

Risk assessment and mixture toxicity of organic micropollutants and their transformation products

Doctoral Thesis

Author(s):

Neuwöhner, Judith

Publication date:

2010

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006188436>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 19055

Risk Assessment and Mixture Toxicity of Organic Micropollutants and their Transformation Products

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Judith Neuwöhner

Dipl.-Biol., RWTH Aachen University, Germany

born October 13, 1980

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beate I. Escher

Dr. Kathrin Fenner

Prof. Dr. René P. Schwarzenbach

PD Dr. Rolf Altenburger

2010

Summary

Organic micropollutants, such as pesticides, biocides and pharmaceuticals that are widely used in agriculture and/or households, are released into the environment where they are subject to various transformation processes. The number of possible transformation products is overwhelming and many are not even identified yet. In addition to the parent compounds, the emerging transformation products may pose risks to human health and the environment due to their bioaccumulation potential and their toxicity. Thus, classical approaches for their risk assessment are not appropriate and new ways are required to evaluate transformation products and to prioritize them for further testing and refined risk assessment. Predictive models can be used for comparative risk assessment, where the risk of transformation products is evaluated in relation to their parent compound.

A prediction model based on the combination of quantitative-structure-activity relationships (QSAR) for baseline toxicity and a subsequent toxic ratio (TR) analysis was used to account for bioaccumulation and specific effects of transformation products relative to their parent compounds. To account for changes in mode of action due to transformation of a parent compound, structural units of the molecules were identified that are responsible for a specific mode of action (toxicophores). Two case studies were performed to validate the predictive model and to refine it.

In an initial step to prepare the case studies, an experimental mode-of-action classification scheme was developed. To this end, two algae tests were used, both of which yield information on the physiological mode of action by combining the time and effect pattern of different structural and functional endpoints, e.g. photosynthesis inhibition and growth rate inhibition, with a subsequent QSAR/TR-analysis. Mixture toxicity was introduced as a diagnostic tool to substantiate the mode of action analysis.

During the first case study with the antidepressant fluoxetine and its human metabolites these combined experimental and computational tools were shown to be useful. The metabolite p-trifluoromethylphenol was clearly less toxic than fluoxetine and was classified as a baseline toxicant. Fluoxetine and its demethylated metabolite norfluoxetine were equally toxic, and exhibited unusually high TR values, which pointed to a specific mode of action. However, their effect pattern with respect to the different endpoints was similar to the effect pattern of baseline toxicants. A subsequent investigation on the pH-dependent toxicity of five basic pharmaceuticals, all containing an aliphatic amine group like fluoxetine and norfluoxetine, and the development of a simple toxicokinetic ion-trapping model showed that the apparent high TR was caused by a toxicokinetic effect due to speciation and not by a toxicodynamic effect due to a specific mode of action. When speciation of fluoxetine and norfluoxetine was taken into account, they were also classified as baseline toxicants.

The second case study focused on the herbicide diuron and its transformation products. Effects on algae and daphnids were investigated to answer the question of whether transformation processes lead to differences in the species' sensitivities depending on changes in mode of action. Indeed, for algae, a decrease in toxicity from diuron to 3,4-dichloroaniline with concomitant decrease in the specific effect could be observed. In

contrast, for daphnia, an increase in toxicity from diuron to 3,4-dichloroaniline with subsequent formation of a specific mode of action was observed. The decrease of the specific effect in algae could be related to the presence of the methylurea group. In daphnia, cleavage of the methylurea group led to the change from baseline toxicity of diuron to the specific effect of 3,4-dichloroaniline. Mixture toxicity experiments confirmed this mode of action analysis.

Both case studies demonstrated the importance of accounting for transformation products in the risk assessment of organic micropollutants. This is especially relevant for the primary transformation products, which often still possess the same mode of action as the parent and will add to the overall risk of the parent. Further, the formation of new toxicophores may lead to higher toxicity and might even change the target species and thus species sensitivity.

