



# Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

---

Merkblatt Nr. 33

1. Auflage

März 1973

---

## Unterlagen zur Toxikologie eines Pflanzenschutzmittels im Rahmen des Zulassungsverfahrens

Richtlinie der BBA

von

W. Weinmann

in Zusammenarbeit mit dem Bundesgesundheitsamt  
und dem Toxikologischen Ausschuß des  
Industrieverbands Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel e. V.

## Allgemein

Die toxikologischen Versuche müssen in jeder Hinsicht unter definierten bzw. standardisierten Bedingungen dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis entsprechend durchgeführt werden. Sie sollen möglichst viele toxikologischen Kriterien erfassen. Größter Wert ist auf die Objektivierung, übersichtliche Dokumentation und statistische Bearbeitung der Befunde zu legen. Dem Gutachter ist Einsicht in die Originalunterlagen zu ermöglichen. Werden fremde Versuchsergebnisse angeführt, so sind dem Antrag Kopien der zitierten Original-Literatur beizufügen. Soweit der Antragsteller die Notwendigkeit von Spezialuntersuchungen vorhersieht, sollte er diese von sich aus sobald als möglich durchführen. In Zweifelsfällen sollte sich der Antragsteller mit der Gutachterbehörde in Verbindung setzen.

Über Einzelheiten der Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung muß die verantwortliche Toxikologe entscheiden. Allgemeine Hinweise für Untersuchungen sind in der Mitteilung V vom 16. Mai 1966 der Kommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, enthalten. Einige Gesichtspunkte sollen nachstehend hervorgehoben werden: Es sollen möglichst genaue Angaben über die Versuchstiere (wie Tierhalter, Tierstamm, Gewicht, Herkunft, Fütterung und Fütterungszustand) und Methoden gemacht werden. Bei Ermittlung der akuten Toxizität sollen sich die geschlechtsreifen Tiere in der ersten Lebenshälfte befinden; die Bestimmung soll mindestens an einer Tierart für männliche und weibliche Tiere gesondert durchgeführt werden. Fütterungsversuche sollen in der Regel mit Tieren beiderlei Geschlechts kurz nach dem Absetzen beginnen. Die gleichzeitige Untersuchung entsprechender Kontrolltiere in ausreichender Zahl ist Voraussetzung. Versuche an landwirtschaftlichen Nutztieren sind nach Möglichkeit von ausgebildeten Veterinärtoxikologen oder Toxikologen unter Beratung durch einen Tierarzt durchzuführen.

Nachstehend wird unterschieden zwischen den grundsätzlich erforderlichen Unterlagen über die akute Toxizität des technischen Wirkstoffes und des Pflanzenschutzmittels sowie dem 90-Tage-Versuch (wenn der Einsatz des Mittels in Kulturen erfolgen soll, die zur Verwendung als Lebensmittel oder Futtermittel geeignet sind oder wenn es beim Einsatz eines Mittels in anderen Anwendungsgebieten nicht auszuschließen ist, daß Rückstände in das Trinkwasser gelangen können) und den Unterlagen, die je nach den Ergebnissen der vorgenannten Untersuchungen oder der chemischen Struktur des Wirkstoffes sowie seiner Abbau- und Reaktionsprodukte erforderlich werden können. Unter Umständen sind in die toxikologische Untersuchung auch die wesentlichen Abbau- und Reaktionsprodukte des Wirkstoffes einzubeziehen.

### Grundsätzlich erforderliche Unterlagen

#### D - 1.1 *Akute orale und intraperitoneale Toxizität des technischen Wirkstoffes*

Bei der Ermittlung der akuten Toxizität ist die  $LD_{50}$  mit ihren 95%o-Vertrauensgrenzen zu bestimmen sowie nach Möglichkeit der Slope-Faktor mitzuteilen.

Im Falle von Kombinationspräparaten ist die  $LD_{50}$  der einzelnen Wirkstoffe und der Wirkstoffkombination im vorgesehenen Mischungs-

verhältnis an der Ratte zu bestimmen. An der zweiten Tierart ist nur die Kombination zu bestimmen. Repräsentative Untersuchungen für Kombinationen gleicher Wirkstoffe mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen können in beschränktem Umfange anerkannt werden.

Die akute orale Toxizität des Wirkstoffes bzw. der Wirkstoffkombination ist durch Bestimmungen der akuten intraperitonealen oder intravenösen Toxizität an der Ratte zu ergänzen.

