

Einfluss von Lipophilie und Molekülgröße auf das Biokonzentrationspotential von Umweltchemikalien

Monika Nendza, Luhnstedt, AL-Luhnstedt@t-online.de Martin Müller, Schmallenberg, Martin.Mueller@ime.fraunhofer.de

Zusammenfassung

Anhand validierter BCF-Daten aus der CEFIC LRI Goldstandard-Datenbank wurden Kriterien analysiert, die als Indikatoren einer reduzierten Bioakkumulation dienen können. Im Sinne einer Klassifizierung von B-Stoffen wurde bestätigt, dass $BCF > 2000$ nicht für Stoffe mit $\log K_{OW} < 3$ oder > 10 auftritt. Die Molekülgröße (maximaler Moleküldurchmesser $> 2,5$ nm, effektiver Moleküldurchmesser $> 1,5$ nm) und die Molmasse (> 600 g/mol) sind weitere mögliche Indikatoren für BCF-Werte < 2000 . Eine robuste Validierung ist aber mangels belastbarer BCF-Daten für große Moleküle nicht durchführbar. Kriterien aus dem Screening oraler Pharmaka (Lipinski's Rule of 5) sind nicht ausreichend, um geringe Bioakkumulation festzustellen.

Hintergrund

REACH sieht für Stoffe mit (sehr) persistenten, (sehr) bioakkumulierenden und toxischen Eigenschaften (PBT-Stoffe, vPvB-Stoffe) eine Zulassungspflicht vor [1]. Grenzkriterium ist ein Biokonzentrationsfaktor (BCF) > 2000 für B-Stoffe bzw. > 5000 für vB-Stoffe [2]. Mit Blick auf den erheblichen experimentellen Aufwand von Bioakkumulationsstudien wird diskutiert, ob Stoffe aufgrund physikalisch-chemischer oder struktureller Eigenschaften biologische Membranen voraussichtlich nicht durchdringen können bzw. die Stoffaufnahme so sehr gehemmt ist, dass eine relevante Bioakkumulation nicht zu erwarten ist. Insbesondere Lipophilie ($\log K_{OW}$: 1-Oktan/Wasser-Verteilungskoeffizient), Molekülgröße (D_{max} : maximaler Durchmesser, D_{eff} : effektiver Durchmesser), Molmasse und Lipidlöslichkeit werden als mögliche limitierende Kriterien betrachtet (Tabelle 1). Indikatoren einer eingeschränkten Bioakkumulation könnten als Kriterien für ein Waiving (Verzicht) von experimentellen Bestimmungen des BCF auf der Basis von Substanzeigenschaften herangezogen werden.

BCF Cut-off: Fakt oder Fiktion?

Die Frage, ob superlipophile Stoffe ($\log K_{OW} > 5-6$) tatsächlich eine geringere Bioakkumulation aufweisen als aufgrund ihrer Hydrophobie zu erwarten ist, ist nicht abschließend beantwortet. Der oft beschriebene BCF Cut-off, z.B. [9, 11, 15-21], wird entweder experimentellen Artefakten oder einer veränderten Aufnahme aufgrund verminderter Membranpermeation zugeschrieben (Abbildung 1). Insbesondere lipophile Chemikalien mit sehr geringer Wasserlöslichkeit haben häufig eine scheinbar reduzierte Biokonzentration. Viele 'zu niedrige' BCF-Werte relativ zum $\log K_{OW}$ der Testsubstanzen halten einer kritischen Überprüfung nicht stand, sie reflektieren fehlerhafte Durchführung und Auswertung von Testergebnissen. Ent-

scheidende Einflussfaktoren sind die Bioverfügbarkeit (z.B. freie, gelöste Expositionskonzentrationen, Sorption, Grenzen der Wasserlöslichkeit, Effekte von Lösungsvermittlern) und die Kinetik (z.B. Erreichen des Steady-State, verminderte Diffusion in Wasserphasen, Auswirkungen von Größe und Lebensdauer der Testorganismen).

Systematische experimentelle Belege für eine reduzierte Aufnahme großer Moleküle, z.B. Untersuchungen an biologischen Membranen, liegen nicht vor. Daten zur oralen Absorption von Antibiotika weisen aber darauf hin, dass auch große Substanzen mit hohem Molekulargewicht ($MW > 1000$ g/mol) Membranen passieren und in Organismen aufgenommen werden können [22, 23].

