.G. Lunt, R.C. Reay, P.N.R. Usherwood, VCH Weinheim, 267-285.
- Webster, G.R.B., H. Jin.** 1998. GC-ECD determination of cypermethrin and its major metabolites in soil, elm bark, and litter. *Fresenius J. Anal. Chem.* **360**:573-579.
- Wegman, R.C.C., A.W.M. Hofstee.** 1979. Chlorophenols in surface waters of the Netherlands (1976-1977). *Water Res.* **13**:651-657.
- Weiler, E.W.** 1990. Immunoassay for the quantification of low molecular weight compounds in plants. In: *Chemistry of Plant Protection.* G. Haug, H. Hoffmann, Springer. 145-220.
- WHO.** 1989. Cypermethrin. Environmental Health Criteria 82. WHO, Genf. ISBN 92 4 154282 9.

WHO. 1990. Deltamethrin. Environmental Health Criteria 97. WHO, Genf. ISBN 92 4 154297 7.

WHO. 1990. Permethrin. Environmental Health Criteria 94, WHO, Genf. ISBN 92 4 154294 2.

Worthing, C.R. 1991. Cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, etofenprox, permethrin, pyrethrins. In: *The pesticide manual*. British Crop Protection Council, Ninth edition.

Wu, Y.S., H.K. Lee, S.F.Y. Li. 1998. Rapid estimation of octanol-water partition coefficients of pesticides by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **19**:1719-1727.

Yasin, M., P.J. Baugh, P. Hancock, G.A. Bonwick, D.H. Davies, R. Armitage. 1995. Synthetic pyrethroid insecticides analysis by gas chromatography / mass spectrometry operated in negative-ion chemical ionisation mode in soil, moss and fish tissue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**:1411-1417.

Yu, S.J. 1990. Liquid chromatographic determination of permethrin esterase activity in six phytophagous and entomophagous insects. *Pestic. Biochem. Physiol.* **36**:237-241.

Zhao, Y.-H., X. Yuan, L.-H. Yang, L.-S. Wang. 1996. Quantitative structure-activity relationships of organic acids and bases. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**:242-249.

Zhou, J.L., S. Rowland, R.F.C. Mantoura. 1995. Partition of synthetic pyrethroid insecticides between dissolved and particulate phases. *Water Res.* **29**:1023-1031.

Zitko, V., W.G. Carson, C.D. Metcalfe. 1977. Toxicity of pyrethroids to juvenile atlantic salmon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **18**:35-41.

Zitko, V., D.W. McLeese, W.G. Carson, C.D. Metcalfe. 1979. Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **21**:338-343.

Zitko, V., D.W. McLeese, C.D. Metcalfe. 1980. Lethality of permethrin, cypermethrin and fenvalerate to salmon, lobster and shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **25**:950-955.

Zöllner, N., K. Kirsch. 1962. Zitiert nach: E. Merck (1974). *Z. Gesamte Exp. Med.* **135**:545.

6. Material und Methoden

6.1 Geräte

Aquarien: 20 l, 30 l und 200 l Vollglasbecken, Eigenbau

Peristaltikpumpen: Braun Infusomat, *B. Braun Melsungen*, Peristaltic Pump P-3, *LKB Pharmacia*, 2132 Micro Perpex Peristaltic Pump, *LKB Pharmacia*, ISMATEK VP, *Ismatek*

3-Kanal Schreiber L 6510, *Linseis*

pH-Meter pH 530, *WTW* mit pH-Elektrode InLab[®] 420, *Mettler Toledo*

Sauerstoffmeßgerät Oximeter OXI 191, *WTW*, mit Sauerstoffelektrode EO 190-1,5, *WTW*

Temperaturmeßgerät, *Greisinger*

IKA Rührmotor RE 16, *IKA*

Heizrührer Haake E 3 mit 2050 Watt, *Haake* und IKAMAG RCT, *IKA*

Messerhomogenisator HO 4, *Bühler*

Schüttler IKA-VIBRAX-VXR mit Aufsatz VX 5, *IKA*

Eindampfgerät: Reacti-Therm Heating Module, *PIERCE*

Rüttler REAX 2000, *Heidolph* und MS1 Minishaker, *IKA*

Spektralphotometer, *Dr. Lange*

Rotationsverdampfer

Eindampfgerät: PIERCE Reacti-Therm Heating Module

Mini-Diazomethangenrator *Aldrich*

Perkin-Elmer Fluoreszenz-Spektrometer LS-5

Cryovials, *Nunc*

Potter-Homogenisator: Teflonkolben, rund mit Glasgefäß 15 ml, 800 Upm, *Bühler*

Ultrazentrifuge, *Beckmann*, Rotor TFT 70 min 1 h bei 4 °C vorkühlen

Hitachi Photometer

Vortexer, *Ika* bzw. *Heidolph*

Zentrifuge für Eppendorfcaps, *Eppendorf* und *Haereus*, *Haereus*

6.2 Chemikalien

1-Methyl-3-nitro-nitrosoguanidin, *Aldrich*

2-Phenoxybenzoesäure [2PBA] *Aldrich*

3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure [Cl₂CA] *Dr. Ehrensdorfer*, als Lösung der cis- und trans Isomeren in Methanol (je 10 µg/ ml), oder als Feststoff, Spende der Firma *Bayer*

3-Phenoxybenzoesäure [3PBA] *Aldrich*
4-Fluor-3-phenoxybenzoesäure [4F3PBA], Spende der Firma *Bayer*
5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol [Irgasan DP 300, Triclosan], Spende der Firma *Ciba-Geigy*
7,5 mol Natronlauge p.a., *Riedel-de-Haën*, zwei mal mit Toluol ausgeschüttelt
7-Ethoxyresorufin, O⁷-Ethyl-3-H-phenoxazin-3-on, *Fluka*
Bifenthrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Permethrin, *Dr. Ehrensdorfer*
Borsäure, *Fluka*
cis-3-(2,2-Dibromvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonsäure [Br₂CA] *Dr. Ehrensdorfer*,
als Lösung in Methanol (10 µg/ ml)
di-Natriumhydrogenphosphat oder mit 12 H₂O, *Fluka*
Dowex Ionentauscher, 50-100 Typ 1x4p.A., *Fluka*
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, *Merck*
Glycerin, *Merck*
Kaliumchlorid, *Fluka*
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a., *Fluka*
Kaliumhydrogenphosphat, *Fluka*
Kaliumnatriumtartrat • 4 H₂O, *Merck*
Kieselgel 60 (0,040 -0,063 nm; 230-400 mesh), *Merck*
Kupfersulfat • 5 H₂O, p.a., *Fluka*
Methanol, destilliert über verspiegelte 2 m Kolonne
NADPH Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, *Fluka*
Natriumcarbonat, wasserfrei, *Merck*
Natriumhydroxid, p.a., *Riedel-de-Haën*
n-Hexan, 2-Propanol, Toluol, Aceton, zur Pestizidrückstandsanalytik, *Scharlau*
o-Phosphorsäure 85 % zur Analyse, *Riedel-de-Haën*
Resorufin, 7-Hydroxy-3-H-phenoxazin-3-on Natriumsalz, *Fluka*
Rinderserumalbumin (BSA, RSA), *Serva*
Salzsäure, 37 % p.a., *Fluka*
Schwefelsäure 95 - 97 %, p.a., *Scharlau*
Speiseöl, *Livio*[®]
Tetramin[®] Flockenfutter für Zierfische, *Tetra Werke*
Triethylsulfoniumjodid 98+ %, *Johnson Matthey Alfa Products*
Vanillin, *Fluka*
Wasser, zweifach destilliert in einer Quarzglasapparatur

6.3 GC-ECD

Gaschromatograph Simens Sichromat mit Autosampller 200, Elektroneneinfangdetektor ^{63}Ni Spülgas Stickstoff 4.6, Split mit Plotter Shimadzu C-R1A.

Gaschromatograph Varian 3700 mit Autosampller 8000 und Elektroneneinfangdetektor ^{63}Ni Spülgas Stickstoff 4.6, und Wasserstoff 3.0 als Trägergas.

6.4 GC-MS-MS

Gaschromatograph Varian Star 3400 CX, SPI 1093 Temperaturprogrammierbarer Injektor, Septumspülung 5 ml/min, Hochleistungsliner, Kapillarsäule HP-5-MS, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 μm Filmdicke), Helium 5.0 (1 ml/min), Autosampller Varian 8200, Iontrap Varian Saturn 3 mit Waveboard (MSⁿ) und Datensystem Saturn V 5.1.

6.5 Triclosan

6.5.1 Fische

Als Testfische wurden unbehandelte Zebrabärblinge (*brachydanio rerio*) – ca. 3 - 6 Monate alt, 0,1 - 0,25 g schwer und 2 - 3 cm lang – aus dem Aquariumhandel bezogen, bei 20 °C in einem 200 l Aquarium unter Durchflußbedingungen (250 ml/min) gehältert und täglich mit Tetramin[®] Flockenfutter für Zierfische gefüttert.

