

Untersuchung der Aufnahme von luftgetragenen Herbiziden  
aus wässrigen Lösungen und Driftrückständen in die Nadeln  
der Waldkiefer *Pinus Sylvestris* L.

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der  
Fakultät Nachhaltigkeit der Leuphana Universität Lüneburg

vorgelegt von

**Diplom Umweltwissenschaftler**

**Andreas Fleischer**

aus Coburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Ing. Wolfgang Ruck
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Ebinghaus

Dortmund 2013

Der praktische Teil dieser Dissertation wurde in der Zeit von November 2004 bis August 2008 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ing. Wolfgang Ruck am Institut für nachhaltige Chemie und Umweltchemie der Leuphana Universität Lüneburg angefertigt.

## **Dank**

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern, Auszubildenden und Praktikanten der Arbeitsgruppe Umweltchemie, die mir während der Anfertigung des praktischen Teils dieser Arbeit die besten Kollegen waren, die man sich vorstellen kann. Ich danke

Herrn Prof. Dr. Ing. Wolfgang Ruck für die Betreuung meiner Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen, die mir die Umsetzung dieses Themas ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Ralf Ebinghaus für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme der Rolle als zweiter Gutachter.

Herrn Dr. Wolf-Ulrich Palm für die engagierte und erstklassige wissenschaftliche Betreuung, seine Offenheit und Hilfsbereitschaft.

Meinen Diplomandinnen Ann-Kathrin Stark, Isabell Zunker und Angelika Klugkist, deren Diplomarbeiten ich begleiten durfte. Die Versuche, die wir zusammen planten und durchführten haben entscheidend zu den Ergebnissen dieser Dissertation beigetragen, einige Verweise dazu finden sich auf den folgenden Seiten.

Frau Dr. Dana Rühl für ihre Hilfsbereitschaft, eine komplette Dissertation korrekturlesen.

Ganz besonders danke ich Simone Grätz, meinen Eltern und allen Freunden, die mich immer unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

1 Gegenstand der Arbeit und Ergebnisse.....	11
2 Einleitung.....	14
3 Stand des Wissens.....	20
3.1 Rechtliche Grundlagen.....	20
3.2 Einfluss von Herbiziden auf Nichtzielpflanzen.....	23
3.3 Pestizidemissionen aus landwirtschaftlichen Flächen.....	25
3.3.1 Spraydrift.....	26
3.3.2 Volatilisation.....	28
3.4 Atmosphärischer Transport.....	29
3.5 Deposition von Luftschadstoffen auf Kiefernadeln.....	30
3.6 Verteilungsverhalten an Pflanzenoberflächen und kutikulärer Transport.....	32
3.7 Translokation und Metabolismus von Isoproturon.....	35
3.8 Probenaufbereitung.....	37
3.8.1 Extraktion der Herbizide aus den Nadelkompartimenten.....	37
3.8.2 Extraktion der verbleibenden Nadel oder intakter Nadeln.....	38
3.8.3 Aufreinigung von Extrakten epikutikulärer Wachse und Kiefernadeln.....	39
3.9 Untersuchte Herbizide und Kriterien für deren Auswahl.....	40
4 Experimentelles.....	43
4.1 Probenvorbereitung.....	43
4.1.1 Probenahme.....	43
4.1.2 Bestimmung der Trockenmasse.....	45
4.1.3 Extraktion epikutikulärer Wachse.....	45
4.1.4 Charakterisierung von epikutikulären Wachsextrakten: Gehalt an Chlorophyll und Harzsäuren.....	46
4.1.5 Extraktion gesamter oder nach der Extraktion der Wachsschicht verbleibender Nadeln.....	49
4.1.6 Probenanreicherung und Aufreinigung.....	51
4.1.6.1 Ausfrieren der Wachse, Einengen und Verdünnen mit Wasser.....	54
4.1.6.2 Festphasenextraktion.....	55
4.2 Methodenentwicklung: Massenspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie.....	58
4.3 Modellversuche zur Adsorption/Desorption und zum Herbizidtransport in Kiefernna-	

deln.....	59
4.3.1 Rekonstituiertes epikutikuläres Wachs und wässrige Phase: Adsorption - Desorption.....	61
4.3.2 Intakte Koniferennadeln und wässrige Phase: Adsorption - Desorption.....	66
4.3.2.1 Verteilungsversuch mit 13 lipophilen Herbiziden - parallele Ansätze der wässrigen Phase.....	67
4.3.2.2 Serieller Verteilungsversuch mit 49 Herbiziden in einem großvolumigen Ansatz .....	72
4.3.3 Applikation von Isoproturon in definierter Wirkstoffmenge und Tröpfchenvolumen: kompartmentelle Charakterisierung der Herbizidverteilung.....	76
4.3.3.1 Überblick zum Versuchsablauf.....	76
4.3.3.2 Bestimmung der Wiederfindung und Kalibration.....	77
4.3.3.3 Vorbereitung der Verteilungsversuche.....	79
4.3.3.4 Versuchsdurchführung.....	83
4.3.3.5 Dokumentation der Versuchsbedingungen.....	88
4.3.3.6 Untersuchung der Translokation innerhalb der Nadeln und Zweige.....	91
4.3.3.7 Untersuchung der Volatilisation.....	94
5 Ergebnisse.....	99
5.1 Auswertung von Konzentrationsverläufen und Berechnung von Verteilungskoeffizienten.....	99
5.1.1 Auswertung der Konzentrationsverläufe.....	99
5.1.2 Berechnung von Verteilungskoeffizienten.....	102
5.2 Probenvorbereitung und Analytik.....	104
5.3 Modellversuche zur Adsorption/Desorption und zum Herbizidtransport in Kiefernnadeln.....	114
5.3.1 Rekonstituiertes epikutikuläres Wachs und wässrige Phase: Adsorption - Desorption.....	114
5.3.2 Verteilungsversuch mit 13 lipophilen Herbiziden - parallele Ansätze der wässrigen Phase.....	116
5.3.3 Serieller Verteilungsversuch mit 49 Herbiziden in einem großvolumigen Ansatz .....	119
5.3.4 Applikation von Isoproturon in definierter Wirkstoffmenge und Tröpfchenvolumen: kompartmentelle Charakterisierung der Herbizidverteilung.....	122

5.3.4.1 Verteilungsverhalten des Wirkstoffs Isoproturon in der wässrigen Phase und in den epikutikulären Wachsen.....	123
5.3.4.2 Untersuchung der nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln.....	128
5.3.4.3 Translokation in Nadeln und Zweigen.....	129
5.3.4.4 Volatilisation.....	130
6 Diskussion.....	135
6.1 Adsorption und Desorption von Terbuthylazin an rekonstituiertem epikutikulärem Wachs.....	135
6.2 Adsorption und Desorption aus der wässrigen Phase an intakten Kiefernadeln.....	136
6.3 Applikation von Isoproturon in definierter Wirkstoffmenge und Tröpfchenvolumen: kompartimentelle Charakterisierung der Herbizidverteilung.....	142
6.3.1 Nach 48 Stunden auf der Oberfläche der Kiefernadeln verbliebenes Isoproturon: Rolle der Volatilisation.....	143
6.3.2 Masse des Isoproturons in der epikutikulären Wachsschicht und der wässrigen Phase während der Desorption.....	146
6.3.3 Abbauprodukte in der wässrigen Phase und epikutikulären Wachsschicht.....	147
6.3.4 Untersuchung der nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln und der Translokation.....	147
6.4 Fazit.....	148
7 Literaturverzeichnis.....	150
8 Anhang.....	159
8.1 Chemikalien und Geräte.....	159
8.2 Chromatographische Methoden.....	163
8.3 Konzentrationsverläufe des Verteilungsversuches: parallele Ansätze der wässrigen Phase.....	166
8.4 Kalibration des Verteilungsversuches: parallele Ansätze der wässrigen Phase.....	170

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: In Deutschland in Verkehr gebrachte Pflanzenschutzmittel (Daten entnommen aus Bvl 2012).....	14
Abbildung 2: Abdrifteckwerte im Ackerbau, Daten entnommen aus: Jki 2006.....	28
Abbildung 3: Literaturrecherche zur Priorisierung von Herbizidwirkstoffen anhand Tonnage, Nachweis in der Umwelt und Polarität.....	42
Abbildung 4: Trennen der Kiefernnadeln vom Zweig.....	44
Abbildung 5: anhand der jeweiligen Massenspektren identifizierte charakteristische Harz- und Wachsbestandteile.....	49
Abbildung 6: Übersicht des Verfahrens zur Aufbereitung der in den Verteilungsversuchen (Abschnitte 4.3.3) anfallenden Proben.....	53
Abbildung 7: Beschichtung eines HPLC-Vials mit rekonstituiertem epikutikulärem Wachs im Rotationsverdampfer.....	63
Abbildung 8: Verteilungsversuch mit intakten Nadeln, serieller Versuchsansatz.....	74
Abbildung 9: Übersicht des Versuchsaufbaus.....	80
Abbildung 10: mit Isoproturon benetzte Kiefernnadeln vor der Desorption in die herbizidfreie Pufferlösung.....	80
Abbildung 11: Benetzen der Nadeln mit einer 10 µl Mikroliterspritze.....	85
Abbildung 12: Kiefernnadeln, zur Desorption eingetaucht in herbizidfreie Pufferlösung.....	86
Abbildung 13: Abschätzen des Benetzungswinkels.....	89
Abbildung 14: Translokation: Abgabe von Stoffen aus der Nadel ins Vial.....	92
Abbildung 15: Translokation: Untersuchung eines Zweigabschnittes.....	94
Abbildung 16: Volatilisation von Petrischälchen.....	95
Abbildung 17: Volatilisation von Glaskapillaren.....	95
Abbildung 18: Volatilisation in geschlossenem System mit Fängermaterial.....	97
Abbildung 19: einfach exponentielle Konzentrationsverläufe im Verteilungsversuch mit intakten Kiefernnadeln in der wässrigen Phase (entnommen aus Fleischer 2006).....	99
Abbildung 20: biexponentielle Konzentrationsverläufe im Verteilungsversuch mit intakten Kiefernnadeln in der wässrigen Phase (entnommen aus Fleischer 2006).....	100
Abbildung 21: Zwei mit Reinstwasser verdünnte Extrakte aus Kiefernnadeln, vor und nach passieren einer LiChrolut EN 200 mg Kartusche.....	106
Abbildung 22: Kalibriergeraden Isoproturon und seine Abbauprodukte $c = 1 - 100 \mu\text{g/l}$ .....	107

Abbildung 23: Chromatogramm einer Kalibrierlösung, Isoproturon und seine Abbauprodukte c = 5 ng/ml.....	110
Abbildung 24: Chromatogramme der mit 5ng aufgestockten epikutikulären Wachse und der wässrigen Phase in den Verteilungsversuchen.....	111
Abbildung 25: Chromatogramme der mit 50 ng aufgestockten Restnadeln und des Blindwertes.....	112
Abbildung 26: Adsorption und Desorption von Terbutylazin in wässriger Lösung an rekonstituierte epikutikuläre Wachse (entnommen aus Fleischer 2006).....	115
Abbildung 27: Masse des Wirkstoffs Isoproturon in den Kompartimenten wässrige Phase und epikutikuläre Wachse nach Applikation auf der Nadeloberfläche in Reinstwasser, Desorption in langen Zeitintervallen, (Versuchsreihe 1).....	124
Abbildung 28: Masse des Wirkstoffs Isoproturon in den Kompartimenten wässrige Phase und epikutikuläre Wachse nach Applikation auf der Nadeloberfläche in Reinstwasser, Desorption in kurzen Zeitintervallen (Versuchsreihe 2).....	125
Abbildung 29: Masse des Wirkstoffs Isoproturon in den Kompartimenten wässrige Phase und epikutikuläre Wachse während der Desorption nach Applikation auf der Nadeloberfläche in Pflanzenschutzmittelformulierung mit AHL (Versuchsreihe 3).....	126
Abbildung 30: Masse des Abbauproduktes mono-desmethyl Isoproturon in der wässrigen Phase, Desorption nach 9-2890 min (Versuchsreihe 1).....	127
Abbildung 31: Masse des Abbauproduktes mono-desmethyl Isoproturon in der wässrigen Phase, Desorption nach 1-60,5 Minuten (Versuchsreihe 2) .....	128
Abbildung 32: Verlust des Isoproturons von benetzten Glasoberflächen, Einfluss der Geometrie und Formulierung.....	131
Abbildung 33: Verlust des Isoproturons von benetzten Glasoberflächen, Einfluss des Tröpfchen volumens.....	133

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zeitintervalle Adsorption - Injektion der wässrigen Phase (HPLC-Autosampler) aus mit rekonstituierten Wachsen beschichteten Vials.....	64
Tabelle 2: Zeitintervalle Desorption - Injektion der wässrigen Phase (HPLC-Autosampler) aus mit rekonstituierten Wachsen beschichteten Vials.....	66



Tabelle 3: Kontaktdauer der Kiefernadeln mit einer Phosphatpufferlösung zur Messung der Desorption.....	84
Tabelle 4: Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß der Kalibration des Isoproturons und seiner Abbauprodukte.....	108
Tabelle 5: Wiederfindungen von Isoproturon und seiner Abbauprodukte in den untersuchten Probenmatrices.....	109
Tabelle 6: Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) der in den Verteilungsversuchen (Abschnitt 4.3.3) untersuchten Analyten.....	113
Tabelle 7: Intakte Kiefernadeln im parallelen Ansatz: Geschwindigkeitskonstanten und Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten.....	117
Tabelle 8: Intakte Kiefernadeln im parallelen Ansatz: Desorption in die wässrige Phase...118	
Tabelle 9: Intakte Kiefernadeln im seriellen Ansatz: Geschwindigkeitskonstanten und Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten (Daten entnommen aus Zunker 2008).....	121
Tabelle 10: Gleichgewichtskonzentrationen und Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten für die Desorption (Daten entnommen aus Zunker 2008).....	121
Tabelle 11: In der wässrigen Phase und in den epikutikulären Wachsen nachgewiesene Abbauprodukte.....	127
Tabelle 12: Zeitabhängiger Verbleib von Isoproturon auf benetzten Oberflächen, Einfluss der Geometrie und Formulierung.....	132
Tabelle 13: Experimentell bestimmte log K <sub>cw</sub> und Literaturwerte für log K <sub>ow</sub> (Entnommen aus Tomlin 2003).....	138
Tabelle 14: Geschwindigkeitskonstanten der biexponentiellen Konzentrationsverläufe (Daten des seriellen Versuchsansatzes entnommen aus Zunker 2008).....	140
Tabelle 15: Stoffe mit schneller Adsorption aus der wässrigen Phase, schnellem Transport in der Kutikula und/oder irreversibler Aufnahme.....	141

## Abkürzungen

° C	Grad Celsius
GC-ECD	Gaschromatographie-Elektroneneinfangdetektor-Kopplung
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer-Kopplung
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography – Massenspektrometrie
V	Volt
min	Minuten
µl	Mikroliter
nl	Nanoliter
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
PCP	Pentachlorphenol
ESI	electrospray ionisation
K <sub>cw</sub>	Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient
K <sub>ow</sub>	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
U/min	Umdrehungen pro Minute
MCPA	(4-Chlor-2-methylphenoxy) Essigsäure
IPU	Isoproturon

# 1 Gegenstand der Arbeit und Ergebnisse

Herbizide, die durch Spray-Drift, Volatilisation oder Winderosion aus landwirtschaftlichen Flächen ausgetragen werden (im folgenden zusammenfassend als luftgetragene Herbizide bezeichnet) können wiederum auf Nichtzielpflanzen gelangen. Es wird angenommen, dass Wälder eine Senke für luftgetragene Pestizide darstellen (ASTON & SEIBER 1996, ASTON & SEIBER 1996A). Wirkungen von luftgetragenen Herbiziden auf Nichtzielpflanzen können nicht ausgeschlossen werden: Berechnungen zeigten, dass für Nichtzielpflanzen ökotoxikologisch relevante Konzentrationen durch die atmosphärische Deposition von Herbiziden überschritten werden können (JONG & LUTTIK 2003).

Die an den Blättern von Nichtzielpflanzen haftenden Herbizide können wiederum durch Regenereignisse aus der Laubschicht ausgewaschen werden und in den Boden gelangen (BERNHARDT & RUCK 2004). Welche Herbizide nach deren Deposition wieder ausgewaschen werden oder aber in der Laubschicht verbleiben ist vom Verteilungsverhalten der Stoffe an der Blattoberfläche abhängig.

In der vorliegenden Dissertation wurde das Verteilungsverhalten von Herbiziden und einiger ihrer Abbauprodukte an der Oberfläche von Nichtzielpflanzen bestimmt.

Für diese Arbeit wurden überwiegend Herbizide ausgewählt, deren Verwendung in der derzeitigen landwirtschaftlichen Praxis in hohen Tonnagen üblich ist. Die meisten untersuchten Wirkstoffe besitzen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten  $\log K_{OW} > 3$  und wurden in Regen- oder Luftproben nachgewiesen.

Als Modellorganismus diente die Waldkiefer *Pinus Sylvestris* L. mit deren Nadeln Versuche zur Charakterisierung des Adsorptions- und Desorptionsverhaltens von 55 Herbiziden aus wässrigen Lösungen durchgeführt wurden. Es wurden Verteilungsversuche sowohl mit rekonstituiertem epikutikulärem Wachs als auch mit intakten Kiefernadeln durchgeführt.

Für den Stoff Terbutylazin konnte bei Versuchen mit rekonstituierten epikutikulären Wachsen (Abschnitt 4.3.1) eine Aufnahme aus der wässrigen Lösung in das Wachs festgestellt werden. Der Verteilungskoeffizient zwischen Wachs und Wasser betrug für die Adsorption  $\log K_{WachsW} = 3, 0$ . Für die Desorption wurde ein höherer Verteilungskoeffizient von  $\log K_{WachsW} = 3, 3$  ermittelt und auf Grund der Differenz angenommen, dass Anteile des Terbutylazins irreversibel an das epikutikuläre Wachs gebunden werden.

Die Ergebnisse aus Sorptionsversuchen (Abschnitt 4.3.2) mit wässrigen Lösungen und intakten Kiefernnadeln zeigen für 19 weitere Herbizide mit einem  $\log K_{ow} > 3,8$  eine schnelle Adsorption aus der wässrigen Phase an die Nadeloberfläche mit einer mittleren Lebensdauer für die Aufnahme aus der wässrigen Phase von 12 Minuten (Aclonifen, Bifenox, Bromoxynil-octanoat, Diflufenican, Fenoxaprop-p-ethyl, Fluazifop-p-butyl, Fluroxypyr-meptyl, Haloxyfop-ethoxyethyl, Haloxyfop-methyl, Mefenpyr-diethyl, PCP, Pendimethalin, Picolinafen, Propaquizafop, Prosulfocarb, Pyridate, Quizalofop-ethyl, Triallate und Trifluralin).

Die für diese Stoffe ermittelten Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten liegen im Bereich  $\log K_{cw} = 3,3$  bis 4,8. Für 7 Stoffe war nach einer schnellen Verringerung der Konzentration in der wässrigen Phase eine weitere stetige Abnahme der Herbizidkonzentration mit einer Lebensdauer unter 2000 Minuten zu beobachten (Fluroxypyr-meptyl, Fenoxaprop-p-ethyl, Propaquizafop, Quizalofop-ethyl, Trifluralin, Fluazifop-p-butyl und Haloxyfop-methyl). Dieses Aufnahmeverhalten lässt vermuten, dass die Stoffe über die epikutikuläre Wachsschicht in das innere Gewebe der Kiefernnadeln aufgenommen werden. Die Stoffe Bromoxynil-octanoat, Fluroxypyr-meptyl, Propaquizafop, Quizalofop-ethyl und Trifluralin zeigten eine irreversible Aufnahme aus wässrigen Lösungen in Kiefernnadeln.

In einem Laborversuch wurde die Deposition von Herbiziden auf intakten Kiefernnadeln simuliert. Die Verteilung zwischen der epikutikulären Wachsschicht, Niederschlagswasser und der nach Extraktion mit Dichlormethan verbleibenden Nadeln wurde für das Herbizid Isoproturon und seine Abbauprodukte ermittelt (Abschnitt 4.3.3).

Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Versuchsdesign erlaubte die Messung der Verteilungsvorgänge an intakten, noch am Zweig befindlichen Kiefernnadeln. Weitere Transportvorgänge (Translokation, Volatilisation und die Bildung von Abbauprodukten) konnten mit dem vorgestellten Konzept quantifiziert werden.

Aus den Ergebnissen der Laborversuche können Rückschlüsse zum Verbleib des Herbizids Isoproturon im Waldökosystem getroffen werden: In Freilandmessungen konnte ein Konzentrationsverlauf mit einer starken Abnahme der Konzentration in der epikutikulären Wachsschicht nach Regenereignissen beobachtet werden (FLEISCHER 2004). Andere Freilandmessungen zeigten, dass durch Spraydrift in Waldökosysteme eingetragenes Isoproturon bei Regenereignissen aus dem Kronenbereich in den Waldboden ausgewaschen wird (BERNHARTDT & RUCK 2004).

Die Laborversuche ergaben, dass Isoproturon bei Kontakt mit wässrigen Lösungen sofort (Lebensdauer unter 1 Minute) von der Oberfläche der Kiefernadeln desorbiert und nicht in das innere Gewebe der Kiefernadel aufgenommen wird. Darüber hinaus treten bei Driftrückständen kleiner Stoffmenge und Schichtdicke ( $1 \text{ ng/mm}^2$ ) für Isoproturon hohe Verluste (zwischen 47 und 88 % der ursprünglich applizierten Menge) durch Volatilisation und abiotischen Abbau auf.

Die in den Laborversuchen ermittelten Ergebnisse erklären und bestätigen die Befunde der Freilandmessungen. Sie zeigen, dass Driftrückstände von polaren Herbiziden durch Regenereignisse aus der Vegetationsoberfläche von Nichtzielpflanzen ausgetragen werden und in andere Umweltkompartimente wie zum Beispiel den Waldboden gelangen können. Diese Eintragspfade in Ökosysteme sollten bei der Bewertung von Pflanzenschutzmitteln und Wirkstoffen berücksichtigt werden.

## 2 Einleitung

In Deutschland wurden im Jahr 2011 etwa 112.000 t Pflanzenschutzmittel in Verkehr gebracht. Der größte Anteil dieser Menge sind Herbizide (ca. 54.000 t) und Wachstumsregler/Keimhemmungsmittel (ca. 7.600 t). Die Tonnage der Wirkstoffe betrug insgesamt ca. 44.000 t (davon ca. 18.000 t Wirkstoffe in Herbiziden und ca. 3.100 t in Wachstumsreglern/Keimhemmungsmitteln). Damit machen Chemikalien, die im Regelfall toxisch für Zielpflanzen sind beziehungsweise deren Wachstum beeinflussen den größten Anteil der in Deutschland in Verkehr gebrachten Pflanzenschutzmittel aus. Die Berichte des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zeigen in den letzten 10 Jahren einen Anstieg der Gesamtwirkstoffmenge von 26 % bei einem durchschnittlichen Anteil der Herbizidwirkstoffe von 42 % (BVL 2012).

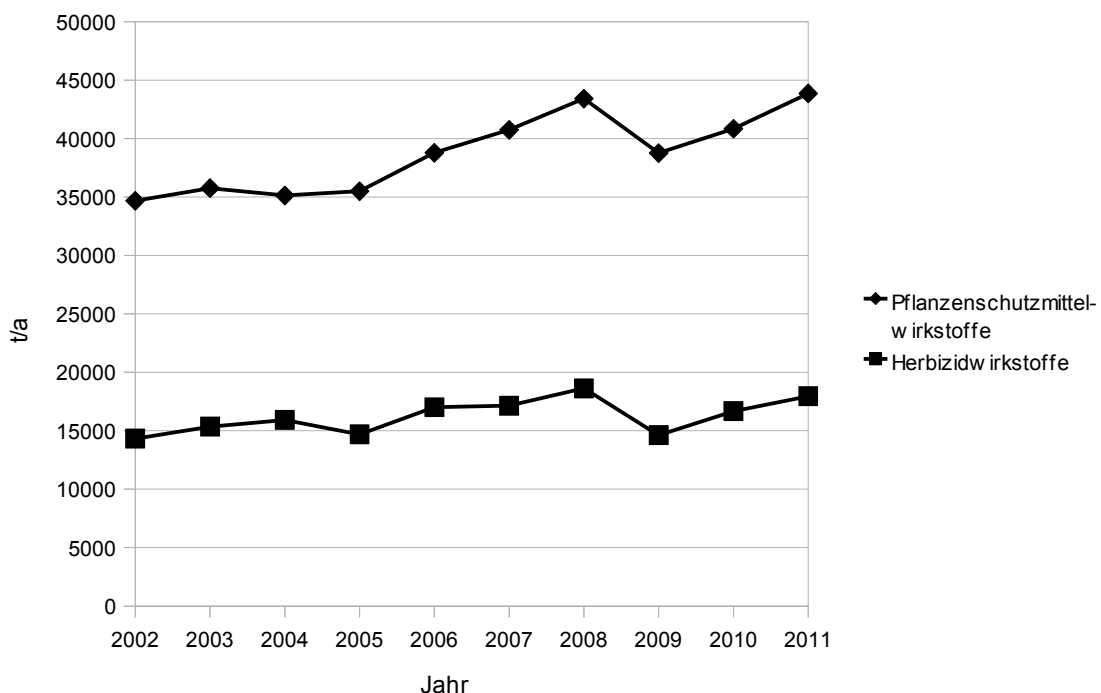


Abbildung 1: In Deutschland in Verkehr gebrachte Pflanzenschutzmittel (Daten entnommen aus BVL 2012)

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Stoffen handelt es sich um Herbizidwirkstoffe, die in hoher Tonnage in Verkehr gebracht werden. Für den Wirkstoff Isoproturon lag die in Ver-

kehr gebrachte Menge in den Jahren 2002 - 2011 bei über 1000 t/a (BVL 2002-2011). Isoproturon wird darüber hinaus auch als Biozidwirkstoff in Verkehr gebracht und auch im Außenbereich als Schutzmittel für Mauerwerk angewendet (aufgeführt u.a. mit Produktart 10 im Anhang II der REVIEW-VERORDNUNG (EG) NR. 1451/2007<sup>1</sup>, in Verbindung mit den Nichtaufnahmeentscheidungen der Kommission 2008/809/EC, 2010/72/EU, 2007/565/EC).

Von den für das Chemikalienmanagement zuständigen Behörden wurde in einem Überblick zu Stoffen, die ein hohe Beeinträchtigung mit nationaler und internationaler Bedeutung von Oberflächengewässern darstellen, Isoproturon als für das Trinkwasser problematische Chemikalie genannt (BAUA 2005).

Aktuelle Medienberichte und eine Pressemitteilung der Landesregierung Nordrhein-Westfalen zur Belastung von Trinkwasser nennen auch heute noch den Wirkstoff Isoproturon im Zusammenhang mit der Überschreitung von Grenzwerten. Über den genauen Eintragsweg werden allerdings nur Mutmaßungen angestellt: Es wird über Einträge aus der Landwirtschaft und aus bioziden Verwendungen (siehe oben) spekuliert (WAZ 2013, WDR 2013, NRW 2013).

Zu möglichen Eintragspfaden von Pflanzenschutzmitteln in Oberflächengewässer gehören unter anderem Runoff (Oberflächenabfluss von Niederschlägen), Volatilisation (Verdunstung des Wirkstoffs) von der Zielfläche und Spraydrift während der Pflanzenschutzmitteleanwendung (NEUMANN ET AL. 2002, DABROWSKI & SCHULZ 2003, RÖPKE ET AL. 2004). Pflanzenschutzmittel können aber auch durch Spraydrift in Waldökosysteme eingetragen werden. Dort können sie durch Niederschläge aus dem Kronenbereich ausgewaschen werden. Im Stammablaufwasser von Buchen wurden Konzentrationen des Herbizids Isoproturon von bis zu 360 ng/l gemessen (BERNHARDT & RUCK 2004). Es wäre denkbar, dass die ausgewaschenen Wirkstoffe abhängig von ihren intrinsischen Eigenschaften (z.B. Adsorption am Boden) ins Grundwasser oder auch in Oberflächengewässer gelangen.

Im Gegensatz zu Industriechemikalien werden Pflanzenschutzmittel in hohen Tonnagen direkt in der Umwelt freigesetzt. Bei Industriechemikalien, die als gefährlich eingestuft sind, ist es das Ziel, die Exposition von Mensch und Umwelt durch geeignete Risikomanagementmaßnahmen soweit wie möglich zu minimieren (REACH-VERORDNUNG (EG) NR.

---

<sup>1</sup> VERORDNUNG (EG) Nr. 1451/2007 DER KOMMISSION vom 4. Dezember 2007 über die zweite Phase des Zehn-Jahres-Arbeitsprogramms gemäß Artikel 16 Absatz 2 der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten

1907/2006<sup>2</sup>, GEFÄHRSTOFFVERORDNUNG<sup>3</sup>, TRGS 560<sup>4</sup>). Bei Pflanzenschutzmitteln sind dieselben Maßnahmen (z.B. technische Maßnahmen, die auf einen Einschluss der Stoffe oder auf einen besonderen Umgang mit der Abluft abzielen) auf Grund der beabsichtigten Wirkung auf eine große Fläche im Freien nicht möglich.

Der Anteil der landwirtschaftlichen Fläche in Deutschland beträgt im Jahr 2011 52,3 % (STATISTISCHES BUNDESAMT 2013). Abhängig von der Nutzung werden Teile der landwirtschaftlichen Fläche mit Pflanzenschutzmitteln behandelt.

Auf Grund der großen betroffenen Fläche und der offenen Anwendung erscheint das Inverkehrbringen von Wirkstoffen mit bestimmten gefährlichen Eigenschaften in Pflanzenschutzmitteln als nicht akzeptabel. Das aktuelle europäische Pflanzenschutzrecht listet Gefahreigenschaften (u.a. POP- Persistent Organic Pollutants; PBT – Persistent, Bioakkumulierbar und Toxisch; vPvB – sehr Persistent, sehr Bioakkumulierbar; Karzinogene der Kategorien 1A und 1B) als Ausschlusskriterien für eine Genehmigung der Wirkstoffe oder erzeugt Druck zur Substitution (Artikel 4 in Verbindung mit Anhang II Nummer 3.6 und Artikel 24 in Verbindung mit Anhang II Nummer 4 der PFLANZENSCHUTZMITTEL-VERORDNUNG (EG) NR. 1107/2009<sup>5</sup>; SMOLKA 2009).

Der Wirkstoff Isoproturon ist als krebserzeugend der Kategorie 2 und sehr giftig für Wasserorganismen im Hinblick auf akute und langfristige Wirkung eingestuft (Anhang VI Tabelle 3.1 der CLP-VERORDNUNG (EG) NR. 1272/2008<sup>6</sup>). Produkte, die Isoproturon enthalten sind noch mehrere Jahre (zum Teil bis Ende 2018) zugelassen, beziehungsweise bestehen nach Zulassungsende noch Übergangsfristen von ungefähr zwei Jahren für die Aufbringung auf landwirtschaftliche Flächen (BVL 2013).

---

2 VERORDNUNG (EG) Nr. 1907/2006 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission

3 Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen (Gefahrstoffverordnung – GefStoffV) Vom 26. November 2010 (BGBl. I S 1643) geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 28. Juli 2011 (BGBl. I S 1622)

4 Technische Regeln für Gefahrstoffe: Lufrückführung bei Tätigkeiten mit krebserzeugenden, erbgutverändernden und fruchtbarkeitsgefährdenden Stäuben TRGS 560, Ausgabe: Januar 2012 GMBI 2012 S. 17-18 [Nr. 2]

5 VERORDNUNG (EG) Nr. 1107/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates

6 VERORDNUNG (EG) Nr. 1272/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006



Als Grundlage für eine Minimierung der Exposition von Mensch und Umwelt und Rahmenbedingung für die Bewertung von Pflanzenschutzmitteln und Wirkstoffen wird in den Gesetzestexten zum Pflanzenschutz die „gute Pflanzenschutzpraxis“ (beziehungsweise auch „gute fachliche Praxis im Pflanzenschutz“) festgelegt, (Artikel 55 der PFLANZENSCHUTZMITTEL-VERORDNUNG (EG) NR. 1107/2009, § 3 PFLANZENSCHUTZGESETZ<sup>7</sup>). Zu deren Risikomanagementmaßnahmen gehört eine Verringerung der Abdrift des Sprühnebels zum Beispiel durch driftmindernde Sprühgeräte oder Beachtung maximaler Fahr- und Windgeschwindigkeiten (BMELV 2010).

Die Vergangenheit hat gezeigt, dass die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln ungewollte Wirkungen in der Umwelt haben kann, zum Beispiel die Anreicherung in der Nahrungskette und die bekannten Wirkungen von DDT auf den Bruterfolg von Greifvögeln (AMES 1966, WOODWELL ET AL. 1967). Aber auch in der Gegenwart gibt es trotz der bestehenden Regelungen zur Genehmigung von Wirkstoffen und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln Vorfälle mit unerwünschten Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln. Im Jahr 2008 kam es nach der Aussaat von insektizidbehandeltem Saatgut zu einem Bienensterben in der Rheinebene in Baden-Württemberg (NUYTTENS ET AL. 2013) und in Bayern. Die Untersuchungen des Julius Kühn Institutes zeigten, dass durch Abrieb bei der Aussaat von gebeiztem Saatgut ein Insektizid in die Luft gelangte und auf blühende Pflanzen verfrachtet wurde, was zu einer Vergiftung der Bienen führte (JKI 2008).

Die beiden genannten Beispiele für tatsächliche Auswirkungen auf Nichtzielorganismen unterscheiden sich im Hinblick auf das zum Zeitpunkt der Anwendung vorherrschende Wissen und die regulatorischen Rahmenbedingungen: Vermutlich waren zum Zeitpunkt der ersten großflächigen Anwendungen des DDTs keine Informationen zu toxikologischen Auswirkungen auf Greifvögel vorhanden. Im Gegensatz dazu sollten während des Zulassungsverfahrens der Produkte, die das Bienensterben 2008 ausgelöst haben, mögliche toxische Wirkungen für Nichtzielorganismen (Honigbienen) auf Grund der gesetzlichen Datenanforderungen betrachtet worden sein (Anhang II Teil A Abschnitt 8.3.1 der PFLANZENSCHUTZMITTEL-RICHTLINIE 91/414/EWG<sup>8</sup>). Da diese Produkte zugelassen wurden, kann nur vermutet werden, dass im Zulassungsverfahren die Exposition der Bienen in dem geschehenen Ausmaß nicht vorhergesehen wurde. Darüber hinaus handelte es sich bei dem Bienensterben um akute toxische Effekte. Die Einschätzung, ob eine chronische Exposition

---

7 Pflanzenschutzgesetz vom 6. Februar 2012 (BGBl. I S. 148, 1281)

8 RICHTLINIE DES RATES vom 15. Juli 1991 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (91/414/EWG)

zu negativen Auswirkungen bei Nichtzielorganismen führt ist mit einer noch größeren Unsicherheit behaftet (FENT 2013).

Die genannten aktuellen Beispiele zu Isoproturon mit unbekanntem Eintragungsweg im Trinkwasser und dem Bienensterben unterstreichen, wie wichtig die Informationen zur tatsächlichen Exposition und ein Verständnis des Verbleibs (öko-)toxikologisch hochrelevanter Stoffe im Ökosystem sind.

Mehrere Studien belegen Auswirkungen der aktuell verwendeten Pflanzenschutzmittel auf Nichtzielorganismen. Zum Beispiel zeigen Feld- und Laboruntersuchungen toxikologische Auswirkungen von Isoproturon auf Nichtzielorganismen in einem, einer landwirtschaftlichen Fläche benachbarten Oberflächengewässer trotz Einhaltung von Sicherheitsabständen und einer guten landwirtschaftlichen Praxis (GREULICH ET AL. 2002). Berechnungen des niederländischen RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu) im Auftrag der EU-Kommission zeigten, dass für Nichtzielpflanzen ökotoxikologisch relevante Konzentrationen durch die atmosphärische Deposition von Herbiziden überschritten werden (JONG & LUTTIK 2003).

Nichtzielpflanzen mit einer besonderen ökologischen aber auch wirtschaftlichen Bedeutung sind Waldbäume. Die Waldkiefer *Pinus Sylvestris* L. hat mit 24 % nach der Fichte (28 %) den zweithöchsten Anteil an der deutschen Waldfläche (BMELV 2009). Darüberhinaus verbleiben deren Nadeln im Gegensatz zu den Blättern der Laubbäume für mehrere Jahre am Zweig und ermöglichen das Monitoring von deponierten Stoffen (und gegebenenfalls Aussagen zur Akkumulation) über mehrere Vegetationsperioden (NIEMINEN ET AL. 1999).

Bei Freilandmessungen wurde der Stoff Isoproturon nach einem Sprühereignis in Konzentrationen von bis zu 333 ng/g Nadeln in Waldkiefern am Rand einer landwirtschaftlichen Fläche durch Extraktion der epikutikulären Wachsschicht mit Dichlormethan nachgewiesen. Im Rahmen der Messungen fiel auf, dass der Isoproturongehalt innerhalb weniger Tage im Zusammenhang mit Regenereignissen stark abnahm und der Stoff letztlich nicht mehr in der Wachsschicht der Nadeln nachgewiesen werden konnte. Dabei war die räumliche Verteilung der Isoproturongehalte abhängig von der zum Zeitpunkt der Herbizidanwendung vorherrschenden Windrichtung (FLEISCHER 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Eintrag und der Verbleib von Herbiziden in Nadeln der Waldkiefer untersucht werden. Hierbei werden mögliche Transportwege, wie Volatilisation oder Spraydrift auf die Oberfläche von Nadeln überprüft. Die vorliegende Dissertation un-

tersucht mit Modellversuchen im Labormaßstab, ob Herbizide, die durch Volatilisation oder Spraydrift auf die Oberfläche von Nadeln der Waldkiefer gelangen, in das Gewebe der Nadeln aufgenommen werden und ob die Herbizide dort verbleiben. Die Ergebnisse erlauben eine Aussage, für welche Wirkstoffe eine Exposition des Blattgewebes der Waldkiefer bestehen kann oder ob eine Verbleib an der Nadeloberfläche und damit zum Beispiel die Auswaschung der Stoffe bei Regenfällen und ein Transport in den Waldboden und ins Grundwasser möglich ist. Die Arbeit trägt damit zu einer genaueren Abschätzung der Exposition einer wichtigen Waldbaumart durch Herbizide bei.

## 3 Stand des Wissens

### 3.1 Rechtliche Grundlagen

Das Inverkehrbringen und die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln wird in Deutschland durch das Pflanzenschutzgesetz geregelt. Pflanzenschutzmittel dürfen nur angewendet werden, wenn sie zugelassen sind, und zwar nur unter den in der Zulassung genannten Anwendungsbestimmungen (§ 4 Absatz 1 des PFLANZENSCHUTZGESETZES, BMELV 2010).

Das Pflanzenschutzgesetz beruht dabei auf den Vorgaben auf EU-Ebene durch die Pflanzenschutzmittel-Richtlinie 91/414/EWG und durch die Pflanzenschutzmittel-Verordnung (EG) Nr. 1107/2009. Die EU-Pflanzenschutzmittel-VO löst die Pflanzenschutzmittel-Richtlinie ab. Insbesondere Regelungen der Pflanzenschutzmittel-Richtlinie im Hinblick auf die Genehmigung von Wirkstoffen oder zur Zulassung und Abverkauf im Zusammenhang mit unter dieser Richtlinie erfolgten Verfahren gelten mit Übergangsfristen weiterhin (Artikel 80 der EU-PFLANZENSCHUTZMITTEL-VO).

Pflanzenschutzmittel können nur zugelassen werden, wenn die enthaltenen Wirkstoffe genehmigt sind (Artikel 29 Absatz 1a der EU-PFLANZENSCHUTZMITTEL-VO). Die Bewertung der Genehmigungsanträge wird durch die zuständige Behörde eines Mitgliedstaates durchgeführt, diese legt einen Bericht vor („Entwurf des Bewertungsberichtes“ durch den berichtserstattenden Mitgliedstaat, Artikel 11 Absatz 1 der EU-PFLANZENSCHUTZMITTEL-VO). Für den Stoff Isoproturon war Deutschland berichterstattender Mitgliedstaat, zum damaligen Zeitpunkt im Rahmen der Regelungen der Pflanzenschutzmittel-Richtlinie (EU-KOMMISSION 2002). In Deutschland ist das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) die zuständige Behörde:

- für die Erstellung des nationalen Bewertungsberichtes bei der Genehmigung von Wirkstoffen (§ 41 Absatz 3 PFLANZENSCHUTZGESETZ) und
- für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln (§ 33 Absatz 1 PFLANZENSCHUTZGESETZ; RESSELER ET AL. 2009).

Die Datenanforderungen an die Prüfung von Wirkstoffen und Pflanzenschutzmitteln werden in den VERORDNUNGEN (EU) NR. 283/2013<sup>9</sup> (Wirkstoffe) und (EU) NR. 284/2013<sup>10</sup> (Pflanzenschutzmittel) festgelegt und in den MITTEILUNGEN DER KOMMISSION 2013/C 95/01<sup>11</sup> (Wirkstoffe) und 2013/C 95/02<sup>12</sup> (Pflanzenschutzmittel) durch z.B. Hinweise auf die relevanten OECD und EU-Leitliniendokumente konkretisiert. Diese Verordnungen enthalten unter anderem auch Datenanforderungen zur Toxizität der Wirkstoffe oder Pflanzenschutzmittel für Nichtzielpflanzen, z.B. Verordnung (EU) Nr. 283/2013, Anhang Teil A Abschnitte 8.6 (Versuche mit Nichtzielpflanzen), 8.9 (Monitoringdaten). Die Kommissionsmitteilungen verweisen dabei auf folgende Prüfverfahren:

- OECD Test Guideline 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (OECD 2006)
- OECD Test Guideline 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test (OECD 2006A)

Nach der OECD Guideline 208 wird der zu prüfende Wirkstoff (oder auch das Pflanzenschutzmittel) über den Boden, nach der OECD Guideline 227 über die Blätter der Pflanzen appliziert. Beide Methoden sehen eine Versuchsdauer von bis zu 28 Tagen vor. Bei entsprechender Anzahl von getesteten Konzentrationen beziehungsweise Pflanzen kann die NOEC (No Observed Effect Concentration) abgeschätzt werden. In den Abschnitten der Kommissionsmitteilungen zur Prüfung der Auswirkungen auf terrestrische Nichtzielpflanzen wird allgemein auf die EU-Leitlinie Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology (SANCO/10329/2002 rev 2) verwiesen. Nach diesem Leitliniendokument können auch Freilandversuche zur Untersuchung von Auswirkungen auf Nichtzielpflanzen notwendig sein (EU-KOMMISSION 2002A).

---

9 VERORDNUNG (EU) Nr. 283/2013 DER KOMMISSION vom 1. März 2013 zur Festlegung der Datenanforderungen für Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln

10 VERORDNUNG (EU) Nr. 284/2013 DER KOMMISSION vom 1. März 2013 zur Festlegung der Datenanforderungen für Pflanzenschutzmittel gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln

11 Mitteilung der Kommission im Rahmen der Durchführung der Verordnung (EU) Nr. 283/2013 der Kommission vom 1. März 2013 zur Festlegung der Datenanforderungen für Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (2013/C 95/01)

12 Mitteilung der Kommission im Rahmen der Durchführung der Verordnung (EU) Nr. 284/2013 der Kommission vom 1. März 2013 zur Festlegung der Datenanforderungen für Pflanzenschutzmittel gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (2013/C 95/02)

Anhand der in den Kommissions-Mitteilungen genannten OECD – Methoden und des Leitliniendokuments werden keine Untersuchung zu Langzeiteffekten von Herbiziden auf Nichtzielpflanzen gefordert, die ein für Waldbäume realistisches Szenario darstellen (zum Beispiel langfristige Exposition von Waldbäumen gegenüber Herbizidkonzentrationen, die charakteristisch für atmosphärische Herbizideinträge oder Spraydrift bei größeren Distanzen zu landwirtschaftlichen Flächen sind). Allerdings beinhaltet beispielsweise der Abschnitt 8.9 (Monitoringdaten) der Verordnung (EU) Nr. 283/2012 die Forderung „alle verfügbaren Monitoring-Daten über die schädlichen Auswirkungen des Wirkstoffs auf Nichtziel-Organismen anzugeben“. Diese Forderung kann allerdings nur umgesetzt werden, wenn der Stoff schon geraume Zeit in Verkehr gebracht und angewendet wird und entsprechende Monitoring-Daten zum Beispiel für eine Überprüfung von Wirkstoffgenehmigungen verfügbar sind.

Für die Risikobewertung werden die Informationen zur Toxizität mit der in der zu erwartenden Exposition verglichen. Für die Expositionsbeurteilung werden Informationen zum Umweltverhalten (stoffintrinsic Eigenschaften wie Verteilungskoeffizienten und Abbauverhalten) und zu den Expositionswegen (zum Beispiel Spraydrift) benötigt (STRELOKE 2011).

Die EU-Leitlinie empfiehlt als Ausgangspunkt für die Expositionsabschätzung im Hinblick auf Spraydrift die vom Julius-Kühn Institut (ehemals BBA) ermittelten Abdrifteckwerte. Dabei handelt es sich um typische Mengenteile, die im Bezug auf die ursprüngliche Aufwandmenge abhängig vom Abstand zur landwirtschaftlichen Fläche durch Spraydrift deponiert werden. Es handelt sich dabei um die Ergebnisse einer Vielzahl von Driftmessungen, die für verschiedene Kulturtypen durchgeführt wurden (GANZELMEIER ET AL. 1995). Die EU-Leitlinie weist allerdings auch darauf hin, dass das den Abdrifteckwerten zugrundeliegende Szenario der Eintrag von Pflanzenschutzmitteln via Spraydrift in Oberflächengewässer ist und dass, wenn vorhanden, realistischere Driftdaten, oder geeignete Modelle angewendet werden sollten (EU-KOMMISSION 2002A).

Bei der Risikobewertung im Pflanzenschutz wird zugrunde gelegt, dass es sich bei der angenommenen Exposition um einen „realistic worst case“ handelt, beziehungsweise dass die gute fachliche Praxis und die damit verbundenen Risikominderungsmaßnahmen eingehalten werden (EU-KOMMISSION 2002A, STRELOKE 2011). Risikominderungsmaßnahmen im Hinblick auf die Expositionswege Spraydrift und Volatilisation sind unter anderem:

- die Verwendung von driftmindernden Sprühgeräten (JKI 2012). Sprühgeräte werden nach einem Merkmalskatalog (dieser enthält unter anderem Angaben zum Tropfendurchmesser) geprüft (BBA 2002). Die Kriterien für die Einstufung von Sprühgeräten als driftmindernd werden als Mitteilung des Julius-Kühn Institutes im Bundesanzeiger veröffentlicht (JKI 2013<sup>13</sup>)
- die Einhaltung von Abständen z.B. zu Oberflächengewässern und Saumbiotopen (diese werden gegebenenfalls im Zulassungsverfahren festgelegt, BMELV 2010),
- als Bestandteile der guten fachlichen Praxis angepasste Fahrgeschwindigkeiten (maximal 8 km/h) beim Versprühen oder die Beachtung von Wetterfaktoren (dauerhaft Windgeschwindigkeit über 5 m/s, Luftfeuchte unter 30 % und Temperatur über 25 °C, BMELV 2010).

Die gute fachliche Praxis ist im Pflanzenschutzgesetz verankert, die im Zulassungsverfahren festgelegten Risikominderungsmaßnahmen werden auch auf dem Etikett des Pflanzenschutzmittels vermerkt (STRELOKE 2011). Darüber hinaus müssen Personen, die Pflanzenschutzmittel beruflich verwenden über eine ausreichende Sachkunde verfügen, die Sicherung der Sachkunde ist Teil des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (§ 9 PFLANZENSCHUTZGESETZ, PFLANZENSCHUTZ-SACHKUNDEVERORDNUNG<sup>14</sup>, JKI 2012).

### **3.2 Einfluss von Herbiziden auf Nichtzielpflanzen**

Die Wirkung auf Nichtzielpflanzen wurde in der nahen Umgebung von landwirtschaftlichen Flächen untersucht. In der Saumvegetation von Agrarflächen können empfindliche Pflanzenarten durch verdriftete Herbizide beeinträchtigt werden (De JONG & UDO DE HAES 2001). Zur Saumvegetation am Ackerrand gehören zum Beispiel kleine Gehölze oder Hecken. Diese haben eine große Bedeutung im Biotopverbund für geschützte Tier- und Pflanzenarten (SÖNDGERATH & SCHRÖDER 2002, KRAMER-SCHADT ET AL. 2011).

---

<sup>13</sup> Bekanntmachung von Richtlinien, die zur Prüfung von Pflanzenschutzgeräten nach § 52 Absatz 1 des Pflanzenschutzgesetzes angewendet werden, Veröffentlicht am Mittwoch, 8. Mai 2013 BAnz AT 08.05.2013 B2

<sup>14</sup> Pflanzenschutz-Sachkundeverordnung vom 28. Juli 1987 (BGBl. I S. 1752), die zuletzt durch Artikel 27 des Gesetzes vom 6. Dezember 2011 (BGBl. I S. 2515) geändert worden ist

Im Labormaßstab wurde die Toxizität von luftgetragenen Herbiziden auf Nichtzielpflanzen unter anderem durch Versuche in Kammern erforscht, in denen die Pflanzen gegenüber den vernebelten oder verdampften Herbiziden exponiert werden, um die Exposition durch Volatilisation von einer behandelten Agrarfläche experimentell nachzustellen. Beispielsweise wurden Änderungen der Blattform für den Wirkstoff 2,4-D bei Konzentrationen von 30 ng/m<sup>3</sup> beobachtet (BREEZE & VAN RENSBURG 1991). Für den Stoff Ethofumesat wurde ein NOEC von 75 ng/m<sup>3</sup> ermittelt. Zwar wurde bei dieser Studie kein Bezug zu realen Luftkonzentrationen in der Umgebung einer behandelten Fläche hergestellt, das Versuchsdesign kann aber als wertvolle Ergänzung zu den im Abschnitt 3.1 beschriebenen Standardtests gesehen werden. Ein so ermittelter NOEC kann mit der experimentell oder durch Modelle ermittelten Exposition bei der Bewertung von Wirkstoffen und Pflanzenschutzmitteln verglichen werden (FRANZARING ET AL. 2001).

Um den Effekt von verdrifteten Pflanzenschutzmitteln zu bestimmen, wurden in Gewächshausversuchen Bruchteile der empfohlenen Aufwandmenge auf Nichtzielpflanzen versprüht. Für eine Reihe von Nichtzielpflanzen wurden Effekte bei unter 5 % der empfohlenen Aufwandmenge und damit in für die Exposition gegenüber Spraydrift relevanten Dosen beobachtet. Dabei stellten sich Effekte auf die Reproduktion der getesteten Pflanzenarten als empfindlichster Endpunkt heraus (CARPENTER & BOUTIN 2010).

Die im Abschnitt 3.1 genannten Standardprüfverfahren werden in der Regel mit jungen Pflanzen oder Keimlingen durchgeführt. Im Gegensatz dazu sind Nichtzielpflanzen im Freiland in verschiedenen Wachstumsphasen der Exposition durch Spraydrift, Volatilisation oder belasteten Niederschlägen ausgesetzt. Es gibt Hinweise, dass Nichtzielpflanzen am empfindlichsten während der reproduktiven Phasen ihres Lebenszyklus reagieren können (BOUTIN ET AL. 2012).

Die in Labor- oder Freilandversuchen ermittelten Effektkonzentrationen (NOEC, LOEC) lassen sich mit tatsächlich gemessenen Luftkonzentrationen, Konzentrationen in Niederschlägen oder mit durch Modellen errechneten räumlichen Verteilungen der Herbizideinträge vergleichen. Anhand von Luftkonzentrationen in verschiedenen Regionen in den Niederlanden durchgeführte Berechnungen wurde ermittelt, dass für die Herbizide Ethofumesat, 2,4-D und Fluoroxypyryl noch in Abständen von 400 m bis 3 km von der Zielfläche Risiken für Nichtzielpflanzen bestehen (DUECK 2003).



Auch von Behördenseite wurden ein Risiko für Nichtzielpflanzen als wahrscheinlich angesehen: Das niederländische RIVM (National Institute of Public Health and the Environment) hat im Auftrag der EU-Kommission eine Risikobewertung für Nichtzielpflanzen im Hinblick auf luftgetragene Herbizide durchgeführt. In einer Studie wurde aus Messdaten und Verteilungsmodellen die jährliche Deposition und letztendlich Dosis für verschiedene Nichtzielorganismen ermittelt und mit Toxizitätsdaten verglichen. Die Berechnungen ergaben, dass für 11 Herbizide ein Risiko für Nichtzielpflanzen aufgrund regionaler Hintergrundkonzentrationen besteht (JONG & LUTTIK 2003).

