Chemosphere No. 3, pp 161 - 168, 1975. Pergamon Press. Printed in Great Britain.

BEITRÄGE ZUR ÖKOLOGISCHEN CHEMIE C[1]

AUSSCHEIDUNG, SPEICHERUNG UND METABOLISIERUNG VON 2,4,6,2',4'-PENTACHLORBIPHENYL-^{14}C NACH LANGZEITFÜTTERUNG AN RATTEN

J.P. Lay, W. Klein und F. Korte
Institut für ökologische Chemie der
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München
D-5205 St. Augustin 1

und

Institut für Chemie der
Technischen Universität München
D-805 Freising-Weihenstephan

(Received in Germany 13 May 1975; received in UK for publication 19 May 1975)

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit der Zielsetzung durchgeführt, die Kenntnisse über das Verhalten und die Umwandlung von polychlorierten Biphenylen im Tierorganismus zu erweitern. Als Modellsubstanz für diesen Test wählten wir das 2,4,6,2',4'-Pentachlorbiphenyl, das mit seinem Chlorierungsgrad von 50% zu den Substanzen zählt, deren ubiquitäres Vorkommen auf erhöhte Persistenz, bzw. niedrige Abbaurate, zurückgeführt wird. Dies beruht auf der erschwerten Substitution mehrfach chlorierter aromatischer Systeme. Speziell dieses Isomere wurde ausgewählt, da es nach Lit. [2] zu den schwerer abbaubaren höher chlorierten Biphenylen gehört (freie o- und m-Position). Das hier untersuchte Isomere ist Bestandteil vieler technischer PCB.

MATERIAL UND METHODEN

Tierhaltung und Oralapplikation

Je 4 männlichen und weiblichen Ratten (Durchschnittsgewicht 100 g) wurden mit Hilfe einer Magensonde fünf Wochen lang täglich je 50 µg 2,4,6,2',4'-Cl_5-Biphenyl-^{14}C [3] (entsprechend ca. 2 ppm in der Diät oder ca. 0,5 ppm bezogen auf Körpergewicht) jedem Individuum appliziert.

Die Versuchstiere wurden einzeln in Metabolismuskäfigen gehalten, die eine Fütterung ad libitum und ein separates Auffangen von Faeces und Urin gestatteten.

---

[1] IC. Mitteilung: P. Bartl und F. Korte, Chemosphere im Druck.

MONS 084376

Die Stammlösung zur Applikation des Pentachlorbiphenyls-^{14}C, spez. Aktivität 0,36 mCi/mMol, radiochemische Reinheit > 99%, wurde auf Lutrolbasis mit 5% Äthanolzusatz hergestellt, wodurch einerseits ein gutes Lösungsvermögen für das Biphenyl und andererseits eine hohe Resorption im Magen-Darm-Trakt der Ratten erzielt wurde.
Nach 2 Wochen Fütterungszeit wurden je ein männliches und ein weibliches Tier wegen Wachstumshemmungen und Futterverweigerung von der weiteren Behandlung ausgeschlossen. Die übrigen 6 Tiere zeigten bis zum Versuchsende ein normales Wachstum im Vergleich zu den gehaltenen Kontrolltieren. Als Diät wurden Altromin ^{R} und Weizen (1 : 1) angeboten.

Eine GC-MS-Analyse aus Extrakten beider Futterarten zeigte, daß sie Hexachlorbenzol und Hexachlorbutadien enthielten. Die Konzentrationen betrugen für das Hexachlorbenzol ca. 0,02 - 0,025 ppm, für das Hexachlorbutadien 0,03 ppm. Im Weizen wurden ferner Spuren eines Hexachlorbiphenyls nachgewiesen.

Faeces und Urin wurden täglich nach Geschlechtern getrennt gesammelt. Ihre Radioaktivität wurde täglich durch Szintillationszählung gemessen. Vier Tage nach der letzten Applikation (34. Versuchstag) wurden alle Ratten getötet und seziert.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität in den Faeces und in den Organen vor und nach Extraktion wurde nach Verbrennen eines aliquoten, luftgetrockneten Anteils durch $^{14}CO_2$-Szintillationszählung ermittelt (Oximat Intertechnique, Scintillator auf Toluolbasis). Die Radioaktivität im Urin wurde durch Direktmessung einer Probe im Szintillationszähler gemessen (Tri-Carb Mod. 3375 bzw. 3380, Packard; Scintillator auf Dioxanbasis). Ebenso wurde die Radioaktivität der methanolischen Faecesextrakte, die Methylenchlorid-Extrakte des Urins, die methanolischen Organextrakte und die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten radioaktiven Zonen gemessen. Die Dünnschichtchromatogramme und die präparativen Schichtchromatogramme wurden mit DC-Scanner ausgewertet (Berthold/Frieseke Mod. LB II 2722).

