Arch. Toxikol. 30, 207—214 (1973)
© by Springer-Verlag 1973

Zur Persistenz von polychlorierten Biphenylen (PCB) an Ratten*

H. F. Benthe und A. Schmoldt

Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg

Eingegangen am 29. September 1972

Persistence of Polychlorinated Biphenyls (PCB) in Rats

Abstract. The pattern of PCB-residues was studied in male rats after the application of tetrachlorobiphenyl (TCB). Four weeks after i.p. injection of 1 g/kg TCB the adipose tissue contains 338 µg/g. Combined capillary gas-liquid chromatography and mass-spectrometry revealed a considerable shift to the higher chlorinated components (penta- and hexachlorobiphenyl — 63 %) in the PCB-pattern of the residue. The proportion of these compounds in the total PCB content of the TCB administered was only 5 %. The tri- and tetrachlorobiphenyls decreased, indicating much higher metabolism. Therefore we may conclude that tetrachlorobiphenyl is acceptable with regard to environmental pollution if it does not contain more higher chlorinated components.

Key words: Polychlorinated Biphenyls — Persistence — Metabolism — Environmental Pollution.

Zusammenfassung. An Ratten wurde das Rückstandsverhalten von technischem Tetrachlorbiphenyl (TCB) untersucht. 4 Wochen nach i.p. Gabe von 1 g/kg sind im Fettgewebe 338 µg/g nachweisbar. Bei gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse wird im PCB-Muster des Rückstandes eine starke Zunahme (auf 63 %) der Penta- und Hexachlorbiphenyle sichtbar, die in der Ausgangsverbindung nur zu 5 % vertreten sind. Demgegenüber sind Tri- und Tetrachlorbiphenyl ungleich besser metabolisierbar. Es kann gefolgert werden, daß Tetrachlorbiphenyl im Hinblick auf Umweltbelastung vertretbar ist, wenn es von den höher chlorierten Beimengungen befreit wird.

Schlüsselwörter: Polychlorierte Biphenyle — Persistenz — Metabolismus — Umwelt-Contamination.

Soweit die wenigen qualitativen Analysen zeigen, kommen in Rückstandsanalysen von biologischem Material vornehmlich höher chlorierte PCBs (Penta- bis Heptachlorbiphenyl) vor (Duke *et al.*, 1971; Bagley *et al.*, 1970). Dabei ist unklar, ob diese Rückstände aus Umweltbelastung mit höher chlorierten PCBs stammen oder nicht metabolisierbare Reste

* Mit dankenswerter Unterstützung durch das Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit.

DSW 030038

STLCOPCB4014000

niedrig chlorierter Verbindungen darstellen. Diese Frage ist wichtig angesichts des Versuches, das PCB-Problem durch Rücknahme höher chlorierter Verbindungen und Ersatz durch niedrig chlorierte zu lösen. Es ergibt sich dabei weiter die Frage, ob für alle niedrig chlorierten Isomeren (Cl = 2—4) ein gleichwirksamer Abbau existiert, oder ob auch in diesem Bereich selektiv persistierende Komponenten nachgewiesen werden können.

Da der Mensch im allgemeinen Falle durch Umweltcontamination und im besonderen bei technischer Anwendung der PCBs mit diesen Stoffen belastet wird, steht der PCB-Metabolismus im Säugetierorganismus im Vordergrund des Interesses.

Bei Vögeln sind nach chronischen Fütterungsversuchen mit Tri- und Pentachlorbiphenyl im Lebergewebe Rückstandsmuster analysiert worden, die vornehmlich höher chlorierte Komponenten zu repräsentieren scheinen, eine direkte Chlorbestimmung durch angeschlossene Massenspektrometrie erfolgte nicht. Die näherungsweise bestimmten PCB-Reste in Leber und Fettgewebe waren nach chronischer oraler Gabe von Pentachlorbiphenyl doppelt so hoch wie nach Trichlorbiphenyl (Bailey u. Bunyan, 1972). Nach einmaliger oraler Gabe von Pentachlorbiphenyl an Ratten deutet ein grober gaschromatographischer Vergleich zwischen dem PCB-Muster der verabfolgten Verbindung und der aus Gewebsproben extrahierten auf eine Vermehrung höher chlorierter Komponenten hin (Grant *et al.*, 1971).

