

Entwicklung von Ionischen Flüssigkeiten höherer Eigensicherheit unter Verwendung einer flexiblen (öko-)toxikologischen Testbatterie

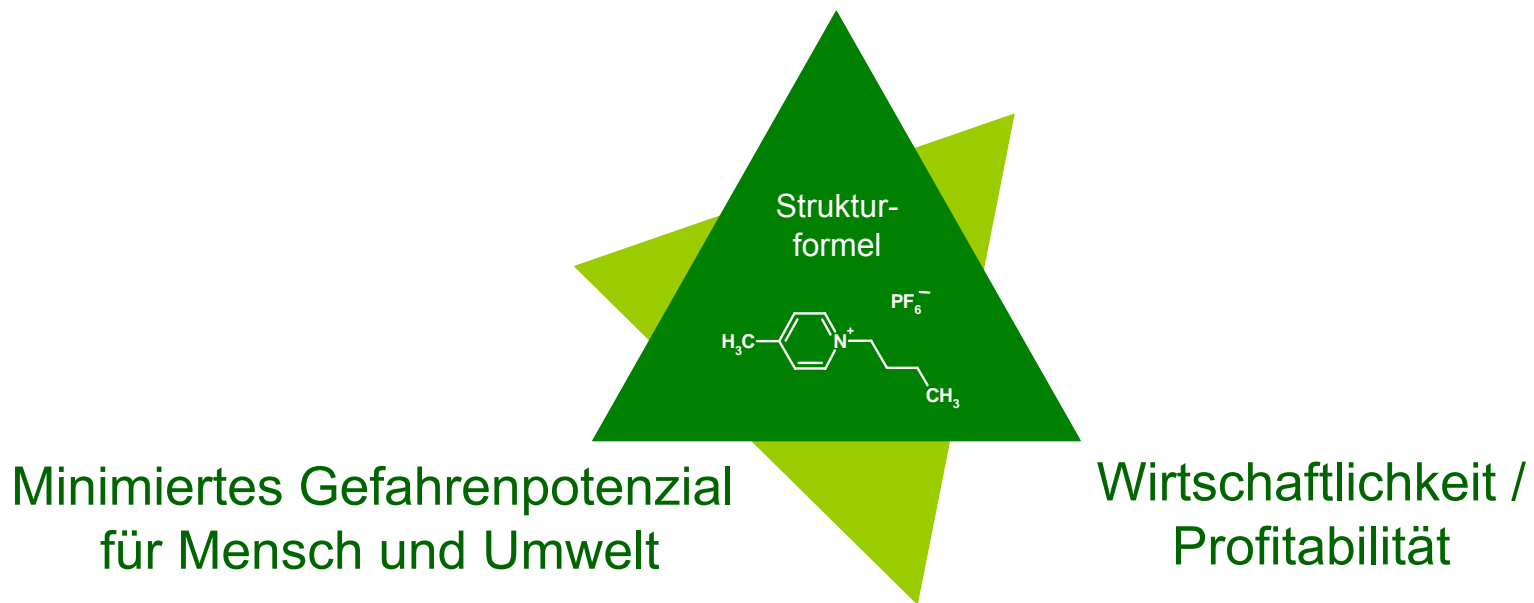


Stefan Stolte



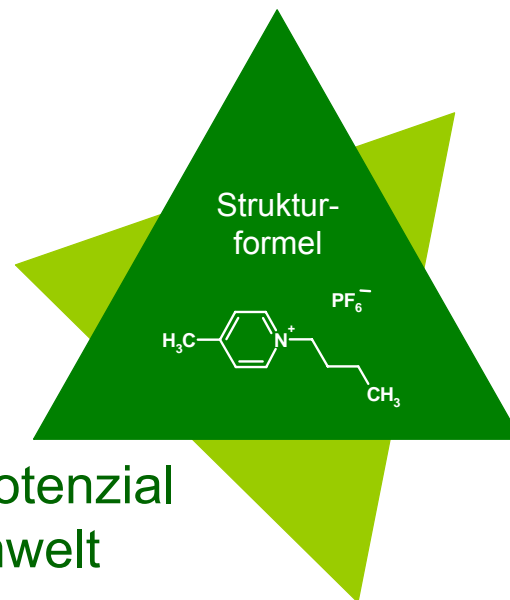
Ziel: „Nachhaltiges Produktdesign“

Technisches Leistungsprofil



Jastorff et al. 2003
Green Chemistry 5, 136-142

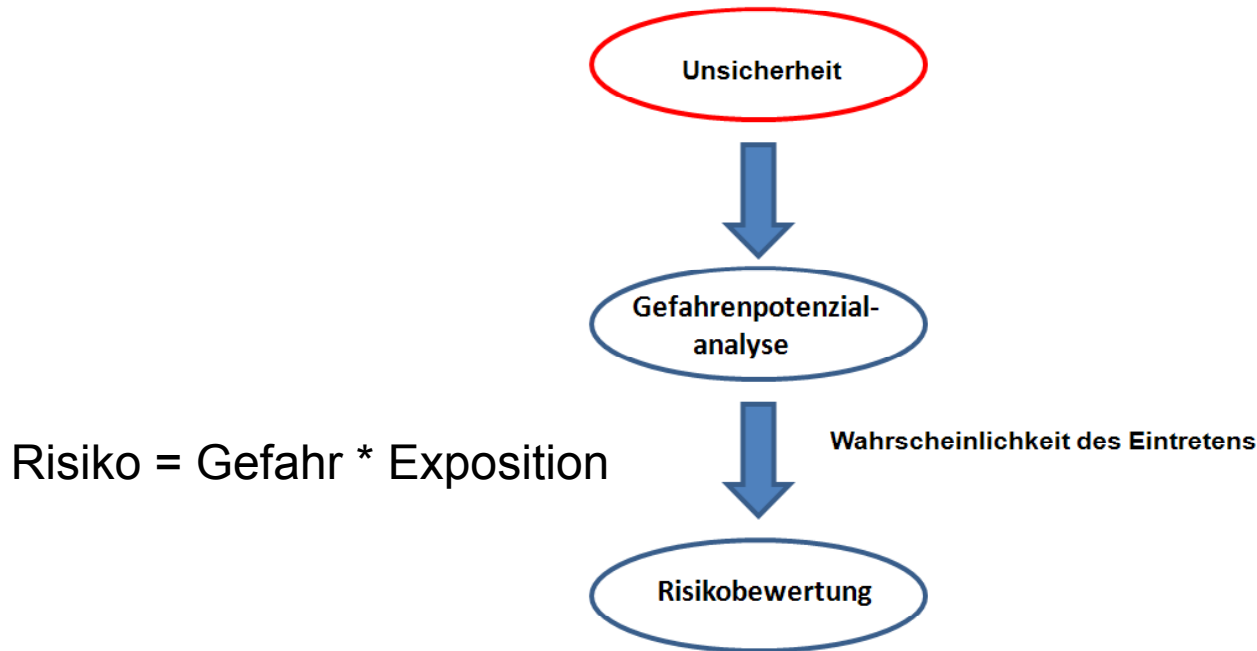
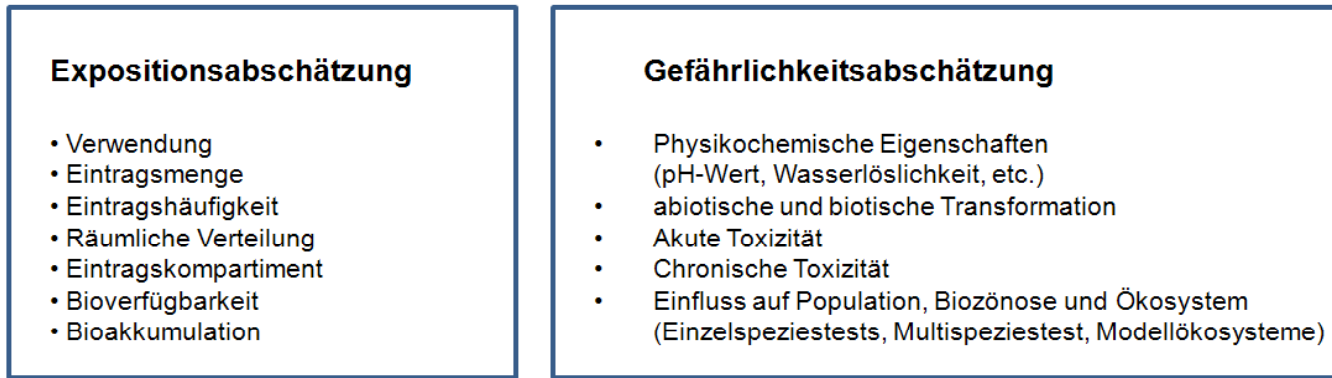
Ziel: „Nachhaltiges Produktdesign“



Minimiertes Gefahrenpotenzial
für Mensch und Umwelt

Jastorff et al. 2003
Green Chemistry 5, 136-142

Was ist notwendig um das Gefahrenpotenzial abzuschätzen?