Unbenommen der genannten Aspekte ist aus theoretischen Erwägungen eine nicht-Linearität von BCF/Lipophile-Beziehungen zu erwarten, allerdings bei erheblich höheren $\log K_{OW}$ -Werten ~ 10 [24]. Insbesondere limitierte Diffusion in wässrigen Phasen, unterschiedliches Verhalten in Lipiden oder 1-Oktanol sowie unterschiedliche thermodynamische Eigenschaften, z.B. Enthalpie-Effekte, schließen eine 'endlose' Linearität der Beziehung zwischen Lipophilie und Bioakkumulation aus [25].

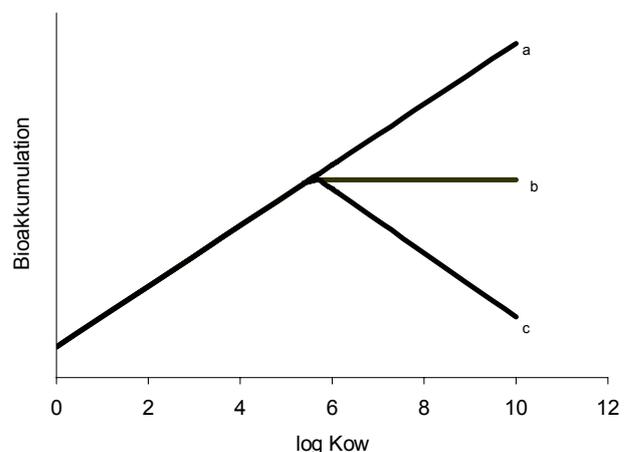


Abb.1. Mögliche Beziehungen zwischen Bioakkumulation und $\log K_{OW}$: Der Unterschied zwischen den Funktionen (a) und (b) beruht auf kinetischen Artefakten, zwischen (b) und (c) auf verminderter Bioverfügbarkeit [24].

Beziehungen zwischen BCF und Lipophilie

Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) zur Abschätzung des BCF aus dem $\log K_{OW}$ sind für neutrale organische Substanzen mittlerer Lipophilie ($0 < \log K_{OW} < 6$) etabliert, z.B. [10, 16, 18, 19]. Lineare Funktionen beschreiben das Akkumulationspotential von Chemikalien unter der Annahme passiver Diffusion als geschwindigkeitsbestimmenden Prozess. Abweichungen nach unten, d.h.

Jahr	Chemikalien	log K_{OW}	Molekülgröße	Molmasse	Lipidlöslichkeit	Wasserlöslichkeit	Quelle
1985	Polychlorierte Naphthaline	> 6	$D_{eff} > 0,95$ nm	--	--	--	Opperhuizen et al. [3]
1987	Silicone	--	Kettenlänge > 5,3 nm	--	--	--	Opperhuizen et al. [4]
1988	Organische Farbstoffe	--	$D_{eff} > 1,05$ nm	> 450 g/mol	< 10 mg/l	< 0,1 mg/l oder > 2000 mg/l	Anliker et al. [5, 6]
1991	--	--	--	> 600 g/mol	--	--	UBA [7]
2000	--	--	$D_{eff} > 0,95$ nm Kettenlänge > 4,3 nm	> 700 g/mol	< 2 mmol/kg	--	Environment Canada [8]
2002	Organische Substanzen	> 5,5	$D_{max} > 1,5$ nm	--	--	--	Dimitrov et al. [9]
2003	--	--	--	> 700 g/mol	--	--	TGD [10]
2005	Organische Substanzen	--	$D_{max} > 1,7 \pm 0,2$ nm	--	--	--	Dimitrov et al. [11]
2006	--	--	Kettenlänge > 4,3 nm $D_{max} > 1,74$ nm	> 700-1100 g/mol	< 0,002*MW mg/l	--	TC-NES [12]
2007	--	> 10	$D_{max} > 2,5$ nm $D_{eff} > 1,5$ nm	> 600 g/mol	--	--	UBA [13]
2007	--	> 10	Kettenlänge > 4,3 nm $D_{eff} > 1,74$ nm	> 700-1100 g/mol	< 0,002*MW mg/l	--	EU [2]
2007	--	> 8	$D_{max} > 1,5$ nm $D_{eff} > 1,0$ nm	> 600 g/mol	--	--	Arijs et al. [14]

Tabelle 1. Beispiele für Kriterien, die als Indikatoren einer möglicherweise reduzierten Bioakkumulation vorgeschlagen wurden.

geringere Bioakkumulation, können z.B. auf Ionisation, Abbau oder Metabolismus der Testsubstanzen beruhen.