Aufarbeitung der Exkremente und Isolierung von Metaboliten

Der ausgeschiedene Urin wurde im Perforator kontinuierlich über 24 h bei natürlichem pH und weitere 24 h bei pH 1 mit Methylenchlorid extrahiert. Die Extraktionsausbeute betrug insgesamt 30 - 40% der enthaltenen Radioaktivität. Die luftgetrockneten Faeces wurden in einer Haushaltsmühle zerkleinert und im Soxhlet 48 h mit Methanol extrahiert. Hierbei wurden 88,5% der vorhandenen Radioaktivität extrahiert.

Die biologische Matrix der Faecesextrakte konnte durch Säulenchromatographie weitgehend abgetrennt werden (Säule: Länge: 120 cm, Durchmesser: 8 cm, Füllung: 2 kg Silicagel, Laufmittel: Hexan, Essigester).

MONS 084377

Zu Beginn der chromatographischen Untersuchungen der Urinextrakte wurden präparative 2 mm Kieselgelplatten (Merck) - später selbstgefertigte Kieselgel-Dünnschichtplatten - benutzt. Als Fließmittel wurde jeweils n-Hexan verwendet.

Aus den Faecesextrakten konnten mit Hilfe der DC und n-Hexan bzw. Hexan/Benzol als Laufmittel 3 radioaktive Zonen isoliert werden. Die unpolarste Zone (V in Tab. 1) war Rf-identisch mit dem applizierten Ausgangsprodukt. Die hydrophilste Zone (III in Tab. 1) zeigte nach Methylierung mit Ag_2O/CH_3J eine Verminderung ihrer Polarität. Im Urinextrakt wurden 4 radioaktive Zonen nachgewiesen, von denen keine mit dem Ausgangsprodukt chromatographisch identisch war (I - IV in Tab. 1). Mit den Zonen I - III wurden Derivatisierungsreaktionen durchgeführt. Die Zonen I und II wurden hydrolysiert (12-stündiges Erhitzen auf 80° mit 1/2 konz. HCl), mit Äther extrahiert und anschließend mit CH_3J/Ag_2O methyliert. Zone III wurde ebenfalls mit CH_3J/Ag_2O methyliert.

Tab. 1 zeigt die DC-Rf-Werte der Zonen vor und nach Versuchen zur Derivatisierung.

Tab. 1 DC-Rf-Werte radioaktiver Zonen im Urinextrakt vor und nach Derivatisierung (Kieselgel-Fertigplatten, Merck)

Radioaktive Zone Nr.	Rf-Wert (Laufmittel: Hexan/Benzol 2:1)	Rf-Wert nach Hydrolyse des Stärks (Laufmittel: Benzol/Essigester 10:1)	Rf-Wert nach Methylierung (Laufmittel: Benzol)
I Urin	Start	0,40	0,20
II Urin	Start	0,50	0,28
III Urin + Faeces	0,58	-	0,62
IV Urin + Faeces	0,73	-	-
V Faeces	0,86	-	-

Nach mehrmaliger DC-Reinigung wurden die radioaktiven Zonen gaschromatographisch analysiert (Gaschromatograph Fractovap G I von Carlo Erba, ECD, Glassäule 2 m Länge mit der Füllung: 1 % OV 1 auf Chromosorb W-AW-DMCS, Trägergas: N_2).

Die anschließende GC-MS-Analyse wurde mit dem Massenspektrometer Typ LKB 9000, der Firma LKB Bromma Schweden, ausgeführt (Säule 3 m, Füllung w.o., Trägergas Helium).

MONS 084378

Aufarbeitung der Gewebe und Organe

Die Gewebe und Organe wurden nach der Radioaktivitätsbestimmung durch Verbrennung 48 Std. im Soxhlet mit Methanol extrahiert. Nach Bestimmung der Radioaktivität in den Extrakten und in den extrahierten Rückständen wurden die Extrakte eingeengt, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Anteile an Ausgangsprodukt und Metaboliten bestimmt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ausscheidung und Verteilung

Im Verlauf der 34-tägigen Oralapplikation von 2, 4, 6, 2', 4' -Cl_5-Biphenyl an Ratten wurden von den männlichen und weiblichen Tieren zusammen 42, 52% der applizierten Gesamtmenge renal und faecal ausgeschieden. Für die Geschlechter getrennt wurden die in Tab. 2 aufgezeichneten Werte gefunden.

