



Bewertung persistenter, bioakkumulierender und toxischer Eigenschaften von ionischen und ionisierbaren Stoffen

Daniela Claßen (daniela.classen@UBA.de), Juliane Ackermann (juliane.ackermann@UBA.de), Stephan Brendel (stephan.brendel@UBA.de), Fachgebiet IV 2.3 „Chemikalien“ Umweltbundesamt

Zusammenfassung

Das aktuell gültige Konzept der REACH-Verordnung ermöglicht keine hinreichende Bewertung persistenter (P), bioakkumulierender (B) und toxischer (T) Eigenschaften von ionischen Stoffen. Von zentraler Bedeutung für die PBT-Bewertung ist die Abschätzung der Adsorption von Stoffen an Umweltmedien sowie ihrer Anreicherung in Organismen. Das Adsorptionsverhalten ionischer Stoffe unterscheidet sich stark von dem neutraler Stoffe und kann daher nicht mit dem $\log K_{ow}$ abgeschätzt werden, sondern verlangt nach einer experimentellen Adsorptionsstudie. Als Screeningparameter für das Bioakkumulationspotential kann anstelle des $\log K_{ow}$ der D_{MW} (Membran-Wasser-Verteilungskoeffizient) genutzt werden. Bei ionisierbaren Stoffen muss der pH-Wert von Testsystemen wenn möglich so gewählt werden, dass die neutrale Spezies getestet wird.

Einleitung

Das Bewertungskonzept zur Identifizierung persistenter, bioakkumulierender und toxischer (PBT-) Stoffe wurde für neutrale organische Stoffe entwickelt. Jedoch liegen nach einer Auswertung von Franco et al. (2010) 49% der unter REACH registrierten Stoffe im umweltrelevanten pH-Bereich (pH 4-10; ECHA 2016) ionisch vor. Die Eigenschaften ionischer und ionisierbarer Stoffe und ihr Umweltverhalten werden stark durch ihre chemische Ladung beeinflusst. Funktionelle Gruppen, wie z.B. alkoholische und phenolische Hydroxylgruppen, Carboxyl-Sulfonsäure- und Thiolgruppen, sowie Amine sind kennzeichnend für ionische und ionisierbare Stoffe. Die Dissoziationskonstante (pK_a) ionisierbarer Stoffe liegt im umweltrelevanten pH-Bereich, so dass in Abhängigkeit vom pH des umgebenden Umweltkompartiments die neutrale oder ionische Spezies des Stoffes dominiert. Ionische Stoffe (IOS) treten in der Umwelt nur als ionische Spezies auf. Herausforderungen, die sich bei der PBT-Bewertung organischer Ionen im Rahmen der REACH-VO (EC No 1907/2006) ergeben, werden im Folgenden erläutert.

Persistenz

Für die Bewertung des Abbauverhaltens von Stoffen stehen Simulationstests mit drei verschiedenen Umweltkompartimenten zur Verfügung (OECD 307, Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil; OECD 308, Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems; OECD 309, Aerobic Mineralisation in Surface Water). Welches Umweltkompartiment für eine experimentelle Prüfung der Abbaubarkeit und weiterer Endpunkte gewählt wird, hängt u.a. stark vom Adsorptionsverhalten eines Stoffes ab. So ist nur für Stoffe mit hohem Adsorptionspotential die Untersuchung des Abbaus in

Boden oder Sediment vorgesehen (REACH Anhang IX, 9.2.1.). Adsorbierte Stoffe werden generell als weniger zugänglich für Mikroorganismen angesehen, die bevorzugt oder ausschließlich gelöste Stoffe abbauen (Boivin et al. 2005). Wird zur Bestimmung der Abbaubarkeit adsorptiver Stoffe ein Testsystem mit Oberflächenwasser und geringer organischer und mineralischer Adsorptionsoberfläche gewählt, kann dies zu einer Überschätzung des Abbaus dieser Stoffe führen.