#### D-1.2 *Akute Toxizität des Handelspräparates*

Hier ist die akute orale Toxizität der Wirkstoffzubereitung mitzuteilen. Weiterhin ist die Testung der lokalen Reizwirkung der Formulierung an der intakten und skarifizierten Haut ("Patch-Test") und am Auge bei Kaninchen unter Verwendung eines anerkannten Bestimmungsschlüssels obligatorisch. Nur unter bestimmten Voraussetzungen ist die systemische dermale Toxizität und die Inhalationstoxizität zu testen. Die Untersuchungen werden erforderlich, wenn es sich bei dem Handelspräparat — eine genügend enterale Resorption vorausgesetzt — im Sinne der Giftverordnungen um ein Präparat mit hoher bis mittlerer Toxizität (bis ca. 500 mg/kg per os) handelt. Ferner sind diese Untersuchungen dann erforderlich, wenn das Pflanzenschutzmittel oder die anwendungsfertige Zubereitung ein Stäube-, Räucher-, Begasungs-, Beizmittel oder ein Puder ist oder wenn es als Flüssigkeit verspritzt, versprüht oder vernebelt werden soll.

Beim Inhalationstest ist die Wirkstoffkonzentration in der Luft des Versuchsraumes und bei nicht gasförmigen Stoffen das Partikelspektrum zu kontrollieren. Die Expositionszeit sollte 4 Stunden, der Beobachtungszeitraum 14 Tage nicht unterschreiten. Beurteilbar werden sollte die Mortalität, das Körpergewicht und die Pathologie.

#### D-1.3 *Die kumulativ-toxische Wirkung des technischen Wirkstoffes*

Die kumulativ-toxische Wirkung wird bisweilen aus Versuchen anderer Zielsetzungen beurteilbar sein, in der Regel werden jedoch spezielle Untersuchungen durchgeführt werden müssen. Die Dosierungen sind so zu wählen, daß bei der höchstdosierten Gruppe deutliche klinische Erscheinungen auftreten. Für die Wahl der zu untersuchenden Parameter gelten dieselben Maßstäbe wie im chronischen Fütterungsversuch. Die Applikationsdauer sollte 4 Wochen nicht überschreiten. Bei einem Teil der Tiere ist die Erholungsphase zu beobachten. Dieser Versuch, der mit dem Wirkstoff bzw. der Wirkstoffkombination durchgeführt wird, ist gesondert in Hinblick auf den möglichen Vergiftungsmechanismus zu diskutieren.

#### D-1.4 *90-Tage-Fütterungsversuch*

Zur Bestimmung des „no-effect-level“ werden in der Regel 3 bis 4 verschiedene Dosierungen des technischen Wirkstoffes an jeweils 10 männlichen und 10 weiblichen entwöhnten Ratten ad libitum verfüttert.

Beurteilt werden: Futterraufnahme, Gewichtsentwicklung, Mortalität, Hämatologie, pathologische Anatomie und Organengewichte sowie Histo-pathologie.

Entsprechende Versuche sind mit Hunden durchzuführen.

## 2 Unterlagen die erforderlich werden können

D - 2.1/

### 2.2 *Langzeitfütterungsversuche mit Ratten und Hunden*

Siehe Mitteilung V der DFG-Kommissionen für Pflanzenschutz-, Pflanzen-behandlungs- und Vorratsschutzmittel vom 16. Mai 1966.

### D - 2.3 *Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren*

Für Pflanzenschutzmittel, die zur direkten Behandlung von Futtermitteln und auf Grünflächen (Wiese, Weide usw.) angewendet werden, ist die akute und subakute Toxizität für betroffene Tierarten im Vergleich zur Ratte zu ermitteln bzw. anhand informatorischer Versuche oder anderer Informationen abzuschätzen. Für Tierarten, die dem Experiment aus irgendwelchen Gründen nicht zugänglich sind, werden die Prüfungen, so- weit erforderlich, an phylogenetisch verwandten Tierarten durchgeführt.

Bei subchronischen und chronischen Fütterungsversuchen wird in der Regel der „no-effect-level“ zu bestimmen sein. Während das z. B. bei Hühnern und Kaninchen praktikabel ist, dürfte dies bereits beim Schwein und besonders bei Rindern und Pferden auf wirtschaftliche und organi- satorische Schwierigkeiten stoßen. In den zuletzt genannten Fällen ist dann in einem Fütterungsversuch die Konzentration des Stoffes zu prüfen, mit der als Rückstand auf Futterpflanzen zu rechnen ist. Die Dauer des Fütterungsversuches richtet sich nach der Lebens- bzw. Nutzungsdauer der betreffenden Tierart. Bei den Versuchen sollen mindestens das Allgemeinbefinden, die Gewichtsentwicklung, die Futterraufnahme sowie die Blut- und Harnbeschaffenheit (histologisch-chemisch) beurteilt werden.