Tab. 2 Ausscheidung der Radioaktivität während 34 Tagen Oralapplikation von 2, 4, 6, 2', 4' -Pentachlorbiphenyl-^{14}C

	♂♂		♀♀	
Probe	% der applizierten Radioaktivität	% der ausgeschiedenen Radioaktivität	% der applizierten Radioaktivität	% der ausgeschiedenen Radioaktivität
Faeces	34, 14	78, 33	29, 42	72, 97
Urin	10, 59	23, 67	10, 89	27, 03
Gesamt	44, 73	100, 00	40, 31	100, 00

Der Verlauf der Radioaktivitätsausscheidung ist aus den Abbildungen 1 und 2 ersichtlich. Abb. 1 zeigt die tägliche Ausscheidung als % der täglich applizierten Dosis. Die renal ausgeschiedene Radioaktivität weist nach 7-tägiger Applikation keine deutliche Steigerung mehr auf, d.h. sie bleibt für die übrige Applikationszeit fast konstant.

Zeichnet man den prozentualen Anteil der Summe der täglichen Ausscheidung an Radioaktivität gegen die Summe der täglich gegebenen Dosen (Abb. 2), so erreicht die Kurve der Totalausscheidung der männlichen Tiere bereits am 7. Tag der Applikation einen Wert von 34% und steigt bis zum 34. Tag nur um weitere 10% auf den Endwert von 44% an.

Bei Anwendung desselben Berechnungsprinzips verläuft die Ausscheidungskurve der weiblichen Ratten noch flacher als diejenige der männlichen Tiere. Hier ist am 7. Applikationstag bereits ein Wert von 34, 5% erreicht, der sich bis zum 34. Tag lediglich um 6% erhöht.

MONS 084379

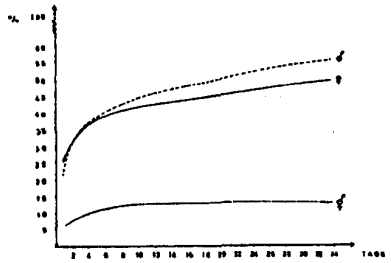


Abb. 1 Tägliche Ausscheidung als % der täglich applizierten Dosis (... renal ausgeschiedene Radioaktivität, --- faecal ausgeschiedene Radioaktivität ♂♂, —— faecal ausgeschiedene Radioaktivität ♀♀)

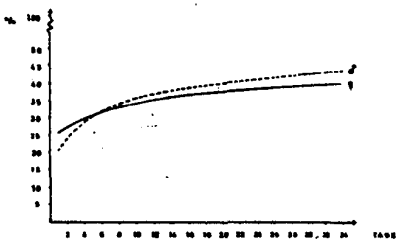


Abb. 2 Summe der ausgeschiedenen Radioaktivität als % der insgesamt applizierten Radioaktivität

Nach Beendigung der Oralapplikation betrug die Summe der wiedergewonnenen Radioaktivität in Organen und Exkrementen für die männlichen Tiere 86,57% - für die weiblichen Ratten 88,04% - bezogen auf die gegebene Totaldosis. Die nachstehende Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Speicherung an Pentachlorbiphenyl bzw. Metaboliten in den analysierten Organen.

MONS 084380

Tab. 3 Speicherung von Radioaktivität nach Oralapplikation von 2,4,6,2',4'-Pentachlorbiphenyl-^{14}C an Ratten (µg und ppm äquivalent zu Pentachlorbiphenyl)

Organspecies	Gehalt an ^{14}C für 3 Individuen in µg	Gehalt in ppm
Urogenitalsystem ♂	76,15	12,692
" ♀	576,66	30,511
Magen- und Darminhalt ♂	93,07	12,087
" ♀	136,09	17,227
Leber ♂	209,17	6,116
" ♀	193,95	6,042
Lunge ♂	126,78	11,960
" ♀	108,82	14,706
Herz ♂	22,77	6,324
" ♀	12,11	4,176
Nieren ♂	51,10	11,883
" ♀	64,82	12,964
Fell ♂	1006,65	5,749
" ♀	1069,20	7,128
Muskelfleisch ♂	333,54	1,602
" ♀	386,98	1,225
Fettgewebe ♂	803,15	25,998
" ♀	734,83	22,750

Umwandlung

Obwohl die Ausgangssubstanz, ein Vertreter der höher chlorierten Biphenyle, als schwer metabolisierbar angesehen wurde [2], wurden in Urin, Faeces und einigen Organen wechselnde Mengen Metaboliten nachgewiesen, die alle hydrophiler waren als das Ausgangsprodukt.