Schätzungsweise 13 bis 20 Millionen Pflanzen- und Tierarten

Übertragbarkeit: Laborversuch / Freiland
Tierversuch / Mensch

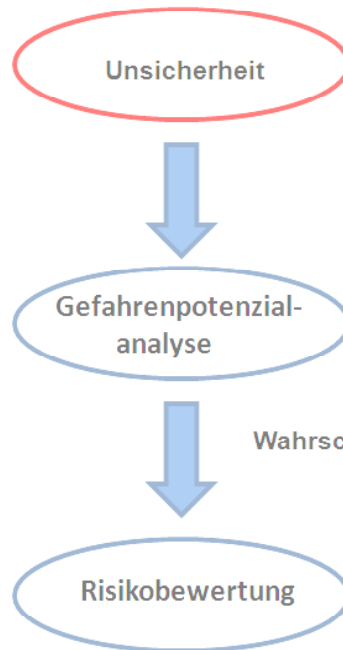
Zusammenwirken biotischer und abiotischer Faktoren

Expositionsabschätzung

- Verwendung
- Eintragsmenge
- Eintragshäufigkeit
- Räumliche Verteilung
- Eintragskompartiment
- Bioverfügbarkeit
- Bioakkumulation

Gefährlichkeitsabschätzung

- Physikochemische Eigenschaften (pH-Wert, Wasserlöslichkeit, etc.)
- abiotische und biotische Transformation
- Akute Toxizität
- Chronische Toxizität
- Einfluss auf Population, Biozönose und Ökosystem (Einzelspezies-tests, Multispezies-test, Modellökosysteme)



Ein sehr komplexes Feld mit dem Ziel den Faktor „Unsicherheit“ zu reduzieren

Das „Nachhaltige Produktdesign“ am Beispiel der Ionischen Flüssigkeiten





Theoretisch sind 10^{12} Ionische Flüssigkeiten möglich

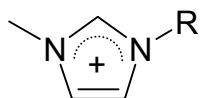
Problem:

Strukturvielfalt repräsentiert ein unkalkulierbares
Risiko für Mensch und Umwelt

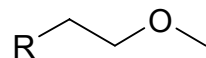
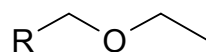
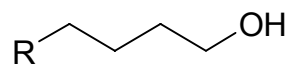
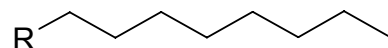
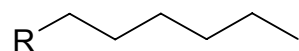
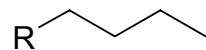
Unser Ansatz:

- **systematische Auswahl der Substanzen für die (öko-)toxikologische Daten erhoben werden**

Kopfgruppe



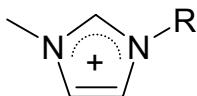
Seitenkette



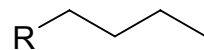
Anion



Kopfgruppe



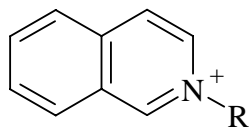
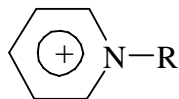
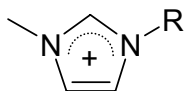
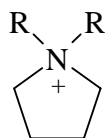
Seitenkette



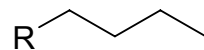
Anion



Kopfgruppe



Seitenkette



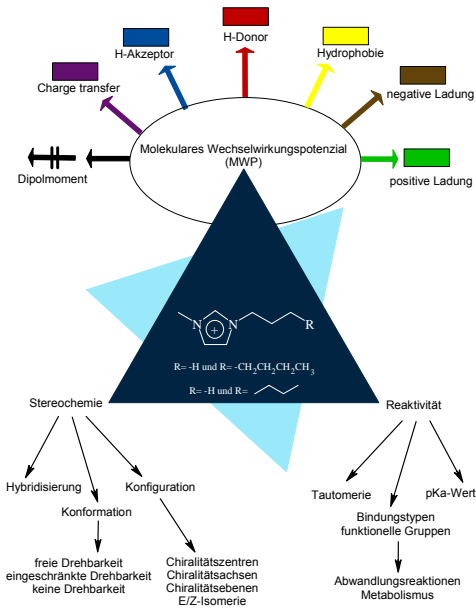
Anion



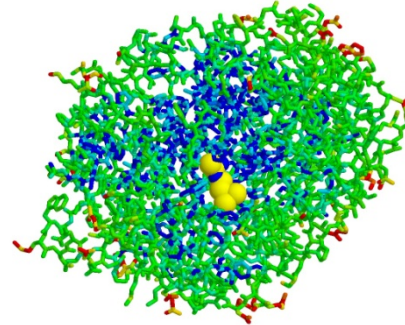
Unser Ansatz:

- systematische Auswahl der Substanzen für die (öko-)toxikologische Daten erhoben werden
- **testen in einer flexiblen (öko-)toxikologischen Testbatterie und Etablierung einer Analytik**

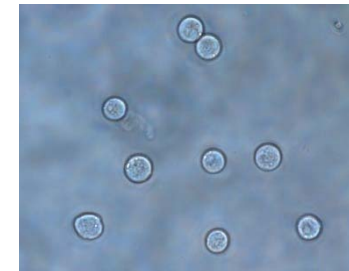
Struktur-Wirkungs-Analyse



Enzymhemmtest (Acetylcholinesterase)



Zellvitalitätstest WST-1-Assay mit IPC-81 - Zellen

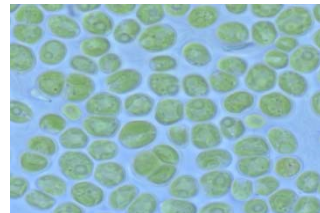


Die Testbatterie

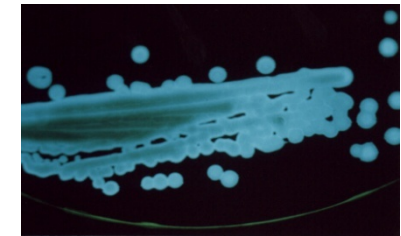
Wachstumshemmtest mit *Lemna minor* ISO TC 147/SC 5 N draft



Reproduktionshemmtest limnische Grünalge (*Scenedesmus vacuolatus*)



Lumineszenzhemmtest marines Bakterium (*Vibrio fischeri*), DIN 38412 L 341

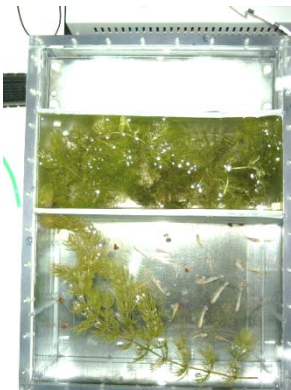


Die Testbatterie



Wachstumshemmtest

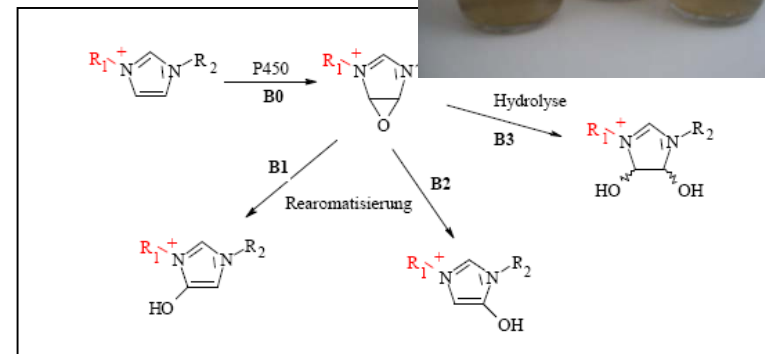
Triticum aestivum und *Lepidium sativum*



AquaHab

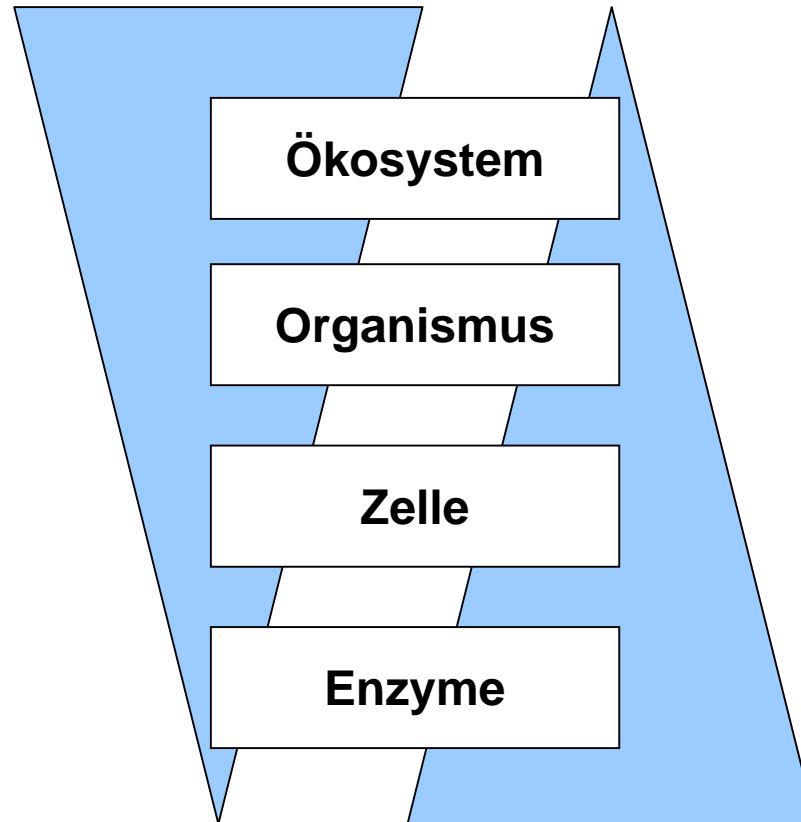


Reproduktionshemmtest *Folsomia candida*



Tests zur biologischen Abbaubarkeit
und zur biologischen Transformation

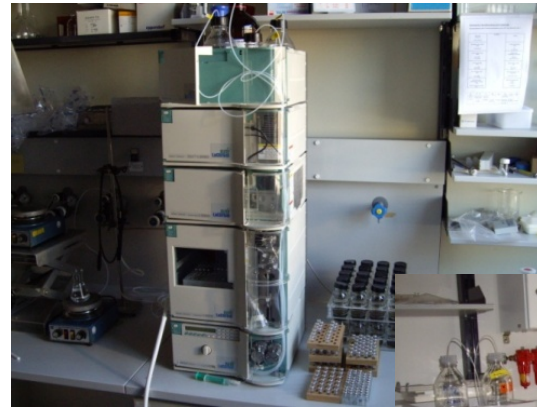
Hohe Übertragbarkeit
(Hohe Relevanz für ökologische Betrachtungen)