6.5.2 Wasser, Einstellen des pH-Wertes

Als Testwasser wurde temperiertes Leitungswasser mit einem pH-Wert von ~ 8 verwendet. Für die pH-Werte 6, 7 und 9 wurden Puffer verwendet (pH 6 HCl / KH_2PO_4 , pH 7 NaOH / KH_2PO_4 und pH 9 NaOH / H_3BO_3), die mittels zweier Peristaltikpumpen kontinuierlich eingeleitet wurden (Abbildung 54). Durch stufenweise Erhöhung der Fördermenge wurden die Fische innerhalb einer Woche an den entsprechenden pH-Wert adaptiert.

Die Pufferstammlösungen wurden selbst hergestellt: 0.5 mol/l HCl, 1 mol/l NaOH, 1 mol/l KH_2PO_4 , 0.5 mol/l H_3BO_3 . Zur Einstellung der pH-Werte wurden bei einem Wasserdurchfluß von 250 ml/min = 15 l/h ca. folgende Volumina gebraucht:

Tabelle 17: Volumina Pufferstammlösungen zur pH-Einstellung für 15 l Leitungswasser.

<i>pH-Wert</i>	<i>HCl^{a)}</i> [ml]	<i>NaOH^{b)}</i> [ml]	<i>KH₂PO₄^{c)}</i> [ml]	<i>H₃BO₃^{d)}</i> [ml]
6	35	-	18	-
7	-	2	14	-
9	-	9	-	14

a) 0.5 mol/l, b) 1 mol/l, c) 1 mol/l, d) 0.5 mol/l.

6.5.3 Aufbau der Versuchsanlage Triclosan

Die Versuchsanlage bestand gemäß den OECD-Richtlinien für Durchflußanlagen (OECD No. 305 E) aus zwei unter Durchfluß stehenden 30 l fassenden Vollglasbecken (Akkumulations- und Eliminationsbecken) mit Rührer, einer Wasserversorgung, drei Peristaltikpumpen zur Chemikalieneinleitung und pH-Pufferung sowie Meßgeräten zur Aufzeichnung der Temperatur-, pH- sowie Sauerstoffwerte (Abbildung 54 und Abbildung 9). Die Wassertemperatur wurde bei 20 °C gehalten, der Tag-Nacht Rythmus war 10/14 h. Der Durchfluß betrug 250 ml/min und wurde durch die Höhendifferenz zwischen Niveau des Wasservorratsbehälters und des Wassereinlaufs (Glastrichter) in das Eliminationsbecken reguliert.

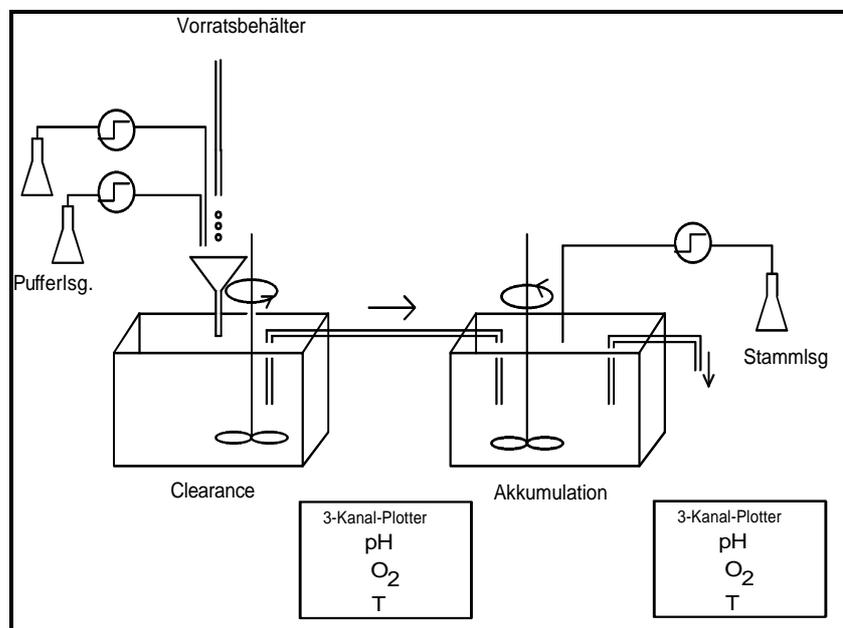


Abbildung 54: Schematischer Versuchsaufbau Bioakkumulation im Durchfluß mit pH-Wert-Einstellung des Wassers durch Pufferlösungen

6.5.4 Versuchsverlauf Bioakkumulation Triclosan

Vor jedem Versuch wurden die Zebrabärblinge an den pH-Wert adaptiert. Die Adaption erfolgte im Eliminationsbecken. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Akkumulationsbecken mit 50 µg/l Triclosan äquilibriert, indem 12,5 ml (für 25 l Leitungswasser) der Stammlösung Triclosan (100 mg/l in Methanol) zugegeben und dann mit dem Durchfluß der Stammlösung begonnen wurde. Zu Versuchsbeginn wurden die Fische in das Akkumulationsbecken umgesetzt und mit der Probennahme begonnen. Eine Probennahme bestand aus drei bis vier Fischproben à 2 Fischen und aus zwei Wasserproben à 100 ml. Die Länge und das Gewicht der Fische wurde bestimmt, die Fischproben wurden bis zur Aufarbeitung bei -20 °C tiefgefroren und die Wasserproben bei 4 °C gelagert. Nach dem Ende der Akkumulationsphase wurde der größte Teil der Fische in das Eliminationsbecken umgesetzt, ein Teil verblieb im Akkumulationsbecken mit weiterer Chemikalienzufuhr zur verlängerten Akkumulation. Die Fische wurden täglich gefüttert. Die Zeitpunkte der Probenahmen sind in den beiden folgenden Tabellen zu sehen:

Tabelle 18: Probennahmezeitpunkte in Stunden für die Bioakkumulation von Triclosan bei variierenden pH-Werten des Wassers.

<i>pH-Wert</i>	<i>Probennahme</i>	
	<i>Akkumulation [h]</i>	<i>Elimination [h]</i>
6	0,5, 1, 1,5, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72	0,5, 1, 1,5, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 144, 168
7	3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 144	3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120
8	6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 144, 192, 240	6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 144, 192, 240
9	12, 24, 36, 48, 72, 120, 218, 230, 252, 280	12, 24, 48, 96, 168, 192, 240

Tabelle 19: Probennahmezeitpunkte in Stunden für die verlängerte Bioakkumulation von Triclosan bei variierenden pH-Werten des Wassers.

<i>pH-Wert</i>	<i>Probennahme</i>
	<i>Verlängerte Akkumulation [h]</i>
6	96, 120, 144, 196
7	192, 240, 264
8	288, 336, 384, 432, 480
9	408, 504, 552

6.5.5 Triclosan-Wasser

Aus einer Stammlösung von Triclosan (100 mg/l in Methanol) wurden 0,125 ml/min mittels einer Peristaltikpumpe und unter Verwendung von Silikonschläuchen direkt am Rührer in das Akkumulationsbecken eingeleitet. Der Rührkopf wurde mit Gummihütchen versehen, um die Fische nicht zu verletzen. Der Ausfluß erfolgte über einen Aktivkohlefilter in die Kläranlage.

6.5.6 Aufarbeitung der Fischproben Triclosan

Die gefrorene Fischprobe wurde in einem 25 ml Pürrierkolben gegeben und mit 20 ml HIP 3:2 (n-Hexan : 2-Propanol), 100 µl konz. Schwefelsäure und 1000 µl Pentachlorphenol (5 mg/l in Toluol) als internem Standard versetzt und 5 min bei 2500 U/min homogenisiert. Der Überstand wurde in ein 25 ml Zentrifugenglas abdekantiert und der Rückstand ein zweites Mal mit 20 ml HIP 3:2 homogenisiert. Der Inhalt des Pürrierkolbens wurde vollständig in ein zweites Zentrifugenglas überführt und mit HIP gegen das erste Zentrifugenglas austariert. Dann wurden beide Extrakte 10 min bei 4000 U/min und 20 °C zentrifugiert. Die HIP-Extrakte wurden in einem 50 ml-Meßkolben vereinigt, mit HIP 7:2 bis zur Marke aufgefüllt und geschüttelt. Bis zur weiteren Bestimmung wurden die Meßkolben im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

6.5.7 Bestimmung des Triclosan-Gehaltes im Fisch

2 ml bzw. 4 ml des HIP-Extraktes wurden mit 2 ml 0,5 mol/l Natronlauge 5 min in einem Reagenzglas gerührt. Die organische Phase wurde verworfen, die wäßrige Phase mit 100 µl konz. Salzsäure angesäuert, mit 2 ml Toluol versetzt und 5 min gerührt. 1 ml der organischen Phase wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap gegeben, mit 200 µl TESH (0,5 mol/l) versetzt und 30 s geschüttelt. Dann wurde 3 min bei 13 000 U/min zentrifugiert und 150 µl der unteren wäßrigen Phase zur Gaschromatographie verwendet. Kalibriert wurde gegen 100, 200, 500, 750, 1000, 2000 und 5000 µg/l Lösungen, die 100 µg/l Pentachlorphenol als internen Standard enthielten.