B-Stoffen [2] bestätigt Abbildung 2, dass BCF > 2000 nicht für Stoffe mit log K_{OW} < 3 oder > 10 auftritt.

Eine Analyse von Beziehungen zwischen Bioakkumulationspotential und physikalisch-chemischen oder strukturellen Eigenschaften erfolgte beispielhaft anhand validierter BCF-Daten aus der CEFIC LRI Goldstandard-Datenbank zur Bioakkumulation [26]. Bei multiplen Einträgen zu einer Substanz wurde im Sinne einer Worst-Case Betrachtung der jeweils höchste BCF-Wert verwendet. Abbildung 2 zeigt die Verteilung von BCF-Werten in Abhängigkeit von der Lipophilie, berechnet als log K_{OW} (KowWin (Version 1.67) [27]). Die bilineare QSAR beschreibt das maximale Bioakkumulationspotential [18]:

$$\log BCF = 0.99 \log K_{OW} - 1.47 \log (4.97 \times 10^{-8} K_{OW} + 1) + 0.0135 \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die Datenverteilung zeigt erhebliche Streuungen über zwei bis drei Größenordnungen für Substanzen gleicher Lipophilie. Mit steigendem log K_{OW} nehmen die Abweichungen von der QSAR nach unten zu. Abweichungen nach oben betreffen nur hydrophile Moleküle (log K_{OW} < 3), deren BCF aber in allen Fällen kleiner als 2000 ist. Im Sinne einer Klassifizierung von

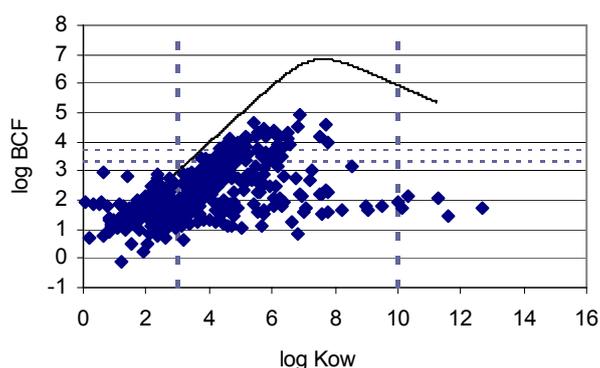


Abb. 2. Beziehung zwischen log BCF [26] und log K_{OW} . Die bilineare Funktion beschreibt das maximale Bioakkumulationspotential [18]. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die BCF-Grenzkriterien für B- und vB-Stoffe an.

Beziehungen zwischen BCF und Molekülgröße

Ein möglicher limitierender Einfluss der Molekülgröße auf die Bioakkumulation ist oft postuliert worden. Geht man von passiver Diffusion als Mechanismus der Membranpassage

aus, muss die Absorptiongeschwindigkeit mit zunehmender Molekülgröße abnehmen. Beziehungen zwischen BCF-Werten [26] und dem maximalen und effektiven Moleküldurchmesser, berechnet nach Geometrieoptimierung mit MOPAC (<http://openmopac.net>) mittels CROSS [28] sind in Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

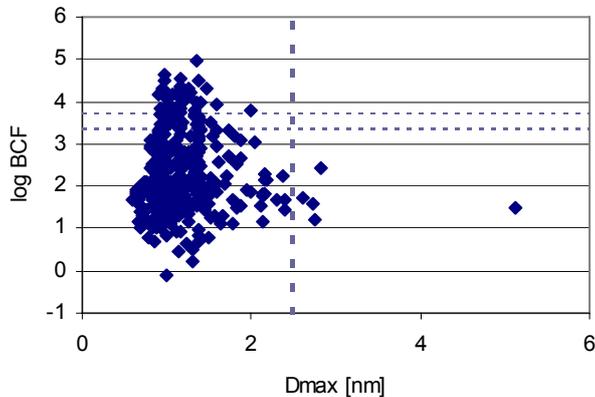


Abb. 3. Beziehung zwischen log BCF [26] und maximalem Moleküldurchmesser D_{\max} [nm]. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die BCF-Grenzkriterien für B- und vB-Stoffe an.