Höhe Generalisierbarkeit
(Hohe Relevanz für molekulare Betrachtungen)

Analytik

- Identitätsbestimmung
- Reinheitskontrolle
- Bestimmung von Ist-Konzentrationen
- Adsorption an biologische Matrizes
- Interaktion mit Membranen
- Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit/Metabolismus
- Q-SAR Toxizitäts-Korrelationen



HPLC-DAD

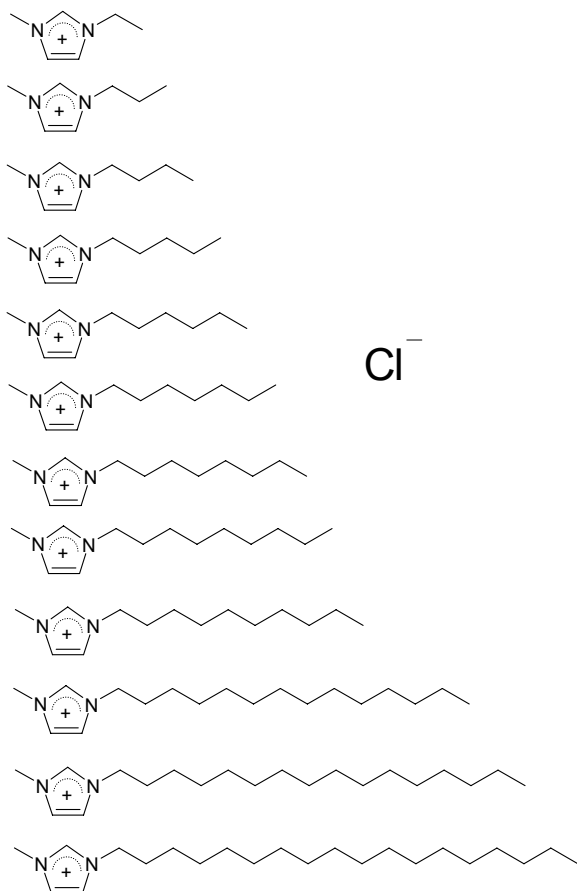


HPLC-(ESI)MS

Unser Ansatz:

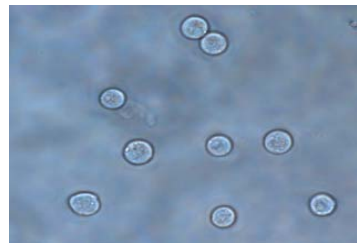
- systematische Auswahl der Substanzen für die (öko-)toxikologische Daten erhoben werden
- testen in einer flexiblen (öko-)toxikologischen Testbatterie und Etablierung einer Analytik
- **Identifizierung von einzelnen Strukturelementen, die (öko-)toxisch wirken und die die biologische Abbaubarkeit beeinflussen**

Einfluss der Seitenkette



Zellvitalitätstest

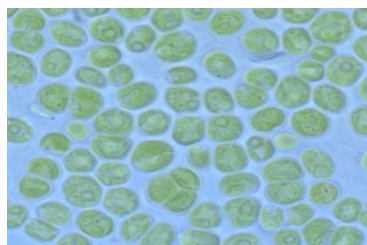
WST-1-Assay mit IPC-81 - Zellen



Ranke et al. 2004 *Ecotoxicol Environ Saf* **58** (3) 396-404

Stolte et al. 2007 *Green Chem* **9** (8) 760-767

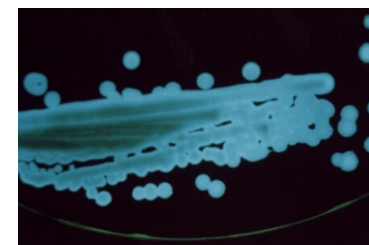
Limnische Grünalge
(*Scenedesmus vacuolatus*)



Wasserlinse
(*Lemna minor*)



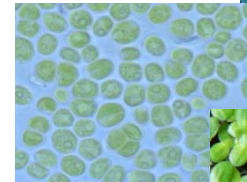
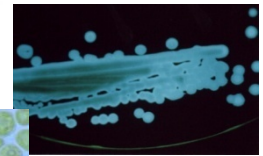
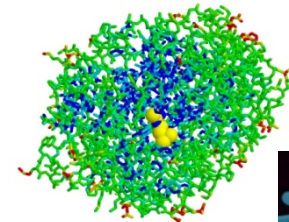
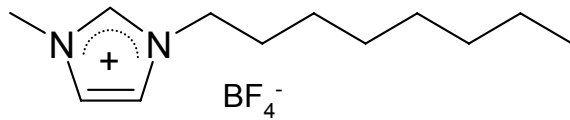
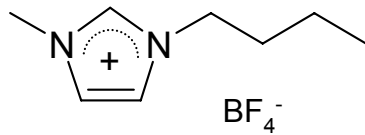
Marines Bakterium
(*Vibrio fischeri*)



Stolte et al. 2007 *Green Chem* **9** (11) 1170-1179

Je länger die Alkylseitenkette, desto toxischer die Substanz

Einfluss der Seitenkette



Enchytraeus albidus

Dendrobaena Veneta

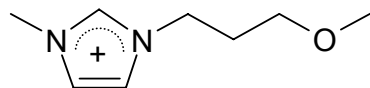
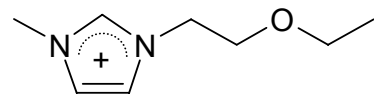
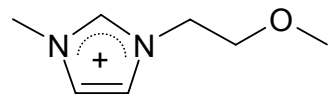
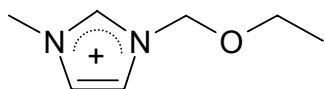
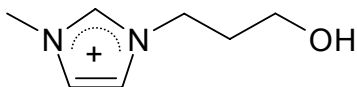
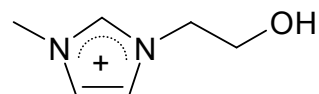
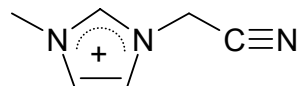
Einfluss der Seitenkette

Zellvitalitätstest

WST-1-Assay mit IPC-81 - Zellen

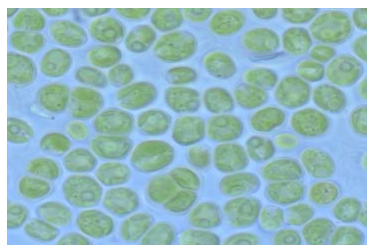


Stolte et al. 2007 *Green Chem* 9 (8) 760-767



Cl⁻

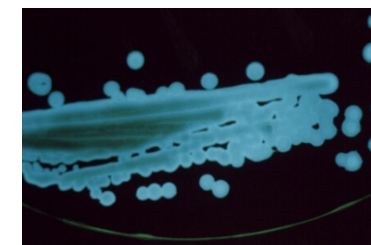
Limnische Grünalge
(*Scenedesmus vacuolatus*)



Wasserlinse
(*Lemna minor*)



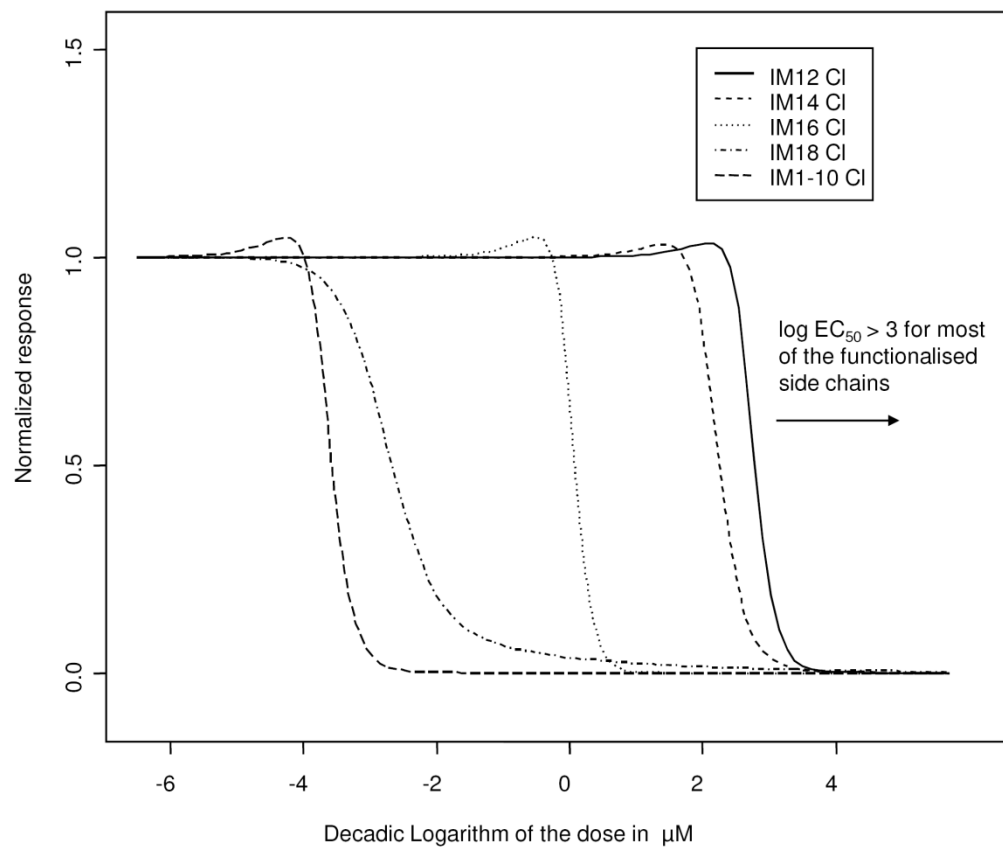
Marines Bakterium
(*Vibrio fischeri*)