6.5.8 Bestimmung des Triclosan-Gehaltes im Wasser

40 ml der Wasserprobe wurden in einen 50 ml Spitzkolben gegeben, mit 100 µl konz. Salzsäure angesäuert, mit 1950 µl Toluol und 50 µl Pentachlorphenol (5 mg/l in Toluol) als internem Standard versetzt. Dann wurde 10 min bei 600 U/min geschüttelt, kurz stehengelassen und mit Leitungswasser aufgefüllt. 1 ml der Toluolphase wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap überführt, mit 200 µl TESH (0,5 mol/l) versetzt und 30 s geschüttelt. Dann wurde 3 min bei 13 000 U/min zentrifugiert und 150 µl der unteren wäßrigen Phase zur Gaschromatographie verwendet. Kalibriert wurde gegen 0,6, 0,8,

1,0, 1,2 und 1,4 mg/l Triclosanlösungen, die 125 µg/l Pentachlorphenol als internen Standard enthielten.

6.5.9 Bestimmung des Triclosan-Gehaltes im Fischfutter

1 g Tetramin[®] Flockenfutter für Zierfische wurde wie eine Fischprobe aufgearbeitet. Es war kein Triclosan nachweisbar.

6.5.10 Darstellung von 0,1 mol/l Triethylsulfoniumhydroxid (TESH)

1,23 g (5 mmol) Triethylsulfoniumjodid (TESJ) wurden in 25 ml bidest. Wasser gelöst und auf eine regenerierte Ionenaustauschersäule (75 g Dowex 50 - 100 Type 1*4 p.a.) gegeben.

Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf ca. 2 Tropfen/s eingestellt und das Eluat solange verworfen, bis sich ein pH-Wert > 12 eingestellt hatte. Nun wurde das Eluat in einem 25 ml Meßkolben aufgefangen und mit der gleichen Menge bidest. Wasser verdünnt und in eine dunkle 100 ml Steilbrustflasche umgefüllt, die stets im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

Zum Regenerieren wurde die Ionenaustauschersäule mit 2 mol/l Natronlauge halogenfrei gewaschen (Silbernitrat-Nachweis). War dies nicht der Fall, so mußte der Ionentauscher erneuert werden. Dazu wusch man ca. 80 g Ionentauscher in einem Sieb mit der Maschenweite 0,063, Material kleiner als 0,063 mm wurde ausgewaschen. Das Material wurde in eine Chromatographiesäule (40 * 300 mm) gefüllt und mit 2 mol/l Natronlauge halogenfrei gewaschen.

6.5.11 GC-Parameter Triclosan

Säule DB-17 (Rt_x-50 halbpolar) 25 m, Trägergas Wasserstoff 3.0, Injektortemperatur 190 °C, Detektortemperatur 310 °C, Split, Temperaturprogramm: 150 °C, mit 10 °C/min auf 260 °C, 10 min, Injektionsvolumen 2 µl.

6.5.12 Fettbestimmung

Der Gesamtfettgehalt der Fische wurde photometrisch als Sulfophosphovanilinkomplex nach Aufschluß mit Schwefelsäure bei $\lambda = 546$ nm bestimmt.

Vanillin-Phosphorsäure: In einem 500 ml Meßkolben wurden 0,6085 g Vanillin mit wenig Wasser eingewogen, und 678,3 g o-Phosphorsäure 85 % zugewogen, über Nacht unter Lichtausschluß gerührt und mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Dies ergab 8 mmol/l Vanillin in 11,9 mol/l Phosphorsäure.

Ein Aliquot des HIP-Extraktes (500 µl) wurden in ein Reagenzglas gegeben und im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, mit 1 ml konz. Schwefelsäure versetzt,

kurz geschüttelt, mit einer Glaskugel verschlossen und 10 min auf dem Wasserbad auf 100 °C erhitzt. Von der auf Raumtemperatur abgekühlten Probe wurden 50 µl in ein zweites Reagenzglas abpipettiert und mit 1 ml der Vanillin-Phosphorsäure versetzt und kurz geschüttelt. Nach 30 min wurde die Extinktion gegen eine Hg-Lampe bei $\lambda = 546$ nm gemessen. 500 µl HIP 3:2 wurden als Reagenzienblindwert eingesetzt. Kalibriert wurde gegen eine Lösung von Speiseöl in HIP (50 mg Fett/ 100 ml HIP). Aus dieser Lösung wurden 100, 200, 300, 400 und 600 µl (= 50, 100, 150, 200, 300 µg Fett absolut) aufgearbeitet.

6.5.13 Wiederfindungsraten Triclosan

Für die Bestimmung von Triclosan in den Fisch- und Wasserproben wurden Wiederfindungsfaktoren bestimmt, indem Fischproben unbehandelter Zebraabräbblinge bzw. Leitungswasserproben mit Triclosan dotiert wurden und die gemessenen Konzentrationen mit den entsprechenden Kalibrierpunkten verglichen wurden.

Um die Wiederfindungsrate bei der Fischprobenaufarbeitung zu bestimmen, wurden jeweils fünf Fischproben so mit Triclosan und internem Standard (PCP) dotiert, daß sich eine zu messende Konzentration von 1 mg/l ergab. Parallel wurden zwei "Leerfischproben" ohne Triclosan aufgearbeitet. Es ergab sich eine Wiederfindungsrate von 168 %.

Die Wiederfindungsrate für die Wasserproben wurde ermittelt, indem fünf Leitungswasserproben mit Konzentrationen von 50 µg/l Triclosan und der entsprechenden Menge internem Standard versetzt und neben zwei Wasserproben ohne Triclosan aufgearbeitet wurden. Die Wiederfindungsrate betrug 93 %.

6.6 Pyrethroide

6.6.1 Fische

Als Testfische wurden unbehandelte Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus eigener - Ahrensburger - Zucht eingesetzt, Alter 5 - 7 Monate, Länge 5 - 7,5 cm, Gewicht 1,5 - 3,5 g.

EROD-Aktivität: Es wurden Regenbogenforellen aus Ahrensburger Zucht der Länge 15 - 20 cm, 25 - 45 g und einem Alter von 1 - 1,5 Jahren eingesetzt.

6.6.2 Wasser

Als Testwasser wurde Ahrensburger Brunnenwasser aus dem eigenen Brunnen verwendet, enteist und belüftet. Die typischen Werte lagen bei pH 7,2, Ammonium

0,06 mg/l, Nitrit 0,01 mg/l, Nitrat 1,79 mg/l, Mangan(II) 0,1 mg/l, Eisen(II) 0,02 mg/l und einem Härtegrad von rund 10 °dH, die Wassertemperatur betrug zwischen 11 bis 12 °C und wurden durch eine äußere Wasserkühlung konstant gehalten.

6.6.3 Aufbau der Versuchsanlage Pyrethroide

Die Versuchsanlage zur Untersuchung der Bioakkumulation und Toxizität von Pyrethroiden in Forellen wurde anhand der OECD Vorschriften 305E für Durchflußversuche in der Außenstelle Ahrensburg des Instituts für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei aufgebaut. Zwei je 15 l fassende Vollglasbecken und ein Niveauequalsbecken wurden mit Glasbrücken (mit Netzensperren) bestückt, der Wasserzufluß wurde über die Höhendifferenz reguliert und auf 10 l/h eingestellt (Abbildung 54, Seite 99 und Abbildung 30, Seite 49). Der Tag/Nacht Rhythmus der Beleuchtung betrug 14/10 h. Die Becken wurden belüftet. Die Pyrethroide wurden in Methanol gelöst, in braune Glasflaschen gefüllt und mittels einer Peristaltikpumpe und unter Verwendung von Silikonschläuchen mit 20 ml/h in die Akkumulationsbecken eingeleitet. Während der Akkumulation wurden die Regenbogenforellen in Wasser mit 0,5 – 5 µg/l je nach Pyrethroid gehalten. Aufgrund der langen Versuchsdauer von einheitlich 96 Stunden für die Akkumulationsphase wurden die Fische täglich wenig gefüttert, die Becken wurden daher regelmäßig von Rückständen gesäubert. Die Clearancephase wurde durch den Transfer der meisten Fische in das Clearancebecken mit reinem Wasser gestartet. In bestimmten Zeitabständen wurden Fisch- und Wasserproben genommen, um die Kinetik der Akkumulation und Clearance zu verfolgen.

