

8 L.B.L.

1425

10. NOV. 1982

1



Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Bundesrepublik Deutschland

Merkblatt Nr. 56

1. Auflage

August 1982

Untersuchungen zum Metabolismus von Pflanzenbehandlungsmitteln im Boden

D

Richtlinie der Biologischen Bundesanstalt
von
W. Weinmann
K. Schinkel



Inhalt

1. Vorwort	3
2. Einleitung	3
3. Allgemeine Versuchsanlage	3
4. Versuchsdurchführung	4
4.1. Wirkstoffzusatz	4
4.2. Inkubation des Bodens	4
4.3. Extraktion des Bodens	5
4.4. Untersuchung der Extrakte und Absorptionslösungen	5
4.4.1 Verteilung der Radioaktivität	5
4.4.2 Identifizierung der Abbauprodukte	5
5. Auswertung des Versuches	5
5.1. Struktur der Abbau- und Reaktionsprodukte	5
5.2. Eigenschaften der Abbau- und Reaktionsprodukte	5
5.3. Aufstellung einer Stoffbilanz	6
6. Hinweise zum Ausfüllen des Formblattes BBA AP-14-01	6
Anlage Musterformblatt BBA AP-14-01	7

1. Vorwort

Das vorliegende Merkblatt stellt einen ersten Versuch dar, Empfehlungen zur Durchführung von Untersuchungen zum Metabolismus von Pflanzenbehandlungsmitteln im Boden zu geben. Die Autoren sind sich der Schwierigkeiten bewußt, die insbesondere durch die Vielfalt der Substanzen und ihrer Abbauprodukte wie auch durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften gegeben sind. Es mögen von Fall zu Fall andere Untersuchungsmethoden als die hier beschriebenen sinnvoll erscheinen.

Es wird deshalb besonders nachdrücklich um Ergänzungs- und Änderungsvorschläge gebeten, die bei der nächsten Auflage des Merkblattes berücksichtigt werden könnten.

2. Einleitung

Für die Beurteilung des Verhaltens eines Pflanzenbehandlungsmittels im Boden sind Informationen über die Beständigkeit und Mobilität des Wirkstoffes erforderlich. Richtlinien für die Erarbeitung dieser Daten stehen mit den Merkblättern Nr. 36 und Nr. 37 der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft zur Verfügung.

Die Konzentrationsabnahme eines Wirkstoffes im Boden ist jedoch nicht mit dem vollständigen Abbau gleichzusetzen. Schon bei einer geringfügig geänderten Struktur des Wirkstoffmoleküls kann unter Umständen die Substanz von der Analysenmethode nicht mehr erfaßt werden. Vielfach sind derartige erste Abbauprodukte noch biologisch aktiv, mitunter sind sie selbst erst die eigentlich wirksame Substanz. Die Frage nach Art und Menge der entstehenden Zwischenprodukte des Umwandlungsprozesses ist nicht nur von ökotoxikologischem Interesse, sondern auch im Hinblick auf eine mögliche Aufnahme dieser Metaboliten durch die behandelte oder eine nachgebaute Kultur sowie eine Kontamination des Grundwassers von erheblicher Bedeutung.

Die Verseifung eines Esters, die Bildung von Oxidationsprodukten, z. B. von Sulfoxid und Sulfon aus einer Thioätherfunktion oder eine – oft reversible – Konjugatbildung kann lediglich als Vorstufe einer Abbaureaktion angesehen werden. Das Verhalten einer Substanz ist erst dann befriedigend geklärt, wenn der Weg zum endgültigen Abbau bekannt ist.

Die folgenden Ausführungen sind als Richtlinie zu betrachten. Im Einzelfall kann ein anderes Vorgehen geeigneter erscheinen. Es kann auch erforderlich werden, Umfang und Tiefe der Untersuchungen zu verändern.

3. Allgemeine Versuchsanlage

Soweit nicht besondere Gründe für die Wahl eines anderen Bodens sprechen, sind für die Versuche die Standardböden 1 oder 2 – wie sie im Merkblatt Nr. 36 der Biologischen Bundesanstalt beschrieben sind – zu verwenden. Anderenfalls ist ein gleichwertiger Boden einzusetzen, um den Zusammenhang mit den Ergebnissen der Untersuchungen gemäß Merkblatt Nr. 36 und Nr. 37 sicherzustellen.

Bei gelagerten Böden ist im Interesse einer Aktivierung der mikrobiellen Leistungsfähigkeit die im Merkblatt Nr. 36 beschriebene Vorbehandlung von großer Bedeutung.