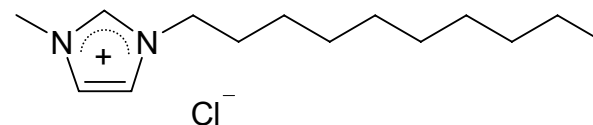
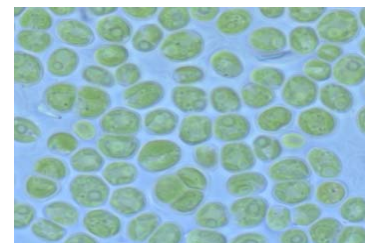
Stolte et al. 2007 *Green Chem* 9 (11) 1170-1179

Je polarer die Seitenkette, desto weniger toxisch die Substanz

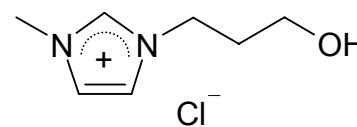
Einfluss der Seitenkette



Limnische Grünalge
(*Scenedesmus vacuolatus*)



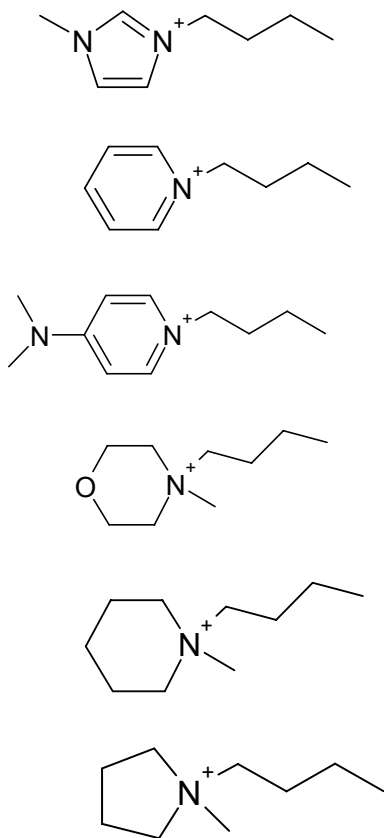
$EC_{50} = 0.3 \text{ nM}$



$EC_{50} > 1 \text{ mM}$

Verschiebung der Toxizität um 6-7 Größenordnungen!

Einfluss des Kopfgruppe



Zellvitalitätstest

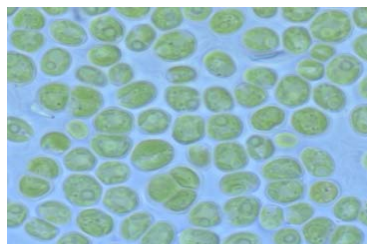
WST-1-Assay mit IPC-81 - Zellen



Ranke et al. 2004 *Ecotoxicol Environ Saf* **58** (3) 396-404

Stolte et al. 2007 *Green Chem* **9** (8) 760-767

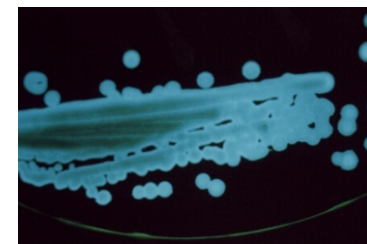
Limnische Grünalge
 (*Scenedesmus vacuolatus*)



Wasserlinse
 (*Lemna minor*)

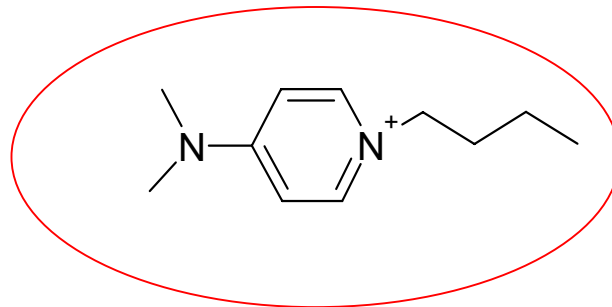


Marines Bakterium
 (*Vibrio fischeri*)



Stolte et al. 2007 *Green Chem* **9** (11) 1170-1179

Die Kopfgruppe trägt weniger zur Toxizität des Kations bei



Die Hydrophobie des Kations

- quantitative Bestimmung der Hydrophobie über einen HPLC bestimmten Parameter ($\log k_0$)

Ranke et al. 2007 *Ecotoxicol Environ Saf* 67 (3) 430-438

Die Hydrophobie des Kations

- quantitative Bestimmung der Hydrophobie über einen HPLC bestimmten Parameter ($\log k_0$)

Ranke et al. 2007 *Ecotoxicol Environ Saf* 67 (3) 430-438

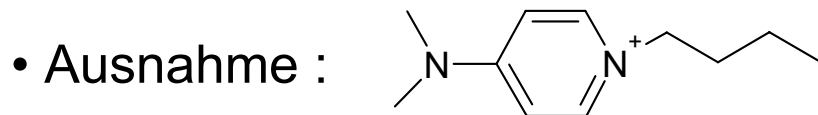
- der $\log k_0$ wird maßgeblich von der Seitenkette bestimmt; die Kopfgruppe ist weniger ausschlaggebend

Die Hydrophobie des Kations

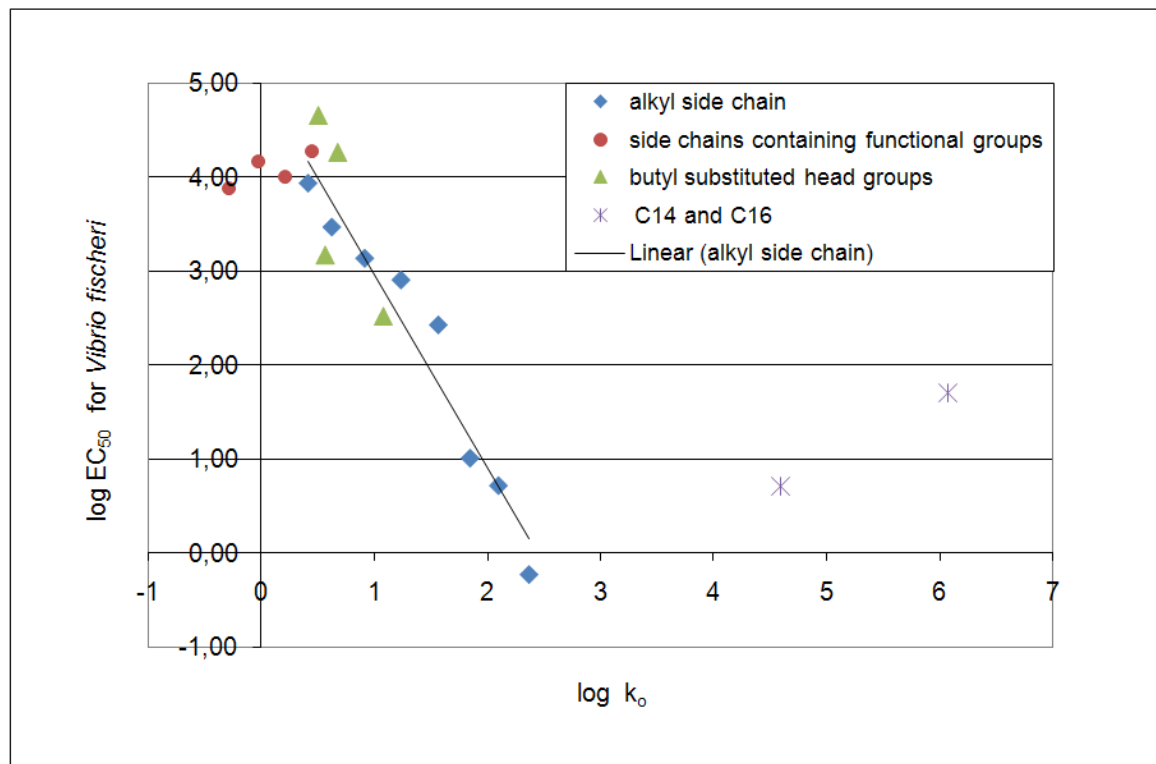
- quantitative Bestimmung der Hydrophobie über einen HPLC bestimmten Parameter ($\log k_0$)

Ranke et al. 2007 *Ecotoxicol Environ Saf* 67 (3) 430-438

- der $\log k_0$ wird maßgeblich von der Seitenkette bestimmt; die Kopfgruppe ist weniger ausschlaggebend