6.6.4 Beschreibung Probennahme Fische

Fischprobe: Die Fische wurden zum Zeitpunkt der Probenahme mittels eines Käschers aus dem Becken genommen und durch einen Schlag auf den Kopf bzw. auf die Tischkante getötet. Die Länge und das Gewicht wurden notiert und je zwei Fische pro Probe in einem Glasgefäß bei –20 °C eingefroren.

6.6.5 Beschreibung Probennahme Wasser

Wasserprobe: Zwei Liter Wasser aus dem Akkumulationsbecken wurden in braune 2,5 l Flaschen abgefüllt, sofort mit 50 ml Hexan versetzt und 30 s kräftig geschüttelt. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung im Kühlraum gelagert.

6.6.6 Pyrethroide im Wasser

Die gekühlte Wasserprobe wurde mit internem Standard versetzt (Bifenthrin in Methanol), geschüttelt und die organische Phase abgetrennt. Dann wurde mehrfach mit Hexan extrahiert (1 x 100 ml, 2 x 50 ml) und die Probenflasche sowie der Schütteltrichter mit Hexan ausgespült (je 25 ml). Die Hexanphasen wurden kombiniert, mit Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Danach wurde mit 1 ml Hexan aufgenommen, in ein 1,5 ml Pierce-Gefäß überführt, im Stickstoffstrom eingengt und mit 200 µl Toluol aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Gehaltsbestimmung mittels GC-ECD bei - 20 °C aufbewahrt.

6.6.7 Pyrethroide im Fisch

Die gefrorene Fischprobe wurde mit internem Standard versetzt und mit 20 ml Hexan / 2-Propanol 3:2 (HIP 3:2) 5 min mit 25 000 U/min homogenisiert, nach dem Absetzen wurde der Überstand in ein Zentrifugenglas abgegossen und nochmal 5 min mit 20 ml HIP 3:2 homogenisiert. Das Homogenisat wurde vollständig in ein zweites Zentrifugenglas gegeben, und die Extrakte 10 min mit 4000 U/min bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 50 ml Meßkolben vereinigt und mit HIP 7:2 auf 50 ml aufgefüllt. Der HIP-Extrakt wurde im Kühlraum bei 8 °C gelagert.

20 ml des HIP-Extraktes wurden in einen 25 ml-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Hexan aufgenommen.

Säulenchromatographie: Eine Chromatographiesäule wurde mit Sand, 5 g Kieselgel 60 (Korngröße 0,040 - 0,063 nm), Sand und Natriumsulfat präpariert. Der Hexan-Extrakt wurde vollständig auf die Säule gegeben und mehrmals mit wenig Hexan nachgespült. Man ließ ein Säulenvolumen durchlaufen, dann wurde erst mit 15 ml Hexan und anschließend mit 9 ml Diethylether/Hexan (5+95) gewaschen. Die Pyrethroide wurden dann mit Diethylether/Hexan (5+95) eluiert, für Permethrin waren 20 ml, Deltamethrin 40 ml, Cypermethrin 60 ml und Cyfluthrin 60 ml nötig. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer eben bis zur Trockene eingengt und mit Toluol aufgenommen. Der Gehalt an Pyrethroiden wurde mittels GC-ECD bestimmt.

6.6.8 GC-Parameter für Pyrethroide

GC-Parameter: Säule DB-5 (95 % Methyl, 5 % Phenyl) 30 m x 0,25 mm ID, 0,25µm Filmdicke, Trägergas Wasserstoff 3.0, Injektortemperatur 280 °C, Detektortemperatur 310 °C, Split, Temperaturprogramm: 60 °C (2 min), mit 8 °C pro min auf 280 °C (15 min), 1-2 µl Injektionsvolumen.

6.6.9 Wiederfindungsraten Pyrethroide

Wasser Deltamethrin 107 %, Cyfluthrin 112 %, Cypermethrin 112 %, Permethrin 327 %, die Wiederfindung im Fisch betrug 39 %.

6.7 Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und Bio-konzentrationsfaktoren (BCF's) sowie von Halbwertszeiten

Unter Annahme eines Zweikompartimentmodells und der sich daraus ergebenden Gleichungen wurden mit Hilfe nichtlinearer Regressionen (Gauß-Newton Iteration) die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 für Aufnahme und Abgabe berechnet. Dazu wurde das BASIC-Programm "Biokonz" verwendet (Butte und Blum 1984, Butte 1991). Aus diesen ließen sich die Biokonzentrationsfaktoren errechnen. Unter Verwendung der Gleichungen für das Zweikompartimentmodell und den erhaltenen Parametern k_1 und k_2 wurden dann Akkumulationskurven mit Hilfe des Grafikprogramms Microcal Origin® (Origin 1997) eingezeichnet. Zum Vergleich wurden nach (Gl. 24)

$$BCF_{ss} = \frac{c_f}{c_w} \quad (\text{Gl. 24})$$

c_f : Konzentration der Testsubstanz im Fisch (bei steady state)

c_w : Konzentration der Testsubstanz im Wasser

zusätzlich Gleichgewichtsbiokonzentrationsfaktoren (steady state BCF_{ss}) aus den verlängerten Aufnahmephasen bestimmt. Die zugehörigen Daten zu den Fischversuchen finden sich im Anhang.

Die Biologischen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ wurden nach Gleichung (Gl. 7) berechnet.

6.8 Pyrethroid-Metaboliten

6.8.1 Darstellung von Diazomethan in Toluol

800-1000 mg 1-Methyl-3-nitro-nitrosoguanidin (MNNG) wurden in das Innenröhrchen des Diazomethangenerators gefüllt und in 1,5 ml Wasser suspendiert. In den Außenbehälter wurden 10 ml Toluol gefüllt. Anschließend wurde die Apparatur zusammengesteckt, mit einer Klemme gesichert und für mindestens 1 Stunde in der Tiefkühltruhe bei - 18 °C gekühlt.

Der Reaktor wurde in ein Eis-Wasserbad gestellt, dann wurde durch das Septum langsam 1 ml einer 7,5 molaren Natronlauge gegeben. Nach ca. 0,5 bis 2 Stunden im Eisbad war die Reaktion beendet. Das im Toluol gelöste Diazomethan wurde in ein Reagenzglas mit Schraubverschluß überführt (evtl. mit Natriumsulfat als Trockenmittel) und konnte im Gefrierfach bei -18 °C aufbewahrt werden. Reste von MNNG wurden mit konzentrierter Salzsäure unschädlich gemacht und in den Säureabfallbehälter

gegeben, Reste von Diazomethan in Toluol wurden in Essigsäure gegeben und in den Abfallbehälter für organische Lösungsmittel entsorgt. Vorsicht, Diazomethan ist explosiv und sowohl Diazomethan als auch seine Vorstufe cancerogen!

6.8.2 Ausgangslösungen Pyrethroid-Metaboliten

Cl₂CA: 100 mg 3PBA wurden in einem 100 ml Meßkolben in Toluol gelöst (1 g/l). Daraus stellte man durch eine 1:100 Verdünnung eine Ausgangslösung von 10 mg/l (= 10 µg/ml) her.

Br₂CA: Als Ausgangslösungen diente die käuflich erhältliche Lösung in Methanol (10 µl/ml).

3PBA: 100 mg 3PBA wurden in einem 100 ml Meßkolben in Toluol gelöst (1 g/l). Daraus stellte man durch eine 1:100 Verdünnung eine Ausgangslösung von 10 mg/l (= 10 µg/ml) her.

4F3PBA: 100 mg 4F3PBA werden in einem 100 ml Meßkolben in Toluol gelöst (1 g/l). Daraus stellte man durch eine 1:100 Verdünnung eine Ausgangslösung von 10 mg/l (= 10 µg/ml) her.

6.8.3 Stammlösungen Pyrethroid-Metaboliten

Cl₂CA, Br₂CA, 4F3PBA und 3PBA: Aus den Ausgangslösungen wurde durch verdünnen mit Aceton Lösungen in den benötigten Konzentrationen hergestellt. Interner Standard (2PBA 1 µg/ml in Aceton): In einem 20 ml Meßkolben wurde Aceton vorgelegt, 20 µl Ausgangslösung hinzugegeben und mit Aceton zur Marke eingestellt.

Die Standardlösungen waren im Eisfach min. ein Jahr haltbar.

