

## Abschlussbericht

für die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU)

### Schwerlösliche organische Verbindungen in Kosmetika - ökotoxikologische Bewertung und Substitution (ECOSM)

Projektleitung:	Prof. A. Schäffer, Prof. H. Hollert RWTH Aachen Institut für Umweltforschung (Biologie 5) Worringerweg 1 52074 Aachen
Projektbearbeitung:	M.Sc. Stefanie Damme (04/2010 – 04/2012) Dipl. Biol. Felix Stibany (09/2012 – 08/2015) Institut für Umweltforschung (Biologie 5)
Projektpartner:	- IKW (Industrieverband Körperpflege- und Waschmittel e.V.) - Umweltbundesamt - ECT Ökotoxikologie GmbH
Aktenzeichen:	AZ 28047/31
Berichtszeitraum:	01.04.2010 - 31.08.2015

Aachen, 30. November 2015

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Testsubstanzen</b>	<b>8</b>
2.2.1 Bromchlorophen	8
2.2.2 Dodecylbenzol	9
<b>2.3 Passive Dosing</b>	<b>11</b>
2.3.1 Konventionelles Passive Dosing	11
2.3.2 Passive Dosing Limit Test	12
<b>3. Dodecylbenzol</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Analytik und Löslichkeitsbestimmung von Dodecylbenzol (Arbeitspaket 2)</b>	<b>13</b>
3.1.1 Analytik von Dodecylbenzol	13
3.1.2 Löslichkeitsbestimmung von Dodecylbenzol	16
<b>3.2 Methodenetablierung und Ökotoxizität von Dodecylbenzol (Arbeitspaket 3/4)</b>	<b>20</b>
3.2.1 Etablierung des konventionellen Passive Dosing für Dodecylbenzol (AP3)	20
3.2.2 Ökotoxizität von Dodecylbenzol im konventionellem Passive Dosing (AP4)	22
Microtox® Assay	22
Akuter Daphnien-Immobilitätstest	24
Algenwachstumshemmtest	24
Chronischer Daphnien-Reproduktionstest	25
3.2.3 Etablierung des Passive Dosing Limit Test für Dodecylbenzol (AP3)	26
3.2.4 Ökotoxizität von Dodecylbenzol im Passive Dosing Limit Test (AP4)	27
Algenwachstumshemmtest Limit Test	27
Akuter Daphnien-Immobilitäts Limit Test	32
Fisch-Embryo Toxizitätstest Limit Test	35
<b>4. Bromchlorophen</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Analytik und Löslichkeitsbestimmung von Bromchlorophen (Arbeitspaket 2)</b>	<b>36</b>
4.1.1 Analytik von Bromchlorophen	36
4.1.2 Löslichkeitsbestimmung von Bromchlorophen	37
<b>4.2 Methodenetablierung und Ökotoxizität von Bromchlorophen (Arbeitspaket 3/4)</b>	<b>40</b>
4.2.1 Etablierung des konventionellen Passive Dosing für Bromchlorophen (AP3)	40
4.2.2 Ökotoxizität von Bromchlorophen (AP4)	40
Akuter Daphnien-Immobilitätstest	41
Algenwachstumshemmtest	42
Fisch-Embryo Toxizitätstest (FET)	43
Akuter Daphnien-Immobilitätstest im DMSO Co-Solvent Setup	44
Vergleich von frei gelöster ( $C_{\text{free}}$ ) und totaler ( $C_{\text{total}}$ ) Bromchlorophen Konzentration	45
<b>5. Literaturrecherche und Review-Artikel (Arbeitspaket 1)</b>	<b>47</b>

<b>6. Diskussion und Schlussfolgerung.....</b>	<b>47</b>
6.1 Dodecylbenzol.....	47
6.2 Bromchlorophen .....	50
6.3 Abschlussdiskussion .....	51
<b>7. Präsentation des Projekts .....</b>	<b>52</b>
<b>8. Literatur.....</b>	<b>53</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>54</b>
9.1 Bestimmung der Löslichkeit von Dodecylbenzol in Methanol .....	54
9.2 Etablierung des Passive Dosing mittels PDMS-Schichten (Dodecylbenzol).....	54
9.3 Ökotoxizität von Dodecylbenzol über Passive Dosing mit PDMS-Schichten.....	61
Akuter Daphnien-Immobilitätstest .....	61

Abbildung 1: Gesamtproduktion von Körperpflegeprodukten in Deutschland im Jahr 2002 ....	6
Abbildung 2: log $K_{OW}$ verschiedene Substanzen/-gruppen .....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Passiv Dosing .....	11
Abbildung 4: Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von Dodecylbenzol mittels GC-FID .....	14
Abbildung 5: Kalibration zur Quantifizierung von Dodecylbenzol mittels GC-MS .....	15
Abbildung 6: Exp. Bestimmung der Löslichkeit von Dodecylbenzol im Langzeittest.....	17
Abbildung 7: Exp. Bestimmung der Löslichkeit von Dodecylbenzol über Passive Dosing .....	19
Abbildung 8: Überprüfung des Passive Dosing in $H_2O$ dest.....	21
Abbildung 9: Ergebnisse der Microtox <sup>®</sup> -Assays .....	23
Abbildung 10: Ergebnisse des akuten Daphnien-Immobilitätstests .....	24
Abbildung 11: Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests .....	25
Abbildung 12: Ergebnisse des chronischen Daphnien-Reproduktionstests .....	26
Abbildung 13: Etablierung des Algenwachstumshemmtests Passive Dosing Limit Test .....	29
Abbildung 14: Algenwachstumshemmtest über Passive Dosing Limit Test .....	31
Abbildung 15: Etablierung des akuten Daphnientests über Passive Dosing Limit Test .....	32
Abbildung 16: Erste akute Daphnien-Immobilitätstests Passive Dosing Limit Test .....	33
Abbildung 17: Vergleich akute Daphnien-Immobilitätstests nach Reinigung .....	34
Abbildung 18: Akute Daphnien-Immobilitätstests Passive Dosing Limit Test (Käfig) .....	35
Abbildung 19: Kalibration zur Quantifizierung von Bromchlorophen mittels GC-ECD .....	37
Abbildung 20: Aufbau der Säulen-Eluatiionsmethode.....	38
Abbildung 21: Löslichkeitsmessung von Bromchlorophen .....	39
Abbildung 22: Löslichkeitswerte von Bromchlorophen in verschiedenen Medien .....	40
Abbildung 23: Quantifizierung der Beladungskonzentration von BCP in Elendt-M4 .....	41
Abbildung 24: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier akuten Daphnientests .....	42
Abbildung 25: Quantifizierung der Beladungskonzentration von BCP in DIN-Algenmedium .....	43
Abbildung 26: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier Algenwachstumshemmtests .....	43
Abbildung 27: Quantifizierung der Beladungskonzentration von BCP in DIN-Wasser .....	44
Abbildung 28: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier Fisch-Embryo Toxizitätstests .....	44
Abbildung 29: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier akuten Daphnientests .....	45
Abbildung 30: Vergleich von $C_{free}$ und $C_{total}$ von BCP in den Ökotoxizitätstests .....	46
Abbildung A1: Schematischer Ablauf der Passive Dosing Methodik .....	55
Abbildung A2: Messung der Dodecylbenzolkonzentration in $H_2O$ dest. ....	58
Abbildung A3: Messung der Dodecylbenzolkonzentration in $H_2O$ dest. ....	59
Abbildung A4: Messung der Dodecylbenzolkonzentration in $H_2O$ dest. ....	60
Abbildung A5: Akute Daphnientests (3x) über Passive Dosing mittels PDMS-Schichten .....	63

## 1. Zusammenfassung

Der vorliegende Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben „Schwer lösliche organische Verbindungen in Kosmetika - ökotoxikologische Bewertung und Substitution / ECOTOXICITY investigations of COSMETIC ingredients (ECOSM)“ dokumentiert die einzelnen Projektschritte und Ergebnisse von Beginn des Projekts im April 2010 bis zum Abschluss im August 2015.

Ziel des ECOSM Projekts war es den von Tolls et al. (2009b) veröffentlichten Poorly Solubles Approach zu bewerten und hinsichtlich seiner Relevanz zu überprüfen. Hierfür sollten nach OECD und DIN standardisierte akute und chronische ökotoxikologische Testmethoden für die Testung schwer wasserlöslicher organischer Substanzen (Schwerpunkt Kosmetika) nach Modifikation und Optimierung so eingesetzt werden, dass die Eignung des Poorly Solubles Approach als Instrument für die Risikobewertung wichtiger, bisher nicht nach Standardkriterien bewertbarer, umweltrelevanter Stoffgruppen beurteilt werden kann.

Die erste Testsubstanz Bromchlorophen (BCP) erwies sich im Laufe der Arbeiten als wesentlich höher wasserlöslich als ursprünglich angenommen. Obwohl BCP mit seiner Löslichkeit deutlich oberhalb des Relevanzbereichs des Poorly Solubles Approach lag, wurde es als Modellsubstanz zur prinzipiellen Etablierung und Testung der Methodik weiter bearbeitet. Im weiteren Verlauf des Projekts wurde der Fokus aber auf die Zielmodellsubstanz Dodecylbenzol gelegt.

Das Arbeitspaket 1 (Literaturrecherche) wurde abgeschlossen, der ursprünglich vorgesehene Review Artikel zur Zusammenfassung der bisher publizierten Ergebnisse zur Problematik schwerlöslicher Substanzen zugunsten von experimentellen Publikationen ausgesetzt. Arbeitspaket 2 (Analytik und Löslichkeitsbestimmung) nahm zeitlich den Hauptteil des Projekts in Anspruch und konnte für beide Testsubstanzen mit der Entwicklung spezialisierter analytischer Methoden (GC-FID, GC-MS, GC-ECD, LC-MS) und der nachfolgenden, mit unterschiedlichen Methoden validierten, exakten Löslichkeitsbestimmung in unterschiedlichen wässrigen Medien abgeschlossen werden. Für die Testsubstanz Dodecylbenzol wurden zwei Methoden zur Löslichkeitsbestimmung eingesetzt: in einem Langzeittest (direkte Zugabe der Testsubstanz als separate Phase auf die Testmedien Wasser, Elendt M4 Daphnienmedium und DIN Algenmedium; Äquilibrierungszeit bis 35 Tage) ergab Werte zwischen  $5,6 \pm 2,3$  und  $24,1 \pm 15,4$   $\mu\text{g/L}$  (der höchste Wert im DIN Algenmedium). Mittels Passive Dosing Limit Test ergaben sich übereinstimmend Werte zwischen  $7,8 \pm 3,9$  und  $15,1 \pm 3,4$   $\mu\text{g/L}$  (Schwankungsbreiten in der Regel  $\pm 50\%$ ).

Ebenfalls wurde das Ziel einer Adaptation von standardisierten akuten und chronischen ökotoxikologischen Testmethoden (Arbeitspaket 3) an die Methodik des Passive Dosing erfolgreich abgeschlossen. Schwer lösliche Substanzen werden dabei über ein Reservoir (z.B. Silikon, PDMS) im Expositionsgefäß dosiert. Die ständige Diffusion der Testsubstanz aus dem Reservoir in die wässrige Phase bis zur Gleichgewichtseinstellung ermöglicht eine konstante Exposition und einen Ausgleich auftretender Substanzverluste. Die Modifikation bestehender Testsystem erfolgte sowohl auf Basis bereits veröffentlichter Passive Dosing Methoden, als auch auf Basis von neuen optimierten Varianten (Passive Dosing Limit Test).

Umfassende sowohl akute als auch chronische ökotoxikologische Untersuchungen beider

Testsubstanzen wurden durchgeführt und ausgewertet (Arbeitspaket 4). In konventionellen Passive Dosing Tests wurden keine Effekte des Dodecylbenzol auf Mikroorganismen, Algen und Daphnien festgestellt, während im Passive Dosing Limit Test bei maximaler Löslichkeit der Testsubstanz (s.o.) signifikante Effekte auf das Algenwachstum und Daphnien-Mobilität festgestellt wurden.

Die Methodik des Passive Dosing erwies sich als eine wesentlich stabilere Methode zur Testung schwerlöslicher Substanzen im Vergleich mit Co-Solvent- oder Standardtests. Insbesondere an den Passive Dosing Limit Test angepasste Standardtests in geschlossenen Systemen sind eine vielversprechendes Instrument für die Bestimmung der Löslichkeit und Bewertung der Ökotoxizität schwer wasserlöslicher Stoffe. Die Entwicklung und Anwendung geeigneter experimenteller Methoden für die Bewertung solcher Substanzen konnte somit erfolgreich abgeschlossen werden.

Die experimentellen Ergebnisse können zur Erarbeitung eines brauchbaren und ökonomischen Verfahrens zur Risikobewertung von hoch lipophilen Substanzen beitragen, jedoch sollten noch weitere Modellsubstanzen in diesen optimierten Testverfahren untersucht werden. Auch bietet der hier entwickelte Ansatz die Möglichkeit, Chemikalien hinsichtlich ihrer potenziellen PBT-Eigenschaften zu untersuchen und zu bewerten. Eine abschließende Bewertung des „Poorly Solubles Approach“, nach dem für narkotisch wirkende Chemikalien mit einer Wasserlöslichkeit unterhalb des  $ETNC_{\text{aqua}}$  von  $1,9 \mu\text{g/L}$  prinzipiell keine ökotoxikologischen Effekte für exponierte Wasserorganismen zu erwarten sind, kann mit den erarbeiteten Ergebnissen nicht erfolgen. Hierzu müsste die Datengrundlage mit mehr Testsubstanzen erweitert werden.

Insgesamt sind drei Veröffentlichungen der Ergebnisse in Arbeit.

## 2. Einleitung

### 2.1 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens

„Personal Care Products“ bzw. kosmetische Mittel umfassen eine große Anzahl von verschiedenen Produktsegmenten zugehörigen Zubereitungen (Abbildung 1), die eine Vielzahl von Stoffen mit sehr unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften enthalten. Dabei spielen in vielen Konsumentenprodukten, insbesondere in Kosmetika, in Wasser schwerlösliche organische Verbindungen (Löslichkeit < 1 mg/L) z.B. als Emulgatoren, Stabilisatoren oder Konservierungsmittel eine bedeutende Rolle. Auf Grund ihrer hohen Einsatzmenge werden nach der gültigen EU-Gesetzgebung (REACH, 2006/1907/EG) Untersuchungen zu Umweltverhalten und Wirkung auf Wasserorganismen erforderlich. Die zur Registrierung unter REACH vorzulegenden Daten aus Standardtests zur Ermittlung der aquatischen Ökotoxizität sind bei schwerlöslichen Substanzen jedoch kaum verfügbar. Schwerlösliche Substanzen adsorbieren stark an Oberflächen von Testgefäßen und Testorganismen; dies erschwert eine konstante Exposition über den Versuchszeitraum (Rufli et al. 1998, Smith et al. 2012). Darüber hinaus ist für viele derartige Verbindungen die analytische Quantifizierbarkeit im Bereich ihrer Löslichkeit technisch sehr herausfordernd. Gleichzeitig liefert die Eigenschaftskombination aus hoher Stabilität, Lipophilie und Adsorptionsverhalten Hinweise auf Persistenz und ein erhöhtes Bioakkumulationspotenzial und qualifiziert diese Stoffe als PBT/vPvB-Verdachtsstoffe (persistent, bioakkumulativ, toxisch bzw. sehr persistent, sehr bioakkumulativ) im Sinne der Kriterien des Anhang XIII der REACH-Verordnung.

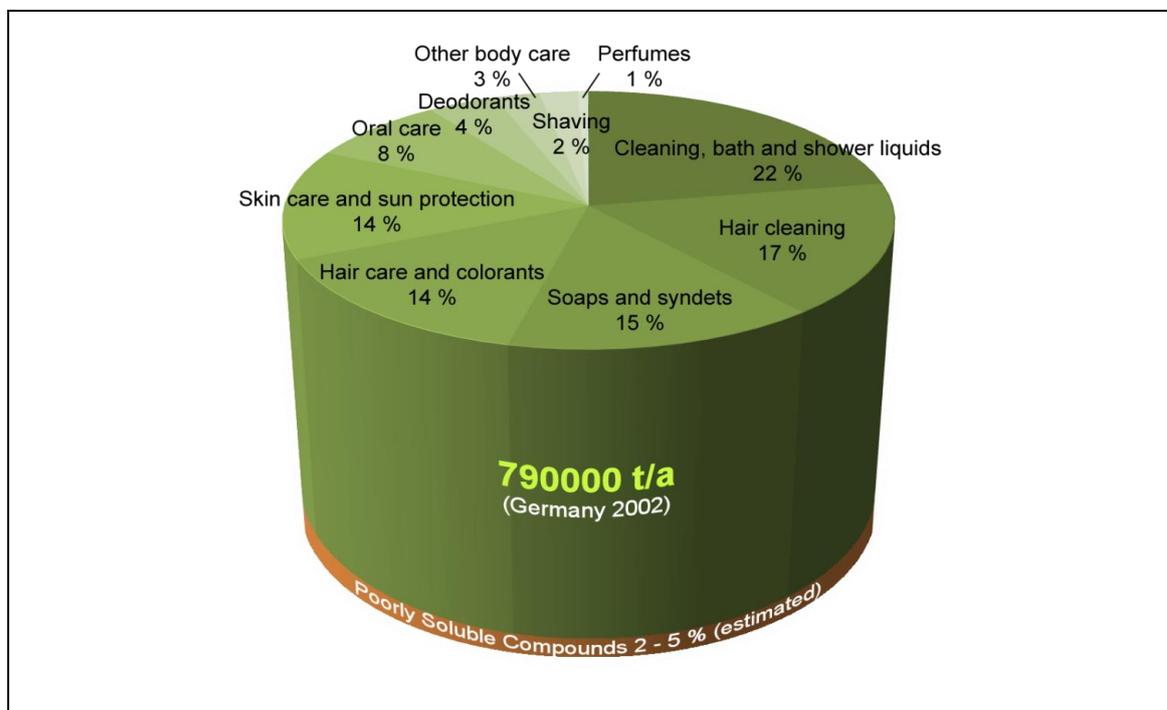


Abbildung 1: Gesamtproduktion von Körperpflegeprodukten in Deutschland im Jahr 2002 und Aufteilung in verschiedene Produktsegmente. Abschätzung des Anteils schwerwasserlöslicher Verbindungen aus Körperpflegeprodukten. Grafik erstellt anhand (Tolls et al. 2009a).