### **3.3 Pestizidemissionen aus landwirtschaftlichen Flächen**

Nicht die gesamte applizierten Wirkstoffmenge verbleibt auf der landwirtschaftlichen Fläche und erreicht tatsächlich den Zielorganismus, im Fall von Herbiziden also in erster Linie auf der Anbaufläche unerwünschte Pflanzen. In der Zielfläche gelangen die versprühten Stoffe sowohl auf die Oberfläche der Zielpflanzen als auch auf die Bodenoberfläche. Dabei treten während des Versprühens Verluste insbesondere durch die Verdriftung des Sprühnebels (Spraydrift) und nach dem Versprühen durch Verdunstung der Wirkstoffe von der Pflanzen- und Bodenoberfläche (Volatilisation) auf (COMBELLACK 1982). Von der Bodenoberfläche können die Wirkstoffe als Runoff bei Regenereignissen ausgewaschen werden (NG & CLEGG 1997, RABINET ET AL. 2010) oder auch durch Winderosion in die Luft gelangen und von der Zielfläche wegtransportiert werden (CESSNA ET AL. 2006, TIRYAKI & TEMUR 2010).

Für die Berechnung der Pestizidemissionen bei der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln werden verschiedene Modelle im Rahmen der Pflanzenschutzmittelzulassung empfohlen, beziehungsweise sind diese für die Einreichung neuer Anträge verbindlich, dazu gehören:

- EVA (Schätzung der Deposition in Nichtzielflächen durch Drift/Volatilisation)
- EXPOSIT (Eintrag in Oberflächen-/Grundwasser durch Oberflächenabfluss/Runoff)
- FOCUS-PELMO (Eintrag ins Grundwasser, im Zusammenhang mit Lysimeterstudien)

Die Modelle ermöglichen zwar Berechnungen anhand stoffintrinsic Parameter, sehen aber als Eingangsparameter auch experimentell bestimmte Daten aus Freiland- oder Windtunnelversuchen vor (BVL 2013A).

Die Überprüfung der Vorhersagen von Modellen und damit deren kontinuierliche Validierung und Weiterentwicklung ist wichtig. Das zeigen zum Beispiel Vergleichsuntersuchungen zur Volatilisation von Wirkstoffen, für die Modellberechnungen mittels PELMO eine gute Übereinstimmung mit experimentell ermittelten Daten bei Stoffen mit hohem Dampfdruck lieferten (Ethoprophos, 0,0465 Pa; Procymidone 0,019 Pa). Die Volatilisation von Malathion (0,0053 Pa, dieser Dampfdruck ist nur um einen Faktor von ca. 4-8 niedriger) wurde durch das Modell allerdings um einen Faktor von 30 unterschätzt (FERRARI ET AL. 2003). Im Vergleich zu diesen Stoffen weisen viele Herbizide noch wesentlich geringere Dampfdrücke auf (zum Beispiel Isoproturon  $3.15 \cdot 10^{-3}$  mPa, TOMLIN, 2003).

Aktuelle Analysen von zahlreichen Datensätzen aus Freilandmessungen und der Vergleich mit Modellberechnungen (FOCUS) zeigten gerade im Hinblick auf die verfeinerten Szenarien in der höherstufigen Berechnung des Modells häufig zu niedrige errechnete Werte (KNÄBEL ET AL. 2012).

### 3.3.1 Spraydrift

Die Angaben in der Literatur zu Pflanzenschutzmittelverlusten durch Spraydrift zeigen eine sehr hohe Bandbreite, mit Werten in älteren Studien von wenigen bis zu 50 % (VAN DEN BERG ET AL. 1999) und niedrigeren Werten in Driftmessungen mit aktuellen Sprühgeräten im Bereich von durchschnittlich 5 % (ARVIDSSON ET AL. 2011). Die hohe Variabilität ist vermutlich durch die große Anzahl an Einflussfaktoren beim Versprühen, daraus resultierenden unterschiedlichen Versuchsanordnungen (zum Beispiel Windtunnel oder Freilandmessungen), aber möglicherweise auch der Entwicklung driftmindernder Geräte und Anwendungspraktiken im Hinblick auf die aktuellen Werte begründet. Selbst bei der Verwendung von gleichen Sprühdüsen und demselben Arbeitsdruck unterscheiden sich die Angaben zur Drift um einen Faktor von bis zu 10 (ARVIDSSON ET AL. 2011).

Die Transportweite für versprühte Pflanzenschutzmittel durch Drift nimmt mit abnehmender Tröpfchengröße und zunehmender Windgeschwindigkeit zu. Ab einem Tröpfchendurchmesser von weniger als 20  $\mu\text{m}$  können Aerosole dauerhaft in der Luft verbleiben

(JOHNSON ET AL. 2011). Die Angaben, ab welcher Tröpfchengröße Sprühnebel anfällig für Verdriftung sind, reichen von  $< 50 \mu\text{m}$  bis  $< 200 \mu\text{m}$ . Tröpfchen von wenigen  $\mu\text{m}$  Durchmesser können verdunsten bevor sie sedimentieren (HILZ & VERMEER 2013, NUYTTENS ET AL. 2011). Messungen von Driftrückständen in Abständen von 5 bis 30 m Abstand zur behandelten Fläche ergaben, dass die verdriftete Menge mit dem Anteil des Sprühnebels korreliert, der Tröpfchendurchmesser von unter  $100 \mu\text{m}$  aufweist. Bei vorgegebenem Sprühdüsentyp hatte die Windgeschwindigkeit und die Höhe des Sprühauslegers (beziehungsweise die Höhe der Sprühdüsen) über dem Boden den größten Einfluss auf die verdriftete Menge (ARVIDSSON ET AL. 2011). Da auch Faktoren wie die Viskosität oder die Oberflächenspannung die Bildung von Tröpfchen beim Versprühen beeinflussen, können geeignete Formulierungsbestandteile zu einer Reduktion der Spraydrift beitragen (HILZ & VERMEER 2013).

In der EU-Leitlinie Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology (SANCO/10329/2002 rev 2) wird für die Expositionsbeurteilung zur Spraydrift auf die vom Julius-Kühn Institut (ehemals BBA) ermittelten Abdrifteckwerte verwiesen. Diese wurden als Ergebnis von Driftmessungen, die für verschiedene Kulturtypen durchgeführt wurden ermittelt. Zur Driftmessung wurden Wassergefäße als Sammler verwendet, die in zunehmenden Abständen von der behandelten Fläche in Bodenhöhe aufgestellt wurden (GANZELMEIER ET AL. 1995). Deshalb handelt es sich bei diesem Versuchsdesign um ein Szenario für den Eintrag in Oberflächengewässer, die EU-Leitlinie nennt die Abdrifteckwerte als ersten Anhaltspunkt für die Ermittlung von Risiken für terrestrische Nichtzielorganismen. Wenn vorhanden sollen realistischere Driftdaten oder geeignete Modelle angewendet werden (EU-KOMMISSION 2002A). Im Hinblick auf die Exposition von Nichtzielpflanzen ist es als kritisch zu bewerten, dass das Szenario der Abdrifteckwerte nicht die dreidimensionale Struktur der Vegetationsschicht berücksichtigt, die zu anderen Depositionsraten führen kann (WEISSER ET AL. 2002). Abbildung 2 zeigt die vom Abstand abhängige Driftmenge der im Ackerbau untersuchten Sprühgeräte auf Basis der 90 % Perzentile (JKI 2006).

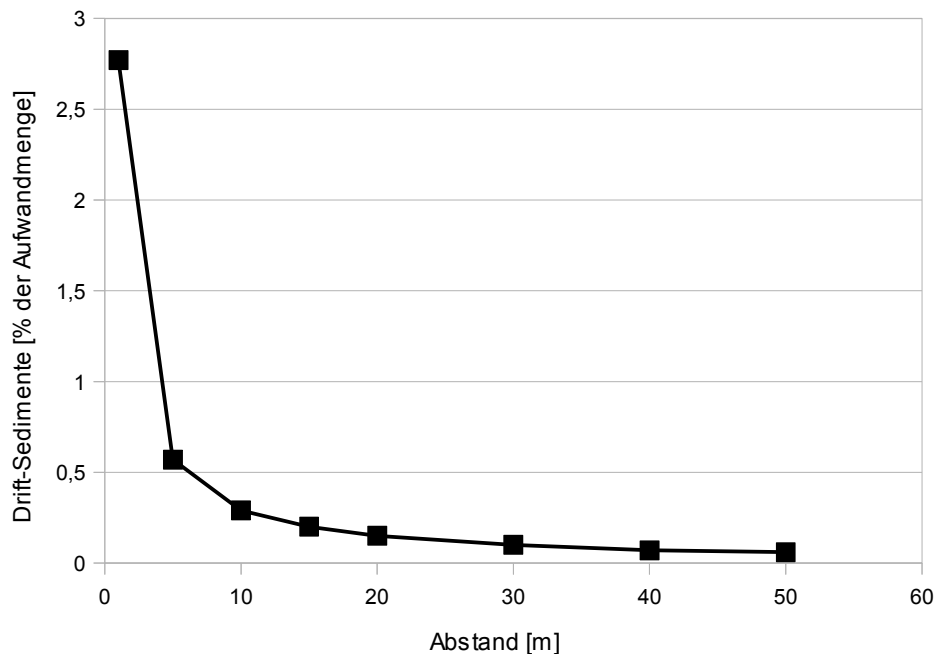


Abbildung 2: Abdrifteckwerte im Ackerbau, Daten entnommen aus: JKI 2006

- vom Abstand abhängige Driftmenge der im Ackerbau untersuchten Sprühgeräte

### 3.3.2 Volatilisation

Die Wirkstoffmengen, die nicht durch Drift während des Sprühens aus der behandelten Fläche ausgetragen werden und die tatsächlich auf die Zielfläche aufgebracht wurden, verbleiben dort nicht im vollen Umfang. Die Stoffe können durch Volatilisation (Verdunstung des Wirkstoffs von der Zielfläche) in die Luft gelangen. Die Wirkstoffe können vom Boden oder auch von den Blättern der besprühten Pflanzen verdunsten (BEDOS ET AL. 2002A).

Durch Volatilisation können über 50 % der aufgetragenen Stoffe von den Oberflächen der Zielpflanzen und des Ackerbodens in die Luft gelangen (LEISTRA & WOLTERS 2004). Für Wirkstoffe mit hohem Dampfdruck wie Trifluralin wurden Verluste von 90 % innerhalb einer Woche beobachtet (BEDOS ET AL 2002A).

Als wichtigster stoffintrinsischer Faktor für die Volatilisation wird der Dampfdruck der Stoffe angenommen (FOCUS 2008). Jedoch beeinflussen weitere Umweltfaktoren wie Temperatur, Sonneneinstrahlung oder Bodenfeuchte das Ausmaß der Volatilisation (BEDOS ET AL. 2009). Die Intensität der Volatilisation ist dabei stark tageszeitenabhängig (YATES 2006). Für die Volatilisation der Herbizide Trifluralin und Triallate wurde eine von der Bo-

denfeuchte abhängige Verdunstungsrate beobachtet und damit erklärt, dass Wassermoleküle bei der Adsorption an den Boden mit den Herbiziden um aktive Oberflächen konkurrieren und sich so die Volatilisation der Herbizide bei höherer Bodenfeuchte verstärkt (MAJEWSKI ET AL. 1993).

Die Volatilisation von <sup>14</sup>C-isotopenmarkiertem Isoproturon in Lysimeterstudien war sehr gering (maximal 1,17 % der ursprünglichen Aufwandmenge nach drei Monaten) und sehr stark von der verwendeten Bodenart abhängig. In einem Teil der in den Lysimetern untersuchten Boden/Zielpflanzenkombinationen überwog der Anteil des von den Pflanzenoberflächen volatilierten Isoproturons (1,13 %), die Volatilisation von der Bodenoberfläche (0,04 %) war viel niedriger (SCHROLL ET AL. 2008).

### **3.4 Atmosphärischer Transport**

Wenn Wirkstoffe von Pflanzenschutzmitteln durch die in den vorangegangenen Abschnitten genannten Mechanismen in die Atmosphäre gelangen, ist ein Transport über große Distanzen möglich. Die in der Luft oder in Niederschlägen gemessenen Konzentrationen lassen sich dann nicht mehr genau einer einzelnen Quelle zuordnen (BEDOS ET AL. 2002). Dieser long-range transport ist möglich, wenn die Stoffe nicht durch abiotischen Abbau aus der Atmosphäre entfernt werden. Es werden als Auslösewert für einer Betrachtung von long-range transport Eigenschaften im Rahmen der Pflanzenschutzmittelbewertung Halbwertszeiten in der Atmosphäre von mehr als 2 Tagen vorgeschlagen (FOCUS 2008). Für die Messung von aktuell verwendeten („current-use“) Herbiziden in Luftproben, Regen oder Nebel liegen zahlreiche Daten vor. Bei den Untersuchung von Regenproben wurden für einige der Wirkstoffe wiederholt die aktuellen Trinkwassergrenzwerte überschritten (DUBUS ET AL. 2000, CLARK 2003, QUAGHEBEUR ET AL. 2004, SCHEYER ET AL. 2006, SCHEYER ET AL. 2007, SCHUMMER ET AL. 2010, MESSING ET AL. 2012).

Current-use Herbizide werden nicht nur in Luft- oder Niederschlagsproben aus Regionen gefunden, in der diese in der Landwirtschaft angewendet werden. Zum Beispiel wurden im brasilianischen Pantanal, im Abstand von mehr als 75 km zum nächsten Anwendungsgebiet die Herbizide Metolachlor und Trifluralin in Regenproben (Konzentrationen bis zu 36 µg/l) nachgewiesen (LAABS ET AL. 2002).

Diese Herbizide konnten auch bei der Untersuchung von Regen-, Nebel-, Luft-, und Wasserproben in abgelegenen Regionen der Bering- und Chuki- See nachgewiesen werden (CHERNYAK ET AL. 1996). Der Wirkstoff Metolachlor ist in Deutschland in zugelassenen Pflanzenschutzmitteln auf dem Markt, Trifluralin konnte in Pflanzenschutzmitteln in Deutschland noch bis ins Jahr 2009 verwendet werden (BVL 2013).

In Aktuellen Untersuchungen konnten die Herbizide Metolachlor, Metazachlor, Pendimethalin, Trifluralin, Bentazon und Terbutylazin in Konzentrationen von bis zu 156 pg/m<sup>3</sup> in Luftproben in abgelegenen Gebieten der deutschen Bucht nachgewiesen werden. Die gemessenen Luftkonzentrationen werden nicht durch Einträge der Herbizide in Flussmündungen verursacht, vielmehr tragen die atmosphärischen Konzentrationen zu einem Eintrag ins Meerwasser bei (MAI ET AL. 2013).

Besonders große Transportweiten in der Größenordnung von hunderten bis tausenden Kilometern wurden für die in Deutschland nicht mehr anwendbaren Herbizide Atrazin, Simazin, Alachlor und Trifluralin, aber auch für die noch in Deutschland auf dem Markt befindlichen Stoffe MCPA, 2,4-D, Pendimethalin und Terbutylazin belegt (VAN DIJK & GUICHERIT 1999, BVL 2013).

### **3.5 Deposition von Luftschadstoffen auf Kiefernadeln**

Untersuchungen in der Sierra Nevada (USA) zeigten die Deposition von luftgetragenen Organo-phosphor-Flammschutzmitteln und -Pestiziden auf Kiefernadeln in geschützten Naturräumen ohne Industrie und Landwirtschaft. Es wird angenommen, dass Wälder eine Senke für luftgetragene Organophosphor-Pestizide darstellen (ASTON & SEIBER 1996, ASTON & SEIBER 1996A, ASTON ET AL. 1996B, ASTON & SEIBER 1997). Der Eintrag von luftgetragenen organischen Schadstoffen in alpine Biotope wird als Risiko für die dortigen Lebensgemeinschaften angesehen (DALY & WANIA 2005). In einem Bericht zum Monitoring von Luftschadstoffen in der Sierra Nevada-Southern Cascades Region (USA) wird der Nachweis von Pestiziden in Koniferennadeln und mögliche Auswirkungen von Luftschadstoffen im Ökosystem dieser Region beschrieben (SIMONICH & NANUS 2012).

Im Hinblick auf die Deposition von Luftschadstoffen sind die Nadeln der Waldkiefer gut für das Umweltmonitoring geeignet: Neben der Fichte mit einem Flächenanteil von 28 %

hat die Waldkiefer den zweitgrößten Anteil an der deutschen Waldfläche von 24 % (BMELV 2009).

Da die in den heimischen Wäldern vertretenen Laubbaumarten ihre Blätter im Herbst/Winter abwerfen, ist eine Akkumulation von luftgetragenen Herbiziden nur während einer Vegetationsperiode möglich. Im Gegensatz dazu verbleiben Kiefernadeln über eine Dauer von mehr als drei Jahren an den Zweigen. Die Nadeln ermöglichen deshalb eine Probenahme zu allen Jahreszeiten und können auch auf eine mögliche Akkumulation von Schadstoffen untersucht werden (NIEMINEN ET AL. 1999). Allerdings ändert sich während ihrer Lebensdauer die Beschaffenheit der epikutikulären Wachsschicht durch Umwelteinflüsse und Schadstoffe im Hinblick auf ihre Wasserdurchlässigkeit, dem Benetzungswinkel von Flüssigkeitströpfchen oder der elektronenmikroskopisch sichtbaren Struktur (GARDINGEN ET AL. 1991, CAPE 1983, CROSSLEY & FOWLER 1986).

Niederschläge verdunsten im Kronenraum von Kiefernbeständen stärker als bei Laubbäumen. Diese Verringerung der Niederschlagsmenge im Vergleich zum Freiland wird als Interzeption bezeichnet. Für Buchenwälder wurden als Durchschnitt über 5 Jahre Interzeptionswerte von 17,4 %, für Kiefernwälder hingegen 31,1 % ermittelt (CEPEL 1967). Dies lässt vermuten, dass das Niederschlagswasser längeren Kontakt mit den Nadeln von Kiefernbeständen als mit Blättern von Laubbäumen hat. Dies könnte gegenüber Buchenlaub zu einer stärkeren Aufnahme von Herbiziden aus Niederschlagswässern in die Nadeln von Waldkiefern führen.

Im Vergleich zu Laubbaumarten weisen Koniferen auf Grund der unterschiedlichen aerodynamischen Eigenschaften von Laubblättern und Nadeln eine stärkere Filterwirkung gegenüber Spraydrift auf. Windtunnelversuche zeigten, dass Zweige mit Nadeln im Vergleich zu Zweigen mit Laubblättern eine zwei bis vierfache Menge an Driftrückständen zurückhalten (UCAR ET AL. 2003). Für die nasse Deposition von Herbiziden unterscheiden sich Kiefern und Fichten voneinander: Messungen von Adsorptionsisothermen verschiedener Koniferennadeln zeigten, dass Nadeln der Waldkiefer eine größere spezifische Oberfläche im Hinblick auf die Adsorption aus wässrigen Lösungen (specific leaf surface contact area) besitzen als Fichtennadeln (SCHREIBER & SCHÖNHERR 1992, SCHREIBER & SCHÖNHERR 1993).

Für die Umweltprobenbank des Umweltbundesamtes werden seit über 20 Jahren Kiefernadeln gesammelt. Die Nadeln werden zum Beispiel auf Dioxine und PCBs untersucht (UBA 2013, RAPPOLDER ET AL. 2007). Der Nachweis von Persistenten Organischen Verbin-

dungen (POPs) und Organochlorpestiziden in Kiefernnadeln gelang in mehreren Regionen der Erde (FRANICH ET AL. 1993, HANARI ET AL. 2004, WENZEL ET AL. 2002, VILLA ET AL. 2003). Eine Auswertung von über 10 Jahren an abgelegenen Probenahmestellen in Kiefernnadel untersuchten PAH, PCB und Organochlorpestiziden ergab, dass das Langzeitmonitoring von Nadelproben ähnliche Ergebnisse zu den zeitlichen Trends der Luftbelastung liefert wie das Monitoring mittels hochvolumiger Luftprobenahme (KLANOVA ET AL. 2009).

Luftgetragene Chemikalien, die auf die Oberfläche von Pflanzen gelangen, können in die epikutikuläre Wachsschicht aufgenommen werden (SABIJIC ET AL. 1990). Bei der epikutikulären Wachsschicht handelt es sich um die äußerste wasserabweisende Schicht, die die Blattoberfläche der Landpflanzen bildet (RIEDERER & MÜLLER 2006). Im Rahmen einer Diplomarbeit an der Universität Lüneburg zur Entwicklung einer Analysemethoden für die Bestimmung von Pestiziden in Koniferennadeln wurde Isoproturon in der epikutikulären Wachsschicht von Nadeln der Waldkiefer nachgewiesen (HEDTKAMP 2002).

Bei Messungen in Kiefernnadeln von Bäumen am Rande einer landwirtschaftlichen Fläche im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit gelang der Nachweis des durch Spraydrift transportierten Herbizids Isoproturon in Konzentrationen von bis zu 333 ng/g in der epikutikulären Wachsschicht (bezogen auf das Trockengewicht der Kiefernnadeln). Dabei konnte eine Abhängigkeit des Isoproturongehaltes von der im Anwendungszeitraum vorherrschenden Windrichtung und von Regenereignissen ermittelt werden (FLEISCHER 2004).

### **3.6 Verteilungsverhalten an Pflanzenoberflächen und kutikulärer Transport**

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Aufnahme von luftgetragenen Herbiziden aus Niederschlägen in die Oberfläche von Nichtzielpflanzen am Beispiel der Waldkiefer. Für die Aufnahme von Herbiziden aus der wässrigen Phase ist die Wechselwirkung der Stoffe mit der kutikulären Wachsschicht ausschlaggebend: Eine Aufnahme durch die Stomata tritt nicht auf, außer bei der Anwendung von Herbiziden auf Zielpflanzen durch die Verwendung von Organosilicon-Tensiden ab einem Mindestgehalt von 0,2 bis 0,3 % der Tenside in der Sprühlösung (Zabkiewicz 2000).

Zu den Diffusions-, Adsorptions- und Desorptionsvorgängen an Pflanzenkutikeln gibt es Laboruntersuchungen, die mit wässrigen Lösungen der Stoffe und verschiedenen Oberflä-



chen durchgeführt wurden. Wässrige Pestizidlösungen wurden mit vollständigen Blättern (SCHREIBER & SCHÖNHERR 1992), enzymatisch isolierten Pflanzenkutikeln (BUCHHOLZ ET AL. 1998) oder mit rekonstituierten epikutikulären Wachsen (SCHREIBER ET AL. 1996) in Kontakt gebracht. Bei rekonstituierten epikutikulären Wachsen handelt es sich um dünne Wachsfilme auf einem Trägermaterial. Dazu werden die Wachse mit einem organischen Lösungsmittel aus Blättern extrahiert, der Extrakt wird auf das Trägermaterial aufgebracht und durch Verdunsten des Lösungsmittels bildet sich ein dünner Wachsfilm (SCHREIBER ET AL. 1996).

Mit den Oberflächen, die in einem Verteilungsversuch Wirkstoffe aus einer wässrigen Lösung aufgenommen haben, lässt sich in einem zweiten Schritt die Desorption der Stoffe bestimmen. Dies lässt eine Aussage zu, ob die Blattoberfläche beziehungsweise die Blätter für Pestizide in Niederschlägen eine Senke darstellen. Bei Verteilungsversuchen mit intakten Koniferennadeln wurde nachgewiesen, dass für die Stoffe 2,4-D und PCP bis zu 70% der aufgenommenen Menge in den Nadeln verbleiben und nicht wieder in die wässrige Lösung abgegeben werden. In diesem Zusammenhang wurde auf Grund der beobachteten Adsorptions-/Desorptionskinetik die Annahme getroffen, dass in Kiefernnadeln mehrere Kompartimente (epikutikuläre Wachse, Kutikula, inneres Nadelgewebe) existieren, in denen sich Konzentrationsgleichgewichte mit sehr unterschiedlichen Geschwindigkeiten einstellen (SCHREIBER & SCHÖNHERR 1993A). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Aufnahme von Anthracen in Maisblätter und die Beobachtung, dass der Stoff zeitabhängig in fünf unterschiedlichen Abschnitten der Blattoberfläche auftrat (epikutikuläre Wachse, Kutikula, äußere und innere Oberfläche der epidermalen Zellwände und Zytoplasma der epidermalen Zelle) können als Bestätigung dieser Hypothese gelten (WILD ET AL. 2004).

Die genannten Transportprozesse spielen sich in einer Tiefe von wenigen  $\mu\text{m}$  ab: Die Dicke der epidermalen Zellwand beträgt für Waldkiefernnadeln durchschnittlich etwa 4  $\mu\text{m}$  (LAAKSO ET AL. 2000), die darüber liegende kutikuläre Membran besitzt im Mittel einen Durchmesser von 200nm (RIEDERER & MÜLLER 2006). Auf der Oberfläche der kutikulären Membran der Waldkiefer befinden sich epikutikuläre Wachskristalle von bis zu 1,5  $\mu\text{m}$  Länge und 220 nm Durchmesser (CROSSLEY & FOWLER 1986).

Die Pflanzenkutikeln (BUCHHOLZ ET AL. 1998) beziehungsweise die epikutikulären Wachse (SCHREIBER ET AL. 1996) werden als Barriere und damit limitierender Faktor für die Aufnahme von Herbiziden in Pflanzenoberflächen angesehen. Es wird davon ausgegangen, dass der äußere Bereich der Kutikula, der den höchsten Anteil an kutikulären Wachsen aufweist

(etwa 10 % ihres Volumens), den größten Anteil an der Barriereeigenschaft der Kutikula für die Diffusion von Stoffen darstellt. Die übrigen inneren 90 % des Volumens der Kutikula tragen kaum zur Barrierewirkung bei, sie stellen vielmehr ein Kompartiment für die Sorption von organischen Molekülen dar (SCHREIBER & RIEDERER 1993A). Für den Transport durch die Kutikula sind mehrere stoffintrinsische Größen relevant, unter anderem der Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient und die Größe der durch die Kutikula diffundierenden Moleküle:

Für enzymatisch isolierte Kutikeln können Gleichgewichtskonzentrationen und damit Verteilungskoeffizienten zwischen wässriger Phase und Kutikula ermittelt werden, dabei korreliert der Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{CW}$ ) für eine Reihe von Stoffen gut mit dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{OW}$ ):

$$\log K_{CW} = 0,057 + 0,970 \log K_{OW} \quad (r = 0,987) \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen dem  $\log K_{CW}$  und dem Verteilungskoeffizienten zwischen rekonstituiertem epikutikulärem Wachs und wässriger Phase ( $\log K_{WachsW}$ ), dieser ist allerdings etwa um eine Größenordnung niedriger als der  $\log K_{CW}$  beziehungsweise der  $\log K_{OW}$ :

$$\log K_{WachsW} = -1,108 + 1,010 \log K_{CW} \quad (r = 0,994) \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

(RIEDERER & MÜLLER 2006)

Für Geschwindigkeitskonstanten, die bei der Desorption von Stoffen aus der Kutikula oder rekonstituierten epikutikulären Wachsen gemessen wurden, zeigte sich eine Größenselektivität und Korrelation mit der Molekülgröße. Kleine Moleküle sind in der kutikulären Membran mobiler als große Moleküle. Es wird angenommen, dass dieser Effekt auf abgegrenzte amorphe und kristalline Bereiche der kutikulären Wachse zurückzuführen ist, die für einen gewundenen Diffusionspfad der Moleküle verantwortlich sind (SCHREIBER ET AL. 1996). Für die in diesen Untersuchungen zum Teil verwendeten Feststoffe (darunter auch Herbizide) wurde das Molvolumen nicht experimentell bestimmt, sondern nach inkrementellen Berechnungsmethoden anhand der Molekülstruktur nach LeBas (Molar Volume  $V_M$ ) oder Abraham und McGowan (Molecular Volume  $V_X$ ) abgeschätzt. Für die Mobilität der Stoffe in Kutikeln verschiedener Pflanzenarten wurde eine gute Korrelation mit dem Quotienten aus  $\log K_{CW}/V_M$  beziehungsweise  $\log K_{CW}/V_X$  ermittelt (KERLER & SCHÖNHERR 1988, BUCHHOLZ ET AL. 1998, KERSTIENS 2006, RIEDERER & MÜLLER 2006, SCHREIBER & SCHÖNHERR

2009). Besonders Stoffe mit einem berechneten Molvolumen ab  $110 \text{ cm}^3/\text{mol}$  unterliegen verstärkt einem gröÙenselektiven Transportverhalten (POPP ET AL. 2005).

Allerdings bestätigen nicht alle späteren Untersuchungen eine Abhängigkeit der Mobilität von der Molekülgröße (BALLMANN ET AL. 2011). Es werden aber molekulare Deskriptoren wie  $V_x$  weiterhin auch in aktuellen Modellen zur Abschätzung der Toxizität beziehungsweise Toxikokinetik von Stoffen anhand von Strukturmerkmalen (QSAR, Quantitative Structure Activity Relationships) zum Beispiel im Rahmen der REACH-Verordnung angewendet (KÜHNE ET AL. 2013).

Pflanzenschutzmittel können nach Verdunstung der flüssigen Anteile verdrifteter Sprühlösungen als Feststoffe auf Pflanzenoberflächen vorhanden sein (FAERS & PONTZEN 2008). Für Anteile der Stoffe, die auf der Kutikula als Feststoffe vorliegen wurden im Vergleich zum  $\log K_{C/W}$  sehr niedrige Verteilungskoeffizienten zwischen dem Feststoff und der Kutikula berechnet (RIEDERER 1990).

Zusätzlich zu den stoffintrinsic Eigenschaften (Verteilungskoeffizienten und Molekülgröße) hat die Temperatur einen starken Einfluss auf die Transportprozesse an Pflanzenkutikeln (SCHREIBER 2002, KERSTIENS 2006).

Im Hinblick auf die Wirkung von Pflanzenschutzmittelformulierungen auf Zielpflanzen ist die Aufnahme der Stoffe durch die Kutikula in das Blattgewebe relevant. Eine transportfördernde Wirkung haben Tenside als Formulierungsbestandteile (BURGHARDT ET AL. 1998). Diese verbessern auch die Benetzung der Blattfläche (Verringerung des Kontaktwinkels, breitere Kontaktfläche), beeinflussen die Verdunstungsgeschwindigkeit der Tröpfchen und haben Auswirkungen auf die Form des nach Verdunstung verbleibenden Rückstandes (FAERS & PONTZEN 2008). Als typische Tröpfchendurchmesser für Sprührückstände auf der Zielpflanze werden  $500 \mu\text{m}$  angenommen (PIERCE ET AL. 2008). Darüber hinaus hat die je Flächeneinheit aufgebrauchte Dosis einen starken Einfluss auf die Aufnahmegeschwindigkeit (FORSTER ET AL. 2004, FORSTER ET AL. 2006).

### **3.7 Translokation und Metabolismus von Isoproturon**

Stoffe, die über die Blattoberfläche in Pflanzen aufgenommen werden, können von dort innerhalb der Leitbündel im Pflanzengewebe im Xylem (von der Wurzel aus betrachtet auf-

wärts) oder im Phloem (vom Blatt aus betrachtet abwärts) transportiert werden, dies wird als Translokation bezeichnet (TRAPP 2004).

In Untersuchungen mit radioaktiv markiertem ( $^{14}\text{C}$ ) Isoproturon zum Transport in Weizen und Gräsern wurde festgestellt, dass innerhalb von sieben Tagen größere Mengen des Wirkstoffes innerhalb der Blätter transportiert werden. Für Weizen wurde ein Transport von insgesamt (Xylem und Phloem) 9,7 % und für das Gras *Alopecurus myosuroides* Huds. von 28,1 % der Radioaktivität des applizierten Isoproturons gemessen. Es wurde belegt, dass innerhalb des Untersuchungszeitraumes 55,3 % (Weizen), beziehungsweise 32,0 % (Gras) der Radioaktivität als Rückstand auf der Pflanzenoberfläche verblieben. 17,6 % (Weizen) beziehungsweise 21,4 % (Gras) der Radioaktivität wurden in dem behandelten Abschnitt der Blätter wiedergefunden (ACHHIREDDY & KIRKWOOD 1986). In dieser Untersuchung wurde nicht überprüft, ob die gemessene Radioaktivität von dem Wirkstoff selbst oder zum Teil von seinen Metaboliten herrührt. Auffällig ist, dass die taxonomisch sehr ähnlichen Organismen (Gras und Weizen) bereits sehr unterschiedliche Transporteigenschaften zeigen.

Herbizide können in Pflanzen Abbauvorgängen unterliegen (Metabolismus), die in den meisten Fällen die Polarität der Metabolite gegenüber dem ursprünglichen Wirkstoff erhöhen. Dabei sind Vorgänge wie Oxidation, Hydroxylierung, Hydrolyse (etc.) von der Konjugation mit Glucose oder Aminosäuren zu unterscheiden (SIMINSZKY 2006).

Für den Wirkstoff Isoproturon wurden in Sojabohnen überwiegend die Metabolite monodesmethyl-Isoproturon, 2-hydroxy-Isoproturon und 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon nachgewiesen. Der Abbau in Weizen erfolgte insbesondere über 2-hydroxy-Isoproturon und 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon. Diese Versuche wurden in Zellkulturen mit radioaktiv markiertem Isoproturon durchgeführt, unter diesen Bedingungen betrug der gesamte Abbau 45 bis 54 % innerhalb von 48 Stunden. Nach 48 Stunden waren unter diesen Bedingungen 3 %, nach sieben Tagen 14 % der Radioaktivität in unlöslicher Form an Hemizellulose und Lignin gebunden (GLÄSSGEN ET AL. 1999).

Als Hauptabbauwege für Isoproturon in Pflanzen werden Hydroxylierung und Demethylierung angegeben (SINGH ET AL. 1998). Neben den oben genannten Metaboliten wurden auch isopropenyl-Isoproturon (GLÄSSGEN ET AL. 1999), didesmethyl-Isoproturon, und ein saurer Metabolit identifiziert. Das korrespondierende Anilin konnte nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (SINGH ET AL. 1998).

### **3.8 Probenaufbereitung**

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick zu den Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Probenaufbereitung.

Die Probenaufbereitung beinhaltet unter anderem die Extraktion von Herbiziden mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen (darunter auch Säuren und Basen) und Polaritäten. Die Herbizide wurden mittels Flüssig-Flüssig Extraktion oder Festphasenextraktion aus stark schwebstoffhaltigen wässrigen Proben im Rahmen von Verteilungsversuchen extrahiert. Es wurden Proben aus Nadeln der Waldkiefer durch Extraktion mit Dichlormethan in die Kompartimente der epikutikulären Wachsschicht und des übrigen Nadelgewebes getrennt und die Extrakte beider Kompartimente mittels Festphasenextraktion aufgereinigt.

In den spurenanalytischen Verfahren zur Quantifizierung der Herbizidgehalten in den aufgereinigten Proben wurden HPLC-MS, GC-ECD und GC-MS Kopplungen verwendet.

#### **3.8.1 Extraktion der Herbizide aus den Nadelkompartimenten**

Auf Grund der Annahme, dass sich Koniferennadeln im Hinblick auf die Aufnahme von organischen Schadstoffen und Herbizide in verschiedene Kompartimente unterteilen lassen (siehe Abschnitt 3.6 dieser Arbeit, SCHREIBER & SCHÖNHERR 1993A) wurden entsprechende Extraktionsverfahren zur Auftrennung der Nadelproben angewendet. Bei der Untersuchung von Kiefernnadeln (*Pinus ponderosa*) in der Sierra Nevada (USA) auf organophosphorhaltige Flammenschutzmittel und Pestizide wurden die Nadeln durch Abspülen mit destilliertem Wasser, einer wässrigen Tensidlösung und Chloroform in die entsprechenden Kompartimente unterteilt und der Pestizidgehalt in diesen getrennt quantifiziert (ASTON & SEIBER 1996, ASTON & SEIBER 1996A, ASTON ET AL. 1996B, ASTON & SEIBER 1997). Auch für die Untersuchung von POPs in Kiefernnadeln wurden Methoden verwendet, bei denen eine Trennung in epikutikuläre Wachse und restliche Nadeln durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln vorgesehen ist (KYLIN 1996, HELLSTRÖM ET AL. 2004).

Die Extraktionsdauer epikutikulärer Wachse mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln (meist Chloroform oder Dichlormethan) wird mit einer relativ großen Spannweite angegeben:

unter anderem in den oben genannten Untersuchungen zu phosphororganischen Verbindungen in Kiefernadeln für insgesamt 1,5 Minuten in Chloroform,

- in einem Forschungsbericht zu „Koniferennadeln als natürliche Sammler organischer Luftinhaltsstoffe“ für Fichtennadeln 10 Minuten in Dichlormethan (HUTZINGER ET AL. 1992),
- 20 Minuten in Chloroform für die Extraktion der epikutikulären Wachse von Buchenlaub (SCHREIBER ET AL. 1996) oder
- bis zu 48h (HELLSTRÖM ET AL. 2004) oder 96 h in Dichlormethan für Kiefernadeln (KYLIN 1996).

Bei allen genannten Extraktionsmethoden werden die epikutikulären Wachse bei Raumtemperatur und nur geringer mechanischer Belastung (stehen lassen oder im Überkopfschüttler) extrahiert.

Darüber hinaus wird bezweifelt, ob eine eindeutige quantitative Trennung zwischen epikutikulären Wachsen, intrakutikulären Wachsen und dem Blattgewebe durch Extraktion mit Lösungsmitteln möglich ist (SCHREIBER & SCHÖNHERR 2009). Es wurden deshalb im Rahmen dieser Dissertation und im Rahmen der Diplomarbeit von Angelika Klugkist Vorversuche zur Extraktion von Waldkiefernadeln mittels Dichlormethan im Hinblick auf die Menge des extrahierten Wachses und aus dem Nadelinneren mitextrahiertem Chlorophyll in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer durchgeführt. Die Extraktion von Chlorophyll und eine Grünfärbung der Extrakte wird als Indikator dafür gesehen, dass auch Bestandteile des Nadelinneren extrahiert wurden (RIEDERER & MÜLLER 2006).

### **3.8.2 Extraktion der verbleibenden Nadel oder intakter Nadeln**

Für die Extraktion der Herbizide aus den nach der Extraktion der epikutikulären Wachsschicht verbleibenden Nadeln beziehungsweise intakter Nadeln wurden im Rahmen dieser Dissertation und der Diplomarbeit von Angelika Klugkist Methoden erprobt, die für die Extraktion von Pestiziden in einem weiten Polaritätsbereich unter anderem in der Rückstandsanalytik von Pflanzenproben angewendet werden. Eine aktuelle Extraktionsmethode, die auch in der Untersuchung von PBDE in Fichtennadeln (ST-AMAND ET AL. 2007) oder in Lebens- und Futtermitteln (PANG ET AL. 2006, VDLUFA 2005) angewendet wurde, ist die be-

schleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE). Das Funktionsprinzip beruht auf der Extraktion der Probe mit einem Lösungsmittel bei hoher Temperatur und Druck über dem Siedepunkt des Lösungsmittels. Pflanzenmaterialien werden hierfür zusammen mit einem Trägermaterial (Diatomeenerde) und Quarzsand zum Beispiel in einer Kugelmühle homogenisiert und in eine Extraktionszelle gefüllt. Die druckfest verschlossene Extraktionszelle wird automatisch mit dem Lösungsmittel befüllt und beheizt. Nach dem Ende eines Extraktionszyklus wird die Zelle mit Stickstoff durchströmt und der Extrakt aufgefangen. Bei Bedarf können mehrere Extraktionszyklen durchgeführt werden (ROSTAGNO ET AL. 2013).

Als alternative Methode können Kiefernnadeln mit einem Ultraturrax zusammen mit dem Lösungsmittel homogenisiert werden (ASTON & SEIBER 1996A). Für die Analytik von PAH in Kiefernnadeln ist nach dem Zerkleinern der Nadeln die Ultraschallextraktion eine gängige Technik (RATOLA ET AL. 2008 ). Die Anwendung von Ultraschall nach dem Homogenisieren beschleunigt die Durchdringung der Probenmatrix mit dem Lösungsmittel und die Verteilung der Analyten von den festen Bestandteilen der Probenmatrix in den Extrakt. Durch die Ultraschallwellen bilden sich Kavitationsblasen in der Flüssigkeit unter Bildung lokal hoher Drücke und Temperaturen, die zur Extraktion des Analyten beitragen (FIDALGO-USED ET AL. 2007).

### **3.8.3 Aufreinigung von Extrakten epikutikulärer Wachse und Kiefernnadeln**

Die Methodenentwicklung für die Aufreinigung von epikutikulären Wachsextrakten und Extrakten intakter Kiefernnadeln erfolgte im Rahmen dieser Dissertation und mehrerer Diplomarbeiten an der Universität Lüneburg (HEDTKAMP 2002, FLEISCHER 2004, STARK 2007, KLUGKIST 2008). Es wurden Verfahren, die einerseits auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Wachse in organischen Lösungsmitteln und andererseits auf Methoden zur Festphasenextraktion beruhen, erprobt.

Epikutikuläre Wachse bestehen abhängig von der jeweiligen Spezies und auch jahreszeitenabhängig aus unterschiedlichen langkettigen Molekülen (Kettenlängen: 20-40 Kohlenstoffatome), insbesondere Alkohole, Fettsäuren und n-Alkane (RIEDERER & MÜLLER 2006). Für die Waldkiefer überwiegt bei den langkettigen Alkoholen und Fettsäuren das 10-Nonacosanol (ALI ET AL. 2005).

In Untersuchungen zur Analytik von PCB und Organochlorpestiziden wurde beobachtet, dass sich rekonstituierte epikutikuläre Wachse bei Raumtemperatur gut in Dichlormethan, aber nur unter Erhitzen in Toluol, Hexan oder Acetonitril lösen. Die Wachse bilden beim Abkühlen beziehungsweise lagern im Gefrierfach Niederschläge, die sich vom überstehenden Lösungsmittel durch Zentrifugieren trennen lassen. Darauf basierend wurden unterschiedliche Fraktionen der Wachse gewonnen (KYLIN 1996). Die schlechte Löslichkeit der Wachse in Acetonitril wurde auch für die Analytik von Organophosphorpestiziden in Kiefernadeln angewendet (ASTON & SEIBER 1996A).

Für die Aufreinigung von Wachsextrakten und Extrakten intakter Kiefernadeln wurden im Rahmen dieser Dissertation und in den oben genannten Diplomarbeiten insbesondere Versuche zur Festphasenextraktion mit verschiedenen Adsorbentien (unter anderem Kieselgel, Polystyrol-Divinylbenzol, Aminopropyl-modifiziertes Kieselgel, Carbon-black und Kombinationen daraus) durchgeführt.

Die für die Untersuchung der Herbizidkonzentration in der epikutikulären Wachsschicht und der verbleibenden Kiefernadeln bei Verteilungsversuchen angewandten Aufreinigungsmethode beruht auf einer Multimethode zur Analytik von 90 Pestiziden in Obst und Gemüse. In dieser Methode wird der organische Extrakt in Aceton auf ein geringes Volumen eingengt und mit Reinstwasser verdünnt. Die Probe wird ähnlich einer Wasserprobe per Festphasenextraktion aufgearbeitet. Die wässrige Probelösung wird an Polystyrol-Divinylbenzol Festphasenextraktionskartuschen angereichert. Die Elution mit organischen Lösungsmitteln erfolgt bei hoher Matrixbelastung der Proben über eine zweite Kartusche mit einem schwachen Anionenaustauscher aus diethyl-aminopropyl-modifiziertem Kieselgel (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ 2003).

### **3.9 Untersuchte Herbizide und Kriterien für deren Auswahl**

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Herbizide wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- hohe in Verkehr gebrachte Mengen (> 25 t/a in mindestens einem der Jahre 2004-2006, anhand der Veröffentlichungen des BVL zu den in Verkehr gebrachten Pflanzenschutzmitteln)



- Nachweis in Niederschlägen oder Luftproben (anhand einer Literaturrecherche insbesondere in den im Abschnitt 3.4 genannten Quellen)
- ein  $\log K_{OW}$  ab 3 (aus TOMLIN 2003)

Zusätzlich wurden auch die Stoffe Carfentrazone-ethyl und Metsulfuronmethylester untersucht, die im Rahmen der Diplomarbeit auf einer behandelten Ackerfläche nachgewiesen wurden (FLEISCHER 2004).

Abbildung 3 gibt einen Überblick der ausgewählten Herbizide. Es ist offensichtlich, dass nicht alle ausgewählten Stoffe alle drei Kriterien erfüllen. Die Abbildung ermöglicht in einem gewissen Rahmen eine Priorisierung der Stoffe. Allerdings ist zu bedenken, dass zum Beispiel das Kriterium Menge durch die Tatsache in seiner Aussage eingeschränkt ist, dass die Aufwandmengen bei der Entwicklung vieler moderner Herbizide immer geringer werden, vermutlich bei der gleichen Wirksamkeit auf Zielpflanzen und möglicherweise auch Nichtzielpflanzen (BUNDESTAG 2011).

Insbesondere für die in Abbildung 3 genannten Herbizide wurden im Rahmen dieser Dissertation und der Diplomarbeiten von Ann-Kathrin Stark, Angelika Klugkist und Isabell Zunker Methoden zur Probenvorbereitung und Analytik entwickelt. Bei den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Verteilungsversuchen wurden, abhängig von der Fragestellung und Versuchsdurchführung jeweils eine Auswahl dieser Stoffe untersucht. Die in den Verteilungsversuchen bearbeiteten Stoffe werden in den Beschreibungen der Versuchsläufe im Abschnitt 4 genannt.

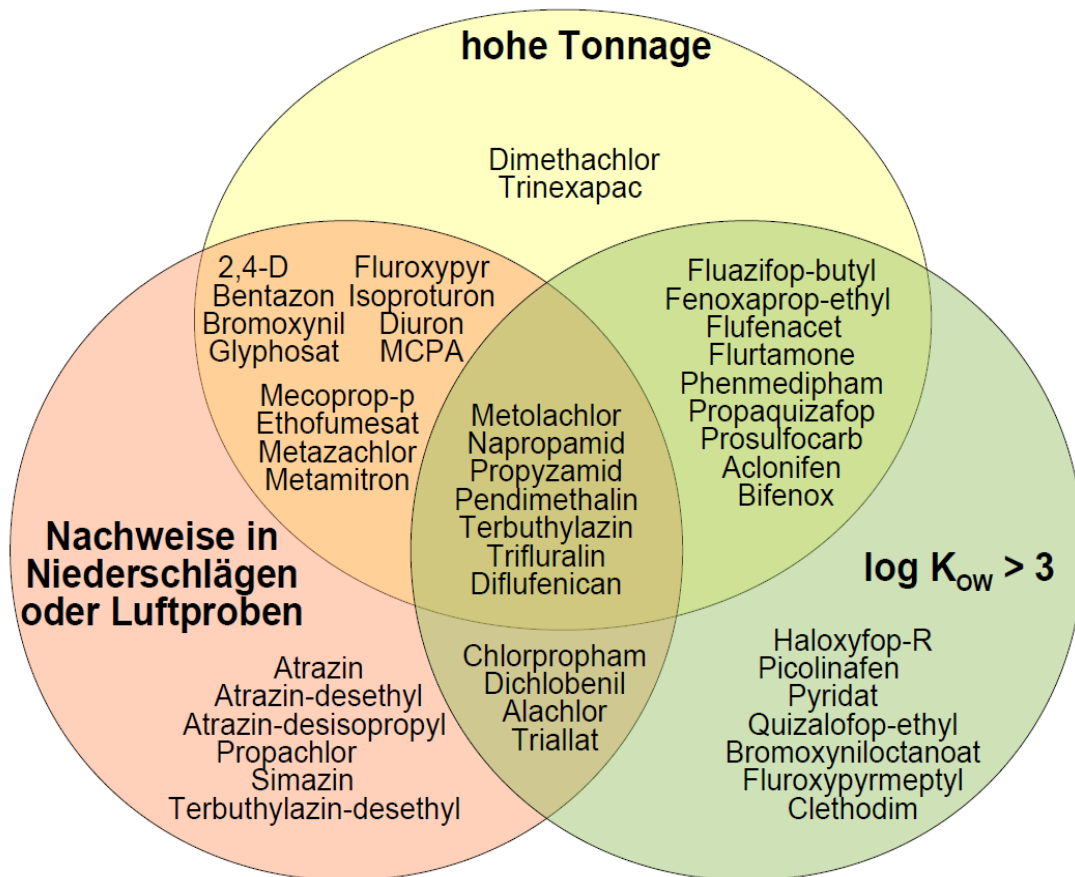


Abbildung 3: Literaturrecherche zur Priorisierung von Herbizidwirkstoffen anhand Tonnage, Nachweis in der Umwelt und Polarität

## **4 Experimentelles**

Die folgenden Abschnitte beschreiben die experimentellen Schwerpunkte dieser Arbeit. Generell wurde bei allen durchgeführten Arbeiten darauf geachtet, dass möglichst keine Blindwerte in die Proben eingetragen und keine Kreuzkontaminationen zwischen den Proben verschleppt wurden: Alle Labormaterialien wurden in der Laborspülmaschine gereinigt, kritische Oberflächen wurden mit Ethanol oder Aceton (technischer Reinheit) und Methanol oder Aceton (Reinheit für die Chromatographie) gespült. Die verwendeten HPLC- und GC-Vials wurden im Muffelofen bei 400 °C ausgeglüht.

### **4.1 Probenvorbereitung**

Zur Probenvorbereitung zählten insbesondere:

- die Probenahme von Kiefernzweigen,
- das Entfernen der Nadeln von den Zweigen,
- die Extraktion der epikutikulären Wachse und der verbleibenden Nadel,
- die Anreicherung und Aufreinigung der dabei anfallenden Extrakte mittels Festphasenextraktion und
- die Anreicherung und Aufreinigung wässriger, stark schwebstoffhaltiger Lösungen aus den durchgeführten Verteilungsversuchen

#### **4.1.1 Probenahme**

Für die Probenahme von Kiefernzweigen an verschiedenen Standorten im Freiland wurden mit Ethanol gereinigte Astschneider, Gartenschere und Kunststoffkisten verwendet. Die Zweige wurden immer so von den Ästen der Bäume getrennt, dass sich die Schnittstelle im Abschnitt des Zweiges befand, der die nicht beprobten Nadeln des vorangegangenen Jahrgangs trug. Bei der Probenahme wurden Laborhandschuhe getragen und die von den Bäu-

men getrennten Zweige nur am Ende mit der Schnittstelle berührt. Die Zweige wurden direkt in die vorher mit Laborpapier und Aluminiumfolie ausgelegte Kunststoffkiste abgelegt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und möglichst ohne Verzögerung ins Labor transportiert.

Im Labor wurden die zu untersuchenden Nadeln mit Pinzetten von den Zweigen getrennt. Die einzelnen Nadeln wurden mit der Pinzettenspitze an dem Häutchen, das die holzige Verbindungsstelle der Nadeln zum Zweig bedeckt umschlossen und vom Zweig gezupft.



*Abbildung 4: Trennen der Kiefernadeln vom Zweig*

Dabei wurden ebenfalls Laborhandschuhe getragen und darauf geachtet, dass nur die Verbindungsstelle zum Zweig und nicht die übrigen Oberflächen der Nadeln mit der Pinzette berührt wurden. Die Nadeln wurden in Bechergläsern gesammelt und dann wie in den folgenden Abschnitten beschrieben weiterverarbeitet.

#### **4.1.2 Bestimmung der Trockenmasse**

Um für die im Abschnitte 4.3 beschriebenen Verteilungsversuche die applizierten Wirkstoffmengen in Relation zu den in Freilandmessungen ermittelten Herbizidkonzentrationen (zum Beispiel Isoproturon in Kiefernadeln am Rand einer landwirtschaftlichen Fläche, FLEISCHER 2004) setzen zu können, wurde die Trockenmasse der jeweils verwendeten Nadeln bestimmt. Um das am besten für die Trockenmassebestimmung geeignete Verfahren zu ermitteln, wurden in Vorversuchen Kiefernadeln im Trockenschrank bei 105° C, im Exsikkator bei Raumtemperatur und in einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Die Vorversuche ergaben sehr ähnliche Gewichtsverluste bei sehr unterschiedlichen Trocknungszeiten. Deshalb wurde für die Bestimmung der Trockenmasse im Rahmen der Verteilungsversuche folgende Methode verwendet:

Es wurden etwa 5 g Nadeln (Frischgewicht) wie im Abschnitt 4.1.1 beschrieben von den Zweigen in ein Becherglas gezupft. Gleichzeitig wurden die Nadeln dabei abgezählt, um das durchschnittliche Trocken- und Frischgewicht pro Nadel zu ermitteln. Das Frischgewicht der Nadeln wurde an der Laborwaage bestimmt. Die Nadeln wurden im offenen Becherglas bei 105 °C in den Trockenschrank gestellt, das Trockengewicht wurde nach 24 h bestimmt.