6.8.4 Pyrethroid-Metaboliten im Fisch

Die gefrorene Fischprobe wurde mit Aceton/ 0,25 N Salzsäure (1:1) und internem Standard 2PBA versetzt und 2 x mit 25 000 Upm homogenisiert, dann wurde zentrifugiert, abdekantiert und einrotiert, um das Aceton zu entfernen. Es wurde 1 h bei 100 °C im verschlossenen Reagenzglas erhitzt. Dann wurde mit Hexan versetzt, geschüttelt, die organische Phase abgetrennt (Schütteltrichter oder Zentrifuge), mit Natronlauge versetzt und wieder geschüttelt. Die Natronlauge wurde abgenommen und angesäuert, dann wurde wieder mit Hexan ausgeschüttelt, die organische Phase abgenommen und mit Natriumsulfat getrocknet. Ein Teil der Hexanphase wurde im Pierce-Gefäß im Stickstoffstrom vorsichtig bis zur Trockene eingengt und mit 50 µl Diazomethan in Toluol versetzt, mit einem Teflondeckel verschlossen, kurz gevortext und über Nacht bei RT stehen gelassen. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

6.8.5 GC-MS Parameter Pyrethroid-Metaboliten

GC-Parameter:

Temperaturprogramm: 1 min bei 100 °C, dann mit 10 °C/ min auf 270 °C, anschließend mit 50 °C/ min auf 290 °C und 3 min ausheizen. Injektor: Von 100 °C auf 290 °C mit 100 °C min, 2 min halten, Septumspülung: 5 ml/ min, Probenvolumen: 1 – 2 µl

MS-Parameter:

Ionenfalltemperatur 170 °C, EI 70 eV. Filamentstrom, Multiplierspannung und Automatic-Gain-Control Target-Wert wurden mit Autotune gewählt, typische Werte lagen bei Filamentströmen von 10 bis 20 µA, Multiplierspannungen von 2000 V bis 2300 V und AGC-Target-Werten von 65 000.

6.9 EROD

6.9.1 Versuchsdurchführung Aktivität Mischfunktioneller Oxygenasen (EROD-Aktivität)

Zur Untersuchung des Einflusses von Pyrethroiden auf die MFO-Aktivität von Forellenlebern wurden Einzelstoffversuche der untersuchten Pyrethroide Cypermethrin, Cyfluthrin, Deltamethrin und Permethrin in der für die Bioakkumulationsuntersuchungen verwendeten Durchflußanlage durchgeführt.

Es wurden Regenbogenforellen aus Ahrensburger Zucht der Länge 15 - 20 cm, 25 - 45 g und einem Alter von 1 - 1,5 Jahren eingesetzt. Als Wasser wurde Brunnenwasser verwendet (s.o.), die Pyrethroide wurden wie bei den Bioakkumulationsversuchen in Methanol gelöst und mittels einer Peristaltikpumpe und unter Verwendung von Silikonschläuchen in die Becken geleitet und durch den Luftstrom aus einem Luftstein verteilt. Die Becken wurden 24 Stunden mit Wasser und Chemikalienlösung äquilibriert und die Fische zum Versuchsstartzeitpunkt eingesetzt.

6.9.2 Stammlösungen für EROD-Aktivität

7-Ethoxyresorufin (50 µM): 1 mg wurde in 83 ml Methanol p.a. gelöst und in 5 ml Portionen (Stammlösung) in kleinen braunen Glasflaschen im Gefrierschrank aufbewahrt. Jeweils frisch zur Messung wurde 1 ml Stammlösung mit 4 ml Phosphatpuffer versetzt und im Eisbad aufbewahrt.

Resorufin: 2 mg Resorufin wurden in 500 ml gekühltem Phosphatpuffer gelöst (2 Tage) und der Meßkolben mit Alufolie umwickelt bei 4 °C aufbewahrt. Für die Kalibrierfunktion wurde 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt und auf pH 7,4 eingestellt.

NADPH (4,5 µM): 8 mg/ml Phosphatpuffer wurden immer frisch angesetzt für ca. 20 Proben. 2 mg/250 µl Phosphatpuffer wurden im Eppendorfcap angesetzt und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

KCl (0,15 M): 11,18 g/l Kaliumchlorid wurden in bidest. Wasser zum Spülen von Lebern angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4): 11,35 g/l Na₂HPO₄ (wasserfrei, 0,08 M); 2,72 g/l KH₂PO₄ (0,02 M) und 11,18 g/l KCl (0,15 M) wurden im Becherglas in ca. 900 ml bidest. Wasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt (ca. 3,5 – 4 ml) und dann im Meßkolben auf 1 l aufgefüllt und kühl aufbewahrt.

20 % Glycerin-Phosphatpuffer: 20 ml einer 87 % Glycerinlösung wurden mit 67 ml Phosphatpuffer gemischt.

6.9.3 Berücksichtigung der Reinheit des Resorufin-Standards

Der Reinheitsgrad von kommerziell erhältlichem Resorufin variiert in Abhängigkeit vom Hersteller, der Charge und von den Lagerbedingungen erheblich. Da dies direkten Einfluß auf die Höhe der gemessenen EROD-Aktivitäten hat, muß der Reinheitsgrad des für die Kalibrierung verwendete Resorufin berücksichtigt werden. Reines Resorufin hat in 0,1 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 8 ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 572 \text{ nm}$ mit einer molaren Absorption von $73,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Zur Berechnung der Konzentration wurde folgende Gleichung verwendet: $A = \epsilon KL$ mit

A= Absorption bei 578 nm,

ϵ = Extinktionskoeffizient ($0,0732 \text{ } \mu\text{m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in Phosphatpuffer, pH 8),

K= Konzentration,

L= Küvettenlänge (1 cm).

Beispielrechnung: Für Resorufin von Fluka ergab sich am 13.3.98 eine Absorption von 0,856 bei 578 nm. Daraus ergab sich eine Konzentration von $11,69 \text{ } \mu\text{m}$ (Soll bei 4 mg/l $16,93 \text{ } \mu\text{m}$), d.h. Faktor 0,69 bzw. 1,448. Die Absorption bei 100 % Reinheit des Resorufins beträgt $0,0732 \times 16,93 = 1,239$. Das für die EROD-Messung verwendete Resorufin hatte einen Gehalt von $1,7 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ($\mu\text{m/l}$).

Erstellung der Resorufin-Kalibriergeraden: Von der Stammlösung wurden in Reagenzgläsern unterschiedliche Volumina (10, 20, 50, 100, 200, 300 μl , Doppelbestimmungen) mit Phosphatpuffer auf 2000 μl aufgefüllt, gemixt und dann gemessen. Der digitale Meßwert wurde notiert. Die Kalibriergerade ergibt sich aus dem Pipetervolumen (umgerechnet in pmol Resorufin, vorher Reinheit von Resorufin bestimmen, s.o.) und den gemittelten Meßwerten durch lineare Regression. Die Aufzeichnung auf einem XY-Schreiber ist ebenfalls möglich, Papiervorschub 50 – 60 mm/min. Für die Forellenlebern ergab sich eine Kalibrierwert von $1 \text{ } \mu\text{l}$ Resorufin = $1,7 \text{ pmol}$.

6.9.4 Durchführung der EROD-Messung

Probennahme: Nach Versuchsende wurden Fische einzeln mit einem Schlag auf den Kopf betäubt, Gewicht (Naßgewicht) und Länge notiert und die Leber sofort auf Eis herauspräpariert. Bei der Präparation der Leber wurde versucht, jede Beschädigung der Gallenblase zu vermeiden. Wenn nicht sicher war, ob bei der Präparation die Gallenblase verletzt wurde, wurde die Leber mit kalter 0,15 M Kaliumchloridlösung gespült und anschließend abgetupft. Die Lebern wurden gewogen und einzeln im Cryovial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Lebergewicht und das Schlachtgewicht (ohne Innereien) wurden notiert. Da eine direkt anschließende Aufarbeitung nicht

möglich war, wurden die Leberproben einzeln in Cryovials (1,8 ml) verpackt und zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Größere Lebern (>1 g) wurden vorher 3 - 4 mal geteilt, um eine optimale Schockgefrierung zu gewährleisten. Bei allen folgenden Aufarbeitungsschritten wurde bis zur Messung darauf geachtet, daß die Proben immer auf Eis gekühlt wurden.

Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Lebern wurden schonend auf Eis aufgetaut, gewogen und sofort weiterverarbeitet.

Homogenisieren der Leber: Homogenisationsgläser wurden mit 7 ml Phosphat-Puffer gefüllt und auf Eis gestellt. Das Homogenisieren erfolgte im Eisbad (Eis + H₂O). Das Homogenisat durfte sich dabei nicht auf Temperaturen über 4 °C erwärmen. Die Homogenisation ist einer der entscheidenden Aufarbeitungsschritte. Sie muß immer in gleicher Weise erfolgen, d.h. durch z.B. fünfmaliges Eintauchen des Teflonkolbens. Auf gar keinen Fall darf zu lange homogenisiert werden, da durch die zwangsläufige Erwärmung die Enzyme teilweise oder vollständig zerstört werden (800 Upm, 5 mal). Zwischen den einzelnen Proben wurde der Teflonkolben abgewischt. Das gesamte Leberhomogenat wurde in die Zentrifugengläser gegeben, mit Phosphatpuffer incl. Deckel auf gleiches Gewicht (7,5 g) eingestellt und der Rotor bestückt.

