

TESTSYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DER METABOLISIERUNG VON PFLANZENSCHUTZMITTELN IN ZUCHTFISCHEN

TEST SYSTEM TO STUDY THE METABOLISM OF PESTICIDES IN FARMED FISH

Metabolismusstudien an Nutztieren

Metabolismusstudien an Nutztieren bestimmen die Rückstände von Pflanzenschutzmitteln (PSM) und sind erforderlich, wenn ein PSM in Nutzpflanzen zum Einsatz kommt, deren Teile oder Produkte zur Erzeugung tierischer Nahrungsmittel verwendet werden. Metabolismusstudien an Wiederkäuern und Geflügel sind bereits Teil der PSM-Regulation. Auf Grund des steigenden Anteils pflanzlicher Rohstoffe in Aquakulturdiäten werden jedoch Metabolismusstudien auch für (Süßwasser-) Fische wie Regenbogenforelle oder Karpfen erforderlich, wenn an diese Pflanzen verfüttert werden, die mit PSM mit einem $\log K_{ow} > 3$ behandelt wurden. Metabolismusstudien werden normalerweise mit radioaktiv markierten Substanzen durchgeführt, um die Detektion und die Identifikation unbekannter Metabolite zu ermöglichen und die Effizienz von Extraktionsverfahren für diese chemischen Komponenten zu testen. Nach Überprüfung der Art und Höhe von Rückständen in tierischen Produkten wie Fleisch, Milch oder Eiern sind weitere Fütterungsstudien an den jeweiligen Nutztieren erforderlich. Diese Fütterungsstudien werden in der Regel mit nicht radioaktiv markiertem Testmaterial und an einer größeren Gruppe von Tieren vorgenommen, um notwendige Daten zur Bestimmung für Höchstrückstandsgehalte tierischer Produkte zu bestimmen.

Fischmetabolismusstudien: Eine methodische Herausforderung

Richtlinien zu Metabolismus- (und Fütterungs-) Studien für Wiederkäuer, Geflügel und Schweine sind verfügbar, sie sind aber auf Grund der Unterschiede in der Umwelt und den Haltebedingungen der Tiere auf Fische nicht voll anwendbar. Radioaktiv markiertes Testmaterial ist unter aquatischen Bedingungen schwierig anzuwenden. Außerdem entstehen durch Metabolismusstudien große Mengen kontaminierten Wassers, die durch eine leistungsstarke Filtertechnologie behandelt werden müssen. Testfuttermittel, die mit radioaktiv markiertem Testmaterial ($\log K_{ow} > 5$) angereichert sind, müssen stabilisiert

werden, um das Herauslösen der Testsubstanz aus den Futterpellets vor der Aufnahme durch die Versuchstiere zu verhindern. Im Gegensatz zu im Rahmen der PSM-Regulation allgemein üblichen Testverfahren (z. B. OECD TG 305) werden Fischmetabolismusstudien mit Tieren von Schlachtgröße durchgeführt, um die Analyse von Rückständen im Fischprodukt (Filet) zu ermöglichen und ausreichend Gewebematerial für die Identifikation radioaktiv markierter Metaboliten zu liefern.

Ein neues Testsystem für Fischmetabolismusstudien

Im Fraunhofer IME wurde ein neues Testsystem etabliert, das die Durchführung von Fischmetabolismusstudien ermöglicht. Experimente können unter statischen oder Durchflussbedingungen in großen Tankeinheiten (2 m³) durchgeführt werden. Alle Tanks sind mit einem starken Filtersystem ausgestattet, um die Akkumulation gelöster Testsubstanz und ausgeschiedener Metabolite im Wasser während der Metabolismusstudien zu vermeiden und eine Bilanzierung der Radioaktivität im Durchfluss zu ermöglichen. Das Testsystem erfüllt alle Qualitäts- und Sicherheitserfordernisse für Studien im Rahmen der PSM-Registrierung, bei denen ¹⁴C-markierte Substanzen zum Einsatz kommen. Karpfen und Regenbogenforelle stehen als Versuchstiere zur Verfügung. Stabilisierte und mit radioaktiver Substanz angereicherte Versuchsfuttermittel können vor Ort hergestellt werden. Die Probenaufbereitung und analytischen Untersuchungen werden im IME Schmallenberg durchgeführt. Modernste analytische Geräte für die Detektion und Identifikation von PSM-Metaboliten inklusive LC/MS und NMR-Technologie stehen zur Verfügung.