#### **4.1.3 Extraktion epikutikulärer Wachse**

Die Extraktion der epikutikulären Wachse erfolgte bei Raumtemperatur mit Dichlormethan im Überkopfschüttler bei 40 U/min. Für die im Abschnitt 4.3 beschriebenen Verteilungsversuche wurden 1 g Nadeln (Frischgewicht) mit 10 ml Dichlormethan in verschraubbare Reagenzgläser gegeben und für 20 Minuten extrahiert. Der Extrakt wurde aus dem Reagenzglas über einen Keramikfilter (Porenweite 4 µm) in ein 30 ml Schraubfläschchen abgegossen. Weitere 5ml Dichlormethan wurden zu den Nadeln im Reagenzglas gegeben und das verschlossene Reagenzglas wurde von Hand kurz umgeschüttelt. Die Lösung wurde ebenfalls über den Filter in das Schraubfläschchen abgegossen. Der Filter wurde mit weiteren 5 ml Dichlormethan gespült. Alle genannten Dichlormethanmengen wurden somit im Schraubfläschchen vereinigt. Für die Proben des Verteilungsversuchs im Abschnitt 4.3.3 wurde nach der Extraktion zu den Extrakten in den Schraubfläschchen mit einer Mikroliter-

spritze 7 µl der Lösung des deuterierten internen Standards Isoproturon D6 ( $c = 11,1 \text{ mg/l}$ , Herstellung der Lösung siehe Abschnitt 4.3.3.2) gegeben und somit um 77,7 ng aufgestockt.

#### **4.1.4 Charakterisierung von epikutikulären Wachsextrakten: Gehalt an Chlorophyll und Harzsäuren**

Bei ersten Versuchen der Extraktion von Kiefernnadeln mit Dichlormethan wurde beobachtet, dass sehr selten an den beprobten Zweigen Harztröpfchen austraten. Eine Verunreinigung von Wachsextrakten mit geringen Mengen an Kiefernharz ist für lediglich analytische Fragestellungen wie der Nachweis von Pestiziden in Kiefernnadeln aus dem Freiland vernachlässigbar. Allerdings könnten Verteilungsversuche zum Beispiel mit rekonstituierten Wachsen durch größere Mengen verschleppten Harzes beeinflusst werden. Ein anderer Aspekt ist die Extraktionsdauer (oder auch Extraktionstemperatur) der Nadeln, bei der zwar eine möglichst große Menge an epikutikulären Wachs von den Nadeln extrahiert wird, aber möglichst wenig Bestandteile (z.B. Chlorophyll oder Harze) aus dem Nadelinneren austreten und in den Wachsextrakt gelangen. Da in der Literatur für verschiedene Lösungsmittel und Spezies ein Bereich von Extraktionsdauern beschrieben (vergleiche Abschnitt 3.8.1) wird, wurden Vorversuche durchgeführt, um diese Daten zu überprüfen. Die Durchführung, das Ergebnis und die Interpretation dieser Versuche werden in diesem Abschnitt zusammen beschrieben, da sie als Grundlage für das im Abschnitt 4.1.1 genannte Probenahmeverfahren und das im Abschnitt 4.1.3 beschriebene Extraktionsverfahren gesehen werden.

#### **Extraktion gefärbter Blattbestandteile**

Um die optimale Extraktionsdauer für epikutikuläre Wachse zu ermitteln, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Angelika Klugkist abhängig von der Extraktionsdauer:

- die UV/VIS-Spektren der Extrakte in Dichlormethan in einem breiten Wellenlängenbereich von 230-800 nm aufgenommen. Es wurde angenommen, dass eine zeitabhängig ansteigende Extinktion im sichtbaren Wellenlängenbereich von den gefärbten Blattinhaltsstoffen (Chlorophylle, Carotine) verursacht wird. Die Auswertung der Extinktionsdaten er-

folgte bei den in der Literatur für Chlorophyllextrakte angegebenen Wellenlängen und bei den in diesem Versuch ermittelten Absorptionsmaxima (663 nm).

- das Gewicht des verbleibenden Wachsrückstandes nach Verdunsten des Dichlormethans mit der Analysenwaage gewogen.

Für diese Untersuchung wurden jeweils 7 g Nadeln Frischgewicht mit 10 ml Dichlormethan für 20 bis 4267 Minuten am Überkopfschüttler extrahiert. Die Versuche zeigten ein Plateau der gewogenen Extraktreste nach einer Extraktionsdauer von 1500 Minuten bei einem gleichzeitig linearen Anstieg der UV/VIS-Extinktion über die gesamte Versuchsdauer. Dieser Vorversuch wurde wie folgt im Hinblick auf das im Abschnitt 4.1.3 beschriebene Extraktionsverfahren der epikutikulären Wachse interpretiert:

- Die Extraktion der epikutikulären Wachse erfolgt sehr schnell innerhalb weniger Minuten.
- Längere Extraktionsdauern über 40 Minuten führen zu einer linear ansteigenden Mitextraktion von Chlorophyll und anderen gefärbten Blattbestandteilen aus dem Nadelinneren.

Um eine annähernd quantitative Extraktion der epikutikulären Wachsschicht (vergleiche auch Abschnitt 3.8.1) bei konstanten Bedingungen zu erreichen, wurde bei allen durchgeführten Versuchen das im Abschnitt 4.1.3 beschriebene Extraktionsverfahren beibehalten. Dieses Verfahren wurde bereits bei den Freilandmessungen von Isoproturon in Kiefernnadeln angewendet (HEDTKAMP 2002, FLEISCHER 2004).

### **Überprüfung auf extrahierte Harzsäuren**

Um die Wachsextrakte für Verteilungsversuche mit rekonstituierten Wachsen auf verschleppte Harzanteile zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung charakteristischer Harzbestandteil in reinem Kiefernharz und in den Wachsextrakten qualitativ verglichen. Dafür wurden GC-MS Fingerprints der für Harze charakteristischen Harzsäuren ermittelt. Harzsäuren sind Triterpene, diese sind in Koniferennadeln zu einem geringeren Anteil enthalten als im Holz der Bäume. Zu den für Waldkiefern charakteristischen Harzsäuren gehören Pimar-, Sandaracopimar-, Isopimar-, Levopimar-, Dehydroabietin-, Abietin- und Neoa-bietin-Säure (Manninen 2002). Für organische Säuren (auch für sehr lipophile wie die

Harzsäuren) wäre eine Analytik per LC-MS denkbar und wurde in Vorversuchen erprobt, allerdings ermöglicht das LC-MS API 165 keine charakteristische Fragmentierung wie das ebenfalls in der Arbeitsgruppe Umweltchemie vorhandene GC-MS (Trace DSQ Thermo Finnigan). Dieses verfügt darüberhinaus über eine Bibliothek und Suchfunktion zur Identifizierung von Analyten anhand ihrer Fragmente (NIST). Die Analytik von Stoffen mit Säuregruppen mittels GC ist unbefriedigend, meist sind starkes Tailing, Adsorption und Zersetzung im Liner und damit einhergehend schlechte Nachweisgrenzen zu beobachten (MEYER 2005). Daher wurden die Wachsextrakte und Harzlösungen mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) derivatisiert und mittels GC-MS analysiert.

Zur Derivatisierung wird zu dem organische Extrakt mit den sauren Analyten lediglich ohne Erhitzen TMSH im Überschuss hinzugegeben, es bilden sich die Methylester der Säuren. Überschüssiges TMSH zersetzt sich im GC-Liner bei 250 °C und greift nicht die Säule an (GUTNIKOV 1995).

Für die Analyse wurden Lösungen von Kiefernharz ( $c = 309 \text{ mg/L}$ ) und epikutikulären Wachsen ( $c = 381 \text{ mg/L}$ , hergestellt nach dem Verfahren in Abschnitt 4.1.3) durch Einwiegen an der Analysenwaage und Auffüllen mit Dichlormethan in Messkolben hergestellt. Es wurden dieselben epikutikulären Wachse untersucht, die für Verteilungsversuche mit rekonstituiertem epikutikulärem Wachs und wässriger Phase verwendet wurden. Von diesen Lösungen wurden mit einer Kolbenhubpipette  $200 \mu\text{l}$  in ein GC-Vial mit Insert gegeben. Es wurden je Vial  $100 \mu\text{l}$  TMSH mit einer Kolbenhubpipette hinzugegeben.

Nach Verschließen der Vials wurden diese geschüttelt und innerhalb der nächsten Stunden mittels GC-MS vermessen.

Die qualitative Auswertung der Chromatogramme und MS-Spektren mittels der NIST-Bibliothekssuche zeigte, dass in den Harzproben deutliche Peaks für die Methylester der genannten Harzsäuren identifiziert werden konnten (Abbildung 5). In den Wachsproben waren diese Stoffe mit viel geringeren Signalstärken nahe an der Nachweisgrenze enthalten. In den Wachsproben konnten anhand der Spektren der in Abbildung 5 gezeigten Peaks die für epikutikuläre Wachse charakteristischen langkettigen Fettsäuren (beziehungsweise deren Methylester) und der langkettige Alkohol 10-nonacosanol identifiziert werden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass mit den in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.3 beschriebenen Verfahren keine nennenswerten Harzmengen in die epikutikulären Wachse verschleppt wurden, die für Verteilungsversuche mit rekonstituierten Wachsen verwendet wurden.



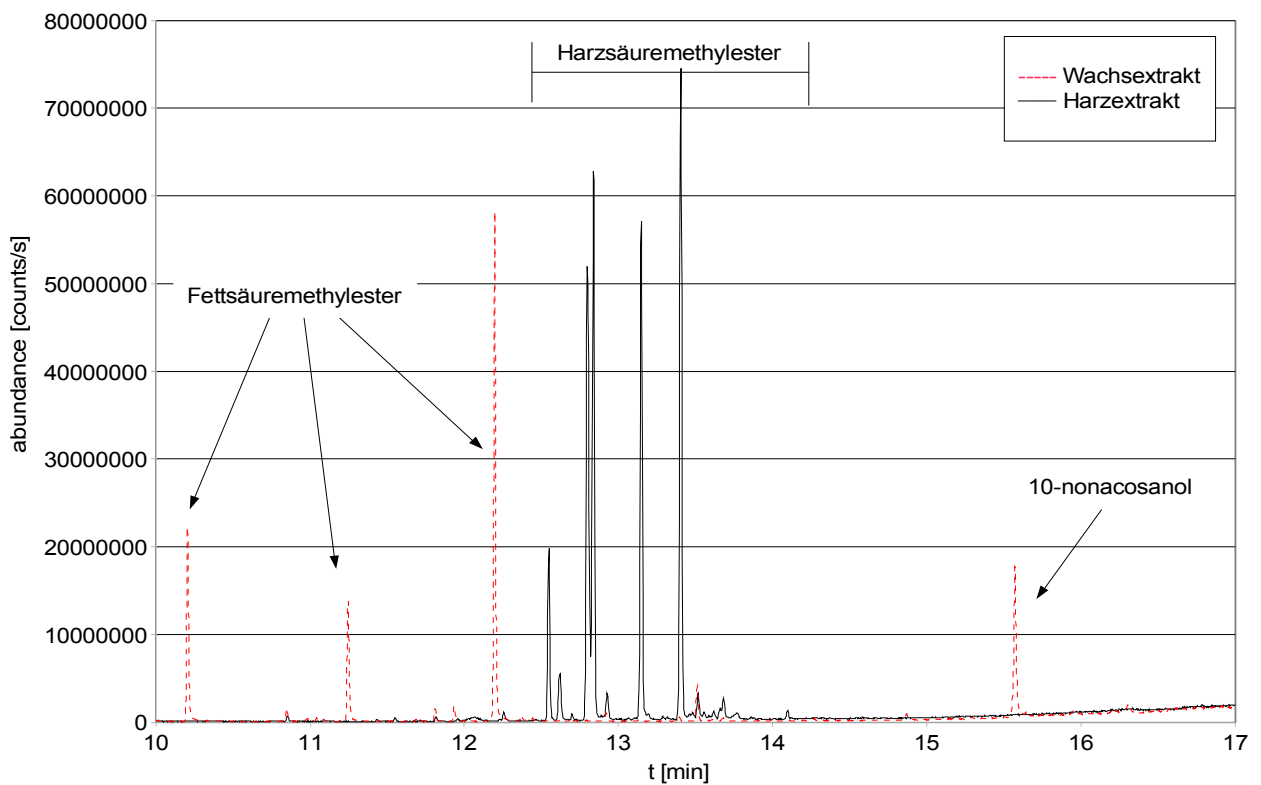


Abbildung 5: anhand der jeweiligen Massenspektren identifizierte charakteristische Harz- und Wachsbestandteile

- Totalionenchromatogramme der derivatisierten Harzextrakte (schwarz) und Wachsextrakte (rot)

#### 4.1.5 Extraktion gesamter oder nach der Extraktion der Wachsschicht verbleibender Nadeln

Es wurden je nach untersuchter Fragestellung die gesamte Nadel inklusive Wachsschicht oder die nach der Extraktion der epikutikulären Wachsschicht mit Dichlormethan verbleibende Nadel extrahiert.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Angelika Klugkist wurde die Extraktion von Nadelproben mittels beschleunigter Lösungsmittelextraktion (Accelerated Solvent Extraction – ASE) und mittels Ultraturax- und Ultraschallextraktion erprobt. Für die überwiegende An-

zahl der in dieser Diplomarbeit untersuchten Herbizide zeigte die Homogenisierung der Nadeln in der Kugelmühle und die Extraktion mittels ASE gute Wiederfindungen. Allerdings erwiesen sich mehrere Aspekte der Probenaufarbeitung mittels Kugelmühle und ASE im späteren Verlauf der Dissertation als nachteilig. Die Homogenisierung der Nadelproben in der Kugelmühle war oft mangelhaft, damit verbundenen waren auch Probleme bei der Zugabe des internen Standards in die Mahlbecher. Darüberhinaus zeigte sich ein höherer Zeitbedarf beim Befüllen der Kugelmühle und Reinigen der Mahlbecher. Die in der Arbeitsgruppe vorhanden ASE ermöglicht nur die Extraktion jeweils einer Probe und ist auf Grund der Größe der Extraktionszellen besser für größere Probenmengen (ab etwa 5 g Nadeln Frischgewicht) geeignet. Bei Nadelproben, die mittels ASE extrahiert wurden fiel auf, dass der nach der Extraktion verbleibende Rückstand aus Zellulosematerial (herrührend aus dem Zellmaterial der Kiefernnadeln) und Diatomeenerde (Füllmaterial und gegebenenfalls Adsorbens in der ASE) unregelmäßig verteilte grüne Flecken aufwies. Dies deutet darauf hin, dass die Extraktion über den Querschnitt der ASE-Zelle gesehen nicht homogen abläuft. Dieses Problem ließ sich auch nicht durch Versuche beheben, die Packung der ASE-Zelle beim Befüllen homogener zu gestalten. Der Rückstand aus Zellmaterial der Ultraturrax- und Ultraschallextraktion war weiß und zeigte keine grünen Verfärbungen.

Es wurde festgestellt, dass im Hinblick auf die Präzision der Ergebnisse, den Zeitbedarf und der bei der Extraktion von 1 g Kiefernnadeln (Frischgewicht) verbrauchten Lösungsmittelmengen und weiteren Materialien (Diatomeenerde für die ASE) die Homogenisierung mittels Ultraturrax und Extraktion im Ultraschallbad am effizientesten war. Dies gilt insbesondere für die Analytik des im Verteilungsversuch im Abschnitt 4.3.3 untersuchten Isoproturons und seiner Abbauprodukte. Mit aufgestockten Proben durchgeführte Versuche zeigten, dass sich aus dem Rückstand der Ultraturrax- und Ultraschallextraktion, der nochmals mittels ASE extrahiert wurde, keine Analyten im ASE-Extrakt nachweisen lassen.

Für die Verarbeitung von nach der Extraktion der epikutikulären Wachsschicht verbleibenden Nadeln oder für intakte Nadeln wurde folgendes Verfahren verwendet:

Etwa 1 g Nadeln Frischgewicht (dies entspricht ungefähr 10-11 Waldkiefernnadeln) wurden in einen 50 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Wenn es sich um Nadeln handelt, deren Wachsschicht in einem vorangegangenen Arbeitsschritt extrahiert wurde, wurden diese komplett in den Erlenmeyerkolben überführt, da auch bei der Extraktion der epikutikulären Wachse nach der im Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Vorgehensweise dieselbe Menge an Nadeln verwendet wurde.

Vor der Extraktion wurde zu den Nadeln im Erlenmeyerkolben mit einer Mikroliterspritze 7 µl der Lösung des internen Standards Isoproturon D6 ( $c = 11,1 \text{ mg/l}$ ) gegeben und somit auf 77,7 ng aufgestockt. Für die im Verteilungsversuch im Abschnitt 4.3.3 erzeugten Proben gilt, dass der interne Standard und 5 ml Acetonitril bereits direkt nach der Extraktion der epikutikulären Wachse zu den in Schraubfläschchen gelagerten Nadeln gegeben wurde.

In den Erlenmeyerkolben wurden 40 ml Acetonitril gegeben. Der Ansatz im Erlenmeyerkolben wurde für 15 Minuten bei einer Drehzahl von 8000 U/min am Ultraturrax zerkleinert. Dabei wurde der Erlenmeyerkolben in eine Glasschale gestellt, die mit ca. 1-2 cm Wasser aufgefüllt wurde. Diese Kühlung war notwendig, da sich durch das Zerkleinern bei hoher Drehzahl im Erlenmeyerkolben Wärme entwickelt. Diese führt zum Sieden des Acetonitrils, wenn sie nicht durch leichte Kühlung des Kolbens abgeführt wird. Vor dem Entfernen des Rührwerks aus dem Erlenmeyerkolben wurde die Außenwand des Rührwerks mit wenigen ml Acetonitril abgespült und dieses im Erlenmeyerkolben aufgefangen.

Zwischen der Bearbeitung weiterer Proben wurde der Ultraturrax jeweils in einem schmalen Becherglas mit Ethanol technischer Reinheit, Reinstwasser und einer geringen Menge Aceton (für die Chromatographie) bei laufendem Rührwerk gespült.

Nach der Bearbeitung mit dem Ultraturrax wurde der Erlenmeyerkolben mit einem Uhrglas abgedeckt und für 45 Minuten bei etwa 40 °C im Ultraschallbad extrahiert.

Nach der Ultraschallextraktion wurden die Extrakte aus den Erlenmeyerkolben in 100 ml Schraubfläschchen überführt und im Gefrierfach gelagert.

#### **4.1.6 Probenanreicherung und Aufreinigung**

Die im Abschnitt 4.3.3 beschriebene wässrige Phase, die epikutikulären Wachsextrakte und die Extrakte der verbleibenden Nadel beziehungsweise Gesamtnadel wurden mittels Festphasenextraktion aufgereinigt und aufkonzentriert. Es wurde ein an eine Multimethode zur Aufreinigung und Analytik von Pestiziden in Gemüse (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ 2003) angelehntes Verfahren gewählt (vergleiche Abschnitt 3.8.3), in dem aus den verschiedenen organischen Extrakten (epikutikuläre Wachse in Dichlormethan und verbleibende Nadeln beziehungsweise Gesamtnadeln in Acetonitril) "wässrige" Proben hergestellt werden und diese dann mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert und aufgereinigt werden. Bei diesem Verfahren ist der zugrundeliegende Anreicherungsschritt die Adsorption der verdün-

ten Extrakte an Festphasenextraktionskartuschen mit einem hochvernetzten Styroldivinylbenzolharz (LiChrolut EN) als Adsorbens. Dies geschieht unabhängig von der Herkunft (organische Extrakte in Dichlormethan oder Acetonitril oder der wässrigen Phase aus den Verteilungsversuchen). Allerdings ist die Aufarbeitung der wässrigen Phase aus den Verteilungsversuchen einfacher und unterscheidet sich von der Bearbeitung der Extrakte in Dichlormethan und Acetonitril. Im Vergleich zu den wässrigen Proben waren für diese Extrakte die folgenden zusätzlichen Arbeitsschritte notwendig:

- Ausfrieren der Fette
- Einengen und Verdünnen mit Reinstwasser um "wässrige" Proben für die Anreicherung an den LiChrolut EN Kartuschen herzustellen
- Beim Elutionsschritt wurde die LiChrolut EN Kartusche mit einer Festphasenextraktionskartusche mit aminopropyl-modifiziertem Kieselgel gekoppelt und über diese eluiert.

Dabei trägt jeder dieser zusätzlichen Arbeitsschritte wesentlich zur Aufreinigung der Proben und zur Verminderung von Matrixeffekten bei.

Diese Vorgehensweise der Aufreinigung von Kiefernnadelextrakten wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Angelika Klugkist erprobt und mit anderen Methoden der Extraktaufreinigung verglichen. Die Methode für die Aufreinigung der Proben aus den im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Verteilungsversuchen basiert auf dem in der Diplomarbeit von Angelika Klugkist beschriebenen Verfahren, weicht aber gegebenenfalls für Einzelheiten davon ab. In den folgenden Abschnitten ist die Methode beschrieben, die für die Anreicherung und Aufreinigung der Proben aus den Verteilungsversuchen des Abschnittes 4.3.3 verwendet wurde.

Abbildung 6 gibt einen Überblick zum Verfahren, dabei sind die Arbeitsschritte in der unteren Bildhälfte, die für die drei unterschiedlichen Probenmatrices den gleichen Ablauf haben in derselben Farbe markiert.

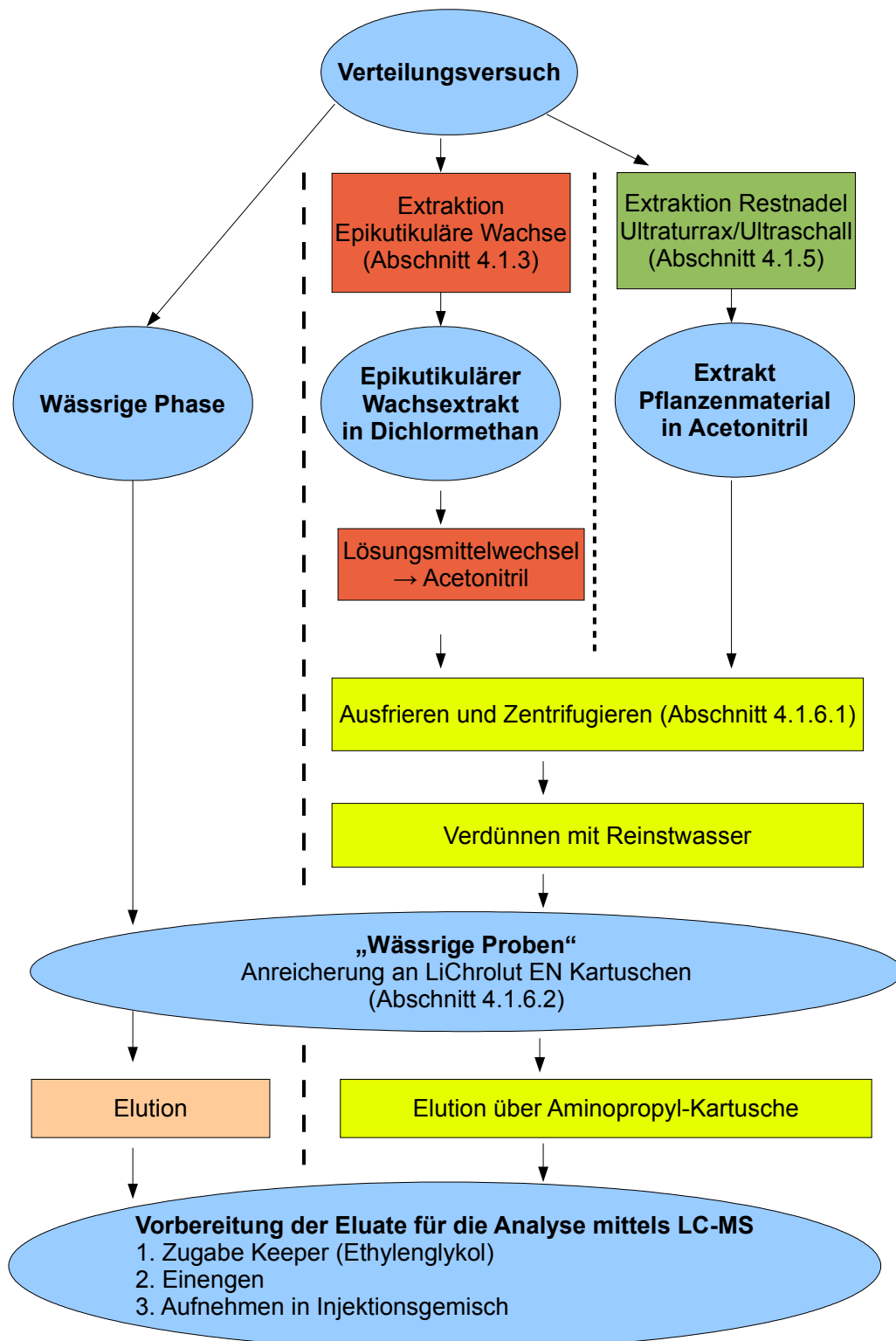


Abbildung 6: Übersicht des Verfahrens zur Aufbereitung der in den Verteilungsversuchen (Abschnitte 4.3.3) anfallenden Proben

#### **4.1.6.1 Ausfrieren der Wachse, Einengen und Verdünnen mit Wasser**

Um die insbesondere in den Extrakten der epikutikulären Wachse aber auch die in den Extrakten der verbleibenden Nadeln enthaltenen Fette abzutrennen, wurden diese ausgefroren. Dabei wird die schlechte Löslichkeit der Wachse in Acetonitril ausgenutzt, dieser Effekt wird durch niedrige Temperaturen verstärkt (vergleiche Abschnitt 3.8.3).

Für die epikutikulären Wachsextrakte in Dichlormethan wurde wie folgt vorgegangen:

Die epikutikulären Wachse sind in Dichlormethan sehr gut, in Acetonitril hingegen sehr schlecht löslich. Deshalb wurde ein Lösungsmittelwechsel durchgeführt: Die nach der Extraktion der Wachsschicht in die 30 ml Schraubfläschchen überführten und im Kühlschrank gelagerten Extrakte (siehe Abschnitt 4.1.3) wurden in diesen Schraubfläschchen bis auf ein Volumen von circa 1 ml Dichlormethan mit Stickstoff im Wasserbad bei etwa 20 °C eingengt. Die für das Einengen konstruierte Apparatur besitzt auswechselbare Pasteurpipetten zum Verströmen des Stickstoffs auf die einzuengenden Lösungen. Dadurch werden Kontaminationen beim Wechseln der einzuengenden Fläschchen beziehungsweise Lösungen vermieden.

Nach dem Einengen wurden die Fläschchen in eine Kältemischung aus Eis und Aceton gestellt (Temperatur ca. -5 °C). Zu dem verbleibenden geringen Volumen an Dichlormethan wurden 10 ml Acetonitril hinzugegeben, die Fläschchen verschlossen und für 3 Stunden ins Gefrierfach (-18 °C) gestellt. Die Wachse sind nach dem Entnehmen aus dem Gefrierfach deutlich als Flocken sichtbar. Die Fläschchen wurden für 10 Minuten bei 4300 U/min (Heraeus Megafuge 1, Radius des Rotors: ca. 16 cm) zentrifugiert. Die überstehende Lösung ist nach dem Zentrifugieren klar, die Wachse bilden eine kompakte Schicht am Boden des Fläschchens. Die überstehende Lösung wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues 30 ml Schraubfläschchen überführt. Das ursprüngliche Fläschchen wurde mit 1,5 ml Acetonitril nachgespült, das Acetonitril wurde ebenfalls in das neue Fläschchen überführt. Der nun in Acetonitril vorliegende Extrakt wurde mit Stickstoff im Wasserbad bei 65 °C auf ein Volumen von circa 1 ml Acetonitril eingengt, dann wurden 30 ml Reinstwasser hinzugegeben. Die Fläschchen wurden kurzzeitig ins Ultraschallbad gehalten, um eventuell verschleppte Wachskrümel zu dispergieren. Danach wurden die Fläschchen bis zur Durchführung der Festphasenextraktion im Kühlschrank gelagert.

Die Vorgehensweise für das Ausfrieren der Fette, Überführen, Einengen, Versetzen mit Wasser und Lagern der wässrigen Proben war für die Extrakte der verbleibenden Nadeln beziehungsweise Gesamtnadeln bis auf folgende Unterschiede gleich:

Die nach der Ultraturrax/Ultraschallextraktion in 100 ml Schraubfläschchen überführen Extrakte wurden direkt im Gefrierfach gelagert. Die Extrakte lagen schon in Acetonitril vor. Deshalb war der für die Dichlormethanextrakte beschriebene Lösungsmittelwechsel nicht notwendig: Die Fläschchen wurden direkt nach der Entnahme aus dem Gefrierfach wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand in neue 100ml Fläschchen überführt. Der Extrakt wurde auf circa 3 ml eingengt und mit 95 ml Reinstwasser versetzt.

#### **4.1.6.2 Festphasenextraktion**

Die wässrige Phase der Verteilungsversuche im Abschnitt 4.3.3 und die in diesen Verteilungsversuchen aus den Extrakten der epikutikulären Wachse und der verbleibenden Nadeln beziehungsweise intakten Nadeln erzeugten wässrigen Proben (siehe vorangegangener Abschnitt) wurden an LiChrolut EN Festphasenextraktionskartuschen (200 mg, 3 ml Reservoirvolumen, Merck) angereichert. Alle diese Proben weisen einen sehr hohen Grad an Verunreinigungen auf, die mit dem Festphasenextraktionsverfahren abgetrennt werden.

#### **Konditionieren und Equilibrieren**

Zur Vorbereitung wurden die Kartuschen auf die Extraktionseinheit gesteckt und mit 6 ml Ethylacetat und 6 ml Methanol konditioniert. Danach wurde mit 8 ml Reinstwasser equilibriert. Zum Konditionieren und Equilibrieren wurde kein Vakuum an die Kartuschen angelegt, die Lösungsmittel und das Reinstwasser sickern auf Grund der Schwerkraft in wenigen Minuten durch das Festphasenbett.

Bei der gleichzeitigen Vorbereitung von bis zu 24 Festphasenkartuschen bedeutet diese Vorgehensweise keinen Zeitverlust. Es wird vielmehr gewährleistet, dass die Kartuschen während der Konditionierung/Equilibrierung nicht trockenlaufen und dass insbesondere im Equilibrierungsschritt genügend Zeit für die Benetzung des Festphasenmaterials mit Reinstwasser gegeben ist.

## **Anreicherung**

Glaswolle wurde in einem Becherglas mit Aceton und Reinstwasser gereinigt. In die Reservoir der Kartuschen wurden lockere Flocken der Glaswolle gegeben (circa 1 cm Schichtdicke) und diese leicht mit einem Spatel an die obere Fritte des Festphasenbettes gedrückt. Die Kartuschen wurden mit Reinstwasser bis 5 mm unter der Oberkante des Reservoirs befüllt. Teflonschläuche mit Anschlussadaptern wurden mit Aceton und Reinstwasser gespült und mit dem oberen Ende der Kartuschen verbunden. Das freie Ende der Schläuche wurde in die Glasfläschchen, die die Proben enthielten gelegt. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde Unterdruck an die Extraktionseinheit angelegt und durch Öffnen der einzelnen Ventile an den Steckplätzen der Kartuschen wurden die Proben bei einem Fluss von circa 3 ml/min durch die Kartuschen gesogen. Wenn die Lösungen komplett aus den Fläschchen gesaugt waren, wurden 3 ml Reinstwasser in die Fläschchen gegeben, um so noch am Glas oder in den Schläuchen haftende Probenreste über die Kartuschen zu spülen.

Nach dem so erfolgten Anreicherungsschritt wurde das Vakuum für 5 Minuten beibehalten, um Luft durch die Kartuschen zu saugen und so Wasserreste aus dem Festphasenbett zu entfernen.

## **Elution**

Im nun folgenden Elutionsschritt wurde für die Proben, die aus der Extraktion der epikutikulären Wachse und der verbleibenden Nadeln beziehungsweise intakten Nadeln stammten ein anderes Verfahren gewählt als für die Elution der Proben, die aus der wässrigen Phase der Verteilungsversuche herrührten:

- Die Kartuschen, an denen die wässrigen Lösungen aus den Verteilungsversuchen angereichert wurden, wurden mit 2 ml Ethylacetat und 6 ml Ethylacetat/Aceton (90/10 % v/v) eluiert.
- Die Elution der übrigen Proben erfolgte über eine an die LiChrolut EN Kartuschen gekoppelte Aminopropylkartusche (LiChrolut NH<sub>2</sub>, 500 mg, Reservoirvolumen 3 ml, Merck). Dafür wurden Aminopropylkartuschen vorbereitet, indem diese auf die Festphasenextraktionseinheit gesteckt wurden. Die Aminopropylkartuschen wurden mit 6 ml Ethylacetat konditioniert. Nach dem Konditionieren wurden die Ventile der Extraktionseinheit verschlossen und 2 ml Ethylacetat in das Reservoir der Ami-



nopropylkartuschen gegeben. Das Verschießen der Ventile ist in diesem Moment notwendig, damit das Lösungsmittel in der Kartusche verbleibt und nicht weiter durch die Kartusche läuft. So ist gewährleistet, dass die Aminopropylkartusche im Elutionsschritt nicht trockenläuft. Auf die Aminopropylkartuschen wurden die im Anreicherungsschritt beladenen LiChrolut EN Kartuschen mit einem Adapter befestigt. Nun wurde diese Kartuschenkombination durch Zugabe von 2 ml Ethylacetat und 6 ml Ethylacetat/Aceton (90/10 % v/v) in das Reservoir der oben aufgesteckten LiChrolut EN Kartuschen und Öffnen der Ventile an der Festphasenextraktionseinheit eluiert.

Für alle Proben erfolgte die Zugabe des Lösungsmittels für die Elution in die Reservoirs der Kartuschen ohne ein Vakuum anzulegen. Das Eluat sickert auf Grund der Schwerkraft durch das Festphasenbett. Die Eluate wurden in 22 ml Vials mit Schraubverschluss aufgefangen.

#### **Vorbereitung der Messung: Einengen der Eluate, Zugabe des Injektionsgemisches**

Zu den Eluaten in den 22 ml Vials wurden mit einer Kolbenhubpipette 50 µl Ethylenglykol als sogenannter Keeper gegeben. Dieser verhindert, dass sich die Proben beim Einengen bis zur Trockene vollständig verflüchtigen und dabei gegebenenfalls Anteile der zu messenden Analyten verloren gehen. Die Eluate wurden an der im Abschnitt 4.1.6.1 beschriebenen Apparatur mit Stickstoff bei 35 °C eingengt. Es wurden zu jeder Probe 1 ml eines Gemisches aus Reinstwasser/Acetonitril (75/25 % v/v) gegeben (Injektionsgemisch). Die Proben wurden mit Pasteurpipetten in HPLC-Vials überführt, verschlossen und bis zur Messung an der HPLC-MS im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt.

Abbildung 6 (Seite 53) gibt einen Überblick über das gesamte im Abschnitt 4.1 beschriebene Verfahren zur Extraktion, Anreicherung und Aufreinigung der im Verteilungsversuch im Abschnitt 4.3.3 anfallenden Proben aus wässriger Phase, epikutikulärer Wachsschicht und nach der Extraktion der epikutikulären Wachsschicht verbleibenden Kiefernadeln

## 4.2 Methodenentwicklung: Massenspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie

Die für die Quantifizierung der Herbizide an der HPLC-MS verwendete Methode wurde laufend fortentwickelt, dies geschah insbesondere in den im Rahmen der Promotion betreuten Diplomarbeiten: Ein geeigneter HPLC-Gradient zur Auftrennung von 48 Herbiziden und von Störpeaks in Proben aus epikutikulären Wachsen wurde in der Diplomarbeit von Ann-Kathrin Stark entwickelt. Bei der Entwicklung der Methode lag der Augenmerk auch auf der akzeptablen Dauer des HPLC-Laufes, möglichst geringer Peakbreite und der Optimierung der Spannungen im Interface des Massenspektrometers, um eine höhere Empfindlichkeit der Messung zu erreichen. Eine weitere Optimierung der Interface-Parameter wurde unter anderem in der Diplomarbeit von Isabell Zunker durchgeführt. Das Vorgehen bei der Optimierung der Parameter des Massenspektrometers wird in diesen Diplomarbeiten beschrieben. Zusammenfassend wurden die Interface-Parameter des LC-MS und dabei insbesondere die an den Elektroden im Interface des Massenspektrometer anliegenden Spannungen (Declustering und Focusingpotential) wie folgt optimiert:

In einem ersten Schritt wurden die Massenspektren der einzelnen Analyten aufgenommen. Diese wurden durch Direktinfusion mittels Spritzenpumpe in das Turbo-Ion-Spray Interface des Massenspektrometers injiziert. Zur Injektion wurden die Stammlösungen der Analyten schrittweise mit einem Gemisch aus 50 % Acetonitril und 50 % Wasser (mit 0,1 % Ameisensäureanteil in Reinstwasser) verdünnt um eine Übersättigung des Detektors zu vermeiden. Die Molekülmassen +1 (protoniertes Molekül) und die Fragmentmassen mit den höchsten Signalstärken in den Massenspektren wurden für die weitere Optimierung ausgewählt.

In einem zweiten Schritt wurden für jede der ausgewählten Massen Optimumkurven der Signalintensität in Abhängigkeit von den im Interface anliegenden Spannungen aufgezeichnet. Mit der Elektrodenspannung, die jeweils zur höchsten Intensität des Messsignals führte, wurden ausgehend vom Parameter Declusteringpotential die übrigen Spannungen optimiert. Nach zwei bis drei Optimierungszyklen, in denen schrittweise durch Verdünnen die injizierte Konzentration verringert wird um immer im linearen Bereich des Detektors zu messen, wurden so die genannten Spannungen optimiert. Dies führt zu einer höheren Empfindlichkeit der Messung um Faktoren von 10 bis 100 gegenüber den werksseitig in der Analysesoftware vorgegebenen Spannungen der Interfaceelektroden.

In den verwendeten Analysenmethode wurde die Messdauer des HPLC-Gradienten in mehrere Zeitfenster entsprechend der Retentionszeiten der Analyte unterteilt, so dass jeweils nur die Molekülmasse (+ 1 H) und ein Fragment des jeweiligen Analyten gemessen wurde. Dadurch wird auf der Masse des jeweiligen Ions mit den zugehörigen Interface-Spannungen möglichst lange gemessen. Dies führt zu einer hohen Messempfindlichkeit und Präzision bei einer trotzdem ausreichend hohen Anzahl von Messintervallen je Analytpeak.

Analyten, deren Retentionszeiten sehr ähnlich waren (zum Beispiel Isoproturon und der interne Standard Isoproturon D6) wurden in einem gemeinsamen Zeitfenster gemessen. Im Hinblick auf den deuterierten internen Standard ist eine Überschneidung der Retentionszeit gewollt (beziehungsweise erlaubt die hohe Trennschärfe der verwendeten HPLC-Methode auch annähernd eine Trennung der deuterierten und undeuterierten Substanz), um eine matrixbedingte Signalsuppression mit dem internen Standard korrigieren zu können. Diese Korrektur der Signalsuppression ist umso besser, je weniger sich die Retentionszeiten von Analyt und internem Standard unterscheiden, da zu unterschiedlichen Retentionszeiten gegebenenfalls auch unterschiedliche Matrixanteile eluieren und so die Ionisierung im Interface unterschiedlich beeinflussen.

Bei der Untersuchung von sehr vielen Analyten mit ähnlichen Retentionszeiten (zum Beispiel im Rahmen der Diplomarbeit von Isabell Zunker zur Untersuchung des Verteilungsverhaltens von 49 Herbiziden, siehe Abschnitt 4.3.2.2) wurde jede Probe mit drei HPLC-MS Läufen vermessen, um eine möglichst hohe Messempfindlichkeit zu erreichen. Ein Grund hierfür ist, dass mit dem verwendeten API 165 Massenspektrometer keine schnellen Wechsel der Ionisierungspolarität bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit der Messung möglich sind: saure Analyte spalten bei der Ionisierung im ESI-Interface ein Proton ab, hierfür muss die Polarität der Ionisierungsspannung umgekehrt werden.

### **4.3 Modellversuche zur Adsorption/Desorption und zum Herbizidtransport in Kiefernnadeln**

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche dienten der Charakterisierung des Verteilungsverhaltens von Herbiziden an Kiefernnadeln. Es wurde die Adsorption/Desorption von current-use Herbiziden aus wässrigen Lösungen an rekonstituierten epikutikulären Wachsen (Abschnitt 4.3.1) und intakten Kiefernnadeln (Abschnitte 4.3.2.1 und 4.3.2.2) er-

mittelt. Darüberhinaus wurde das Transportverhalten von Isoproturon und seinen Abbauprodukten nach Spraydrift in der epikutikulären Wachsschicht und dem Nadelgewebe untersucht und die Transportmechanismen Volatilisation und Auswaschung von Driftrückständen auf den Kiefernadeln in einem Laborversuch simuliert (Abschnitt 4.3.3).

Die genannten Versuche bauen in der Verfahrensentwicklung und Verfeinerung der Versuchsbedingungen aufeinander auf:

- Die Messung der Adsorption/Desorption mit rekonstituierten epikutikulären Wachsen stellt die Verteilungsabläufe in einem Versuchskonzept nach, das möglichst viele der Faktoren und Transportmechanismen, die die Verteilung in der Natur beeinflussen ausklammert. Es werden lediglich die Vorgänge an der Schnittstelle epikutikuläre Wachse - wässrige Phase nachgestellt.
- Die Versuche zur Verteilung zwischen wässriger Phase und intakten Kiefernadeln lassen indirekte Rückschlüsse auf den Transport der Wirkstoffe durch die epikutikuläre Wachsschicht in das Nadelgewebe zu.
- Der Versuch im Abschnitt 4.5.3, bei dem die Spray-Drift von Isoproturon durch die Applikation von Tröpfchen auf noch an den Kiefernzweigen befindlichen Nadeln simuliert wird, lässt Schlüsse auf weitere Prozesse wie die Volatilisation von Pflanzenoberflächen, den Abbau des Wirkstoffes, die Desorption durch Niederschläge unterschiedlicher Dauer und die tatsächliche Messung des Herbizidtransportes in die verschiedenen Gewebe der Kiefernadel zu.

### **In den Verteilungsversuchen verwendete Referenzstandards**

Wenn nicht beim jeweiligen Versuch anders vermerkt, wurden für die Verteilungsversuche Stammlösungen der verwendeten Referenzsubstanzen wie folgt angesetzt. Es wurden zwischen 5 und 18 mg der einzelnen Wirkstoffe an der Analysenwaage jeweils in einen 100 ml Messkolben eingewogen, das genaue Gewicht wurde dokumentiert. Die Messkolben wurden mit 100 ml Acetonitril aufgefüllt, nach vollständigem Auflösen der Wirkstoffe wurde der Inhalt in Steilbrustflaschen mit Schliff überführt und in der Gefriertruhe bei -18 °C gelagert.

Die Reinheit der Stammlösungen wurde mittels HPLC-UV (Agilent, Diode Array Detector) überprüft: Die Stoffe wurden injiziert und mit einer isokratischen Methode bei den

Wellenlängen 210, 220, 240, 254 und 270 nm vermessen. Die Chromatogramme wurden im Hinblick auf mögliche Nebenpeaks ausgewertet und mit den Angaben in den Datenblättern der Lieferanten verglichen.

### **4.3.1 Rekonstituiertes epikutikuläres Wachs und wässrige Phase: Adsorption - Desorption**

#### **Überblick zum Versuchsablauf**

In diesem Versuch wurden HPLC-Vials (Volumen 1,8 ml) mit einer dünnen Schicht aus 3 mg rekonstituiertem Wachs belegt. Wenige Minuten vor Start der Messung mittels HPLC-MS wurden die Vials mit 1,5 ml einer Lösung von Terbutylazin in Reinstwasser ( $c = 700 \mu\text{g/l}$ ) aufgefüllt. Das Verhältnis der Wachsmenge zum Volumen der wässrigen Lösung wurde so gewählt, dass bei einem vermuteten Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten, der in derselben Größenordnung wie der  $K_{ow}$  des Terbutylazins liegt, eine deutlich messbare Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase zu erwarten war. Die genaue Menge der zugegebenen Lösung wurde vor Beginn der Messung an der Analysenwaage ausgewogen. Danach wurden die Vials verschlossen, im Autosampler des HPLC-MS platziert und die Messung gestartet. Nach Abschluss dieser Messreihe wurde die in den Vials verbliebene Lösung verworfen. Die Vials wurden nun mit 1,5 ml Reinstwasser befüllt und die Messung mittels HPLC-MS wurde gestartet um die Desorption des in den beschichteten Vials adsorbierten Wachses zu bestimmen.

#### **Herstellung eines Extraktes epikutikulärer Wachse**

Für die Gewinnung der epikutikulären Wachse wurden Nadeln von Bäumen auf dem Campus der Universität Lüneburg verwendet. Es wurden nach dem unter Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren Nadeln des aktuellen Nadeljahrgangs gewonnen.

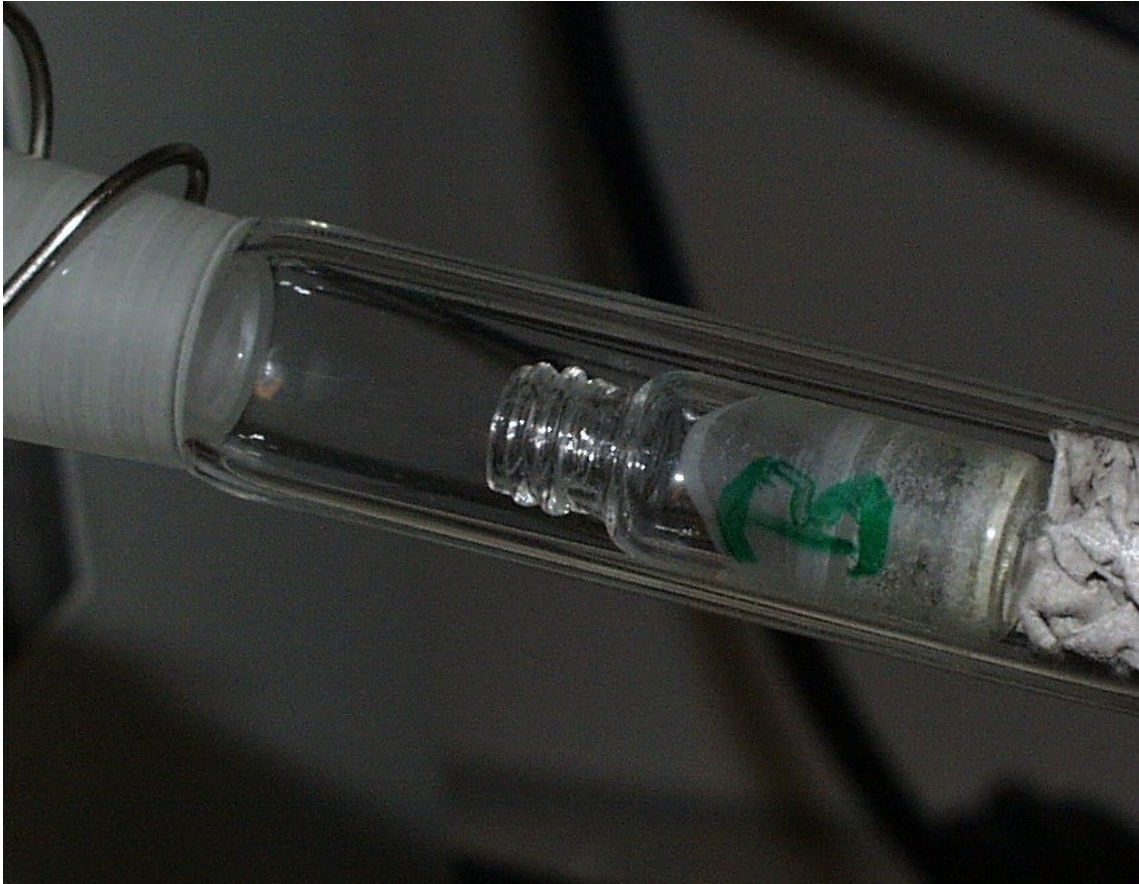
Es wurden insgesamt 204,3 g Nadeln Frischgewicht (93,8 g Trockengewicht, bestimmt nach 4.1.2) entsprechend dem im Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Verfahren mit Dichlormethan in diesem Fall für eine Dauer zweimal 20 Minuten extrahiert. Auf Grund der notwendigerweise großen Nadel- und Lösungsmittelmenge (hier wurden pro Extraktion 3 ml Dichlormethan pro Gramm Nadeln verwendet) wurde die Nadelmenge auf drei Ansätze auf-

geteilt. Die Extraktion erfolgte mit der angegebenen Lösungsmittelmenge und Dauer in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen in einem großen Überkopfschüttler bei 15 Umdrehungen pro Minute. Die Extrakte wurden gesammelt und vereinigt. Die gesamte Flüssigkeitsmenge des Extraktes betrug circa 1,1 l (es bleiben an den Nadeln jeweils wenige ml Dichlormethan haften, deshalb wurde zweimal extrahiert). Die Lösung wurde mit einem Keramikfilter (Durchmesser 10 cm, Porenweite 4 µm) filtriert. Der filtrierte Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bis auf circa 20 ml eingengt. Die Flüssigkeit wurde in einen vorher mit der Analysenwaage ausgewogenen 50ml Rundkolben überführt und bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt. Der offene Rundkolben wurde abgedunkelt bei Raumtemperatur stehen gelassen, um gegebenenfalls noch vorhandene Reste an Dichlormethan verdunsten zu lassen. Das Gewicht des Rundkolbens war nach 24 Stunden konstant. Das Gewicht der gewonnenen Wachsmenge betrug 1,0978g. In den Rundkolben mit Wachs wurden Dichlormethan gegeben (37,6 g) und das Wachs darin gelöst. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt, durch das bekannte Leergewicht des Kolbens konnte die Wachskonzentration durch erneutes Auswiegen des Rundkolbens ermittelt werden. Dies war hilfreich, da durch die hohe Flüchtigkeit des DCM auch bei mit Schliffstopfen verschlossenem Rundkolben und Lagerung im Kühlschrank immer geringe Mengen des Lösungsmittels verdunsten.

### **Belegen der Vials mit rekonstituiertem epikutikulärem Wachs**

Das Leergewicht von drei HPLC-Vials wurde an der Analysenwaage bestimmt. Die aktuelle Konzentration des Wachsextraktes wurde durch Auswiegen des Rundkolbens an der Analysenwaage ermittelt. Eine 100 µl Mikroliterspritze wurden mit dem Extrakt vorgespült und in die Vials wurden 78µl des Extraktes (3 mg Wachs je Vial) gegeben. Die Vials wurden in ein dickwandiges Reagenzglas mit Schliff gegeben, welches an den Rotationsverdampfer angeschlossen wurde. Das in den Vials enthaltene Dichlormethan wurde vorsichtig im Rotationsverdampfer entfernt bis eine dünne trockene Wachsschicht sichtbar wurde. Dazu wurde die schwenkbare Achse des Rotationsverdampfers in eine möglichst horizontale Position gebracht. Es wurde nicht zusätzlich im Wasserbad erwärmt.

Nach dem Einrotieren wurden die Vials an der Analysenwaage gewogen. Die Vials wurden über Nacht abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert. Die Wägung wurde am Folgetag wiederholt. In den Vials befanden sich 2,9 mg, 3,2 mg und 3,2 mg Wachs.



*Abbildung 7: Beschichtung eines HPLC-Vials mit rekonstituiertem epikutikulärem Wachs im Rotationsverdampfer*

### **Herstellung der wässrigen Lösung für den Verteilungsversuch und für die Kalibration**

Aus einer Stammlösung des Stoffes Terbutylazin in Acetonitril ( $c = 70 \text{ mg/l}$ ) wurde in Reinstwasser eine Reihe von Kalibrationslösungen (Konzentrationen von 7 bis 1400  $\mu\text{g/l}$ ) angesetzt. Für das Ansetzen der Lösungen wurden Mikroliterspritzen (10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  und 1000  $\mu\text{l}$ ) und Messkolben (20 - 100 ml) verwendet. Die Lösung der Konzentration 700  $\mu\text{g/l}$  wurde sowohl für die Kalibration als auch für den Verteilungsversuch verwendet.

### **Zugabe der wässrigen Herbizidlösung in die beschichteten Vials**

Zwei der mit rekonstituiertem epikutikulärem Wachs beschichteten HPLC-Vials wurden mit circa 1,5 ml der wässrigen Lösung der Konzentration 700 µg/l befüllt. Dafür wurde eine Pasteurpipette aus Glas verwendet, die mit der Lösung vorgespült wurde. Der Zeitpunkt des Befüllens wurde notiert. In das dritte mit Wachs beschichtete Vial wurde lediglich Reinstwasser gefüllt. Für die Überführungen der Lösungen für die Kalibrationsreihe in HPLC-Vials wurden ebenfalls mit der jeweiligen Kalibrationslösung vorgespülte Pasteurpipetten verwendet. Beim Verschließen der Vials und dem späteren Bestücken des HPLC-Autosamplers wurde darauf geachtet, dass die Vials nicht gekippt wurden und die Lösung nicht mit dem Verschluss beziehungsweise dem Septum des Vials in Berührung kam. Die drei beschichteten Vials wurden nach dem Befüllen mit Reinstwasser an der Analysenwaage gewogen um die exakte zugegebene Flüssigkeitsmenge zu ermitteln.