Der „Poorly Solubles Approach“ (Tolls et al. 2009b), der in dieser Untersuchung auf seine Eignung als Bewertungsinstrument für die Umweltverträglichkeit schwerlöslicher Verbindungen überprüft werden sollte, basiert auf einer Analyse von mehr als 5000 validierten akuten und chronischen Ökotoxizitätsdaten von Stoffen aus verschiedenen Datenbanken (ECETOC, U.S. EPA fathead minnow database, Utrecht University guppy database). Anhand dieser Datenanalyse konnte für inerte Substanzen mit einem narkotischen Wirkmechanismus eine Konzentration (ETNC<sub>aqua</sub>, Aquatic Exposure Threshold of No ecotoxicological Concern) von 1,9 µg/L vorgeschlagen werden, unterhalb der mit hoher Wahrscheinlichkeit (95 %) keine akuten oder chronischen Effekte auf aquatische Organismen zu erwarten sind (De Wolf et al. 2005). Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurden im Projekt ECOSM akute und chronische Toxizitätstest durchgeführt. Da Standardtests auf Grund der starken Hydrophobie der Substanzen und der selbst bei maximaler Wasserlöslichkeit extrem geringen Stoffkonzentrationen praktisch nicht anwendbar sind, sollte die Methodik des Passive Dosing zum Einsatz kommen (Mayer et al. 1999). Schwerlösliche Substanzen werden dabei über ein Reservoir (z.B. Silikon O-Ringe, PDMS-Schicht) bis zu ihrer maximalen Löslichkeit in das jeweilige Testmedium eingebracht. Die ständige Nachlieferung der Substanz aus dem Reservoir in die wässrige Phase bis zur Gleichgewichtseinstellung ermöglicht eine konstante Exposition der Testorganismen.

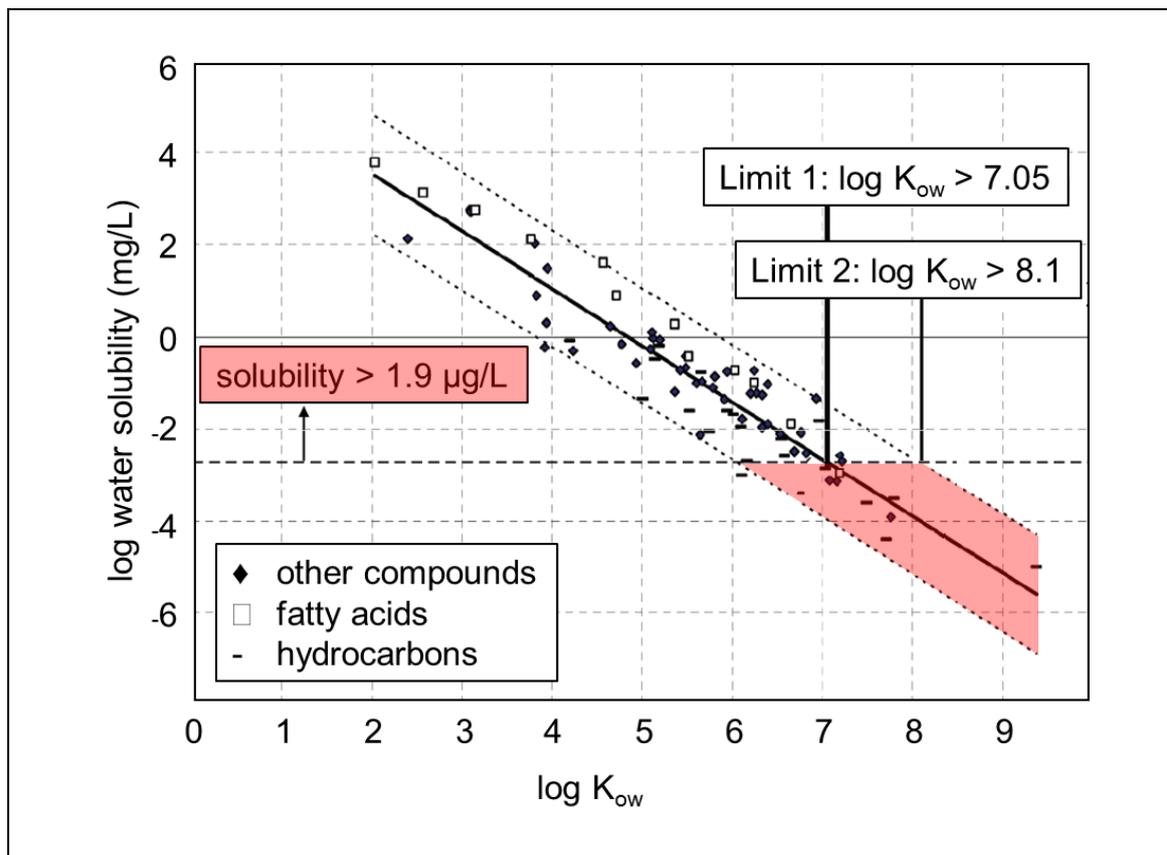


Abbildung 2: log K<sub>ow</sub> verschiedene Substanzen/-gruppen aufgetragen gegen Wasserlöslichkeit [mg/L]. Gestrichelte Linie zeigt Grenzbereich des ETNC<sub>aqua</sub>. Substanzen unterhalb dieser Linie fallen in den Bereich des Poorly Solubles Approach (log K<sub>ow</sub> > 7.05). Grafik erstellt anhand (Tolls et al. 2009b).

Im Projekt sollten nach OECD und DIN standardisierte ökotoxikologische Testmethoden für das „Passive Dosing“ modifiziert und so akute und chronische Ökotoxizitätstests mit schwerlöslichen Substanzen durchgeführt werden. Die gewonnenen Daten sollten dazu dienen, den Bewertungsansatz des „Poorly Soluble Approach“ hinsichtlich seiner Aussagefähigkeit zu überprüfen. Ziel des Projekts war es letztlich, ein Instrument für die Risikobewertung wichtiger, bisher nicht nach Standardkriterien bewertbarer, umweltrelevanter Stoffgruppen bereit zu stellen. Dies impliziert:

- Die Entwicklung und Anwendung geeigneter experimenteller Methoden für die Bewertung einer Screening-Methode, um die ökotoxikologische Relevanz ausgewählter schwer löslicher Stoffe zu beurteilen.
- Die Erarbeitung eines brauchbaren und ökonomischen Verfahrens zur Risikobewertung von hoch lipophilen Substanzen.
- Die mögliche Nutzung des Ansatzes für die Bewertung der Ökotoxizität von Chemikalien mit potenziellen PBT-Eigenschaften.

## **2.2 Testsubstanzen**

Eine für die Aussagefähigkeit der vorgesehenen Untersuchungen unabdingbare Voraussetzung war die Verfügbarkeit der Testverbindungen in chemisch einheitlicher Form, d.h. aus Homologen- und Isomergemischen bestehende Testverbindungen kamen nicht in Frage. Solche üblicherweise in kosmetischen Standardprodukten eingesetzten (meist aus oleochemischen Ausgangsprodukten stammende) Rohstoffe würden die Bestimmung exakter physikochemischer Daten, wie der Löslichkeit oder der aquatischen Toxizität nicht zulassen, da diese Parameter in hohem Maße von der spezifischen chemischen Struktur beeinflusst werden können. Vor diesem Hintergrund gestaltete sich die Suche nach geeigneten, für Kosmetikprodukte zumindest grundsätzlich relevanten Modellverbindungen als nicht ganz einfach. Letztendlich fiel die Auswahl auf zwei für die geplanten modellhaften Untersuchungen verfügbare Substanzen, die hinsichtlich ihres Toxizitätsmechanismus (toxicity mode of action) überprüft worden waren.

### **2.2.1 Bromchlorophen**

Bromchlorophen (BCP) ist eine antimikrobiell wirksame Verbindung mit substituierter Phenol-Struktur. Es war als Konservierungsstoff Bestandteil in einer Reihe verschiedener Haut- und Wunddesinfektionsmittel sowie von Zahnpasten (Courant et al. 1995). Aufgrund des über Struktur-/Aktivitätsbeziehungen (QSAR) errechneten log Kow (6,1) sollte BCP eine Löslichkeit in der Größenordnung von 10 – 100 µg/l aufweisen und somit einen geeigneten Einstieg in die Adaptation konventioneller Testverfahren an sehr schwerlösliche Testsubstanzen darstellen. Basierend auf der chemischen Struktur ergaben entsprechende Rechenmodelle keinen Hinweis auf eine nicht-narkotischen Wirkmechanismus von BCP. Mit einer im Rahmen des Projekts experimentell ermittelten maximalen Wasserlöslichkeit von 8,4 mg/L stellte sich

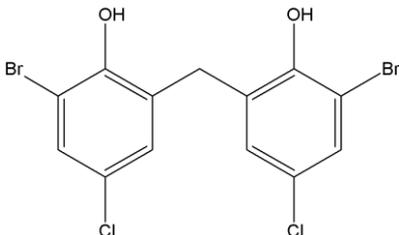
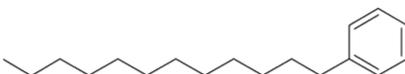
Bromchlorophen jedoch als weit löslicher heraus als erwartet. Die Substanz gilt damit nicht als schwerlöslich im Sinne des „Poorly Solubles Approach“ da der Konzentrationsgrenzwert von 1,9 µg/L (ETNC<sub>aqua</sub>) überschritten wird.

Dennoch wurde die Substanz Bromchlorophen als Modellsubstanz zur Methodenentwicklung im Rahmen eines Nebenprojekts weiter bearbeitet und mit den erhaltenen experimentellen Daten erstmals eine ökotoxikologische Charakterisierung dieser Substanz ermöglicht. Der Fokus des Projekts ECOSM wurde aufgrund der prognostizierten passenderen Eigenschaften hinsichtlich des „Poorly Solubles Approach“ auf die Testsubstanz Dodecylbenzol (DDB) gelegt.

### 2.2.2 Dodecylbenzol

Als Vertreter schwerlöslicher organischer Kosmetikinhaltsstoffe wurde im Projekt ECOSM Dodecylbenzol (DDB) untersucht. DDB ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Herstellung des in großen Mengen produzierten Tensids Natriumdodecylbenzolsulfonat (Ullmann et al. 1995). Obwohl es als solches nicht im Bereich der Körperpflegeprodukte eingesetzt wird, eignet es sich aufgrund seiner Eigenschaften als Modellsubstanz für schwer wasserlösliche Substanzen. Für DDB war mit einem experimentell bestimmten log K<sub>ow</sub> von 8,65 (Sherblom et al. 1992) eine sehr geringe Wasserlöslichkeit im µg/L Bereich zu erwarten. Die Prognosen zur Wasserlöslichkeit bestätigten dies (Tabelle 1). Die Substanz ist flüssig unter Standardbedingungen. Weitere Eigenschaften sind in Tabelle 1 aufgeführt. Ein weiterer Vorteil von DDB war die Verfügbarkeit als Reinsubstanz: DDB ist mit einer Reinheit von > 99,5% erhältlich. Strukturbasierte Rechenmodelle erlauben DDB als inert, d.h. narkotisch wirksam einzustufen.

Tabelle 1: Eigenschaften der Testsubstanzen des Projekts ECOSM Bromchlorophen und Dodecylbenzol und prognostizierte Wasserlöslichkeiten.

<u>Bromchlorophen</u> ( 2,2-methylenbis(6-brom-4-chlorphenol ) )	<u>Dodecylbenzol</u> (1-Phenyldodecan )
$C_{13}H_8Br_2Cl_2O_2$  CAS: 15435-29-7 Molekulargewicht: 426,9154 g/mol Dichte: 1,923 g/cm <sup>2</sup> Schmelzpunkt: 189,0 °C Siedepunkt: 452,3 °C (1,013 bar) Flammpunkt: 227,4 °C Dampfdruck: 1,13*10 <sup>-10</sup> bar (25 °C)	$C_{18}H_{30}$  CAS: 123-01-3 Molekulargewicht: 246,44 g/mol Dichte: 0,86 g/cm <sup>2</sup> Schmelzpunkt: -7,0 °C Siedepunkt: 331,0 °C (at 1,013 bar) Flammpunkt: 110,0 °C Dampfdruck: 0,0001 bar (50 °C)
<u>EpiSuite® Modelle:</u> WATERNT 1567,8 µg/L WSKOW 46,6 µg/L (LogK <sub>OW</sub> 6.12 KOWWIN estimate) WSKOW 22,3 µg/L (LogK <sub>OW</sub> 6.50 experimental)	<u>EpiSuite® Modelle:</u> WATERNT 1,56 µg/L WSKOW 4,88 µg/L (LogK <sub>OW</sub> 7.94 KOWWIN estimate) WSKOW 1,01 µg/L (LogK <sub>OW</sub> 8.65 experimental)  <u>ChemProp® Modelle:</u> Abraham et al. 0,53 µg/L Meylan and Howard 1,77 µg/L UFZ Read Across 50,85 µg/L

## 2.3 Passive Dosing

### 2.3.1 Konventionelles Passive Dosing

Die Methodik des Passive Dosing basiert auf einer festen Phase (Reservoir), in Form eines Polymers, die mit einer definierten Menge der zu untersuchenden Substanz beladen ist, und welche dann mit der wässrigen Phase in Kontakt gebracht wird (Mayer et al. 1999). Die Testsubstanz diffundiert aus der festen in die flüssige Phase bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Phasen. Wenn die Substanzmenge in der festen Phase und die Desorptionsgeschwindigkeit genügend hoch sind, wird bei Konzentrationsabfall der Chemikalie, z.B. durch Abbau, Verdampfung, Sorption an Gefäßwände oder Aufnahme in Organismen, diese ständig nachgeliefert, so dass eine konstante Konzentration in der Lösung aufrechterhalten werden kann (Smith et al. 2010a). Die Technik wird vor allem zur Testung lipophiler Schadstoffe in ökotoxikologischen Untersuchungen eingesetzt. Bei stark lipophilen Substanzen kann bei gesättigter Beladung der festen Phase eine Konzentration im wässrigen Medium erreicht werden, die näherungsweise der maximalen Löslichkeit entspricht. Somit kann mittels Passive Dosing auch die maximale Löslichkeit der Substanz im jeweiligen Medium bestimmt werden.

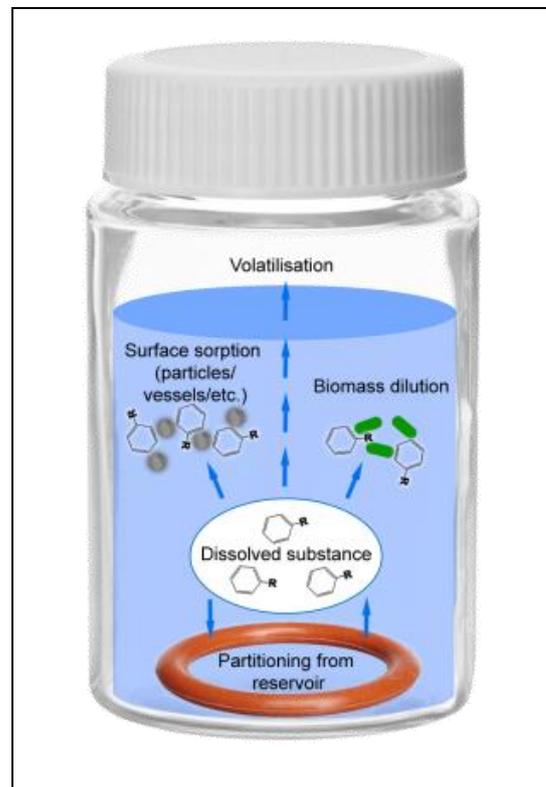


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Passiv Dosing

Geeignete feste Phasen zur Testung hydrophober Substanzen sind Silikon (z.B. in Form von Silikon O-Ringen) und Polydimethylsiloxan (PDMS) (Smith et al. 2010b, Mayer and Holmstrup 2008).