Die Adsorption, also die Verteilung von Stoffen zwischen fester und flüssiger Bodenphase im Gleichgewichtszustand, wird experimentell über die Batch-Equilibriummethode (OECD 106, Adsorption- Desorption Using a Batch Equilibrium Method) bestimmt und als Adsorptionskoeffizient K_d ausgedrückt. Der Adsorptionskoeffizient K_d - normalisiert auf den Anteil an organischen Kohlenstoff im Boden - wird als K_{oc} bezeichnet. Für Stoffe mit einem Produktions- oder Importvolumen ≥ 10 t/a ist mit einer Registrierung eine Adsorptionsstudie obligatorisch vorzulegen. Auf die experimentelle Untersuchung der Adsorption von Stoffen an mineralische und organische Bodenbestandteile kann verzichtet werden, wenn die physikochemischen Stoffeigenschaften (z.B. niedriger Verteilungskoeffizient n Oktanol/Wasser [$\log K_{ow}$]) auf ein geringes Adsorptionspotential hinweisen (REACH Anhang VIII, 9.3.1.).

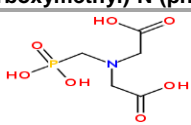
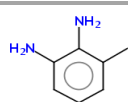
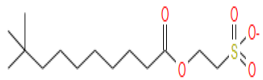
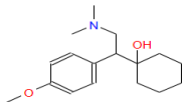
Das Verteilungsverhalten zwischen n -Oktanol und Wasser wird durch den $\log K_{ow}$ beschrieben und ist bei vielen IOS sehr niedrig. Daher wird ein geringes Adsorptionspotential angenommen. Jedoch zeigt eine Auswahl unter REACH registrierter IOS mit niedrigem $\log K_{ow}$ ($< 0,4$) gleichzeitig einen hohen K_{oc} (> 1000 L/kg), was wiederum auf eine starke Adsorption an Boden hinweist (Tab.1). Für IOS ist die Abschätzung der Adsorption an Boden (K_d , K_{oc}) mittels $\log K_{ow}$ daher oft nicht möglich.

Der $\log K_{ow}$ bildet nicht alle Adsorptionsprozesse von IOS im Boden ab und ist daher nicht zur Abschätzung ihres Adsorptionsverhaltens in der Umwelt geeignet. Im Gegensatz zu neutralen Stoffen, bei denen die Adsorption an Boden u.a. auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, spielen bei IOS auch elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Die Bewertung der Adsorption von IOS anhand des $\log K_{ow}$ kann zur Unterschätzung ihrer Adsorptionsstärke und zur Überschätzung ihres Abbaus in Testsystemen mit geringer Adsorptionsoberfläche führen. Die experimentelle Bestimmung der Adsorption von IOS ist daher grundlegend für die Bewertung ihrer Persistenz in der Umwelt.

Bioakkumulation

Das Potential zur Anreicherung von Stoffen in Organismen wird mit dem $\log K_{ow}$ als Maß für ihre Hydrophobizität abgeschätzt (ECHA 2014). Da die n-Oktanolphase und das unpolare Fettgewebe in Organismen ähnliche Eigenschaften aufweisen, steht die n-Oktanolphase modellhaft für das unpolare Fettgewebe.

Tab.1: Ionische und ionisierbare REACH-Stoffe mit pKa, $\log K_{ow}$ und K_{oc} .

| Name und Strukturformel | pKa | $\log K_{ow}$ | K_{oc} [L/kg] |
|--|--|---------------|-----------------|
| N-(carboxymethyl)-N-(phosphonomethyl)glycine  | pKa 1= 2,0 pKa 2= 2,3 pKa 3= 5,6 pKa 4=10,8 | < 0 | 6200 |
| 1,2-Diaminotoluene  | pKa 1= 5,1 pKa 2= 3,1 | -0,1 | 2571 |
| Sodium 2-sulphonatoethyl laurate  | pKa= 0,4 | 0,3 | 1451 |
| 1-[2-(dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]cyclohexanol  | pKa= 9,4 | >0,4 | 1425 |

Alle Daten sind experimentell bestimmt und wurden der öffentlichen ECHA-Datenbank entnommen.