### **Messung mittels HPLC-MS**

Vor Zugabe der wässrigen Terbutylazinlösung zu den mit rekonstituierten epikutikulären Wachsen beschichteten Vials wurden die Kalibrationslösungen an der HPLC-MS vermessen. Nach dem Befüllen der beiden beschichteten Vials mit Herbizidlösung wurde der Konzentrationsverlauf des Terbutylazins in diesen Lösungen mit steigenden Zeitabständen bestimmt. Die erste Probe der Zeitreihe wurde nach 40 Minuten injiziert, die letzte Probe nach 4980 Minuten.

*Tabelle 1: Zeitintervalle Adsorption - Injektion der wässrigen Phase (HPLC-Autosampler) aus mit rekonstituierten Wachsen beschichteten Vials*

	Probenahme im Autosampler nach t [min]										
Vial 1	40	120	240	420	720	1260	1410	2535	2670	4800	4950
Vial 2	70	150	270	450	750	1290	1440	2625	2700	4830	4980

Für jede Messung wurden durch den Autosampler 10 µl der im Vial vorhandenen wässrigen Lösung injiziert. Dabei wurden den beiden beschichteten Vials abwechselnd Proben entnommen. Je Vial wurden insgesamt 11 Proben und damit bis zum Ende der Versuchsreihe rechnerisch 110 µl der anfangs enthaltenen 1500 µl injiziert. Die entsprechende Volu-



menänderung durch die Injektionen und möglicherweise geringfügiger Verdunstung aus den mit Septen verschlossenen Vials wurde nach dem Ende des Adsorptionsversuches durch Auswiegen mit der Analysenwaage kontrolliert.

Zwischen den Messungen der Konzentration in den mit Wachs beschichteten und mit wässriger Herbizidlösung befüllten Vials wurde wiederholt eine Lösung aus der Kalibrationsreihe (Konzentration = 140 µg/l) vermessen, um mögliche Empfindlichkeitsschwankungen des Massenspektrometers zu ermitteln.

Jeweils nach der Messung der beschichteten, mit wässriger Terbutylazinlösung gefüllten Vials wurde das beschichtete, aber lediglich mit Reinstwasser befüllte Vial vermessen. Dies diente der Kontrolle, ob zeitabhängig Wachsbestandteile gelöst werden, die zur Retentionszeit des Terbutylazins im Chromatogramm ein Signal liefern, was gegebenenfalls für die Integration des Terbutylazin-Peaks bei der Auswertung der Chromatogramme berücksichtigt werden muss.

Die Temperatur im Autosampler der HPLC wurde mit einem Temperatursensor und Flachbettschreiber während der Versuchsdauer aufgezeichnet, sie betrug  $19 \pm 2$  °C. Der Autosampler war abgedunkelt.

### **Vorbereitung der Vials für die Ermittlung der Desorption und Messung mittels HPLC-MS**

Nach Abschluss der Messreihe zur Adsorption des Terbutylazins wurden die beiden Vials, die mit Wachs beschichtet und zu Beginn mit der wässrigen Herbizidlösung befüllt worden waren, entleert. Die Vials wurden gründlich aber schnell (weniger als 5 Sekunden, um eine vorzeitige Desorption des Terbutylazins zu minimieren) mit Reinstwasser gespült und danach mit circa 1,5 ml Reinstwasser befüllt. Der Befüllungszeitpunkt wurde notiert und das Gewicht der neu befüllten Vials wurde an der Analysenwaage bestimmt um die zugegebene Reinstwassermenge zu dokumentieren.

Die Messung mittels HPLC-MS wurde gestartet und erfolgte nach dem selben Ablauf wie die Messung der Adsorption. Die Zeitintervalle wurden für die Desorption enger gewählt, da die Messung der Adsorption zeigte, dass sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen rekonstituiertem epikutikulärem Wachs und wässriger Phase nach etwa 12 Stunden einstellt.

*Tabelle 2: Zeitintervalle Desorption - Injektion der wässrigen Phase (HPLC-Autosampler) aus mit rekonstituierten Wachsen beschichteten Vials*

	Probenahme im Autosampler nach t [min]									
Vial 1	40	200	490	650	1060	1220	1890	2040	3200	3360
Vial 2	65	230	520	680	1090	1250	1920	2070	3230	3390

### **4.3.2 Intakte Koniferennadeln und wässrige Phase: Adsorption - Desorption**

Da die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von rekonstituierten epikutikulären Wachsen keine Aussagen zu komplexeren Transportprozessen zum Beispiel zwischen der epikutikulären Wachsschicht und dem übrigen Nadelgewebe erlaubt, wurden Methoden zur Messung des Verteilungsverhaltens zwischen wässriger Phase und intakten Koniferennadeln entwickelt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde das Verteilungsverhalten von 13 lipophilen Herbiziden ( $\log K_{ow} \geq 4$ ) an intakten Nadeln bestimmt. In dieser Versuchsreihe wurde je ein Ansatz von wässriger Phase und Nadeln je Zeitintervall verwendet, es wurde also die Konzentration in der wässrigen Phase von mehreren parallelen Ansätzen ermittelt.

In einem weiteren Verteilungsversuch im Rahmen der Diplomarbeit von Isabell Zunker wurde das Adsorptionsverhalten von 49 Herbiziden in einem großvolumigen Ansatz bestimmt, aus dem zu den jeweiligen Zeitintervallen Proben der wässrigen Phase entnommen wurden. Es handelt sich also um eine serielle Probenahme aus dem großvolumigen Ansatz.

Für die Durchführung dieser Verteilungsversuche waren die Ergebnisse des Versuches mit rekonstituierten epikutikulären Wachsen hilfreich: Die Dauer der Verteilung bei den Versuchen mit intakten Nadeln orientierte sich am Zeitraum, der für die Gleichgewichtseinstellung des Terbuthylazins aus der wässrigen Phase mit den rekonstituierten Wachsen relevant war. Darüberhinaus konnte aus dem Versuch mit rekonstituierten epikutikulären Wachsen geschlossen werden, dass sich das Mengenverhältnis von intakten Nadeln und wässriger Phase orientierungshalber aus dem  $\log K_{ow}$  ableiten lässt, um eine messbare Konzentrationsabnahme zu erzielen.

#### **4.3.2.1 Verteilungsversuch mit 13 lipophilen Herbiziden - parallele Ansätze der wässrigen Phase**

In dieser Versuchsreihe wurde ein Teil der unter Abschnitt 3.9 genannten Herbizide untersucht, für die auf Grund des hohen  $\log K_{ow}$  (4,0 - 5,4) ein ebenfalls hoher Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient erwartet wurde. Für einige dieser relativ unpolaren Herbizide ist die Ionisierung mit den zur Verfügung stehenden LC-MS Interfaces (Turbo-Ion-Spray und APCI) eher schwach und die Nachweisgrenzen der Analytik mittels HPLC-MS waren auch nach Anreicherung nicht niedrig genug (zum Beispiel Trifluralin, Pendimethalin, Bromoxynil-octanoat). Nach Vorversuchen zur Analytik mittels GC-MS und GC-ECD wurden folgende 13 Herbizide ausgewählt, die sich präzise und empfindlich per GC-ECD quantifizieren lassen:

Aclonifen, Haloxyfop-ethoxyethyl, Bromoxynil-octanoat, Fluroxypyr-meptyl, Trifluralin, Triallate, Pendimethalin, Diflufenican, Picolinafen, Bifenox, Quizalofop-p-ethyl, Pyridate, Propaquizafop.

Für den Versuch wurden parallele Ansätze von jeweils 100 ml wässriger Herbizid-/Pufferlösung mit intakten Nadeln (4 g Frischgewicht) verwendet. Der Konzentrationsverlauf der Herbizide in der wässrigen Phase während des Adsorptionsschrittes wurde nach ansteigenden Zeitintervallen (8, 19, 47, 97, 156, 311, 554, 1300, 2815 und 2830 Minuten) ermittelt.

Für die Nadeln, die im Adsorptionsschritt 1300, 2815 und 2830 Minuten mit der wässrigen Phase in Kontakt waren, wurde durch Zugabe einer herbizidfreien Pufferlösung der desorbierte Anteil nach 48 Stunden bestimmt.

Zur Ermittlung der Konzentration in der wässrigen Phase wurden die Herbizide durch flüssig-flüssig Extraktion angereichert und der organische Extrakt mittels GC-ECD vermessen.

#### **Für die Kalibration und für den Verteilungsversuch verwendete Stammlösung**

Aus den in Acetonitril gelösten Referenzsubstanzen der 13 oben genannten Herbizide (Herstellung der einzelnen Stammlösungen in Acetonitril vergleiche Abschnitt 4.3) wurde eine Stammlösung in Acetonitril angesetzt. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug für die genannten Herbizide 4 mg/l, außer für Trifluralin (2 mg/l), Propaquizafop (8 mg/l), Pyridate und Quizalofop-p-ethyl (16 mg/l). Diese niedrigeren beziehungsweise höheren Konzentrationen der letzten genannten Stoffe wurden wegen der sehr empfindlichen GC-Mes-

sung für Trifluralin und wegen der im Vergleich zu den übrigen Herbiziden schwächeren Empfindlichkeit für Propaquizafop, Pyridate und Quizalofop-p-ethyl gewählt.

Diese Stammlösung der 13 Herbizide in Acetonitril wurde für eine Kalibrationsreihe über die gesamte Flüssig-Flüssig Extraktion und für die Herstellung der wässrigen Phase im Verteilungsversuch verwendet.

### **Kalibration und Flüssig-Flüssig Extraktion**

Die Kalibration wurde über das gesamte Anreicherungsverfahren durchgeführt. Dafür wurden Verdünnungen der Herbizidstammlösung in der auch für den Verteilungsversuch verwendeten Pufferlösung angesetzt. Diese wurden per flüssig-flüssig Extraktion angereichert und mittels GC-ECD vermessen. Damit beinhaltet die Kalibration bereits die Wiederfindung des Anreicherungsverfahrens. Die Wiederfindung wurde deshalb nicht gesondert ermittelt. Die Geradengleichungen und das Bestimmtheitsmaß ist im Anhang, Abschnitt 8.4 angegeben.

In 100 ml Messkolben wurde eine 0,001 molare Pufferlösung (Zitronensäure/Natriumcitrat) mit der oben beschriebenen Stammlösung auf Konzentrationen von 0 bis 4 µg/l aufgestockt (beziehungsweise entsprechend niedrigere und höhere Konzentrationen für einen Teil der in der Stammlösung enthaltenen Herbizide, siehe oben). Die Konzentrationsabstufungen der Kalibrationslösungen waren 0, 40, 80, 160, 400, 800, 1600, 2800 und 4000 ng/l.

Diese Kalibrationslösungen wurden mit n-Hexan in einer flüssig-flüssig Extraktion aufgearbeitet:

- zu den Proben wurde als interner Standard mit einer Mikroliterspritze 7 µl einer Lösung des Stoffs 4,4' DDD gegeben (c = 114,8 mg/l in Acetonitril) und damit um 574 ng aufgestockt
- es wurden 1000 µl n-Hexan mit einer Mikroliterspritze als Extraktionsmittel hinzugegeben
- die Messkolben wurden mit Glasstopfen verschlossen und für 20 Minuten bei 15 U/min im Überkopfschüttler extrahiert
- die Hexanphasen wurden mit Pasteurpipetten aus Glas abpipettiert, in GC-Vials mit wasserfreiem Natriumsulfat überführt und im Kühlschrank gelagert

- etwa 200 µl der getrockneten Extrakte wurde mit Pasteurpipetten in GC-Vials mit Inserts (Volumen 250 µl) überführt und mittels GC-ECD vermessen

Für die Ermittlung der Konzentration in den wässrigen Phasen des Verteilungsversuchs wurde die beschriebene Kalibration verwendet. Die wässrigen Lösungen aus dem Verteilungsversuch wurden mit demselben Verfahren angereichert.

Alle erzeugten Extrakte wurden mittels GC-ECD vermessen, eine Auflistung der für die Messung verwendeten Geräteparameter findet sich im Anhang (Abschnitt 8.2).

### **Im Verteilungsversuch verwendete wässrige Phase**

Zur Herstellung der im Verteilungsversuch verwendeten wässrigen Phase wurde eine 0,001 molare Citratpufferlösung mit der Stammlösung der 13 Herbizide in Acetonitril auf eine Konzentration von 4 µg/l (beziehungsweise 2 – 16 µg/l für einen Teil der in der Stammlösung enthaltenen Herbizide, siehe oben) je Herbizid aufgestockt. Dafür wurden 2 ml der Herbizidlösung in einen 2 l Messkolben gegeben und mit Pufferlösung aufgefüllt. Der Gehalt der im Verteilungsversuch verwendeten Lösung an Acetonitril lag somit bei 1 ‰. Der pH-Wert der Lösung wurde während des Versuchsverlaufs in weiteren parallelen Ansätzen mit der gleichen Menge an Kiefernadeln mit dem pH-Meter kontrolliert und lag bei  $\text{pH} = 5,2 \pm 0,2$ . Die Konzentration je Herbizid in der wässrigen Phase lag mindestens um einen Faktor 10 (Picolinafen) bis 1000 (Triallate) unter der in der Literatur angegebenen Wasserlöslichkeit (TOMLIN 2003).

### **Verwendete Kiefernadeln**

Für den Verteilungsversuch wurden Nadeln von Bäumen auf dem Campus der Universität Lüneburg verwendet. Es wurden nach dem unter Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren Nadeln des aktuellen Nadeljahrgangs gewonnen.

Das Verhältnis der Menge der in die Lösung gegebenen Nadeln zum Volumen der wässrigen Lösung wurde so gewählt, dass bei einem vermuteten Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten, der in derselben Größenordnung wie der  $\log K_{ow}$  der 13 Zahl Herbizide liegt, eine deutlich messbare Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase zu erwarten war. Dabei wurde die aus den Extraktionen von Kiefernadeln ermittelten Wachsmengen pro Gramm Frischgewicht Kiefernadeln zugrundegelegt. Der Wachsgehalt der verwendeten

Kiefernnadeln wurde durch extrahieren mit Dichlormethan und wiegen des Rückstandes bestimmt, dieser lag bei 5,53 mg Wachs pro Gramm Nadeln (Frischgewicht).

### **Verteilungsversuch**

Es wurden 100 ml Messkolben mit der wässrigen Phase (Herbizid-Pufferlösung) befüllt. Zu den Kolben wurden jeweils 4 g Nadeln gegeben. Das genaue Frischgewicht der in die einzelnen Kolben gegebenen Nadeln wurde vorher an der Laborwaage bestimmt und für jeden Ansatz dokumentiert. Der Zeitpunkt der Zugabe der Nadeln in die Messkolben wurde notiert. Die befüllten Kolben wurden für unterschiedlich lange Zeitintervalle (8, 19, 47, 97, 156, 311, 554, 1300, 2815 und 2830 Minuten) in einen abgedunkelten Überkopfschüttler bei einer Drehzahl von 6 U/min gestellt. Die Temperatur während des Verteilungsversuchs wurde mit einem Schreiber dokumentiert und betrug durchschnittlich  $24 \pm 2$  °C.

Nach dem Ende des jeweiligen Zeitintervalls wurde die Lösung durch dekantieren in einen neuen vorher an der Laborwaage ausgewogenen 100 ml Messkolben überführt. Der Zeitpunkt des Überführens wurde notiert, zusammen mit dem zuvor notierten Zeitpunkt der Nadelzugabe in die wässrige Phase ergibt sich die jeweilige Kontaktdauer zwischen wässriger Phase und Nadeln.

Der mit der zu extrahierenden wässrigen Phase befüllte Messkolben wurde nochmals an der Laborwaage gewogen. Die Differenz zum vorher ermittelten Leergewicht des Messkolbens ergibt die tatsächliche Menge an wässriger Phase, die in der folgenden flüssig-flüssig Extraktion aufgearbeitet wird. Diese ist immer geringer als 100 ml, da an den Nadeln beim dekantieren durchschnittlich 1,5 g der wässrigen Phase haften bleiben. Dies wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

Eine Alternative zu dieser Vorgehensweise wäre, die Nadeln nach dem dekantieren mehrmals mit Reinstwasser zu spülen und diese Flüssigkeit mit der dekantierten Menge zu vereinigen. Allerdings kann so das Ende der jeweiligen Kontaktdauer zwischen wässriger Phase und Nadeln nicht genau ermittelt werden.

Zu den Proben wurden mit einer Mikroliterspritze 7 µl des internen Standards 4,4' DDD dosiert und damit um 574 ng aufgestockt.

Die so gewonnenen wässrigen Proben wurden wie oben beschrieben per flüssig-flüssig Extraktion angereichert und mittels GC-ECD vermessen.

Zusätzlich zu den Messkolben mit Nadeln und Herbizid/Pufferlösung, bei denen die Konzentration nach unterschiedlichen Zeitintervallen bestimmt wurde, wurden folgende Proben zur Kontrolle der Versuchsbedingungen per flüssig-flüssig Extraktion angereichert und mittels GC-ECD vermessen:

- Messkolben mit Nadeln und Pufferlösung, allerdings ohne diese mit Herbiziden aufzustocken. So konnten eventuelle Blindwerte, die während der Dauer des Verteilungsversuches aus den Nadeln in die wässrige Phase gelangen, quantifiziert werden.
- Messkolben lediglich mit Herbizid/Pufferlösung ohne Nadeln. Die Proben wurden zum Ende der Zeitreihe des Verteilungsversuches extrahiert, um nachweisen zu können, ob die Konzentration der Herbizide in der wässrigen Phase ohne Nadeln konstant bleibt, oder ob z.B. Abbauprozesse oder Hydrolyse zu einer Konzentrationsabnahme führen.

Diese Kontrollproben wurden unter den gleichen Bedingungen wie die im Verteilungsversuch bearbeiteten Probe im abgedunkelten Überkopfschüttler bei einer Temperatur von  $24 \pm 2$  °C und einer Drehzahl von 6 U/min über die gesamte Versuchsdauer durchmischt.

### **Messung der Desorption**

Mit den Nadeln, die während des Verteilungsversuches am längsten mit der wässrigen Phase in Kontakt waren, und für die damit erwartet wurde, dass sie im Vergleich zu den übrigen Proben den größten Anteil der Herbizide aus der wässrigen Phase aufgenommen hatten, wurde der Anteil der desorbierbaren Herbizide ermittelt. Es wurden die Nadeln verwendet, die 1300, 2815 und 2830 Minuten mit der wässrigen Phase in Kontakt waren.

Dazu wurden die Nadeln aus diesen Zeitintervallen nach dem Adsorptionsschritt (also nach dem Dekantieren der wässrigen Phase, siehe vorheriger Abschnitt) vorsichtig auf Laborpapier abgelegt und soweit leicht abgetupft, dass keine sichtbaren Tropfen der wässrigen Phase an den Nadeln verblieben. Die Nadeln wurden in 100 ml Messkolben mit 0,001 molarer, nicht mit Herbiziden aufgestockter Citratpufferlösung gegeben und bei einer Temperatur von  $24 \pm 2$  °C und einer Drehzahl von 6 U/min in den abgedunkelten Überkopfschüttler gestellt. Die Konzentration in der abdekantierten wässrigen Phase wurde nach dem oben

genannten Verfahren bestimmt. Die Zeitintervalle für die Desorption der drei Nadelproben betrug 49 bis 51 Stunden.

#### **4.3.2.2 Serieller Verteilungsversuch mit 49 Herbiziden in einem großvolumigen Ansatz**

Die Durchführung dieses Versuchs erfolgte im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Isabell Zunker. Um eine

- geringere Streuung der Messungen im Vergleich zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Versuchsdurchführung (dort wurden parallele Ansätze der wässrigen Phase und der intakten Kiefernnadeln untersucht) zu erreichen,
- eine zeitabhängige Messung der Desorption zu ermöglichen und um
- das Verteilungsverhalten einer größeren Anzahl von 49 Herbiziden zu charakterisieren,

wurde der Versuch in einem großvolumigen Ansatz durchgeführt, aus dem in wachsenden Zeitabständen Wasserproben entnommen wurden. Die Konzentration in der wässrigen Phase der entnommenen Proben wurde durch Anreicherung und Aufreinigung an Festphasenextraktionskartuschen und Messung der Festphasenextrakte mittels HPLC-MS bestimmt.

Dieser Abschnitt enthält eine Zusammenfassung der in der Diplomarbeit von Isabell Zunker im Detail beschriebenen experimentellen Arbeiten im Hinblick auf den durchgeführten Verteilungsversuch. Weitere Einzelheiten zum Versuchsablauf und zur Optimierung des verwendeten analytischen Verfahrens (Bestimmung von Wiederfindungen unterschiedlicher Festphasenextraktionsmaterialien, Optimierung der HPLC-MS Methode) sind der Diplomarbeit zu entnehmen.

In diesem Verteilungsversuch wurden die folgenden Wirkstoffe beziehungsweise einige ihrer Abbauprodukte untersucht:

Aclonifen, Alachlor, Atrazin, Atrazin desethyl, Atrazin desisopropyl, Bentazon, Bifenox, Bromoxynil, Chlortoluron, Clethodim, Desaminometamitron, Desmedipham, Diflufenican, Dimetachlor, Diuron, Ethofumesat, Fenoxaprop-p-ethyl, Fluazifop-p-butyl, Flufenacet, Fluroxypyr (unveresterte Säure), Fluroxypyr-meptyl, Flurtamone, Haloxyfop (unveresterte Säure), Haloxyfop-ethoxyethyl, Haloxyfop-methyl, Isoproturon, Linuron, MCPA, Mefen-



pyr-diethyl, Metamitron, Metazachlor, Metolachlor, Metsulfuron-methylester, Napropamid, Pentachlorphenol, Phemmedipham, Picolinafen, Propachlor, Propanil, Propaquizafop, Propyzamid, Prosulfocarb, Pyridate, Quizalofop-p-ethyl, Simazin, Terbutylazin, Terbutylazin desethyl, Triallate, 2,4-D

### **Überblick zum Versuchsablauf**

Es wurden 791,87 g intakter Kiefernnadeln in ein Glasgefäß (Schott Duran) mit einem Volumen von 20 l gegeben. Zu den Nadeln wurden 20,01 l einer vorher angesetzte Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,01 M; Natriumazid 150 mg/l, pH = 5,3) mit einer Konzentration der genannten Herbizide von jeweils 1 µg/l gegeben.

Die Konzentration in dieser wässrigen Phase lag um mindestens einen Faktor 50 unter den in der Literatur angegebenen Wasserlöslichkeiten. Die niedrigste Wasserlöslichkeit der verwendeten Stoffe besitzt Diflufenican (50 µg/l, TOMLIN 2003). Zur Aufstockung der wässrigen Phase wurde eine Stammlösung der Herbizide in Acetonitril mit einer Konzentration von 100 mg/l je Stoff verwendet. Der Gehalt der wässrigen Phase an Acetonitril betrug somit lediglich 0,01 %.

Für eine gleichmäßige Durchmischung wurde das Glasgefäß mit den Nadeln mit einem Tischschüttler (Abbildung 8) durchmischt und dabei während der Versuchsdauer abgedunkelt.

Nach Zeitintervallen von 9, 24, 44, 71, 135, 260, 545, 1244 und 1814 Minuten wurden jeweils 100 ml der wässrigen Phase mit einer Vollpipette entnommen. Zum letzten Zeitpunkt der Zeitreihe (nach 2704 Minuten) wurde eine Dreifachbestimmung der Konzentration in der wässrigen Phase (Probenahme von dreimal 100 ml mittels Vollpipette) durchgeführt. Die Volumenänderung des Ansatzes bis zum letzten Probenahmeintervall betrug damit lediglich 4,5 %.

Nach Abschluss des ersten Versuchsabschnitts, in dem die Herbizide aus der wässrigen Phase an die Nadeln adsorbierten, wurde die verbliebene wässrige Phase von den Nadeln getrennt und durch eine herbizidfreie Pufferlösung ersetzt. Durch Probenahme und Analyse von wiederum jeweils 100 ml dieser wässrigen Phase nach Zeitintervallen von 10 bis 2838 Minuten wurde die Desorption der Herbizide von den Nadeln in die wässrige Phase bestimmt.



*Abbildung 8: Verteilungsversuch mit intakten Nadeln, serieller Versuchsansatz*

Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurden folgende Proben untersucht:

- Aus der wässrigen Phase wurden vor der Zugabe zu den Nadeln Proben entnommen, um die Konzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  zu überprüfen.
- Um gegebenenfalls Abbauprozesse oder die Adsorption von Stoffen aus der wässrigen Lösung an das verwendete Glasgefäß zu quantifizieren, wurde die Konzentration der wässrigen Phase in einem zu dem oben beschriebenen identischen Ansatz (Volumen 20 l im selben Glasgefäß) und unter denselben Bedingungen (Tempera-

tur, Tischschüttler, abgedunkelt, pH-Wert, Probenahme und Lagerung) über einen Zeitraum von 4 bis 69 Stunden bestimmt.

- Um zu ermitteln, ob aus dem verwendeten Nadelmaterial Hintergrundkonzentrationen oder Blindwerte in die wässrige Phase eingeschleppt werden, wurden unter den gleichen Bedingungen wie im Verteilungsversuch Kiefernadeln mit einer herbizidfreien Pufferlösung für 4 bis 68 Stunden in Kontakt gebracht und Proben der wässrigen Phase untersucht. Es wurde lediglich eine kleinere Menge an Nadeln und wässriger Phase von 100 ml pro Ansatz bei gleichem Mengenverhältnis gewählt.
- Nach dem gleichen Prinzip wurden Proben hergestellt, die unmittelbar vor der Injektion am LC-MS mit den Herbiziden um eine Konzentration von 100 µg/l aufgestockt wurden. Es wurde somit untersucht, ob während der wachsenden Zeitintervalle des Verteilungsversuches eine ansteigende Belastung der Proben mit Matrixbestandteilen entsteht (zum Beispiel Stoffe, die sich von den Nadeloberflächen lösen), die gegebenenfalls auch zu einer wachsenden Signalsuppression des LC-MS führt.

Alle Proben wurden mit LiChrolut EN 200 mg Festphasenextraktionskartuschen nach dem im Abschnitt 4.1.6.2 beschriebenen Verfahren (für wässrige Proben, die nicht durch Extraktion der epikutikulären Wachsschicht oder der verbleibenden Nadeln gewonnenen wurden) angereichert. Abweichend wurde für das Konditionieren der Festphasenextraktionskartuschen Methanol anstatt Ethylacetat und für die Elution Methanol und Dichlormethan verwendet. Für das Anreicherungsverfahren wurden die Wiederfindungen der untersuchten Herbizide bestimmt.

Zur Ermittlung von Empfindlichkeitsschwankungen des LC-MS wurde zu den Messlösungen (nach dem Einengen der Eluate der Festphasenextraktion und Zugabe eines Injektionsgemisches von 1000µl Acetonitril / wässriger HPLC-Eluent 70/30 % v/v) ein deuterierter interner Standard (10 µl D9-Fluazifop-p-butyl c = 10 mg/l) hinzugegeben. Darüberhinaus wurde zusätzlich zur vermessenen Kalibration in regelmäßigen Abständen eine Lösung der Herbizide als Einpunktkalibration gemessen.

### **4.3.3 Applikation von Isoproturon in definierter Wirkstoffmenge und Tröpfchenvolumen: kompartimentelle Charakterisierung der Herbizidverteilung**

Um den Einfluss von Niederschlägen auf den in Freilandmessungen ermittelten Konzentrationsverlauf von Isoproturon in Kiefernadeln (FLEISCHER 2004) zu erklären, wurden Verteilungsversuche mit an den Zweigen verbleibenden Kiefernadeln durchgeführt. Es wurde versucht, die Gegebenheiten im Freiland unter kontrollierten Bedingungen im Labormaßstab abzubilden.

#### **4.3.3.1 Überblick zum Versuchsablauf**

Das Konzept der Versuchsbedingungen ist eine Weiterentwicklung der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Verteilungsversuche: Auf die Nadeln wurde eine genau bekannte Wirkstoffmenge in einem definierten Lösungsvolumen und definiertem Tröpfchenvolumen appliziert, ohne die Nadeln von den Zweigen abzutrennen. Nach 48 Stunden wurden die mit dem Herbizid exponierten Nadeln für unterschiedliche Zeitintervalle in Kontakt mit einer wässrigen Pufferlösung gebracht, die die während der Freilandmessungen aufgetretenen Niederschläge simulieren soll. Auch während dieser Desorptionsphase ermöglichte der Versuchsaufbau (Abbildungen 9 und 11) den Verbleib der intakten Nadeln am Zweig. Zum Ende der Desorptionsphase wurde die Konzentration des Wirkstoffs Isoproturon und seiner Abbauprodukte in der wässrigen Pufferlösung, in der epikutikulären Wachsschicht und in der nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadel bestimmt. Somit wurde die Verteilung von Isoproturon in den Kompartimenten wässrige Phase, epikutikuläre Wachse und Nadelgewebe charakterisiert. Da die Nadeln während der gesamten Versuchsdauer am Zweig verbleiben und so nicht vom Flüssigkeitstransport in den Leitungsbahnen abgetrennt werden, können gegebenenfalls Transportprozesse der applizierten Herbizide unter realistischeren Bedingungen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Versuche mit abgetrennten Nadeln durchgeführt.

Die Konzentrationen an Wirkstoff beziehungsweise Herbizidformulierung in den auf die Nadeln applizierten Lösungen wurde so gewählt, dass die auf die Nadeln aufgebrachte Wirkstoffmenge den im Freiland gemessenen Konzentrationen entsprach. Pro Gramm

Frischgewicht entsprach die auf die Nadeln applizierte Dosis 138 ng. Ähnliche Konzentrationen an Isoproturon wurden in Kiefernadeln bei Freilandmessungen nach einer Herbizidanwendung in der Umgebung eines Getreidefeldes gemessen (FLEISCHER 2004).

Für die Exposition der Nadeln mit dem Wirkstoff beziehungsweise Pflanzenschutzmittel wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

In einer Versuchsreihe wurde lediglich der Wirkstoff Isoproturon gelöst in Reinstwasser auf den Nadeln appliziert. In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine Pflanzenschutzmittel-Formulierung in einer wässrigen Lösung mit Mineraldüngerbestandteilen appliziert: Es sollte der Einfluss von Inhaltsstoffen der Formulierung beziehungsweise der von den Landwirten verwendeten Sprühlösung (Ammonnitrat-Harnstoff-Lösung, AHL) quantifiziert werden, wenn diese in sehr geringen Mengen mit dem Wirkstoff durch Drift auf die Oberfläche von Koniferennadeln gelangen.

#### **4.3.3.2 Bestimmung der Wiederfindung und Kalibration**

Es wurde eine Stammlösung des Wirkstoffs Isoproturon in Reinstwasser hergestellt. Um den Stoff zu lösen, wurde der Messkolben mit dem Reinstwasser und den Kristallen des Wirkstoffs für 48 Stunden im Überkopfschüttler durchmischt. Die Konzentration betrug 9,2 mg/l, Isoproturon besitzt eine Wasserlöslichkeit von 65 mg/l (TOMLIN 2003).

Aus Referenzstandards der folgenden Abbauprodukte des Isoproturons wurde eine Stammlösung der Konzentration 100 mg/l (je Stoff) in Acetonitril angesetzt:

- 2-hydroxy-Isoproturon (N'-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-N,N-dimethylurea)
- 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon (N-[4-(2-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-N'-methylurea)
- 1-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon (N-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-N'-methylurea)
- di-desmethyl-Isoproturon (1-(4-Isopropylphenyl)urea)
- monodesmethyl-Isoproturon (1-(4-Isopropylphenyl)-3-methylurea)
- 4-Isopropylanilin

Eine Zwischenverdünnung in Acetonitril, die sowohl das Isoproturon als auch seine Abbauprodukte enthält, wurde durch Zugabe von 1 ml der Isoproturonstammlösung und 100 µl der Abbauproduktstammlösung in einen 10 ml Messkolben angesetzt. Die Konzentration des Isoproturons und der Abbauprodukte betrug 1 mg/l. Diese Zwischenverdünnung (Isoproturon und Abbauprodukte  $c = 1$  mg/l) wurde für die Herstellung von Kalibrationslösungen und zur Aufstockung der Proben für die Ermittlung der Wiederfindung über das gesamte Analysenverfahren dieses Verteilungsversuches verwendet.

Als interner Standard wurde eine Lösung der isotopenmarkierten Referenzsubstanz Isoproturon D6 ( $c = 11,1$  mg/l) verwendet. Die Lösung wurde durch Einwiegen von 1,11 mg der Referenzsubstanz an der Analysenwaage und Auffüllen in einem 100 ml Messkolben mit Acetonitril hergestellt.

Es wurden nach dem im Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren Nadeln des aktuellen Nadeljahrganges von Kiefern aus dem der Universität Lüneburg benachbarten Waldgebiet Bockelsberg gewonnen. Jeweils 10 Nadeln (durchschnittlich 1,16 g Frischgewicht) wurden für eine Dauer von 45 Minuten mit 25 ml Reinstwasser in sechs 50 ml Schraubfläschchen bei 15 U/min im Überkopfschüttler gespült. Diese wässrigen Lösungen wurde mit Isoproturon und den genannten Abbauprodukten aufgestockt (Aufstockung: 0, 5, 10, 50, 70 und 100 ng je Analyt).

Nach dem im Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Verfahren wurde aus denselben zuvor mit Wasser abgespülten Nadeln Extrakte der epikutikulären Wachsschicht gewonnen. Diese Extrakte wurden ebenfalls mit den gleichen Mengen an Isoproturon und Abbauprodukten aufgestockt.

Die nach der Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln wurden ebenfalls mit den gleichen Mengen Isoproturon und Abbauprodukten aufgestockt und mittels Ultraturax und Ultraschall nach dem unter Abschnitt 4.1.5 beschriebenen Verfahren extrahiert.

Die Proben wurden mit dem im Abschnitt 4.1.6 beschriebenen Verfahren aufgearbeitet, mit dem einzigen Unterschied, dass der interne Standard Isoproturon D6 erst im letzten Arbeitsschritt vor der Messung an der HPLC-MS zu den Proben gegeben wurde: Es sollte für die Bestimmung der Wiederfindung nur die Empfindlichkeitsschwankung der HPLC-MS Messung durch den internen Standard korrigiert werden. Dazu wurde nach dem Eingehen der im Abschnitt 4.1.6.2 beschriebenen Eluate der Festphasenextraktion der interne Standard mit dem Injektionsgemisch zu den Proben gegeben.

Zur Kalibration wurde eine Verdünnungsreihe (Konzentrationen: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 µg/l) aus der Zwischenverdünnung (Isoproturon und Abbauprodukte  $c = 1 \text{ mg/l}$ ), die für das Aufstocken der Wiederfindungsproben verwendet wurde hergestellt und zusammen mit den Wiederfindungsproben vermessen.

### **4.3.3.3 Vorbereitung der Verteilungsversuche**

#### **Präparation der verwendeten Kiefernzweige**

Die für die Verteilungsversuche verwendeten Kiefernzweige wurden 5 Stunden vor der Applikation der Herbizidlösung von Bäumen im Waldgebiet Bockelsberg geschnitten. Nach kurzem Transport ins Labor (circa 20 Minuten) wurden die Zweige nochmals frisch schräg angeschnitten, die angeschnittenen Enden in Erlenmeyerkolben mit Reinstwasser gestellt und an Stativen auf dem Labortisch fixiert. Das erneute Anschneiden vor dem Eintauchen in das Wasser gewährleistet eine Benetzung der frischen Schnittstelle. Das Wasser kann so durch die angeschnittenen Leitbündel der Zweige aufgenommen werden. Dies gewährleistet während der gesamten Versuchsdauer eine Wasserversorgung und Transpiration der Nadeln. Es konnte beobachtet werden, dass die Zweige während des Versuchs Wasser aus den Erlenmeyerkolben aufgenommen haben und nicht sichtbar ausgetrocknet sind.

Die in den Erlenmeyerkolben beziehungsweise am Stativ fixierten Zweige waren circa 40-50 cm lang und so befestigt, dass das angeschnittene Zweigende in das Wasser im Erlenmeyerkolben tauchte und der übrige Teil des Zweiges waagrecht am Stativ fixiert war (Abbildung 9). Da die Nadeln an Kiefernzweigen in sehr gleichmäßigen Abständen rund um den Zweig verteilt wachsen, war folgende Präparation der Zweige möglich: Es wurden an den etwa 30 cm langen Abschnitten am Ende der Zweige alle Nadeln entfernt bis auf zwei Gruppen von 10 Nadeln, die auf einem jeweils maximal 3 cm langen Abschnitt des Zweiges senkrecht nach unten zeigten (Abbildung 10).

Diese Anordnung wurde gewählt, damit sich die Nadeln möglichst einfach mit einer Mikroliterspritze mit einzelnen Tröpfchen benetzen lassen und damit die Untersuchung der Desorption in der Pufferlösung mit den intakten, am Zweig befindlichen Nadeln möglich ist.





*Abbildung 9: Übersicht des Versuchsaufbaus*



*Abbildung 10: mit Isoproturon benetzte Kiefernadeln vor der Desorption in die herbizidfreie Pufferlösung*



### **Für die Applikation auf die Nadeloberfläche verwendete Lösungen:**

Für die Applikation einer definierten Wirkstoffmenge auf die Nadeloberfläche wurden folgende Lösungen verwendet.:

1. Isoproturon/Reinstwasser: Dabei handelte es sich um die im Abschnitt 4.3.3.2 beschriebene Stammlösung von Isoproturon in Reinstwasser der Konzentration 9,2 mg/l
2. Pflanzenschutzmittel-Formulierung in AHL: Lösung des Pflanzenschutzmittels Orefa IPU SC 500 (Firma Plantan) und Düngerbestandteile (AHL) in Reinstwasser. Konzentration an Isoproturon: 9,3 mg/l

Die Formulierungslösung (2.) sollte alle Bestandteile einer gebrauchstüblichen Sprühlösung enthalten, dabei aber dieselbe Konzentration des Wirkstoffes wie die Lösung Isoproturon/Reinstwasser (1.) enthalten. Dies gewährleistet bei den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Verteilungsversuchen (Benetzung von Kiefernadeln mit wässriger Isoproturon/Reinstwasser und mit der Pflanzenschutzmittel-Formulierung) vergleichbare Versuchsbedingungen. In diesen Verteilungsversuchen sollte insbesondere die Größe der applizierten Tröpfchen, die Konzentration des Wirkstoffes und damit die pro benetzter Fläche applizierte Dosis vergleichbar sein, da schon Unterschiede in der applizierten Dosis zu einer unterschiedlichen Aufnahme von Stoffen über die Kutikula führen können (FORSTER ET AL. 2006).

Die Formulierungslösung enthielt Anteile einer handelsüblichen Pflanzenschutzmittel-Formulierung und die üblicherweise von Landwirten für das Ansetzen der versprühten Lösung verwendeten Pflanzendünger (Ammonnitrat-Harnstoff-Lösung, AHL). Lediglich der Wasseranteil in der auf die Nadeln applizierten Lösung ist um einen Faktor von 500 höher als in den von Landwirten versprühten Gemischen, um die oben genannte Bedingung vergleichbarer Konzentrationen der für das Benetzen verwendeten Lösungen zu erfüllen.

Bei der Herstellung der Formulierungslösung wurden die Angaben auf dem Beipackzettel des Produktes Orefa IPU SC 500 berücksichtigt (PLANTAN 2004):

- Wirkstoffgehalt: 47,17 % (Gewichtsprozent) Isoproturon (Suspensionskonzentrat)

- Aufwandmenge 2,5 – 4 l/ha
- Wassermenge zum Verdünnen: 200 – 400 l/ha
- typisches Mischungsverhältnis AHL / Wasser: 1:3, aber auch höhere AHL-Anteile sind möglich

Nach den Angaben im Sicherheitsdatenblatt des Pflanzenschutzmittels Orefa IPU SC 500 enthält das Produkt folgende Formulierungsbestandteile (Plantan 2008):

- Natriumbisulfit-Kresol-Formaldehyd-Kondensat: 2-5 %
- Ethylenglycol: 5-10 %
- Alkylether phosphat, Natriumsalz:  $\leq 1$  %

Für die AHL-Komponente wurden folgende Angaben zu den Bestandteilen (in Gewichtsprozent) im Sicherheitsdatenblatt zum Düngemittel AHL 30 der Firma DSM Agro B.V. zugrundegelegt (DSM AGRO 2007):

- Ammoniumnitrat: 40-41 %
- Harnstoff: 32 %
- Wasser: 24-25 %
- Ammoniumsulfat: 2-4 %

Durch Einwiegen des Pflanzenschutzmittel-Suspensionskonzentrates, der Bestandteile Ammoniumnitrat, Harnstoff, Ammoniumsulfat und Verdünnen mit Reinstwasser wurde die für das Benetzen der Nadeln verwendete Formulierungslösung angesetzt. Die Konzentrationen in der Lösung betragen:

- 9,3 mg/l Isoproturon als Wirkstoff (19,7 mg/l des Suspensionskonzentrates mit den im Sicherheitsdatenblatt angegebenen Tensidgehalten)
- 1,11 g/l Ammoniumnitrat
- 0,90 g/l Harnstoff

- 5,6 mg/l Ammoniumsulfat

### **Zur Untersuchung der Desorption verwendete Pufferlösung**

Die mit Herbiziden benetzten Kiefernnadeln wurden zur Messung der Desorption für unterschiedliche Zeitintervalle in eine 0,01 molare Phosphatpufferlösung (pH = 4,2) eingetaucht. Die Pufferlösung hatte einen Natriumazid-Gehalt von 142 mg/l.

#### **4.3.3.4 Versuchsdurchführung**

Es wurden zwei Versuchsreihen unternommen, in denen Kiefernnadeln mit Herbizidlösungen benetzt wurden und der Verbleib des Isoproturons und seiner Abbauprodukte in der epikutikulären Wachsschicht, der nach Extraktion der Wachsschicht verbleibenden Nadeln und der zur Untersuchung der Desorption verwendeten wässrigen Lösung gemessen wurde.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Isoproturon/Reinstwasserlösung ( $c = 9,2 \text{ mg/l}$ ) für die Benetzung der Nadeln verwendet. 48 Stunden nach dem Benetzen der Nadeln mit der Herbizidlösung wurden die Nadeln für unterschiedliche Zeitintervalle in eine Pufferlösung eingetaucht um die Desorption der Analyte abhängig von der Kontaktdauer der Nadeln mit der Lösung zu messen.

Diese Versuchsreihe wurde einmal mit langen Zeitintervallen (9 – 2890 Minuten) und einmal mit kurzen Zeitintervallen (1 – 60,5 Minuten) für die Desorption durchgeführt, da die zuerst durchgeführte Messung mit den längeren Zeitintervallen zeigte, dass Isoproturon bereits nach einer Kontaktdauer von wenigen Minuten mit der Pufferlösung von der Nadeloberfläche desorbiert.

In der zweiten Versuchsreihe wurde dasselbe Experiment mit der oben beschriebenen Formulierungslösung mit AHL ( $c = 9,3 \text{ mg/l}$ ) über einen Zeitraum von 3 bis 1440 Minuten für die Desorption durchgeführt.

Die untersuchten Zeitintervalle beziehungsweise die Kontaktdauer zwischen Nadeln und Pufferlösung sind in Tabelle 3 aufgeführt.

*Tabelle 3: Kontaktdauer der Kiefernadeln mit einer Phosphatpufferlösung zur Messung der Desorption*

	Zeitintervalle [min]															
IPU/Reinstwasser 1	9	20	30	40	92	176	369	736	1510	2890						
IPU/Reinstwasser 2	1	2	3	5	7	15,5	30	60,5								
IPU Formulierung	3	5	8,5	10,5	15	31	47	60	90	119	183	240	496	703	1095	1440

Die im folgenden beschriebene Methodik (Benetzen der Nadeln, Probenahme, Extraktion und Messung) wurde für alle Messreihen in der gleichen Weise durchgeführt.

### **Benetzen der Kiefernadeln**

Auf den Kiefernadeln der wie im Abschnitt 4.3.3.3 präparierten Zweigabschnitte wurden 15 µl der Herbizidlösung aufgebracht. Dafür wurden die 10 Nadeln, die pro Zweigabschnitt vorbereitet waren insgesamt mit durchschnittlich 95 Tröpfchen ( $\pm 10$ ) aus einer 10 µl Mikroliterspritze benetzt (7 + 8 µl, die Spritze wurde zweimal befüllt). Es wurde immer das gleiche Gesamtvolumen von 15 µl auf jedem Zweigabschnitt appliziert. Beim Aufbringen der Lösung wurde darauf geachtet, dass die Tropfen eine gleichmäßige Größe beziehungsweise ein gleichmäßiges Volumen besitzen. Das durchschnittliche Volumen der Tropfen betrug 160 nl. Es wurde erprobt, die Flüssigkeitsmenge von 15 µl mit einer 25 µl Mikroliterspritze zu dosieren, um den zusätzlichen Dosierfehler durch das oben beschriebene zweimalige Befüllen der 10 µl Spritze zu vermeiden, allerdings zeigte sich, dass die gleichmäßige Applikation möglichst kleiner Tröpfchen mit der verwendeten 10 µl Spritze besser möglich war.

Die mit den Tröpfchen auf die Nadeln applizierte Menge an Isoproturon betrug somit 138 (Benetzungslösung Isoproturon/Reinstwasser,  $c = 9,2 \text{ mg/l}$ ) und 139,5 ng (Formulierungslösung mit AHL  $c = 9,3 \text{ mg/l}$ ) je Zweigabschnitt beziehungsweise pro Gramm Nadeln Frischgewicht.

Die Tropfen wurden in gleichmäßigen Abständen auf die Nadeloberfläche gesetzt, dabei wurde darauf geachtet, dass die Tropfen nicht ineinanderliefen. Jeweils 1 cm an beiden Nadelenden wurden nicht benetzt, um sicherzustellen, dass beim Einbringen der Nadeln in die Desorptionslösung oder beim Abzupfen der Nadeln am Ende des Versuchsverlaufs keine Anteile der applizierten Stoffe zum Beispiel mit der Pinzette berührt und abgerieben werden.

Die Tropfen verdunsteten auf der Nadeloberfläche innerhalb von etwa 10 Minuten. Alle benetzten Nadelgruppen verblieben nun für 48 Stunden ohne weitere Veränderungen an den Zweigen.



*Abbildung 11: Benetzen der Nadeln mit einer 10 µl Mikroliterspritze*

Der Laborplatz mit den an den Stativen befestigten Zweigen wurde nicht abgedunkelt. In die oben beschriebenen Erlenmeyerkolben, in welche die Enden der Zweige eintauchten wurde zweimal täglich Reinstwasser nachgefüllt, um den Verbrauch von Wasser durch die

Transpiration der noch an den Zweigen verbliebenen Nadeln auszugleichen. Es wurde darauf geachtet, dass die schräg angeschnittenen Enden der Zweige in den Erlenmeyerkolben nicht trocken fielen. Im Versuchsverlauf konnte ein leichtes Austreten von Harz an den Schnittstellen der Zweige und eine leichte gelbliche Verfärbung des Wassers in den Erlenmeyerkolben beobachtet werden.

### **Desorption des Isoproturons und seiner Abbauprodukte in die Pufferlösung**

Nach 48 Stunden wurden die Nadeln der Zweigabschnitte zur Messung der Desorption für die in Tabelle 3 beschriebene Dauer in die oben genannte Pufferlösung eingetaucht. Dafür wurden Schnappdeckelgläser (Volumen 25 ml, ohne Verjüngung an der Öffnung, Abbildung 12) vorsichtig von unten über die Nadeln gestülpt.



*Abbildung 12: Kiefernadeln, zur Desorption eingetaucht in herbizidfreie Pufferlösung*

*- Der Gehalt an Isoproturon und Abbauprodukten wurde nach unterschiedlichen Zeitintervallen in der Pufferlösung untersucht.*

Die Gläser enthielten einen Rührfisch. Die verwendeten Rührfische waren mit Glas umhüllte kleine Stabmagnete (Länge circa 1cm). Die über die Nadeln gestülpten Gläser wurden mit einer Klammer an einem Stativ fixiert. Mit höhenverstellbaren Laborbühnen wurden Magnetrüher unter den Böden der Gläser positioniert. Die Magnetrüher wurden auf eine Drehzahl von circa 2 U/min eingestellt, es wurde darauf geachtet dass der Rührfisch nicht an die eingetauchten Nadeln schlägt.

Zu den Nadeln in den Gläsern wurden 25 ml der Pufferlösung gegeben. Der Zeitpunkt der Pufferzugabe wurde als Startzeitpunkt notiert.

### **Probenahme der Pufferlösung**

Nach den in Tabelle 3 genannten Zeitintervallen wurden die Gläser mit den Pufferlösungen wieder von den Nadeln entfernt. Die Lösungen wurden mit Pasteurpipetten aus den Schnappdeckelgläsern in 30 ml Schraubfläschchen überführt. 7 µl der Lösung des internen Standards Isoproturon D6 wurden in die Schraubfläschchen gegeben.

Die leeren Gläser wurden mit jeweils circa 1,5 ml Aceton an der Innenwandung benetzt und vorsichtig geschwenkt. Das Aceton wurde mit Pasteurpipetten in dieselben Schraubvi- als überführt, die für das Einengen des Eluates aus der Festphasenextraktion im späteren Verlauf der Probenaufarbeitung (siehe Abschnitt 4.1.6.2) verwendet wurden. Ziel dieser Maßnahme war es, möglicherweise an der Wandung des Schnappdeckelglases adsorbierte Analyte zu extrahieren und mit der Probe zu vereinen.

### **Extraktion der epikutikulären Wachsschicht**

Die epikutikuläre Wachsschicht der Kiefernadeln des jeweiligen Zweigabschnittes wurde sofort nach dem Entfernen der Pufferlösung extrahiert. Dazu wurden die Nadeln wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben mit einer Pinzette von den Zweigen getrennt und in 50 ml Schraubfläschchen gesammelt. Die Nadeln wurden mit der im Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Methode extrahiert.

Der interne Standard Isoproturon D6 wurde wie im Abschnitt 4.1.3 beschrieben in die für die Lagerung der Dichlormethanextrakte verwendeten Schraubfläschchen dosiert. Die Extrakte in Dichlormethan wurden bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert. Die maximale Dauer zwischen dem Entfernen der Pufferlösung von den Nadeln und der Ex-

traktion der epikutikulären Wachsschicht betrug circa 2 Minuten. Es wurde darauf geachtet, dass diese Zeitspanne so kurz wie möglich gehalten wurde, damit während dieser Dauer der gegebenenfalls stattfindende Weitertransport des Isoproturons in das innere Nadelgewebe möglichst gering ist und somit das Verteilungsverhältnis zwischen den Nadelkompartimenten nicht beeinflusst wird.

### **Extraktion der nach der Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln**

Nach der Extraktion der epikutikulären Wachsschicht mit Dichlormethan verblieben die Nadeln in den für die Extraktion der epikutikulären Wachsschicht verwendeten Schraubfläschchen. Es wurden 5 ml Acetonitril in die Fläschchen gegeben. In die Fläschchen wurden 7 µl des internen Standards Isoproturon D6 dosiert. Die Schraubfläschchen wurden bis zur Extraktion mittels Ultraturrax und Ultraschall verschlossen und im Gefrierfach gelagert. Nach der Entnahme aus dem Gefrierfach wurden die Nadeln in die im Abschnitt 4.1.5 beschriebenen Erlenmeyerkolben überführt und nach dem dort genannten Verfahren extrahiert.

### **Probenaufarbeitung und Messung**

Alle in den Versuchsreihen erzeugten Extrakte und die wässrige Pufferlösung wurden nach dem im Abschnitt 4.1.6 beschriebenen Verfahren per Festphasenextraktion angereichert, aufgereinigt und mittels HPLC-MS vermessen. Die für die Messung mittels HPLC-MS verwendeten Geräteparameter sind im Anhang Abschnitt 8.2 genannt.

