

Diss ETH No.12175

22. Juli 1997

RISK EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN HUMANS
I SYNTHETIC MUSK FRAGRANCES
II ALKYLPHENOLS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
SEVERIN MÜLLER
dipl. Natw. ETH
born February 10, 1968
citizen of Wiliberg AG

accepted on the recommendation of
Prof Dr. Dr. Ch. Schlatter, examiner
Prof. Dr. W. Giger, co-examiner
Dr. P. Schmid, co-examiner

Ch. Schlatter, 22.7.97

Zurich, 1997

Summary

Synthetic musk compounds are widely used as fragrances and fragrance enhancers in body care products, and in household detergents. The industrial most important synthetic musks are of nitro benzenoid (e.g. Musk Moskene, Musk Ketone, Musk Xylene, Musk Moskene, Musk Ambrette, Musk Tibetene) and of non-nitro polycyclic structure (e.g. Galaxolide®, Tonalid®, Celestolide®). In the last years the widespread occurrence of nitro benzenoid musks in the aquatic environment and also in humans has been shown. Part I of this thesis evaluates the human exposure situation of the industrial important synthetic musk compounds. Therefore different nitro and non-nitro benzenoid musk compounds were investigated in human adipose tissue samples. The daily intake of Musk Xylene and Galaxolide are estimated in order to assess their toxicological health risk.

Technical Nonylphenol (NP) and Octylphenol (OP) are alkylphenolic compounds that are mainly used as intermediates in the chemical manufacturing industry. The predominant use of NP and OP is in the form of alkylphenol polyethoxylates (APnEO) with variable ethoxylate chain length and as antioxidants. APnEO are used as emulsifying, dispersing, wetting and foaming agents. NP and OP showed both in vivo and in vitro estrogenic activity at high doses. In the last years, the role of environmental estrogens, as e.g. NP and OP, regarding potential human health effects is intensely discussed. The aim of Part II of this thesis is the evaluation of the estrogenic health risk of alkylphenols in humans.

NP and OP were investigated in non-occupationally exposed persons by analyzing human autopsy adipose tissue samples. The concentrations of NP, OP and their lower ethoxylates (n=1; n=2) were determined by gas chromatography / high resolution mass spectrometry. Concentrations ranged from 19 to 85 ng/g lipids for NP and 0.58-4.07 ng/g lipids for OP, which was in the range of the analytical background contamination. No NP and OP ethoxylates were found in any of the samples (detection limit of 10 and 0.5 ng/g lipids). According to the further investigated pharmacokinetic behaviour of NP in human volunteers it has to be concluded that the real adipose tissue concentrations are at least by a factor of 100 below the analytical background values.

To interpret published *in vitro* results about the estrogenic potency of nonylphenol the distribution of NP and OP in primary mouse hepatocyte cultures was investigated. The distribution between the cell medium and the cell fraction was determined at a concentration level of 10^{-5} M NP or 10^{-6} M OP in order to identify real cell effect concentrations. A fast decline of the parent NP and OP concentrations in the medium was found. The concentrations in the cell fractions were 100 ng NP/mg proteins and 2-6 ng OP/mg proteins after 2 hours and declined to about 20 ng NP/mg proteins and 1-3 ng OP/mg protein respectively after 48 hours. A minimal estrogenic *in vitro* concentration of 10^{-7} M NP and OP was reported in the literature. From our data a minimal estrogenic cell effect concentration of about 100 ng/g cells both for NP and OP can be derived.

The pharmacokinetic behaviour of NP was investigated in human volunteers. In order to eliminate the analytical background problems isotope labeled $^{13}\text{C}_6$ -NP was synthesized. Both after intravenous and oral application an elimination half-life of 2-3 hours of the parent compound was found. Bioavailability after oral application (determined by the comparison of the AUC's) was about 20%. The substance seems to distribute into the lipid phase of the body within 2 hours.

The daily intake of non-occupationally exposed persons was estimated with the existing scarce literature values of NP concentrations in drinking water and other food stuffs. The daily intake was estimated to be less than 0.16 mg/day.

Risk estimations were based on the daily intake of NP and the relative potency of NP to 17β -estradiol. A safety factor of 3'000 can be derived when comparing the resulting NP blood concentration with 17β -estradiol levels in the blood of adult males.

Risk estimations based on the daily intake of NP and therefore resulting organ concentrations (calculated upon the lipid content) compared with minimal estrogenic cell effect concentrations result in a safety factor in the range of 5'000.

Too, calculation of estrogenic equivalence factors of NP and genistein (a phytoestrogen which is ingested in milligram amounts daily) in human blood indicate a minor importance of nonylphenol.

The results of this study indicate that the non-occupationally exposure to NP does not result in an estrogenic health risk to humans.

Zusammenfassung

Synthetische Moschusverbindungen werden als Duftstoffe und Duftträger in Pflegeprodukten und in Waschmitteln eingesetzt. Die industriell wichtigsten synthetischen Moschusduftstoffe sind Nitroaromaten (zum Beispiel Moschus Mosken, Moschus Keton, Moschus Xylol, Moschus Ambrette, Moschus Tibeten) und polyzyklische Verbindungen (zum Beispiel: Galaxolid®, Tonalid®, Celestolid®). In den letzten Jahren wurde das Auftreten von Nitromoschusverbindungen in der aquatischen Umwelt und im Menschen gezeigt. Teil 1 dieser Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Exposition des Menschen mit den industriell wichtigsten Moschusduftstoffen. Verschiedene Nitromoschusduftstoffe und Polyzyklische Moschusduftstoffe wurden darum in Humanfettgewebe untersucht. Die tägliche Aufnahme von Moschus Xylol und Galaxolid wurden abgeschätzt, um eine toxikologische Risikobeurteilung für den Menschen zu machen.