Kompletter Service von der Futterzubereitung bis zur Gewebeanalyse

Mit dem neuen Testsystem für Fischmetabolismus bietet das Fraunhofer IME alle Dienstleistungen zur Durchführung von Fischmetabolismusstudien an, die im Rahmen der PSM-Registrierung erforderlich sind.



Metabolism studies in food producing animals

Metabolism studies in food-producing animals can estimate the levels of plant protection product (PPP) residues in edible products, and must be performed when a PPP is used in crops that are used to feed livestock. Metabolism studies in ruminants and poultry are required under current regulations. However, due to the increasing proportion of plant-derived materials in aquaculture diets, metabolism studies in (freshwater) fish such as rainbow trout or carp will also be required when PPPs of $\log K_{ow} > 3$ are used in crops fed to farmed fish. Metabolism studies are normally carried out using a radiolabeled active substance to enable the detection and identification of unknown major metabolites and to verify the efficiency of extraction procedures. This initial assessment determines the nature and abundance of the residues in food commodities, such as meat, milk and eggs. Subsequent livestock feeding studies are usually required, in which unlabeled test material is fed to a larger group of animals to provide the data necessary to establish maximum residue levels for food products of animal origin.

Technical challenges involved in fish metabolism studies

Guidance documents on metabolism (and feeding) studies for ruminants, poultry and pigs are available, but these are not fully applicable to fish because of differences in the environment and husbandry conditions. Radiolabeled test material is difficult to apply under aquatic conditions. Large volumes of contaminated water result from metabolism studies and need to be treated using powerful filter technology. Experimental diets enriched with radiolabeled test material ($\log K_{ow} < 5$) need to be stabilized to avoid leaching of the test compound from the fish-feed pellets prior to ingestion by the experimental animals. In contrast to common regulatory testing procedures (e.g. OECD TG 305), fish metabolism studies need to be carried out with larger animals of marketable size to allow the analysis of residues in the fish product (filet) and to provide sufficient tissue for the identification of radiolabeled metabolites.

A new test system for fish metabolism studies

A new test system developed at the Fraunhofer IME provides the technology to carry out fish metabolism studies with animals up to marketable size. Experiments can be performed under static or flow-through conditions in large tank units (2 m³). All tanks are equipped with strong filter systems to avoid the accumulation of dissolved test substances and excreted metabolites in the water during the metabolism studies. A balance of radioactivity is possible even under flow-through conditions. The test system meets all quality and safety requirements for registration studies using ¹⁴C-labeled compounds. Common carp and rainbow trout are available as test organisms. Stabilized experimental diets enriched with radiolabeled test substances can be prepared on site. Sample preparation and analytical investigations are carried out at the IME Schmalenberg. State-of-the-art analytical equipment is available for the detection and identification of PPP metabolites, including LC/MS and NMR technology.

Full service from feed preparation to tissue analysis

With the new test system for fish metabolism studies, Fraunhofer IME provides a complete service to carry out regulatory testing procedures related to the metabolism of pesticides in farmed fish.

Contact / Ansprechpartner

Dr. Christian Schlechtriem
 Tel: +49 2972 302 - 186
 christian.schlechtriem@ime.fraunhofer.de

Dr. Dieter Hennecke
 Tel: +49 2972 302 - 209
 dieter.hennecke@ime.fraunhofer.de

Figure 1: Rainbow trout

Figure 2: LC/MS - LTQ OrbitrapTMHybrid FT Mass Spectrometer