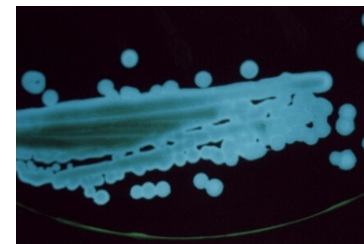


Die Abhängigkeit der Toxizität von der Hydrophobie

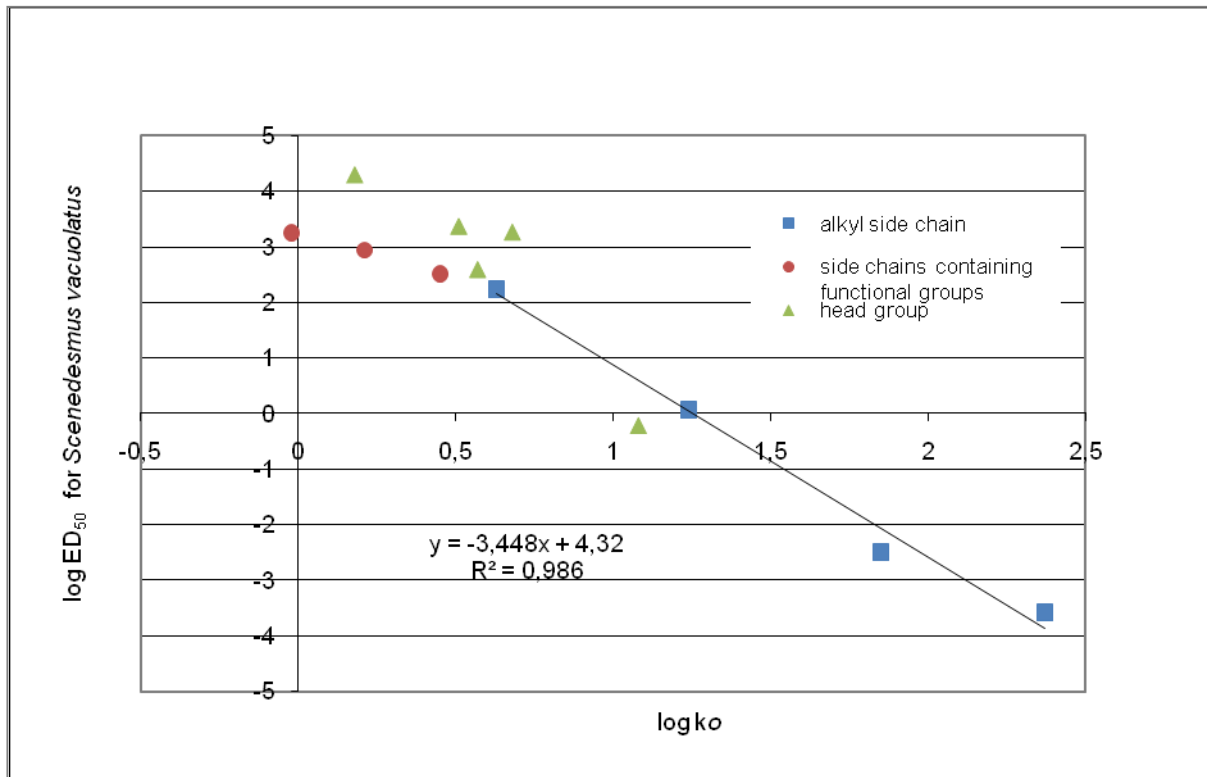


Stolte et al. 2007 *Green Chem* 9 (11) 1170-1179

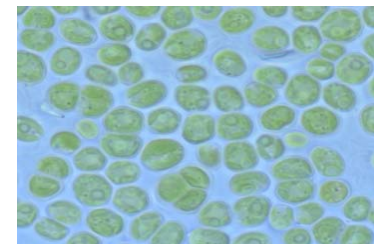
Marines Bakterium (*Vibrio fischeri*)



Die Abhängigkeit der Toxizität von der Hydrophobie



Limnische Grünalge (*Scenedesmus vacuolatus*)

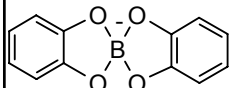
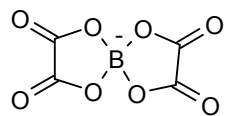
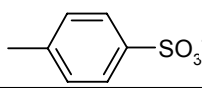


Stolte et al. 2007 *Green Chem* 9 (11) 1170-1179

Hypothese:

Störung des Membransystems und höhere interne Effektkonzentrationen

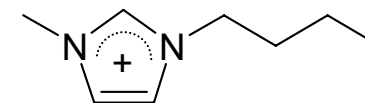
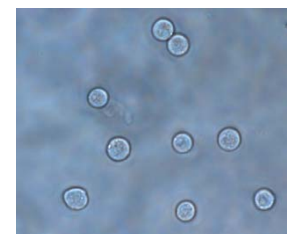
Einfluss des Anions

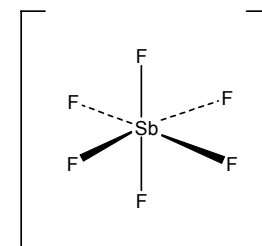
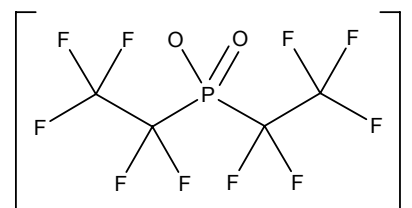
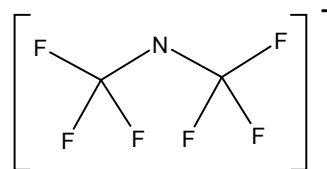
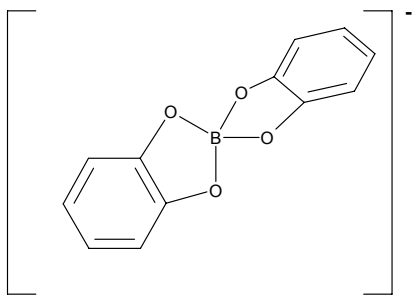
No.	Structure	Name	No.	Structure	Name
1	BF_4^-	Tetrafluoroborate	13	SCN^-	Thiocyanate
2		Bis-[1,2-benzene-diolato(2-)] borate (BBDB)	14	HSO_3^-	Hydrogen sulfate
			15	$\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$	Methyl sulfate
			16	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_3^-$	Ethyl sulfate
3		Bis-[oxalato(2-)]-borate (BOB)	17	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OSO}_3^-$	Octyl sulfate
			18	$\text{H}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{OSO}_3^-$	2-(2-methoxyethoxy)-ethylsulfate
			19	$\text{H}_3\text{C}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OSO}_3^-$	Methyl-poly(oxy-1,2-ethanediyl) sulfate
			20	CH_3SO_3^-	Methanesulfonate
4	$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_3\text{C}^-$	Tris(trifluoromethyl-sulfonyl)methide	21	CF_3SO_3^-	Trifluoromethanesulfonate
5	$(\text{CN})_2\text{N}^-$	Dicyanamide	22		Tosylate (Tos)
6	$\text{N}(\text{CF}_3)_2^-$	Bis(trifluoro-methyl)imide			
7	$\text{N}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2^-$	Bis(trifluoromethyl-sulfonyl)imide	23	F^-	Fluoride
8	PF_6^-	Hexafluorophosphate	24	Cl^-	Chloride
9	$(\text{C}_2\text{F}_5)_3\text{PF}_3^-$	Tris(pentafluoroethyl)-trifluorophosphate	25	Br^-	Bromide
10	$(\text{C}_3\text{F}_7)_3\text{PF}_3^-$	Tris(heptafluoropropyl)-trifluorophosphate	26	I^-	Iodide
11	$[(\text{C}_2\text{F}_5)_2\text{P}(\text{O})\text{O}]^-$	Bis(pentafluoroethyl)-phosphinate	27	$\text{Co}(\text{CO})_4^-$	Cobalttetracarbonyl
12	SbF_6^-	Hexafluoro-antimonate			

Stolte et al. 2006 *Green Chem* 8 (7) 621-629

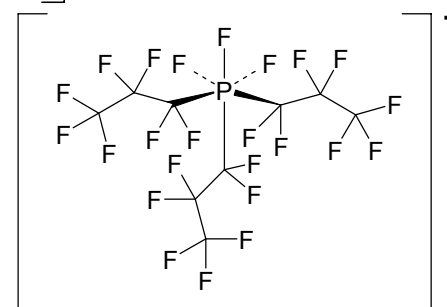
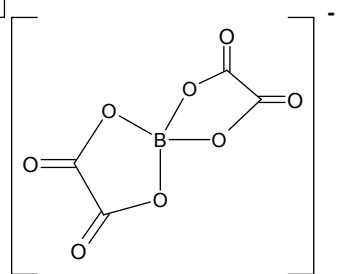
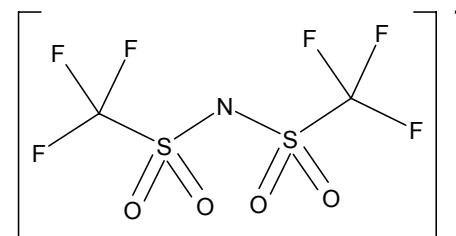
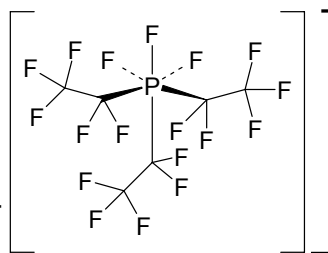
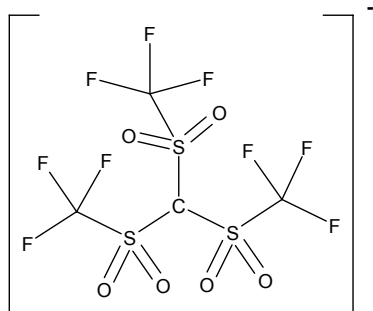
Zellvitalitätstest