Unter der Annahme, dass sich Stoffe im unpolaren Fettgewebe von Organismen anreichern und diese Anreicherung mit der Hydrophobizität dieser Stoffe und dem Fettgehalt von Organismen korreliert, wird das Verteilungsverhalten n-Oktanol/Wasser auf Organismen übertragen (Ehrlich et al. 2011). Der $\log K_{ow}$ wird als Screening-Kriterium verwendet, um die Notwendigkeit der Durchführung einer Bioakkumulationsstudie mit Fischen (OECD 305, Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure) zu begründen (ECHA 2014). IOS sind oft hydrophiler und weisen einen niedrigen $\log K_{ow}$ auf, weshalb das Bioakkumulationspotential dieser Stoffe als gering bewertet wird. IOS können jedoch auch in Organismen aufgenommen werden und an Proteine oder Phospholipide der Zellmembranen binden. So zeigt eine Studie von Bittermann et al. (2014), dass Ionen mit hydrophobem Rest in Membranlipiden akkumulieren und daher potentiell bioakkumulierend sein können.

Das Potential zur Anreicherung in Membranlipiden wird durch den $\log K_{ow}$ nicht abgebildet. Die alternative Verwendung des $\log D$ stellt als Screening-Kriterium für die Bioakkumulation von IOS keine optimale Lösung dar. Der $\log D$ bildet den $\log K_{ow}$ in Abhängigkeit des pH-Wertes ab (Kah und Brown 2008). Für

ionisierbare Stoffe steigt die $\log D$ -Kurve mit dem Anteil der neutralen Spezies an. Da bei ionisierbaren Stoffen im Allgemeinen die neutrale Spezies stärker bioakkumuliert, kann der $\log D$ zwar hilfreich sein, um das Bioakkumulationspotential in Abhängigkeit vom pH-Wert abzuschätzen. Für IOS, die in der Umwelt nur als ionische Spezies auftreten, ist der $\log D$ jedoch ungeeignet. Wie der $\log K_{ow}$ bildet auch der $\log D$ nur das Anreicherungspotential in unpolaren Fettgeweben ab, nicht jedoch das in Membranlipiden (Escher und Schwarzenbach 1996).

Das Anreicherungspotential in Membranlipiden kann mit dem Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten (D_{MW}) modellhaft abgeschätzt werden und eignet sich, um die allgemeine Aufnahmekapazität von IOS für Organismen einzuschätzen (Armitage et al. 2013). Je höher der D_{MW} , desto stärker akkumulieren Stoffe in Membranlipiden. Dieser Verteilungskoeffizient kann sowohl experimentell bestimmt (Avdeef et al. 1998), als auch mathematisch berechnet werden (Bittermann et al. 2014). Experimentell wird der D_{MW} häufig modellhaft mit dem Verteilungsverhalten zwischen künstlichen Liposomen (meistens bestehend aus Phosphatidylcholin) und Wasser bestimmt. Die Ermittlung eines geeigneten Grenzwertes für den D_{MW} steht noch aus, um das Screening-/Bewertungskonzept für das Bioakkumulationspotential für IOS anzupassen.