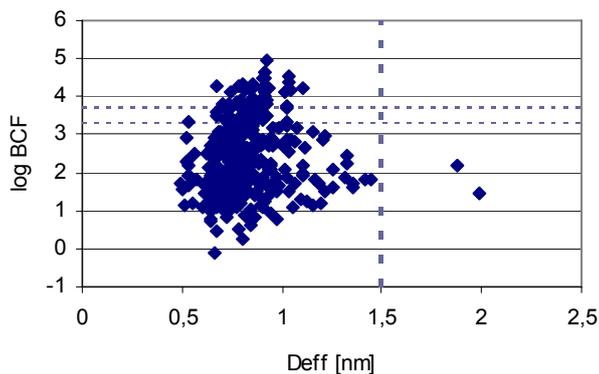


Abb. 4. Beziehung zwischen log BCF [26] und effektivem Moleküldurchmesser D_{eff} [nm]. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die BCF-Grenzkriterien für B- und vB-Stoffe an.

Bei kleinen Molekülen ($D_{\max} < 2,0$ nm, $D_{\text{eff}} < 1,2$ nm) ist kein Einfluss ihrer Größe auf das Ausmaß ihrer Bioakkumulation zu erkennen. Demgegenüber erscheint ein maximaler Moleküldurchmesser $> 2,5$ nm oder ein effektiver Moleküldurchmesser $> 1,5$ nm ein möglicher Indikator für BCF-Werte < 2000 . Diese Grenzkriterien ($D_{\max} > 2,5$ nm, $D_{\text{eff}} > 1,5$ nm) entsprechen den Befunden, die anhand eines limitierten Datensatzes für Pflanzenschutzmittel und Neustoffe erhalten wurden [13]. Eine robuste statistische Diskriminierung ist aber nicht möglich, weil auch diese Datenbasis nur wenige sehr große Substanzen enthält. Weiterhin einschränkend ist, dass mit verschiedenen Verfahren berechnete Moleküldurchmesser je nach verwendeter Geometrieoptimierung variieren können.

Beziehungen zwischen BCF und Molmasse

Das Molekulargewicht wird seit Jahrzehnten als Indikator-kriterium für reduzierte Bioverfügbarkeit diskutiert. Allerdings ist die Interpretation eines Grenzwertes auf der Basis der Molmasse komplex, weil diese Eigenschaft mit vielen anderen korreliert. Der Aspekt der limitierten Membranpermeation aufgrund der Größe von Verbindungen erscheint ungeeignet, weil auch Chemikalien mit $MW > 1000$ g/mol Membranen gut passieren können [22, 23]. Andere Eigenschaften, die ebenfalls mit dem Molekulargewicht korreliert sind, wie Löslichkeit, Sorption, Bioverfügbarkeit und Absorptionskinetik, haben vermutlich einen größeren Einfluss.

Die Darstellung der Beziehung zwischen BCF und Molmasse (Abbildung 5) zeigt, dass die wenigen vorliegenden Substanzen mit einem Molekulargewicht > 600 g/mol $BCF < 2000$ haben. Der hier erhaltene Wert ist niedriger, als die für das neue TGD [2] vorgeschlagenen ($MW > 700$ g/mol für nicht-B, $MW > 1100$ g/mol für nicht-vB). Eine Validierung ist aber mangels belastbarer BCF-Daten für Moleküle mit großer Molmasse nicht durchführbar.