WST-1-Assay mit IPC-81 - Zellen



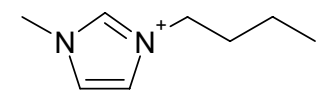
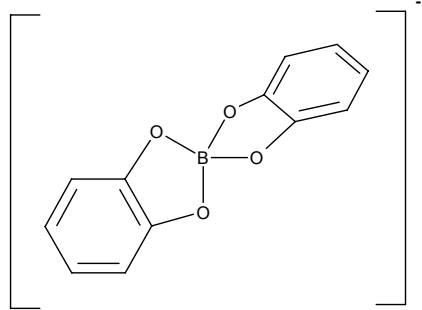
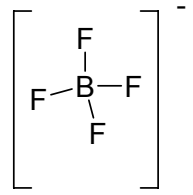
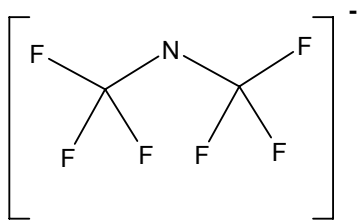
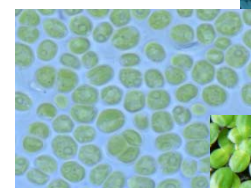
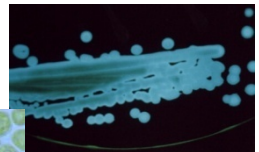
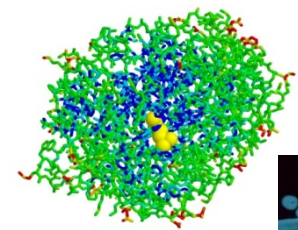
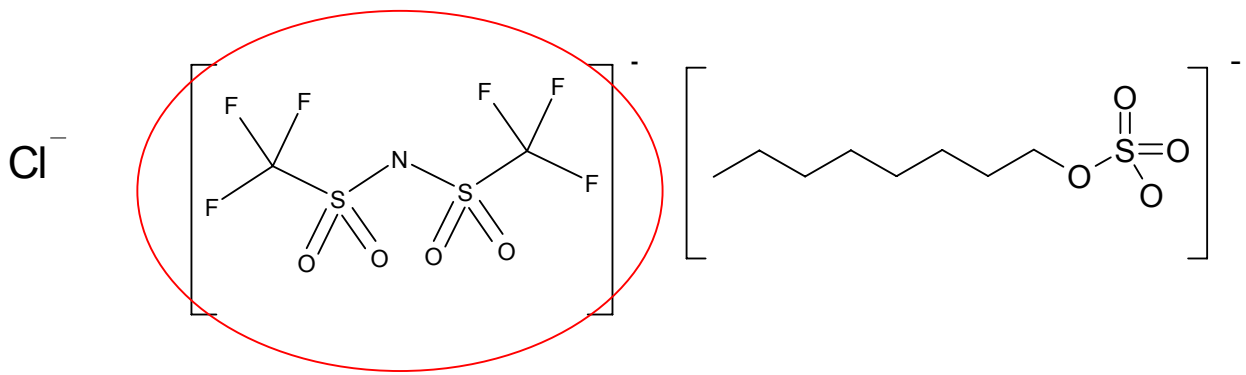


hochfluorierte und / oder hydrolyse-empfindliche Strukturen beeinflussen die Zytotoxizität



Verschiebung der Toxizität um 3 Größenordnungen!

Einfluss des Anions





Matzke et al. 2007 9 (11) 1198-1207
Green Chem

- Entwicklung und Wachstum des Weizens gestört durch das $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$ Anion: Pseudo-Sukkulenz und Verlust des Gravitropismus

- die untersuchten Anionen tragen (zum Teil deutlich) zur Toxizität von Ionischen Flüssigkeiten bei

- die untersuchten Anionen tragen (zum Teil deutlich) zur Toxizität von Ionischen Flüssigkeiten bei
- **der Effekt des Anions war in der Regel nicht so ausgeprägt wie der “Seitenketten-Effekt”**

- die untersuchten Anionen tragen (zum Teil deutlich) zur Toxizität von Ionischen Flüssigkeiten bei
- der Effekt des Anions war in der Regel nicht so ausgeprägt wie der “Seitenketten-Effekt”
- **Zusammenhang zwischen hochfluorierten und / oder hydrolyseempfindlichen Strukturen und Toxizität konnte nicht für alle Substanzen und Testsysteme bestätigt werden**

- die untersuchten Anionen tragen (zum Teil deutlich) zur Toxizität von Ionischen Flüssigkeiten bei
- der Effekt des Anions war in der Regel nicht so ausgeprägt wie der “Seitenketten-Effekt”
- Zusammenhang zwischen hochfluorierten und / oder hydrolyseempfindlichen Strukturen und Toxizität konnte nicht für alle Substanzen und Testsysteme bestätigt werden
- **oft große Unterschiede in den verschiedenen Testsystemen**

- die untersuchten Anionen tragen (zum Teil deutlich) zur Toxizität von Ionischen Flüssigkeiten bei
- der Effekt des Anions war in der Regel nicht so ausgeprägt wie der “Seitenketten-Effekt”
- Zusammenhang zwischen hochfluorierten und / oder hydrolyseempfindlichen Strukturen und Toxizität konnte nicht für alle Substanzen und Testsysteme bestätigt werden
- aber oft große Unterschiede in den verschiedenen Testsystemen
- **Wirkmechanismen**

Mischungstoxizität

Ionische Flüssigkeiten sind Kombinationen aus zwei unterschiedlichen chemischen Spezies

Konzept der Konzentrations-Additivität:

- robustes Vorhersage-Konzept aus der Pharmakologie zur Untersuchung von Kombinationswirkungen
- Berechnung von EC_{50} -Werten

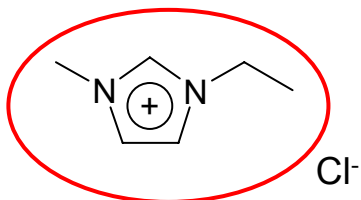
$$EC_{X(Mix)} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_X(S_i)} \right)^{-1} \quad \text{mit} \quad p_i = \frac{C_{S_i}}{C_{(Mix)}}$$

Für ein binäres Gemisch in dem beide Komponenten in gleichen Konzentrationen vorliegen ergibt sich:

$$EC_{50}^{1+2} = \frac{EC_{50}^1 * EC_{50}^2}{EC_{50}^1 + EC_{50}^2}$$

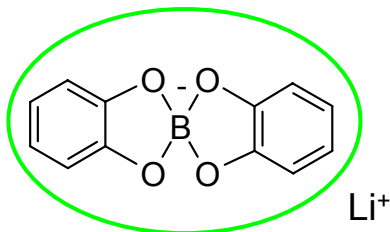
Berechnung:

$$EC_{50}^{1+2} = \frac{EC_{50}^1 * EC_{50}^2}{EC_{50}^1 + EC_{50}^2}$$



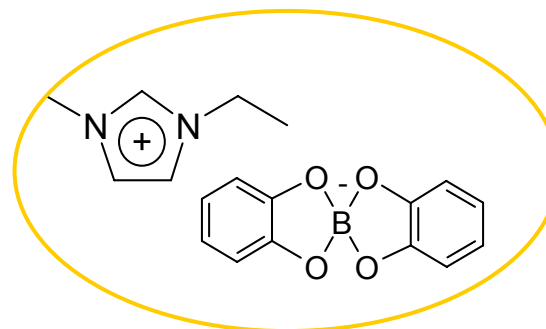
Cl⁻

EC_{50}^1



Li⁺

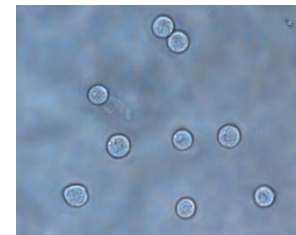
EC_{50}^2



EC_{50}^{1+2}

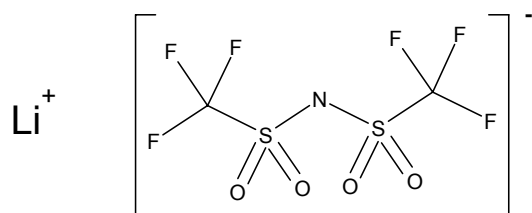
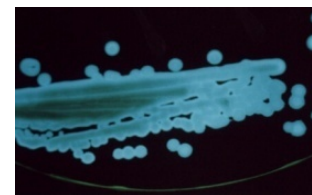
Beispiele:

	EC ₅₀ values/μM	
	C ₂ MIM	C ₄ MIM
BBDB	10 (13)	
BOB	860 (890)	
(CN) ₂ N ⁻		1400 (2900)
SbF ₆ ⁻		180 (190)
HSO ₄ ⁻		1900 (2500)
C ₈ H ₁₇ OSO ₃ ⁻		1700 (1600)
Tos		1900 (3000)

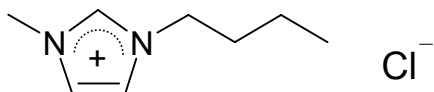


- das Konzept der Konzentrations-Additivität sind mögliche Ausgangspunkte für die prospektive Abschätzung
- Können Experimente nicht ersetzen

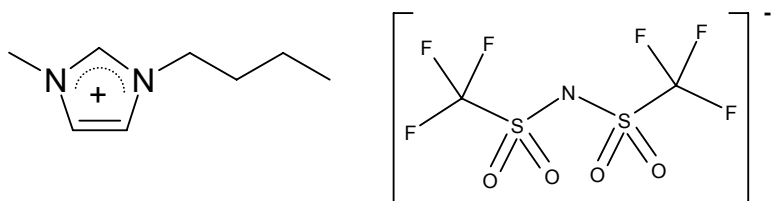
Kombinationswirkungen



$\text{EC}_{50} > 20\ 000\ \mu\text{M}$



$\text{EC}_{50} = 2\ 500\ \mu\text{M}$



$\text{EC}_{50} = 300\ \mu\text{M}$ (Gemessen)

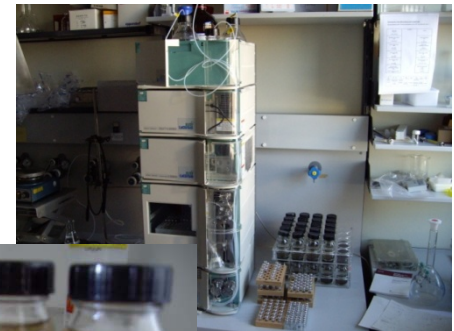
$\text{EC}_{50} = 5\ 000\ \mu\text{M}$ (Berechnet)

- Ionenpaarbildung, Bioverfügbarkeit
- Kombinationswirkungen schränken Prognose der Toxizität ein