Ein Beispiel für die Grenzen der Anwendung des aktuell gültigen Screenings-/Bewertungskonzeptes für die Bioakkumulation von IOS ist BPA-DA (4,4'-[(isopropylidene)bis(p-phenyleneoxy)]diphthalic dianhydride). BPA-DA hydrolysiert in der Umwelt sehr schnell zu BPA-TA (4,4'-[Propane-2,2-diylbis(4,1-phenyleneoxy)]diphthalic acid), einer vierwertigen Säure, die im umweltrelevanten pH Bereich hauptsächlich dissoziiert vorliegt. BPA-TA ist deutlich hydrophiler als der Ausgangsstoff BPA-DA. Wird als Screening-Parameter zur Bewertung der Bioakkumulation von BPA-TA der $\log D$ genutzt, wird das Bioakkumulationspotential als gering eingeschätzt, weil der $\log D$ (< 3,75) im umweltrelevanten pH Bereich deutlich unter dem Screening-Kriterium für potentiell bioakkumulierende Stoffe (< 4,5) liegt. Der mit COSMOtherm berechnete $\log D_{MW}$ > 5 bei einem pH-Wert von 7,4 lässt jedoch erwarten, dass BPA-TA ein erhöhtes Bioakkumulationspotential besitzt.

Toxizität

Zur Bewertung der Toxizität von Stoffen werden standardisierte ökotoxikologische Tests mit aquatischen Organismen aus verschiedenen trophischen Ebenen durchgeführt. Bei ionisierbaren Stoffen dominiert in Abhängigkeit vom pH des umgebenden Testmediums die neutrale oder ionische Spezies. Experimentelle Studien mit der neutralen und ionischen Spezies von Stoffen zeigen, dass die neutrale Spezies im Regelfall eine höhere Toxizität im Vergleich zu der ionischen Spezies aufweist. Die höhere Toxizität der neutralen Spezies steht im Zusammenhang mit dem geringeren Bioakkumulationspotential der ionischen Spezies. In der Literatur wird die Toxizität der ionischen Spezies bis zu zwei Größenordnungen geringer angegeben, als die der neutralen Form (Rendal et al.

2011). Ein Beispiel ist der ionisierbare Stoff Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-diphenyl-ether), dessen Toxizität mit zunehmendem Dissoziationsgrad deutlich abnimmt (Orvos et al. 2002, Roberts et al. 2014; Abb. 1). Die Toxizität ionisierbarer Stoffe kann zusätzlich durch die sogenannte Ionenfalle verstärkt werden. Viele Organismen halten einen konstanten, vom umgebenden Medium unabhängigen pH-Wert in den Zellen aufrecht (Homöostase).

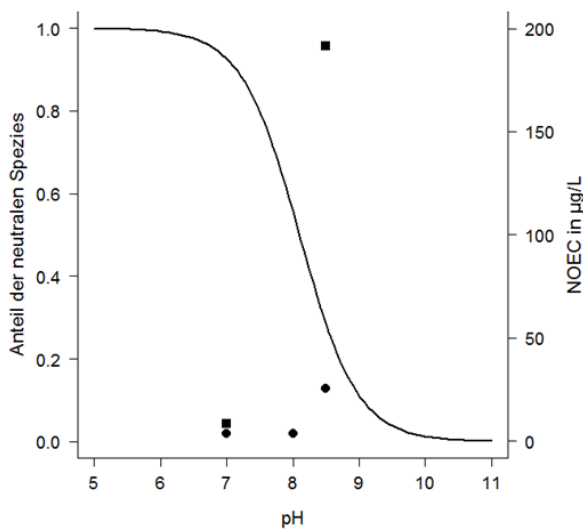


Abb.1: Vergleich des Anteils der neutralen Spezies (durchgehende Linie) und der Toxizität von Triclosan ($pK_a = 8,1$) in Abhängigkeit vom pH Wert. Dargestellt ist die pH-abhängige NOEC (No Observed Effect Concentration) der Wachstumsrate der Alge *Scenedesmus subspicatus* (●) (Roberts et al. 2014) und der Reproduktion des Wasserfloh *Ceriodaphnia dubia* (■) (Orvos et al. 2002). Je höher die NOEC, desto geringer ist die Toxizität des Stoffes.