1. Zentrifugation: 10 000 g, 20 min, 4 °C, Rotor mindestens 1 h bei 4 °C vorgekühlt.

Entfernen der groben Zelltrümmer: Die Fettschicht wurde abgesaugt, der Überstand in Zentrifugengläser dekantiert. Lag ein weiches Pellet vor, wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette (Spitze abgebrochen) vorsichtig abgesaugt. Die Zentrifugengläser wurden wiederum mit Phosphatpuffer auf gleiches Gewicht eingestellt und in den Rotor gestellt.

2. Zentrifugation: 105 000 g, 60 min, 4 °C.

Mikrosomenfraktion abfüllen: Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen (dekantiert!). Die Zentrifugenröhrchen mit dem Pellet wurden mit 5 ml 20 % Glycerin-Phosphatpuffer gefüllt und das Pellet mit einer Pasteurpipette (Spitze abgebrochen) unter Druck abgespült und gepottert (5 x 800 Upm). Die Mikrosomenfraktion wurde kurz gevortext, 250 µl für die Proteinbestimmung nach Lowry abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die Probe wurde bis zur Messung auf Eis aufbewahrt. Die restliche Mikrosomenfraktion wurde nun auf EROD-Aktivität gemessen.

Fluoreszenzmessung: Die Messung am Perkin Elmer Fluoreszenz-Spektralphotometer LS-5 erfolgte bei einer Excitationswellenlänge von 530 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 586 nm. Die Messung wurde im abgedunkelten Raum durchgeführt (kein direktes Tageslicht) und bei 20 °C in einer 2 ml Quarzglasküvette,

die Lösungen waren alle gekühlt und standen bis zur Messung auf Eis, der Inhalt der Küvette erwärmte sich schnell genug.

Zur Überprüfung der Gerätefunktion und der angesetzten Lösungen wurde ein Vorlauf mit 1790 µl Phosphatpuffer, 200 µl Substrat und 10 µl NADPH-Lösung (für eine 2000 µl Glasküvette) durchgeführt. Für die eigentliche Messung wurden in die Glasküvette folgende Lösungen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert: 1790 µl Phosphatpuffer (4 °C), 150 µl Substrat (7-Ethoxyresorufin), 50 µl Probe, 10 µl NADPH-Lösung.

Die Probe wurde gemischt (mit einer 1000 µl-Pipette einige Male gepumpt; es wurde eine Küvette mit Magnetrührer verwendet), der Schreibervorschub eingeschaltet (Aufnahme per Computer) und die Fluoreszenzintensität etwas länger als eine Minute aufgezeichnet.

Die EROD-Aktivität wurde nach folgendem Verfahren berechnet:

$$\text{EROD-Meßwert (slope)} \times \text{Kalibriergerade (slope, hier 20)} \times \text{Kalibrierlösung (1 µl Resorufin = 1,7 pmol)} \times 60 \text{ s} = X \text{ pmol/min}$$

Es wurden 50 µl der Mikrosomenfraktion in der EROD-Messung eingesetzt:

$$X \text{ pmol/min} \times 20 : \text{Proteingehalt der Probe (mg Protein/ml mikrosomaler Fraktion)} = \text{pmol Resorufin/mg mikros. Protein/min.}$$

Berechnung der Meßwerte : EROD-Meßwert / Proteingehalt * (20*20*1,7*60 = 40800)]

6.9.5 Proteinbestimmung nach Lowry (Folin-Ciocalteu), modifiziert

Lösungen

A: 2 % Kalium-Natriumtartratlösung

B: 1 % Kupfer(II)sulfatpentahydrat

C: 2 % Natriumcarbonat (wasserfrei) in 0,1 M Natronlauge

Durchführung: 200 µl Probe (je nach Gehalt verdünnt, meist 10 µl + 190 µl bidest. Wasser) wurden mit 1 ml Lowry-Reagenz [1 Teil A + 1 Teil B + 100 Teile C] versetzt, kurz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion wurde eine Rinderserumalbuminlösung (BSA), 1 mg/l in 0,4 M Natronlauge bzw. bidest. Wasser) verwendet:

Kalibrierreihe [mg/l]	Blindwert	25	50	100	200	300	500
µl BSA-Stammlsg.	0	5	10	20	40	60	100
µl Wasser	200	195	190	180	160	140	100

Zu jeder Probe und den Kalibrierproben wurden 100 µl Folinreagenz (1:1 mit bidest. Wasser verdünnt) hinzugefügt, kurz gevortext und 30 min inkubiert. Dann wurde die Extinktion bei $\lambda = 750 \text{ nm}$ gemessen.

7. Anhang

7.1 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Triclosan bei pH 6 in Zebrabärblingen

Tabelle 20: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebrabärblingen bei pH 6. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 35,95 \mu\text{g/l}$

ZEIT (h)	KONZ. (GEMESSEN) (mg/kg)	KONZ. (BERECHNET) (mg/kg)
0,5	16,55	0,02
1,0	19,61	0,75
1,5	29,66	1,95
3,0	5,43	33,84
6,0	84,25	67,94
12,0	138,70	133,77
24,0	237,94	240,98
36,0	225,66	276,03
48,0	275,52	288,85
60,0	442,49	286,77
72,0	317,25	342,42
72,0	173,78	311,72
73,0	263,08	305,39
73,0	335,98	299,19
75,0	315,91	281,33
78,0	226,93	248,74
84,0	77,13	194,46
96,0	5,25	118,83
108,0	5,03	72,62
120,0	2,77	44,38
132,0	1,23	27,12
144,0	5,63	16,57
168,0	6,99	6,19
216,0	0,15	0,86
240,0	3,13	0,32

GESCHW.-KONSTANTE AUFNAHMEPHASE	356,86
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)	72,00
GESCHW.-KONSTANTE CLEARENCEPHASE	4,103655E-02
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)	9,261671E-03
BIOAKKUMULATIONSFAKTOR	8696
FEHLER DES BCF	2632
S DER ABWEICHUNGSQUADRATE	97757,19
STANDARDFEHLER DER EINZELMESSUNG	65,19442

7.2 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Triclosan bei pH 7 in Zebraäbrlingen

Tabelle 21: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebraäbrlingen bei pH 7. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 41,6 \mu\text{g/l}$

ZEIT (h)	KONZ. (GEMESSEN) (mg/kg)	KONZ. (BERECHNET) (mg/kg)
3,0	5,71	5,09
6,0	0,83	7,41
12,0	27,48	11,81
24,0	28,89	92,63
36,0	215,31	257,22
48,0	265,26	291,76
72,0	240,16	324,06
96,0	316,66	324,97
144,0	420,15	336,52
147,0	324,00	302,63
150,0	273,14	272,15
156,0	285,00	220,10
168,0	113,00	143,96
180,0	58,86	94,16
192,0	21,31	61,58
216,0	13,88	26,34
240,0	6,72	11,27
264,0	0,06	0,82

GESCHW.-KONSTANTE AUFNAHMEPHASE	287,9652
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)	35,27984
GESCHW.-KONSTANTE CLEARENCEPHASE	3,537963E-02
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)	4,376625E-03
BIOAKKUMULATIONSFAKTOR	8139,295
FEHLER DES BCF	1417,093
SUMME DER ABWEICHUNGSQUADRATE	27170,71
STANDARDFEHLER DER EINZELMESSUNG	41,20885

7.3 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Triclosan bei pH 8 in Zebrabärblingen

Tabelle 22: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebrabärblingen bei pH 8. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 48,6 \mu\text{g/l}$

ZEIT (h)	KONZ. (GEMESSEN) (mg/kg)	KONZ. (BERECHNET) (mg/kg)
0,0	0,00	0,00
6,0	72,04	60,20
12,0	114,78	135,37
24,0	218,55	190,05
36,0	290,53	233,47
48,0	283,52	296,85
72,0	280,76	305,18
96,0	327,71	312,21
144,0	183,06	243,26
192,0	368,90	308,19
240,0	254,09	308,29
246,0	231,65	240,61
252,0	195,72	187,78
264,0	111,42	114,38
276,0	125,92	69,67
288,0	32,07	42,44
312,0	14,68	15,74
336,0	18,96	5,84
384,0	19,85	0,80
432,0	0,00	0,11
480,0	0,00	0,01