In den zitierten Versuchen an Vögeln und Ratten wurde das PCB oral verabfolgt. Die danach ermittelten Rückstandsmuster lassen jedoch nur sehr bedingt Rückschlüsse auf abgelaufene Metabolisierungs- und Eliminationsvorgänge zu, weil unklar ist, in welchem Umfange durch den Resorptionsvorgang bereits eine Selektion in dem PCB-Muster erfolgt ist. Um diese möglichen Resorptionsunterschiede für bestimmte Isomeren auszuschließen, wurde in den eigenen Untersuchungen das PCB durch i.p. Injektion verabfolgt. Zudem ist bekannt, daß PCB in Aerosolform im Gegensatz zu oraler Verabfolgung sehr gut resorbiert wird. Da bei technischer Anwendung der Flüssigkeiten die Inhalation von Aerosolen viel häufiger ist als eine orale Aufnahme, ist die Persistenz tatsächlich vom Organismus aufgenommener Verbindungen von Bedeutung.

Material und Methoden

Männliche Wistar-Ratten (180 bis 200 g) (Zuchtstation E. Jautz, 7967 Kisslegg) erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 2 ml/kg einer Lösung von Tetrachlorbiphenyl (Arochlor® 1248) in Pflanzenöl (5 g/10 ml). Bis zur Tötung bekamen die Ratten Futter (Altromin®) und Wasser ad libitum. Nach 4 Wochen wurden die Ratten durch Genickschlag und Dekapitation getötet, Leber und retroperitoneales Fettgewebe entnommen und bis zur Aufarbeitung bei −20 °C gelagert.

DSW 030039

STLCOPCB4014001

Zerkleinertes Gewebe wurde nach der Methode nach Stanley u. Le Favour (1965) mit fünffachem Volumen einer Mischung aus 60%iger Perchlorsäure und Essigsäure (1 + 1) aufgeschlossen und anschließend viermal mit dem zehnfachen Volumen Hexan ausgeschüttelt. Die vereinigten Hexanextrakte wurden nach der Methode von Grant *et al.* (1971) gereinigt. Die quantitative Bestimmung erfolgte photometrisch nach Benthe *et al.* [1972 (1)]. Die Ausbeute nach diesem Verfahren betrug für Leber und Fettgewebe 85,5 ± 2,6%. Alle Chemikalien waren analysenrein, Hexan und Heptan (Uvasol Merck) wurden frisch destilliert. Für die Überlassung von Tetrachlorbiphenyl Arochlor® 1248 danken wir der Monsanto Deutschland.

Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die gaschromatographische Auftrennung erfolgte an einer Stahlsäule in einem F + M Gaschromatographen (Modell 810) mit Flammenionisationsdetektor (FID). Die Stahlsäule (Länge 100 m, innerer Durchmesser 1,5 mm) war mit 10% Apiezon belegt unter Zusatz von Triphenylphosphoniumchlorid nach dem Vorgehen von Malec (1971). Injektortemperatur: 250 °C, Ofentemperatur: 200 °C, FID-Temperatur: 230 °C, als Trägergas Helium mit 40 ml/min. Das Injektionsvolumen von 2 µl wurde ohne Split direkt auf die Säule gegeben. Als Lösungsmittel diente n-Decan; alle in Heptan überführten Hexanextrakte wurden zuvor auf ein Volumen von ca. 15 bis 30 mg n-Decan eingeengt.

Über einen Split am Ende der Stahlsäule wurden ca. 10 bis 20% des Durchströmungsvolumens über einen Watson-Biemann Glasfrittenseparator in ein Massenspektrometer MS 12 (Ass. Elect. Indust. Ltd.) gegeben. Die Temperatur des Separators betrug 150 °C, die der Ionenquelle 200 °C. Das Massenmuster der einzelnen Peaks wurde durch Anstieg der Beschleunigungsspannung optisch am Oscilloskop kontrolliert und im Maximum der Konzentration durch elektromagnetischen scan registriert (UV-Schreiber). In allen Fällen war das Molekülion als Hauptpeak vorhanden.[1]

Ergebnisse

Das eingesetzte Tetrachlorbiphenyl ließ sich gaschromatographisch in 45 Einzelkomponenten auflösen, für jede Einzelkomponente konnte durch Massenspektrometrie der Chlorgehalt bestimmt werden (Tabelle 1). Demnach repräsentieren einige Peaks Mischkomponenten aus 3 bis 4- und 4 bis 5-fach chlorierten Verbindungen, wobei sich stets eine Hauptkomponente ausmachen ließ. Es ergibt sich weiterhin, daß für die Retentionszeit neben der Anzahl der Chloratome ihre sterische Anordnung entscheidend ist; so liegen im Bereich des Trichlorbiphenyls bereits einige Tetrachlorverbindungen und im Bereich des Tetrachlorbiphenyls sehr frühe Pentachlorkomponenten (Peak 11 bis 14 und Peak 25 und 26).