### **4.3.3.5 Dokumentation der Versuchsbedingungen**

#### **Luftfeuchte und Temperatur**

Während der gesamten Dauer der Verteilungsversuche und der in den Abschnitten 4.3.3.6 und 4.3.3.7 beschriebenen begleitenden Versuche wurde die Luftfeuchte und Temperatur am Versuchsaufbau mit einem Temperatur/Feuchteschreiber dokumentiert. Die Temperatur lag durchschnittlich bei  $23 \pm 6$  °C, die relative Luftfeuchte bei durchschnittlich  $68 \pm 20$  %. Die Kalibration des Schreibers wurde im Abstand von 2 Tagen im Hinblick auf die Tempe-

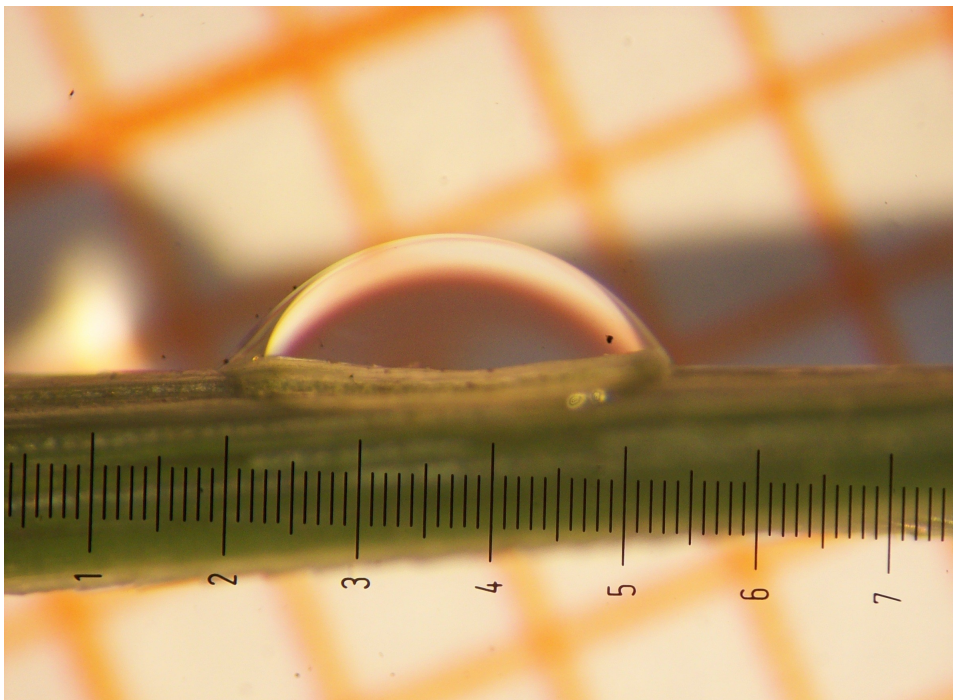


ratur mit einem elektronischen Temperatursensor und im Hinblick auf die Luftfeuchte mit einem Aspirationspsychrometer kontrolliert.

Da auch im Labor Luftbewegungen durch die Frischluftzufuhr oder Abzüge verursacht werden, diese allerdings durch die Lüftungsanlage konstant gehalten werden, wurde die Luftgeschwindigkeit am Versuchsaufbau mit einem Heizdrahtanemometer bestimmt. Die Luftgeschwindigkeit betrug durchschnittlich  $0,2 \pm 0,1$  m/s.

### **Benetzungswinkel**

Der Benetzungswinkel der auf die Nadeln applizierten Tröpfchen und die benetzte Oberfläche wurde mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen (Abbildung 13) abgeschätzt. Der Benetzungswinkel wurde zwischen der benetzten Oberfläche und der Tangente der Tröpfchenoberfläche am Berührungspunkt zur Nadeloberfläche abgeschätzt. In Abbildung 13 ist der Benetzungswinkel kleiner als  $90^\circ$ . Ebenfalls sichtbar ist die Skala des verwendeten Okularmikrometers, das hier allerdings keine Anwendung findet. Der Tröpfchendurchmesser längs der Nadel beträgt etwa 1,8 mm.



*Abbildung 13: Abschätzen des Benetzungswinkels*

### **Beschaffenheit der Verdunstungsrückstände**

Die Verdunstungsrückstände der Tröpfchen der beiden für das Benetzen verwendeten Lösungen (Reinstwasser/Isoproturon und die Formulierungslösung mit AHL) wurden auf einem Objektträger aus Glas mit einem Labormikroskop mit Okularmikrometer fotografiert.

### **Trocken- und Frischgewicht, Gehalt an epikutikulären Wachsen**

Das Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht und der darauf bezogene Gehalt an epikutikulären Wachsen wurden durch Trocknung und Extraktion nach den in den Abschnitten 4.1.2 und 4.1.3 beschriebenen Verfahren bestimmt.

### **Verschleppung an der Glasoberfläche der Desorptionsgefäße**

Es wurde untersucht, ob die benetzten Nadeln beim Überstülpen der Schnappdeckelgläser die innere Glaswandung der Gläser berühren und ob dadurch Isoproturon von den Nadeln abgestreift wird. Dafür wurde ein Zweigabschnitt wie 4.3.3.4 beschrieben benetzt. Wie im selben Abschnitt beschrieben wurde ein Schnappdeckelglas über die Nadeln gestülpt. Das Glas wurde nicht mit Pufferlösung befüllt, sondern von den Nadeln wieder abgenommen. Die Innenwandung des Glases wurde mit etwa 5 ml Aceton mit einer Pasteurpipette benetzt und vorsichtig geschwenkt. Die Analyse des Aceton-Extraktes zeigte keine nachweisbaren Gehalte an Isoproturon oder den untersuchten Abbauprodukten.

### **Haftwasseranteil**

Es wurde der Flüssigkeitsanteil bestimmt, der nach dem Entnehmen der Nadeln aus den zur Desorption verwendeten Pufferlösungen an den Nadeln haften bleibt (Haftwasseranteil). Der Haftwasseranteil wurde durch Auswiegen der Gewichts Differenz der trockenen und der einer Pufferlösung entnommenen Nadeln, bezogen auf das Frischgewicht der Nadeln, bestimmt. Der Haftwasseranteil wurde bei der Ermittlung der Stoffmenge von Isoproturon und seiner Abbauprodukte in der epikutikulären Wachsschicht der Kiefernnadeln berücksichtigt, da die Nadeln im unter Abschnitt 4.3.3.4 beschriebenen Probenahmeverfahren vor

der Extraktion der epikutikulären Wachsschicht mit Dichlormethan nicht abgespült werden können und durch den Haftwasseranteil gegebenenfalls Anteile der Analyte, die der wässrigen Phase (Pufferlösung) zuzurechnen sind in die epikutikulären Wachsextrakte verschleppt werden.

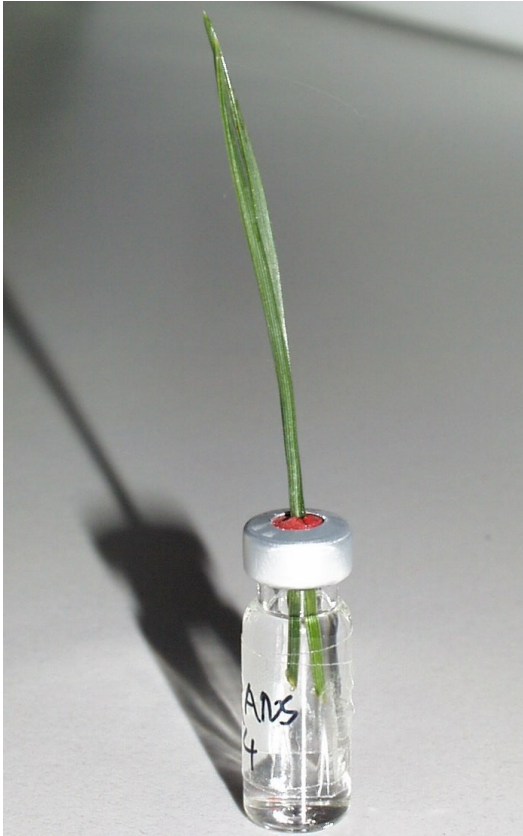
#### **4.3.3.6 Untersuchung der Translokation innerhalb der Nadeln und Zweige**

Um zu erkennen, ob Anteile des Wirkstoffs Isoproturon oder seiner Abbauprodukte, die innerhalb der 48h nach Applikation der Herbizidtröpfchen gegebenenfalls in das innere Gewebe der Nadeln aufgenommen wurden, auch Transportvorgängen im Nadelgewebe unterliegen, wurden zwei Messreihen durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die Stoffe aus benetzten Nadeln in eine wässrige Lösung abgegeben werden oder ob sie entlang der Nadel von einem benetzten Bereich in einen unbehandelten Bereich der Nadel transportiert werden. Solche Transportvorgänge würden einen Hinweis auf die Verteilung der Stoffe in der gesamten Kiefer (Translokation, vergleiche Abschnitt 3.7) geben.

#### **Messung des Transports aus einzelnen Nadeln in eine wässrige Lösung**

In der ersten Versuchsreihe wurden frische Nadeln (Probenahme siehe Abschnitt 4.1.1) am zweignahen Ende schräg angeschnitten. An der Analysenwaage ausgewogene HPLC-Vials mit Krimprand wurden mit 1,7 ml Reinstwasser befüllt und mit einer Krimpkappe verschlossen. Die befüllten Vials wurden nochmals an der Analysenwaage gewogen und das exakte Gewicht notiert. Das Septum wurde so mit einem spitzen gereinigten Messer durchstoßen, dass die Öffnung groß genug für eine Kiefernnadel war. Je eine schräg angeschnittene Kiefernnadel wurde mit einer Pinzette ca. 1,5 cm über der Schnittstelle gefasst und das angeschnittene Ende durch die Öffnung des Septums etwa 1 cm tief in die Flüssigkeit gesteckt.

Das Septum umschloss dabei die Nadel und dichtete das Vial gegen Verdunstung ab (Abbildung 14).



*Abbildung 14: Translokation: Abgabe von Stoffen aus der Nadel ins Vial*

*- Mit Isoproturonlösung im Abschnitt außerhalb des Vials benetzte Kiefernadeln, das Vial enthält Reinstwasser*

Nun wurde der Abschnitt der Nadel, der aus dem Vial herausragte und nicht mit der Pinzette in Berührung gekommen war mit 10  $\mu\text{l}$  der im Abschnitt 4.3.3.3 beschriebenen Isoproturonlösungen benetzt. Es wurden somit je Nadel (und Vial) 93 ng Isoproturon appliziert. Die so präparierten Nadeln/Vials wurden in einem offenen Aufbewahrungskasten für HPLC-Vials gestellt und neben dem im Abschnitt 4.3.3.4 beschriebenen Versuchsaufbau platziert, so dass für diese Kiefernadeln dieselben Versuchsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchte, Luftgeschwindigkeit, Helligkeit) vorlagen wie im eigentlichen Verteilungsversuch. Nach 48 Stunden wurden die Nadeln aus den Vials entnommen. Die Gewichts Differenz und damit die im Vial verbliebene Flüssigkeitsmenge wurde an der Analysenwaage bestimmt.

In die HPLC-Vials wurden 7  $\mu\text{l}$  des internen Standards Isoproturon D6 dosiert.

Die HPLC-Vials wurden ohne weitere Probenaufbereitung mittels HPLC-MS mit der im Anhang Abschnitt 8.2 beschriebenen Methode vermessen.

## **Messung des Transports entlang der Nadel**

In einem zweiten Versuchs wurden wie im Verteilungsversuch im Abschnitt 4.3.3.4 die Nadeln am Zweig belassen. Die Probenahme, Präparation und Fixierung an einem Laborstativ der verwendeten Zweige erfolgte wie im Abschnitt 4.3.3.4, der einzige Unterschied bestand darin, dass für diesen Versuch kleinere Zweigabschnitte verwendet wurden, die senkrecht fixiert waren und lediglich in ein 22 ml Vial mit Reinstwasser eintauchten.

Die am Zweig belassenen Nadeln wurden mit einem Filzstift markiert und so in mehrere Abschnitte (Drittel) der Nadellänge unterteilt (Abbildung 15).

Für den Versuch wurde die Formulierungslösung mit AHL ( $c = 9,3 \text{ mg/l}$ ) wie im Abschnitt 4.3.3.4 beschrieben mit einer Mikroliterspritze in den der Nadelspitze zugewandten zwei Dritteln der Nadel appliziert. Es wurden  $10 \mu\text{l}$  je Nadel in durchschnittlich 55 Tröpfchen auf insgesamt 8 Nadeln und somit 93 ng Isoproturon je Nadel aufgebracht (und damit 744 ng auf dem gesamten Zweig).

Nach einem Zeitintervall von 45 Stunden wurden die äußeren benetzten Enden der Nadeln mit einer Schere auf der von der Nadelspitze abgewandten Seite der Filzstiftmarkierung abgeschnitten und verworfen. Der übrige Teil der Nadeln wurde mit einer Pinzette vom Zweig getrennt und in 22 ml Vials gesammelt. Zu den Nadeln wurden 5 ml Acetonitril und  $7 \mu\text{l}$  der Lösung des internen Standards Isoproturon D6 gegeben. Die Nadeln wurden nach dem Verfahren im Abschnitt 4.1.5 mittels Ultraturrax und Ultraschall extrahiert.

Die Extrakte wurden mit dem Festphasenextraktionsverfahren nach Abschnitt 4.1.6 aufkonzentriert und aufgereinigt und mittels HPLC-MS vermessen.

Zu der Flüssigkeit, in die das Ende des Zweiges eintauchte (Abbildung 15) wurden  $70 \mu\text{l}$  des internen Standards Isoproturon D6 gegeben. Die Flüssigkeit wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte mittels HPLC-MS vermessen.



*Abbildung 15: Translokation: Untersuchung eines Zweigabschnittes*

*- Mit schwarzem Filzstift markierte Teilabschnitte der Nadeln wurden mit Isoproturonlösung benetzt. Der Gehalt an Isoproturon und Abbauprodukten wurde in den nicht benetzten Nadelabschnitten und in der wässrigen Lösung, in die der Zweig eintaucht untersucht.*

#### **4.3.3.7 Untersuchung der Volatilisation**

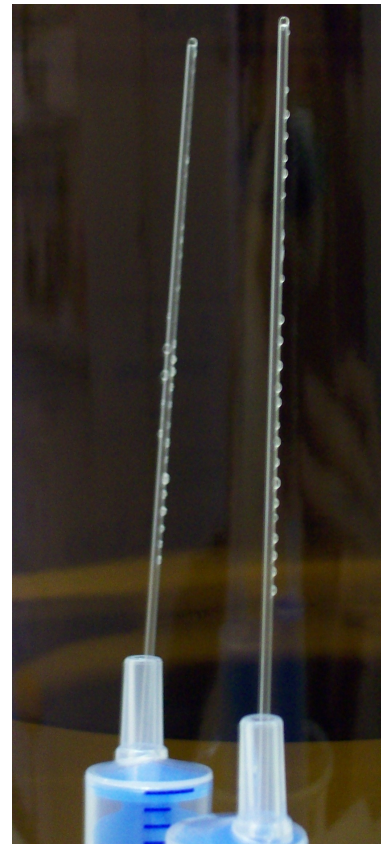
Es wurde untersucht, ob Isoproturon unter den beschriebenen Versuchsbedingungen (oben genannte Temperatur, Luftfeuchte und Luftgeschwindigkeit) nach der Applikation auf die Nadeln von deren Oberfläche verdunstet (= Volatilisation, vergleiche Abschnitt 3.3.2) oder ob Abbauprodukte aus abiotischen Abbauvorgängen nachgewiesen werden können. Dafür



wurden die für die Applikation auf die Nadeln verwendeten Lösungen (Isoproturon/Reinstwasser  $c = 9,2 \text{ mg/l}$  und Formulierungslösung mit AHL  $c_{\text{Isoproturon}} = 9,3 \text{ mg/l}$ ) mit einer Mikroliterspritze auf Glasoberflächen verschiedener Geometrie aufgebracht. Es wurden sowohl Petrischälchen (Abbildung 16) als auch Glaskapillaren, die in ihrer Form (Durchmesser circa 1,5 mm, Länge 75 mm, Abbildung 17) den Kiefernadeln ähnelten mit den Lösungen benetzt. Es wurden je Glasoberfläche  $10 \mu\text{l}$  mit durchschnittlich  $65 \pm 10$  Tropfchen aufgetragen.



*Abbildung 16: Volatilisation von Petrischälchen*



*Abbildung 17: Volatilisation von Glaskapillaren*

*- Glasoberflächen unterschiedlicher Geometrie, benetzt mit Isoproturonlösung zur Untersuchung der Volatilisation*

Die benetzten Glasoberflächen wurden für eine Dauer von bis zu 2400 Minuten auf unterschiedliche Weise in unmittelbarer Nähe des oben beschriebenen Versuchsaufbaus gegenüber der Laborluft exponiert:

- offen am für den Verteilungsversuch verwendeten Aufbau, unter gleichen Bedingungen (bei gleicher Luftgeschwindigkeit, Temperatur, Luftfeuchte und Helligkeit)
- offen im Laborschrank (gleiche Temperatur, keine Luftbewegung, dunkel)
- mit Schliffdeckel verschlossene Petrischälchen im Laborschrank

Nach wachsenden Zeitintervallen wurden die Glasoberflächen extrahiert: In die Petrischälchen wurden 7 µl des internen Standards Isoproturon D6 gegeben. Die Glasoberflächen wurden mit 1 ml eines Gemisches aus Wasser/Acetonitril (75/25 % v/v = Injektionsgemisch) extrahiert. Dazu wurden die Petrischälchen mit einem passenden Schliffdeckel verschlossen, geschüttelt und für 1 Minute mit der Bodenfläche des Petrischälchens ins Ultraschallbad gehalten. Nach einer Standzeit von 5 Minuten auf dem Labortisch und nochmaligem Schütteln wurden die Petrischälchen geöffnet und der Inhalt mit Pasteurpipetten in HPLC-Vials überführt. Die Glaskapillaren wurden für die Extraktion in 22 ml Schraubvials gegeben und nach Zugabe des internen Standards ebenfalls mit 1 ml des Injektionsgemisches durch Schütteln extrahiert. Die Extrakte wurden mittels HPLC-MS mit der im Anhang Abschnitt 8.2 beschriebenen Methode auf den Gehalt an Isoproturon und die in dieser Dissertation untersuchten Abbauprodukte analysiert.

Eine weitere Messreihe wurde mit Petrischälchen durchgeführt, die mit größeren Tröpfchen der Lösung Isoproturon/Reinstwasser  $c = 9,2 \text{ mg/l}$  benetzt wurden (50 µl in  $104 \pm 15$  Tropfen), um zu klären, ob das Tröpfchenvolumen die Volatilisation beeinflusst.

### **Transport im geschlossenen System**

Darüberhinaus wurde die Volatilisation von Isoproturon in einem geschlossenen System untersucht. Es wurde ein Petrischälchen mit Schliffdeckel verwendet und gemessen, ob Anteile von dem auf den Deckel aufgetragenen Isoproturon in das auf dem Boden des Schälchens platzierte Festphasenextraktionsmaterial transportiert werden. Das Festphasenextraktionsmaterial fungiert in diesem Fall als Fänger material für Isoproturon, das gegebenenfalls von der Oberfläche des Deckels des verschlossenen Petrischälchens volatilisiert:



Festphasenextraktionsmaterial (vernetztes Polystyrol-Divinylbenzol aus dem Bett einer geöffneten Lichrolut EN 200 mg Festphasenextraktionskartusche) wurde in Petrischälchen mit Schliff gegeben (Abbildung 18). Der Glasdeckel der Petrischälchen wurde mit der im Abschnitt 4.3.3.3 beschriebenen Formulierungslösung mit AHL  $c_{\text{Isoproturon}} = 9,3 \text{ mg/l}$  benetzt. Die Schalen wurde nach dem vollständigen Verdunsten der Tröpfchen auf den Deckeln mit diesen verschlossen. Das Festphasenextraktionsmaterial war somit durch eine circa 1cm dicke Luftschicht räumlich vom applizierten Isoproturon getrennt.

Nach einer Dauer von 5 Tagen wurde das Festphasenextraktionsmaterial unter Verwendung von frischen Schliffdeckeln mit 5 ml Acetonitril extrahiert. Vor Zugabe des Acetonitrils wurden 7  $\mu\text{l}$  des internen Standards Isoproturon D6 auf den frischen Schliffdeckel dosiert. Die so gewonnene Extrakte wurden mit Pasteurpipetten aus dem Petrischälchen in ein 22 ml Glasvial pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, kein Festphasenextraktionsmaterial zu verschleppen. Die Extrakte wurden mit Stickstoff eingengt und in 1 ml des Injektionsgemisches aufgenommen. Die ursprünglichen Schliffdeckel, auf die die für das Benetzen verwendeten Lösungen appliziert wurden, wurde wie oben beschrieben mit 1 ml des Injektionsgemisches extrahiert.



*Abbildung 18: Volatilisation in geschlossenem System mit Fängermaterial*

*- Untersuchung der Volatilisation von der mit Isoproturonlösung benetzten Deckeloberfläche in das herbizidfreie Festphasenextraktionsmaterial als Fänger*

Die so gewonnenen Lösungen wurden ebenfalls mittels HPLC-MS mit der im Anhang Abschnitt 8.2 beschriebenen Methode auf den Gehalt an Isoproturon und die in dieser Dissertation untersuchten Abbauprodukte vermessen.

### **Blindwerte**

Für alle beschriebenen Versuche zur Volatilisation wurden Blindwerte bestimmt, indem die gleichen Petrischälchen, Kapillaren und das Festphasenextraktionsmaterial für die maximale Zeitdauer der für die Volatilisation untersuchten Zeitreihen am selben Standort wie die übrigen Proben der Laborluft ausgesetzt wurden. Die Blindwerte wurden auf dieselbe Weise wie oben beschrieben extrahiert und vermessen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Auswertung von Konzentrationsverläufen und Berechnung von Verteilungskoeffizienten

Dieser Abschnitt gibt einen Überblick zur Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten und Verteilungskoeffizienten aus den in den Verteilungsversuchen experimentell ermittelten Daten.

#### 5.1.1 Auswertung der Konzentrationsverläufe

Die in den in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verteilungsversuchen gemessenen Konzentrationsverläufe wurden im Hinblick auf die Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase ausgewertet.

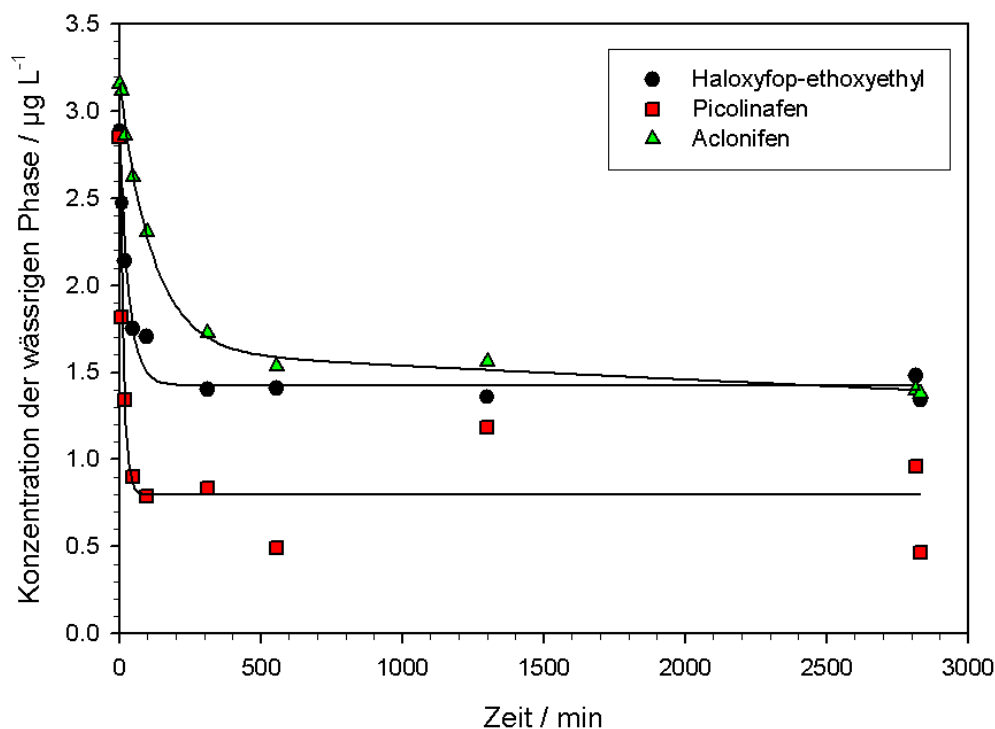


Abbildung 19: einfach exponentielle Konzentrationsverläufe im Verteilungsversuch mit intakten Kiefernadeln in der wässrigen Phase (entnommen aus FLEISCHER 2006) - Zeitabhängiger Verlauf der Herbizidkonzentration während der Adsorption an Kiefernadeln in parallelen Versuchsansätzen (vergleiche Abschnitt 4.3.2.1)

Für einige Stoffe konnten exponentielle Konzentrationsabnahmen mit der Einstellung eines Gleichgewichtes beobachtet werden (Abbildung 19).

Dieser Konzentrationsverlauf lässt sich durch folgende Funktion beschreiben:

$$c = a \cdot \exp(-k \cdot t) + b \quad (\text{Gleichung 5.1})$$

Parameter **b** der Funktion stellt die Gleichgewichtskonzentration der wässrigen Phase dar.

Andere Stoffe hingegen zeigten eine schnelle exponentielle Konzentrationsabnahme mit einer im weiteren Versuchsablauf stetig fallenden Konzentration (Abbildung 20). Für diese Stoffe wurde angenommen, dass eine schnelle exponentielle Konzentrationsabnahme (vermutlich verursacht durch eine schnelle Adsorption der Stoffe aus der wässrigen Phase an die Nadeloberfläche) von einem weiteren Transportprozess (vermutlich die Permeation der Stoffe durch die epikutikuläre Wachsschicht oder die gesamte Kutikula) überlagert wird.

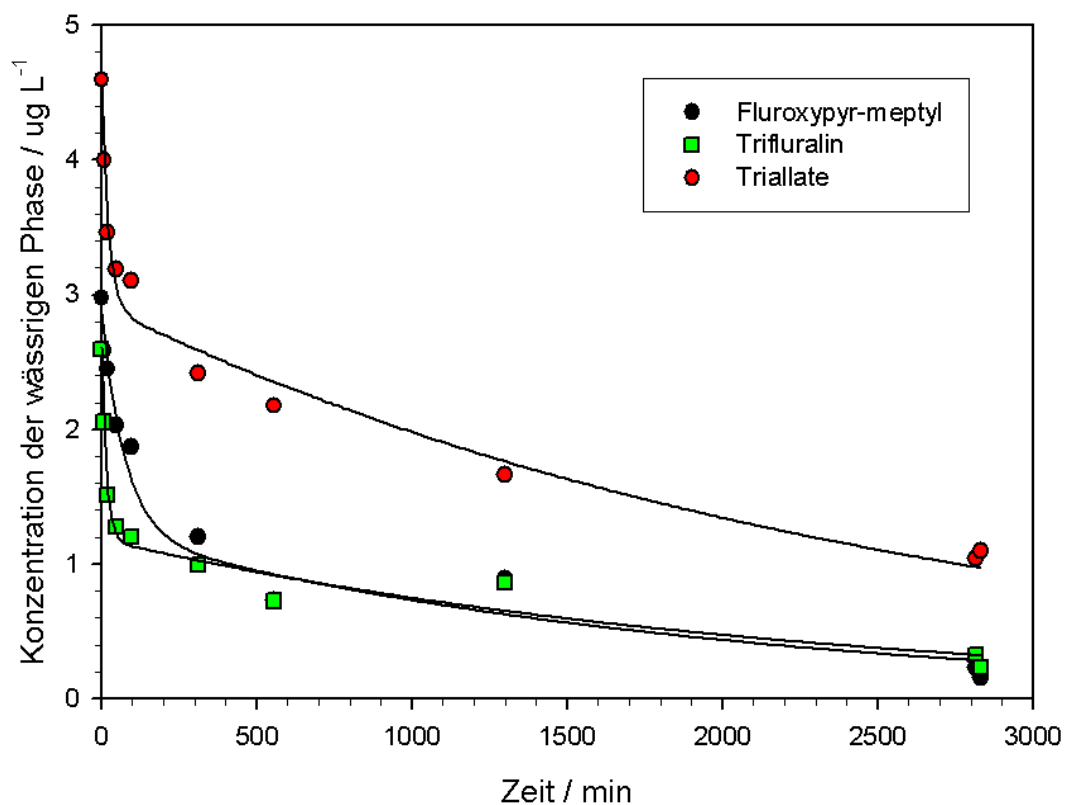


Abbildung 20: biexponentielle Konzentrationsverläufe im Verteilungsversuch mit intakten Kiefernadeln in der wässrigen Phase (entnommen aus FLEISCHER 2006)

- Zeitabhängiger Verlauf der Herbizidkonzentration während der Adsorption an Kiefernadeln in parallelen Versuchsansätzen (vergleiche Abschnitt 4.3.2.1)

Dieser langsamere Transportprozess ist für die weitere Abnahme der in der wässrigen Phase gemessenen Konzentration verantwortlich. Für die Auswertung dieser Daten wurde somit angenommen, dass sich ein schneller exponentieller Prozess und ein langsamer exponentieller Prozess der Konzentrationsabnahme überlagern.

Der Konzentrationsverlauf dieser angenommenen Vorgänge kann durch folgende biexponentielle Funktion beschrieben werden:

$$c = a \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + b \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (\text{Gleichung 5.2})$$

Für Stoffe, die eine Gleichgewichtseinstellung und damit nur einen einfach exponentiellen Konzentrationsverlauf zeigen, ist diese Funktion auch gültig: In diesem Fall wird die zweite Geschwindigkeitskonstante ( $k_2$ ) sehr klein, der Term  $(-k_2 \cdot t)$  geht somit gegen 0. Das bedeutet, dass der Parameter  $b$  mit 1 multipliziert wird. Der Parameter  $b$  steht dann auch in diesem Fall, genauso wie oben für die einfach exponentiellen Konzentrationsabnahme beschrieben, für die Gleichgewichtskonzentration in der wässrigen Phase.

Ein einfach exponentieller Verlauf wurde angenommen, wenn die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  so niedrig ist, dass sich die aus ihr errechneten Lebensdauern  $\tau$  in einem Zeitrahmen bewegen, der um ein Vielfaches über die Dauer der Verteilungsversuche hinausgeht. Das ist für  $k_2 < 10^{-4}$  der Fall. Die Lebensdauer errechnet sich aus:

$$\tau = 1 / k \quad (\text{Gleichung 5.3})$$

Um die Parameter und Geschwindigkeitskonstanten der oben genannten biexponentiellen Funktion zu ermitteln wurde mit dem Programm NLREG (Nonlinear Regression Analysis Program V. 4.1) eine Regressionsanalyse der Datenpaare Konzentration und Zeitintervalle aus den Verteilungsversuchen vorgenommen. Um redundante Variablen in der Regressionsanalyse zu eliminieren wurde die unabhängige Variable  $a$  in Gleichung 5.2 ersetzt durch:

$$a = c_0 - b \quad (\text{Gleichung 5.4})$$

In diesem Fall ist  $c_0$  die bekannte Anfangskonzentration zum Zeitpunkt 0 im Verteilungsversuch.

Die Regressionsanalyse wurde logarithmisch gewichtet vorgenommen, für die Berechnung der Ausgleichsfunktion zu den gemessenen Datenpaaren (Zeit und Konzentration) wurde dem Programm folgende Funktion vorgegeben:

$$\ln c = \ln[(c_0 - b) \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + b \cdot \exp(-k_2 \cdot t)] \quad (\text{Gleichung 5.5})$$

dabei ist:	c	berechnete Konzentration in $\mu\text{g/l}$
	$c_0$	gemessene Anfangskonzentration in $\mu\text{g/l}$
	$k_1$	Geschwindigkeitskonstante: schnelle Konzentrationsabnahme bzw. Adsorption an die Nadeloberfläche
	$k_2$	Geschwindigkeitskonstante: langsame Konzentrationsabnahme bzw. Transport in der Kutikula
	t	Zeit
	b	Gleichgewichtskonzentration für einfach exponentiellen Konzentrationsverlauf, angenommene Gleichgewichtskonzentration für doppelt exponentiellen Verlauf (siehe Abschnitt 5.1.2)

### 5.1.2 Berechnung von Verteilungskoeffizienten

Aus den in den Verteilungsversuchen ermittelten Daten wurden Verteilungskoeffizienten zwischen der wässrigen Phase und

- rekonstituierten epikutikulären Wachsen (Verteilungsversuch Abschnitt 4.3.1)
- intakten Waldkiefernadel bezogen auf den Gehalt an epikutikulären Wachsen (Verteilungsversuche Abschnitte 4.3.2.1 und 4.3.2.2)

berechnet.

Betrachtet man diese Verteilungskoeffizienten als analog zum Oktanol-Wasserverteilungskoeffizienten, repräsentieren die epikutikulären Wachse die organische Phase (Oktanol-Phase).

Bei der Berechnung von Verteilungskoeffizienten ist die Kenntnis der Konzentrationen im Gleichgewicht mindestens für eine der Phasen (wässrige Phase oder organische Phase) notwendig.

Für die oben beschriebenen einfach exponentiellen Konzentrationsverläufe ist die Gleichgewichtskonzentration in der wässrigen Phase bereits aus der grafischen Darstellung offensichtlich. Im Hinblick auf die im Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Funktionen handelt es sich um den Parameter **b**, der sich wie im vorangegangenen Abschnitt berechnen lässt.

Das trifft sowohl auf die Gleichung 5.1 als auch auf die Gleichung 5.5 zu, für biexponentielle Konzentrationsverläufe ist folgende Besonderheit zu beachten:

Bei den biexponentiellen Konzentrationsverläufen stellte sich kein Gleichgewicht ein.

Um eine näherungsweise Berechnung von Verteilungskoeffizienten zu ermöglichen, wurde angenommen, dass die Gleichgewichtskonzentration anhand des Parameters **b** der Gleichung 5.5 abgeschätzt werden kann. Dieser entspricht der berechneten Anfangskonzentration des zweiten exponentiellen Terms ( $\mathbf{b} \cdot \exp(-\mathbf{k}_2 \cdot \mathbf{t})$ ) in den oben genannten biexponentiellen Funktionen (Gleichung 5.2 und 5.5) und beschreibt den Extrempunkt mit der größten Krümmung im Konzentrationsverlauf der Stoffe in Abbildung 20.

Wenn sich jedoch im Experiment eine im Vergleich zu  $\mathbf{k}_1$  relativ große Geschwindigkeitskonstante  $\mathbf{k}_2$  und damit ein schneller zweiter Transportprozess nach der Adsorption beobachten lässt (der angenommene Weitertransport des Stoffes durch die Kutikula), führt die Annahme

$\mathbf{b}$  = Gleichgewichtskonzentration

zu einer Überschätzung der Konzentration in der wässrigen Phase und damit einer Unterschätzung des Verteilungskoeffizienten.

Dies wurde allerdings in Kauf genommen, da der Parameter  $\mathbf{b}$  im Konzentrationsverlauf den einzigen definierte Punkt darstellt, auf den eine Abschätzung Bezug nehmen kann.

Alternativ hätte ein willkürlich gewählter Zeitpunkt und die dafür berechnete Konzentration gewählt werden können, um die angenommene Gleichgewichtskonzentration abzuschätzen. Dies führt aber je nach Konzentrationsverlauf der Stoffe zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die geschätzte Gleichgewichtskonzentration wäre dann letztendlich nur vom

willkürlich festgelegten Zeitpunkt abhängig. Diese Vorgehensweise wurde für die Berechnung von Verteilungskoeffizienten nicht angewendet.

Die Verteilungskoeffizienten zwischen wässriger Phase und rekonstituierten epikutikulären Wachsen beziehungsweise wässriger Phase und intakten Nadeln wurden wie folgt anhand der tatsächlichen oder wie oben abgeschätzten Gleichgewichtskonzentration berechnet:

$$K_{\text{WachsW}} = \frac{C_{\text{Wachs}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{(m_0 - m_G) / m_{\text{Wachs}}}{b}$$

(Gleichung 5.6)

dabei ist:	$c_{\text{Wachs}}$	Herbizidkonzentration im Wachs
	$c_{\text{H}_2\text{O}}$	Herbizidkonzentration in der wässrigen Phase
	$K_{\text{WachsW}}$	Verteilungskoeffizient: wässrige Phase / Wachs
	$m_0$	Masse der Herbizide in der wässrigen Phase zum Zeitpunkt $t = 0$ in [ng]
	$m_G$	Masse der Herbizide in der wässrigen Phase im Gleichgewichtszustand in [ng]
	$m_{\text{Wachs}}$	Masse der epikutikulären Wachse
	$b$	Gleichgewichtskonzentration für einfach exponentiellen Konzentrationsverlauf, angenommene Gleichgewichtskonzentration für doppelt exponentiellen Verlauf (siehe oben)

## 5.2 Probenvorbereitung und Analytik

Im folgenden Abschnitt wird das im Abschnitt 4.1.6 beschriebene Verfahren zur Probenvorbereitung von

- Extrakten der epikutikulären Wachse,
- Extrakten der nach der Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln
- der in den Verteilungsversuchen untersuchten wässrigen Phase



und die zur Analytik des Isoproturons und seiner Abbauprodukte verwendete HPLC-MS Methode bewertet.

Die Probenaufreinigung nach Abschnitt 4.1.6 hatte eine hohe Effektivität bei der Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Pflanzenproben. Die nach Anreicherung/Aufreinigung durch Festphasenextraktion mittels HPLC-MS vermessenen Probelösungen in Wasser/Acetonitril (75/25 % v/v) wiesen keine unlöslichen Bestandteile auf und waren im Extremfall (Extrakte der Kiefernnadeln) nur leicht gelblich gefärbt. Deshalb waren an den Elektroden des LC-MS Interface auch nach mehreren hundert vermessenen Proben keine Verschmutzungen sichtbar. Das Massenspektrometer zeigte kaum eine Abnahme der Messempfindlichkeit und musste bei ähnlichem Probendurchsatz viel seltener für Reinigungsarbeiten heruntergefahren werden, als dies zum Beispiel bei den in der Arbeitsgruppe Umweltchemie ebenfalls verwendeten GC-MS Geräten der Fall war. Die nach Abschnitt 4.1.6 aufgereinigten Proben führten kaum zu relevanten Ablagerungen an der Vorsäule des HPLC-Systems, alle Proben wurden durchgehend mit derselben analytischen Säule vermessen.

Im Hinblick auf die Aufreinigung von Pflanzenextrakten weisen die Arbeitsschritte „Ausfrieren der Wachse“ (Abschnitt 4.1.6.1) und das im selben Abschnitt beschriebene Verdünnen mit Reinstwasser vor der Anreicherung mittels Festphasenextraktion an LiChrolut EN 200 mg Kartuschen eine hohe Effektivität auf:

- Im Rahmen der Diplomarbeit von Ann-Kathrin Stark wurde festgestellt, dass durch das Ausfrieren in Acetonitril bereits 50 % der epikutikulären Wachse aus der Probe entfernt werden (STARK 2007).
- Durch das Verdünnen mit Reinstwasser in den folgenden Arbeitsschritten (vergleiche Abschnitt 4.1.6.1) fallen die organischen Verunreinigungen als feinste Partikel aus. Diese Partikel sind so fein, dass sie nicht von den Filterfritten oder im Bett der Festphasenextraktionskartuschen zurückgehalten werden und im Anreicherungsschritt die Kartusche passieren. Die Flüssigkeit zeigt vor dem Anreichern an der Festphasenextraktionskartusche und nach dem passieren kaum eine Änderung in der Farbintensität (Abbildung 21, für die Aufnahme wurde die Flüssigkeit nach der Anreicherung an der Kartusche nicht verworfen sondern in einer 100 ml Schraubflasche aufgefangen). Gleichzeitig werden die untersuchten Analyte mit guten Wiederfindungen am Festphasenextraktionsmaterial angereichert, dies zeigen die Ergebnisse der Diplomarbeit von Angelika Klugkist und die im Abschnitt 5.2 für Iso-

proturon ermittelten Wiederfindungen. Die untersuchten Abbauprodukte weisen allerdings zum Teil niedrige Wiederfindungen in den Extrakten der Nadeln auf (Tabelle 5), was für diese komplexe Probenmatrix vermutlich auf die Signalsuppression des LC-MS zurückzuführen ist: Es konnte nur für Isoproturon ein deuterierter interner Standard bezogen werden.

Noch im Anreicherungsschritt auf der LiChrolut EN - Festphasenextraktionskartusche verbliebene Verunreinigungen werden für die Proben aus den Extrakten der epikutikulären Wachse und der Kiefernnadeln im Elutionsschritt mit der verwendeten Aminopropyl-Festphasenextraktionskartusche abgetrennt (Arbeitsschritt „Elution“ im Abschnitt 4.1.6.1).



Abbildung 21: Zwei mit Reinstwasser verdünnte Extrakte aus Kiefernnadeln, vor und nach passieren einer LiChrolut EN 200 mg Kartusche

### Kalibration und Wiederfindungen

Für die Bestimmung der Konzentrationen der Proben, die in den im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Verteilungsversuchen erzeugt wurden, wurde die Kalibration in Abbildung 22 für Isoproturon und die untersuchten Abbauprodukte verwendet.

Folgende Stoffe wurden untersucht:

- Isoproturon
- 2-hydroxy-IPU (N'-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-N,N-dimethylurea)

- 2-hydroxy-monodesmethyl-IPU (N-[4-(2-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-N'-methylurea)
- 1-hydroxy-monodesmethyl-IPU (N-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-N'-methylurea)
- di-desmethyl-IPU (1-(4-Isopropylphenyl)urea)
- monodesmethyl-IPU (1-(4-Isopropylphenyl)-3-methylurea)

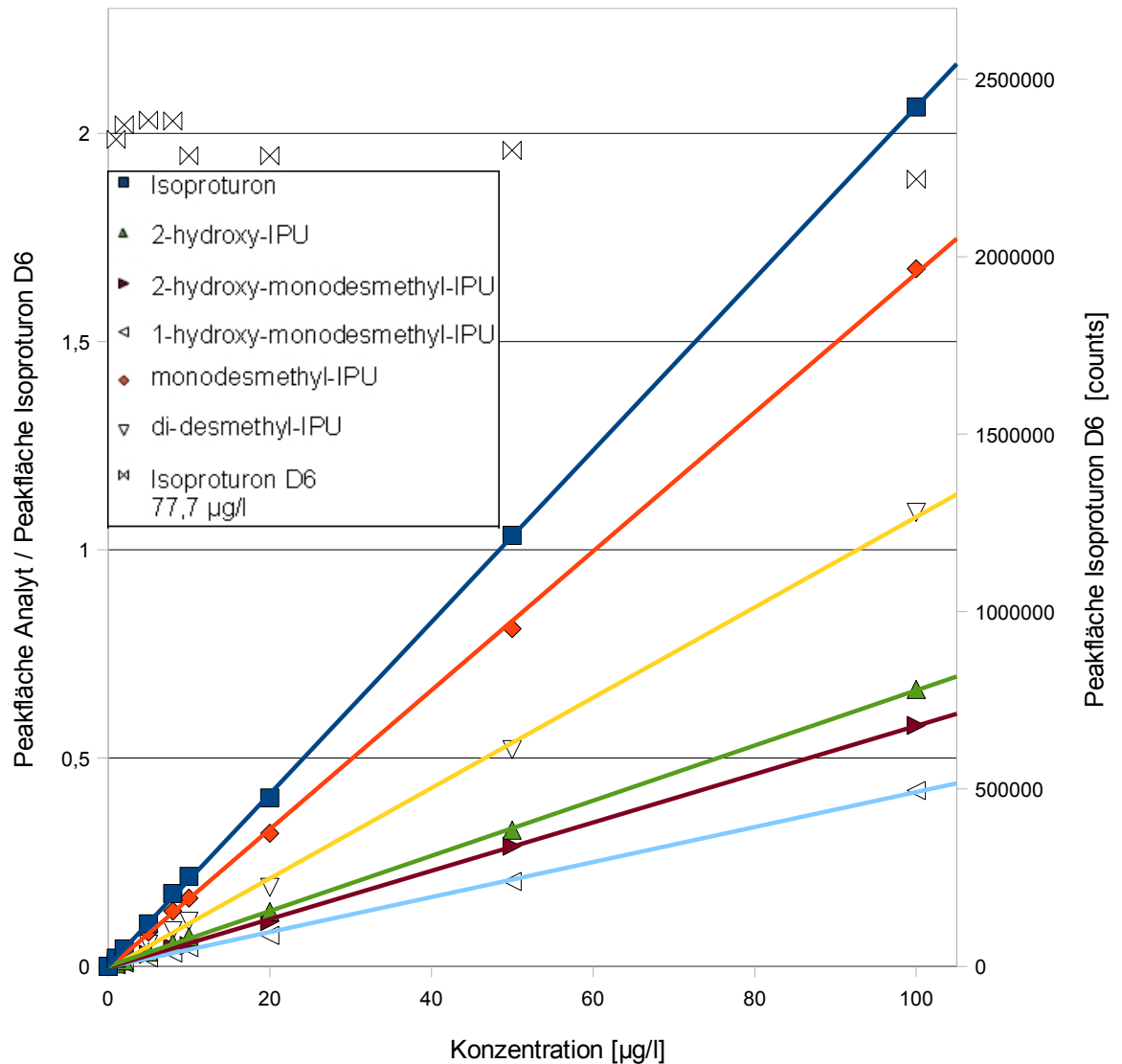


Abbildung 22: Kalibriergeraden Isoproturon und seine Abbauprodukte  $c = 1 - 100 \mu\text{g/l}$

- Ordinate: Konzentration in den Kalibrierlösungen, rechte Abszisse: Peakfläche des internen Standards Isoproturon D6, linke Abszisse: Quotient der gemessenen Peakflächen der Analyten und des internen Standards Isoproturon D6 in den jeweiligen Kalibrierlösungen

Die Signalstärke des deuterierten internen Standards Isoproturon D6 wurde für alle untersuchten Analyte zum Ausgleich der Empfindlichkeitsschwankungen des Massenspektrometers berücksichtigt. Abbildung 22 zeigt die Kalibriergeraden der Analyte und die Signalstärke des internen Standards bei der Vermessung der Kalibrierlösungen.

*Tabelle 4: Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß der Kalibration des Isoproturons und seiner Abbauprodukte*

- *y*: Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des internen Standards Isoproturon D6

Analyt	Gleichung	R <sup>2</sup>
Isoproturon	$y=0,02062x+0,00185$	0,9999
2-hydroxy-IPU	$y=0,00662x+0,00063$	0,9999
2-hydroxy-monodesmethyl-IPU	$y=0,00534x+0,00026$	0,9971
1-hydroxy-monodesmethyl-IPU	$y=0,00437x-0,00077$	0,9943
di-desmethyl-IPU	$y=0,01090x-0,00140$	0,9996
monodesmethyl-IPU	$y=0,01607x+0,00071$	0,9995

Für die genannten Stoffe wurden für alle in den Verteilungsversuchen im Abschnitt 4.3.3-anfallenden Matrices (wässrige Phase, epikutikuläre Wachsextrakte, nach der Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibende Nadeln) wie im Abschnitt 4.3.3.2 beschrieben, Wiederfindungen bestimmt. Die jeweiligen Proben wurden dafür mit 0, 5, 10, 50, 70 und 100 ng je Analyt aufgestockt. Wie im genannten Abschnitt beschrieben, bezieht sich die Aufgestockte Menge auf jeweils 1 g Frischgewicht der verarbeiteten Nadeln.

Der interne Standard Isoproturon D6 wurde erst nach dem Probenanreicherungs- und Aufreinigungsverfahren, bei der Aufnahme der eingeengten Festphasenextraktionseluate in die Injektionslösung zu den Proben dosiert und damit nur für die Korrektur der Empfindlichkeitsschwankungen des LC-MS verwendet. Die Wiederfindungen zeigten in dem oben genannten Konzentrationsbereich für alle Analyte einen linearen Verlauf. Tabelle 5 nennt die durchschnittlichen Wiederfindungen je Analyt und Probenmatrix.

*Tabelle 5: Wiederfindungen von Isoproturon und seiner Abbauprodukte in den untersuchten Probenmatrices*

	wässrige Phase	epikutikuläre Wachse	verbleibende Nadeln
Isoproturon	109%	104%	78%
2-hydroxy-IPU	106%	103%	42%
2-hydroxy-monodesmethyl-IPU	102%	100%	52%
1-hydroxy-monodesmethyl-IPU	105%	97%	42%
di-desmethyl-IPU	118%	103%	71%
monodesmethyl-IPU	114%	112%	94%

Es fällt auf, dass die Wiederfindungen der Abbauprodukte im Vergleich zu Isoproturon sehr gering ausfallen, das gilt vor allem für die hydroxy-Produkte, die zu Beginn des HPLC-Gradienten eluieren (Abbildung 23).

Es wird angenommen, dass die Korrektur der Signalsuppression im Electro-spray Interface durch den deuterierten Standard Isoproturon D6 am besten für Isoproturon und die Abbauprodukte ist, die mit der geringsten Differenz in der Retentionszeit zum internen Standard eluieren. Signalsuppressionen, die zu anderen Retentionszeiten des Gradienten als die Retentionszeit des internen Standards durch Co-eluierende Matrixbestandteile verursacht wer-

den, können nicht durch die Messung des internen Standards in vollem Maße erfasst werden.

Abbildung 23 zeigt das Chromatogramm einer 5 ng/ml Kalibrationslösung in Reinstwasser/Acetonitril (75/25 % v/v). Die Probe wurde mit der im Anhang Abschnitt 8.2 angegebenen Methode vermessen. Im Chromatogramm ist das Signal der Molekülmasse (+1) je Analyt (protoniertes Molekül) dargestellt. Die Messempfindlichkeit konnte durch die im Abschnitt 4.2 beschriebene Optimierung der Interface-Spannungen auf ein für ein single-Quadrupol LC-MS hohes Maß gesteigert werden.

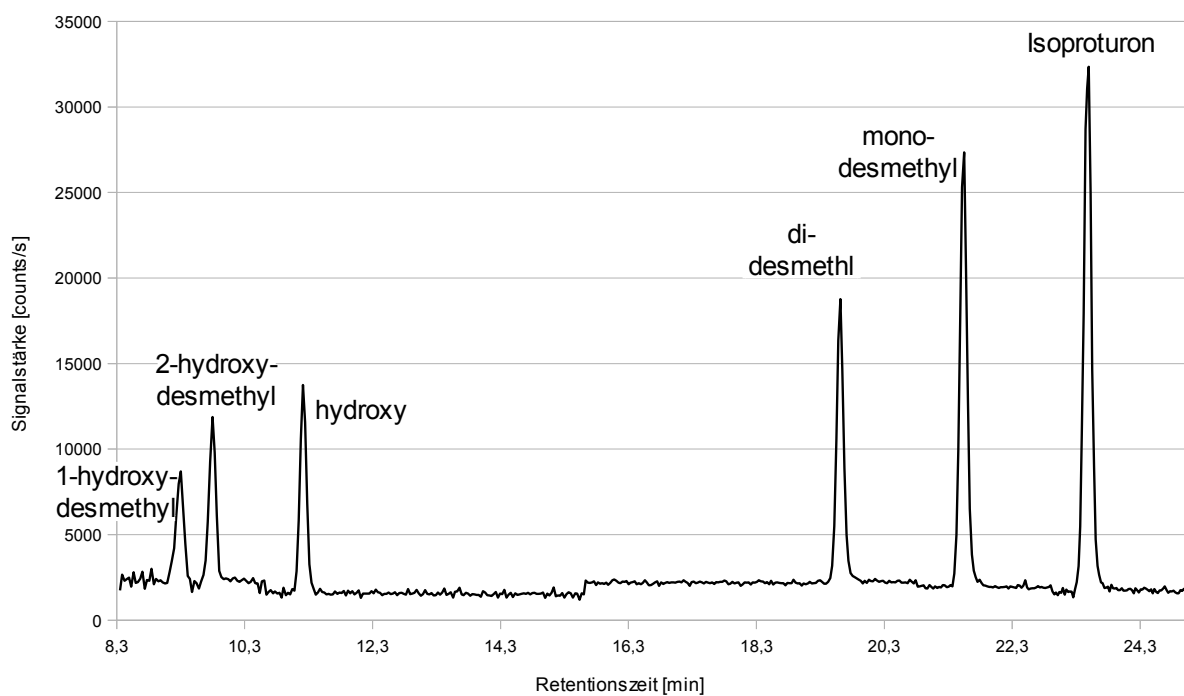


Abbildung 23: Chromatogramm einer Kalibrierlösung, Isoproturon und seine Abbauprodukte  $c = 5 \text{ ng/ml}$

- Kurznamen im Chromatogramm:

*hydroxy: 2-hydroxy-Isoproturon, 2-hydroxy-desmethyl: 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon, 1-hydroxy-desmethyl: 1-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon, di-desmethyl: di-desmethyl-Isoproturon, mono-desmethyl: monodesmethyl-Isoproturon*

Die Wiederfindungen in der wässrigen Phase der Verteilungsversuche und in den Extrakten der epikutikulären Wachsschicht zeigten gute Ergebnisse, die Chromatogramme weisen wenige Überlagerungen durch Nebenpeaks auf. Abbildung 24 zeigt die Chromatogramme der mit jeweils 5 ng aufgestockten wässrigen Phase und der epikutikulären Wachsschicht für die jeweiligen Molekülmassen +1.