In ökotoxikologischen Untersuchungen kann es nötig sein, einen bestimmten Konzentrationsbereich zu testen. Zur Einstellung von unterschiedlichen definierten Konzentrationen mittels Passive Dosing wird die feste Phase mit verschiedenen Substanzmengen beladen. Die Beladung erfolgt mit einer Stammlösung aus Lösungsmittel (z.B. Methanol) und Testsubstanz (Smith et al. 2010a). Hierzu wird im ersten Schritt eine gesättigte Stammlösung der Testsubstanz in Methanol hergestellt (maximale Löslichkeit in Methanol). Der Überstand dieser Stammlösung wird weiter verdünnt und so eine Konzentrationsreihe erzeugt. Bei Beladung der festen Phase kommt es zur Gleichgewichtseinstellung zwischen der Substanzkonzentration in der Stammlösung ( $C_{\text{MeOH}}$ ) und in der festen Phase ( $C_{\text{Silikon}}$ ). Die Gleichgewichtskonstante ( $K_{\text{MeOH:Silikon}}$ ) der Verteilung der Substanz zwischen Stammlösung und fester Phase entspricht dem Verhältnis der Konzentrationen in Stammlösung und fester Phase. Wird die beladene feste Phase mit einer wässrigen Lösung ins Gleichgewicht gebracht,

ergeben sich bei einer Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{Silikon:Medium}}$  und unterschiedlichen Beladungen der festen Phase ( $C_{\text{Silikon}}$ ) entsprechend unterschiedliche Konzentrationen im Wasser ( $C_{\text{Medium}}$ ).

$$C_{\text{Silikon (eq)}} = K_{\text{MeOH:Silikon}} \cdot C_{\text{MeOH}}$$

$$C_{\text{Medium (eq)}} = K_{\text{Silikon:Medium}} \cdot C_{\text{Silikon}}$$

Bei maximaler Beladung der festen Phase (gesättigte Stammlösung) ergibt sich nach Gleichgewichtseinstellung ein  $C_{\text{Medium}}$ , welches näherungsweise der maximalen Löslichkeit im Medium entspricht. Während der Beladung muss die Stammlösung hier ständig gesättigt („übersättigt“) sein.

### 2.3.2 *Passive Dosing Limit Test*

Basierend auf dem konventionellen, in der Literatur beschriebenen Passive Dosing, wurde im Projekt ECOSM eine neue Variante dieser Methodik entwickelt. Ausschlaggebend hierfür war die in bisherigen Studien ausschließliche Anwendung des Passive Dosing für Feststoffe. Die Testsubstanz Dodecylbenzol liegt unter Standardbedingungen jedoch als Flüssigkeit vor. Mehr als 300 in der ECHA Datenbank (unter REACH) registrierte Substanzen mit einem  $\log K_{\text{OW}} \geq 5.5$  sind flüssig unter Standardbedingungen (Datenbank-Analyse: (ECHA 2015, OECD 2015)). Wie für andere stark hydrophobe Substanzen gibt es auch für diese Gruppe momentan keine passenden Testsysteme zur ökotoxikologischen Untersuchung.

Die Methodik des Passive Dosing Limit Tests basiert also auf einer Lösungsmittelfreien Beladung von Silikon O-Ringen mit der reinen Testsubstanz. Die Methodik nutzt das in der Literatur beschriebene Schwellungs-Potenzial von Silikonen im Kontakt mit lipophilen Flüssigkeiten und Lösungsmitteln (Lee et al. 2003, Mahomed et al. 2010). Die Beladung des Silikons mit einer flüssigen Reinsubstanz führt zu einer direkten Aufnahme der Substanz im Silikon („Anschwellen“). Der Grad des Anschwellens ist sowohl Substanz- als auch Zeitabhängig und bestimmt die Menge der aufgenommenen Substanz (Schwellung-Potenzial). Für die Testsubstanz Dodecylbenzol wurde ein Schwellung-Potenzial von 14,5 % im Silikonpolymer der genutzten Silikon O-Ringe gemessen (siehe unten Kapitel 2.2.4). Bei einer erwarteten Löslichkeit der Substanz in wässrigen Medien im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich ist aufgrund des hohen Schwellungs-Potenzials die Reservoir-Funktion des Silikons gewährleistet. Außerdem führt die Absättigung des Silikons mit Reinsubstanz zu einer Gleichgewichtskonzentration im Medium ( $C_{\text{Medium}}$ ) die exakt der maximalen Löslichkeit entspricht.

Zusätzlich bietet diese Methodik die Vorteile, dass vollständig auf die Nutzung von Lösungsmitteln verzichtet werden kann, sowohl Beladung als auch Gleichgewichtseinstellung einfach und schnell durchzuführen sind und eine Adaptation an verschiedene Ökotoxizitätstests leichter möglich ist (siehe unten).

### 3. Dodecylbenzol

#### 3.1 Analytik und Löslichkeitsbestimmung von Dodecylbenzol (Arbeitspaket 2)

##### 3.1.1 Analytik von Dodecylbenzol

Die Entwicklung zweier Analytikmethoden zum Nachweis von Dodecylbenzol wurde erfolgreich abgeschlossen. Die Messungen wurden auf Basis eines Gaschromatographen mit Flammenionisations-Detektor (GC-FID; Agilent Technologies 7820A) oder mit Massenspektrometer (GC-MS; Agilent Technologies 6890N + MSC Direct Inlet Probe SIM) durchgeführt.

Bei der GC-FID Methodik wurde als Säule eine Agilent Technologies® HP-5 mit einer Länge von 30 m verwendet, wobei das Einspritzvolumen 1 µL im Splitless Modus betrug. Das verwendete Trägergas war Helium. Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet: Start bei 60°C für eine Dauer von 2 min, dann aufheizen mit 10°C pro Minute bis 340°C auf. Die finale Temperatur von 340°C wird für 5 min gehalten. Die Gesamtdauer eines Laufs betrug dementsprechend 35 min.

Bei der GC-MS Methodik wurde eine Optima® 35 MS 0,25 mm Säule mit einer Länge von 30 m verwendet. Das Einspritzvolumen lag bei 2 µL im Splitless Modus. Das Trägergas und das Temperaturprogramm glichen dem der GC-FID Methodik. Im Falle der GC-MS Methode wurde hauptsächlich im sogenannten SIM-Mode gearbeitet (selected-ion monitoring); hierbei wird nur eine begrenzte Anzahl ausgewählter, auf das Zielmolekül passende Masse/Ladungs-Verhältnisse (m/z) detektiert, und kein vollständiges Spektrum aufgezeichnet. Der Vorteil besteht in der hohen Nachweisempfindlichkeit für ausgewählte Zielsubstanzen. Zusätzlich kann die GC-MS Methodik auch im SCAN-Mode durchgeführt werden, wobei alle Masse/Ladungs-Verhältnisse eines definierten Bereichs erfasst und ausgegeben werden. So kann eine Vielzahl der in der Probe enthaltenen Substanzen, wie evtl. entstehende Metaboliten des Dodecylbenzol betrachtet und interpretiert werden. Allerdings verschlechtert sich die Nachweisgrenze im SCAN-Mode und ähnelt der der GC-FID.

Beide Methoden wurden mit einem Autosampler (GC-FID: Agilent Technologies G4513A; GC-MS: Agilent Technologies 7683 Series) durchgeführt. Die Injektion erfolgte mit einer 10 µL Hamilton-Spritze, die jeweils vor und nach der Injektion mehrfach nacheinander mit Toluol und Ethylacetat gespült wurde. Zudem wurde zur Absättigung der Spritze vor der Injektion zweimal mit der jeweiligen Probe gespült:

2x Toluol → 2x Ethylacetat → 2x Probe → INJEKTION → 3x Toluol → 3x Ethylacetat

Zur Überprüfung der Sauberkeit des jeweiligen Geräts und zur Reinigung der Säule wurde zwischen jedem Probenlauf mindestens 1 „Leerlauf“ mit reinem *n*-Hexan durchgeführt. Bei erwarteten hohen Dodecylbenzolkonzentrationen wurden bis zu zwei separate *n*-Hexan-Läufe durchgeführt. Ebenfalls wurden jeweils vor dem ersten und nach dem letzten Lauf jeweils zwei separate *n*-Hexan Läufe durchgeführt.

Zur Kalibration der Methoden wurden Stammlösungen hergestellt. Die Testsubstanz Dodecylbenzol (TCI Europe N.V., Belgium) wurde auf einer Ultrafeinwaage (Mettler

Toledo UMX5 Comparator) exakt abgewogen und mit *n*-Hexan auf 100 ml aufgefüllt wurde. Aus dieser Stammlösung wurde dann eine Verdünnungsreihe in 1:10 Schritten pipettiert. Aus den einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann Proben in GC-Vials überführt und mit der jeweiligen Methode analysiert. Der Vorgang wurde bei einer konstanten Temperatur von 20°C durchgeführt.

Die Ergebnisse der Kalibrierungen der beiden gaschromatografischen Methoden zeigen eine deutliche Differenz in der Nachweisgrenze. Während die GC-MS im SIM-Mode noch 10 µg Dodecylbenzol / L mit geringen Schwankungen quantitativ nachweisen kann, liegt die Nachweisgrenze der GC-FID Methodik bei ca. 100 µg/L. Beide Methoden unterscheiden sich also in der Empfindlichkeit um den Faktor 10. In absoluten Zahlen bedeuten diese Werte eine untere Nachweisgrenze von ca. 20 pg Dodecylbenzol bei der GC-MS im SIM-Mode (Einspritzvolumen: 2 µL) und ca. 100 pg bei der GC-FID (Einspritzvolumen: 1 µL) bei Durchführung nach der beschriebenen Methodik.

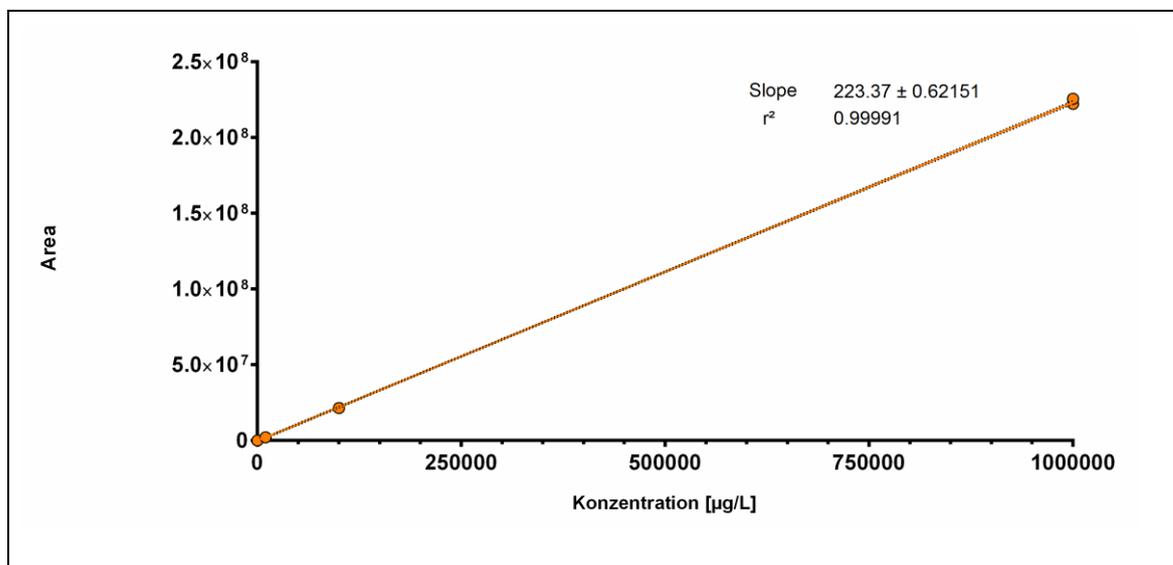


Abbildung 4: Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von Dodecylbenzol mittels GC-FID. Eingesetzte Dodecylbenzolkonzentrationen sind 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 µg/l. Die Geradensteigung beträgt 223,37 mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,99991$ .

Die Kalibrierung der GC-FID (Abbildung 4) wies einen eindeutige Linearität in einem Konzentrationsbereich von 100 – 1000000 µg/L auf mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,9999$  auf. Daraus geht eine Regressionssteigung von  $223,37 \pm 0,622$  hervor.

Die Kalibrierung der GC-MS im SIM-Mode (Abbildung 5) weist eine nicht-linearen Zusammenhang zwischen Area und Konzentration auf. Eine polynomische Regression zeigt ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 1$ .

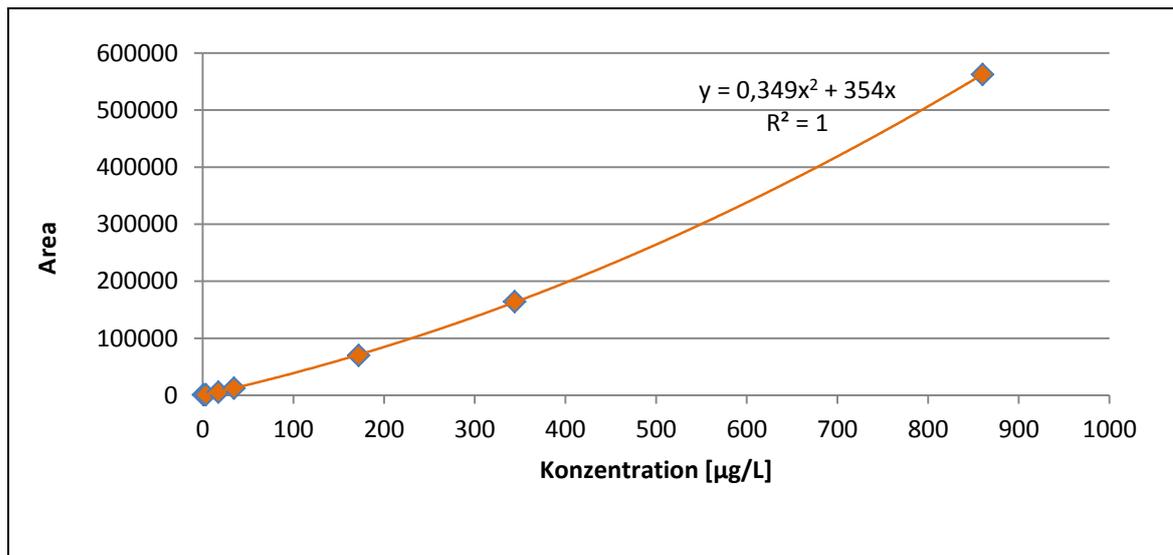


Abbildung 5: Kalibration zur Quantifizierung von Dodecylbenzol mittels GC-MS; polynomische Regression (2. Grades) aufgrund der Nichtlinearität. Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,99999$ .

Bezogen auf die erwartete Löslichkeit des Dodecylbenzol in Wasser und anderen wässrigen Testmedien von 1,9 µg/L erscheint die Nachweisgrenze selbst der GC-MS im SIM-Mode (~10 µg/L) nicht ausreichend. Durch Einengung (Aufkonzentrierung) der Proben am Rotationsverdampfer konnte die Nachweisgrenze jedoch weiter erniedrigt werden. Die im Folgenden beschriebene Methodik der Extraktion und Einengung am Rotationsverdampfer wurde während der Methodenetablierung und den danach durchgeführten ökotoxikologischen Tests in gleicher Art durchgeführt. Das zu testende wässrige Medium wurde mit gleichem Volumen *n*-Hexan (1:1) vermengt und anschließend extrahiert (je 5 min Schütteln per Hand und 20 min Schütteln bei 280 rpm auf Horizontalschüttler). Der *n*-Hexan Extrakt wurde in einen Spitzkolben überführt und mit 0,6 ml Toluol vermischt. Am Rotationsverdampfer wurde das Gemisch dann bei 40°C bis zur vollständigen Verdampfung des *n*-Hexans eingengt. Das Toluol wurde im Anschluss auf 1 ml aufgefüllt und in GC-Vials gefüllt. Diese wurden dann mittels GC-MS mit der bereits beschriebenen Methode gemessen. Nach folgender Formel erlaubt der Einengungsfaktor (Verhältnis Probevolumen vor Extraktion zu Extrakt nach Einengung (1 ml)) die Analyse von effektiven Dodecylbenzolkonzentration von ≥ 0,22 µg/L am GC-MS im SIM-Mode.

$$\frac{\text{Nachweisgrenze der GC}}{\text{Einengungsfaktor}} = \text{Effektiv nachweisbare Konzentration}$$

Dementsprechend war mit der GC-FID Methodik bei einem Einengungsfaktor von 45 eine Bestimmung von ca. 2,22 µg Dodecylbenzol/L möglich.

Aufgrund der beschriebenen höheren Empfindlichkeit der GC-MS Methodik (SIM Mode) wurde nahezu ausschließlich mit dieser gearbeitet. Die GC-FID Methodik wurde

lediglich zur Bestimmung sehr hoher Substanzkonzentrationen z.B. zur Bestimmung der Löslichkeit von DDB in Methanol eingesetzt.

### 3.1.2 Löslichkeitsbestimmung von Dodecylbenzol

Mit Dodecylbenzol wurden verschiedene Löslichkeitsuntersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde die Wasserlöslichkeit und deren Kinetik über die direkte Zugabe der Testsubstanz zu Millipore-H<sub>2</sub>O bestimmt („konventionelle Methode“).