GESCHW.-KONSTANTE AUFNAHMEPHASE	262,24
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)	27,95225
GESCHW.-KONSTANTE CLEARENCEPHASE	4,131295E-02
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)	4,465266E-03
BIOAKKUMULATIONSFAKTOR	6347,646
FEHLER DES BCF	963,5811
SUMME DER ABWEICHUNGSQUADRATE	19852,81
STANDARDFEHLER DER EINZELMESSUNG	32,32468

7.4 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Triclosan bei pH 9 in Zebraabräblingen

Tabelle 23: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Triclosan in Zebraabräblingen bei pH 9. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 46,7 \mu\text{g/l}$

ZEIT (h)	KONZ. (GEMESSEN) (mg/kg)	KONZ. (BERECHNET) (mg/kg)
12,0	57,75	61,73
24,0	69,82	105,04
36,0	101,22	128,43
48,0	124,26	149,02
72,0	156,47	141,97
120,0	152,68	178,66
218,0	237,30	159,71
230,0	241,59	173,64
252,0	156,73	161,51
280,0	203,68	173,69
312,0	147,70	175,33
324,0	46,74	114,50
336,0	52,43	75,48
360,0	13,64	32,79
408,0	16,51	6,19
480,0	0,00	0,51
504,0	0,00	0,22
552,0	0,00	0,04
GESCHW.-KONSTANTE AUFNAHMEPHASE (FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)		129,17 29,74
GESCHW.-KONSTANTE CLEARENCEPHASE (FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE)		0,0347 0,0083
BIOAKKUMULATIONSFAKTOR		3719
FEHLER DES BCF		1232
SUMME DER ABWEICHUNGSQUADRATE		21413,94
STANDARDFEHLER DER EINZELMESSUNG		6,58

7.5 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Permethrin in Regenbogenforellen

Tabelle 24: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Permethrin in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 4,0 \mu\text{g/l}$

ZEIT (h)	KONZ. (GEMESSEN) (ng/kg)	KONZ. (BERECHNET) (ng/kg)
1,0	234,5	39,2
3,0	382,5	100,5
6,0	727,3	164,0
12,0	501,0	396,0
24,0	819,5	814,6
36,0	970,2	1094,4
48,0	1184,5	1410,0
72,0	2147,3	1962,7
96,0	2436,1	2712,1
97,0	3048,2	2502,3
99,0	2136,9	2472,8
102,0	2321,0	2429,0
108,0	2554,0	2343,9
120,0	1952,9	2182,5
132,0	2235,7	2032,1
144,0	2074,6	1892,2
168,0	1333,2	1640,4
192,0	1525,7	1422,3

GESCHW.-KONSTANTE AUFNAHMEPHASE :	8,536208
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE) :	0,770884
GESCHW.-KONSTANTE CLEARENCEPHASE :	0,00595
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE) :	0,00141
BIOAKKUMULATIONSFAKTOR :	1435,38
FEHLER DES BCF :	364,9148
SUMME DER ABWEICHUNGSQUADRATE :	1,321461
STANDARDFEHLER DER EINZELMESSUNG :	0,2873871

7.6 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Permethrin im Fett von Regenbogenforellen

Tabelle 25: Gemessene und berechnete Konzentrationen der Bioakkumulation von Permethrin im Fett von Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 4,0 \mu\text{g/l}$

ZEIT (h)	KONZ. (GEMESSEN) (mg/kg)	KONZ. (BERECHNET) (mg/kg)
1,00	5525,8	827,8
3,00	12312,5	2127,6
6,00	12808,3	3485,9
12,00	11358,6	8485,8
24,00	15015,3	17741,5
36,00	21353,5	24222,8
48,00	29292,1	31702,9
72,00	46506,6	45500,6
96,00	42570,5	64747,2
97,00	68301,5	59908,2
99,00	72588,8	59532,7
102,00	60475,5	58973,9
108,00	53959,2	57872,1
120,00	42046,3	55729,7
132,00	65700,8	53666,7
144,00	74141,0	51680,0
168,00	45234,1	47924,6
192,00	31946,4	44442,0

GESCHW.-KONSTANTE AUFNAHMEPHASE :	179,8767
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE) :	25,34185
GESCHW.-KONSTANTE CLEARANCEPHASE :	0,00314
(FEHLER DER GESCHW.-KONSTANTE) :	0,00198
BIOAKKUMULATIONSFAKTOR :	57222,76
FEHLER DES BCF :	36982,29
SUMME DER ABWEICHUNGSQUADRATE :	1993,651
STANDARDFEHLER DER EINZELMESSUNG :	11,16258
MITTLERE FETTGEHALT	4,22 %
BCFL	57200

7.7 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Cyfluthrin in Regenbogenforellen

Tabelle 26: Gemessene und berechnete Konzentrationen für Cyfluthrin der Bioakkumulation in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 0,52 \mu\text{g/l}$

Zeit [h]	<i>c_w</i> [ng/l]	<i>c_f</i> [ng/kg]	<i>s_d</i> [ng/kg]	<i>c_f berechnet*</i> [ng/kg]
1	1,95	545,3	11,5	78,0
3	0,80	454,3	32,1	216,8
6	0,54	564,2	49,4	388,1
12	0,49	655,9	144,2	630,4
24	0,49	610,6	37,3	876,3
36	0,57	705,3	87,0	972,1
48	0,44	971,1	144,7	1009,5
72	0,45	1063,1	65,0	1029,7
96	0,34	1326,5	103,7	1032,8
99	0,52	1122,6	103,5	
102	0,52	1221,6	123,6	
108	0,52	1171,1	47,6	
120	0,52	1184,6	68,4	
132	0,52	1129,9	99,5	
144	0,52	1174,3	151,1	
168	0,52	1198,3	65,9	

*Berechnung nur für die Aufnahmephase

Geschwindigkeitskonstante k1	41
Fehler der Geschwindigkeitskonstante k1	17
Geschwindigkeitskonstante k2	0,0332
Fehler der Geschwindigkeitskonstante k2	0,0206
BCF	1240
Fehler des BCF	550
mittlerer Fettgehalt	4,57
BCFL	27100

7.8 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Deltamethrin in Regenbogenforellen und im Fett von Regenbogenforellen

Tabelle 27: Gemessene Konzentrationen für Deltamethrin der Bioakkumulation in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 0,40 \mu\text{g/l}$

Zeit [h]	C_w [ng/l]	C_f [ng/kg]	sd [ng/kg]
1	0,47	0	0
3	0,33	101,1	142,9
7	0,33	188,8	71,9
12	0,39	89,1	125,9
24	0,39	293,6	26,3
36	0,45	294,9	29,7
48	0,51	312,8	41,7
72	0,40	362,7	57,2
96	0,32	336,8	36,9
99	0,40	340,4	46,1
108	0,40	345,4	51,2
120	0,40	289,8	19,8
144	0,40	321,1	82,9
192	0,40	202,3	11,7
216	0,40	249,9	14,3
264	0,40	292,4	51,5
312	0,40	233,6	18,2

Tabelle 28: Gemessene Konzentrationen für Deltamethrin der Bioakkumulation im Fett von Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser $\bar{C}_w = 0,40 \mu\text{g/l}$

Zeit [h]	C_w [ng/l]	C_f Fett [ng/kg]	sd [ng/kg]
1	0,47	0	0
3	0,33	3712,2	5249,9
7	0,33	8309,3	4220,6
12	0,39	3673,4	5195,0
24	0,40	13628,8	1858,7
36	0,45	15201,8	1194,8
48	0,51	19349,0	7981,0
72	0,40	15871,8	5384,9
96	0,32	14720,0	1100,3
99	0,40	14924,1	3946,5
108	0,40	23870,9	7538,0
120	0,40	23995,8	19096,2
144	0,40	27630,6	9713,5
192	0,40	16443,2	1488,4
216	0,40	38346,6	12859,4
264	0,40	25342,8	7445,3
312	0,40	15000,8	3640,2

7.9 Parameter der Bioakkumulation von Deltamethrin

Berechnung aus der Aufnahmephase:

Geschwindigkeitskonstante k1	52
Fehler der Geschwindigkeitskonstante k1	13
Geschwindigkeitskonstante k2	0,0605
Fehler der Geschwindigkeitskonstante k2	0,0187
BCF	860
Fehler des BCF	366
BCF (Fett)	42 130
mittlerer Fettgehalt	1,94 %

7.10 Übersicht über die Daten des Bioakkumulationsversuches von Cypermethrin in Regenbogenforellen

Tabelle 29: Gemessene Konzentrationen der Bioakkumulation von Cypermethrin in Regenbogenforellen. Konzentration im Wasser 0,67 µg/l