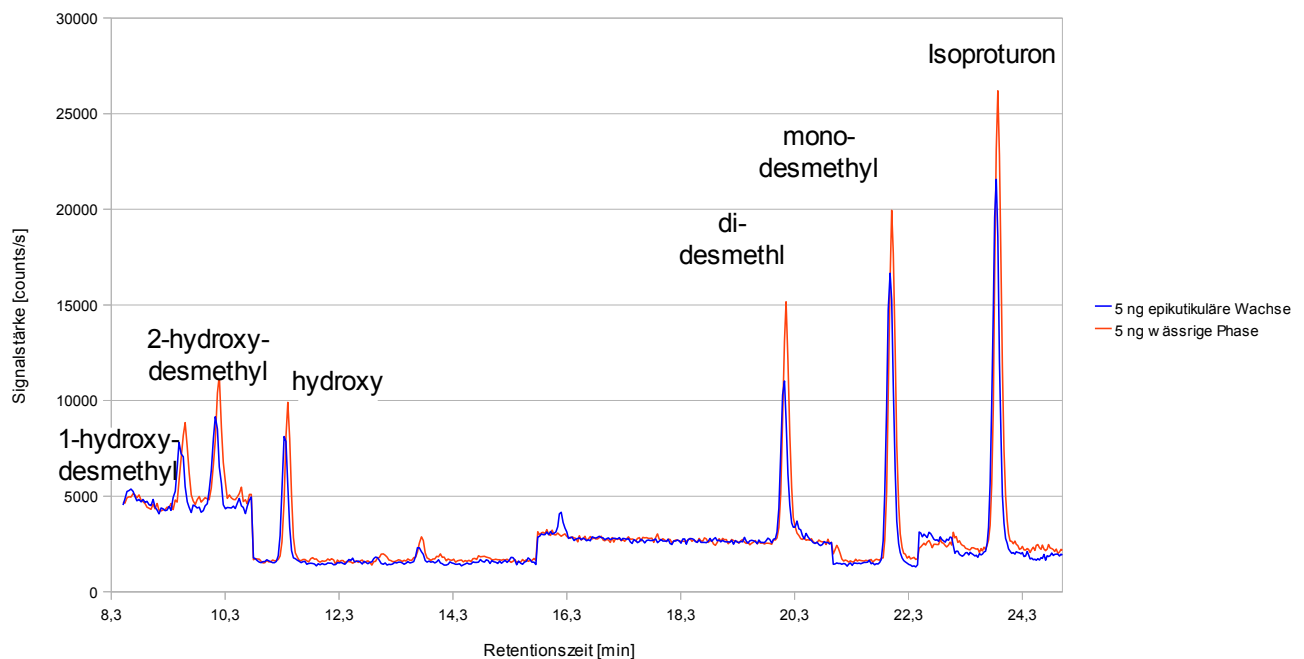


Abbildung 24: Chromatogramme der mit 5ng aufgestockten epikutikulären Wachse und der wässrigen Phase in den Verteilungsversuchen

*Kurznamen im Chromatogramm:*

*hydroxy: 2-hydroxy-Isoproturon, 2-hydroxy-desmethyl: 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon, 1-hydroxy-desmethyl: 1-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon, di-desmethyl: di-desmethyl-Isoproturon, mono-desmethyl: monodesmethyl-Isoproturon*

Für die Analyse der nach der Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln (in Abbildung 25 kurz als „Restnadeln“ bezeichnet) erwies sich das verwendete single-Quadrupol LC/MS als wenig selektiv. Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm des für die

Bestimmung der Wiederfindung mit 50 ng Isoproturon und seiner Abbauprodukte aufgestockten Probe und das Chromatogramm des Blindwertes.

Erkennbar sind viele Nebenpeaks, auch der Blindwert weist Peaks mit derselben Retentionszeit wie die Analyte auf. Weitere Blindwertbestimmungen für Restnadeln während der Verteilungsversuche zeigten darüberhinaus, dass die Signalstärke und Zusammensetzung der Verunreinigungen im Chromatogramm schwankt und von Faktoren wie der Kontaktdauer der Nadeln mit der herbizidfreien wässrigen Phase abhängig ist.

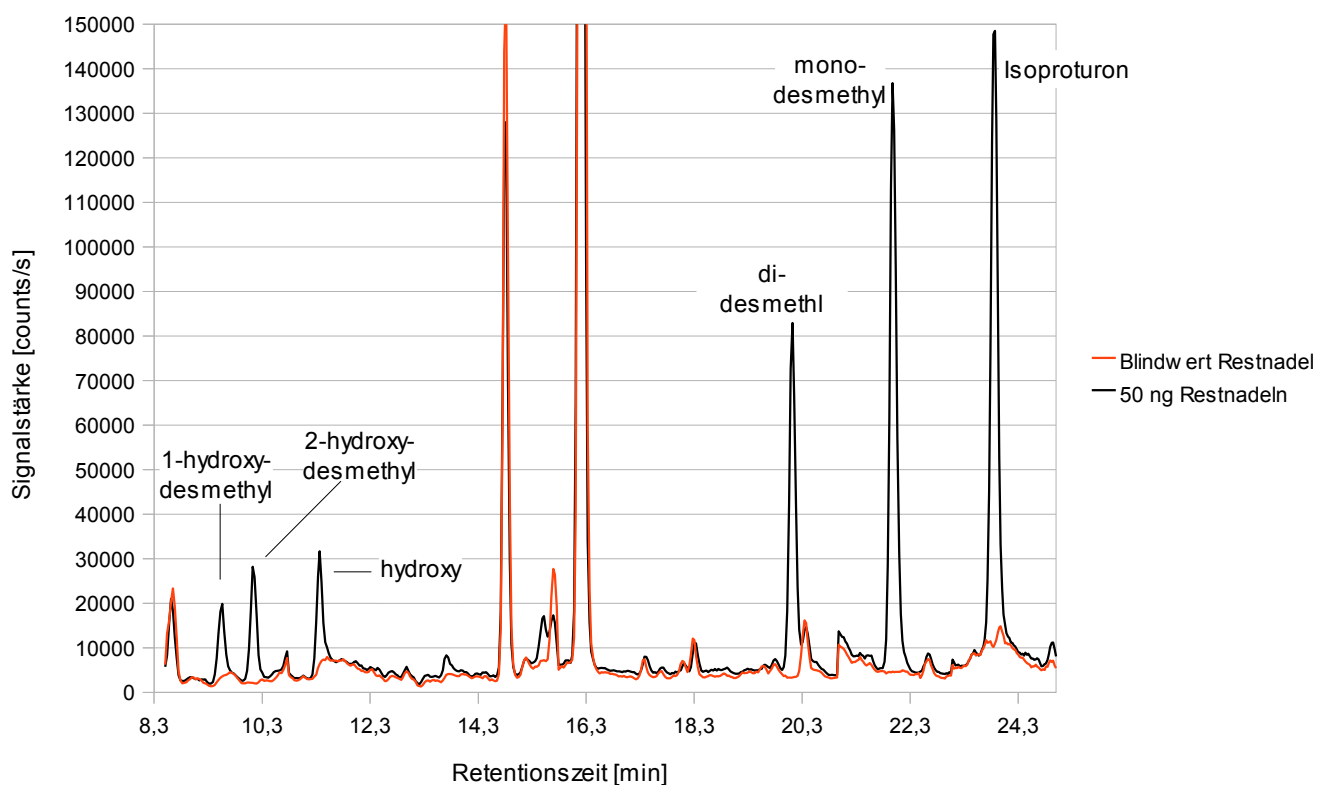


Abbildung 25: Chromatogramme der mit 50 ng aufgestockten Restnadeln und des Blindwertes

*Kurznamen im Chromatogramm:*

*hydroxy: 2-hydroxy-Isoproturon, 2-hydroxy-desmethyl: 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon, 1-hydroxy-desmethyl: 1-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon, di-desmethyl: di-desmethyl-Isoproturon, mono-desmethyl: monodesmethyl-Isoproturon*



Anhand der Signal-Rauschverhältnisse (S/R) der Chromatogramme in den für die Wiederfindung untersuchten Proben (Abschnitt 4.3.3.2) und der im Rahmen der Verteilungsversuche gemessenen Blindwert wurden Nachweisgrenzen (S/R = 3) und Bestimmungsgrenzen (S/R = 10) abgeschätzt (Tabelle 6). Diese gelten für die in den im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Verteilungsversuch anfallenden Probenmatrices wässrige Phase, epikutikuläre Wachsextrakte und nach der Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibende Nadeln (Restnadeln).

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Grenzen sind in der Einheit ng angegeben und beziehen sich auf die im untersuchten Kompartiment enthaltene Masse des Stoffes: In dem im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Verteilungsversuch ist das Volumen der wässrigen Phase 25 ml. Die untersuchte Nadelmenge beträgt 1 g (Frischgewicht). Der Anteil der epikutikulären Wachse ist durchschnittlich 5,5 mg/g Kiefernnadeln (Frischgewicht).

Es wurden auf 1 g Nadeln (Frischgewicht) 138 ng Isoproturon durch Benetzen mit der Herbizidlösung appliziert. Bezogen auf diese zum Startzeitpunkt des Verteilungsversuchs aufgebrauchte Masse an Isoproturon sind die Nachweisgrenzen in Tabelle 6 in % angegeben.

*Tabelle 6: Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) der in den Verteilungsversuchen (Abschnitt 4.3.3) untersuchten Analyten*

*- Angegebene Grenzen in [ng] und [%] der applizierten Dosis in den Kompartimenten wässrige Phase, epikutikuläre Wachse und Restnadeln*

		2-hydroxy-monodes-methyl-IPU		1-hydroxy-monodes-methyl-IPU		2-hydroxy-IPU		di-desmethyl-IPU		mono-desmethyl-IPU		Isoproturon	
		[ng]	[%]	[ng]	[%]	[ng]	[%]	[ng]	[%]	[ng]	[%]	[ng]	[%]
Wässr. Phase	NG	2,0	1,4	1,5	1,1	0,70	0,50	0,50	0,36	0,40	0,30	0,30	0,21
	BG	6,7	4,8	5,0	3,6	2,3	1,7	1,7	1,2	1,3	1,0	1,0	0,66
Epikut. Wachs	NG	2,5	1,8	2,0	1,4	1,0	0,70	0,70	0,50	0,50	0,36	0,40	0,30
	BG	8,3	6,0	6,7	4,8	3,3	2,3	2,3	1,7	1,7	1,2	1,3	1,0
Restnadel	NG	15	11	10	7,2	10	7,2	8,0	5,8	5,0	3,6	10	7,2
	BG	50	36	33	24	33	24	27	19	17	12	33	24

## **5.3 Modellversuche zur Adsorption/Desorption und zum Herbizidtransport in Kiefernnadeln**

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der im Abschnitt 4.3 beschriebenen Verteilungsversuche dargestellt. In diesen Versuchen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- die Adsorption/Desorption von Herbiziden aus wässrigen Lösungen an rekonstituierten epikutikulären Wachsen (Abschnitt 4.3.1) und
- intakten Kiefernnadeln (Abschnitte 4.3.2.1 und 4.3.2.2)
- das Transportverhalten von Isoproturon und seinen Abbauprodukten nach Spraydrift in der epikutikulären Wachsschicht, verbunden mit der Auswaschung von Driftrückständen durch Niederschläge (Abschnitte 4.3.3.1-4.3.3.4)
- der Einfluss der Mechanismen Volatilisation und Translokation auf den Verbleib von Driftrückständen auf Kiefernnadeln (Abschnitte 4.3.3.6 und 4.3.3.7)

### **5.3.1 Rekonstituiertes epikutikuläres Wachs und wässrige Phase: Adsorption - Desorption**

Es wurde die Adsorption und nachfolgende Desorption des Wirkstoffs Terbutylazin aus einer Lösung in Reinstwasser ( $c = 700 \mu\text{g/l}$ ) an rekonstituiertem epikutikulärem Wachs bestimmt. Der Versuch wurde mit HPLC-Vials durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.1), die mit dem rekonstituierten epikutikulären Wachs beschichtet waren und direkt während der Versuchsdauer mittels HPLC-MS vermessen wurden. Die Vials waren mit einer Schicht aus 3 mg rekonstituiertem Wachs belegt. Das Volumen der wässrigen Phase betrug 1,5 ml.

Es wurde der in Abbildung 26 dargestellte Konzentrationsverlauf ermittelt.

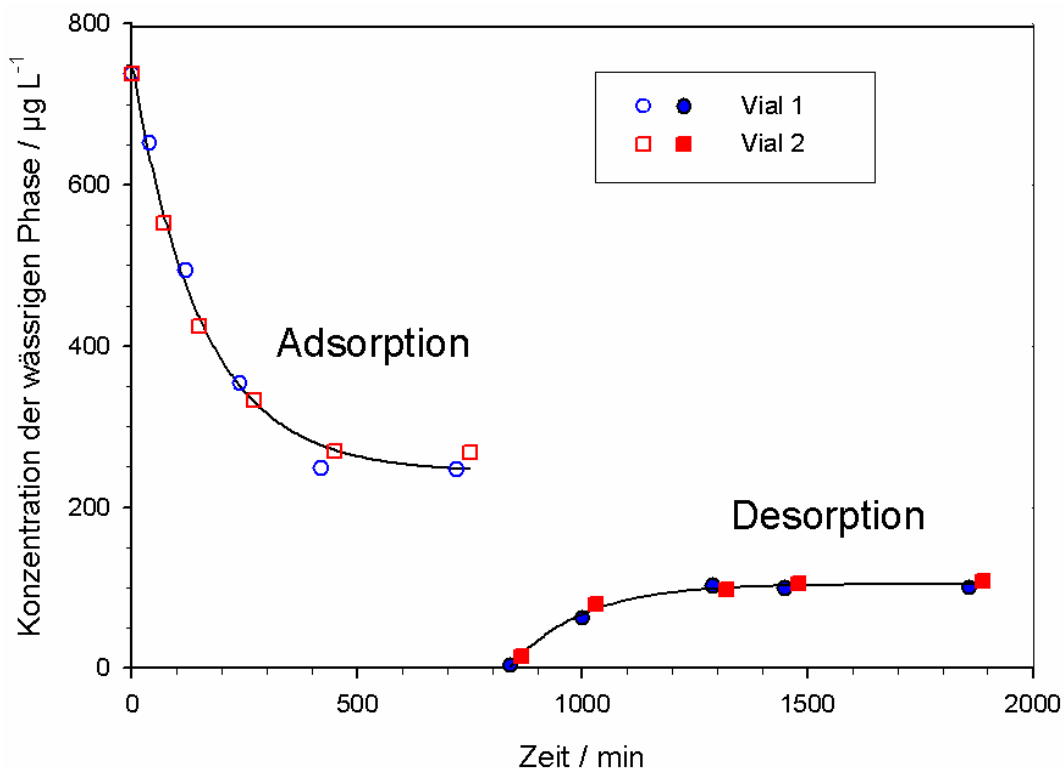


Abbildung 26: Adsorption und Desorption von Terbutylazin in wässriger Lösung an rekonstituierte epikutikuläre Wachse (entnommen aus FLEISCHER 2006)

Die Datenpunkte Vial 1 und Vial 2 resultieren aus der Konzentrationsbestimmung der wässrigen Phase für zwei auf die selbe Weise mit den rekonstituierten Wachsen beschichteten Vials (siehe Abschnitt 4.3.1). Jeder Datenpunkt stellt eine Injektion im HPLC-MS System und damit eine Einfachbestimmung dar.

Aus den Gleichgewichtskonzentrationen (ermittelt durch die im Abschnitt 5.1 .1 beschriebene Regressionsanalyse) wurde nach der Vorgehensweise in Abschnitt 5.1.2 der Verteilungskoeffizient zwischen rekonstituiertem epikutikulärem Wachs und wässriger Phase berechnet ( $K_{\text{WachsW}}$ ). Für die Regressionsanalyse wurde bei dem in Abbildung 26 gezeigten Konzentrationsverlauf eine einfach exponentielle Konzentrationsabnahme beziehungsweise Zunahme zugrundegelegt.

Für die Adsorption des Terbutylazins ( $\log K_{\text{OW}} = 3.21$ , TOMLIN 2003) an das rekonstituierte Wachs wurde der  $\log K_{\text{WachsW}} = 3.0$  bestimmt.

Für die Desorption betrug der  $\log K_{\text{WachsW}} = 3.3$

Die begleitend vermessene Kontrolle einer Terbuthylazinlösung ( $c = 700 \mu\text{g/l}$ ) in Reinstwasser ohne epikutikuläre Wachse zeigte keinen Abbau des Wirkstoffs über die Versuchsdauer.

Die Messung der herbizidfreien wässrigen Phase (Reinstwasser) in einem mit epikutikulären Wachsen beschichteten Vial ergab keinen messbaren Gehalt für Terbuthylazin.

### **5.3.2 Verteilungsversuch mit 13 lipophilen Herbiziden - parallele Ansätze der wässrigen Phase**

Es wurden von den in Abschnitt 3.9 genannten Herbiziden die folgenden 13 Stoffe untersucht, für die auf Grund des hohen  $\log K_{ow}$  (4,0 - 5,4) ein ebenfalls hoher Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient erwartet wurde:

Aclonifen, Haloxyfop-ethoxyethyl, Bromoxynil-octanoat, Fluroxypyr-meptyl, Trifluralin, Triallate, Pendimethalin, Diflufenican, Picolinafen, Bifenox, Quizalofop-p-ethyl, Pyridate, Propaquizafop.

Der Konzentrationsverlauf der Herbizide in der wässrigen Phase während der Adsorption an intakte Kiefernadeln wurde nach ansteigenden Zeitintervallen ermittelt. Es wurden parallele Ansätze von jeweils 100 ml wässriger Phase und 4 g Kiefernadeln (Frischgewicht) verwendet (Abschnitt 4.3.2.1).

Anhand der Konzentrationsverläufe (Übersicht in Anhang Abschnitt 8.3) wurden, wie im Abschnitt 5.1 beschrieben, Geschwindigkeitskonstanten und Verteilungskoeffizienten berechnet (Tabelle 7). Für die Mehrzahl der Stoffe wurde eine biexponentielle Konzentrationsabnahme beobachtet und deshalb die in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Mechanismen einer schnellen Adsorption an die auf der Nadeloberfläche befindlichen epikutikulären Wachse (Geschwindigkeitskonstante  $k_1$ ) und ein langsamer Weitertransport durch die Kutikula (Geschwindigkeitskonstante  $k_2$ ) angenommen.

Mit dem in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Extraktionsverfahren wurde ein Gehalt an epikutikulären Wachsen von 5,5 mg/g Frischgewicht ermittelt. Die Berechnung der Verteilungskoeffizienten erfolgte auf Grund dieses Wachsgehaltes anhand der im Abschnitt 5.1.2 beschriebenen Vorgehensweise.

Da für die im Verteilungsversuch gemessenen Konzentrationsverläufe vermutet wurde, dass nicht allein die epikutikulären Wachse sondern auch die Beschaffenheit der Kutikula für die Transporteigenschaften verantwortlich ist, sind in Tabelle 7 die Verteilungskoeffizienten als Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{cw}$ ) bezeichnet.

*Tabelle 7: Intakte Kiefernadeln im parallelen Ansatz: Geschwindigkeitskonstanten und Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten*

	Geschwindigkeitskonstante $k_1$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Geschwindigkeitskonstante $k_2$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$\log K_{cw}$
Aclonifen	0,009	0,00005	3,6
Bifenox	0,026	0,00015	3,9
Bromoxynil-octanoat	0,295	0,00030	4,3
Diflufenican	0,236	0,00042	4,2
Fluroxypyr-meptyl	0,015	0,00056	3,8
Haloxyfop-ethoxyethyl	0,033	0,00002	3,6
Pendimethalin	0,071	0,00035	3,9
Picolinafen	0,075	0,00002	4,1
Propaquizafop	0,012	0,00061	4,0
Pyridate	0,247	0,00005	4,3
Quizalofop-ethyl	0,012	0,00053	4,0
Triallate	0,045	0,00039	3,4
Trifluralin	0,064	0,00046	3,7

Für Stoffe mit  $k_2 > 10^{-4}$  wurde angenommen, dass ein biexponentieller Konzentrationsverlauf und damit ein Weitertransport in das Nadelgewebe vorliegt. Abbildungen 19 und 20 im Abschnitt 5.1.1 zeigen Beispiele aus diesem Verteilungsversuch für einfach- und biexponentielle Konzentrationsverläufe in Konzentrationsbereichen zwischen 0,5 und 4,5  $\mu\text{g/l}$ .

Für die Nadeln, die im Adsorptionsschritt 1300, 2815 und 2830 Minuten mit der wässrigen Phase in Kontakt waren, wurde durch Zugabe einer herbizidfreien Pufferlösung der desorbierte Anteil nach 48 Stunden bestimmt. Das Ergebnis wurde qualitativ dahingehend ausgewertet, ob sich das Desorptionsverhalten abhängig von der Kontaktdauer der Kiefernadeln mit der Lösung unterscheidet: Für Wirkstoffe, die nach der langen Kontaktdauer von über 2800 Minuten in viel geringerem Maße desorbieren als nach 1300 Minuten Kontakt-

dauer wird angenommen, dass der Weitertransport durch die Kutikula der Nadeln irreversibel ist. Tabelle 8 listet die in der wässrigen Phase gemessenen Konzentrationen nach 48 Stunden Desorption in Abhängigkeit von der vorangegangenen Kontaktdauer der Nadeln während der Adsorption auf:

*Tabelle 8: Intakte Kiefernnadeln im parallelen Ansatz: Desorption in die wässrige Phase*

Kontaktdauer [min]	Konzentration in der wässrigen Phase [ $\mu\text{g/l}$ ]		
	1300	2815	2830
Aclonifen	0,51	0,47	0,54
Bifenox	0,35	0,34	0,36
Bromoxynil-octanoat	0,17	0,03	0,03
Diflufenican	0,12	0,01	0,01
Fluroxypyr-meptyl	0,16	0,03	0,03
Haloxyfop-ethoxyethyl	0,51	0,50	0,59
Pendimethalin	0,23	0,13	0,12
Picolinafen	0,40	0,26	0,28
Propaquizafop	0,11	n.n.	0,04
Pyridate	0,28	0,14	0,15
Quizalofop-ethyl	0,08	n.n.	n.n.
Triallate	0,35	0,24	0,20
Trifluralin	0,17	0,03	n.n.

*n.n. = nicht nachweisbar*

Während für die Herbizide Aclonifen, Bifenox und Haloxyfop-ethoxyethyl die desorbierte Menge nicht von der Kontaktdauer mit der Herbizidlösung im Adsorptionsschritt abhängt, zeigen die übrigen Herbiziden für die längeren Kontaktdauern von 2815 und 2830 Minuten eine geringere Desorption in die wässrige Phase. Dieser Effekt ist besonders stark ausgeprägt bei den Wirkstoffen Diflufenican, Trifluralin, Fluroxypyr-meptyl und Bromoxynil-octanoat. Zum Teil sind diese Stoffe in den längeren Zeitintervallen nicht mehr nachweisbar. Für diese Stoffe wird davon ausgegangen, dass die Aufnahme in das Nadelgewebe irreversibel ist, und keine Desorption stattfindet.

Die begleitend vermessenen Kontrollen (Herbizidlösung mit den untersuchten Wirkstoffen im verwendete Puffer) ohne hinzugefügte Kiefernadeln zeigte keinen Abbau der Stoffe über die Versuchsdauer.

Die Messung der herbizidfreien wässrigen Phase (das verwendete Puffergemisch) mit hinzugefügten Kiefernadeln ergab keinen messbaren Gehalt an Herbiziden.

Für alle Messungen gilt, dass je Zeitintervall eine Probe genommen, nach dem im Abschnitt 4.3.2.1 extrahiert, und mittels GC-ECD als Doppelbestimmung gemessen wurde.

### **5.3.3 Serieller Verteilungsversuch mit 49 Herbiziden in einem großvolumigen Ansatz**

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des seriellen Verteilungsversuches zur Adsorption/Desorption von Herbiziden an intakten Waldkiefernadeln (Versuchsdurchführung: Abschnitt 4.3.2.2) zusammengefasst, die im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Isabell ZUNKER 2008 gewonnen wurden.

In diesem Versuch wurde der Konzentrationsverlauf von 49 Stoffen (Herbizide und einige ihrer Abbauprodukte) in der wässrigen Phase eines großvolumigen (20,01 l) seriellen Ansatzes aus 791,87 intakten Kiefernadeln und einer Pufferlösung (Anfangskonzentration 1 µg/l je Herbizid) bestimmt. Es wurden in wachsenden Zeitabständen jeweils 100 ml Proben der wässrigen Phase genommen, per Festphasenextraktion angereichert und mittels HPLC-MS vermessen. Zum Ende des Adsorptionsschrittes wurde die wässrige Phase gegen eine herbizidfreie Pufferlösung ausgetauscht und die Konzentration der desorbierten Stoffe mit demselben analytischen Verfahren bestimmt.

Das Verteilungsverhalten folgender Wirkstoffe beziehungsweise einiger ihrer Abbauprodukte wurde untersucht:

Aclonifen, Alachlor, Atrazin, Atrazin desethyl, Atrazin desisopropyl, Bentazon, Bifenox, Bromoxynil, Chlortoluron, Clethodim, Desaminometamitron, Desmedipham, Diflufenican, Dimetachlor, Diuron, Ethofumesat, Fenoxaprop-p-ethyl, Fluazifop-p-butyl, Flufenacet, Fluroxypyr (unveresterte Säure), Fluroxypyr-meptyl, Flurtamone, Haloxyfop (unveresterte Säure), Haloxyfop-ethoxyethyl, Haloxyfop-methyl, Isoproturon, Linuron, MCPA, Mefenpyr-diethyl, Metamitron, Metazachlor, Metolachlor, Metsulfuron-methylester, Napropamid, Pentachlorphenol, Phemmedipham, Picolinafen, Propachlor, Propanil, Propaquizafop,

Propyzamid, Prosulfocarb, Pyridate, Quizalofop-p-ethyl, Simazin, Terbuthylazin, Terbutylazin desethyl, Triallate, 2,4-D

### **Stoffe mit signifikanter Konzentrationsabnahme: Geschwindigkeitskonstanten und Verteilungskoeffizienten**

Für die in Tabelle 9 genannten Stoffe wurde im Adsorptionsschritt eine signifikante Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase ermittelt, die Auswertung der Konzentrationsverläufe ergab die in der Tabelle dargestellten Geschwindigkeitskonstanten und Verteilungskoeffizienten.

Eine signifikante Konzentrationsabnahme wurde dann angenommen, wenn die relative Standardabweichung der Wiederfindung im verwendeten Probenanreicherungs- und Aufreinigungsverfahren (Festphasenextraktion an LiChrolut EN 200mg Kartuschen) geringer war als die Abweichung vom Mittelwert der im Verteilungsversuch zeitabhängig gemessenen Konzentrationen.



*Tabelle 9: Intakte Kiefernadeln im seriellen Ansatz: Geschwindigkeitskonstanten und Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten (Daten entnommen aus ZUNKER 2008)*

	Geschwindigkeitskonstante $k_1$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Geschwindigkeitskonstante $k_2$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$\log K_{cw}$
Diflufenican	0,018	0,0002	3,3
Fenoxaprop-p-ethyl	0,022	0,0009	3,8
Fluazifop-p-butyl	0,041	0,0018	4,8
Fluroxypyr-meptyl	0,238	0,0019	4,2
Haloxyfop-ethoxyethyl	0,017	0,0009	4,1
Haloxyfop-methyl	0,020	0,0010	3,9
Mefenpyr-diethyl	0,031	0,0003	3,3
PCP	0,029	0,0002	3,4
Picolinafen	0,114	0,0002	3,8
Propaquizafop	0,040	0,0011	3,8
Prosulfocarb	0,148	0,0002	3,4
Quizalofop-ethyl	0,028	0,0006	4,1
Triallate	0,218	0,0002	3,7

### **Stoffe für die eine Desorption ermittelt wurde**

Für die Stoffe Diflufenican, Mefenpyr-diethyl und Prosulfocarb konnte die Desorption mit einem zeitabhängigen Konzentrationsverlauf quantifiziert und eine Gleichgewichtskonzentration ermittelt werden (Tabelle 10).

*Tabelle 10: Gleichgewichtskonzentrationen und Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten für die Desorption (Daten entnommen aus ZUNKER 2008)*

	Gleichgewichtskonzentration [ $\mu\text{g/l}$ ]	$\log K_{cw}$ (Desorption)
Mefenpyr-diethyl	0,10	4,6
Diflufenican	0,25	4,0
Prosulfocarb	0,18	3,9

### **Stoffe ohne signifikante Konzentrationsabnahme im Versuchsverlauf**

Die folgenden Stoffe zeigten im Versuchsverlauf keine signifikante Konzentrationsabnahme beziehungsweise eine zeitunabhängige Streuung der Messwerte um den Mittelwert (ZUNKER 2008):

Alachlor, Atrazin, Atrazin desethyl, Atrazin desisopropyl, Bentazon, Bromoxynil, Chlortoluron, Desaminometamitron, Desmedipham, Dimetachlor, Diuron, Flufenacet, Fluroxypyr (unveresterte Säure), Flurtamone, Haloxyfop (unveresterte Säure) Isoproturon, Linuron, MCPA, Metamitron, Metazachlor, Metolachlor, Metsulfuron-methylester, Napropamid, Phemmedipham, Propachlor, Propanil, Propyzamid, Simazin, Terbutylazin, Terbutylazin desethyl, 2,4-D

### **Stoffe deren Verteilungsverhalten nicht bestimmt werden konnte**

Die Stoffe Aclonifen, Bifenox, Ethofumesat, Pyridate und Clethodim konnten in dem verwendeten Verfahren nicht mit ausreichender Empfindlichkeit zur Untersuchung der Konzentrationsverläufe gemessen werden (ZUNKER 2008).

### **5.3.4 Applikation von Isoproturon in definierter Wirkstoffmenge und Tröpfchenvolumen: kompartmentelle Charakterisierung der Herbizidverteilung**

Um den Einfluss von Niederschlägen auf den in Freilandmessungen ermittelten Konzentrationsverlauf von Isoproturon in Kiefernadeln (FLEISCHER 2004) zu erklären, wurden Verteilungsversuche mit an den Zweigen verbleibenden Kiefernadeln durchgeführt (Abschnitt 4.3.3). Auf Waldkiefernadeln (10 Nadeln, 1 g Frischgewicht) wurde eine genau bekannte Wirkstoffmenge (138 ng) in einem Gesamtvolumen von 15 µl und definiertem Tröpfchenvolumen (durchschnittlich 160 nl) appliziert, ohne die Nadeln von den Zweigen abzutrennen.

Nach 48 Stunden wurden die mit dem Herbizid benetzten Nadeln für unterschiedliche Zeitintervalle in Kontakt mit einer wässrigen Pufferlösung gebracht (Desorption). Während der Desorption verblieben die intakten Nadeln am Zweig. Die Masse des Wirkstoffs Isoproturon und seiner Abbauprodukte wurde in der wässrigen Pufferlösung, in der epikutikulären Wachsschicht und in den nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln (Restnadeln) bestimmt.

Der Wirkstoff Isoproturon wurde sowohl in Reinstwasser als auch in einer verdünnten Sprühlösung, wie sie in der Landwirtschaft Anwendung findet (Pflanzenschutzmittelformulierung mit AHL - Ammoniumnitrat/Harnstofflösung) auf den Kiefernnadeln appliziert.

Es wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:

- Kiefernnadeln benetzt mit Isoproturon/Reinstwasser,  $c = 9,2 \text{ mg/l}$ , Versuchsreihe 1 mit langen (9 bis 2890 Minuten) und Versuchsreihe 2 mit kurzen (1 bis 60,5 Minuten) Zeitintervallen für die Desorption und
- Kiefernnadeln benetzt mit verdünnter Sprühlösung ( $c_{\text{Isoproturon}} = 9,3 \text{ mg/l}$ , Pflanzenschutzmittel Formulierung mit AHL), Zeitintervalle für die Desorption 3 bis 1440 Minuten, = Versuchsreihe 3).

Darüberhinaus wurde untersucht, welche Anteile des applizierten Wirkstoffs unter gleichen Versuchsbedingungen durch Translokation in der Nadel beziehungsweise im Zweig transportiert werden und welche Anteile sich durch Volatilisation von den benetzten Oberflächen verflüchtigen.

#### **5.3.4.1 Verteilungsverhalten des Wirkstoffs Isoproturon in der wässrigen Phase und in den epikutikulären Wachsen**

Die Masse des Wirkstoffs Isoproturon wurde in der wässrigen Phase und in den epikutikulären Wachsen nach wachsender Desorptionsdauer ermittelt und ergab die in den Abbildungen 27, 28 und 29 dargestellten Verläufe.

Die Kiefernnadeln wurden mit einer Lösung von Isoproturon in Reinstwasser (Versuchsreihen 1 und 2) und mit einer verdünnten Herbizidformulierung mit Düngerbestandteilen (AHL, Versuchsreihe 3) benetzt. Die 48 Stunden vor der Desorption auf die am Zweig be-

findlichen Nadeln applizierte Masse an Isoproturon betrug für die Lösung des Isoproturons in Reinstwasser 138 ng. Durch Applikation der verdünnten Herbizidformulierung mit AHL wurden 139,5 ng des Wirkstoffs auf die Nadeln aufgetragen (vergleiche Abschnitt 4.3.3.4).

Bei den Proben  $t = 0$  handelt es sich in allen Versuchsreihen um Kiefernadeln, deren Gehalt an Isoproturon und Abbauprodukten in den epikutikulären Wachsen und der nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln bestimmt wurde, ohne die Nadeln mit der für die Desorption verwendeten Pufferlösung in Kontakt zu bringen. Diese Proben wurden je Versuchsreihe zweifach bestimmt: Es wurden jeweils zweimal Kiefernadeln mit der in der jeweiligen Versuchsreihe verwendeten Isoproturonlösung benetzt und die Nadelproben wurden nach 48 Stunden wie in Abschnitt 4.1.6 beschrieben extrahiert, aufgereinigt und mittels HPLC-MS vermessen. Die relative Standardabweichung der Messwerte im epikutikulären Wachs betrug für die Benetzung mit wässriger Isoproturonlösung 13 % in Versuchsreihe 1 und 5 % in Versuchsreihe 2. Für die Versuchsreihe 3 (Benetzung der Nadeln mit der verdünnten Herbizidformulierung/AHL) betrug die relative Standardabweichung 0,5%.

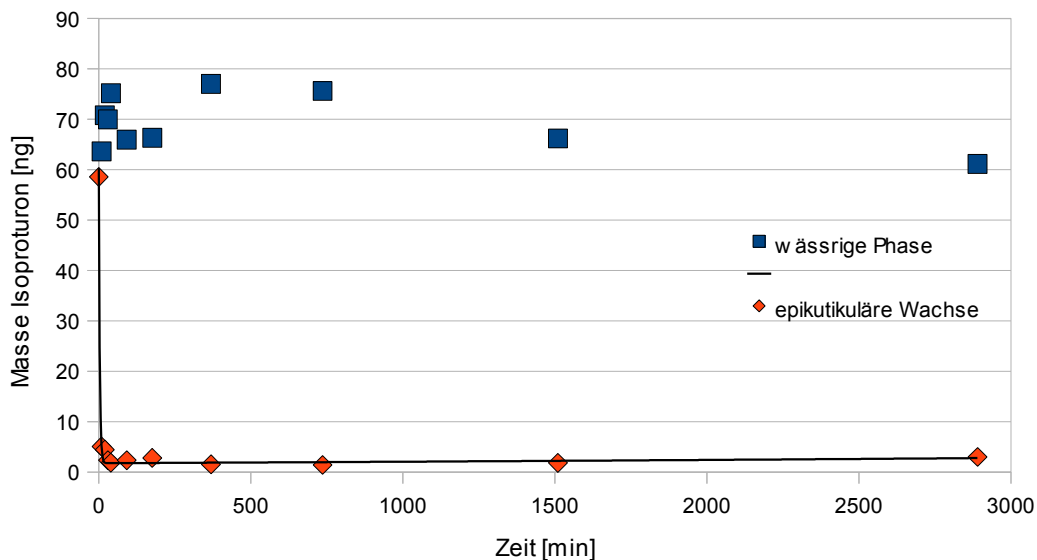


Abbildung 27: Masse des Wirkstoffs Isoproturon in den Kompartimenten wässrige Phase und epikutikuläre Wachse nach Applikation auf der Nadeloberfläche in Reinstwasser, Desorption in langen Zeitintervallen, (Versuchsreihe 1)

Für alle drei Versuchsreihen wurde versucht, die Abnahme an Isoproturon in den epikutikulären Wachsen anhand einer exponentiellen Funktion (wie im Abschnitt 5.1.1 beschrieben) auszuwerten. Da die Abnahme allerdings im Experiment derart schnell war, dass schon zum ersten auf den Zeitpunkt  $t = 0$  folgenden Zeitintervall der überwiegende Anteil des Isoproturons von den Wachsen desorbierte, kann die ermittelte Ausgleichsfunktion nur als Anhaltspunkt gesehen werden, da keine Desorptionsdauern unter 1 Minute gemessen wurden.

Die geschätzten Lebensdauern für die Desorption des Isoproturons liegen in den Versuchsreihen unter 1 Minute.

Sowohl in der wässrigen Phase als auch in den epikutikulären Wachsen zeigt die Masse des Isoproturons für die Versuchsreihen 1 und 2, in denen die Nadeln mit einer Lösung von Isoproturon in Reinstwasser benetzt wurden eine deutlich geringere Streuung als bei der Versuchsreihe 3, in der die Kiefernnadeln mit der verdünnten Herbizidformulierung mit Düngerbestandteilen (Ammonnitrat-Harnstoff-Lösung, AHL) benetzt wurden (Abbildung 29).

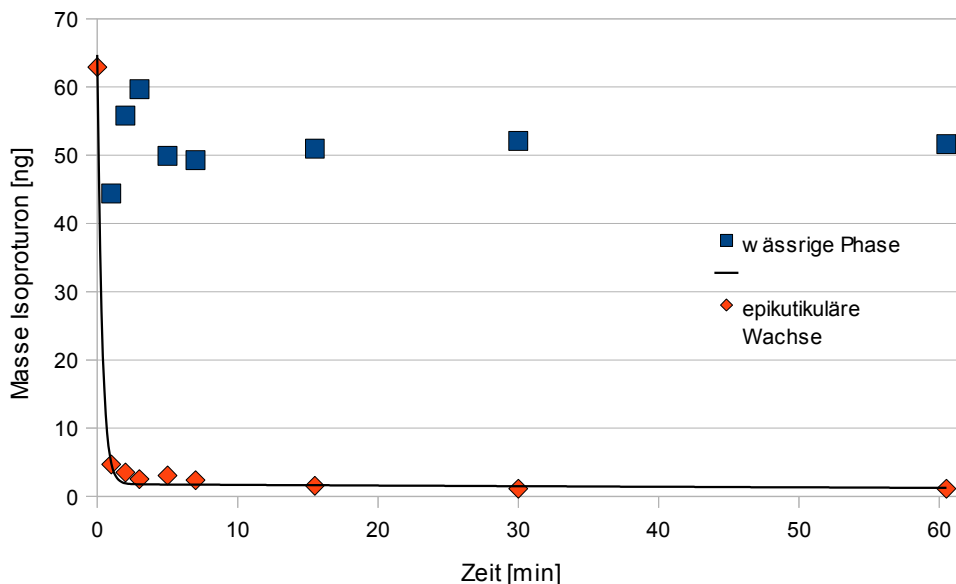


Abbildung 28: Masse des Wirkstoffs Isoproturon in den Kompartimenten wässrige Phase und epikutikuläre Wachse nach Applikation auf der Nadeloberfläche in Reinstwasser, Desorption in kurzen Zeitintervallen (Versuchsreihe 2)

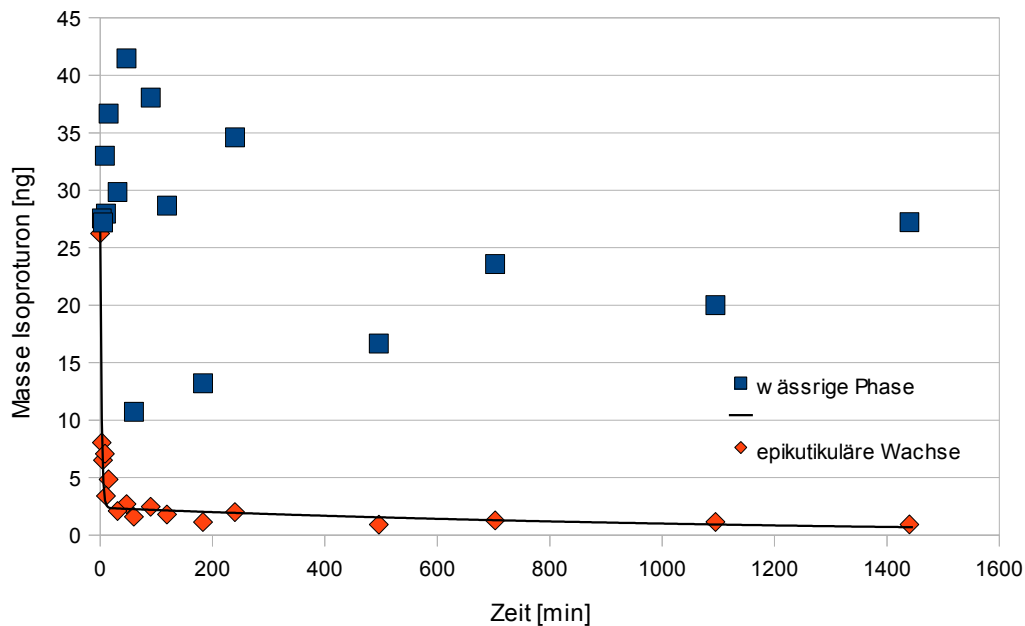


Abbildung 29: Masse des Wirkstoffs Isoprotruron in den Kompartimenten wässrige Phase und epikutikuläre Wachse während der Desorption nach Applikation auf der Nadeloberfläche in Pflanzenschutzmittelformulierung mit AHL (Versuchsreihe 3)

### Nachgewiesene Abbauprodukte

In den Proben aus allen drei Versuchsreihen konnten Abbauprodukte des Isoprotrurons sowohl in der wässrigen Phase als auch in den epikutikulären Wachsen nachgewiesen werden. In den meisten Proben lag die Masse der Abbauprodukte unter den in Tabelle 6 (Abschnitt 5.2) genannten Bestimmungsgrenzen, so dass eine Ermittlung von zeitabhängigen Verläufen in den meisten Fällen nicht möglich war.

Tabelle 11 listet die gefundenen Abbauprodukte in den den untersuchten Messreihen und Kompartimenten mit ihrer maximalen gemessenen Masse. Wenn in einer Versuchsreihe die Masse des Stoffes bestimmt werden konnte ist in Klammern die Zahl der Proben, bei denen die Bestimmungsgrenze überschritten wurde als [(n=x)] aufgeführt. Wenn der Stoff nachgewiesen wurde, aber die ermittelte Masse unter der Bestimmungsgrenze lag, ist dies in der Tabelle mit der Angabe [< x ng] aufgeführt.

Tabelle 11: In der wässrigen Phase und in den epikutikulären Wachsen nachgewiesene Abbauprodukte

		mono-desmethyl-IPU	2-hydroxy-IPU	Di-desmethyl IPU
Versuchsreihe 1	Wässrige Phase	siehe Abb. 30	< 2 ng	< 2 ng
	Wachs	< 2 ng	< 3 ng	n.n.
Versuchsreihe 2	Wässrige Phase	siehe Abb. 31	< 2 ng	n.n.
	Wachs	< 2 ng	< 3 ng	2,8 ng (n=1)
Versuchsreihe 3	Wässrige Phase	1,6 ng	n.n.	9,7 ng (n=1)
	Wachs	2,0 ng	n.n.	16,2 ng (n=3)

n.n. = nicht nachweisbar

Die Abbauprodukte 2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon und 1-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Für mono-desmethyl-Isoproturon konnte die Masse in der wässrigen Phase in den Versuchsreihen 1 und 2 (Nadeln benetzt mit wässriger Isoproturonlösung) bestimmt werden bzw. lag sie nahe der Bestimmungsgrenze von 1,3 ng (Abbildungen 30 und 31).

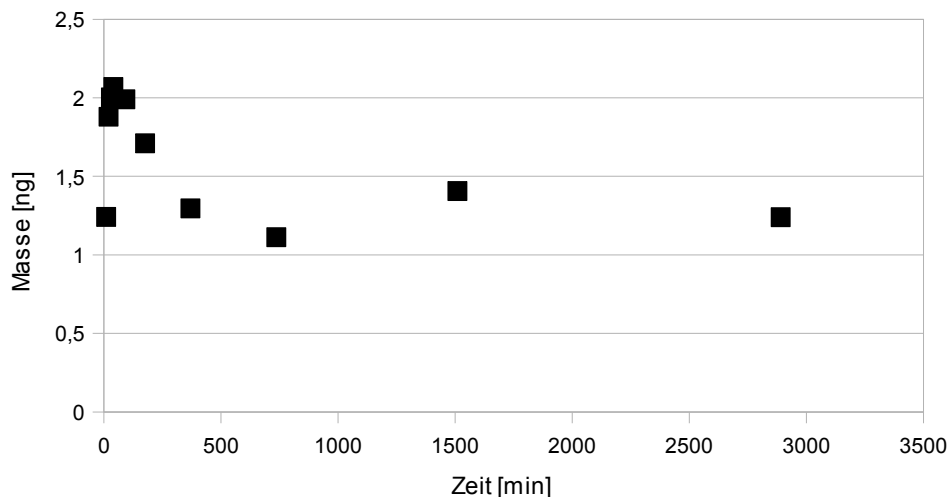


Abbildung 30: Masse des Abbauproduktes mono-desmethyl Isoproturon in der wässrigen Phase, Desorption nach 9-2890 min (Versuchsreihe 1)

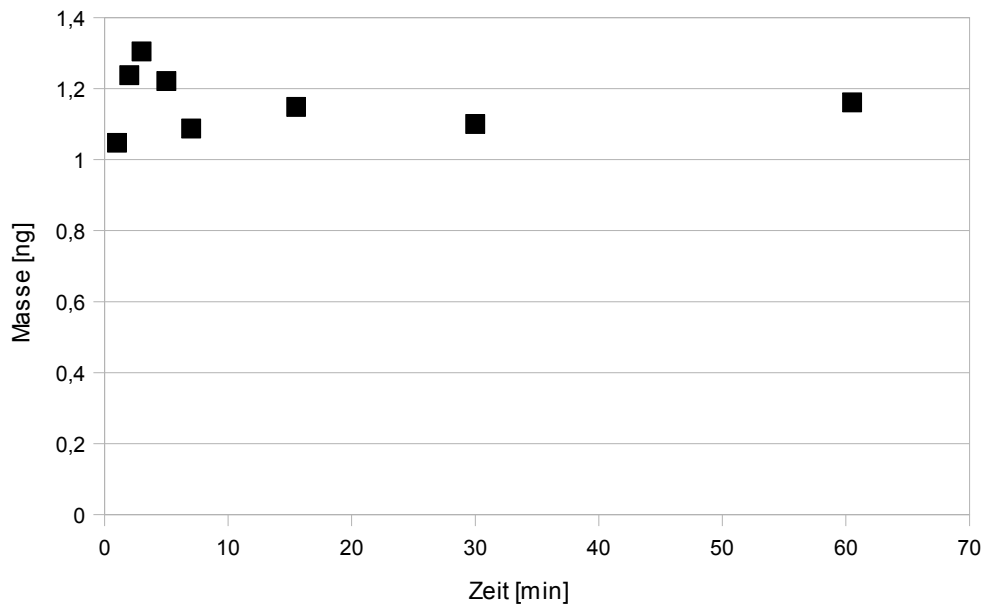


Abbildung 31: Masse des Abbauproduktes mono-desmethyl Isoproturon in der wässrigen Phase, Desorption nach 1-60,5 Minuten (Versuchsreihe 2)

#### 5.3.4.2 Untersuchung der nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln

Isoproturon und seine Abbauprodukte konnten in den nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln (Restnadeln) nicht nachgewiesen werden. Nimmt man als Erfassungsgrenzen den doppelten Betrag der in Tabelle 6 (Abschnitt 5.2) dargestellten Nachweisgrenzen an, bedeutet das, dass die untersuchten Stoffe im Kompartiment Restnadeln nicht die folgenden Massen beziehungsweise prozentualen Anteile des zum Versuchsbeginn applizierten Isoproturons überschreiten:

- 2-hydroxymonodesmethyl-Isoproturon: 30 ng / 22 %
- 1-hydroxymonodesmethyl-Isoproturon: 20 ng / 14 %
- 2-hydroxy-Isoproturon: 20 ng / 14 %
- di-desmethyl-Isoproturon: 16 ng / 12 %



- mono-desmethyl-Isoproturon: 10 ng / 7,2 %
- Isoproturon: 20 ng / 14 %

#### **5.3.4.3 Translokation in Nadeln und Zweigen**

In den im Abschnitt 4.3.3.6 beschriebenen Versuchen wurde die Translokation von Isoproturon innerhalb der Kiefernadeln und in Zweigabschnitten untersucht.

Es wurden Proben aus Nadelabschnitten analysiert, bei denen in einem benachbarten Abschnitt die in den Verteilungsversuchen verwendete verdünnte Pflanzenschutzmittelformulierung appliziert wurde. Dabei befanden sich die intakten Nadeln an einem Kiefernzweigabschnitt. Auch das Wasser, in das das angeschnittene Ende dieses Zweigabschnitts eingetaucht wurde untersucht.

Darüberhinaus wurde der Transport aus angeschnittenen benetzten Nadeln, die in Reinstwasser eingetaucht waren, gemessen.

In keiner dieser Proben konnte Isoproturon oder eines seiner Abbauprodukte nachgewiesen werden. Als Erfassungsgrenzen gelten für die untersuchten Nadelabschnitte die oben zur Analytik der Restnadeln genannten Erfassungsgrenzen. Die Erfassungsgrenzen für die Untersuchung der genannten wässrigen Proben sind wesentlich niedriger, sie entsprechen dem doppelten Betrag der in Tabelle 6 (Abschnitt 5.2) angegebenen Nachweisgrenzen in der wässrigen Phase. Die untersuchten Stoffe haben in den wässrigen Proben zur Messung der Translokation nicht die folgenden Massen beziehungsweise prozentualen Anteile des zum Versuchsbeginn applizierten Isoproturons überschritten:

- 2-hydroxymonodesmethyl-Isoproturon: 4 ng / 2,8 %
- 1-hydroxymonodesmethyl-Isoproturon: 3 ng / 2,2 %
- 2-hydroxy-Isoproturon: 1,4 ng / 1 %
- di-desmethyl-Isoproturon: 1,4 ng / 1 %
- mono-desmethyl-Isoproturon: 0,8 ng / 0,6 %
- Isoproturon: 0,6 ng / 0,4 %

#### 5.3.4.4 Volatilisation

Es wurde untersucht, ob für Isoproturon nach der Applikation auf Glasoberflächen volatilisiert oder ob dessen Produkte aus abiotischen Abbauvorgängen nachgewiesen werden können (Abschnitt 4.3.3.7).

Die für die Applikation auf die Kiefernnadeln verwendeten Lösungen (Isoproturon/Reinstwasser  $c = 9,2 \text{ mg/l}$  und Formulierungslösung mit AHL  $c = 9,3 \text{ mg/l}$ ) wurden mit einer Mikroliterspritze auf Glasoberflächen verschiedener Geometrie aufgebracht. Es wurden Petrischälchen und Glaskapillaren (Durchmesser circa 1,5 mm, Länge 75 mm) mit je  $10 \mu\text{l}$  (durchschnittlich  $65 \pm 10$  Tröpfchen, Tröpfchenvolumen 150 nl) der Lösungen benetzt und unter den gleichen Versuchsbedingungen (Luftgeschwindigkeit, Temperatur, Luftfeuchte und Helligkeit) wie die benetzten Kiefernnadeln gegenüber der Laborluft exponiert.

Eine weitere Messreihe wurde mit Petrischälchen durchgeführt, die mit größeren Tröpfchen der Lösung Isoproturon/Reinstwasser  $c = 9,2 \text{ mg/l}$  benetzt wurden ( $50 \mu\text{l}$  in  $104 \pm 15$  Tropfen, Tröpfchenvolumen 480 nl), um zu klären, ob das Tröpfchenvolumen die Volatilisation beeinflusst.

Darüberhinaus wurde die Volatilisation von Isoproturon in einem geschlossenen System untersucht. Es wurde ein Petrischälchen mit Schliffdeckel verwendet und gemessen, ob Anteile von dem auf den Deckel aufgetragenen Isoproturon während einer Dauer von 5 Tagen in das auf dem Boden des Schälchens platzierte Festphasenextraktionsmaterial (LiChrolut EN 200 mg) transportiert werden.

Die Zeitabhängige Messung der auf den Glasoberflächen verbliebenen Masse an Isoproturon zeigte für Oberflächen (Petrischälchen und Glaskapillaren), die mit der Lösung von Isoproturon in Reinstwasser benetzt wurden einen linearen Verlauf. Dabei ist der Verlust an Isoproturon bei der Applikation auf schmale, dünne Glaskapillaren größer als bei Applikation auf den Boden offener Petrischälchen. Ein noch größerer Verlust tritt bei Benetzen der Kapillaren mit der verdünnten Pflanzenschutzmittelformulierung mit AHL auf. Darüberhinaus wurde in diesem Fall ein exponentieller Verlauf angenommen (Abbildung 32).