Hierzu wurden jeweils 250 ml Millipore-H<sub>2</sub>O in einen Scheidetrichter gefüllt und 10 µl Dodecylbenzol mit einer Hamilton-Spritze hinzu pipettiert. Bei einer erwarteten Löslichkeit von (~) 2 µg Dodecylbenzol pro Liter Millipore-H<sub>2</sub>O liegt die zugegebene Menge Dodecylbenzol somit um einen Faktor 17200 über der maximal löslichen Menge. Eine Phasentrennung führt dazu, dass die Substanz auf der Oberfläche des Wassers verbleibt. Die Scheidetrichter wurden dann mit Teflon<sup>®</sup>-Deckel und Parafilm<sup>®</sup> verschlossen und zur Vermeidung photokinetischer Effekte mit Aluminiumfolie lichtundurchlässig verpackt. Nach 24, 48, 72, 96 Stunden und nach 1, 1½, 2, 2½, und 3½ Wochen wurden dann jeweils 3x 60 ml Proben aus einem Scheidetrichter entnommen und separiert in 200 ml Schottflaschen gefüllt. Extraktion und Messung erfolgten wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben.

Über die direkte Zugabe von Dodecylbenzol zum jeweiligen Medium konnte die Löslichkeitskinetik über einen Zeitraum von bis zu 35 Tagen gemessen werden (siehe Abbildung 6).

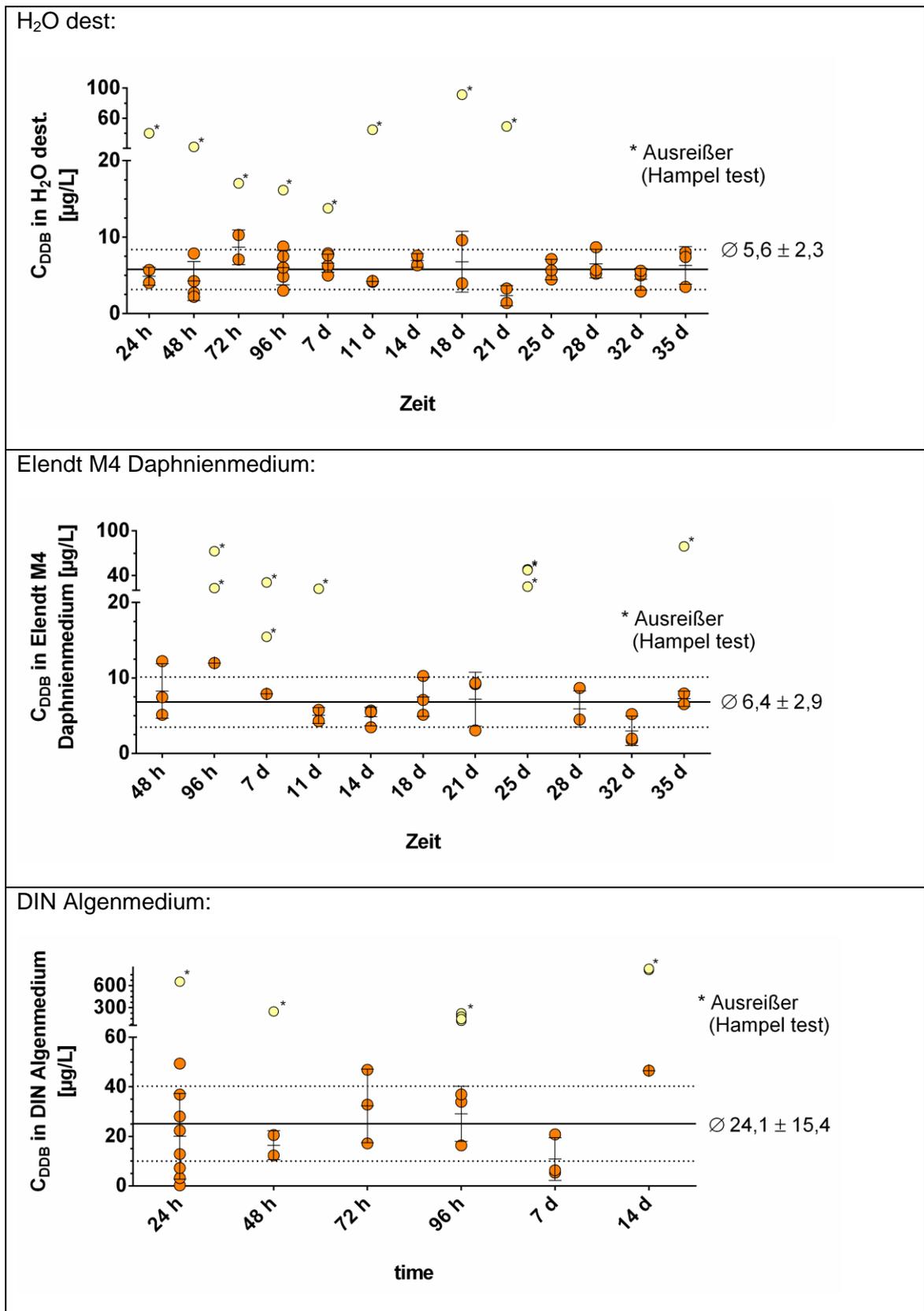


Abbildung 6: Exp. Bestimmung der Löslichkeit von Dodecylbenzyl im Langzeittest in H<sub>2</sub>O dest, Elendt M4 Daphnienmedium und DIN Algenmedium.

Die Gleichgewichtseinstellung erfolgte sehr schnell (innerhalb von 24 bzw. 48 h). Auf diese Weise wurde die Löslichkeit von Dodecylbenzol in H<sub>2</sub>O dest, Elendt M4 Daphnienmedium und in DIN Algenmedium bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die zweite Methode zur Bestimmung der Löslichkeit des Dodecylbenzol basiert auf der Methodik des Passive Dosing. Das Prinzip der Gleichgewichtsverteilung zwischen Silikon O-Ringen und Medium führt bei maximal beladenem Silikon zur maximal löslichen Konzentration in ebendiesem Medium. Nach mehreren Versuchen mit der konventionellen Passive Dosing Methodik (unter Einsatz von Lösungsmittel), wurde die Löslichkeit des Dodecylbenzol aufgrund der geringeren Schwankungen über den Passive Dosing Limit Test bestimmt, d.h. ohne Lösungsmittel. Die Messung der Löslichkeit in verschiedenen Medien wurde sowohl an die Dauer des jeweiligen Ökotoxizitätstest angepasst, als auch an die Durchführung. Die Methode des Passive Dosing Limit Tests ist in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

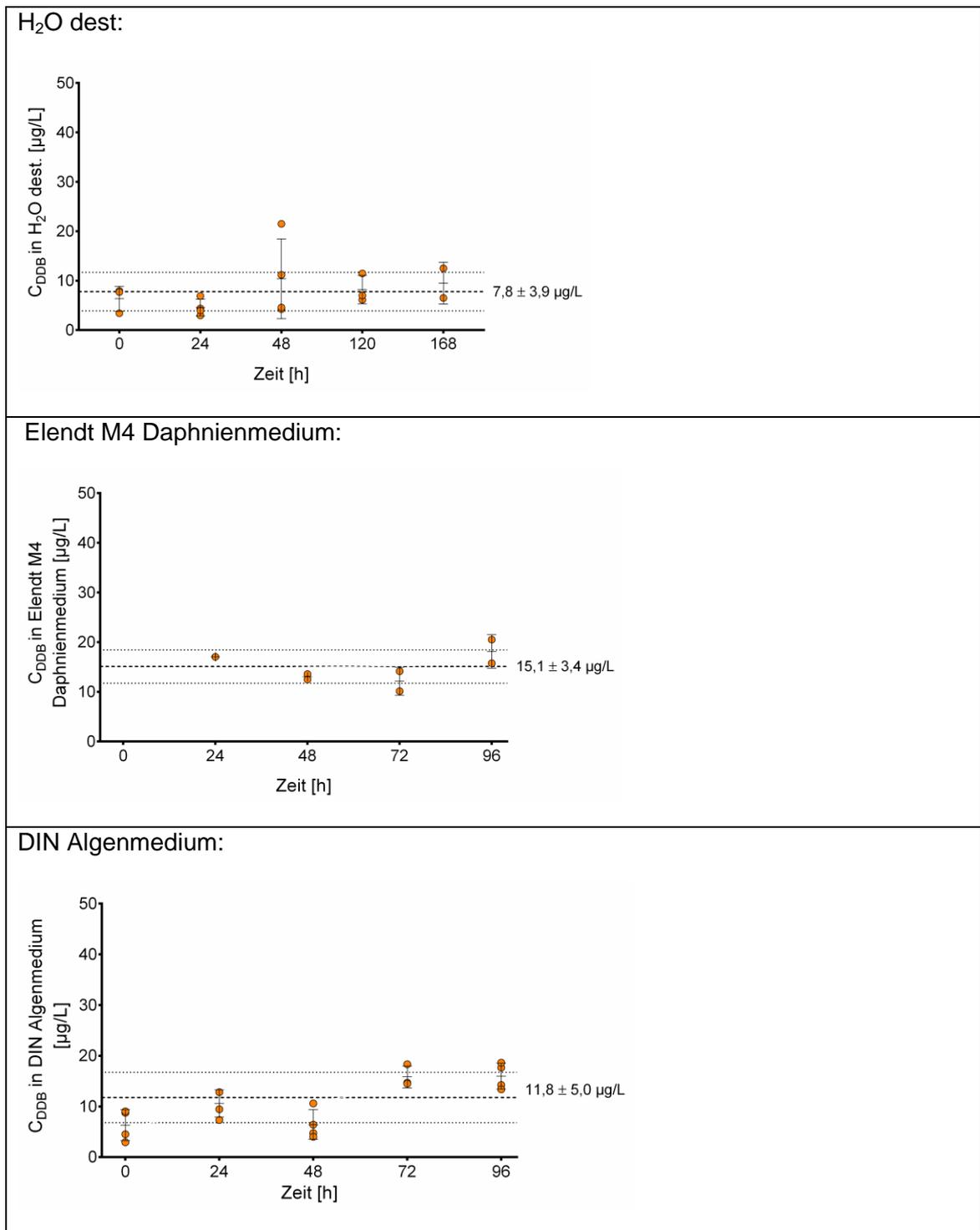


Abbildung 7: Exp. Bestimmung der Löslichkeit von Dodecylbenzol über Passive Dosing Limit Test in H<sub>2</sub>O dest, Elendt M4 Daphnienmedium und DIN Algenmedium.

Die mit dem Passive Dosing Limit Test bestimmten Löslichkeitswerte liegen generell etwas höher in der zuvor beschriebenen „konventionellen Methode“, jedoch ebenfalls im unteren µg/L-Bereich. Die Gleichgewichtseinstellung wurde innerhalb der Equilibrierungszeit von 24 h erreicht. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Experimentell ermittelte Löslichkeitswerte des Dodecylbenzol (DDB) in verschiedenen Medien mittels Langzeittest und Passive Dosing Limit Test.

	Langzeittest	Passive Dosing Limit Test
H <sub>2</sub> O dest.	5,6 ± 2,3 µg/L	7,8 ± 3,9 µg/L
Elendt M4 Daphnienmedium (OECD 202)	6,4 ± 2,9 µg/L	15,1 ± 3,4 µg/L
DIN Algenmedium (OECD 201)	24,1 ± 15,4 µg/L	11,8 ± 5,0 µg/L

Warum es zu den leicht unterschiedlichen Löslichkeitswerten zwischen beiden verwendeten Methoden kam, kann nicht abschließend beurteilt werden. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien liegen vermutlich in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe mit möglicherweise Löslichkeitsfördernden Effekten. Wichtig ist festzuhalten, dass alle ermittelten Löslichkeitswerte oberhalb des  $ETNC_{\text{aqua}}$  von 1,9 µg/L liegen, während die rechnerische Löslichkeitsprognose im Bereich dieses Wertes liegt. Im Hinblick auf das Ziel einer experimentellen Toxizitätsprüfung im unteren µg/l-Bereich schien dies jedoch für die weitere Methodenentwicklung nicht von entscheidender Bedeutung zu sein.

### 3.2 Methodenetablierung und Ökotoxizität von Dodecylbenzol (Arbeitspaket 3/4)

Zur Etablierung des Passive Dosing wurden zunächst verschiedene Tests mit gegossenen PDMS-Schichten durchgeführt. Die Daten befinden sich im Anhang: Kapitel 8.2. Aufgrund der stark erhöhten Konzentration der Testsubstanz im Medium im Vergleich zur prognostizierten Löslichkeit und zu den experimentellen Löslichkeitstests, der problematischen Analytik mit sehr starken Schwankungen, sowie dem unklaren Einfluss verschiedener Reinigungsschritte, wurde der Fokus auf das Passive Dosing mit industriell hergestellten Silikon O-Ringen gelegt (Altec Products Ltd, United Kingdom). Vorzüge dieser Variante zeigten sich in Vortests in einer wesentlich einfacheren Handhabung und einer vertrauenswürdigen Quantifizierbarkeit der Testsubstanz.

#### 3.2.1 Etablierung des konventionellen Passive Dosing für Dodecylbenzol (AP3)

Die finale Etablierung des Passive Dosing und die Adaption an Ökotoxizitätstests basiert dementsprechend vollständig auf der Verwendung von Silikon O-Ringen. Grundlegend wurden zwei Methoden entwickelt: 1) Beladung der Silikon O-Ringe mittels Methanol:Dodecylbenzol-Lösungen zur Einstellung verschiedener

Testkonzentrationen. 2) Beladung der O-Ringe in purer Testsubstanz zur Einstellung einer einzigen der maximalen Löslichkeit entsprechenden Konzentration (Passive Dosing Limit Test). Die Silikon O-Ringe wurden vom selben Hersteller bezogen, jedoch unterschiedliche Größen verwendet.

Zunächst wurde das Passive Dosing zur Einstellung verschiedener Testkonzentrationen über Methanol:Dodecylbenzol-Lösungen etabliert. Der Löslichkeit des Dodecylbenzols in Methanol entsprechend (siehe Anhang: Kapitel 8.1) wurde zum Ansetzen der Tests eine übersättigte Dodecylbenzol-Methanol Lösung hergestellt. Zur Beladung wurden die Silikon O-Ringe für 72 h unter Schütteln in diese Stammlösung gelegt. Für niedrigere Konzentrationen wurde die Stammlösung zuvor entsprechend mit reinem Methanol verdünnt (z.B. 1:1, 1:2, 1:4). Die Beladungszeit betrug immer exakt 72 Stunden. Nach Beladung wurden potenziell in den O-Ringen vorhandenen Methanol-Reste im Trockenschrank bei 70 °C für 24 h abgedampft um mögliche Lösungsvermittlungseffekte auszuschließen. Die potenzielle partielle Verdampfung der Testsubstanz Dodecylbenzol während dieses Schrittes konnte in einem separaten Kontrolltest ausgeschlossen werden. Nachfolgend wurden die beladenen O-Ringe in die mit dem jeweiligen wässrigen Medium befüllten Testgefäße eingebracht und für 24 h equilibriert (Gleichgewichtseinstellung).

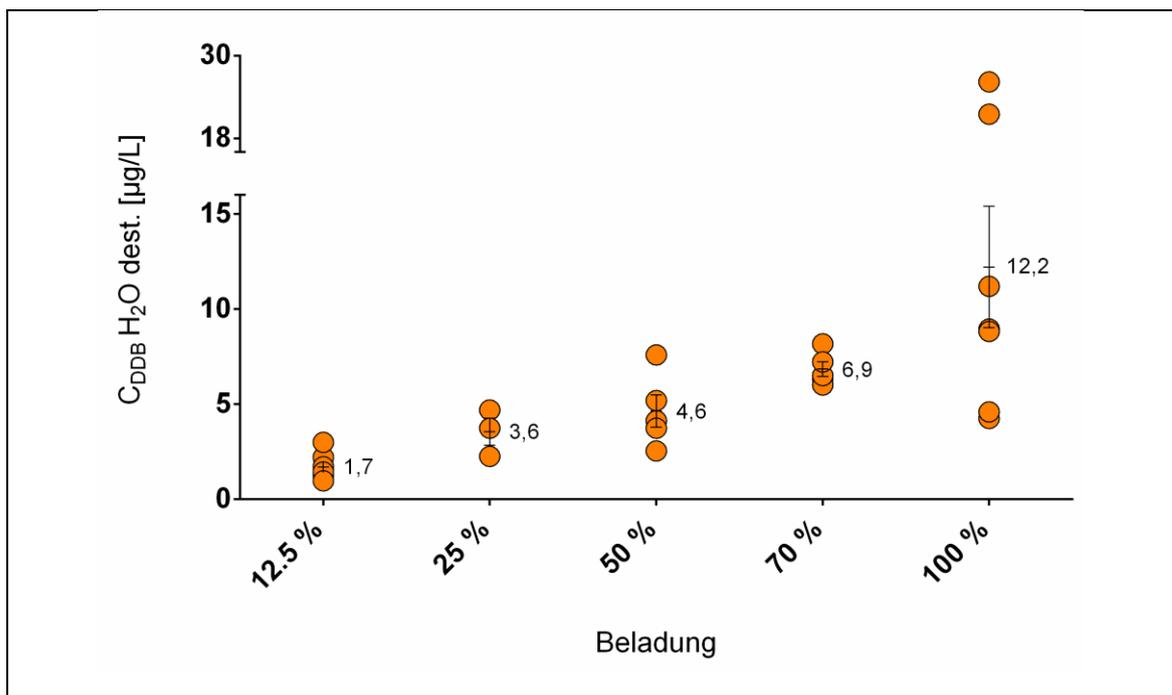


Abbildung 8: Überprüfung des Passiven Dosings in  $\text{H}_2\text{O dest.}$  über verschiedene Beladungen von 12,5 % bis 100 %.