Nach Extraktion der Organe mit Methanol und dünnschichtchromatographischer Analyse der radioaktiven Extrakte wurde in allen Proben mit Ausnahme von Leber, Niere und Darminhalt das Cl_5-Biphenyl unverändert nachgewiesen.

In den Faeces bestand die extrahierbare Radioaktivität (88,5% der vorhandenen) etwa zur Hälfte aus Metaboliten, im Urin (30 - 40% extrahierbar) ausschließlich aus hydrophilen Umwandlungsprodukten.

Die Zusammensetzung der Radioaktivität in den einzelnen Extrakten von Faeces, Urin und Organen ist in Tabelle 4 dargestellt.

MONS 084381

Tab. 4 Prozentuale Zusammensetzung der Radioaktivität in den Extrakten von Organen und Exkrementen von Ratten nach Oralapplikation von ^{14}C-Cl_5-Biphenyl nach DC-Auftrennung.

Probe		Zone I Konjugate	Zone II	Zone III Phenol	Zone IV Phenoläther	Zone V Ausgangssubstanz
Dichlormethanextr. Urin	♂	9,5	18,5	65,7	6,3	n.n.
	♀	11,4	17,9	64,9	5,8	n.n.
Methanolextr. Faeces	♂	n.n.	n.n.	39,7	12,2	48,1
	♀	n.n.	n.n.	41,8	13,2	45,0
Methanolextr. Organe ohne Leber, Niere, Darminhalt	♂♀	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	100

Isolierung und Strukturaufklärung von Metaboliten

Die Isolierung und Strukturbestimmung von Metaboliten wurde mit den Substanzen der Zonen III und IV aus Faeces und Urin durchgeführt, da diese allein nach der chromatographischen Reinigung in genügend großer Menge zur Verfügung standen. Zone III zeigte nach Methylierung mit Ag_2O/CH_3J dieselben gas- und dünnschichtchromatographischen Eigenschaften wie Zone IV. Von beiden Substanzen wurden identische Massenspektren mit folgenden Fragmentionen erhalten:

m/e 354 Molpeak $C_{13}H_7OCl_5$ (100%), m/e 339 M - CH_3 (51%), m/e 311 M - CO - CH_3 (35%), m/e 304 M - CH_3 - Cl (21%), m/e 276 M - CO - CH_3 - Cl (13%), m/e 241 M - CH_3 - CO - Cl - Cl (34%).

Aus den gefundenen massenspektrometrischen Daten wird für die Substanz der Zone III die Struktur eines Monohydroxy-2, 4, 6, 2', 4' -Pentachlorbiphenyls, für Zone IV das entsprechende Methoxyderivat vorgeschlagen.

Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse der Langzeitfütterung mit Pentachlorbiphenyl an Ratten zeigt, daß während 34 Tagen die Speicherungsraten einen höheren Wert als die Ausscheidungsraten aufweisen. Bezogen auf die Gesamtapplikation wurden für die weiblichen Tiere 47,73% Speicherung (gemessen durch Analyse der Körper) gegenüber 40,31% Gesamtausscheidung - für die männlichen Tiere 51,84% Speicherung gegenüber 44,73% Ausscheidung - gemessen. Die ausgeschiedene Radioaktivität bestand zum größten Teil aus Metaboliten (ca. 60%).

MONS 084382

Die Resultate verdeutlichen den geringen Unterschied zwischen den Tiergeschlechtern hinsichtlich ihrer Ausscheidungs-, Speicherungs- und Metabolisierungsraten. Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen gleichartiger Untersuchungen mit niedrig chlorierten Biphenylen im Warmblüterorganismus [4], so bestätigt das untersuchte Beispiel, daß bei entsprechender Exposition die höher chlorierten Biphenyle (> 50% Chlorgehalt) aufgrund ihrer langsamen Ausscheidung und Umwandlung eine höhere stoffliche Belastung für die belebte Umwelt darstellen.

DANKSAGUNG

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie wird für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des koordinierten Forschungsprogramms "Polychlorierte Biphenyle in der Umwelt" gedankt.

LITERATUR

1 IC. Mitteilung: P. Bartl und F. Korte, Chemosphere im Druck
2 E. Schulte und L. Acker, Naturwiss. 61, 79 (1974)
3 R. Ismail, unveröffentlicht
4 M. Kamal, unveröffentlicht

Im Rah
wichtig
Sencor
breite
Zahlr
Substar
reaktio
Reihe

Neben
Struktu
streber

ERGEB

1. Best
Um au
Struktu

MONS 084383