Der Boden wird mit radioaktiv markiertem Wirkstoff*) versetzt und bei gleichbleibender Temperatur in einem geschlossenen, belüftbaren System im Dunkeln gelagert. Die Markierungsstelle im Molekül ist für die Aussagefähigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung und muß daher dem zu erwartenden Abbaupfad derart angepaßt sein, daß der Metabolisierungsprozeß möglichst weit verfolgt werden kann.

Die Versuchsdauer richtet sich nach der Beständigkeit des Wirkstoffes und/oder seiner Hauptmetaboliten und erstreckt sich in der Regel über ein bis zwei Halbwertszeiten (höchstens jedoch 90 Tage). Entstehen mehrere stabile Metaboliten nacheinander, so wird es erforderlich, gesonderte Versuche mit längeren Standzeiten durchzuführen. Flüchtige Abbauprodukte müssen in einer geeigneten Apparatur aufgefangen und bestimmt werden. Die Versuche können darüber hinaus auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Dies kann z.B. durch Lagerung des behandelten Bodens unter Stickstoff erfolgen.

Die Bodenproben werden nacheinander mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert und die Extrakte zur Erstellung einer Stoffbilanz der Flüssig-Scintillationszählung zugeführt.

Zur Identifizierung der Metaboliten sind Methoden der Chromatographie und Massenspektrometrie geeignet. Hierzu werden die Abbauprodukte chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch gemessen. Vorzugsweise wird hierfür eine Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie eingesetzt.

4. Versuchsdurchführung

4.1. Wirkstoffzusatz

Der radioaktiv markierte Wirkstoff wird in ca. 1 ml Wasser, Aceton oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst und die Lösung tropfenweise dem Boden zugesetzt. Eine Wirkstoffkonzentration von 10 mg/kg lufttrockenem Boden erscheint zweckmäßig. Der Boden wird danach mit destilliertem Wasser auf 40% der maximalen Wasserkapazität eingestellt.

4.2. Inkubation des Bodens

100g des behandelten Bodens (bezogen auf lufttrockenen Boden) werden in ein geschlossenes System überführt, das eine Be-/Entlüftung gestattet (z.B. Biometergefäß, eine Kombination von Inkubationsgefäß und Absorptionsfallen) und dieses unter Lichtausschluß bis $22 \pm 2^\circ$ aufgestellt. In geeigneten Zeitabständen wird ein gereinigter Luftstrom durch das Gefäß und die angeschlossenen Absorptionsfallen geleitet, die zum Auffangen flüchtiger Bestandteile mit geeigneten Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität gefüllt sind (z.B. Hexan, Methanol). Die Absorption von Kohlendioxid erfolgt zweckmäßigerweise in 1 N-Natron- oder Kalilauge. Nach jedem Spülvorgang wird der Feuchtigkeitsverlust des Bodens durch Differenzwägung ermittelt und mit destilliertem Wasser ausgeglichen. Die Absorptionslösungen werden in geeigneten Zeitabständen (z.B. alle 10 Tage) ausgewechselt und untersucht.

*) Es sollen nach Möglichkeit ^{14}C -markierte Wirkstoffe verwendet werden.

4.3. Extraktion des Bodens

Nach Abschluß des Versuches werden die Bodenproben oder ein Aliquot derselben mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur durch Schütteln oder Behandlung im Ultraschallbad extrahiert. Die nachfolgende Extraktion mit organischen Lösungsmitteln erfolgt üblicherweise in einer Soxhletapparatur. Es werden nacheinander verschiedene Lösungsmittel nach steigender Polarität verwendet (z.B. Hexan – Dichlormethan – Methanol – Acetonitril). Der extrahierte Boden wird in einem Verbrennungsautomaten aufgeschlossen. Das dabei entstehende Kohlendioxid wird zur Bestimmung nicht extrahierbarer, radioaktiver, organischer Verbindungen in Natron- oder Kalilauge aufgefangen.

4.4. Untersuchung der Extrakte und Absorptionslösungen

4.4.1 Verteilung der Radioaktivität

Der Anteil der Radioaktivität in den Absorptionslösungen wird durch Flüssig-Scintillations-Zählung bestimmt. Die Bodenextrakte (einschließlich des Wasserextraktes) werden gereinigt (z.B. durch Flüssig-Flüssig-Verteilung, Säulen- und/oder Schichtchromatographie), die gereinigten Extrakte eingengt und die Substanzen durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Lokalisierung der Substanzen auf der Platte kann autoradiographisch oder durch Radioscanning erfolgen. Die ermittelten Zonen werden abgeschabt und die Radioaktivität bestimmt.