Wie in Abbildung 8 zu sehen, konnte eine stabile Konzentrationseinstellung in einem vertrauenswürdigen Konzentrationsbereich ohne starke methodische Schwankungen (im Vergleich zu den konventionellen Löslichkeitstests Kapitel 2.1.2) für Konzentrationen unterhalb der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol in  $\text{H}_2\text{O dest.}$  etabliert werden. Lediglich die höchste Konzentration, der maximalen Wasserlöslichkeit entsprechend, wies in den Tests starke Schwankungen auf, möglicherweise bedingt im Einsatz „gesättigter“ Stammlösung. „Gesättigte“ Stammlösung beinhaltet eine zweite

Phase ungelöster Testsubstanz um auftretende Verluste durch Diffusion in das Silikon auszugleichen. Der direkte (variierende) Kontakt des Silikons zu beiden Phasen während der Beladung könnte zu den auftretenden Schwankungen führen.

### 3.2.2 Ökotoxizität von Dodecylbenzol im konventionellem Passive Dosing (AP4)

Die ökotoxikologische Untersuchung von Dodecylbenzol wurde zunächst mittels konventionellem Passive Dosing unter Einstellung verschiedener Konzentrationen unterhalb der maximalen Wasserlöslichkeit durchgeführt. Die zuvor erhaltenen experimentellen Ökotoxizitätsdaten mittels PDMS-Schichten sind in Anhang: Kapitel 8.3 dargestellt. Die Testung bei maximaler Löslichkeit wurde aufgrund der bei Prüfung des konventionellen Passive Dosing aufgetretenen Schwankungen anschließend mittels Passive Dosing Limit Test untersucht (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Die Möglichkeit einer stabilen Einstellung der verschiedenen Konzentrationen konnte bereits in der Methodenetablierung gezeigt werden. Durchgeführt wurden hier zellbasierte Microtox<sup>®</sup> Assays (WCMUC 1994), akute Daphnien-Immobilitätstests (OECD 202), Algenwachstumshemmtests (OECD 201), Fisch-Embryo Toxizitätstests (FET; OECD 236) sowie chronische Daphnienreproduktionstests (OECD 211).

Versuche die Testsubstanz im Testsystem zu quantifizieren erwiesen sich als schwierig bzw. nicht vertrauenswürdig. Stark erhöhte gemessenen Konzentration wiesen darauf hin, dass eine exakte Bestimmung der freigelösten Substanzkonzentration wahrscheinlich aufgrund des Einflusses von Testorganismen, Exkretionen oder organischen Partikeln etc. nur schwer möglich sind. Aufgrund der bereits durchgeführten, exakten Bestimmung der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol in verschiedenen Medien und der Gleichgewichtstheorie des Passive Dosing konnten die Substanzkonzentrationen der verschiedenen Beladungsstufen jedoch bereits berechnet werden. Eine prinzipielle Möglichkeit der Quantifizierung im Testsystem stellten sogenannte Blank Tests dar, parallel zum Test laufende Testsysteme ohne Organismen, die ausschließlich der analytischen Quantifizierung der Testsubstanz dienen.

#### Microtox<sup>®</sup> Assay

Der Microtox<sup>®</sup> Assay wurde in Kooperation mit dem Korean Institute for Science and Technology Europe (KIST Europe) und Herrn Dr. Kilian Smith durchgeführt. Gemessen wird hier die Inhibition der Lumineszenz-Aktivität von *Aliivibrio fischeri*. Die Methode ist beschrieben in WCMUC (1994). Das Testsystem wurde an die Methode des Passive Dosing angepasst. Als Dosing-Polymer kamen sowohl Silikon O-Ringe (ALTEC ORS-0036-24) als auf PDMS-disks zum Einsatz. Getestet wurden 6 bzw. 7 Beladungsstufen von 100% bis 3% der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol über einen Zeitraum von bis zu 120 Minuten. In einem zusätzlichen Test wurde Dodecylbenzol über Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel in 9 Konzentrationen von 1000 bis 0,3 µg/L in das Testsystem eingebracht. Als Positivkontrolle wurde ZnSO<sub>4</sub> eingesetzt, als Negativkontrolle unbeladene O-Ringe bzw. PDMS-disks bzw. DMSO der entsprechenden Testkonzentration. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der

verschiedenen Tests. Es wurden keine Effekte von DDB auf die Lumineszenz-Aktivität im getesteten Zeitraum gefunden.

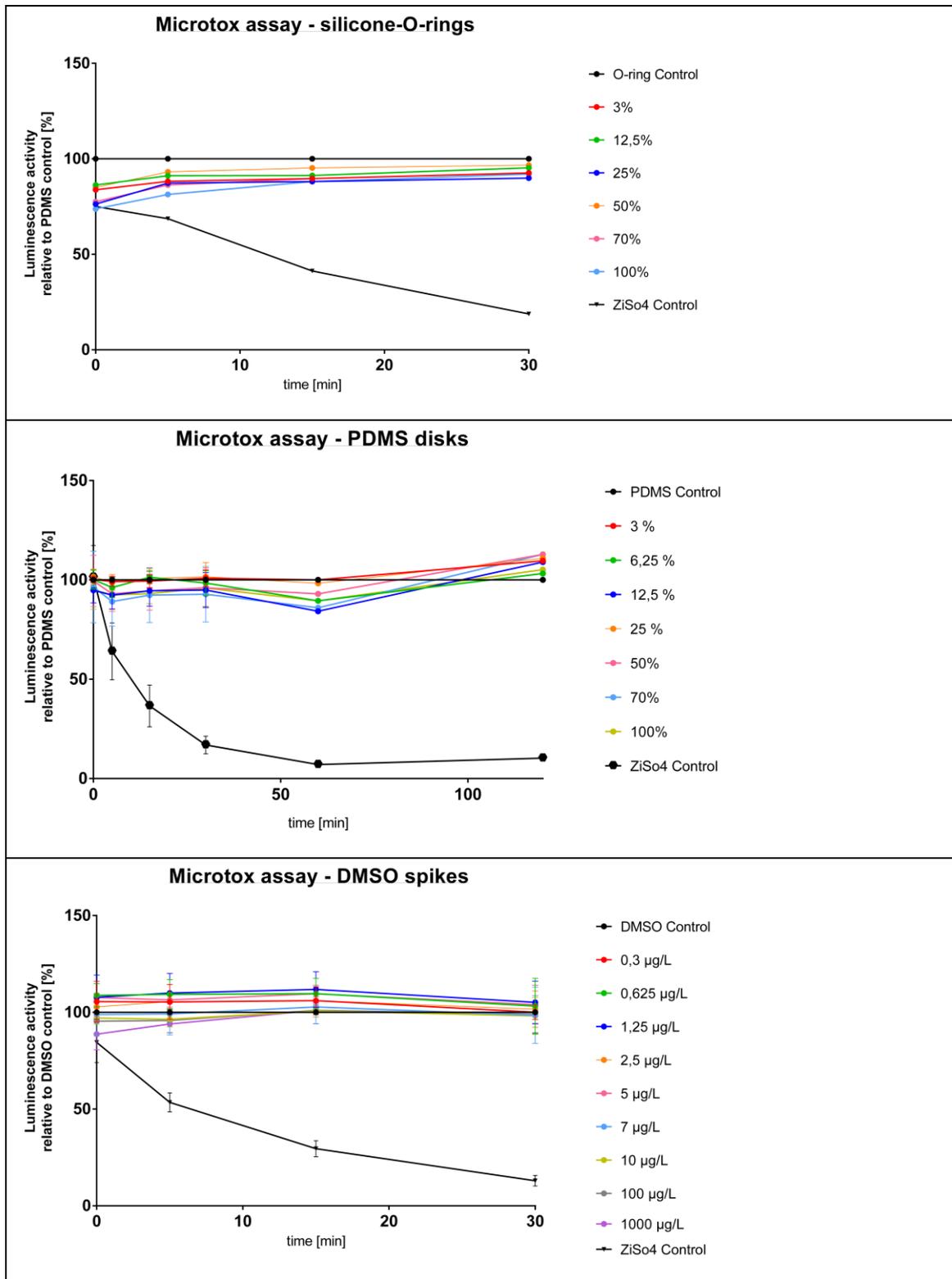


Abbildung 9: Ergebnisse der Microtox<sup>®</sup>-Assays. Passive Dosing von Dodecylbenzol über Silikon O-Ringe und PDMS-disks sowie über Einbringung mittels DMSO als Lösungsmittler.

### Akuter Daphnien-Immobilitätstest

Der akute Daphnientest wurde nach OECD Guideline 202 durchgeführt. Gemessen wird hier die Immobilität von neonaten Daphnien *Daphnia magna*. Das Testsystem wurde an die Methode des konventionellen Passive Dosing angepasst. Als Dosing-Polymer wurden Silikon O-Ringe (ALTEC ORS-BS309) genutzt. Getestet wurden 4 Beladungsstufen von 50 % bis 6,25 % der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol über einen Zeitraum von 48 h in einem offenen Testsystem bei konstanten 20 °C. Sowohl Kontrolle als auch Prozesskontrolle (unbeladene O-Ringe) wurden bei jedem Test mitlaufen gelassen. Insgesamt wurden 4 Tests durchgeführt. Abbildung 10 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der 4 durchgeführten Tests. Es wurden keine Effekte von DDB auf die Mobilität der Daphnien im getesteten Zeitraum gefunden.

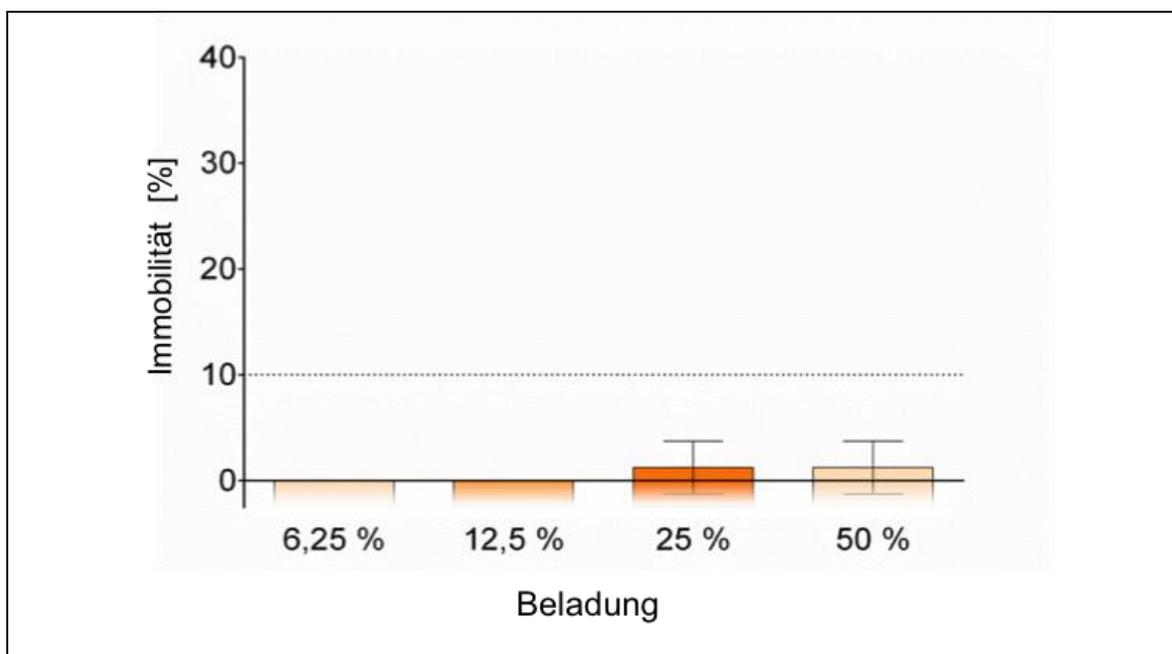


Abbildung 10: Ergebnisse des akuten Daphnien-Immobilitätstests über konventionelles Passive Dosing von Dodecylbenzol über Silikon O-Ringe. Zusammengefasste Darstellung von insgesamt vier Tests.

### Algenwachstumshemmtest

Der Algenwachstumshemmtest wurde nach OECD Guideline 201 durchgeführt. Gemessen wird hier die Hemmung des exponentiellen Wachstums der Alge *Desmodesmus subspicatus*. Der Test gilt sowohl als akuter als auch als chronischer Test. Das Testsystem wurde an die Methode des konventionellen Passive Dosing angepasst. Als Dosing-Polymer wurden Silikon O-Ringe (ALTEC ORS-BS316) genutzt. Getestet wurden 6 Beladungsstufen von 100 % bis 2 % der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol über einen Zeitraum von 72 bzw. 96 h in einem offenen Testsystem unter konstantem Schütteln bei 24 °C. Sowohl Kontrolle als auch Prozesskontrolle (unbeladene O-Ringe) wurden bei jedem Test mitlaufen gelassen. Insgesamt wurden 4 Tests durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der 4

durchgeführten Tests. Es wurden keine signifikanten Effekte von DDB auf Wachstum der Algen gefunden.

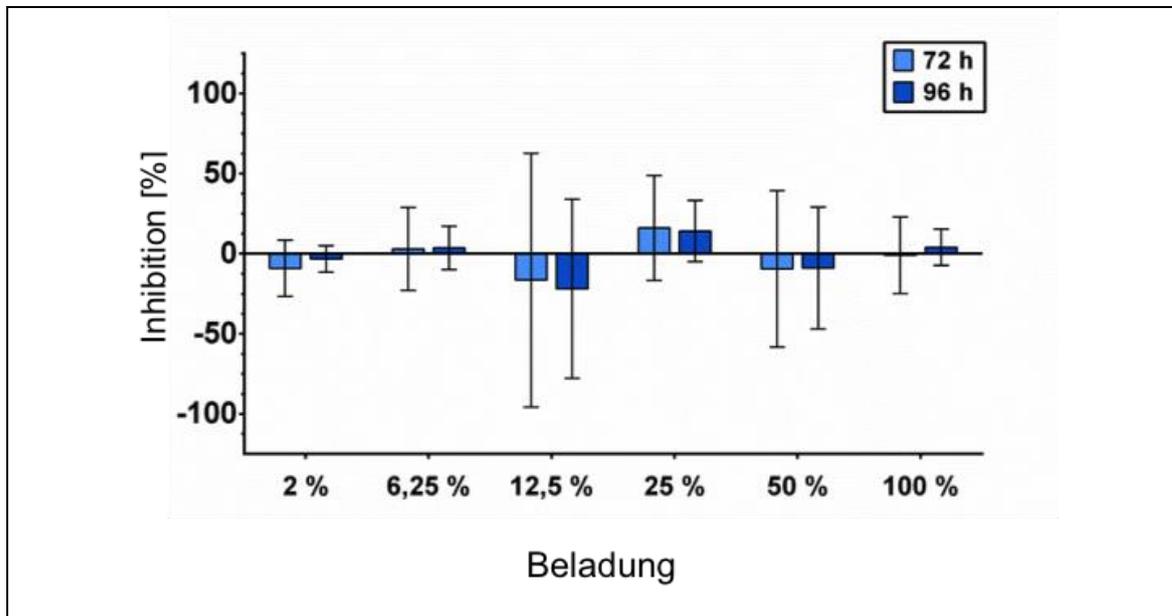


Abbildung 11: Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests über konventionelles Passive Dosing von Dodecylbenzol über Silikon O-Ringe. Zusammengefasste Darstellung von insgesamt vier Tests.

#### Chronischer Daphnien-Reproduktionstest

Der chronische Daphnien-Reproduktionstest wurde nach OECD Guideline 211 zweimal durchgeführt. Gemessen wird hier die Reproduktion adulter Daphnien (*Daphnia magna*), das Wachstum adulter Tiere, die Größe der Nachkommen sowie das Geschlecht der Nachkommen. Das Testsystem wurde an die Methode des konventionellen Passive Dosing angepasst. Als Dosing-Polymer wurden Silikon O-Ringe (ALTEC ORS-BS316) genutzt. Getestet wurden 5 Beladungsstufen von 100 % bis 25 % der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol über einen Zeitraum von 21 Tagen in einem offenen Testsystem bei konstanten 20 °C. Die adulten Tiere wurden während des Versuchs täglich mit definierter Menge Algen gefüttert. Das Medium inkl. der Silikon O-Ringe wurde 2x pro Woche gewechselt. Sowohl Kontrolle als auch Prozesskontrolle (unbeladene O-Ringe) wurden bei beiden Tests mitlaufen gelassen. Insgesamt wurden 2 Tests durchgeführt, wovon einer aufgrund der zu geringen Reproduktion der Kontrolle als nicht valide galt und im weiteren nicht besprochen wird. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse des validen Tests. Es konnten schwache Effekte von DDB auf die Reproduktion der adulten Tiere bei Beladung 90 % und 70 % der Löslichkeit von DDB bezogen auf die Prozesskontrolle gemessen werden. Die Daten wurden auf Normalverteilung (Kolmogoroff-Smirnov Test), Varianzhomogenität (Levene's Test) und Signifikanz (Student-t Test bzw. Welch-t Test) untersucht. Es wurden jedoch keine Effekte auf Wachstum der adulten Tiere oder auf die Größe bzw. das Geschlecht der Nachkommen gefunden.