Zeit [h]	C_w [ng/l]	C_f [ng/kg]	sd [ng/kg]
3	0,61	1522,3	188,0
6	0,67	1095,2	190,0
12	0,67	843,4	10,1
24	0,67	0620,5	11,1
36	0,67	1891,0	289,1
48	0,57	1356,1	245,1
72	0,67	1490,1	26,6
96	0,69	1037,5	195,8
97	0,67	1175,7	101,5
99	0,67	1063,5	21,5
108	0,67	797,3	35,1
120	0,67	754,4	54,2
144	0,67	609,7	2,9

* Kinetische Daten und BCF aus Eliminationsphase berechnet

Geschwindigkeitskonstante k1	29,5
Fehler der Geschwindigkeitskonstante k1	4,8
Geschwindigkeitskonstante k2	0,0133
Fehler der Geschwindigkeitskonstante k2	0,0034
BCF	2210
Fehler des BCF	668
mittlerer Fettgehalt	3,45 %
BCFL	64000

7.11 IUPAC-Name und CAS-Nummern der verwendeten Pyrethroide

Tabelle 30: Trivialnamen, chemische Struktur, IUPAC-Name, Molgewicht und CAS-Nummern der verwendeten Pyrethroide

Name	Struktur	Chemische Bezeichnung
Cyfluthrin		[(RS)-a-Cyano-4-fluor-3-phenoxybenzyl]-(1RS)- cis,trans- 3-(2,2- dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanocarboxylat C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃ , MG. 434,3 CAS [68359-37-5]
Cypermethrin		[(RS)-a-Cyano-3-phenoxybenzyl]-(1RS)-cis,trans- 3-(2,2- dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanocarboxylat C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃ , MG. 416,3 CAS [52315-07-8]
Deltamethrin		[(S)-a-Cyano-3-phenoxybenzyl]-(1R,3R)-3-(2,2- dibromovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanocarboxylat C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃ , MG. 505,2 CAS [52918-63-5]
Permethrin		(1RS)-cis,trans-3-(2,2-Dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanocarbonsäure- 3-phenoxybenzylester C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃ , MG. 391,3 CAS [52645-53-1]

7.12 Log Pow Berechnung für Deltamethrin, Permethrin, Cypermethrin und Cyfluthrin

7.12.1 Log Pow Berechnung für Deltamethrin

Tabelle 31: Berechnung des log P_{OW} von Cypermethrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 6.18

TYPE	NUM	LOGKOW FRAGMENT DESCRIPTION ^{a)}	COEFF	VALUE
Frag	2	-CH3 [aliphatic carbon]	0.5473	1.0946
Frag	3	-CH [aliphatic carbon]	0.3614	1.0842
Frag	2	=CH- or =C< [olefinic carbon]	0.3836	0.7672
Frag	2	-Br [bromine, olefinic attach]	0.3933	0.7866
Frag	12	Aromatic Carbon	0.2940	3.5280
Frag	1	-O- [aliphatic O, two aromatic attach]	0.2923	0.2923
Frag	1	-C#N [cyano, aliphatic attach]	-0.9218	-0.9218
Frag	1	-C(=O)O [ester, aliphatic attach]	-0.9505	-0.9505
Frag	1	-tert Carbon [3 or more carbon attach]	0.2676	0.2676
Const		Equation Constant		0.2290
				Log Pow = 6.1772

^{a)}Eingabe in SMILES: (#N)C(c2c(c(c(c2)))Oc3c(c(c(c3))))(OC(=O)C1(C(C1(C)C)(C=C(Br)Br)))

7.12.2 Log Pow Berechnung für Permethrin

Tabelle 32: Berechnung des log P_{OW} von Permethrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 7.43

TYPE	NUM	LOGKOW FRAGMENT DESCRIPTION ^{a)}	COEFF	VALUE
Frag	2	-CH3 [aliphatic carbon]	0.5473	1.0946
Frag	1	-CH2- [aliphatic carbon]	0.4911	0.4911
Frag	2	-CH [aliphatic carbon]	0.3614	0.7228
Frag	2	=CH- or =C< [olefinic carbon]	0.3836	0.7672
Frag	2	-CL [chlorine, olefinic attach]	0.4923	0.9846
Frag	12	Aromatic Carbon	0.2940	3.5280
Frag	1	-O- [aliphatic O, two aromatic attach]	0.2923	0.2923
Frag	1	-C(=O)O [ester, aliphatic attach]	-0.9505	-0.9505
Frag	1	-tert Carbon [3 or more carbon attach]	0.2676	0.2676
Const		Equation Constant		0.2290
				Log Pow 7.4267

^{a)}Eingabe in SMILES : O=C(C2C(C2(C)C)C=C(CL)CL)OCc3cccc(c3)Oc1cccc1

7.12.3 Log Pow Berechnung für Cypermethrin

Tabelle 33: Berechnung des log P_{OW} von Cypermethrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 6.38

TYPE	NUM	LOGKOW FRAGMENT DESCRIPTION ^{a)}	COEFF	VALUE
Frag	2	-CH3 [aliphatic carbon]	0.5473	1.0946
Frag	3	-CH [aliphatic carbon]	0.3614	1.0842
Frag	2	=CH- or =C< [olefinic carbon]	0.3836	0.7672
Frag	2	-CL [chlorine, olefinic attach]	0.4923	0.9846
Frag	12	Aromatic Carbon	0.2940	3.5280
Frag	1	-O- [aliphatic O, two aromatic attach]	0.2923	0.2923
Frag	1	-C#N [cyano, aliphatic attach]	-0.9218	-0.9218
Frag	1	-C(=O)O [ester, aliphatic attach]	-0.9505	-0.9505
Frag	1	-tert Carbon [3 or more carbon attach]	0.2676	0.2676
Const		Equation Constant		0.2290
				Log Pow = 6.3752

^{a)} Eingabe in SMILES: CLC(CL)=CC1C(C)(C)C1C(=O)OC(C(#N))c2cccc(Oc3ccccc3)c2

7.12.4 Log Pow Berechnung für Cyfluthrin

Tabelle 34: Berechnung des log P_{OW} von Cyfluthrin mit dem Programm LOGKOW (Version 1.57): 5,74

TYPE	NUM	LOGKOW FRAGMENT DESCRIPTION ^{a)}	COEFF	VALUE
Frag	2	-CH3 [aliphatic carbon]	0.5473	1.0946
Frag	3	-CH [aliphatic carbon]	0.3614	1.0842
Frag	2	=CH- or =C< [olefinic carbon]	0.3836	0.7672
Frag	2	-CL [chlorine, olefinic attach]	0.4923	0.9846
Frag	12	Aromatic Carbon	0.2940	3.5280
Frag	1	-O- [aliphatic O, two aromatic attach]	0.2923	0.2923
Frag	1	-C#N [cyano, aliphatic attach]	-0.9218	-0.9218
Frag	1	-C(=O)O [ester, aliphatic attach]	-0.9505	-0.9505
Frag	1	-F [fluorine, aromatic attach]	0.2004	0.2004
Frag	1	-tert Carbon [3 or more carbon attach]	0.2676	0.2676
Factor	1	Ortho-subst on di-aromatic ether (non-cyl)	-0.8396	-0.8396
Const		Equation Constant		0.2290
				Log Pow = 5.7360

^{a)} Eingabe in Smiles: CC1(C)C(C=C(CL)CL)C1C(=O)OC(C(#N))c3ccc(F)c(Oc2ccccc2)c3

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Christian Schettgen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Schettgen
Geburtsdatum	04.09.1968
Geburtsort	Oldenburg (Oldb.)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schule

1974 – 1978	Grundschule Ganderkesee
1978 – 1980	Orientierungsstufe Ganderkesee
1980 – 1988	Gymnasium Ganderkesee, Abitur

Studium

1988 – 04/1994	Studium der Chemie an der Carl v. Ossietzky-Universität Oldenburg
27.04.1994	Abschluss als Diplom-Chemiker
1993 – 07/1998	Studium der Wirtschaftswissenschaften an der Carl v. Ossietzky-Universität Oldenburg
29.07.1998	Vordiplom Wirtschaftswissenschaften
seit 07/1995	Promotionsstudium im Fach Chemie an der Carl v. Ossietzky-Universität Oldenburg bei Prof. Dr. Werner Butte

Beruflicher Werdegang

07/1992 – 10/1992	Industriepraktikum Ciba-Geigy AG, Schweiz
05/1994 – 03/1995	Wissenschaftlicher Angestellter, Carl v. Ossietzky- Universität Oldenburg
07/1995 – 06/1998	Wissenschaftlicher Angestellter, Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg
11/1998 – 03/1999	Methodenentwicklung, EUKOS Umweltanalytik Nord GmbH, Plön
03/1999 – 12/1999	Zusatzqualifikation zum SAP R/3 Juniorberater „Chemische Industrie“, GIB mbH, Mainz
01/2000 –	SAP Anwendungsentwickler, Degussa-Hüls AG, Frankfurt am Main

Oldenburg, den 21. Januar 2000

Christian Schettgen