Zur quantitativen Auswertung wurden die einzelnen Peak-Amplituden prozentual auf die Summe aller Amplituden bezogen. Dieses Vorgehen erscheint gerechtfertigt, da der FID eine vom Chlorgehalt weniger abhängige Empfindlichkeit aufweist im Gegensatz zum Elektronen-Einfangdetektor. Demnach besteht das eingesetzte Tetrachlorbiphenyl

[1] Mr. T. B. Gay, Research Department Monsanto Chemicals Ltd., Ruabon (England) danken wir für die massenspektrometrischen Analysen.

DSW 030040

STLCOPCB4014002

Tabelle 1. Qualitative Zusammensetzung des verabfolgten TCB und des aus dem Fettgewebe nach 4 Wochen extrahierten PCB, Hauptkomponente

Peak Nr.	Cl-Atome	TCB (%)	PCB (%) Fettgewebe
1			
2			
3			
4	2	0,4	
5	3	1,0	0,0
6	2	3,2	1,4
7	3	11,2	0,0
8	3	3,2	2,4
9	3	3,1	0,5
10	3	2,0	0,2
11/10	3,4	1,4	4,8
13	3,4	1,4	0,8
14	3,4	0,8	0
15	3	8,5	1,6
16	3	9,7	1,6
17	3	2,1	0,8
18	3,4	7,4	0,5
19*	3,4	7,4	—
20	3,4	6,0	7,0
21	3,4	4,5	4,1
22	4	3,1	0,3
23	4	2,6	0,4
24	3,4,5	0,8	—
25	4,5	1,2	1,0
26	4,5	1,0	—
27	4	0,2	—
28	4	5,0	5,3
29	4	3,3	2,0
30	4	2,0	0,4
31	4	2,1	0,5
32	4,5	1,0	2,9
33	4,5	0,5	29,0
34	4,5	0,5	1,4
35	4,5	0,8	—
36	5	1,0	1,7
37	5	0,4	1,4
38	6	< 0,1	0,1
39	4	< 0,1	0,1
40	6	0,2	11,0
41/42	5	0,3	1,1
43	5,6	0,2	8,0
44	6	< 0,1	5,3
45	6	0,2	0,9
46*	6,7	(0,7)	(1,1)

* überlagert vom Lösungsmittelpeak, nicht auswertbar

DSW 030041

STLCOPCB4014003

Tabelle 2. Relativer Anteil (%) verschieden hoch chlorierter Biphenyle im applizierten TCB und im PCB-Rückstand des Fettgewebes

Cl-Atome	TCB (%)	PCB (%) Fettgewebe
3	48,0	15,9
4	46,6	21,5
5	4,2	36,4
6 + (7)	1,2	26,2

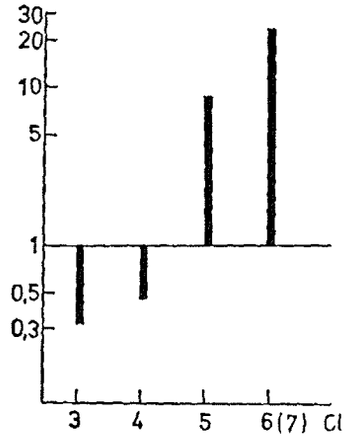

Abb. 1. Veränderungen des Anteils der Tri-Hexachlorbiphenyle des Fettgewebes im Vergleich zur Ausgangsverbindung. Anteile in Ausgangsverbindung gleich 1 gesetzt

zu 95% aus tri- und tetrachlorierten Verbindungen, nur 5% entfallen auf höhere chlorierte Komponenten.

4 Wochen nach i.p. Applikation von 1 g/kg TCB lassen sich meßbare PCB-Mengen aus dem Fettgewebe extrahieren. Für sämtliche 6 Tiere ergibt sich ein Mittelwert von 338 µg/g Fett (Extremwerte 282 µg/g und 422 µg/g). Die qualitative Zusammensetzung ist gegenüber der Ausgangsverbindung verändert, es erfolgt eine deutliche Verschiebung in den höher chlorierten Bereich (Tabelle 2).

Setzt man die Ausgangskonzentrationen der verschiedenen Chlorierungsgrade im applizierten TCB gleich 1, so sind nach 4 Wochen die Tri- und Tetrachlorverbindungen auf $^1/_2$ bis $^1/_3$ reduziert, während der Anteil der Penta- und Hexachlorverbindungen um den Faktor 10 bzw. 20 vermehrt ist (Abb. 1).