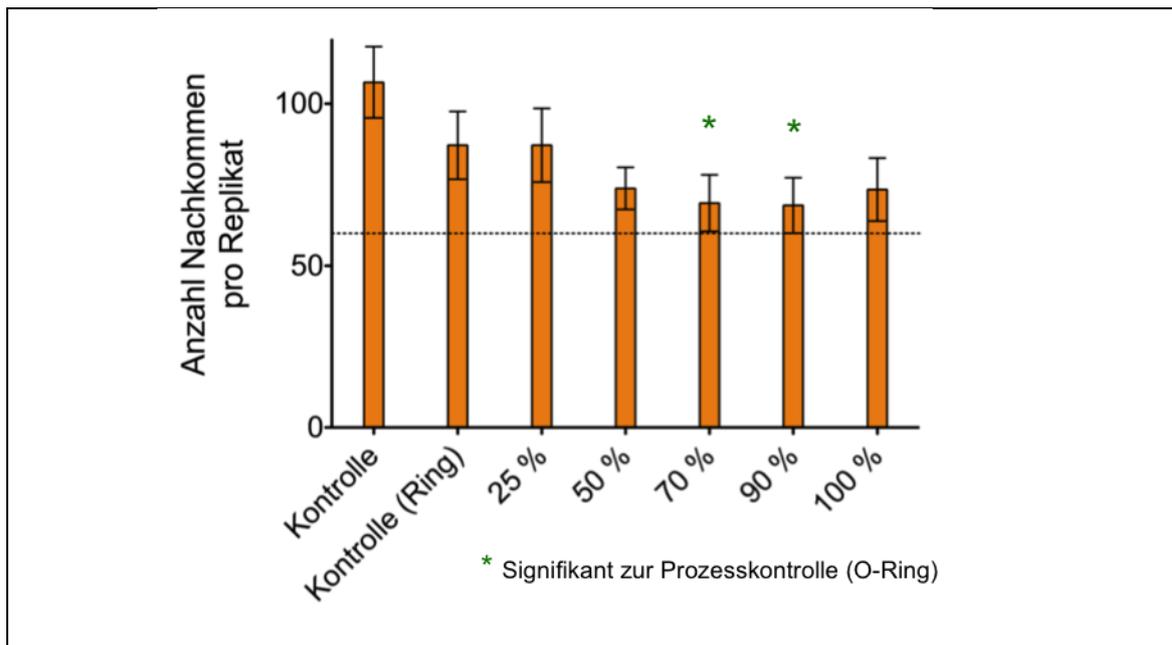


Abbildung 12: Ergebnisse des chronischen Daphnien-Reproduktionstests über konventionelles Passive Dosing von Dodecylbenzol über Silikon O-Ringe.

Zwischenfazit: Ökotoxikologische Effekt von Dodecylbenzol wurden mittels der konventionellen Methodik des Passive Dosing unterhalb bzw. teilweise an der Löslichkeitsschwelle der Substanz nicht gefunden. Resultierende Konzentrationen aus gesättigten Beladungen (100 %) müssen aufgrund der Ergebnisse der Methodenetablierung (große Konzentrationsschwankungen) hinterfragt werden. Lediglich der chronische Daphnien-Reproduktionstest zeigte eine schwache Inhibition der Reproduktion bei Beladungen von 70 % und 90 % der maximalen Löslichkeit.

### 3.2.3 Etablierung des Passive Dosing Limit Test für Dodecylbenzol (AP3)

Statt weiterer, wenig vielversprechender Untersuchungen im Bereich des konventionellen Passive Dosing fiel die Entscheidung weitere Tests exakt bei der maximalen Wasserlöslichkeit des Dodecylbenzols durchzuführen. Bei den Untersuchungen mittels konventionellem Passive Dosing wies die maximale Beladung des Silikons, wie zuvor schon erwähnt, starke Schwankungen auf. Die erarbeiteten Ergebnisse waren damit zur Beantwortung der Frage, ob bei maximaler Löslichkeit ökotoxische Effekte auftreten, nicht ausreichend aussagekräftig. Zur Messung potentieller ökotoxikologischer Effekte der Testsubstanz war daher eine Untersuchung bei maximaler Wasserlöslichkeit unabdingbar. Mit der Entwicklung der Methodik des Passive Dosing Limit Tests wurde eine vielversprechende Methode gefunden, die eine maximale Löslichkeit der Substanz im wässrigen Medium ermöglicht. Durchgeführt wurden daraufhin auf dem Passive Dosing Limit Test basierende Algenwachstumshemmtests (OECD 201), akute Daphnien-Immobilitätstests (OECD 202), sowie Fisch-Embryo Toxizitätstests (FET).

Die eigentliche Etablierung wie Untersuchung der Beladungskinetik und Dosierungskinetik wurden jeweils parallel zu den jeweiligen Ökotoxizitätstests durchgeführt und sind im Folgenden Kapitel 2.2.4 beschrieben.

Auch beim Passive Dosing Limit Test steht die Quantifizierung der Testsubstanz vor den oben geschilderten Problemen. Eine exakte Bestimmung der freigelösten Substanzkonzentration kann aufgrund des Einflusses von Testorganismen, organischen Partikeln etc. nur schwer durchgeführt werden. Im Falle des Passive Dosing Limit Tests, wurden jedoch Blank Tests durchgeführt, um eine Bestätigung der Testkonzentration zu erhalten. Die Entscheidung zur vollständigen Durchführung dieser Untersuchungen lag begründet in den im Folgenden beschriebenen, gemessenen ökotoxikologischen Effekten.

### 3.2.4 Ökotoxizität von Dodecylbenzol im Passive Dosing Limit Test (AP4)

#### Algenwachstumshemmtest Limit Test

Der Algenwachstumshemmtest wurde aufgrund seiner vergleichsweise einfachen und schnellen Durchführbarkeit und des chronischen Endpunkts (Wachstum) als erster ökotoxikologischer Test ausgewählt, um die Methodik des Limit Tests zu etablieren und zu testen. Das technische Ziel war es, durch das verbessertes Passive Dosing Setup eine Einstellung von Substanzkonzentrationen exakt bei maximaler Löslichkeit zu erreichen. Alle Versuche wurden in Kooperation mit der Dänischen Technischen Hochschule in Lyngby (Kopenhagen, Dänemark) bei Herr Prof. Dr. Philipp Mayer durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden Silikon O-Ringe (Typ 1: ALTEC ORS-0096-24) mit reinen Dodecylbenzol beladen ("silicone swelling"). In Abbildung 13A ist die Kinetik des Beladungsverhaltens der O-Ringe dargestellt. Eine Sättigung der O-Ringe mit Testsubstanz wurde innerhalb von 5 Stunden ( $t_{95\%} = 4,36$  h) erreicht. Das Aufnahmepotenzial („swelling potential“) betrug 14,5 %, was insgesamt 32 mg DDB pro O-Ring Typ 1 entspricht. Die relative Standardabweichung betrug weniger als 0,22 % ( $n = 3$ ) während aller gemessenen Zeitintervalle ( $t = 0 - 96$  h). Im Hinblick auf die zu erwartende maximale Löslichkeit der Substanz in Algenmedium im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich, kann das Substanzreservoir als durchaus ausreichend angesehen werden. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Beladungskinetik von Masse und Form der O-Ringe wurden weitere O-Ring Typen getestet. O-Ring-Typ 2 (ALTEC ORS-BS131) hat einen ähnlichen Querschnitt wie O-Ring-Typ 1, jedoch eine wesentlich größere Masse. Beide O-Ring-Typen zeigten eine sehr ähnliche Kinetik trotz unterschiedlicher Masse. O-Ring-Typ 3 (ALTEC ORS-BS316) und O-Ring-Typ 4 (ALTEC ORS-BS309) haben einen wesentlich größeren Querschnitt, unterscheiden sich aber ebenfalls in ihrer Masse. Eine Sättigung wurde bei letzteren erst innerhalb von 17 h ( $t_{95\%} = 16,39$  h) erreicht. Alle getesteten O-Ringe zeigten eine Sättigung bei  $14,5 \pm 0,2$  %. Da Grenzschichten in diesem 2-Phasen-Setup (DDB und Silikon) vernachlässigbar sind, scheint der wichtigste Faktor der Beladungskinetik der Querschnitt der O-Ringe bzw. die Dicke des Silikon-Materials im Allgemeinen zu sein. In Hinblick auf die aquatischen Experimente wurde zusätzlich das Verhalten der Silikon O-Ringe im Wasser untersucht. Das Potential zur Aufnahme von Wasser („swelling in water“) war jedoch

vernachlässigbar niedrig bei 0,3 % ( $n = 3$ ) und einer relativen Standardabweichung von weniger als 0,1% und somit in den Tests vernachlässigbar.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Sättigung des Silikonmaterials mit dieser Methode bereits innerhalb von maximal 17 h erreicht werden konnte, und zu einem Substanzgehalt im mg-Bereich (32 mg pro O-Ring Typ 1) führte. Zusätzlich entfällt die sonst notwendige Entfernung des Lösungsmittels und das damit verbundene Risiko Teile der Testsubstanz zu verlieren. Die maximal mögliche Beladung der O-Ringe impliziert, dass eine konstante freigelöste Substanzkonzentration in der wässrigen Phase des Tests exakt an der Löslichkeitsschwelle durch Gleichgewichtseinstellung eingestellt werden kann.

Nach der Optimierung der Beladungstechnik wurde die Gleichgewichtseinstellung zwischen Silikon und Medium untersucht. Die Kinetik der Dosierung wurde in einem separaten Experiment unter Verwendung von DIN Algenmedium + 20 % Methanol als wässrige Phase untersucht. Das Methanol wurde zugefügt, um eine gesteigerte Löslichkeit des Dodecylbenzols im Medium zu erhalten und so auch niedrige Substanzkonzentrationen während der Gleichgewichtseinstellung quantifizieren zu können. Die zeitliche Dimension der Gleichgewichtseinstellung ist weitgehend unabhängig von der Hydrophobie der Substanz (van der Heijden et al. 2015), sondern vor allem abhängig von der Grenzschicht zwischen Silikon und Medium, und somit von der Turbulenz während der Gleichgewichtseinstellung z.B. durch Schütteln (Kwon et al. 2009). Eine potentiell schnellere Diffusion der Substanz aus dem Silikon durch künstlich reduzierte Hydrophobie (Zugabe von 20 % Methanol als Lösungsmittel) wird kompensiert durch einen insgesamt höheren Stofftransport über die Grenzschicht (Smedes et al. 2009). Wie in Abbildung 13B gezeigt, wurde ein Gleichgewicht in weniger als 12 h ( $t_{95\%} = 11,2$  h) erreicht. Die Zeitachse ist somit übertragbar auf die reale „lösungsmittelfreie“ Dosierung der Testsubstanz. Um eine ausreichende Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts in jedem Fall sicherzustellen, wurde vor allen Tests eine Equilibrierungszeit von 48 h eingehalten.

Um die konstante Exposition des Dodecylbenzols während des gesamten Testzeitraums von 72 h zu bestätigen, wurde die Testsubstanz in einem Blank Test (Test ohne Organismen) quantifiziert. Dies ist in Abbildung 13C dargestellt. Hier wurde eine durchschnittliche DDB Konzentration von  $12 \pm 5$   $\mu\text{g/L}$  gemessen (siehe auch Kapitel 2.1.2). Bezogen auf die Theorie der Gleichgewichtseinstellung kann dieser Wert als die maximale Löslichkeit von Dodecylbenzol in DIN Algenmedium bei 20 °C angesehen werden.

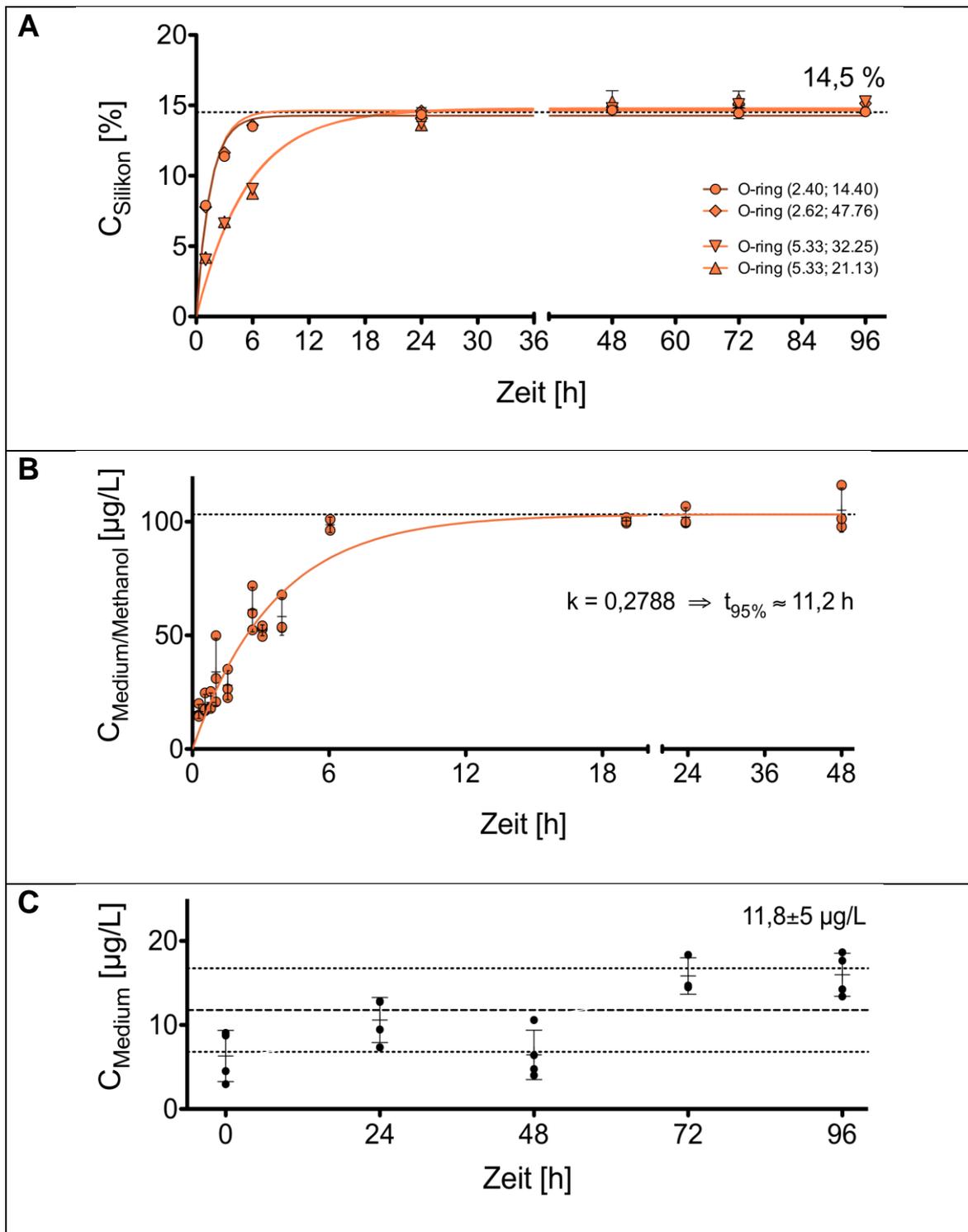


Abbildung 13: Etablierung des Algenwachstumshemmtests Passive Dosing Limit Test. A) Beladung: Kinetik der Beladung verschiedener Silikon O-Ringe mit Dodecylbenzol. Angaben über Querschnitt und Außendurchmesser der O-Ringe in Klammern. Mittelwert und Standardabweichung von je drei Replikaten gravimetrisch bestimmt. Regression über "one-compartment model". B) Dosing: Dosierungs-Kinetik und Gleichgewichtseinstellung über Passive Dosing in DIN-Algenmedium/Methanol-Lösung. Einzelwerte sowie Mittelwert und Standardabweichung gemessen mittels GC-MS. Regression über "one-compartment model". C) Blank Test: Quantifizierung von Dodecylbenzol in DIN-Algenmedium über einen Testzeitraum von 96 h. Einzelwerte sowie Mittelwert und Standardabweichung gemessen mittels GC-MS. Plateau zeugt denn Gesamtmittelwert von 0 h bis 96 h plus Standardabweichung.

Nach Etablierung der Methodik des Limit Tests wurden die zwei eigentlichen Algenwachstumshemmtests (adaptiert an OECD Guideline 201) durchgeführt. Verwendet wurde die Alge *Raphidocelis subcapitata*. Die Tests wurden im Gegensatz zu den bisher durchgeführten konventionellen Passive Dosing Tests in geschlossenen Systemen durchgeführt (Mayer et al. 2000), um damit grundsätzlich potenzielle Verluste der Substanz durch Verdampfung zu vermeiden.