Die linearen Verläufe der auf den Glasoberflächen verbliebenen Masse an Isoproturon wurden mittels linearer Regression ausgewertet, für den Verlauf der mit der verdünnten Pflanzenschutzmittelformulierung benetzten Kapillaren wurde ein einfach exponentieller Ver-

lauf angenommen. Es wurden die folgenden Funktionen für die zeitabhängig auf den Oberflächen verbleibende Masse des Isoproturons berechnet (Tabelle 12).

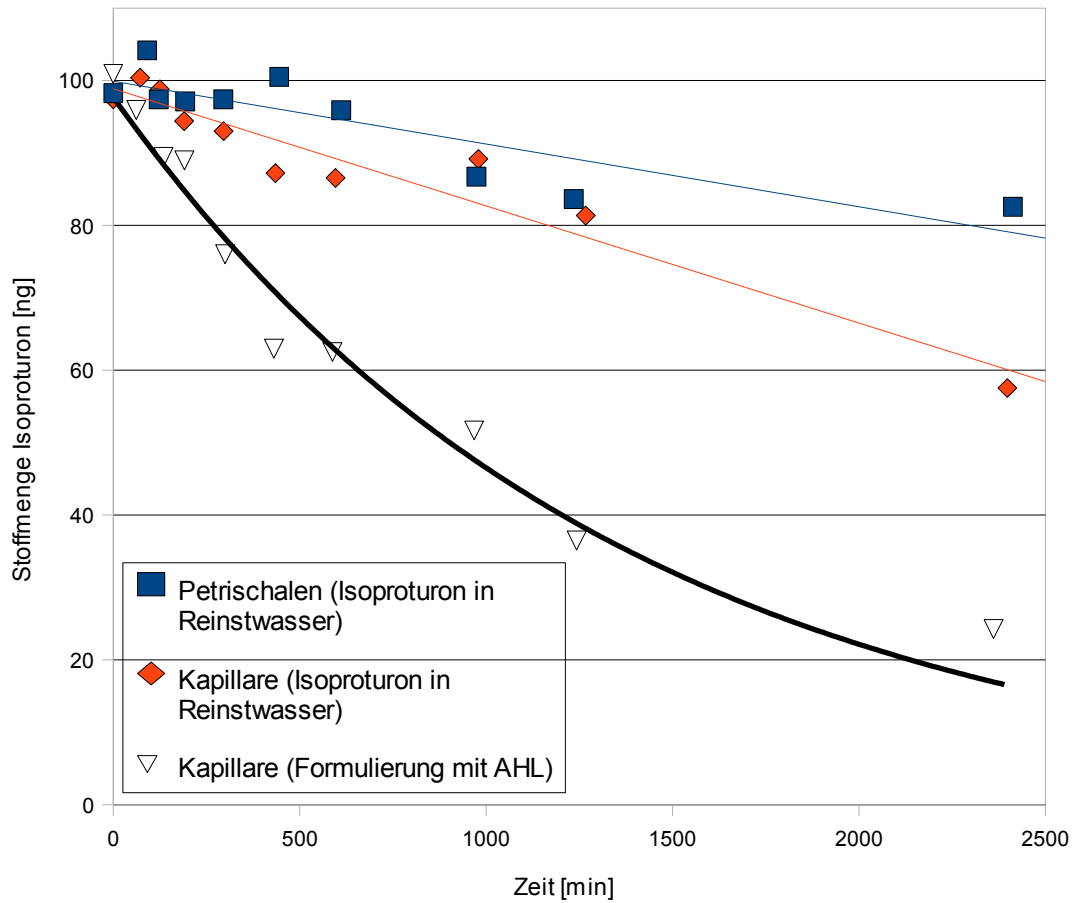


Abbildung 32: Verlust des Isoproturons von benetzten Glasoberflächen, Einfluss der Geometrie und Formulierung

*Tabelle 12: Zeitabhängiger Verbleib von Isoproturon auf benetzten Oberflächen, Einfluss der Geometrie und Formulierung*

	Gleichung	R <sup>2</sup>
Petrischälchen (IPU/Reinstwasser)	$m \text{ IPU}(t) = -0,0087t + 100$	0,76
Kapillaren (IPU/Reinstwasser)	$m \text{ IPU}(t) = -0,016t + 99$	0,93
Kapillaren (PSM-Formulierung / AHL)	$m \text{ IPU}(t) = 98 * \text{EXP}(-0,00074 * t)$	0,97

Abbildung 33 zeigt den Vergleich zwischen der bereits in Tabelle 12 und Abbildung 32 beschriebenen Versuchsreihe (Petrischälchen IPU/Reinstwasser) und einer weiteren Versuchsreihe, in der Petrischälchen mit derselben Lösung von Isoproturon in Reinstwasser, aber mit einem größeren durchschnittlichen Tröpfchenvolumen von 480 nl benetzt wurden.

Die Versuchsreihe mit dem größeren Tröpfchenvolumen wurde über einen längeren Zeitraum (7337 Minuten) durchgeführt. Da die Stoffmenge in dieser Versuchsreihe um einen Faktor 5 größer ist (es wurden 50 µl in 104 ±15 Tröpfchen appliziert im Vergleich zu 10 µl in 65 ± 10 Tröpfchen), wurden die Massen des Isoproturons zum Zeitpunkt t=0 auf 100 % normiert. Die ermittelte Steigungen der Ausgleichsgeraden und damit der zeitabhängige Verlust des Isoproturons unterscheiden sich nur sehr geringfügig (-0,0086 für 150 nl und -0,0083 für 480 nl Tröpfchenvolumen).

Bei allen zeitabhängigen Messungen handelt es sich je Zeitintervall um eine Probe (benetzte Glasoberfläche), die wie im Abschnitt 4.3.3.7 beschrieben extrahiert und mittels HPLC-MS vermessen wurde.

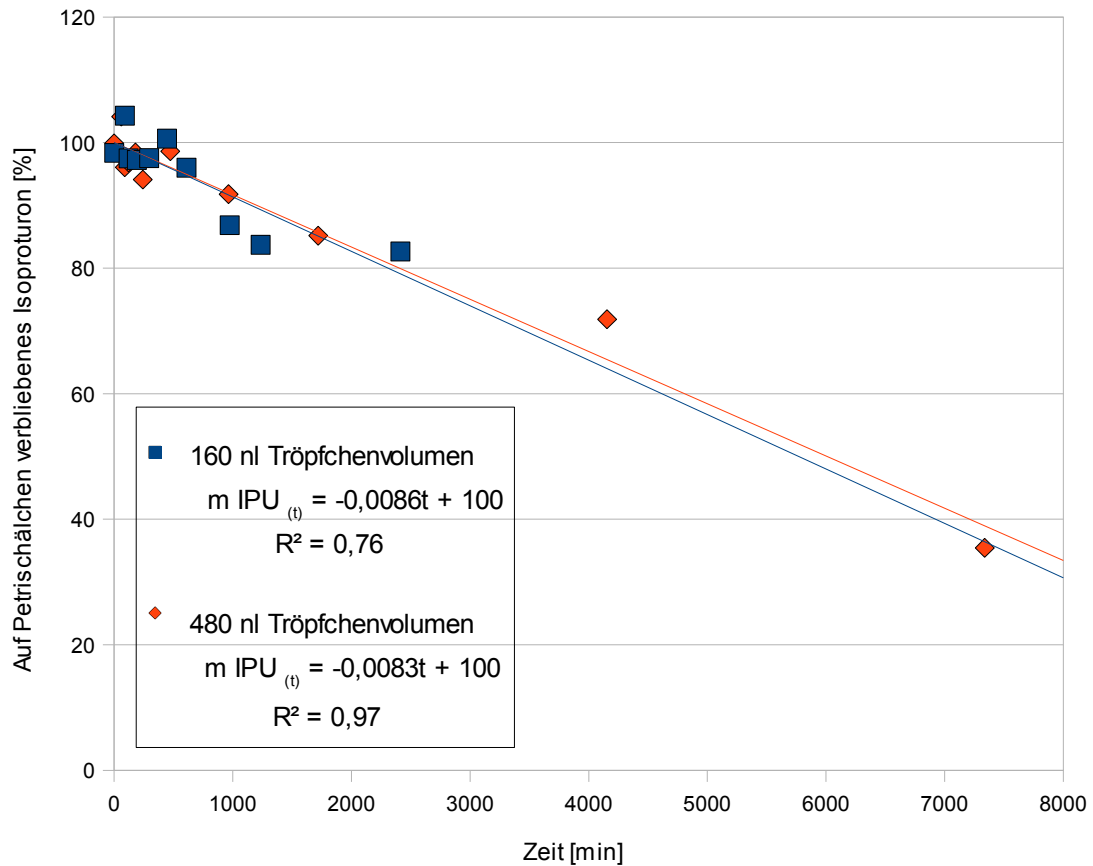


Abbildung 33: Verlust des Isoproturons von benetzten Glasoberflächen, Einfluss des Tröpfchenvolumens

### Abbauprodukte

In den beschriebenen Messungen wurden die Abbauprodukte 2-hydroxy-Isoproturon und mono-desmethyl-Isoproturon nachgewiesen.

Für die mit der verdünnten Pflanzenschutzmittelformulierung / AHL benetzten Kapillaren konnten die Stoffe 2-hydroxy-Isoproturon und mono-desmethyl-Isoproturon an der Nachweisgrenze von 0,7 beziehungsweise 0,4 ng nachgewiesen werden. Die größten Signalstärken wiesen die Proben der Kapillaren auf, die mehr als 500 Minuten der Laborluft ausgesetzt waren.

Für die mit Isoproturon in Reinstwasser benetzten Kapillaren konnten der Stoffe mono-desmethyl-Isoproturon an der Nachweisgrenze von 0,4 ng bei Zeitintervallen ab 1000 Minuten nachgewiesen werden.

Die größte Masse an Abbauprodukten wurde für die Stoffe 2-hydroxy-Isoproturon und mono-desmethyl-Isoproturon in den mit Isoproturon in Reinstwasser benetzten Petrischälchen gemessen. Die durchschnittliche Masse von mono-desmethyl-Isoproturon lag für die Zeitintervalle 974, 1235 und 2413 Minuten bei 2,7 ng. In diesen Proben konnte auch das Abbauprodukt 2-hydroxy-Isoproturon nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden (unter 2,3 ng).

Die Stoffe 2-hydroxymonodesmethyl-Isoproturon, 1-hydroxymonodesmethyl-Isoproturon und di-desmethyl-Isoproturon konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.

### **Volatilisation im geschlossenen System**

Für die Bestimmung des Transports in einem geschlossenen System wurde die Masse an Isoproturon in den mit Pflanzenschutzmittelformulierung / AHL benetzten Schliffdeckeln der Petrischälchen und in dem auf dem Boden des Schälchens befindlichen Festphasenextraktionsmaterial (LiChrolut EN 200 mg) nach 5 Tagen bestimmt (Abschnitt 4.3.3.7).

Es wurde eine Dreifachbestimmung (drei benetzte Petrischälchen) durchgeführt. Die durchschnittliche Masse an Isoproturon im Festphasenextraktionsmaterial nach 5 Tagen bezogen zur anfangs auf den Schliffdeckeln applizierten Masse betrug 5,4 % (Standardabweichung 1,6 %).

An den Schliffdeckeln konnte das Abbauprodukt mono-desmethyl-Isoproturon nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden (unter 1,3 ng).

## 6 Diskussion

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Verteilungsversuche im Hinblick auf die Fragestellung, ob eine Anreicherung von modernen Herbiziden in der Oberfläche von Nichtzielpflanzen möglich ist, am Beispiel der Waldkiefer *Pinus Sylvestris* L. als ökologisch und ökonomisch relevante Baumart diskutiert. Die in den Verteilungsversuchen gewonnenen Ergebnisse werden miteinander verglichen und ein Bezug zu den im Rahmen der Diplomarbeit (FLEISCHER 2004) im Freiland gemessenen Konzentrationen von Isoproturon in der epikutikulären Wachsschicht von Waldkiefernadeln hergestellt.

### 6.1 Adsorption und Desorption von Terbutylazin an rekonstituiertem epikutikulärem Wachs

In diesem Verteilungsversuch konnte der Konzentrationsverlauf der Adsorption aus einer Lösung von Terbutylazin in Reinstwasser ( $c = 700 \mu\text{g/l}$ ) an rekonstituierten epikutikulären Wachsen bestimmt werden. Es wurde eine einfach exponentielle Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase beobachtet. Aus dem sich einstellenden Konzentrationsgleichgewicht zwischen Wachs und wässriger Phase konnte für die Adsorption ein Verteilungskoeffizient  $\log K_{\text{WachsW}} = 3,0$  berechnet werden.

Die Desorption des Terbutylazins aus dem rekonstituierten epikutikulären Wachs in Reinstwasser zeigte eine einfach exponentielle Konzentrationszunahme in der wässrigen Phase. Aus dem Konzentrationsgleichgewicht wurde ein Verteilungskoeffizient für die Desorption von  $\log K_{\text{WachsW}} = 3,3$  ermittelt.

Der Mittelwert dieser beiden Verteilungskoeffizienten liegt sehr nahe bei dem in der Literatur für Terbutylazin verfügbaren Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{\text{CW}} = 3,21$  (TOMLIN 2003).

Aus der Beobachtung, dass der für die Desorption ermittelte  $\log K_{\text{WachsW}}$  größer ist, als der Verteilungskoeffizient für die Adsorption, kann man schließen, dass ein Anteil des Terbu-

thylazins zumindest im Rahmen der Versuchsdauer (maximaler Zeitintervall für die Desorption 3390 Minuten) irreversibel im Kompartiment Wachs verbleibt.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen können nicht den Mechanismus aufklären, der für die irreversible Aufnahme in die rekonstituierten epikutikulären Wachse verantwortlich ist. Informationen über chemische Reaktionen des Stoffes mit den Wachsbestandteilen konnten in einer Literaturstudie nicht ermittelt werden.

Da epikutikuläre Wachse aus kristallinen und amorphen Bereichen bestehen, und die Mobilität von Stoffen in den amorphe Bereichen am höchsten ist (SCHREIBER ET AL. 1996), wäre denkbar, dass die während der Versuchsdauer nicht desorbierbaren Anteile des Stoffs in den kristallinen Anteilen des Wachses immobilisiert vorliegen.

Wenn der Stoff Terbutylazin irreversibel in den epikutikulären Wachsen verbleibt, deutet dies darauf hin, dass die dauerhafte Aufnahme des Stoffes, beispielsweise aus belasteten Niederschlägen in die Nadeloberfläche möglich ist. Das gilt für diesen Stoff auch, wenn man aus der stark vereinfachenden Perspektive des verwendeten experimentellen Ansatzes lediglich die epikutikuläre Wachsschicht betrachtet und einen in intakten Kiefernnadeln möglicherweise stattfindenden Weitertransport des Stoffes durch die Kutikula in das Nadelgewebe nicht berücksichtigt.

## **6.2 Adsorption und Desorption aus der wässrigen Phase an intakten Kiefernnadeln**

In parallelen Ansätzen aus je 4 g Kiefernnadeln und 100 ml wässriger Phase wurde das Adsorptions- und Desorptionsverhalten von 13 relativ unpolaren ( $\log K_{OW} = 4,0 - 5,4$ ) modernen Herbiziden bestimmt. Die Adsorption und Desorption von 49 Herbiziden wurde im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Isabell ZUNKER 2008 in einem großvolumigen seriellen Ansatz (791,87 g Nadeln in 20,01 l wässriger Phase) untersucht.

Für Versuche zum Transportverhalten von Stoffen in Pflanzenkutikeln wird in der Literatur eine Korrelation des Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{CW}$ ) mit dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{OW}$ ) angegeben:

$$\log K_{CW} = 0,057 + 0,970 \log K_{OW} \quad (r = 0,987) \quad (\text{Gleichung 6.1})$$



Außerdem gibt es nach Literaturangaben eine Korrelation zwischen dem  $\log K_{CW}$  und dem Verteilungskoeffizienten zwischen rekonstituiertem epikutikulärem Wachs und wässriger Phase ( $\log K_{WachsW}$ ). Nach diesen Angaben ist der  $\log K_{WachsW}$  etwa um eine Größenordnung niedriger als der  $\log K_{CW}$  beziehungsweise der  $\log K_{OW}$ :

$$\log K_{WachsW} = -1,108 + 1,010 \log K_{CW} \quad (r = 0,994) \quad (\text{Gleichung 6.2})$$

Jedoch wurden diese Daten mit anderen experimentellen Vorgehensweisen ermittelt: Die Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten wurden als Verteilung zwischen der wässrigen Phase und enzymatisch isolierten Kutikeln bestimmt (RIEDERER & MÜLLER 2006).

Die in dieser Dissertation mittels parallelem Versuchsdesign und seriellem Experiment ermittelten Kutikula/Wasser-Verteilungskoeffizienten sind durchschnittlich um  $\log = 0,8$  niedriger als die Literaturangaben des  $\log K_{OW}$ . Das kann unter Berücksichtigung der genannten Korrelation zwischen  $\log K_{CW}$  und  $\log K_{WachsW}$  als Hinweis gedeutet werden, dass mit dem im Rahmen dieser Dissertation und der Diplomarbeit von Isabell Zunker verwendeten Vorgehensweise insbesondere das Verteilungsverhalten der äußersten Bestandteile der Kutikula, nämlich das der epikutikulären Wachse ermittelt wird.

Darüberhinaus stellen sich bei den Verteilungsversuchen mit intakten Kiefernnadeln für Stoffe mit einer biexponentiellen Abnahme in der wässrigen Phase und einer hohen Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  keine Konzentrationsgleichgewichte ein. Die verwendete Methode zur Abschätzung einer Gleichgewichtskonzentration anhand des Parameters  $b$  in der biexponentiellen Gleichung (vergleiche Abschnitt 5.1) kann für diese Stoffe zu einem Überbefund der Konzentration in der wässrigen Phase und damit zu einer Unterschätzung des Verteilungskoeffizienten führen.

Es konnte keine eindeutige Korrelation der dargestellten Verteilungskoeffizienten untereinander und zu Literaturwerten ( $\log K_{OW}$ ) ermittelt werden.

Tabelle 13 zeigt die Verteilungskoeffizienten der Stoffe, die jeweils im parallelen und seriellen Verfahren bestimmt wurden im Vergleich zu den Literaturwerten des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Die mittels des seriellen Versuchsansatzes gemessenen Verteilungskoeffizienten sind der Diplomarbeit von Isabell ZUNKER 2008 entnommen.

Nicht alle der aufgeführten Stoffe wurden in beiden Versuchsreihen (seriell und parallel) untersucht, da bei der parallelen Versuchsreihe (Analytik mittels GC-ECD) auch Herbizide gemessen wurden, die sich nicht in niedrigen Konzentrationen (unter  $0,5 \mu\text{g/l}$  vor Anrei-

cherung) mittels HPLC-MS (im seriellen Versuchsansatz verwendete Analytik) quantifizieren lassen.

*Tabelle 13: Experimentell bestimmte log K<sub>CW</sub> und Literaturwerte für log K<sub>OW</sub> (Entnommen aus TOMLIN 2003)*

	log K <sub>CW-parallel</sub>	log K <sub>CW-seriell</sub>	log K <sub>OW</sub>
Aclonifen	3,6		4,4
Bifenox	3,9		4,5
Bromoxynil-octanoat	4,3		5,4
Diflufenican	4,2	3,3	4,9
Fenoxaprop-p-ethyl		3,8	4,6
Fluazifop-p-butyl		4,8	4,5
Fluroxypyr-meptyl	3,8	4,2	4,5
Haloxyfop-ethoxyethyl	3,6	4,1	4,3
Haloxyfop-methyl		3,9	4
Mefenpyr-diethyl		3,3	3,8
PCP		3,4	5,1
Pendimethalin	3,9		5,2
Picolinafen	4,1	3,8	5,4
Propaquizafop	4	3,8	4,8
Prosulfocarb		3,4	4,7
Pyridate	4,3		4
Quizalofop-ethyl	4	4,1	4,7
Triallate	3,4	3,7	4,6
Trifluralin	3,7		4,8

Die Mobilität vieler Stoffe in Pflanzenkutikeln ist abhängig von ihrer Molekülgröße und Polarität (KERLER & SCHÖNHERR 1988, BUCHHOLZ ET AL. 1998, KERSTIENS 2006, RIEDERER & MÜLLER 2006, SCHREIBER & SCHÖNHERR 2009, vergleiche Abschnitt 3.6).

Allerdings zeigen die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 14) der Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase, sowohl für die schnelle Adsorption an die Nadeloberfläche ( $k_1$ ) als auch für den angenommenen Weitertransport durch die Kutikula ( $k_2$ , vergleiche Abschnitt 5.1), keinen erkennbaren Zusammenhang mit den nach MCGOWAN &

SOWADA 1993 und ABRAHAM & MCGOWAN 1987 berechneten Volumina  $V_x$  oder den Quotienten aus Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{OW}$  und gemessene  $\log K_{ow}$ ) und  $V_x$ .

Da die Verteilungsversuche nur mit einem Verhältnis zwischen Nadeln und Wassermenge (und damit nur ein Volumenverhältnis für die Kompartimente Pflanzenkutikula und wässrige Phase) durchgeführt wurden, konnten nur für Stoffe ähnlicher Polarität ( $\log K_{OW}$  3,8 bis 5,4) Verläufe der Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase ermittelt werden. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten und Verteilungskoeffizienten zeigen eine Streuung, die eine eindeutige Korrelation zum Beispiel mit Verteilungskoeffizienten aus der Literatur oder berechneten Volumina  $V_x$  nicht ermöglicht.

Möglicherweise ist die Streuung bei experimentell ermittelten Verteilungskoeffizienten und Geschwindigkeitskonstanten im Hinblick auf das vereinfachte System isolierter Pflanzenkutikeln geringer als bei dem komplexeren System intakter Kiefernnadeln.

Auch zwischen den beiden Messreihen (parallele und serielle Durchführung der Verteilungsversuche) zeigten sich deutliche Abweichungen für die ermittelten Verteilungskoeffizienten und Geschwindigkeitskonstanten. Vermutlich sind diese auf folgende Unterschiede bei der Durchführung der Versuche zurückzuführen:

- Bei der parallelen Versuchsdurchführung wurden die Nadeln mit der wässrigen Phase im Überkopfschüttler durchmischt. Die mechanische Belastung der Nadeln durch Reibung an den Glaswänden der verwendeten Messkolben ist in diesem Fall größer als bei der seriellen Versuchsdurchführung in einem 20 l Glasgefäß auf dem Tischschüttler. Auch bei der Bestimmung von Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten können durch schütteln geringe Anteile des Oktanols als feinste Tröpfchen in der wässrigen Phase verbleiben, was zu einem Überbefund der Konzentration in der wässrigen Phase für unpolare Stoffe führt. Für unpolare Stoffe ( $\log K_{OW} > 4$ ) wird zur Bestimmung des  $K_{OW}$  die "slow stirring" Methode angewendet, bei der nicht umgeschüttelt wird (OECD 2006B). Gegebenenfalls traten bei dem parallelen Versuchsansatz mit Kiefernnadeln ähnliche Probleme durch zunehmenden Abrieb des epikutikulären Wachses während der Versuchsdauer auf.
- Im parallelen Versuchsansatz wurde ein 0,001 M Citratpuffer ( $\text{pH} = 5,2 \pm 0,2$ ) verwendet, im seriellen Versuch ein 0,01 M Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 5,3$ ) mit 150 mg/l Natriumazid.

- Die Messung von Kontrollproben bei der seriellen Versuchsdurchführung (vergleiche Abschnitt 4.3.2.2) zeigte eine von der Kontaktdauer der Nadeln mit der wässrigen Phase abhängige Matrixbelastung der Proben und damit zeitabhängige Signalsuppression am LC-MS. Dieser Effekt konnte nicht für alle Stoffe durch den einzigen verwendeten deuterierten internen Standard korrigiert werden. Dies erschwerte die Auswertung der Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase (ZUNKER 2008). Eine ähnlich starke Signalsuppression konnte bei der Analytik mittels GC-ECD im parallelen Versuchsansatz nicht beobachtet werden.

*Tabelle 14: Geschwindigkeitskonstanten der biexponentiellen Konzentrationsverläufe (Daten des seriellen Versuchsansatzes entnommen aus ZUNKER 2008)*

	$k_1$ [min <sup>-1</sup> ] - parallel	$k_1$ [min <sup>-1</sup> ] - seriell	$k_2$ [min <sup>-1</sup> ] - parallel	$k_2$ [min <sup>-1</sup> ] - seriell
Aclonifen	0,009		0,00005	
Bifenox	0,026		0,00015	
Bromoxynil-octanoat	0,295		0,00030	
Diflufenican	0,236	0,018	0,00042	0,0002
Fenoxaprop-p-ethyl		0,022		0,0009
Fluazifop-p-butyl		0,041		0,0018
Fluroxypyr-meptyl	0,015	0,238	0,00056	0,0019
Haloxyfop-ethoxyethyl	0,033	0,017	0,00002	0,0009
Haloxyfop-methyl		0,020		0,0010
Mefenpyr-diethyl		0,031		0,0003
PCP		0,029		0,0002
Pendimethalin	0,071		0,00035	
Picolinafen	0,075	0,114	0,00002	0,0002
Propaquizafop	0,012	0,040	0,00061	0,0011
Prosulfocarb		0,148		0,0002
Pyridate	0,247		0,00005	
Quizalofop-ethyl	0,012	0,028	0,00053	0,0006
Triallate	0,045	0,218	0,00039	0,0002
Trifluralin	0,064		0,00046	

Zusammenfassend erlauben die gezeigten Daten aber die grundsätzliche Aussage, dass für die in Tabelle 13 genannten Herbizide auf Grund der ermittelten Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{cw} \geq 3,3$  eine Aufnahme aus mit Herbiziden belasteten Niederschlägen in Kiefernadeln möglich ist.

Tabelle 15 zeigt, welche Stoffe darüber hinaus kritische Eigenschaften für die Aufnahme in Nichtzielpflanzen besitzen wie:

- eine schnelle Adsorption aus wässrigen Lösungen an die Pflanzenoberfläche (Geschwindigkeitskonstanten  $k_1 > 0,05/\text{min}$ )
- ein schneller Weitertransport in das Nadelgewebe (Geschwindigkeitskonstanten  $k_2 > 0,005/\text{min}$ )
- eine irreversible Aufnahme (Vergleiche Abschnitt 5.3.2, um einen Faktor 5 niedrigere Desorption nach einer Adsorptionsdauer von 2800 Minuten im Vergleich zu einer Adsorptionsdauer von 1300 Minuten)

*Tabelle 15: Stoffe mit schneller Adsorption aus der wässrigen Phase, schnellem Transport in der Kutikula und/oder irreversibler Aufnahme*

	$k_1 > 0,05/\text{min}$	$k_2 > 0,0005/\text{min}$	irreversible Aufnahme
Bromoxynil-octanoat	+		+
Fluroxypyr-meptyl		+	+
Propaquizafop		+	+
Quizalofop-ethyl		+	+
Trifluralin	+	+	+
Fluazifop-p-butyl	+	+	
Haloxyfop-methyl		+	
Pendimethalin	+		
Picolinafen	+		
Prosulfocarb	+		
Pyridate	+		
Fenoxaprop-p-ethyl		+	

Bei der Bewertung von Wirkstoffen im Hinblick auf die Fragestellung, ob in Niederschlägen nachweisbare Herbizide ein Risiko für Nichtzielpflanzen darstellen, können diese Kriterien berücksichtigt werden.

### **6.3 Applikation von Isoproturon in definierter Wirkstoffmenge und Tröpfchenvolumen: kompartimentelle Charakterisierung der Herbizidverteilung**

Um den Einfluss von Niederschlägen auf den in Freilandmessungen ermittelten Konzentrationsverlauf von Isoproturon in Kiefernadeln (FLEISCHER 2004) zu erklären, wurden Verteilungsversuche mit an den Zweigen verbleibenden Kiefernadeln durchgeführt.

Bei der genannten Freilanduntersuchung konnten im Rahmen der Diplomarbeit von Andreas Fleischer in der epikutikulären Wachsschicht von Kiefernadeln bis zu 333 ng/g Nadeln Isoproturon (bezogen auf das Trockengewicht) nachgewiesen werden. Die Kiefern, in denen das Isoproturon nachgewiesen wurde befanden sich im Lee einer landwirtschaftlich Fläche, auf der eine Wirkstoffmenge an Isoproturon von 875 g/ha mit dem Herbizid Orefa IPU SC 500 ausgebracht wurde.

Die analysierten Nadeln wurden von Kiefern am Feldrand in einer Höhe von 4 bis 5 m entnommen. 24 Stunden nach der Herbizidanwendung konnten in zwei Nadelproben 254 und 209 ng/g Isoproturon nachgewiesen werden. 48 Stunden nach der Herbizidanwendung wurden in zwei weiteren Nadelproben 228 und 333 ng/g Isoproturon gemessen. Danach setzten starke Regenfälle ein, 96 h nach der Pflanzenschutzmittelanwendung waren in den Kiefernadeln noch 23,5 und 21,6 ng/g Isoproturon enthalten. Isoproturon konnte für die 14 auf die Herbizidanwendung folgenden Tage in Menge unter 20 ng/g nachgewiesen aber nicht mehr quantifiziert werden. 28 Tage nach der Anwendung war der Stoff nicht mehr nachweisbar.

Durch den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Verteilungsversuch wurden im Labormaßstab die Bedingungen (durch den Landwirt verwendet Sprühlösung, auf den Kiefernadeln befindliche Wirkstoffmenge, Einsetzen von Niederschlägen nach 48 Stunden) simuliert.

Auf Waldkiefernadeln (10 Nadeln, 1 g Frischgewicht) wurde eine genau bekannte Menge an Isoproturon

- gelöst in Reinstwasser (applizierte Masse an Isoproturon je 10 Nadeln: 138 ng) und
- als Bestandteil einer verdünnten Pflanzenschutzmittelformulierung mit Düngerbestandteilen (applizierte Masse an Isoproturon je 10 Nadeln: 139,5 ng )

in einem Gesamtvolumen von 15 µl Lösung und definiertem Tröpfchenvolumen (durchschnittlich 160 nl) appliziert.

Nach 48 Stunden wurde die Desorption des Isoproturons von den intakten, am Kiefern-zweig befindlichen Nadeln in eine wässrige Pufferlösung gemessen. Die Masse des Wirkstoffs Isoproturon und seiner Abbauprodukte wurde in der wässrigen Pufferlösung, in der epikutikulären Wachsschicht und in den nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln (Restnadeln) bestimmt.

Darüberhinaus wurde untersucht, welche Anteile des applizierten Wirkstoffs unter gleichen Versuchsbedingungen durch Translokation in der Nadel beziehungsweise im Zweig transportiert werden und welche Anteile sich durch Volatilisation von den benetzten Oberflächen verflüchtigen.

### **6.3.1 Nach 48 Stunden auf der Oberfläche der Kiefernadeln verbliebenes Isoproturon: Rolle der Volatilisation**

Die Kiefernadeln waren nach dem Benetzen mit den oben genannten Lösungen 48 Stunden der Laborluft ausgesetzt. Die Masse des Isoproturons, die sich nach dieser Zeit noch an der Oberfläche der Kiefernadeln befindet, wurde durch Extraktion der epikutikulären Wachse bestimmt. Diese Proben kamen nicht mit der für die Untersuchung der Desorption verwendete Pufferlösung in Berührung.

In den epikutikuläre Wachsen der Nadeln, die mit der wässrigen Isoproturonlösung benetzt wurden, waren nach 48 Stunden noch 61 ng (Standardabweichung 6,1 ng) beziehungsweise 44 % der ursprünglich applizierten Masse an Isoproturon enthalten. In der epikutikulären Wachsschicht der Nadeln, die mit der verdünnten Herbizidformulierung benetzt wurden, waren nach 48 Stunden 26 ng (Standardabweichung 0,1 ng) beziehungsweise 19 % der ursprünglich applizierten Masse enthalten.

Diese starken Verluste können entweder durch Volatilisation oder abiotischen Abbau auf der Nadeloberfläche oder durch einen Weitertransport in die nach der Extraktion der epikulären Wachsschicht verbliebenen Restnadel bedingt sein.

Die zur Kontrolle der Volatilisation durchgeführten Versuche zeigten, dass die Menge an Isoproturon auf Glasoberflächen, die der Laborluft ausgesetzt sind nach 48 Stunden messbar abnimmt. Die Abnahme von Isoproturon, das gelöst in Reinstwasser appliziert wurde zeigte einen linearen zeitabhängigen Verlauf. Für Isoproturon, das in der verdünnten Herbizidformulierung mit AHL Düngerbestandteilen (Ammonium-Harnstoff-Lösung) appliziert wurde zeigte sich eine exponentielle Abnahme.

Dabei waren die Geschwindigkeitskonstanten der Abnahme von der Geometrie der benetzten Oberfläche abhängig: Von Glaskapillaren, die in ihrer Form (Durchmesser circa 1,5 mm, Länge 75 mm, Abbildung 17) den Kiefernnadeln ähnelten war der Verlust um 85 % stärker ausgeprägt als von offenen Petrischälchen (ermittelte Funktionen der Abnahme siehe Abschnitt 5.3.4.4).

Auf den mit wässriger Isoproturonlösung benetzten Kapillaren waren nach 48 Stunden noch 53 % der ursprünglichen Masse an Isoproturon vorhanden. Auf den mit der verdünnten Herbizidformulierung benetzten Kapillaren verblieben nach 48 Stunden lediglich 12 % der ursprünglich applizierten Masse des Isoproturons.

Damit würde allein der Verlust von einer unter gleichen Bedingungen der Laborluft ausgesetzten Glasoberfläche den in den Kiefernnadeln gemessenen Verlust erklären.

Ob der Verlust an den Glasoberflächen allein durch Volatilisation begründet ist oder auch zu einem höheren Anteil durch abiotische Abbauprozesse, kann durch die gewonnenen Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden. Allerdings deutet das Ergebnis des Versuchs zur Volatilisation in einem geschlossenen System darauf hin, dass nennenswerte Anteile des Wirkstoffs durch Volatilisation transportiert werden können. Nach 5 Tagen ließen sich 5,4 % (Standardabweichung 1,6 %) des auf der Innenseite der Schließdeckel von verschlossenen Petrischälchen aufgetragenen Isoproturons in dem am Boden des Petrischälchens befindlichen Fänger material wiederfinden.

In den Proben zur Untersuchung der Volatilisation konnte das Abbauprodukt mono-desmethyl-Isoproturon mit einer maximalen Masse von 2,7 ng quantifiziert werden, das Abbauprodukt 2-hydroxy-Isoproturon konnte nachgewiesen aber nicht quantifiziert werden (unter 2,3 ng).



Der exponentielle Verlust von den mit der verdünnten Formulierung benetzten Kapillaren könnte auf einen abiotischen Abbau hinweisen. Welche Rolle dabei möglicherweise die Düngerbestandteile in der applizierten Lösung spielen (1,11 g/l Ammoniumnitrat, 0,90 g/l Harnstoff, 5,6 mg/l Ammoniumsulfat) ist nicht bekannt. Laut dem Sicherheitsdatenblatt des Herstellers besitzt eine AHL-Lösung  $c = 30 \%$  einen pH-Wert von 6,4 – 7,2 (DSM AGRO 2007). Eine Erhöhung des pH-Wertes beim Verdunsten der Tröpfchen auf den Kapillaren und damit ein schnellerer Abbau des Isoproturons durch Hydrolyse lässt sich damit nicht begründen.

Es stellt sich die Frage, ob unter den genannten Versuchsbedingungen eine Volatilisation möglich ist, die zu den hohen beobachteten Verlusten führt. In Lysimeterstudien war die Volatilisation von  $^{14}\text{C}$ -isotopenmarkiertem Isoproturon sehr gering (maximal 1,17 % der ursprünglichen Aufwandmenge nach drei Monaten, SCHROLL ET AL. 2008).

Allerdings sind die applizierten Mengen auf der Zielfläche und in dem in dieser Dissertation beschriebenen Versuch sehr unterschiedlich. Die Konzentration des Isoproturons ist in den üblicherweise in der Landwirtschaft versprühten Lösungen um einen Faktor von etwa 500 höher als in dem hier beschriebenen Verteilungsversuch (vergleiche Abschnitt 4.3.3.3).

Gelangt diese Sprühlösung auf die Zielfläche belegt sie eine ähnliche Kontaktfläche wie die im Verteilungsversuch applizierten Tröpfchen. Bei einem Sprühvolumen von 1000 l/ha sind Kontaktflächen der auf der Zielfläche gelangten Tröpfchen von 0,2 bis 6 mm<sup>2</sup> möglich (FAERS & PONTZEN 2008). Die Kontaktflächen der im Verteilungsversuch applizierten Tröpfchen betragen sowohl auf den Nadeln als auch auf den benetzten Glasoberflächen etwa 1 mm<sup>2</sup>.

Das bedeutet, dass durch die niedrige Konzentration im Verteilungsversuch auch die gedachte Schichtdicke des Isoproturons (sowohl bei der verwendeten Lösung in Reinstwasser als auch bei der verdünnten Formulierung) um einen Faktor 500 niedriger ist. Nimmt man gleichzeitig die selbe benetzte Fläche an, ist bei gleicher Volatilisationsrate der anteilige Verlust zur Anfangsmenge bei der Verdunstung der durch den Landwirt aufgebrauchten Sprühlösung um einen Faktor von 500 niedriger. Als analoges Gedankenbeispiel können zwei zylindrische Gefäße gleichen Querschnitts gelten, von dem eines der Gefäße die 500-fache Menge an Wasser und damit auch eine 500-fache Schichtdicke enthält, aus denen aber je Zeitintervall die gleiche Menge an Wasser verdunstet.

Nimmt man für die Volatilisation einen linearen Verlauf an, liegt die verdunstete Menge sowohl im Verteilungsversuch als auch in der Lysimeterstudie in derselben Größenordnung: Im Verteilungsversuch wurde nach 2 Tagen ein Verlust von 53 % für die mit Isoproturon in Reinstwasser benetzten Glaskapillaren gemessen. Wenn in der Lysimeterstudie von einer 500-fach größeren Menge in 90 Tagen 1 % verdunsten, gilt folgendes Rechenbeispiel:

- Angenommene Masse (Isoproturon) in einem Tropfen im Verteilungsversuch: 1ng. Daraus folgt ein Verlust von 0,53 ng in zwei Tagen
- Angenommene Masse (Isoproturon) in einem Tropfen in der Lysimeterstudie: 500 ng. Bei 1 % Verlust in 90 Tagen ergibt sich ein Verlust von 0,11 ng in zwei Tagen.

### **6.3.2 Masse des Isoproturons in der epikutikulären Wachsschicht und der wässrigen Phase während der Desorption**

Die zeitabhängigen Verläufe der Masse des Isoproturons in der wässrigen Phase und den epikutikulären Wachsen während der Desorption (vergleiche Abschnitt 5.3.4.1) zeigen, dass das auf der Nadeloberfläche verbliebene Isoproturon extrem schnell (Lebensdauern unter 1 Minute) in die wässrige Phase desorbiert. Die Masse des Isoproturons in der wässrigen Phase bleibt bei den mit der wässrigen Isoproturonlösung benetzten Kiefernnadeln konstant (Mittelwert über beide mit kurzen und langen Desorptionsintervallen durchgeführten Messreihen: 61 ng, Standardabweichung 9,9 ng), es ist keine Abnahme der Masse im Versuchsverlauf zu erkennen. Dies entspricht der Masse in den epikutikulären Wachsen zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Desorption (siehe Abschnitt 6.3.1).

Damit desorbiert das gesamte Isoproturon, das nach 48 Stunden an der Laborluft auf der Oberfläche der Kiefernnadeln vorhanden ist, sehr schnell in die wässrige Phase. Die geringe Masse von durchschnittlich 2 ng Isoproturon in der epikutikulären Wachsschicht während der auf  $t = 0$  folgenden Zeitintervalle der Desorption ist überwiegend durch die Verschleppung von geringen Mengen Haftwasser beim Entnehmen der Kiefernnadeln aus der wässrigen Phase begründet.

Auch für die mit der verdünnten Herbizidformulierung benetzten Nadeln zeigte sich kein abnehmender Verlauf der Masse des Isoproturons in der wässrigen Phase, allerdings streuten die Messwerte stark um den Mittelwert von 27 ng (Standardabweichung 8,5 ng). Auch

dies entspricht der Masse des Isoproturons in den epikutikulären Wachsen zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Desorption (siehe Abschnitt 6.3.1).

### **6.3.3 Abbauprodukte in der wässrigen Phase und epikutikulären Wachsschicht**

Die Abbauprodukte mono-desmethyl-Isoproturon, 2-hydroxy-Isoproturon und di-desmethyl-Isoproturon konnten für die mit wässriger Isoproturonlösung benetzten Nadeln sowohl in der wässrigen Phase als auch in der Wachsschicht nachgewiesen werden. Es waren keine Verläufe mit einem zeitabhängigen Trend zu beobachten. Die Masse der Abbauprodukte betrug je Stoff in keiner der Proben mehr als 3 ng.

Dies gilt auch für die wässrige Phase und Wachsschicht der mit der verdünnten Pflanzenschutzmittelformulierung benetzten Nadeln, mit Ausnahme für das Abbauprodukt di-desmethyl-Isoproturon, der in einer Probe der wässrigen Phase mit 9,7 ng und in drei Proben der Wachsschicht mit bis zu 16,2 ng bestimmt wurde. Das deutet auf einen stärkeren Abbau des Isoproturons auf der Oberfläche der mit der Formulierung benetzten Nadeln im Gegensatz zu den mit in Reinstwasser gelöstem Isoproturon benetzten Nadeln hin.

Bei den gefundenen Abbauprodukten handelt es sich vermutlich um abiotische Abbauprodukte, die sich mutmaßlich nach dem selben Mechanismus wie die auf den Glasoberflächen bei der Untersuchung der Volatilisation detektierten Stoffe bilden. Ein biotischer Abbau in der wässrigen Pufferlösung erscheint auf Grund des bakterienhemmenden Natriumazidgehaltes unwahrscheinlich.

### **6.3.4 Untersuchung der nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln und der Translokation**

Weder in den nach Extraktion der epikutikulären Wachse verbleibenden Nadeln in den Untersuchungen zur Translokation konnte Isoproturon oder eines der untersuchten Abbauprodukte nachgewiesen werden. In Verbindung mit den Verlusten der ursprünglich aufgetragenen Masse an Isoproturon durch Volatilisation und der sehr schnellen und vollständigen Desorption des auf der Nadeloberfläche befindlichen Isoproturons ist es sehr wahrscheinlich, dass keine wesentlichen Anteile des Wirkstoffs unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in das Gewebe der Kiefernnadeln aufgenommen werden. Die in Ab-

schnitt 3.7 beschriebenen Studien zur Aufnahme, Metabolismus und Translokation von Isoproturon wurden mit weitaus größeren applizierten Mengen des Wirkstoffs oder der Formulierungsbestandteile durchgeführt als in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen. Die genannten Studien beziehen sich nicht auf die Aufnahme kleiner Mengen aus Spray-Drift sondern auf die direkte Exposition zum Beispiel der auf der landwirtschaftlichen Fläche befindlichen Nutzpflanzen wie Weizen oder anderen Gräsern (ACHHIREDDY & KIRKWOOD 1986).

## 6.4 Fazit

Die Verteilungsversuche zur Adsorption und Desorption von modernen Herbiziden an rekonstituierten epikutikulären Wachsen und intakten Kiefernnadeln zeigen, dass für Herbizide mit einem  $\log K_{OW} > 3,2$  eine Aufnahme aus wässrigen Lösungen in die epikutikuläre Wachsschicht messbar und damit eine Aufnahme solcher Herbizide aus belasteten Niederschlägen in die Oberfläche von Nichtzielpflanzen möglich ist. Darüberhinaus konnten kritische Eigenschaften wie die schnelle Adsorption aus wässrigen Lösungen, der schnelle Weitertransport in der Kutikula oder eine nicht reversible Aufnahme in Kiefernnadeln nachgewiesen werden.

Für das polare Herbizid Isoproturon ( $\log K_{OW} = 2,5$  TOMLIN 2003) konnte der Verbleib von Driftrückständen nachvollzogen werden: Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Versuchsdesign erlaubt die gleichzeitige Untersuchung des Verbleibs von auf Nichtzielpflanzenoberflächen verdrifteten Herbiziden in den Kompartimenten Niederschlagswasser, der epikutikulären Wachsschicht und dem Blattgewebe. Die Vorgänge Translokation, Volatilisation und die Bildung von Abbauprodukten können mit dem vorgestellten Konzept quantifiziert werden. Dabei ist die Beobachtung dieser Vorgänge an intakten, noch am Zweig befindlichen Kiefernnadeln möglich.

Aus den Ergebnissen der Laborversuche können Rückschlüsse zum Verbleib des Herbizids Isoproturon im Waldökosystem getroffen werden: Der in Freilandmessungen beobachtete Konzentrationsverlauf mit einer starken Abnahme der Konzentration in der epikutikulären Wachsschicht (FLEISCHER 2004) ist durch Auswaschung bei Regenereignissen zu erklären.

Im Laborversuch konnte gemessen werden, dass Isoproturon bei Kontakt mit wässrigen Lösungen sofort (Lebensdauer unter 1 Minute) von der Oberfläche der Kiefernnadeln

desorbiert und nicht in das innere Gewebe der Kiefernnadel aufgenommen wird. Freilandmessungen im Stammablaufwasser von Buchen zeigten, dass durch Spraydrift in Waldökosysteme eingetragenes Isoproturon bei Regenereignissen aus dem Kronenbereich in den Waldboden ausgewaschen wird (BERNHARTDT & RUCK 2004). Die in den Laborversuchen gefundenen Ergebnisse erklären und bestätigen diese Befunde.

Darüberhinaus ergaben die Laborversuche, dass für Driftrückstände des Isoproturons in kleinen Stoffmengen und Schichtdicken ( $1 \text{ ng/mm}^2$ ) hohe Verluste (zwischen 47 und 88 % der ursprünglich applizierten Menge) durch Volatilisation und abiotischen Abbau auftreten.

Die Ergebnisse belegen, dass die Auswaschung von Driftrückständen dieses Herbizides einen Eintragspfad in den Waldboden darstellt. Darauf folgende Prozesse wie run-off und leaching stellen möglicherweise auch eine Exposition von Oberflächengewässern und Grundwasser dar. Da sich diese Prozesse für Isoproturon als kritisch herausgestellt haben, enthalten aktuelle Zulassungen von Produkten, die diesen Wirkstoff enthalten, Anwendungsbeschränkungen, die einen Eintrag in Gewässer verhindern sollen (BVL 2010).

Auch die Auswaschung von Driftrückständen anderer polarer Wirkstoffe aus dem Kronenraum in den Waldboden ist denkbar. In der Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln und ihren Wirkstoffen sollte deshalb die Rolle von Vegetationsoberflächen im Hinblick auf die Deposition von verdrifteten Anteilen der auf der Zielfläche applizierten Aufwandmenge betrachtet werden. Die Oberflächen von Waldkiefern als Beispiel für eine weit verbreitete Nichtzielpflanzenart können als Zwischenspeicher und Bindeglied für den Transport von verdrifteten Pflanzenschutzmitteln zwischen Teilen des Ökosystems fungieren. Nach der Deposition polarer Wirkstoffe können diese durch Niederschläge wieder freigesetzt und im Waldboden, Oberflächengewässern oder dem Grundwasser verfügbar sein.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abraham, M. H., & McGowan, J. C. (1987). The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, 23(4), 243-246.
- Achhireddy, N. R., & Kirkwood, R. C. (1986). The foliar uptake of isoproturon by wheat and *Alopecurus myosuroides* huds. *Pesticide science*, 17(1), 53-57.
- Ali, H. A. M., Mayes, R. W., Hector, B. L., Verma, A. K., & Ørskov, E. R. (2005). The possible use of n-alkanes, long-chain fatty alcohols and long-chain fatty acids as markers in studies of the botanical composition of the diet of free-ranging herbivores. *The Journal of Agricultural Science*, 143(01), 85-95.
- Ames, P. L. (1966). DDT residues in the eggs of the osprey in the north-eastern United States and their relation to nesting success. *Journal of Applied Ecology*, 87-97.
- Arvidsson, T., Bergström, L., & Kreuger, J. (2011). Spray drift as influenced by meteorological and technical factors. *Pest Management Science*, 67(5), 586-598.
- Aston, L. S., & Seiber, J. N. (1996). Exchange of airborne organophosphorus pesticides with pine needles. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 31(4), 671-698.
- Aston, L. S., & Seiber, J. N. (1996A). Methods for the comparative analysis of organophosphate residues in four compartments of needles of *Pinus ponderosa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(9), 2728-2735.
- Aston, L. S., & Seiber, J. N. (1997). Fate of summertime airborne organophosphate pesticide residues in the Sierra Nevada mountains. *Journal of Environmental Quality*, 26(6), 1483-1492.
- Aston, L. S., Noda, J., Seiber, J. N., & Reece, C. A. (1996B). Organophosphate flame retardants in needles of *Pinus ponderosa* in the Sierra Nevada Foothills. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 57(6), 859-866.
- Ballmann, C., De Oliveira, S., Gutenberger, A., Waßmann, F., & Schreiber, L. (2011). A radioactive assay allowing the quantitative measurement of cuticular permeability of intact *Arabidopsis thaliana* leaves. *Planta*, 234(1), 9-20.
- BAuA (2005). National Profile Chemikalienmanagement in Deutschland. S. Feller, U. Kowalski, U. Schlottmann. 2. aktualisierte Auflage der Sonderschrift 59 der Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
- BBA (2002). Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln und Pflanzenschutzgeräten Teil VII September 2002 1 – 1.1.1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Bundesrepublik Deutschland. ISSN 0947 - 1529 Online: [http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/\\_AT/pr%C3%BCverfahren/rilis/erkl%C3%A4rungsverfahren/Merkmale%20Spritz-%20und%20Spr%C3%BCher%C3%A4te%20f%C3%BCr%20Fl%C3%A4chenkulturen.pdf](http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam_uploads/_AT/pr%C3%BCverfahren/rilis/erkl%C3%A4rungsverfahren/Merkmale%20Spritz-%20und%20Spr%C3%BCher%C3%A4te%20f%C3%BCr%20Fl%C3%A4chenkulturen.pdf) . Aburfdatum: 23.5.2013
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., & Barriuso, E. (2002). Occurrence of pesticides in the atmosphere in France. *Agronomie*, 22(1), 35-49.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., & Gabrielle, B. (2002A). Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie*, 22(1), 21-33.
- Bedos, C., Générmont, S., Le Cadre, E., Garcia, L., Barriuso, E., & Cellier, P. (2009). Modelling pesticide volatilization after soil application using the mechanistic model Volt'Air. *Atmospheric Environment*, 43(22), 3630-3639.

- Bernhardt, A., & Ruck, W. (2004). Determination of herbicides in stemflow and throughfall of beeches (*Fagus sylvatica* L.) and in rainfall. *Chemosphere*, 57(10), 1563-1570.
- BMELV (2009). Waldbericht der Bundesregierung 2009. Bericht des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Online: [http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Waldbericht2009.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Waldbericht2009.pdf?__blob=publicationFile) . Abrufdatum: 20.5.2013
- BMELV (2010) Gute fachliche Praxis im Pflanzenschutz - Grundsätze für die Durchführung. Broschüre des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Online: [http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/GutePraxisPflanzenschutz.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/GutePraxisPflanzenschutz.pdf?__blob=publicationFile) . Abrufdatum: 9.5.2013
- Boutin, C., Aya, K. L., Carpenter, D., Thomas, P. J., & Rowland, O. (2012). Phytotoxicity testing for herbicide regulation: shortcomings in relation to biodiversity and ecosystem services in agrarian systems. *Science of the Total Environment*, 415, 79-92.
- Breeze, V. G., & van Rensburg, E. (1991). Vapour of the free acid of the herbicide 2, 4-D is toxic to tomato and lettuce plants. *Environmental Pollution*, 72(4), 259-267.
- Buchholz, A., Baur, P., & Schönherr, J. (1998). Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities. *Planta*, 206(2), 322-328.
- Bundestag (2011). Stellungnahme des Einzelsachverständigen (Prof. Dr. Ralf Schulz) Institute of Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau für die 51. Sitzung des Ausschusses für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz zur Öffentlichen Anhörung zum Thema: „Neuordnung des Pflanzenschutzrechtes“. Deutscher Bundestag. Ausschuss f. Ernährung, Landwirtschaft u. Verbraucherschutz. Ausschussdrucksache 17(10)624-G
- Burghardt, M., Schreiber, L., & Riederer, M. (1998). Enhancement of the diffusion of active ingredients in barley leaf cuticular wax by monodisperse alcohol ethoxylates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(4), 1593-1602.
- BVL (2002-2011). Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland. Berichte aus den Jahren 2002-2011 des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online: [www.bvl.bund.de/infopsm](http://www.bvl.bund.de/infopsm) . Abrufdatum: 19.5.2013
- BVL (2010). PSM-Zulassungsbericht (Registration Report). Solar. Bericht des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online: [http://www.bvl.bund.de/DE/04\\_Pflanzenschutzmittel/01\\_Aufgaben/02\\_ZulassungPSM/01\\_ZugelPSM/01\\_OnlineDatenbank/psm\\_onlineDB\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/02_ZulassungPSM/01_ZugelPSM/01_OnlineDatenbank/psm_onlineDB_node.html) . Abrufdatum: 27.5.2013
- BVL (2012). Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland- Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2011. Bericht des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online: [www.bvl.bund.de/infopsm](http://www.bvl.bund.de/infopsm) . Abrufdatum: 12.2.2013
- BVL (2013). Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel in Deutschland mit Informationen über beendete Zulassungen (Stand April 2013). Bericht des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online: [www.bvl.bund.de/infopsm](http://www.bvl.bund.de/infopsm) . Abrufdatum: 8.5.2013
- BVL (2013A). Naturhaushalt- Modelle zum Eintrag von Pflanzenschutzmitteln in Nicht-Zielbereiche. Internetseite des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online: [http://www.bvl.bund.de/DE/04\\_Pflanzenschutzmittel/03\\_Antragsteller/04\\_Zulassungsverfahren/07\\_Naturhaushalt/psm\\_naturhaush\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/03_Antragsteller/04_Zulassungsverfahren/07_Naturhaushalt/psm_naturhaush_node.html) . Abrufdatum: 24.5.2013
- Cape, J. N. (1983). Contact angles of water droplets on needles of scots pine (*Pinus Sylvestris*) growing in polluted atmospheres. *New Phytologist*, 93(2), 293-299.
- Carpenter, D., & Boutin, C. (2010). Sublethal effects of the herbicide glufosinate ammonium on crops and wild plants: short-term effects compared to vegetative recovery and plant reproduction. *Ecotoxicology*, 19(7), 1322-1336.