Weicht der pH-Wert im Organismus von dem im umgebenden Medium ab und liegt der pK_a des ionisierbaren Stoffes im pH-Bereich des umgebenden Mediums und des Organismus, so kann die Ionenfalle wirken: Die neutrale Spezies des ionisierbaren Stoffes durchdringt die Membran der Zelle und bildet dort in Anhängigkeit vom pH-Wert im Organismus die ionische Spezies aus. Hierdurch wird die ionische Spezies in der Zelle „gefangen“. Dadurch erhöht die Ionenfalle die Bioverfügbarkeit der ionischen Spezies und somit die Toxizität von ionisierbaren Stoffen (Neuwöhner und Escher 2011). Um in ökotoxikologischen Tests mit ionisierbaren Stoffen die toxischste Spezies zu erfassen, sollte der pH-Wert des Testmediums daher so eingestellt sein, dass der Anteil der toxischeren (meist) neutralen Spezies möglichst hoch ist.

Der zu testende pH-Wert in standardisierten ökotoxikologischen Tests kann innerhalb eines vorgegebenen pH-Bereichs (Bsp. pH 6-9) frei gewählt werden. Innerhalb dieses pH-Bereichs kann der Dissoziationsgrad und somit die Toxizität von ionisierbaren Stoffen jedoch stark variieren. Daher ist eine genaue Auswahl des zu testenden pH-Werts für jeden ionisierbaren Stoff notwendig. Zurzeit wird eine Festlegung des Test-pH nur vorgenommen, wenn der pK_a von Stoffen in den

pH-Bereich des Tests fällt (OECD 23, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures). Das Beispiel in Abbildung 2 zeigt jedoch, dass selbst wenn der pK_a von Stoffen außerhalb des pH-Bereichs des Tests liegt, der Dissoziationsgrad und somit die Toxizität ionisierbarer Stoffe stark variieren kann. Das Umweltbundesamt hat einen Anpassungsvorschlag eingebracht, welcher den Test-pH festlegt, falls der pK_a eines Stoffes in einen pH-Bereich von 4-10 fällt. Diese Anpassung würde sicherstellen, dass die toxischere Spezies ionisierbarer Stoffe getestet und dadurch eine Worst Case Situation im Testsystem abgebildet wird.

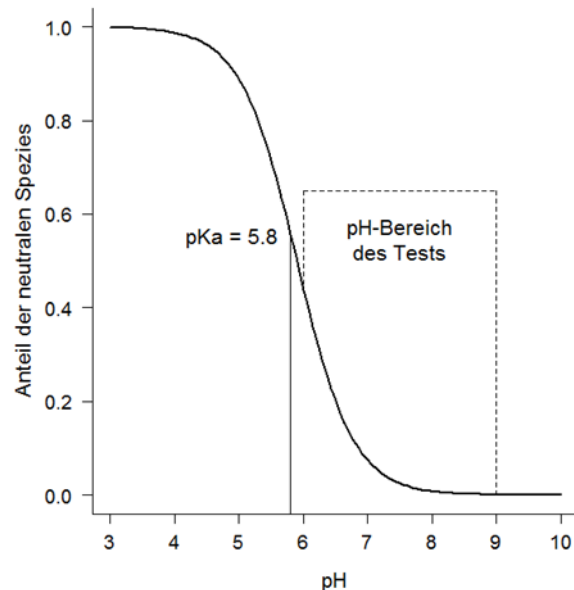


Abb.2: Darstellung des Anteils der neutralen Spezies (durchgehende Linie) einer Säure ($pK_a = 5,8$) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die gestrichelte Linie zeigt den pH-Bereich eines akuten Daphnientests nach OECD 202 Guideline (*Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*). Hier wäre keine spezielle Anpassung des pH-Wert des Tests nötig, da der pK_a der Säure außerhalb des pH-Bereichs des Tests liegt.