DSW 030042

STLCOPCB4014004

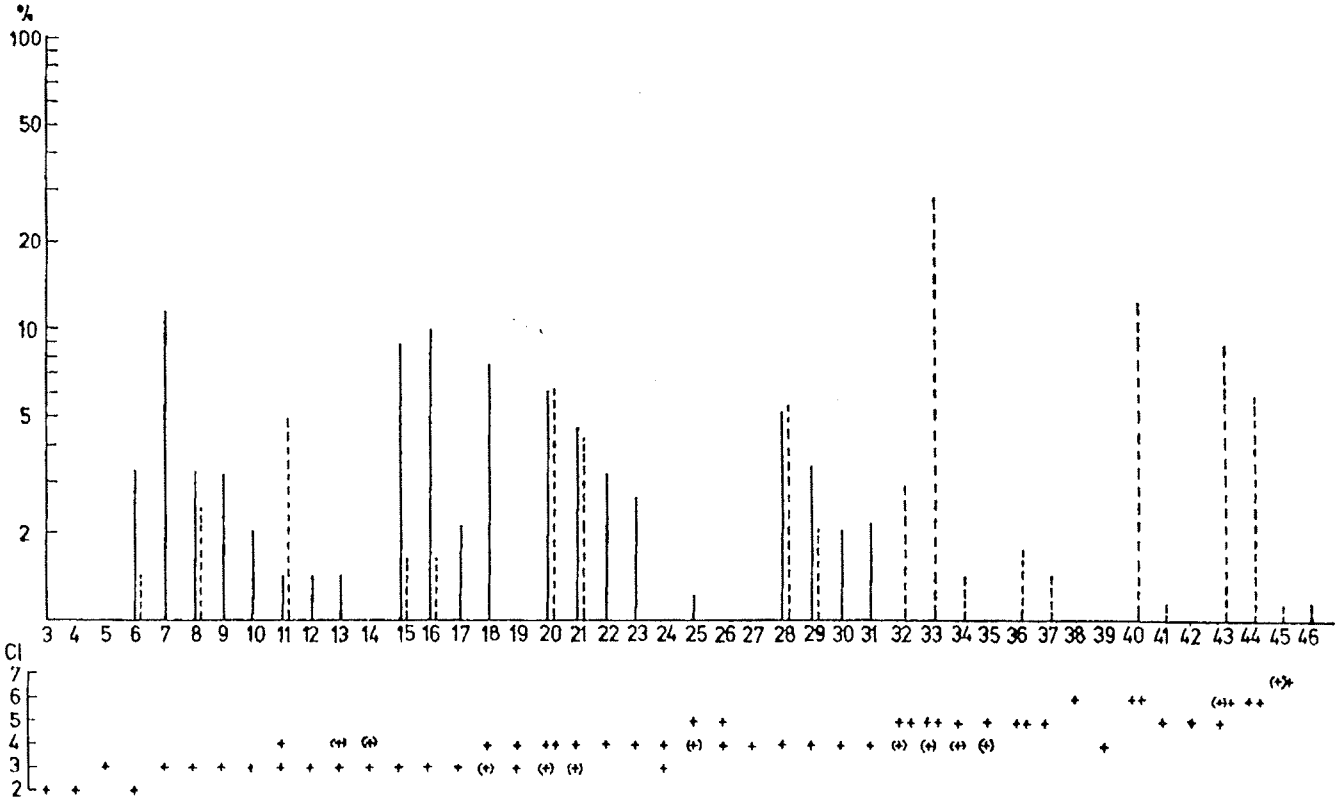

Abb. 2. Prozentuale Anteile der Peaks (3 bis 46) im Ausgangs-TCB (———) und im Rückstands-PCB (------) mit zugehöriger Zahl der Chloratome +, Nebenkomponenten (+), zusätzlich massenspektrometrische Chlorbestimmung im Rückstand + +. Anteile < 1 % vernachlässigt

DSW 030043

STLCOPCB4014005

Diskussion

Nach semiquantitativen Vergleichsanalysen in acht verschiedenen Gewebsproben der Ratte ist die PCB-Konzentration 24 Tage nach Applikation von Pentachlorbiphenyl im Fettgewebe zwölffach höher als die Summe der Konzentrationen in den übrigen Organen (Grant *et al.*, 1971; Benthe *et al.*, 1972 (1 u. 2)]. Die Konzentration im Fettgewebe kann somit als repräsentativ für den Gesamtorganismus angesehen werden.