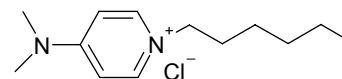
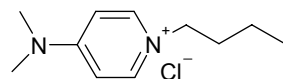
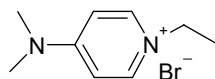
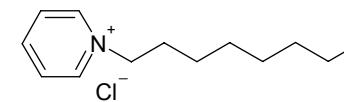
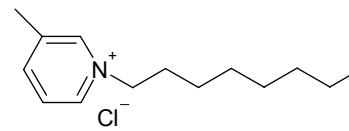
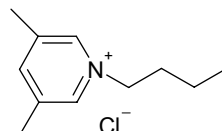
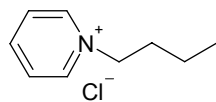
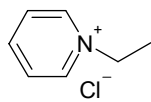
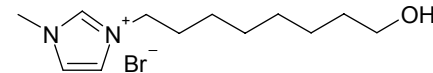
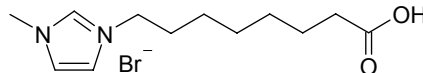
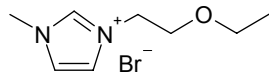
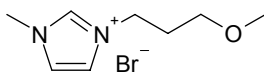
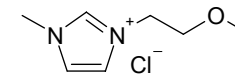
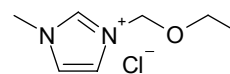
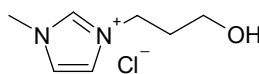
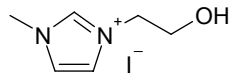
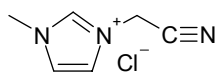
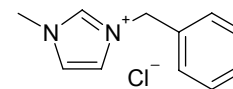
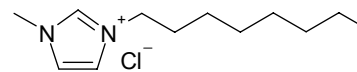
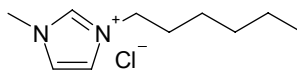
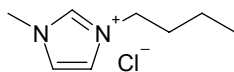
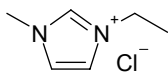
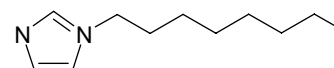
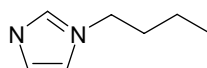
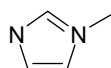
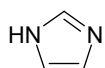
Die biologische Abbaubarkeit von Ionischen Flüssigkeiten

Bestimmung des Primärabbaus

- modifizierter OECD Test 301
- Belebtschlamm aus der Kläranlage
- Inkubationszeit von 31 Tagen



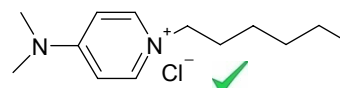
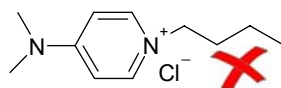
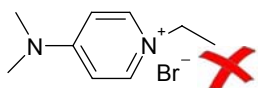
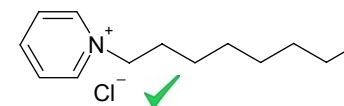
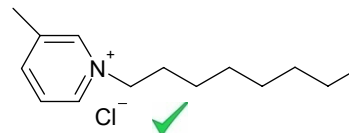
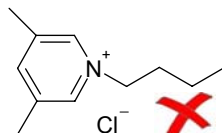
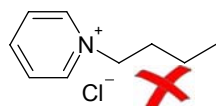
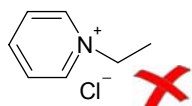
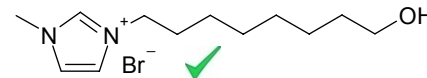
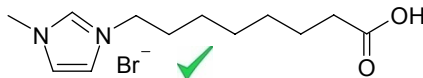
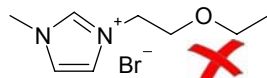
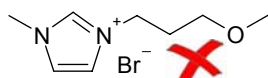
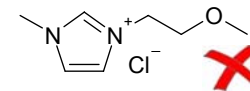
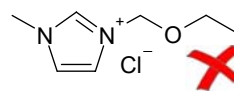
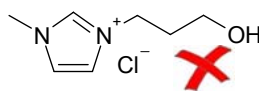
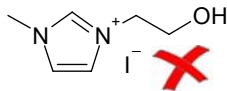
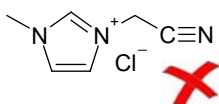
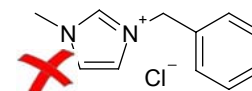
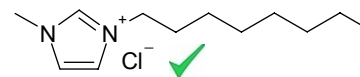
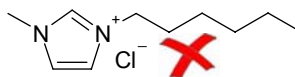
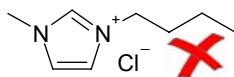
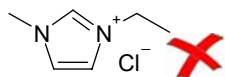
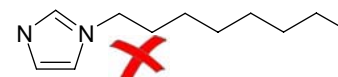
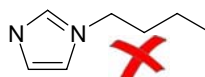
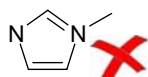
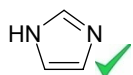
Testsubstanzen



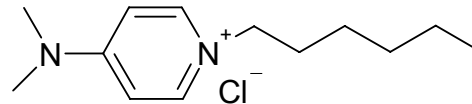
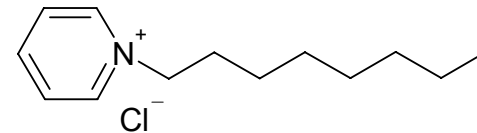
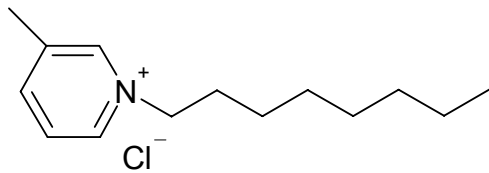
Ergebnisse

X ≈ 0% Primärabbau

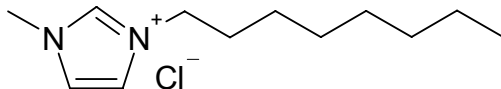
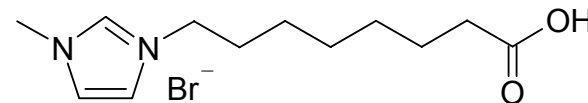
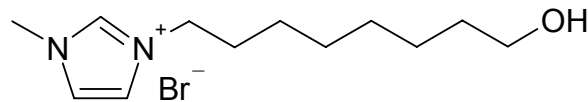
✓ 100% Primärabbau



Stolte et al. 2007 *Green Chemistry* 9 (11) 1170 - 1179



besonders hydrophobe Kationen sind biologisch abbaubar



Zielkonflikt zwischen der biologischen Abbaubarkeit und einer minimierten Toxizität!

Zielkonflikt ist nicht zwingend...

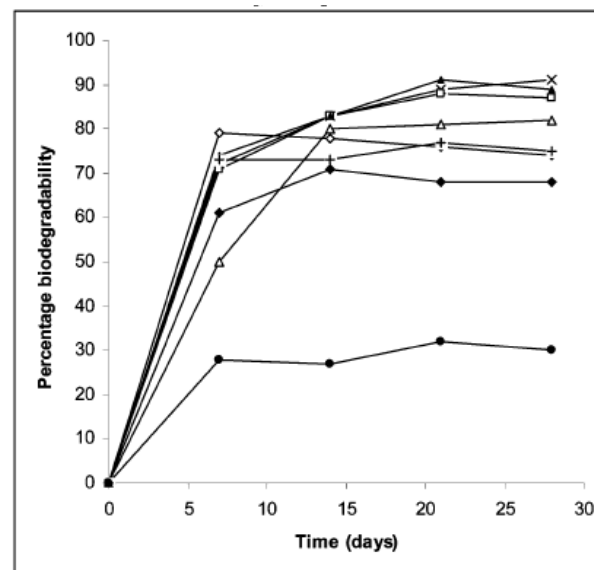
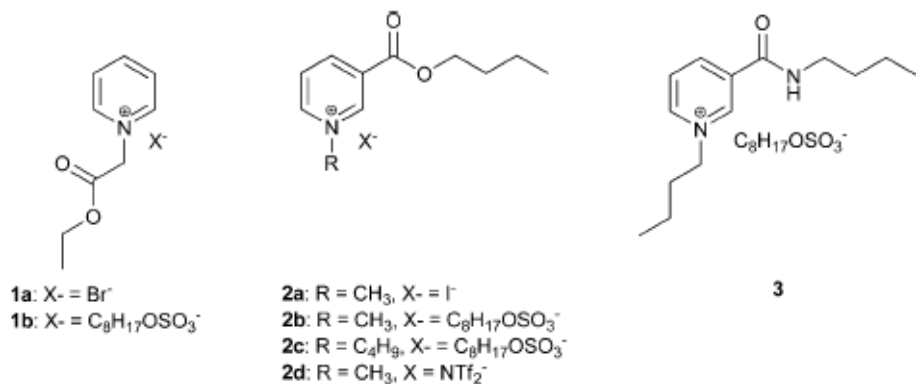
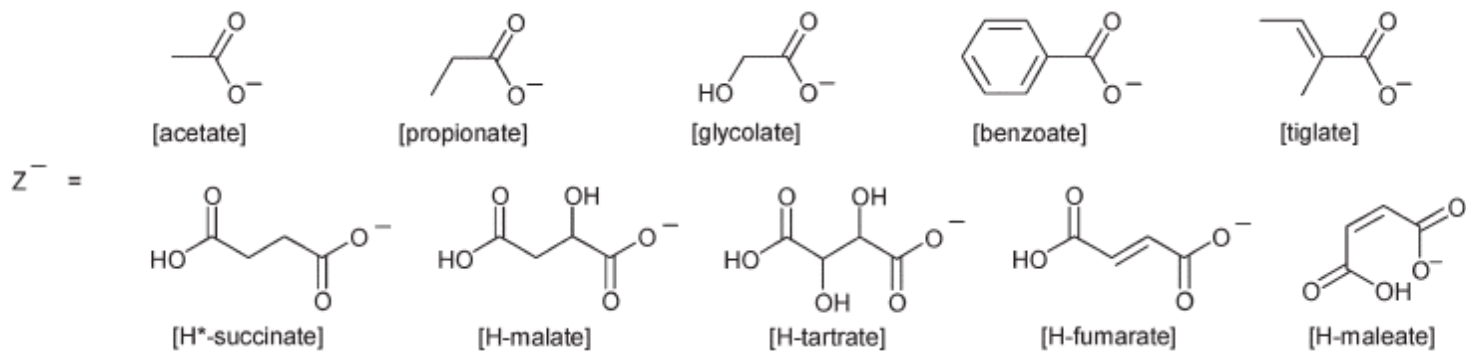
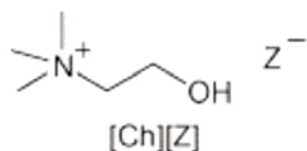


Fig. 1 Biodegradation of 1a (□), 1b (▲), 2a (◇) 2b (+), 2c (△), 2d (◆), 3 (●) and sodium dodecyl sulfate (reference compound) (×) in the CO₂ Headspace test.