4.4.2 Identifizierung der Abbauprodukte

Zur Strukturaufklärung der Metaboliten können chromatographische und massenspektrometrische Verfahren herangezogen werden. Bei beiden Verfahren ist der Vergleich mit Referenzsubstanzen, die möglichst alle erwarteten Abbauprodukte einschließen, unumgänglich. Die Synthese dieser Stoffe ist daher frühzeitig einzuplanen. Bei massenspektrometrischen Untersuchungen ist wegen der geringen Substanzmengen in den meisten Fällen die Kopplung mit einem Gaschromatographen erforderlich.

5. Auswertung des Versuches

5.1. Struktur der Abbau- und Reaktionsprodukte

Die Anzahl der Verbindungen, die während des Abbaus eines Wirkstoffes im Boden entstehen, und ihre chemischen Strukturen sind anzugeben. Bei spektrometrisch durchgeführten Untersuchungen sind die Spektren (in Form sogenannter Strichspektren) sowie eine Interpretation derselben (z.B. Masse des Molekültons, Fragmentierungsmuster) mit vorzulegen. Wenn eine gesicherte Strukturaufklärung nicht möglich ist, sind die Strukturen anzugeben, die aufgrund des gesamten chemischen und physikalischen Verhaltens der Verbindungen wahrscheinlich sind. Diese Deutungen sind zu begründen. In Folgeversuchen ist zu klären, ob die Abbauprodukte in Pflanzen übergehen können. Nach Möglichkeit ist ein Schema des Abbauweges zu erstellen und vorzulegen.

5.2. Eigenschaften der Abbau- und Reaktionsprodukte

Falls zwischen den unter Punkt 4.4.2. angesprochenen Referenzverbindungen und den jeweiligen Abbauprodukten der Wirkstoffe durch chromatographische und/oder spek-

trometrische Verfahren Identität festgestellt wird, sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Substanzen anzugeben (z. B. Schmelzpunkt, Siedepunkt, Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln einschließlich Wasser, Flüchtigkeit, chemische Beständigkeit).

5.3. Aufstellung einer Stoffbilanz

Die aufgrund der Flüssig-Scintillations-Messungen ermittelte prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Kohlendioxid, flüchtige Produkte, nichtflüchtige extrahierbare sowie nicht extrahierbare Substanzen ist anzugeben, und zwar sowohl in Bezug auf die eingesetzte Radioaktivität wie auch in Bezug auf die Summe der wiedergefundenen Aktivität.

Bei identifizierten Abbauprodukten ist deren prozentualer Anteil bezogen auf die eingesetzte Wirkstoffmenge anzugeben.

6. Hinweise zum Ausfüllen des Formblattes BBA AP-14-01

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind auf dem oben genannten Formblatt zu berichten. Der Kopf des Formblattes ist nicht vom Antragsteller auszufüllen.

Über den Rahmen des Formblattes hinausgehende Ausführungen können als Anlagen beigefügt werden.

Unter den Ziffern 2. und 3. können statt der häufig sehr langen chemischen Bezeichnungen Codes eingesetzt werden, denen in einer gesonderten Anlage die Strukturformeln zugeordnet werden.

Unter Ziffer 4. ist in der ersten Spalte der Anteil der Radioaktivität bezogen auf die eingesetzte, in der zweiten Spalte bezogen auf die Summe der wiedergefundenen Radioaktivität einzusetzen.

3300 Braunschweig

Antragsteller:	Eingegangen mit Schreiben vom:	Kenn-Nr.:
----------------	-----------------------------------	-----------

(Bitte nicht ausfüllen)

Metabolismus im Boden

Wirkstoff: _____

1. **Kurzbeschreibung der Versuchsanordnung:** (Einschließlich eines Flußdiagramms der Extraktions-, Reinigungs- und Bestimmungsvorgänge als Anlage)

2. **Wirkstoff sowie Abbau- und Reaktionsprodukte in den Absorptionslösungen (in % der Ausgangsverbindung):**

1. _____
2. _____
3. _____

3. **Wirkstoff sowie Abbau- und Reaktionsprodukte in den Extrakten (in % der Ausgangsverbindung):**

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

4. **Stoffbilanz:**

Radioaktivität (%) in den Absorptionslösungen, Extrakten und den nicht extrahierbaren Anteilen bezogen auf die eingesetzte (Spalte 1) sowie die Summe der wiedergefundenen Aktivität nach Abschluß des Versuches (Spalte 2).

Lösung, Extrakt (Lösungs-/Extraktionsmittel angeben)	1 %	2 %
1. _____		
2. _____		
3. _____		
4. _____		
5. _____		
6. _____		
7. _____		
8. _____		
Summe		

Anlagen

1. Strukturformeln
2. Schema des Abbauweges
3. Spektren
4. Details der Versuchsanlage und Durchführung (einschließlich Flußdiagramm)
5. Sonstige

(Datum)

(Untersuchungsstelle – Unterschrift/Stempel)