Schlussfolgerung

Der $\log K_{ow}$ als Stoffeigenschaft zur Einschätzung des PBT-Verdachts von Stoffen ist für IOS nur begrenzt geeignet. Weder das Adsorptionsverhalten von IOS an Umweltmedien, noch das Potential zur Anreicherung von IOS in Organismen kann durch den $\log K_{ow}$ ausreichend abgeschätzt werden. Für IOS erfordert das geltende PBT-Bewertungskonzept (ECHA 2014) folgende Anpassungen: Das Adsorptionsverhalten von IOS, welches für die Auswahl des Testsystems für die Persistenz-Bewertung entscheidend ist, sollte durch experimentelle Studien ermittelt werden. Alternative Screening-Kriterien für die Bioakkumulation von IOS, wie zum Beispiel der Verteilungskoeffizient D_{MW} , müssen noch validiert werden. Hierfür initiiert das Umweltbundesamt Forschungsvorhaben und versucht neue Erkenntnisse zeitnah in die PBT-Bewertung zu implementieren. Für ionisierbare Stoffe muss bei der Wahl des pH-Wertes von Testsystemen zur Bewertung der Bioakkumulation und Toxizität sichergestellt werden, dass eine Worst-Case Situation im Testsystem abgebildet wird.

Literatur

- Armitage, J. M., J. A. Arnot, F. Wania and D. Mackay (2013). "Development and evaluation of a mechanistic bioconcentration model for ionogenic organic chemicals." *Environ Chem* 32(1): 115-128.
- Avdeef A., K. J. Box, J. E. A. Comer, C. Hibbert, and K. Y. Tam (1998). "pH-metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs." *Pharmaceut Res* 15:209–215.
- Bittermann, K., S. Spycher, S. Endo, L. Pohler, U. Huniar, K.-U. Goss, and A. Klamt (2014). "Prediction of phospholipid–water partition coefficients of ionic organic chemicals using the mechanistic model COSMOmic". *Phys. Chem. B*: 14833-14842.
- Boivin, A., S. Amellal, M. Schiavon and M. T. van Genuchten (2005). "2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils." *Environ Pollut* 138(1): 92-99.
- ECHA Guidance for the implementation of REACH. 2014. Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.11: PBT/vPvB assessment.
- ECHA Guidance for the implementation of REACH. 2016. Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7b: Endpoint specific guidance.
- Escher, B. I. and R. P. Schwarzenbach (1996). "Partitioning of substituted phenols in liposome-water, biomembrane-water, and octanol-water systems." *Environ Sci Technol* 30(1): 260-270.
- Franco, A., A. Ferranti, C. Davidsen and S. Trapp (2010). "An unexpected challenge: ionizable compounds in the REACH chemical space." *Int J Life Cycle Assess* 15(4): 321-325.
- Kah, M. and C. D. Brown (2008). "LogD: Lipophilicity for ionisable compounds." *Chemosphere* 72(10): 1401-1408.
- Neuwoehner, J. and B. I. Escher (2011). "The pH-dependent toxicity of basic pharmaceuticals in the green algae *Scenedesmus vacuolatus* can be explained with a toxicokinetic ion-trapping model." *Aquat Toxicol* 101(1): 266-275.
- Orvos, D. R., D. J. Versteeg, J. Inauen, M. Capdevielle, A. Rothenstein and V. Cunningham (2002). "Aquatic toxicity of triclosan." *Environ Toxicol Chem* 21(7): 1338-1349.
- Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH). Official Journal of the European Union L396.
- Rendal, C., K. O. Kusk and S. Trapp (2011). "Optimal choice of pH for toxicity and bioaccumulation studies of ionizing organic chemicals." *Environ Toxicol Chem* 30(11): 2395-2406.
- Roberts, J., O. R. Price, N. Bettles, C. Rendal and R. van Egmond (2014). "Accounting for dissociation and photolysis: A review of the algal toxicity of triclosan." *Environ Toxicol Chem* 33(11): 2551-2559.

Korrespondenzadresse

Daniela Claßen
Fachgebiet IV 2.3 „Chemikalien“
Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Rosslau
Email: daniela.classen@UBA.de