Die in unseren Versuchen im Fettgewebe wiedergefundene PCB-Menge von 338 µg/g würde sich auf 126 µg/g reduzieren, wenn ein TCB verabfolgt wäre, das zuvor von dem höher chlorierten Anteil (5% mit Cl_5 und Cl_6) befreit wäre.

Die PCB-Akkumulation betrifft den höher chlorierten Bereich keineswegs gleichförmig, die sterische Anordnung der Cl-Atome ist offenbar von Bedeutung (Abb. 2). Unter den Pentachlorbiphenylen ist die fast selektive Speicherung der Verbindung auffallend, die durch Peak 33 dargestellt wird. Daneben gibt es Pentachlorbiphenyle, die metabolisierbar sind: Peak 25 — 26 — 35 — 42.

Der relative Anteil jedes einzelnen Isomeren im Bereich des Hexachlorbiphenyls lag in der Ausgangsverbindung unter 1%, außer Peak 38 werden alle Komponenten verstärkt, ebenfalls nicht gleichmäßig; selektiv besonders angereichert werden Peak 40 und 44 mit dem Faktor 45 bzw. 76.

Wenn sich der Gesamtanteil der Gruppe der Tri- und Tetrachlorbiphenyle deutlich vermindert, so ist im einzelnen die Metabolisierbarkeit unterschiedlich. Eindeutig angereichert wird nur ein Tetrachlorbiphenyl (Peak 11), in der Konzentration gleichbleibend sind drei Verbindungen (Peak 20 — 21 — 28), unter den Trichlorverbindungen erweist sich nur Peak 8 als relativ persistent.

Aus den dargestellten Untersuchungen darf gefolgert werden, daß bei Umweltcontamination mit technischen Produkten niedrig chlorierter Biphenyle (Di- bis Tetrachlor-) nur die höher chlorierten Anteile akkumulieren, d. h. ihr relativer Anteil am PCB-Gesamtgemisch ist im Rückstandsmaterial um ein Vielfaches höher als in der applizierten Ausgangsverbindung. Somit können auch niedrig chlorierte Biphenylgemische zu den bekannten PCB-Mustern in Rückstandsanalysen beitragen. Gemessen an der Metabolisierbarkeit im Säugetierorganismus ergibt sich weiterhin, daß das im Vergleich zum Trichlorbiphenyl technisch vorteilhaftere Tetrachlorbiphenyl im Hinblick auf Umweltbelastung eher vertretbar sein dürfte, wenn es durch Destillation von den höher chlorierten Komponenten völlig befreit wird.

DSW 030044

STLCOPCB4014006

Literatur

Bagley, G. E., Reichel, W. L., Cromartie, F.: Identification of polychlorinated biphenyls in two bald eagles by combined gas-liquid chromatography mass spectrometry. J. Ass. Offic. Anal. Chem. **53**, 251 (1970).

Bailey, S., Bunyan, P. J.: Interpretation of persistence and effects of polychlorinated biphenyls in birds. Nature (Lond.) **236**, 34 (1972).

Benthe, H. F., Knop, J., Schmoldt, A.: Aufnahme und Verteilung nach Inhalation polychlorierter Biphenyle (PCB). Arch. Toxikol. **29**, 85 (1972).

Benthe, H. F., Schmoldt, A., Schmidt, H.: Induktion mikrosomaler Leberenzyme nach einmaliger Gabe von polychlorierten Biphenylen (PCB) und anschließender Stress-Situation. Arch. Toxikol. **29**, 97 (1972).

Duke, T. W., Lowe, J. J., Wilson, A. J., Jr.: A polychlorinated biphenyl (Arochlor 1254) in the water, sediment and biota of Escambia Bay, Florida. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **5**, 171 (1971).

Grant, D. L., Phillips, W. E., Villeneuve, D. C.: Metabolism of a polychlorinated Biphenyl (Arochlor 1254) mixture in the rat. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **6**, 102 (1971).

Malec, E. J.: Improved open tubular gas chromatographic columns for use at 250 °C and above. J. Chromatogr. Sci. **9**, 318 (1971).

Stanley, R. L., LeFavoure, H. T.: Rapid digestion and cleanup of animal tissues for pesticide Residue analysis. J. Ass. Offic. Anal. Chem. **48**, 666 (1965).

Professor Dr. H. F. Benthe
Pharmakologisches Institut
der Universität Hamburg
D-2000 Hamburg 20
Martinistraße 52
Bundesrepublik Deutschland

DSW 030045

STLCOPCB4014007