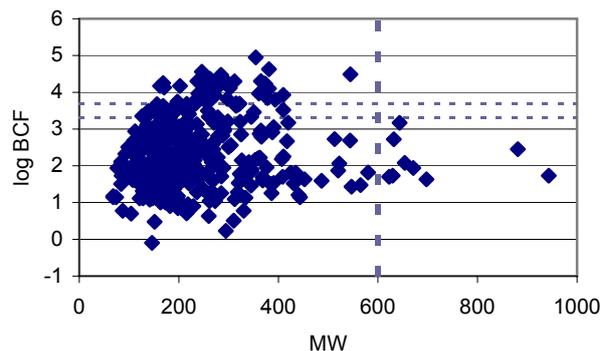


Abb. 5. Beziehung zwischen log BCF [26] und Molmasse MW. Die gestrichelten horizontalen Linien geben die BCF-Grenzkriterien für B- und vB-Stoffe an.

Beziehungen zwischen BCF und 'Lipinski's Rule of 5'

Kriterien aus dem Screening oraler Pharmaka (Lipinski's Rule of 5 [29]) wurden als mögliche Indikatoren geringer Bioakkumulation getestet. Substanzen, die mindestens zwei der folgenden Bedingungen erfüllen

1. Molmasse > 500 g/mol
2. Σ Wasserstoffbrückendonatoren (als Σ OH + NH) > 5
3. Σ Wasserstoffbrückenakzeptoren (als Σ N + O) > 10
4. $\log K_{OW} > 5$

sind in Abbildung 6 markiert. Es zeigt sich, dass 'Lipinski's Rule of 5' nicht ausreichend ist, um geringe Bioakkumulation festzustellen. Verbindungen mit ungünstigen Eigenschaften für orale Arzneistoffe, d.h. geringer Wasserlöslichkeit und langsamer Absorption, können gleichzeitig stark bioakkumulierende Umweltchemikalien sein.

Ausblick

Zuverlässige Kriterien, die als Indikatoren einer reduzierten Bioakkumulation ($BCF < 2000$) dienen, bedürfen einer rigorosen Validierung, bevor sie zum Waiving experimenteller Studien verwendet werden können. Die erfolgversprechenden Kandidaten $\log K_{OW}$, D_{max} , D_{eff} , MW müssen anhand weiterer Daten für große lipophile Stoffe weiter überprüft werden.

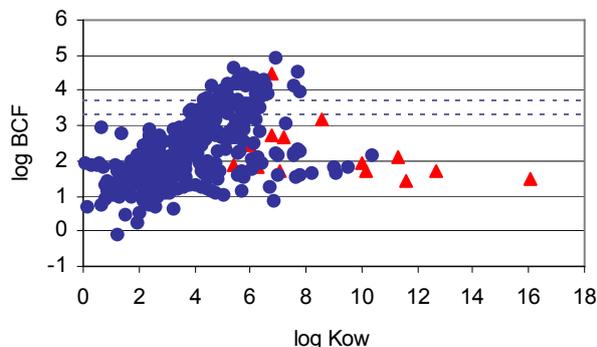


Abb. 6. Anwendung von Lipinski's Rule of 5 [29] als Indikatoren einer reduzierten Bioakkumulation [26]: Substanzen, die mindestens 2 der Regeln genügen, sind mit \blacktriangle markiert, alle anderen mit \bullet . Die gestrichelten horizontalen Linien geben die BCF-Grenzkriterien für B- und vB-Stoffe an.

Danksagung

Dem Umweltbundesamt sei an dieser Stelle für die finanzielle Förderung des Projektes (FKZ 360 01 043) und die fachliche Projektbetreuung durch Herrn G. Kientz gedankt.

Literatur

- [1] European Commission (2006). *REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.* European Commission, Brussels, Belgium.
- [2] European Commission (2007). *Reference preliminary technical guidance document Chapter PBT and vPvB assessment - Draft.* European Commission, Brussels, Belgium.
- [3] Opperhuizen A, v.d.Velde EW, Gobas FAPC, Liem DAK, v.d.Steen JMD, Hutzinger O. (1985). Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere* **14**, 1871-1896.
- [4] Opperhuizen A, Damen HWJ, Asyee GM, van der Steen JMD, Hutzinger O. (1987). Uptake and elimination by fish of polydimethylsiloxanes (silicones) after dietary and aqueous exposure. *Toxicol. Environ. Chem.* **13**, 265-285.
- [5] Anliker R, Moser P. (1987). The limits of bioaccumulation of organic pigments in fish: Their relation to the partition coefficient and the solubility in water and octanol. *Ecotox. Environ. Saf.* **13**, 43-52.
- [6] Anliker R, Moser P, Poppinger D. (1988). Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish: Relationships to hydrophobicity and steric factors. *Chemosphere* **17**, 1631-1644.
- [7] Beek B. (1991). Welcome address and introduction. In: *Bioaccumulation in Aquatic Systems* (Nagel R, Loskill R, eds.), VCH, Weinheim.
- [8] Environment Canada (2000). Environmental categorization for persistence, bioaccumulation and inherent toxicity of substances on the domestic substances list using QSARs.