Harjani et al. *Green Chem.*, 2008, **10**, 436–438

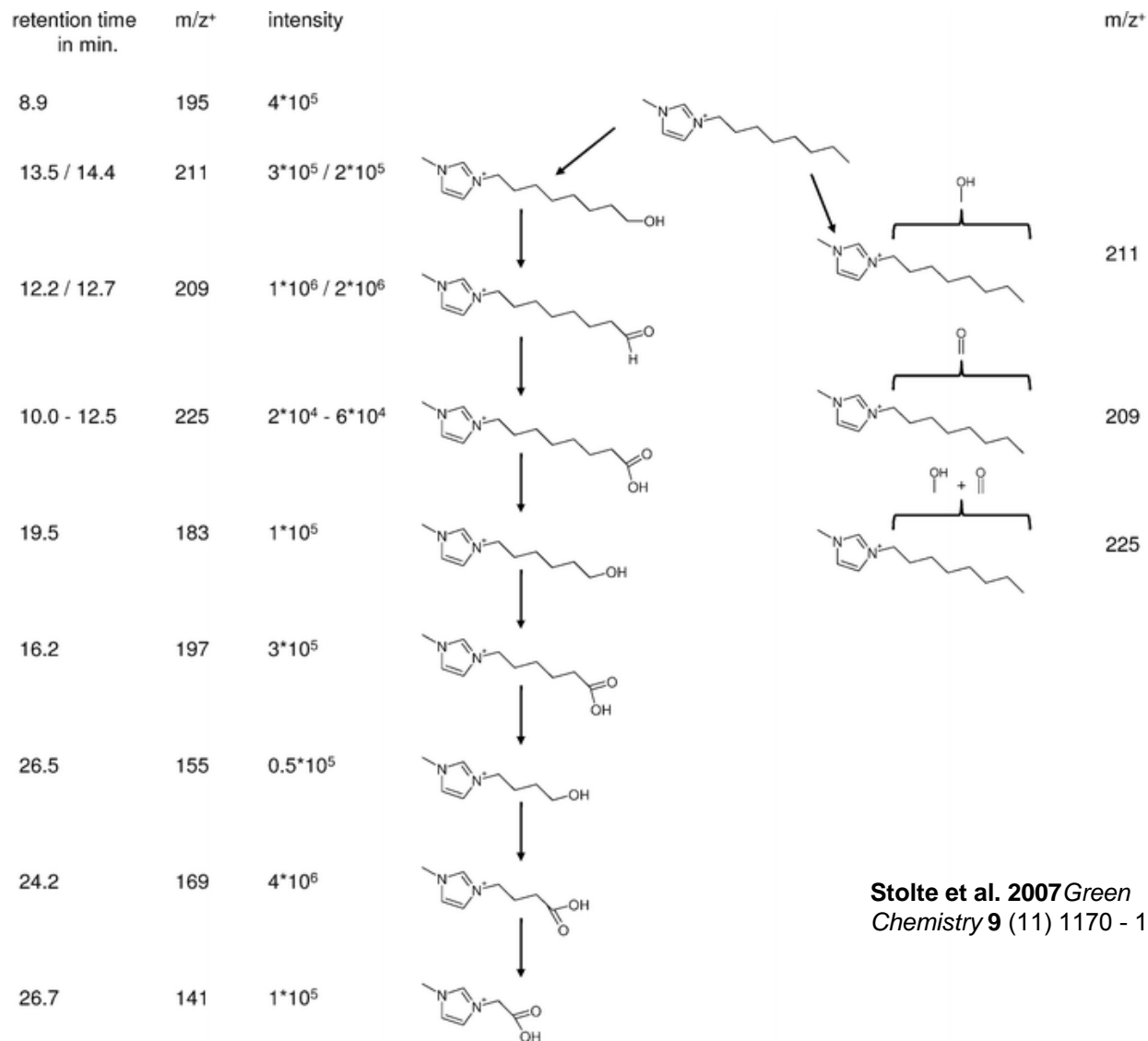
Ionische Flüssigkeiten aus Biomaterialien



Fukaya et al. Green Chem., 2007, 9, 1155–1157 | 1157

und viele Kopfgruppen sind noch nicht untersucht

Identifizierte Transformationsprodukte



Stolte et al. 2007 *Green Chemistry* 9 (11) 1170 - 1179

- identifizierte Produkte tendenziell mit einem geringeren Gefahrenpotenzial
- allerdings ist die Bildung von reaktiven Spezies denkbar

Zusammenfassung

- **Beitrag zur Gefahrenpotenzialanalyse**

Zusammenfassung

- Beitrag zur Gefahrenpotenzialanalyse
- **Identifizierung von Strukturelementen, die die Toxizität und biologische Abbaubarkeit beeinflussen**

Zusammenfassung

- Beitrag zur Gefahrenpotenzialanalyse
- Identifizierung von Strukturelementen, die die Toxizität und biologische Abbaubarkeit beeinflussen
- **Möglichkeit der Prognose von Toxizitäten**

Zusammenfassung

- Beitrag zur Gefahrenpotenzialanalyse
- Identifizierung von Strukturelementen, die die Toxizität und biologische Abbaubarkeit beeinflussen
- Möglichkeit der Prognose von Toxizitäten
- **Hinweise zum Wirkmechanismus / Wirkort**

Ausblick

Ausblick

Erweiterung der Testbatterie um

- **wirkmechanismenbasierte Testsysteme**
- **weitere Screening-Tests zur Erfassung von toxikologisch besonders relevanten Endpunkten**

Ausblick

Erweiterung der Testbatterie um

- wirkmechanismenbasierte Testsysteme
- weitere Screening-Tests zur Erfassung von toxikologisch besonders relevanten Endpunkten

Optimierung bestehender Testsysteme, um zukünftig das Screening großer Substanzdatenbanken zu ermöglichen

Ausblick

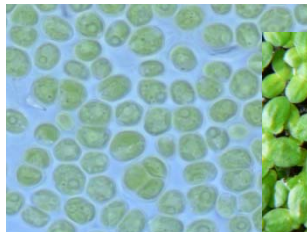
Erweiterung der Testbatterie um

- wirkmechanismenbasierte Testsysteme
- weitere Screening-Tests zur Erfassung von toxikologisch besonders relevanten Endpunkten

Optimierung bestehender Testsysteme, um zukünftig das Screening großer Substanzdatenbanken zu ermöglichen

Testung von ausgewählten Ionischen Flüssigkeiten in der erweiterten und optimierten Testbatterie

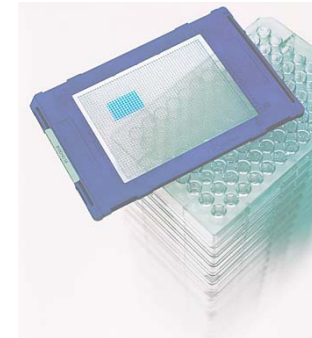
Optimierung bestehender Testsysteme



Limnische Grünalge
(*Scenedesmus vacuolatus*)

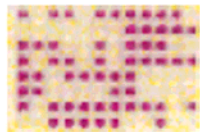


Wasserlinse
(*Lemna minor*)

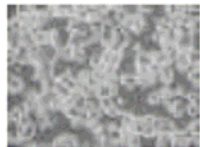


24 und 6-well plates / Screening assays

Neue Testsysteme und Endpunkte



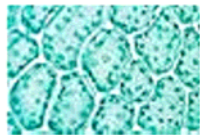
**„Ames-Test“ zur Bestimmung der
Gentoxizität**



**„E-Screen“ zur Bestimmung der
endokrine Wirksamkeit (MCF-7 Zellen)**

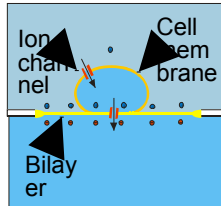


**Sediment Toxizitätsassay mit dem
Bodenbakterium *Arthrobacter globiformis***

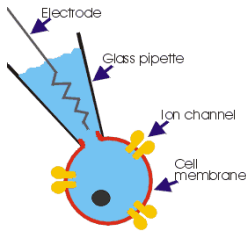


**Zytotoxizitätsscreening mit pflanzlichen
Zelllinien**

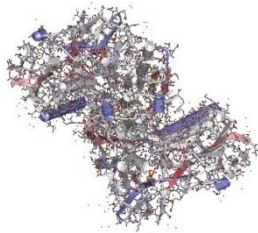
Untersuchungen zum Wirkmechanismus



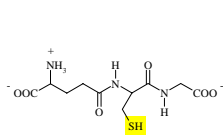
**Interaktionen mit Membranen /
Diffusion**



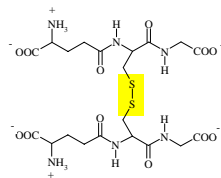
**Wechselwirkungen mit Ionenkanälen
und Membranproteinen**



**Wechselwirkungen mit Enzymen der
Signaltransduktion**



GSH



GSSG



Oxidativen Stress

Entwicklung von Ionischen Flüssigkeiten höherer Eigensicherheit unter Verwendung einer flexiblen (öko-)toxikologischen Testbatterie



- Verbesserung der Datenlage für Ionische Flüssigkeiten
- Verbesserung der Testbatterie:
REACH „intelligente Teststrategien“
- prospektive Entwicklung neuer Industriechemikalien

Arbeitskreis Ionische Flüssigkeiten



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!