With the findings of the case studies the prediction model was improved. First, the case of fluoxetine clearly demonstrated that the prediction of the bioaccumulation potential of ionizable chemicals posed problems. The difference in liposome-water partitioning between the neutral and the ionized species (Δm_w) varied strongly. However, the underlying database of measured liposome-water partitioning coefficients was too small to derive more precise rules for the Δm_w prediction of ionizable compounds. Consequently, ionization was implemented into the prediction model by using the earlier suggested generic Δm_w of 1. Second, the case study of diuron demonstrated how important it is to account for species-specific toxicophores. Therefore, screening for species-specific toxicophore structures was implemented into the model.

In conclusion, the improved prediction model is a systematic and integrated approach to identify transformation products of relevance. Further research should focus on applying the developed prediction model to a broader range of chemicals to prove its predictive power and applicability.

Zusammenfassung

Umweltbelastende organische Chemikalien, wie z.B. Pestizide, Biozide und Pharmaka, werden weltweit in hohen Mengen eingesetzt und gelangen so in die Umwelt, wo sie diversen Abbau- und Transformationsprozessen unterliegen. Die mögliche Anzahl an Umwandlungsprodukten ist gross und viele Umwandlungsprodukte sind bisher noch nicht identifiziert. Die gebildeten Umwandlungsprodukte können aufgrund ihres Bioakkumulationspotenzials und ihrer Toxizität sowohl für die menschliche Gesundheit als auch für die Umwelt ein Risiko darstellen. Daher können die klassischen Methoden zur Risikobewertung nicht eingesetzt werden und neue Methoden für die Bewertung von Umwandlungsprodukten werden benötigt, um Schwerpunkte für weitere Untersuchungen setzen und eine verbesserte Risikobewertung durchführen zu können. Um das Risiko von Umwandlungsprodukten im Verhältnis zu ihren Ausgangssubstanzen zu bewerten, können prädiktive Modelle für eine vergleichende Risikobewertung eingesetzt werden.

Bioakkumulationspotenzial und spezifische Effekte der Umwandlungsprodukte in Bezug zu ihren Ausgangssubstanzen wurden mit einem Vorhersagemodell untersucht, das Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) für Basistoxizität mit einer anschliessenden Toxizitätsverhältnis (TR) Analyse kombiniert. Änderungen des Wirkmechanismus durch Umwandlung der Ausgangssubstanz wurden berücksichtigt, indem strukturelle Einheiten identifiziert wurden, die für einen spezifischen Wirkmechanismus verantwortlich sind (Toxikophore). Zwei Fallstudien wurden durchgeführt, um das prädiktive Modell zu validieren und zu verbessern. Ein erster Schritt zur Vorbereitung der Fallstudien war die Entwicklung eines auf Wirkmechanismen basierten Klassifizierungsschemas. Dazu lieferten zwei Algentests Informationen über den physiologischen Wirkmechanismus. Die Zeitabhängigkeit der untersuchten Effekte und ein Vergleich verschiedener struktureller Endpunkte, z.B. Inhibition der Wachstumsrate, und funktioneller Endpunkte, z.B. Inhibition der Photosynthese, wurde mit einer QSAR/TR-Analyse kombiniert. Mischungstoxizitätskonzepte wurden als diagnostisches Werkzeug zur Unterstützung der Wirkmechanismusanalyse eingeführt.

Die Anwendung der Kombination aus experimentellen und rechnergestützten Werkzeugen wurde in der ersten Fallstudie anhand des Antidepressivums Fluoxetin und seiner Humanmetabolite demonstriert. Der Metabolit p-Trifluormethylphenol zeigte eine deutlich geringere Toxizität als Fluoxetin und wurde als basistoxischer Stoff klassifiziert. Fluoxetin und sein demethylierter Metabolit Norfluoxetin zeigten eine ähnliche Toxizität und wiesen ein ungewöhnlich hohes Toxizitätsverhältnis (TR, definiert als das Verhältnis von vorhergesagtem Effektendpunkt zu experimentellem Effektendpunkt) auf, das trotz der Ähnlichkeit des Effektmusters zu basistoxischen Stoffen auf einen spezifischen Wirkmechanismus hindeutete. Die folgende Untersuchung der pH-Abhängigkeit von fünf verschiedenen basischen Pharmaka, die alle wie Fluoxetin und Norfluoxetin eine aliphatische Aminogruppe besitzen, sowie die Entwicklung eines einfachen toxikokinetischen ion-trapping-Modells zeigte, dass der scheinbar hohe TR auf einen toxikokinetischen Effekt aufgrund der Speziierung dieser Stoffe zurückzuführen ist und nicht auf einen toxikodynamischen Effekt aufgrund eines spezifischen Wirkmechanismus. Unter