- [9] Dimitrov S, Dimitrova N, Walker JD, Veith GD, Mekenyan OG. (2002). Predicting bioconcentration factors of highly hydrophobic chemicals. Effects of molecular size. *Pure Appl. Chem.* **74**, 1823-1830.
- [10] European Communities (2003). *Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market.* European Commission, Joint Research Centre, Ispra, Italy.
- [11] Dimitrov S, Dimitrova N, Parkerton T, Comber M, Bonnell M, Mekenyan OG. (2005). Base-line model for identifying the bioaccumulation potential of chemicals. *SAR QSAR Environ. Res.* **16**, 531-554.
- [12] Comber M, Robertson S, Sijm DTHM. (2006). Discussion paper for the TC NES subgroup on PBTs. ACHS/06/11A. <http://www.defra.gov.uk/environment/chemicals/achs/060606/agenda.htm>.
- [13] Nendza M, Müller M. (2007). *Literature study: Effects of molecular size and lipid solubility on bioaccumulation potential.* Umweltbundesamt, Dessau.
- [14] Arijs K, Versonnen B, Jeliakova N, Comber M, Verdonck F, Iaccino F, Vangheluwe M. (2007). Validation of bioaccumulation threshold criteria. *Poster at SETAC Europe 17th Annual Meeting, Porto.*
- [15] Connell DW, Hawker DW. (1988). Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemicals by fish. *Ecotox. Environ. Saf.* **16**, 242-257.
- [16] Dearden JC. (2004). QSAR modeling of bioaccumulation. In: *Predicting Chemical Toxicity and Fate* (Cronin MTD, Livingstone DJ, eds.), pp. 333-355. CRC Press, Boca Raton.
- [17] Könemann H, van Leeuwen CJ. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes in guppies. *Chemosphere* **9**, 3-19.
- [18] Nendza M. (1991). QSARs of bioconcentration: validity assessment of $\log P_{ow}/\log BCF$ correlations. In: *Bioaccumulation in Aquatic Systems* (Nagel R, Loskill R, eds.), pp. 43-66. VCH, Weinheim.
- [19] Nendza M. (1998). *Structure-Activity Relationships in Environmental Sciences.* Chapman & Hall, London, Great Britain.
- [20] Sabljic A. (1987). The prediction of fish bioconcentration factors of organic pollutants from the molecular connectivity model. *Z. Ges. Hyg.* **33**, 493-496.
- [21] Spacie A, Hamelink JL. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **1**, 309-320.
- [22] Seydel JK, Wiese M. (2002). *Drug-Membrane Interactions, Analysis, Drug Distribution, Modeling.* Wiley-VCH.
- [23] Gobas FAPC, Moore MM, Hermens JLM, Arnot JA. (2006). Bioaccumulation reality check. *SETAC Globe* **7** (5), 40-41.
- [24] Jonker M, van der Haijden S. (2007). BCF hydrophobicity cut-off: Truth or fake? SETAC Europe 17th Annual Meeting, Porto, RA04B-1.
- [25] Hawker DW, Connell DW. (1989). A simple water/octanol partition system for bioconcentration investigations. *Environ. Sci. Technol.* **23**, 961-965.
- [26] EURAS (2007). CEFIC LRI Goldstandard Database. <http://ambit.acad.bg/ambit/php/euras.php>.
- [27] U.S.EPA (2005). EPI Suite v 3.12. <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/docs/episuite.htm>.
- [28] Schüürmann G. (1990). QSAR analysis of the acute fish toxicity of organic phosphorothionates using theoretically derived molecular descriptors. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 417-428.
- [29] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3-25.

Korrespondenzadresse

Dr. Monika Nendza, Analytisches Laboratorium, Bahnhofstr. 1, 24816 Luhnsted