- Cepel, N. V. (1967). Interzeption (= Niederschlagsverdunstung im Kronenraum) in einem Buchen-, einem Eichen- und einem Kiefernbestand des Belgrader Waldes bei Istanbul. *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 86(5), 301-314.
- Cessna, A. J., Larney, F. J., Kerr, L. A., & Bullock, M. S. (2006). Transport of trifluralin on wind-eroded sediment. *Canadian journal of soil science*, 86(3), 545-554.
- Chernyak, S. M., Rice, C. P., & McConnell, L. L. (1996). Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. *Marine pollution bulletin*, 32(5), 410-419.
- Clark, T. (2003). Pesticides in Perspective - Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. *Journal of Environmental Monitoring*, 5(4), 77N-80N.
- Combella, J. H. (1982). Loss of herbicides from ground sprayers. *Weed Research*, 22(4), 193-204.
- Crossley, A., & Fowler, D. (1986). The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clean air. *New Phytologist*, 103(1), 207-218.
- Dabrowski, J. M., & Schulz, R. (2003). Predicted and measured levels of azinphosmethyl in the Lourens River, South Africa: Comparison of runoff and spray drift. *Environmental toxicology and chemistry*, 22(3), 494-500.
- Daly, G. L., & Wania, F. (2005). Organic contaminants in mountains. *Environmental science & technology*, 39(2), 385-398.
- De Jong, F. M., & Udo de Haes, H. A. (2001). Development of a field bioassay for the side-effects of herbicides on vascular plants using *Brassica napus* and *Poa annua*. *Environmental toxicology*, 16(5), 397-407.
- DSM Agro (2007). Sicherheitsdatenblatt des Produktes "AHL 30". DSM Agro B.V., Sittard, Niederlande. Version 5. Ausgabedatum 1.10.2007
- Dubus, I. G., Hollis, J. M., & Brown, C. D. (2000). Pesticides in rainfall in Europe. *Environmental Pollution*, 110(2), 331-344.
- Dueck, T. A. (2003). Risks of vapour-phase herbicides in the atmosphere of non-target plants. *Plant research international B.V.*, Wageningen November 2003 Note 272. Online: <http://edepot.wur.nl/45340>
- EU-Kommission (2002). Review report for the active substance isoproturon - Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 7 December 2001 in view of the inclusion of isoproturon in Annex I of Directive 91/414/EEC. Online: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1-41\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1-41_en.pdf) . Abrufdatum: 21.5.2013
- EU-Kommission (2002A). Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC. SANCO/10329/2002 rev 2 final 17 October 2002. Online: [http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances/docs/wrkdoc09\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/docs/wrkdoc09_en.pdf) . Abrufdatum: 22.5.2013
- Faers, M. A., & Pontzen, R. (2008). Factors influencing the association between active ingredient and adjuvant in the leaf deposit of adjuvant-containing suspoemulsion formulations. *Pest management science*, 64(8), 820-833.
- Fent, K. (2013). *Ökotoxikologie: Umweltchemie-Toxikologie-Ökologie*. Thieme.
- Ferrari, F., Trevisan, M., & Capri, E. (2003). Predicting and measuring environmental concentration of pesticides in air after soil application. *Journal of environmental quality*, 32(5), 1623-1633.
- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., & Sanz-Medel, A. (2007). Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica chimica acta*, 590(1), 1-16.



- Fleischer (2004). Untersuchung von Pestiziden in Nadeln der Waldkiefer (*Pinus silvestris* L.) an einer ausgewählten Ackerfläche. Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg
- Fleischer, A., Palm, W.-U., Ruck, W. (2006). Untersuchung der Herbizidbelastung von Waldbäumen am Beispiel der Waldkiefer *Pinus sylvestris* L. 11. SETAC-GLB Jahrestagung 2006, Landau, Tagungsband S. 177-178.
- FOCUS (2008). Pesticides in Air: Considerations for Exposure Assessment. Report of the FOCUS Working Group on Pesticides in Air, EC Document Reference SANCO/10553/2006 Rev 2 June 2008. 327 pp.
- Forster, W. A., Zabkiewicz, J. A., & Liu, Z. (2006). Cuticular uptake of xenobiotics into living plants. part 2: influence of the xenobiotic dose on the uptake of bentazone, epoxiconazole and pyraclostrobin, applied in the presence of various surfactants, into *Chenopodium album*, *Sinapis alba* and *Triticum aestivum* leaves. *Pest management science*, 62(7), 664-672.
- Forster, W. A., Zabkiewicz, J. A., & Riederer, M. (2004). Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: 1. Influence of xenobiotic dose on the uptake of three model compounds applied in the absence and presence of surfactants into *Chenopodium album*, *Hedera helix* and *Stephanotis floribunda* leaves. *Pest management science*, 60(11), 1105-1113.
- Franich, R. A., Jakobsson, E., Jensen, S., Kroese, H. W., & Kylin, H. (1993). Development of non-destructive methods for the determination of airborne pollutants in pine needles: identification of trace constituents in radiata pine epicuticular wax. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 347(8-9), 337-343.
- Franzaring, J., Kempenaar, C., & Van der Eerden, L. J. M. (2001). Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental pollution*, 114(1), 21-28.
- Ganzelmeier, H., Rautmann, D., Spangenberg, R., Streloke, M., Herrmann, D. M., Wenzelburger, D. H. J., & Walter, D. H. F. (1995). Studies on the spray drift of plant protection products: results of a test program carried out throughout the Federal Republic of Germany. Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Gardingen, P. V., Grace, J., & Jeffree, C. E. (1991). Abrasive damage by wind to the needle surfaces of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. and *Pinus sylvestris* L. *Plant, Cell & Environment*, 14(2), 185-193.
- Gläßgen, W. E., Komoşa, D., Bohnenkämper, O., Haas, M., Hertkorn, N., May, R. G., ... & Sander-mann Jr, H. (1999). Metabolism of the herbicide isoproturon in wheat and soybean cell suspension cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63(2), 97-113.
- Greulich, K., Hoque, E., & Pflugmacher, S. (2002). Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3), 256-266.
- Gutnikov, G. (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1), 71-89.
- Hanari, N., Horii, Y., Okazawa, T., Falandysz, J., Bochentini, I., Orlikowska, A., ... & Yamashita, N. (2004). Dioxin-like compounds in pine needles around Tokyo Bay, Japan in 1999. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(4), 305-312.
- Hedtkamp, S. (2002). Untersuchung von Pestiziden in Koniferennadeln. Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg
- Hellström, A., Kylin, H., Strachan, W. M., & Jensen, S. (2004). Distribution of some organochlorine compounds in pine needles from Central and Northern Europe. *Environmental Pollution*, 128(1), 29-48.
- Hilz, E., & Vermeer, A. W. (2013). Spray drift review: The extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. *Crop Protection*, 44, 75-83.

- Hutzinger, O., Reissinger, M., Hauk, H., Reischl, A., Schweitzer, S. & Umlauf, G. (1992). Koniferennadeln als natürliche Sammler organischer Luftinhaltsstoffe. Schlußbericht zur dem BMFT Forschungsvorhaben Förderkennzeichen 0743124-7. Universität Bayreuth
- JKI (2006). Abdrift-Eckwerte. Microsoft Excel Dokument veröffentlicht durch das Julius Kühn Institut. Online: [http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/\\_AT/abdrift-eckwerte/Abdrifteckwerte.xls](http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam_uploads/_AT/abdrift-eckwerte/Abdrifteckwerte.xls) . Abrufdatum: 24.5.2013
- JKI (2008). Analysen des Julius Kühn-Instituts zu Bienenschäden durch Clothianidin. Presseinformation 10. Juni 2008 des Julius Kühn Institutes. Online: [http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/\\_presse/pi\\_2008/08-06-10.pdf](http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam_uploads/_presse/pi_2008/08-06-10.pdf) . Abrufdatum: 12.2.2013
- JKI (2012). Nationaler Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln. Bericht 2008 bis 2011. Berichte aus dem Julius Kühn-Institut 165. Online: <http://pub.jki.bund.de/index.php/BerichteJKI/article/download/1427/2242> . Abrufdatum: 19.5.2013
- Johnson, G. R., Morawska, L., Ristovski, Z. D., Hargreaves, M., Mengersen, K., Chao, C. Y. H., ... & Corbett, S. (2011). Modality of human expired aerosol size distributions. *Journal of Aerosol Science*, 42(12), 839-851.
- Jong, F. D., & Luttik, R. (2003). Effects of atmospheric deposition of pesticides on terrestrial organisms in the Netherlands.
- Kerler, F., & Schönherr, J. (1988). Permeation of lipophilic chemicals across plant cuticles: prediction from partition coefficients and molar volumes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(1), 7-12.
- Kerstiens, G. (2006). Parameterization, comparison, and validation of models quantifying relative change of cuticular permeability with physicochemical properties of diffusants. *Journal of experimental botany*, 57(11), 2525-2533.
- Klánová, J., Čupr, P., Baráková, D., Šeda, Z., Anděl, P., & Holoubek, I. (2009). Can pine needles indicate trends in the air pollution levels at remote sites?. *Environmental Pollution*, 157(12), 3248-3254.
- Klugkist, A. (2008). Analytik von Herbiziden in Nadeln der Waldkiefer – Nachweis in der Gesamtnadel. Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg
- Knäbel, A., Stehle, S., Schäfer, R. B., & Schulz, R. (2012). Regulatory FOCUS surface water models fail to predict insecticide concentrations in the field. *Environmental science & technology*, 46(15), 8397-8404.
- Kramer-Schadt, S., Kaiser, T. S., Frank, K., & Wiegand, T. (2011). Analyzing the effect of stepping stones on target patch colonisation in structured landscapes for Eurasian lynx. *Landscape ecology*, 26(4), 501-513.
- Kühne, R., Ebert, R. U., von der Ohe, P. C., Ulrich, N., Brack, W., & Schüürmann, G. (2013). Read - Across Prediction of the Acute Toxicity of Organic Compounds toward the Water Flea *Daphnia magna*. *Molecular Informatics*, 32(1), 108-120.
- Kylin, H. (1996). Airborne lipophilic pollutants in pine needles. *Environmental Science and Pollution Research*, 3(4), 218-223.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A. A., Wantzen, M., da Silva, C. J., & Zech, W. (2002). Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. *Journal of environmental quality*, 31(5), 1636-1648.
- Laakso, K., Sullivan, J. H., & Huttunen, S. (2000). The effects of UV - B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant, Cell & Environment*, 23(5), 461-472.

- Leistra, M., & Wolters, A. (2004). Computations on the volatilisation of the fungicide fenpropimorph from plants in a wind tunnel. *Water, Air, and Soil Pollution*, 157(1-4), 133-148.
- Mai, C., Theobald, N., Lammel, G., & Hühnerfuss, H. (2013). Spatial, seasonal and vertical distributions of currently-used pesticides in the marine boundary layer of the North Sea. *Atmospheric Environment*.
- Majewski, M., Desjardins, R., Rochette, P., Pattey, E., Seiber, J., & Glotfelty, D. (1993). Field comparison of an eddy accumulation and an aerodynamic-gradient system for measuring pesticide volatilization fluxes. *Environmental science & technology*, 27(1), 121-128.
- McGowan, J. C., & Sowada, R. (1993). Characteristic volumes and properties of surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 58(4), 357-361.
- Messing, P., Farenhorst, A., Waite, D., & Sproull, J. (2012). Influence of usage and chemical-physical properties on the atmospheric transport and deposition of pesticides to agricultural regions of Manitoba, Canada. *Chemosphere*.
- Meyer, D. (2005). Untersuchung zum Ausbreitungsverhalten polyzyklischer aromatischer Verbindungen an teerkontaminierten Standorten, Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg
- Neumann, M., Schulz, R., Schäfer, K., Müller, W., Mannheller, W., & Liess, M. (2002). The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Water Research*, 36(4), 835-842.
- Ng, H. Y. F., & Clegg, S. B. (1997). Atrazine and metolachlor losses in runoff events from an agricultural watershed: the importance of runoff components. *Science of the total environment*, 193(3), 215-228.
- Nieminen, T. M., Derome, J., & Helmisaari, H. S. (1999). Interactions between precipitation and Scots pine canopies along a heavy-metal pollution gradient. *Environmental Pollution*, 106(1), 129-137.
- NRW (2013). Minister Remmel: Belastung der Ruhr mit Mikroschadstoffen ist ernstes Thema. *Presseinformation – 79/1/2013 der Landesregierung Nordrhein-Westfalen*. Online: <http://www.lanuv.nrw.de/veroeffentlichungen/presse/mkulnv01022013.pdf> . Abrufdatum: 20.5.2013
- Nuyttens, D., De Schampheleire, M., Baetens, K., Brusselman, E., Dekeyser, D., & Verboven, P. (2011). Drift from field crop sprayers using an integrated approach: results of a 5 year study. *Transactions of the ASABE*, 54(2), 403-408.
- Nuyttens, D., Devarrewaere, W., Verboven, P., & Foqué, D. (2013). Pesticide - laden dust emission and drift from treated seeds during seed drilling: a review. *Pest Management Science*.
- OECD (2006). OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test 208. Adopted: 19 July 2006. Online: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test\\_9789264070066-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test_9789264070066-en) . Abrufdatum: 22.5.2013
- OECD (2006A). OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test 227. Adopted: 19 July 2006. Online: [http://www.oecd-ilibrary.org/test-no-227-terrestrial-plant-test-vegetative-vigour-test\\_519gc7rvtcf5.pdf](http://www.oecd-ilibrary.org/test-no-227-terrestrial-plant-test-vegetative-vigour-test_519gc7rvtcf5.pdf) . Abrufdatum: 22.5.2013
- OECD (2006B). OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method. 123. Adopted: 23 March 2006. Online: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712301e.pdf> . Abrufdatum: 11.4.2013
- Pang, G. F., Liu, Y. M., Fan, C. L., Zhang, J. J., Cao, Y. Z., Li, X. M., ... & Guo, T. T. (2006). Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas

- chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(6), 1366-1408.
- Pierce, S. M., Chan, K. B., & Zhu, H. (2007). Residual patterns of alkyl polyoxyethylene surfactant droplets after water evaporation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(1), 213-219.
- Plantan (2004). Beipackzettel/Etikett des Pflanzenschutzmittels Orefa IPU SC 500. Plantan Düngemittel GmbH, Buchholz
- Popp, C., Burghardt, M., Friedmann, A., & Riederer, M. (2005). Characterization of hydrophilic and lipophilic pathways of *Hedera helix* L. cuticular membranes: permeation of water and uncharged organic compounds. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2797-2806.
- Quaghebeur, D., De Smet, B., De Wulf, E., & Steurbaut, W. (2004). Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: results from the monitoring program 1997–2001. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(3), 182-190.
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carluer, N., & Coquery, M. (2010). Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment—Effect of sampling frequency. *Environmental Pollution*, 158(3), 737-748.
- Rappolder, M., Schröter-Kermani, C., Schädel, S., Waller, U., & Körner, W. (2007). Temporal trends and spatial distribution of PCDD, PCDF, and PCB in pine and spruce shoots. *Chemosphere*, 67(9), 1887-1896.
- Ratola, N., Alves, A., Kalogerakis, N., & Psillakis, E. (2008). Hollow-fibre liquid-phase microextraction: A simple and fast cleanup step used for PAHs determination in pine needles. *analytica chimica acta*, 618(1), 70-78.
- Ressler, H., Klein, O., & Lefèvre, M. (2009). Pflanzenschutz: Neue Gesetze und ihr Nutzen. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 21(6), 494-500.
- Riederer, M. (1990). Estimating Partitioning and Transport of Organic Chemicals in the Foliage/Atmosphere System: Discussion of a Fugacity-Based Model. *Environmental science & technology*, 24(6), 829-837.
- Riederer, M., Müller, C. (2006). *Biology of the Plant Cuticle (Annual Plant Reviews)*. Blackwell Publishing Ltd, Band 23
- Röpke, B., Bach, M., & Frede, H. G. (2004). DRIPS--a decision support system estimating the quantity of diffuse pesticide pollution in German river basins. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 49(3), 149.
- Rostagno, M. A., Prado, J. M., & Kraus, G. A. (Eds.). (2013). *Natural Product Extraction: Principles and Applications (Vol. 21)*. Royal Society of Chemistry.
- Sabljić, A., Guesten, H., Schoenherr, J., & Riederer, M. (1990). Modeling plant uptake of airborne organic chemicals. 1. Plant cuticle/water partitioning and molecular connectivity. *Environmental science & technology*, 24(9), 1321-1326.
- Scheyer, A., Morville, S., Mirabel, P., & Millet, M. (2006). Analysis of trace levels of pesticides in rainwater using SPME and GC–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(2), 475-487.
- Scheyer, A., Morville, S., Mirabel, P., & Millet, M. (2007). Pesticides analysed in rainwater in Alsace region (eastern France): comparison between urban and rural sites. *Atmospheric Environment*, 41(34), 7241-7252.
- Schreiber, L. (2005). Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany*, 95(7), 1069-1073.
- Schreiber, L., & Schönherr, J. (1992). Uptake of organic chemicals in conifer needles: surface adsorption and permeability of cuticles. *Environmental science & technology*, 26(1), 153-159.

- Schreiber, L., & Schönherr, J. (1993). Contact areas between waxy leaf surfaces and aqueous solutions: Quantitative determination of specific leaf surface contact areas. *Journal of experimental botany*, 44(11), 1653-1662.
- Schreiber, L., & Schönherr, J. (1993A). Uptake of two chlorinated chemicals in conifer needles: reversibility and compartmental analysis. *New phytologist*, 123(3), 547-554.
- Schreiber, L., Kirsch, T., & Riederer, M. (1996). Transport properties of cuticular waxes of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst.: Estimation of size selectivity and tortuosity from diffusion coefficients of aliphatic molecules. *Planta*, 198(1), 104-109.
- Schreiber, L. (2002). Co-permeability of 3 H-labelled water and 14 C-labelled organic acids across isolated *Prunus laurocerasus* cuticles: effect of temperature on cuticular paths of diffusion. *Plant, Cell & Environment* 25, 1087-1094
- Schreiber, L., Schönherr, J. (2009). *Water and Solute Permeability of Plant cuticles*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Schroll, R., Grundmann, S., Dörfler, U., Ruth, B., & Munch, J. C. (2008). Lysimeter experiments to investigate the fate of chemicals in soils—comparison of five different lysimeter systems. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, 8(2), 209-216.
- Schummer, C., Mothiron, E., Appenzeller, B. M., Rizet, A. L., Wennig, R., & Millet, M. (2010). Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. *Environmental Pollution*, 158(2), 576-584.
- Siminszky, B. (2006). Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 5(2-3), 445-458.
- Simonich, S. L., & Nanus, L. (2012). Sierra Nevada-Southern Cascades (SNSC) region air contaminants research and monitoring report. For the Sierra Nevada-Southern Cascades Steering Committee.
- Singh, S., Kirkwood, R. C., & Marshall, G. (1998). Effect of the Monooxygenase Inhibitor Piperonyl Butoxide on the Herbicidal Activity and Metabolism of Isoproturon in Herbicide Resistant and Susceptible Biotypes of *Phalaris minor* and Wheat. *Pesticide biochemistry and physiology*, 59(3), 143-153.
- Smolka, S. (2009). Das neue EU-Pestizidrecht: Chance und Herausforderung für eine Minimierung von Pestizidrisiken in der konventionellen Landwirtschaft. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 21(6), 490-493.
- Söndgerath, D., & Schröder, B. (2002). Population dynamics and habitat connectivity affecting the spatial spread of populations—a simulation study. *Landscape Ecology*, 17(1), 57-70.
- St-Amand, A. D., Mayer, P. M., & Blais, J. M. (2007). Modeling atmospheric vegetation uptake of PBDEs using field measurements. *Environmental science & technology*, 41(12), 4234-4239.
- Štajnbaher, D., & Zupančič-Kralj, L. (2003). Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015(1), 185-198.
- Stark, A.-K. (2007). Analytik mittels HPLC/MS und Probenvorbereitung polarer Herbizide in Wachsextrakten der Waldkiefer (*Pinus Sylvestris* L.). Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg
- Statistisches Bundesamt (2013). Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Bodenfläche nach Art der tatsächlichen Nutzung. Bericht des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden 2013. Online: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/Flaechennutzung/BodenflaechennutzungPDF\\_2030510.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/Flaechennutzung/BodenflaechennutzungPDF_2030510.pdf?__blob=publicationFile) . Abrufdatum: 20.5.2013
- Streloke, M. (2011). Risk assessment and management of herbicides: obligations of the new EU regulations. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(1), 55-59.

- Tiryaki, O., & Temur, C. (2010). The fate of pesticide in the environment. *Journal of Biological Environmental Science*, 4(10), 29-38.
- Tomlin, C. (2003). *The Pesticide Manual, A World Compendium (2003)*. British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom.
- Trapp, S. (2004). Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 11(1), 33-39.
- UBA (2013). Umweltprobenbank des Bundes - Kiefer. Internetseite der Umweltprobenbank des Bundes. Online: [http://www.umweltprobenbank.de/de/documents/profiles/specimen\\_types/10099](http://www.umweltprobenbank.de/de/documents/profiles/specimen_types/10099) . Abrufdatum: 25.5.2013
- Ucar, T., Hall, F. R., Tew, J. E., & Hacker, J. K. (2003). Wind tunnel studies on spray deposition on leaves of tree species used for windbreaks and exposure of honey bees. *Pest management science*, 59(3), 358-364.
- Van den Berg, F., Kubiak, R., Benjey, W. G., Majewski, M. S., Yates, S. R., Reeves, G. L., ... & Van der Linden, A. M. A. (1999). Emission of pesticides into the air. *Water, Air, and Soil Pollution*, 115(1-4), 195-218.
- van Dijk, H. F., & Guicherit, R. (1999). Atmospheric dispersion of current-use pesticides: A review of the evidence from monitoring studies. *Water, Air, and Soil Pollution*, 115(1-4), 21-70.
- VDLUFA (2005). Methodische Anpassung des Analysenverfahrens zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenschutzmittel in ausgewählten be- und verarbeiteten Futtermitteln (Multiverfahren). Forschungsprojekt Nr. 04 HS 042. Juni 2005. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V.
- Villa, S., Finizio, A., Diaz, R. D., & Vighi, M. (2003). Distribution of organochlorine pesticides in pine needles of an oceanic island: The case of Tenerife (Canary Islands, Spain). *Water, Air, and Soil Pollution*, 146(1-4), 335-349.
- WAZ (2013). Trinkwassergefahr durch Biozide - das Gift kommt aus der Hauswand. WAZ NewMedia GmbH & Co. KG. Online Artikel: <http://www.derwesten.de/region/trinkwassergefahr-durch-biozide-das-gift-kommt-aus-der-hauswand-id7546078.html> . Abrufdatum: 20.5.2013
- WDR (2013). Diskussion um Schadstoffe in Gewässern: Gefährliche Biozid-Belastung in Flüssen und Seen?. Westdeutscher Rundfunk Köln. Online Artikel: <http://www1.wdr.de/themen/politik/biozide100.html> . Abrufdatum: 20.5.2013
- Weisser, P., Landfried, M., & Koch, H. (2002). Off-crop drift sediments on plant surfaces-exposure of non-target organisms. *Aspects of Applied Biology*, 66, 225-230.
- Wenzel, K. D., Manz, M., Hubert, A., & Schüürmann, G. (2002). Fate of POPs (DDX, HCHs, PCBs) in upper soil layers of pine forests. *Science of the total environment*, 286(1), 143-154.
- Wild, E., Dent, J., Barber, J. L., Thomas, G. O., & Jones, K. C. (2004). A novel analytical approach for visualizing and tracking organic chemicals in plants. *Environmental science & technology*, 38(15), 4195-4199.
- Woodwell, G. M., Wurster, C. F., & Isaacson, P. A. (1967). DDT residues in an east coast estuary: a case of biological concentration of a persistent insecticide. *Science*, 156(3776), 821-824.
- Yates, S. R. (2006). Simulating herbicide volatilization from bare soil affected by atmospheric conditions and limited solubility in water. *Environmental science & technology*, 40(22), 6963-6968.
- Zunker, I. (2008). Charakterisierung des verteilungsverhaltens moderner Herbizide zwischen Nadeln der Waldkiefer *Pinus Sylvestris* L. und wässriger Phase. Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg

## 8 Anhang

### 8.1 Chemikalien und Geräte

#### Chemikalien und Labormaterial

Laborchemikalien	Chemikalien	Spezifikationen Reinheiten	/ Lieferant
	Ethylacetat	Rotisolv HPLC	Roth
	Acetonitril	Chromanorm	VWR
	Dichlormethan	Rotisolv HPLC	Roth
	Methanol	HPLC / Hipersolv	VWR
	Essigsäure	96 %	Merck
	Phosphorsäure	Normapur (85%)	VWR
	Ethylenglycol	z.A.	Merck
	Ameisensäure	98 %	Merck
	Natriumhydroxid	z.A.	Merck
	Salzsäure	32 % zur Analyse	Merck
	Hexan	Lichrosolv	Merck
	Ammoniumsulfat	z.A.	Merck
	Harnstoff	z.A.	Merck
	Ammoniumnitrat	z.A.	Merck
	Tetrahydrofuran	99 %	JT Baker
	Citronensäure-Mono- hydrat	Empore	Merck
	Natriumazid	reinst	Merck
	Natriumsulfat	z.A. wasserfrei	Merck
	N-Methylsulfonium- hydroxid (TMSH)		Macherey-Nagel
Festphasenextrakti- onskartuschen	Lichrolut EN 200 mg	3 ml Reservoir	Merck
	Lichrolut NH <sub>2</sub> 500 mg	3 ml Reservoir	Merck
Vials	Klarglasvials 22 ml	Mit PTFE Deckelein- sätzen	Supelco

	Braunglas 1,8 ml	Schraubdeckel und Krimpdeckel	VWR
Referenzstandards	2,4-D	98 %	Ehrenstorfer
	Aclonifen	98,8	Ehrenstorfer
	Alachlor	99 %	Riedel-de Haen
	Atrazin	99 %	Riedel-de Haen
	Atrazin desethyl	97,5 %	Ehrenstorfer
	Atrazin desisopropyl	99,5 %	Ehrenstorfer
	Bentazon	97 %	Ehrenstorfer
	Bifenox	99 %	Ehrenstorfer
	Bromoxynil	98 %	Ehrenstorfer
	Bromoxynil-octanoat	99 %	Ehrenstorfer
	Chlortoluron	97,5 %	Ehrenstorfer
	Chlethodim	98 %	Chem Service Inc.
	Desmedipham	99,5 5	Ehrenstorfer
	Diflufenican	99,5%	Ehrenstorfer
	Dimethachlor	99 %	Ehrenstorfer
	Diuron	97,5 %	Ehrenstorfer
	Ethofumesat	98,5%	Ehrenstorfer
	Fenoxaprop-p-ethyl	99 %	Ehrenstorfer
	Fluazifop-p-butyl	98 %	Ehrenstorfer
	Flufenacet	99 %	Ehrenstorfer
	Fluroxypyr-meptyl	99,5 %	Ehrenstorfer
	Fluroxypyr	97 %	Ehrenstorfer
	Flurtamone	98 %	Ehrenstorfer
	Haloxyfop	99,5 %	Ehrenstorfer
	Haloxyfop-methyl	99 %	Ehrenstorfer
	Haloxyfop-ethoxyethyl	99 %	Ehrenstorfer
	Isoproturon	99 %	Ehrenstorfer
	Isoproturon D6	certified	Ehrenstorfer
	mono-desmethyl-Isoproturon		Ehrenstorfer
	2-hydroxy-Isoproturon	94 %	Freundlicherweise von der Firma Bayer



2-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon	95,3 %	Crop Science zur Verfügung gestellt
1-hydroxy-monodesmethyl-Isoproturon	97,6 %	
di-desmethyl-Isoproturon		Ehrenstorfer
Linuron	99,8 %	Ehrenstorfer
MCPA	99 %	Ehrenstorfer
Mefenpyr-diethyl	99 5	Ehrenstorfer
Metamitron	99,4 %	Ehrenstorfer
Metazachlor	98,1 %	Ehrenstorfer
Metolachlor	99 %	Ehrenstorfer
Metsulfuronmethyl	99,5 5	Ehrenstorfer
Napropamid	99,9 %	Ehrenstorfer
PCP	99 %	Riedel-de Haen
Pendimethalin	99,5 5	Ehrenstorfer
Phenmedipham	98 %	Ehrenstorfer
Picolinafen	97,5 %	Ehrenstorfer
Propachlor	99 %	Riedel-de Haen
Propanil	99,9 %	Ehrenstorfer
Propaquizafop	95 %	Ehrenstorfer
Propyzamid	99 5	Ehrenstorfer
Prosulfocarb	96,5 %	Ehrenstorfer
Pyridate	98,5 %	Ehrenstorfer
Quizalofop-p-ethyl	99,8 %	Ehrenstorfer
Simazin	98,5 %	Ehrenstorfer
Terbuthylazin	99 %	Riedel-de Haen
Terbuthylazin-desethyl	96 %	Ehrenstorfer
Terbutryn	99 %	Ehrenstorfer
Triallate	99 %	Ehrenstorfer
Trifluralin	99 %	Ehrenstorfer
Trinexapac-ethyl	99 %	Ehrenstorfer

## Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Massenspektrometer LC-MS	API 165 PE Sciex	Applied Biosystems
ESI-Interface	Turbo-Ionspray	Applied Biosystems
Autosampler HPLC	Series 200 Autosampler	Perkin Elmer
Pumpe HPLC	Series 200 LC Pump	Perkin Elmer
Entgaser	DG-98050 3-Line	Jasco
Säulenofen	Mistral	Spark
HPLC-Säule	LiChrospher 100 LiChrocart 250-4 RP 18 ec 5 µm	Merck
Chromatographie-Software	Analyst 1.1	MSD Sciex
Massenspektrometer GC-MS	Trace DSQ	Thermo Finnigan
Gaschromatograph	Trace GC	Thermo Finnigan
Chromatographie-Software	Xcalibur Version 1.3	Thermo Finnigan
GC-ECD	GC-ECD PE Autosystem	Perkin Elmer
GC-Säule	Optima MS-5, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	Macherey-Nagel
pH-Messgerät	TH pH 197 , Sentix 41 pH- Elektrode	WTW
Reinstwasseranlage	18,2 Mohm, 4-Kartuschen- system, 0,2 µm Filter	Membra Pure
Tischschüttler	KS 063 AM	Jürgens/Bühler
Temperatursensor	Digitalthermometer	Lehrmittelbau Maey
Flachbettschreiber	L 650	Linseis
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph
Zentrifugen	Labofuge 400	Heraeus
	Megafuge 1	
	Labofuge 200	
Analysenwaage	AT261 DeltaRange	MettlerToledo
Heizdrahtanemometer	Thermisches Anemometer 641 N	Lambrecht
Aspirationspsychrometer	Aspirationspsychrometer 761	Lambrecht

UV/VIS-Spektrometer	Lambda 45	Perkin Elmer
---------------------	-----------	--------------

## 8.2 Chromatographische Methoden

### Methode zur Messung von Isoproturon und seinen Abbauprodukten Mittels HPLC-MS, Anwendung im Verteilungsversuch Abschnitt 4.3.3

#### Gerät:

API 165 (Applied Biosystems), LC 200 Pumpe und Autosampler (Perkin Elmer)

#### 1. Autosampler:

Injektionsvolumen: 30 µl

#### 2. Säule:

LiChrospher 100 LiChrocart 250-4 RP 18 ec 5 µm (Merck)

#### 3. HPLC-Pumpe:

Flussrate: 1000 µl/min

Gradient aus Acetonitril und Reinstwasser (0,1 % v/v Ameisensäure)

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0	90	10
25	45	55
26	0	100
36	0	100
37	90	10
42	90	10

#### 4. Massenspektrometer:

Ionisierungsspannung: 5100 V

Turbagastemperatur: 300 °C

Turbogas: 8 l/min

Parameter zur Messung der Analyte (DP=Declustering Potential, FP = Focusing Potential)

	Zeitfenster [min]	Molekülmasse und Fragment [M/Z]	DP [V]	FP [V]	Messdauer [ms]
2-hydroxy-monodesmethyl-IPU	8,4-10,8	209	22	110	1300
		134	57	168	400
		94	57	168	400
1-hydroxy-monodesmethyl-IPU	8,4-10,8	209	22	110	1300
		134	57	168	400
		94	57	168	400
2-hydroxy-IPU	10,8-15,8	223	22	110	1300
		134	57	168	700
di-desmethyl-IPU	15,8-21,0	179	22	110	1200
		94	57	168	700
monodesmethyl-IPU	21,0-23,0	193	22	110	1200
		94	57	168	600
Isoproturon und Isoproturon D6	23,0-28	207	22	110	600
		72	57	168	200
		213	22	110	600
		78	57	168	200

## Methode zur Messung 13 unpolarer Herbizide mittels GC-ECD (Anwendung im Abschnitt 4.4.2.1)

### Gerät:

GC-ECD PE Autosystem (Perkin Elmer)

### 1. Autosampler:

Injektionsvolumen: 1  $\mu$ l

### 2. Säule, Injektor und Gasfluss

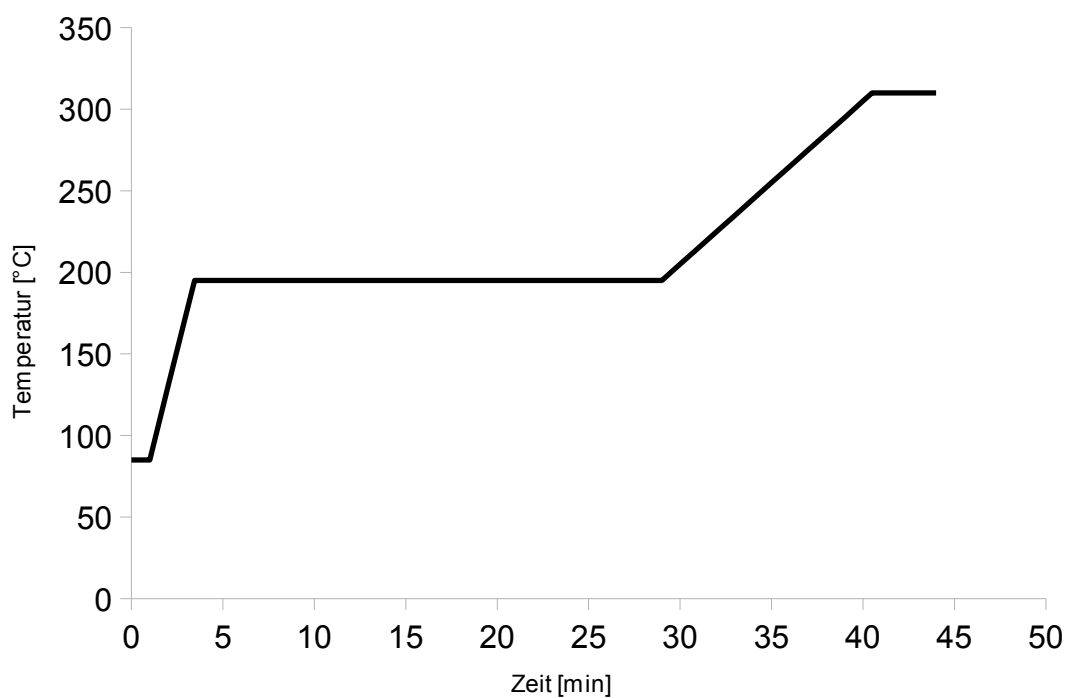
Optima MS-5, 30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m (Macherey-Nagel)

Gasfluss: 1 ml/min

Injektortemperatur: 200 °C

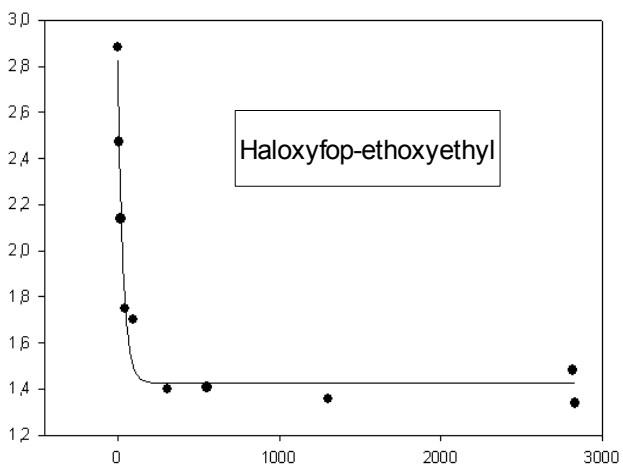
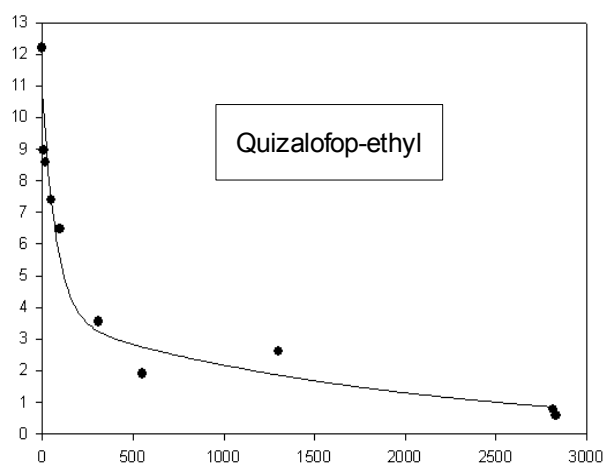
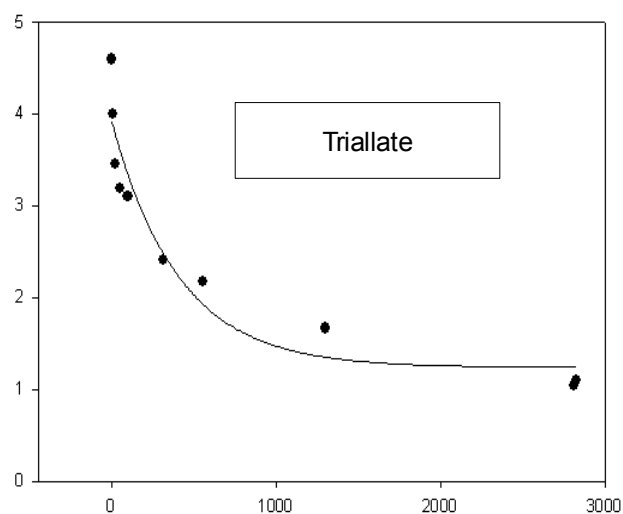
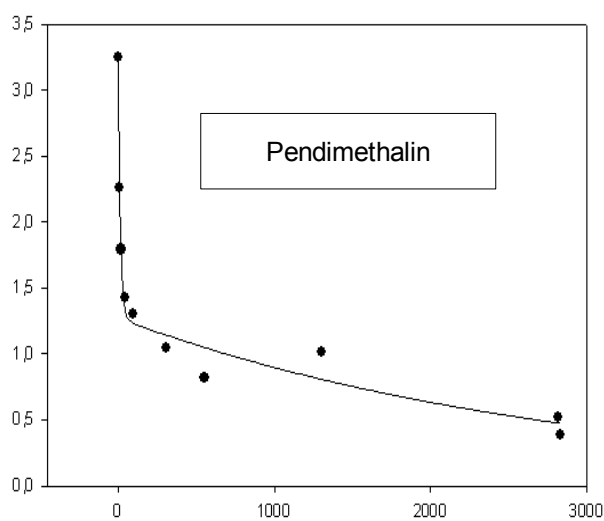
Split: splitless, 0,5 min; Split-Flow 30 ml/min

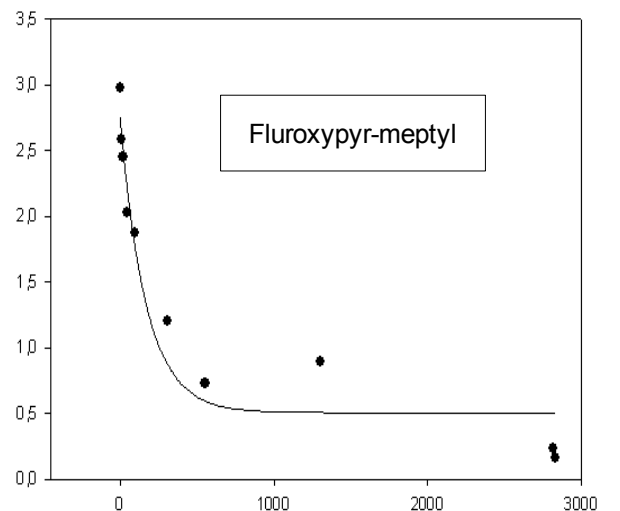
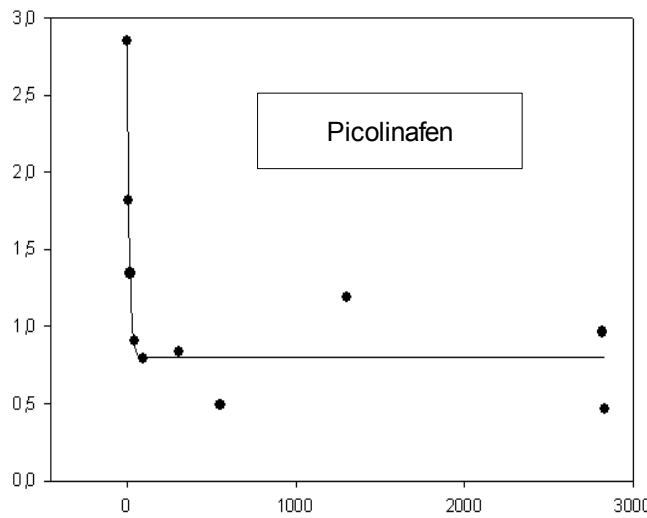
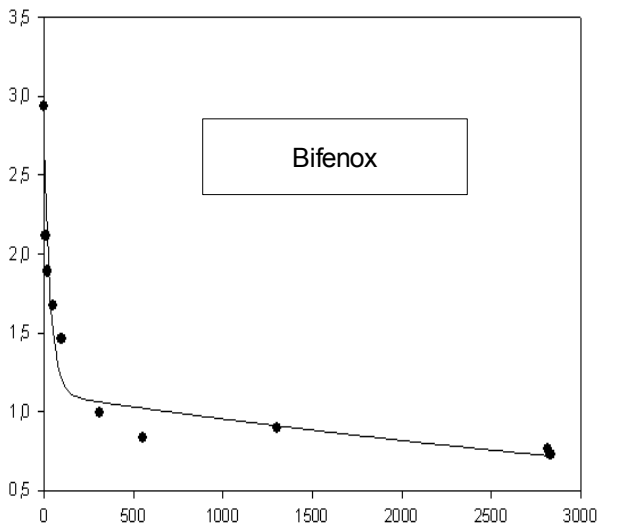
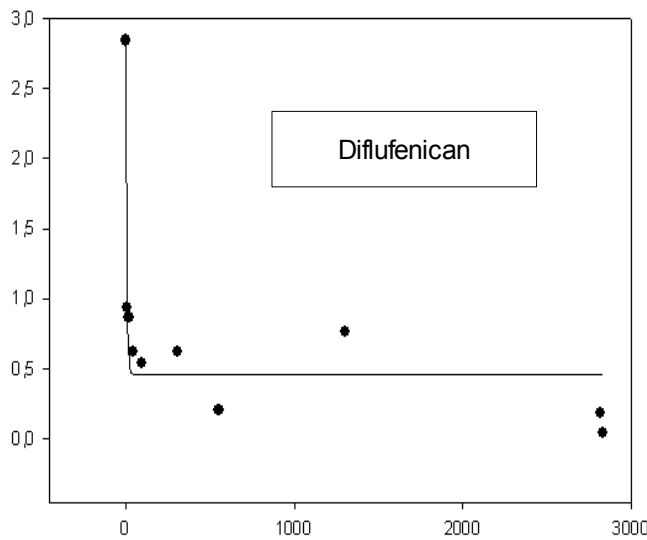
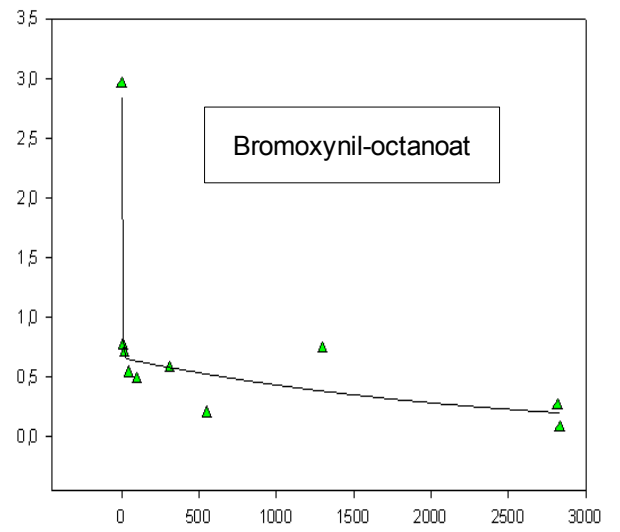
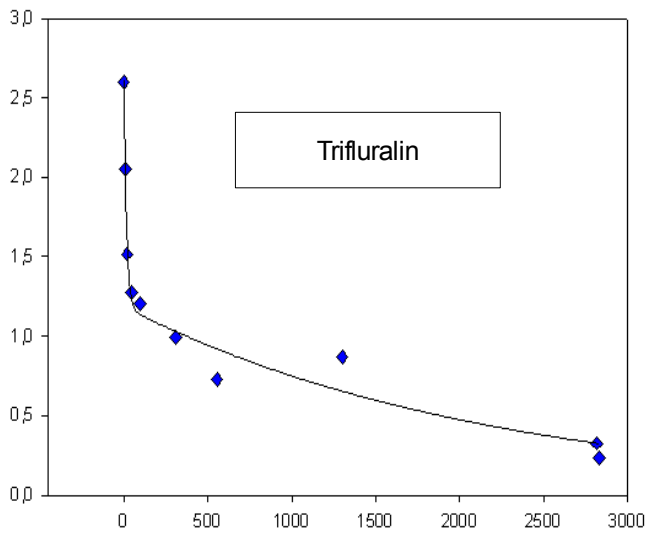
### 3. Temperaturprogramm:

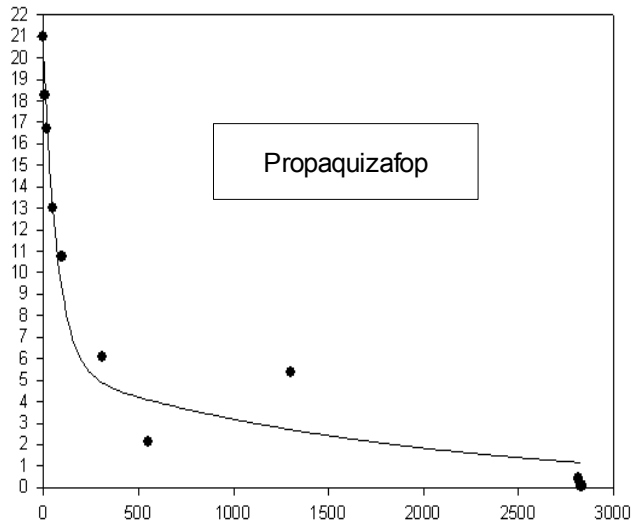
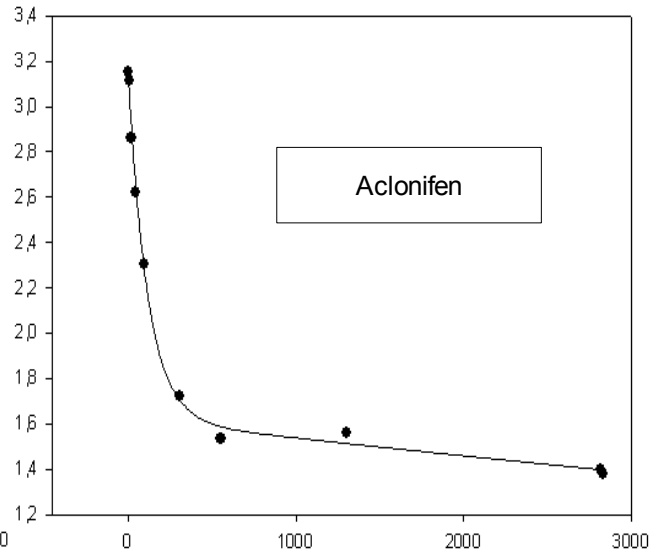
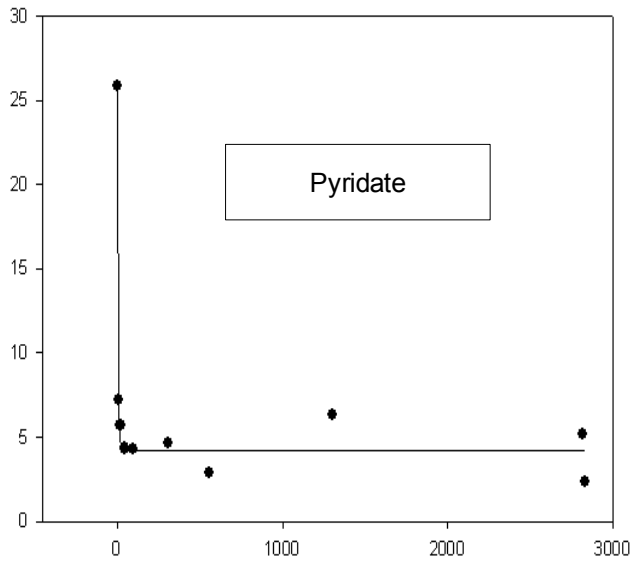


### 8.3 Konzentrationsverläufe des Verteilungsversuches: parallele Ansätze der wässrigen Phase

Konzentrationsverläufe der Herbizide des im Abschnitt 4.3.2.1 beschriebenen Verteilungsversuches (alle Abszissen:  $t$  [min], alle Ordinaten: Konzentration in der wässrigen Phase [ $\mu\text{g/l}$ ]).









Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die biexponentielle Regressionsanalyse (vergleiche Abschnitt 5.1.1) der dargestellten Konzentrationsverläufe

	Bestimmtheitsmaß $R^2$
Aclonifen	0,9970
Bifenox	0,9445
Bromoxynil-octanoat	0,9562
Diflufenican	0,9434
Fluroxypyr-meptyl	0,9771
Haloxypop-ethoxyethyl	0,9767
Pendimethalin	0,9786
Picolinafen	0,9141
Propaquizafop	0,9696
Pyridate	0,9724
Quizalofop-ethyl	0,9594
Triallate	0,9851
Trifluralin	0,9787

## 8.4 Kalibration des Verteilungsversuches: parallele Ansätze der wässrigen Phase

Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß der Kalibration für den im Abschnitt 4.3.2.1 beschriebenen Verteilungsversuch von 13 Herbiziden zwischen intakten Kiefernnadeln und wässriger Phase

	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>
Aclonifen	$y=14629x-2852$	0,9994
Bifenox	$y=34481x-20273$	0,9998
Bromoxynil-octanoat	$y=38365x-15471$	0,9997
Diflufenican	$y=14022x-970$	0,9994
Fluroxypyr-meptyl	$y=16050x-3099$	0,9995
Haloxyfop-ethoxyethyl	$y=14635x-2654$	0,9996
Pendimethalin	$y=11881x-8215$	0,9976
Picolinafen	$y=23860x-21460$	0,9997
Propaquizafop	$y=3781x+3393$	0,9916
Pyridate	$y=24033x-72765$	0,9921
Quizalofop-ethyl	$y=12932x+29144$	0,9958
Triallate	$y=14140x+10582$	0,9987
Trifluralin	$y=13633x+27840$	0,9956