Die Alkylphenole Nonylphenol (NP) und Oktylphenol (OP) werden hauptsächlich als Zwischenprodukte in der chemischen Industrie genutzt. Die wichtigsten Produkte sind die Alkylphenolpolyethoxylate (APnEO) mit variabler Länge der Ethoxyeinheiten und Antioxidantien. APnEO werden als Emulsionshilfsstoffe, als Dispergierungs-, Netzungs- und Schäumungsmittel eingesetzt. NP und OP zeigten sowohl in vitro wie auch in vivo östrogene Effekte in hohen Dosen. In den letzten Jahren wurden die potentiellen Gesundheitseffekte von Umweltöstrogenen (z.B. auch NP und OP) intensiv diskutiert. Das Ziel des Teils II dieser Doktorarbeit ist die Beurteilung des östrogenen Gesundheitsrisikos von Alkylphenolen beim Menschen.

NP, OP und die Konzentrationen deren niedrigen Ethoxylate ($n=1$, $n=2$) wurden in Autopsie-Humanfettproben von nicht beruflich exponierten Personen mittels Gaschromatographie / hochauflösender Massenspektrometrie bestimmt. Die gemessenen NP-Konzentrationen lagen zwischen 19 und 85 ng/g Lipiden, die OP Konzentrationen zwischen 0.58 und 4.07 ng/g Lipiden. Die analytischen Blindwerte lagen jedoch im selben Konzentrationsbereich. NP und OP Ethoxylate konnten in keiner Probe nachgewiesen werden (Nachweisgrenze: 10 ng/g Lipide / 0.5 ng/g Lipide). Ausgehend von den Untersuchungen des pharmakokinetischen Verhaltens von NP in freiwilligen Probanden muss man davon ausgehen, dass die wahren NP-Humanfettkonzentrationen mindestens um den Faktor 100 unterhalb der analytischen Blindwerte liegen.

Um publizierte in vitro Daten über die östrogene Wirkung von Alkylphenolen zu interpretieren, wurde die Verteilung von NP in primären Maushepatozyten untersucht. Nach Zugabe von 10^{-5} M NP und 10^{-6} M OP wurde die Verteilung zwischen dem Zellmedium und den Zellen untersucht, mit dem Ziel effektive Zelleffektkonzentrationen zu bestimmen. In der Mediumsfraktion wurde eine schnelle Abnahme des unveränderten NP und OP beobachtet. In den Zellen wurden Konzentrationen von 100 ng NP/mg Protein und 2-6 ng OP/mg Protein nach 2 Stunden, und 20 ng NP/mg Protein und 1-3 ng OP/mg Protein nach 48 Stunden gemessen. In verschiedenen Publikationen wurde eine minimale östrogene Zelleffektkonzentration von NP und OP in vitro von 10^{-7} M angegeben. Ausgehend von unseren Daten kann somit eine minimale östrogene Zelleffektkonzentration von zirka 100 ng/g Zellen berechnet werden.

Das pharmakokinetische Verhalten von NP wurde in freiwilligen Probanden untersucht. Um die analytischen Blindwertprobleme zu umgehen, wurde isotopenmarkiertes $^{13}\text{C}_6$ -NP synthetisiert. Sowohl nach intravenöser Gabe wie auch nach oraler Gabe wurde eine Eliminationshalbwertszeit von 2-3 Stunden gefunden. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe (berechnet durch den Vergleich der AUC's) war zirka 20%; NP scheint sich innerhalb von 2 Stunden in die Lipidphase des Körpers zu verteilen.

Die tägliche NP-Aufnahme der nicht beruflich exponierten Bevölkerung wurde mittels der spärlichen Literaturdaten über NP Konzentrationen in Trinkwasser und Nahrungsmitteln abgeschätzt. Demnach beträgt die tägliche Aufnahme ≤ 0.16 mg/Tag.

Für eine erste Risikobeurteilungen wurden die resultierenden Blutkonzentrationen nach einer täglichen Aufnahme von 0.16 mg mit den Oestradiolkonzentrationen von erwachsenen Männern verglichen. Ein Sicherheitsfaktor von 3'000 kann berechnet werden, wenn man die relative Potenz von NP miteinbezieht.

Für die zweite Risikoabschätzung wurden die resultierenden Organkonzentrationen bei einer täglichen Aufnahme von 0.16 mg (berechnet aufgrund des Lipidgehaltes) mit der minimalen östrogenen Zelleffektkonzentrationen verglichen. Der so ermittelte Sicherheitsfaktor beträgt zirka 5'000.

Auch eine Berechnung von Oestrogen-Aequivalenzfaktoren von NP und Genistein (Phytoöstrogen das in Milligrammengen täglich eingenommen wird) im Blut zeigen, dass NP von geringer Bedeutung ist.

Die Resultate dieser Studien zeigen, dass aufgrund der nicht beruflichen NP-Exposition kein östrogenes Gesundheitsrisiko resultiert.