Beide unabhängige Algenwachstumshemmtests wurden mit maximal beladenen Silikon O-Ringe Typ 1 (ALTEC ORS-0096-24) durchgeführt, um eine Gleichgewichtskonzentration von DDB exakt an der Löslichkeitsschwelle im DIN Algenmedium zu erreichen ( $12 \pm 5 \mu\text{g/L}$ ). Wie in Abbildung 14A und 14B zu sehen ist, zeigten beide Tests ein exponentielles Wachstum zwischen 0 und 72 h mit Wachstumsraten oberhalb der Validitätskriterien nach OECD bzw. DIN (DIN 2012, OECD 2011). Auch alle gemessenen pH-Werte und Temperatur-Daten waren innerhalb der Richtlinien (DIN 2012, OECD 2011). Beide Tests sind somit valide. Nach 96 h fiel das Wachstum aller Kontrollen und Treatments stark ab, einem bekannten Phänomen, wahrscheinlich aufgrund von limitierenden Faktoren des Testsystems (Mayer et al. 2000). Aus diesem Grund wurde im Weiteren nur der Zeitraum 0-72 h untersucht.

Alle Treatments zeigten eine mäßig, jedoch statistisch signifikantes, reduziertes Wachstum nach 48 und 72 h in beiden Tests im Vergleich zu den entsprechenden Prozesskontrollen. Abbildung 14C zeigt die Inhibition des Wachstums. In Test 1 wurde eine mittlere Hemmung von  $13 \pm 5\%$  (95% CI) nach 48 h bzw. nach 72 h gemessen. In Test 2 Hemmungen von  $11 \pm 3\%$  (95% CI) und  $8 \pm 3\%$  (95% CI) nach 48 h bzw. 72 h.

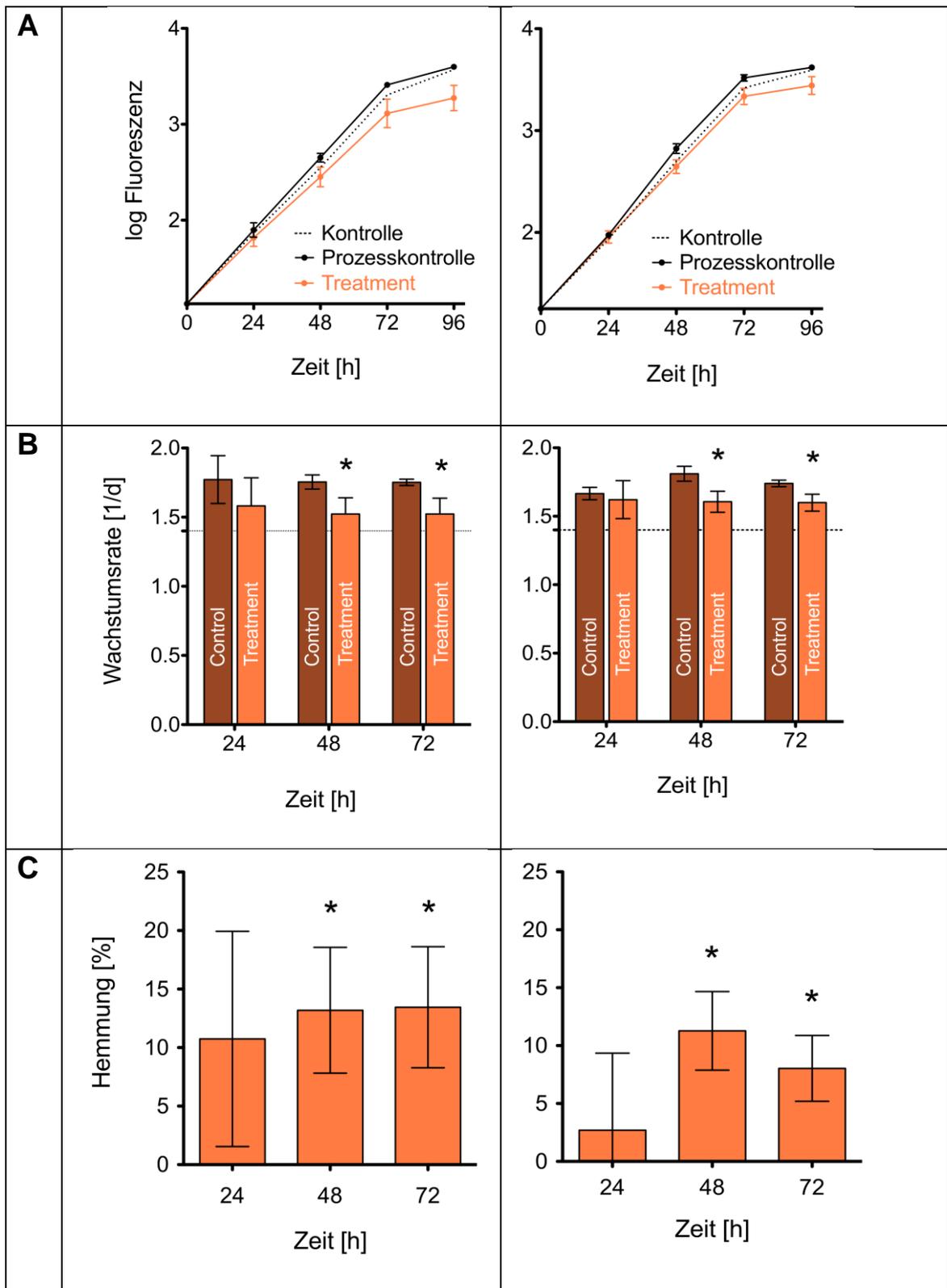


Abbildung 14: Algenwachstumshemmtest über Passive Dosing Limit Test. A) Fluoreszenz (log) über den Testzeitraum von 96 h in zwei Tests (Spalten). B) Wachstumsraten der Treatments im Vergleich zu Prozesskontrollen nach 24, 48 und 72 h. C) Inhibition des Wachstums bezogen auf jeweilige Prozesskontrollen nach 24, 48 und 72 h. Daten wurden auf Normalverteilung (Kolmogoroff-Smirnov Test), Varianzhomogenität (Levene's Test) und Signifikanz (Student-t Test bzw. Welch-t Test) untersucht.

### Akuter Daphnien-Immobilitäts Limit Test

Nach der Etablierung und Durchführung des Algenwachstumshemmtests, wurde als zweiter Test der akute Daphnien-Immobilitätstest an die Methodik des Limit Tests angepasst. Obwohl mittels konventionellem Passive Dosing keine akuten Effekte auf Daphnien gemessen werden konnten, sollte potentielle Auswirkungen des Dodecylbenzol bei maximaler Löslichkeit der Substanz untersucht werden. Eine Durchführung des chronischen Daphnien-Reproduktionstests sollte bei Bestätigung ausbleibender Effekte nachfolgend mittels Limit Test durchgeführt werden. Da es wie im Folgenden beschrieben deutliche akute Effekte gab, wurde auf die Durchführung des chronischen Daphnien-Reproduktionstest verzichtet.

Das Beladungsverhalten („silicone swelling“) der genutzten Silikon O-Ringe (ALTEC ORS-BS309) wurde bereits während des Algenwachstumshemmtests untersucht. Zur Etablierung des akuten Daphnien-Immobilitätstests wurde hier zunächst ebenfalls analog zum Algenwachstumshemmtest sowohl die Gleichgewichtseinstellung (unter Zusatz von 20 % Methanol) überprüft und die Substanzkonzentration über den geplanten Testzeitraum von 96 h in einem Blank Test quantifiziert. Abbildung 15A und 15B zeigen die Ergebnisse dieser Tests. Das Gleichgewicht zwischen Silikon und Medium wurde erreicht bei  $t_{95\%} \approx 13$  h. Ein mittlere frei gelöste DDB Konzentration von  $15,1 \pm 3,4 \mu\text{g/L}$  wurde über einen Testzeitraum von bis zu 96 h gemessen.

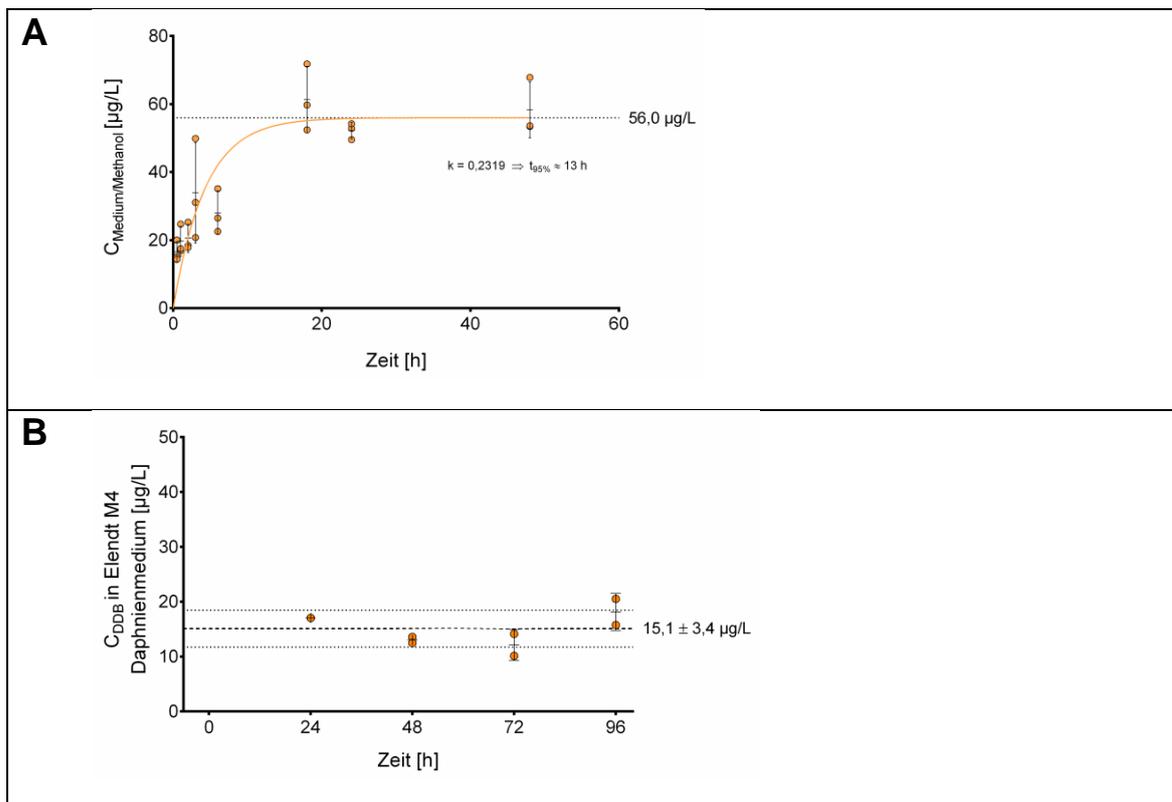


Abbildung 15: Etablierung des akuten Daphnientests über Passive Dosing Limit Test. A) Dosierungs-Kinetik und Gleichgewichtseinstellung über Passive Dosing in Daphnienmedium/Methanol-Lösung. Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung gemessen mittels GC-MS. Regression über „one-compartment model“. B) Blank Test: Quantifizierung von Dodecylbenzol in Elendt-M4 Daphnienmedium über einen Testzeitraum von 96 h. Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung gemessen mittels GC-MS. Gesamtmittelwert von 0 h bis 96 h plus Standardabweichung.

Nach Etablierung des Testsystems wurden zunächst vier einfache akute Limit Tests im geschlossenen System durchgeführt. Der Versuchszeitraum wurde auf bis zu 96 h verlängert (OECD Empfehlung: 48 h), um die eine möglicherweise verzögerte Gleichgewichtseinstellung der Testsubstanz zwischen Organismus und Medium zu gewährleisten (Mayer and Reichenberg 2006). Die Prozesskontrollen zeigten auch innerhalb des verlängerten Testzeitraums keine Auffälligkeiten. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der ersten vier akuten Daphnien-Immobilitätstests (Gesamtdarstellung). Zu sehen sind deutliche Effekte von DDB auf die Mobilität der Daphnien. Allerdings befanden sich auffällig viele der immobilisierten Daphnien am Silikon O-Ring. Dieser Effekt betraf nur die Treatments, nicht die Kontrollen. Dies führte zu dem Verdacht, dass ein Großteil der immobilisierten Tiere aufgrund von am Silikon O-Ring adsorbierter Substanz, an diesem haften blieben und es sich somit nicht um einen Effekt der frei gelösten Testsubstanz handelte.

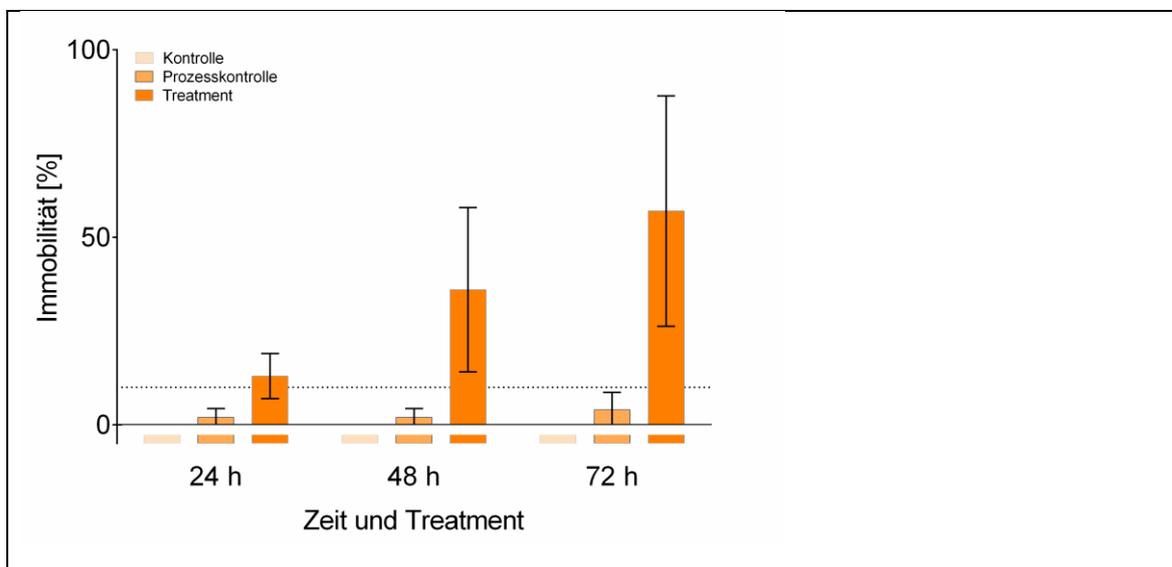


Abbildung 16: Erste akute Daphnien-Immobilitätstests Passive Dosing Limit Test. Gesamtdarstellung von vier unabhängigen Tests.

Um diesem ungewollten Effekt auszuschließen, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, während der die Silikon O-Ringe nach Beladung oberflächlich kurz mittels Methanol oder im Ultraschallbad gereinigt wurden um überschüssige Substanz zu entfernen (je zwei Tests). Alle Tests wurden auch hier über einen verlängerten Testzeitraum von 96 h durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Abbildung 17A bis 17B zu sehen (jeweils Gesamtdarstellung zweier Tests). Zusätzlich wurden die beobachteten Effekte hier unterschieden nach Einbeziehung aller immobilisierten Tiere („Standard“) und Einbeziehung nur der immobilisierten Tiere, welche nicht mit dem Silikon O-Ring assoziiert waren („Konservativ“). Abbildung 17C zeigt die relativen Unterschiede beider Betrachtungsweisen und gibt somit Aufschluss über die Reduktion des Substanz-unabhängigen Einflusses der O-Ringe auf die Daphnien.