### D - 2.4 *Stoffwechselversuche*

Bilanzuntersuchungen mit dem Wirkstoff an Versuchstieren sind not- wendig, um erste Informationen über eine mögliche Anreicherung im Tier zu erhalten. Sie sind vor der Antragstellung durchzuführen und mit den ersten akut-toxikologischen Befunden einzureichen, wenn Art und Menge der Rückstände des Wirkstoffes und/oder seiner Abbau- und Reaktions- produkte in den Futtermitteln eine Anreicherung im tierischen Organismus erwarten lassen. Entsprechende Untersuchungen mit wesentlichen Umwandlungsprodukten sind, sofern erforderlich, erst später, d. h. nach ihrer Erfassung und Identifizierung auf Nahrungs- und Futtermittel durchzuführen.

Quantitative Verteilungsstudien können entscheidende Hinweise für Rückstandsuntersuchungen in Lebensmitteln tierischer Herkunft und für

die Notwendigkeit von funktionellen und biochemischen Experimenten im Verlauf weiterer toxikologischer Prüfungen liefern, wenn eine besondere Gewebs- oder Organaffinität des Wirkstoffes erkannt wird. Sie sollen die ersten toxikologischen Befunde deshalb ergänzen und falls erforderlich mit radioaktiv markierten Wirkstoffen bei oraler Verabreichung durchgeführt werden.

#### D-2.5 *Auswirkung auf Fische*

Für die Beurteilung der Wirkung eines Pflanzenschutzmittels im Wasser auf die im Gewässer befindliche Fauna sind Angaben über die Fischgiftigkeit unerlässlich für alle Wirkstoffe, die im Freien zur Anwendung gelangen. Ausgenommen sind solche Präparate, die als Saatbeizen oder in geschlossenen Räumen (Treibhäuser, Mühlen, Silos usw.) verwendet werden.

Da zur Zeit keine einheitliche Versuchsmethodik vorliegt, genügen Angaben wie die  $LC_{50}$  [96 Std.] oder die nach amerikanischer Standardmethode erzielten TLM-Werte.

Für die Versuche sollten vor allem Regenbogenforellen (Setzlinge) benutzt werden, da diese am empfindlichsten von allen Nutzfischen reagieren und das ganze Jahr über von Zuchtbetrieben in gewünschter Größe erhältlich sind. Empfohlen wird vorläufig folgende Versuchsanwendung und -auswertung: Je 10 Tiere von ca. 5 cm Länge in 10 l gut durchlüftetem Wasser von 22° C; beurteilt werden sollte Schwimmverhalten, Ausfärbung, Reaktionsverhalten und Mortalität. Die Auswertung erfolgt als  $LC_{50}/96$  Std. Zusätzliche Untersuchungen mit Karpfen (Stadium K 1) und Gruppies sind wünschenswert.

Für Mittel, die an und in Gewässern angewendet werden, sind unter Berücksichtigung einer möglichen Anreicherung über die Nahrungskette Untersuchungen über Rückstände des Wirkstoffes und/oder seiner Abbau- und Reaktionsprodukte in Nutzfischen vorzunehmen.

#### D-2.6 *Spezielle Untersuchungen*

Die hierunter beispielhaft angeführten Untersuchungen sind dann durchzuführen, wenn Wirkstoffe oder Beistoffe aufgrund ihrer Gruppencharakteristik die eine oder andere Wirkung vermuten lassen. Besondere Beachtung verdient die Frage nach der sensibilisierenden Wirkung eines Präparates (Hinweise für die Durchführung von Sensibilisierungstest am Meerschweinchen sind zu finden in: „Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics“ der Association of Food & Drug Officials of the U.S., Austin 1, Texas 1959).

Ferner fallen unter diesen Punkt der Antidotversuch und die Neurotoxizität sowie weitere zur Abklärung außergewöhnlicher Fragen erforderliche Untersuchungen. Hier gilt in besonderem Maße die eingangs gemachte Empfehlung sich frühzeitig mit der Gutachterbehörde in Verbindung zu setzen.

### D-3.1 *Schlußfolgerung und toxikologische Grenzwerte*

Die Angaben sollen tabellarisch oder in Stichworten die Ergebnisse der vorangegangenen Einzelangaben enthalten.

Die zusammenfassende Beurteilung sollte im Sinne einer gutachterlichen Äußerung eines auf dem Gebiet der Toxikologie Fachkundigen, unter Einbeziehung aller über die Substanz bekannten toxikologischen Daten vorgenommen werden.

### D-3.2 *Toleranzvorschläge*

Hier ist anzugeben, welche Toleranzen für den Wirkstoff in den in Frage kommenden Kulturen notwendig erscheinen, nach den Ergebnissen der Untersuchungen über die chronische Toxizität und das Rückstandsverhalten. Derartige Vorschläge sind auch für Einzelfuttermittel und Weidepflanzen, unter Erläuterung der Berechnungsgrundlage, zu machen.