Berücksichtigung der Spezierung werden so auch Fluoxetin und Norfluoxetin als basistoxische Stoffe klassifiziert.

Das Herbizid Diuron und seine Umwandlungsprodukte standen im Fokus der zweiten Fallstudie. Um die Frage zu beantworten, ob Umwandlungsprozesse auch zu spezies-abhängigen Änderungen im Wirkmechanismus führen können, wurde der Effekt sowohl auf Algen als auch auf Daphnien untersucht. Für Algen wurde eine Abnahme der Toxizität von Diuron bis hin zum letzten untersuchten Umwandlungsprodukt 3,4-Dichloranilin festgestellt. In Daphnien dagegen nahm die Toxizität von Diuron bis zu 3,4-Dichloranilin, das in diesem Fall einen spezifischen Wirkmechanismus hat, zu. Die Abnahme der Toxizität in Algen kann auf Modifizierungen bzw. den kompletten Abbau der Methylurea-Gruppe zurückgeführt werden. In Daphnien führt das Abspalten der Methylurea-Gruppe zu einem spezifischen Wirkmechanismus des Umwandlungsproduktes 3,4-Dichloranilin. Diese Wirkmechanismen-analyse wurde durch Mischungsexperimente bestätigt.

Beide Fallstudien demonstrieren die Notwendigkeit, Umwandlungsprodukte in der Risikobewertung von Mikroverunreinigungen zu berücksichtigen. Dies ist vor allem in Hinblick auf die ersten Umwandlungsprodukte relevant, da diese oft noch den gleichen Wirkmechanismus besitzen wie die Ausgangssubstanz und somit zum Gesamtrisiko der Ausgangssubstanz beitragen. Zusätzlich kann auch die Entstehung eines neuen Toxikophors zu einer höheren Toxizität führen und die Spezies-Sensitivität im Vergleich zur Ausgangssubstanz ändern.

Die Ergebnisse der Fallstudien erlaubten eine Verbesserung des Vorhersagemodells. Die Fluoxetin-Fallstudie zeigte, dass die Vorhersage des Bioakkumulationspotenzials von ionisierbaren Substanzen problematisch ist. Der Unterschied des Liposom-Wasser-Verteilungskoeffizienten von neutraler zu ionisierter Spezies (Δm_w) variierte stark. Aufgrund der geringen Anzahl an gemessenen Liposom-Wasser-Verteilungskoeffizienten für ionisierbare Substanzen war eine Ableitung von präziseren Regeln für die Vorhersage des Δm_w nicht möglich. Daher wurde die Ionisierung in Form des bereits bekannten, generischen Δm_w von 1 für den Liposom-Wasser-Verteilungskoeffizienten in das Vorhersagemodell implementiert. Die Diuron-Fallstudie zeigte, wie wichtig es ist, speziesabhängige Toxikophore zu berücksichtigen. Daher wurde die Überprüfung der Chemikalien auf Spezies spezifische Toxikophore in das Vorhersagemodell implementiert.

Insgesamt stellt das verbesserte Vorhersagemodell einen systematischen und integrativen Ansatz zur Identifizierung von relevanten Umwandlungsprodukten dar. Um das Vorhersagemodell auf seine prädiktive Aussagekraft zu prüfen, sollte es in Zukunft auf eine größere Auswahl von Chemikalien angewandt werden.