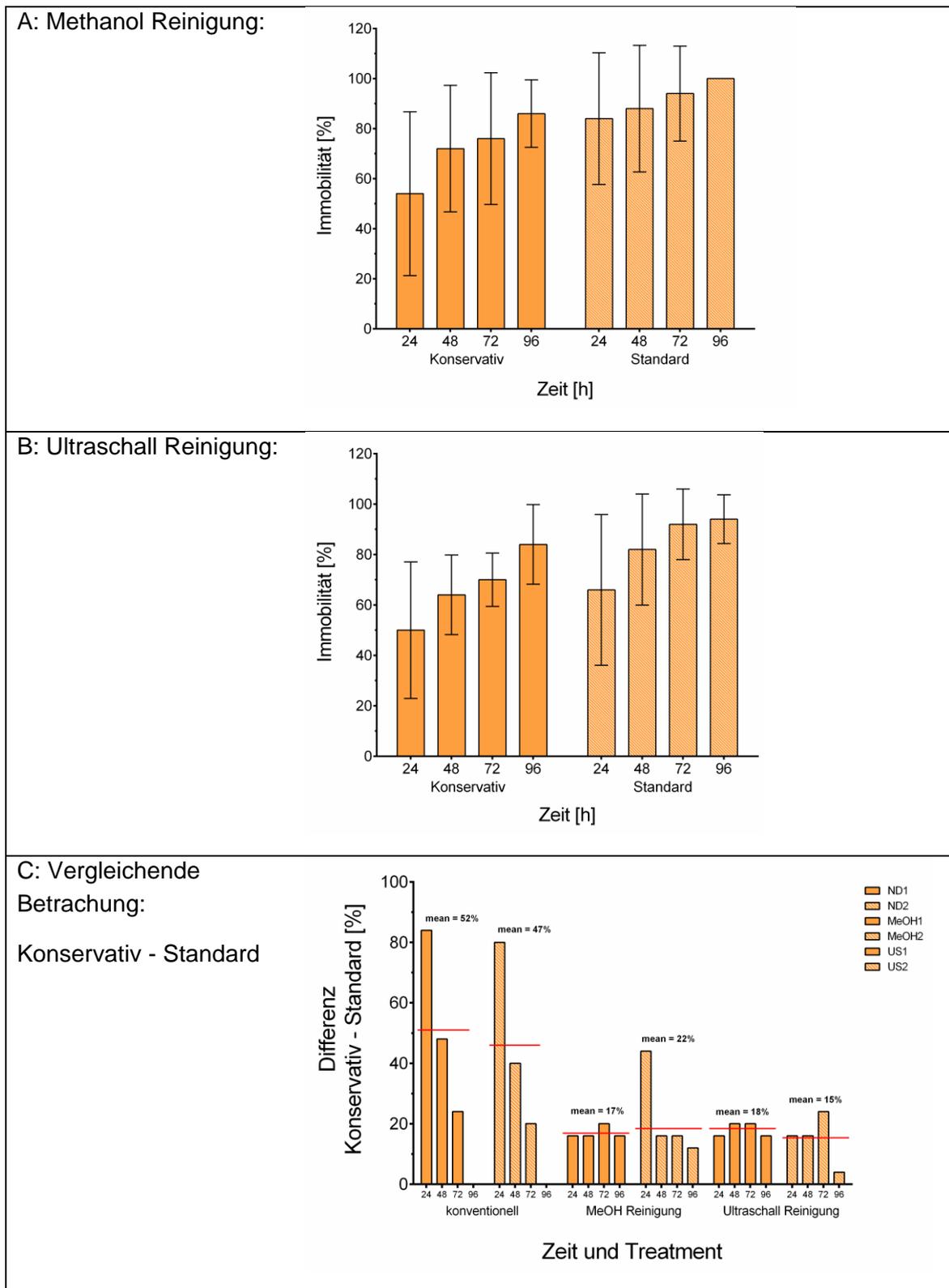


Abbildung 17: Vergleich akute Daphnien-Immobilitätstests nach Reinigung der Silikon O-Ring Oberfläche mit Methanol (A) oder Ultraschall (B). Jeweils Gesamtdarstellung zweier Tests konservative Betrachtung gegen standardisierte. Außerdem Differenz (C) zwischen konservativer und standardisierter Betrachtung der Methanol bzw. Ultraschall Reinigung im Vergleich zum konventionellen Test.

Obwohl mittels Reinigungsschritten die Anzahl am O-Ring haftender Tiere stark reduziert werden konnte, blieb die generelle Problematik des ungewollten Substanz-unabhängigen Effekts der O-Ringe auf die Daphnien bestehen. Zusätzlich müssen die angewendeten Reinigungsschritte als problematisch hinsichtlich der effektiven freigelösten Testsubstanz angesehen werden. Wird ein Teil der Substanz während der Reinigungsschritte entfernt, kann die maximale Löslichkeit im Medium nicht exakt erreicht werden.

Zur finalen Testung der maximalen Löslichkeit im Daphnien-Immobilitätstest wurde aus diesem Grund eine neue Methode etabliert, bei der die Silikon O-Ringe vollständige mittels eines Edelstahl-Käfigs von den Daphnien getrennt wurden. Eine Adhäsion der Tiere an die Silikonoberfläche kann so vollständig ausgeschlossen werden und die beobachteten Effekte ausschließlich auf das frei gelöste Dodecylbenzol bezogen werden. Beladung und Equilibrierung wurden wie bisher durchgeführt, die Silikon O-Ringe jedoch vor Teststart in die Käfige überführt und über den gesamten Testzeitraum von 96 h dort belassen. In Abbildung 18 sind beide durchgeführten Tests dargestellt. Es wurde eine Immobilisierung von  $12 \pm 17 \%$  nach 24 h,  $16 \pm 18 \%$  nach 48 h,  $32 \pm 19 \%$  nach 72 h und  $56 \pm 35 \%$  nach 96 h gemessen. Ob dieser deutliche Effekt auf die frei gelöste DDB-Konzentration von  $15,1 \pm 3,4 \mu\text{g/L}$  (siehe oben) bezogen werden kann, muss diskutiert und weiter validiert werden.

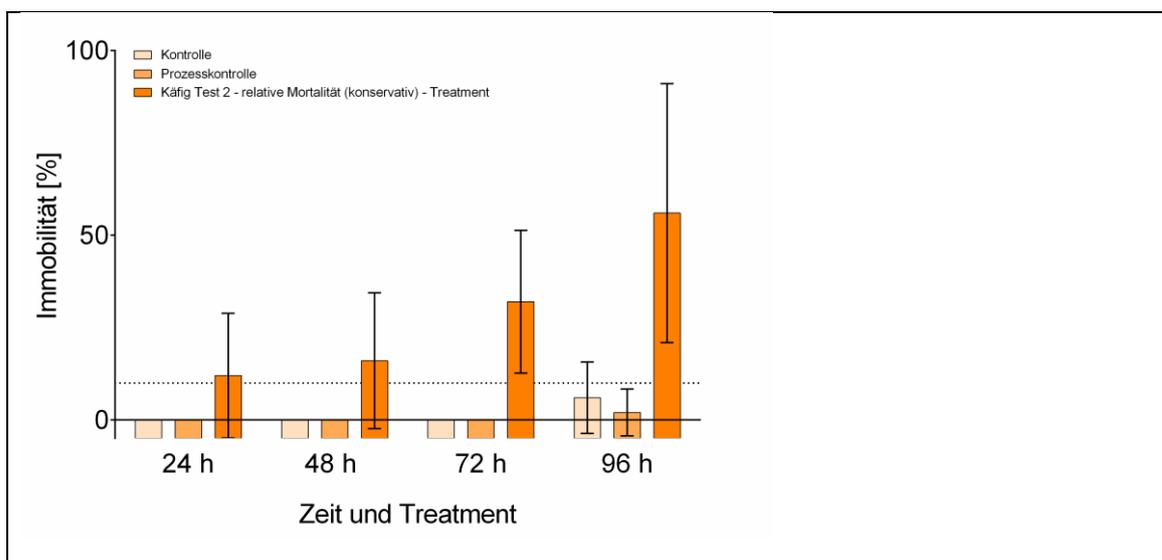


Abbildung 18: Akute Daphnien-Immobilitätstests Passive Dosing Limit Test (Käfig) mit separierten Silikon O-Ringen. Gesamtdarstellung von zwei unabhängigen Tests.

#### Fisch-Embryo Toxizitätstest Limit Test

Zusätzlich wurden ebenfalls im Passive Dosing Limit Test mehrere Fisch-Embryo Toxizitätstests (FET) durchgeführt. Die Tests (3x) wurden über einen Testzeitraum von 96 h mit maximal beladenen Silikon O-Ringen (ALTEC ORS-BS131) durchgeführt. Für diesen O-Ring Typ wurde das Beladungsverhalten bereits während der Vorbereitung des Algenwachstumshemmtests untersucht. In keinem der Tests konnte ein Effekt auf Fisch-Embryos bei maximaler Löslichkeit der Testsubstanz gemessen werden.

## 4. Bromchlorophen

### 4.1 Analytik und Löslichkeitsbestimmung von Bromchlorophen (Arbeitspaket 2)

#### 4.1.1 Analytik von Bromchlorophen

Die Methode zur Bestimmung von Bromchlorophen in den erwarteten niedrigen Konzentrationen wurde zunächst auf Basis eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen mit UV/VIS-Detektor (HPLC-UV/VIS) entwickelt. Diese erwies sich als nicht sensitiv genug.

Eine weitere Methode wurde an einem Flüssigkeitschromatograph mit Massenspektrometer (LC-MS) etabliert. Als Laufmittel wurden ein Wasser-Acetonitril-Essigsäure-Gemisch und ein Acetonitril-Isopropanol-Gemisch verwendet. Die verwendete Säule war eine Hypersil Gold™ 150x4 mm mit einer Partikelgröße von 3 µm. Diese Methode lieferte eine empfindliche und reproduzierbare Möglichkeit, Bromchlorophen nachzuweisen. Diese Methode wurde ausschließlich zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit (siehe 3.1.2) genutzt und für erste ökotoxikologische Vorversuche herangezogen.

Für die ausführlich ökotoxikologische Testung der Substanz erwies es sich jedoch als sinnvoll eine einfach anzuwendende, eine hohe Trennleistung aufweisende gaschromatografische Methode zu etablieren. Hierzu musste die schwer-flüchtige Substanz zunächst mittels einer einschrittigen Acetylierung nach Angelo Alfieri (1989) derivatisiert werden.

Diese günstige und schnelle Methode basiert auf der Acetylierung der aromatischen Ringe des Bromchlorophens mit Essigsäure-Anhydrid. Zu den zu analysierenden Proben wurde *n*-Hexan und Kaliumhydrogencarbonat (Merck Deutschland, Darmstadt) hinzugegeben. Kaliumhydrogencarbonat agiert als Protonenakzeptor, wodurch es ein Proton einer Hydroxygruppe am Bromchlorophen bindet und zu Wasser und CO<sub>2</sub> reagiert. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde Essigsäure-Anhydrid (Merck Deutschland, Darmstadt) hinzugefügt und die eigentliche Acetylierung des Stoffes durchgeführt. Das Acetylkation bindet an das ionisierte Bromchlorophen und kann nach Stabilisierung mit Kaliumchlorid (Merck Deutschland, Darmstadt) von der wässrigen Phase getrennt werden (dreimalige Extraktion mit *n*-Hexan). Nach der Trocknung des vereinten Extrakts mit Natriumsulfat konnte die Probe gaschromatografisch analysiert werden.

Hierfür wurde ein Gaschromatograph mit Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD, Agilent Technologies 6890N Network GC Systems) verwendet. Als Säule wurde eine Agilent HP5 genutzt, als Trägergas Stickstoff. Der Einspritzmodus war splitless. Während der Messung wurde zuerst eine Temperatur von 60 °C für 5 min gehalten. Anschließend wurde die Säule in 10 °C Schritten pro Minute auf 300 °C erhitzt. Diese Temperatur wurde erneut für 5 min gehalten, was zu einer Laufzeit von 34 min pro Messung führte. Abbildung 19 zeigt die Kalibrierung der gaschromatografischen Methode nach Derivatisierung.

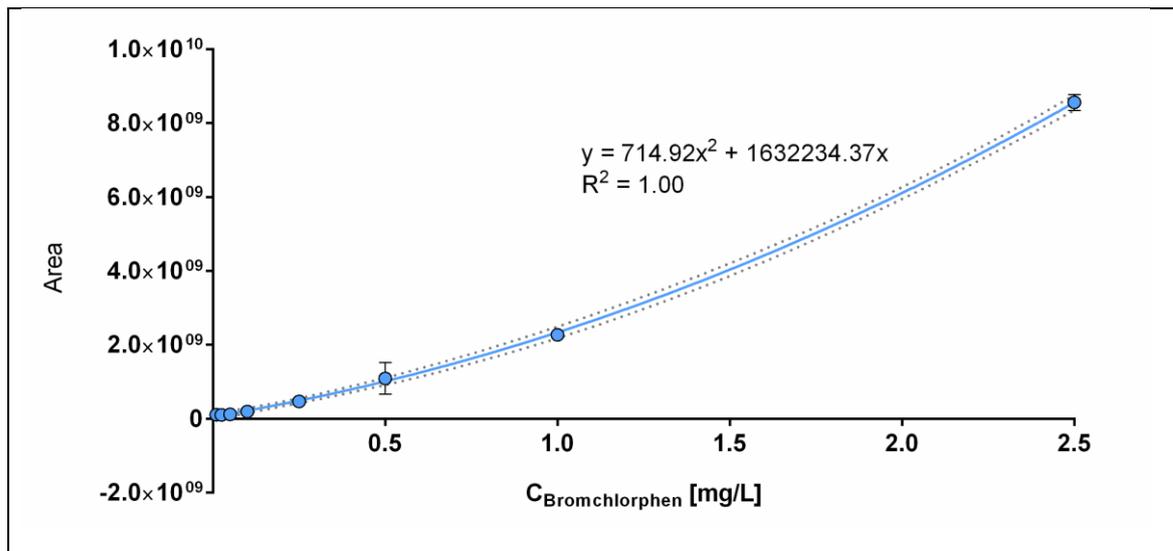


Abbildung 19: Kalibration zur Quantifizierung von Bromchlorophen mittels GC-ECD; polynomische Regression (2. Grades) aufgrund der Nichtlinearität. Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 1,00$ .

#### 4.1.2 Löslichkeitsbestimmung von Bromchlorophen

Nach Etablierung der analytischen Methoden (hier mittels LC-MS), wurde die Löslichkeit von Bromchlorophen in verschiedenen Medien bestimmt. Zur exakten Bestimmung der Löslichkeit in Wasser wurde die Säulen-Elutionsmethode nach OECD 105 etabliert (Abbildung 20). Hierzu wird die Testsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel in einem Becherglas gelöst und eine definierte Menge Glasperlen als Probenträger zugegeben. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet ist, wird die Durchflussapparatur vollständig und luftblasenfrei mit wässrigem Medium (z.B. H<sub>2</sub>O dest) gefüllt. Um ein späteres Strömen der Perlen und dadurch eventuelle Schäden an der Pumpe zu verhindern, wird ein Pfropf aus Glaswolle vor den Perlen in die Säule der Apparatur platziert. Pro Versuchsansatz werden 600 mg der belasteten Glasperlen in die Durchflussapparatur gefüllt und für zwei Stunden im Medium belassen. Anschließend wird das System mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 25 ml/h durchströmt. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten werden Proben des Mediums entnommen und mittels LC-MS Analyse die Konzentration der Prüfsubstanz in der Wasserphase bestimmt, bis sich ein Konzentrationsplateau gebildet hat, das dem Wert der max. Wasserlöslichkeit entspricht.

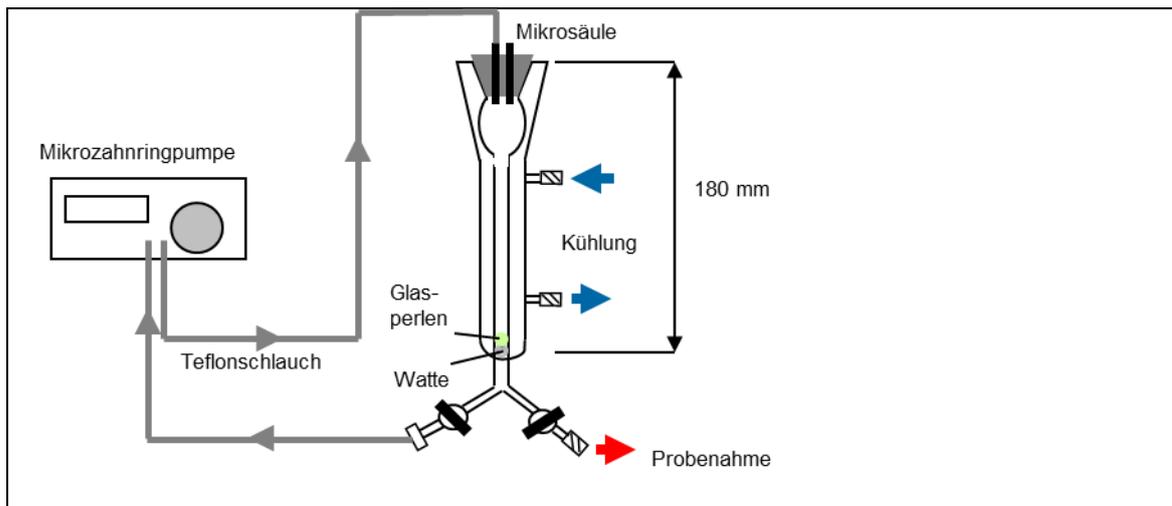


Abbildung 20: Aufbau der Säulen-Eluatiionsmethode zur Bestimmung der Löslichkeit von Bromchlorophen.

Die Methode wurde zunächst in Vorversuchen mit Fluoranthen (Referenzsubstanz empfohlen EPA (1996)) getestet. Die Bestimmung der Konzentration im Medium erfolgte mit einem Gaschromatograph mit Flammen-Ionisations-Detektor (GC-FID). Als Trägergas wurde Helium verwendet. Das Löslichkeitsmaximum wurde bei einer Konzentration von 5,2 µg/ml Hexan erreicht. Werden die Extraktions- und Einengungsschritte berücksichtigt, ergibt sich für Fluoranthen eine experimentell ermittelte Wasserlöslichkeit von 208 µg/l. Der Vergleich mit dem in der Literatur angegebenen Wert von 210 µg/l bestätigt die korrekte Etablierung der Methode.

Nachfolgend wurde die Wasserlöslichkeit von Bromchlorophen mittels der Säulen-Eluatiionsmethode ermittelt. Unter Verwendung von Hexan als Lösungsmittel wurde Bromchlorophen auf Glasperlen aufgetragen. Anschließend wurden die Glasperlen in die Durchflussapparatur gegeben und mit destilliertem Wasser (gemessener pH-Wert ~7) umspült. Die Probenahmezeitpunkte für die Konzentrationsbestimmung waren nach 16, 18, 24, 30, 36 und 48 h Durchflussdauer. Die entnommenen Proben wurden mit Hexan extrahiert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Extrakte wurden an der LC-MS vermessen.

Es wurde eine Löslichkeit von Bromchlorophen in Wasser bei 20°C von 8,4 mg/L ermittelt. Dieses Ergebnis wurde durch dreimalige Wiederholung des Versuchs verifiziert (siehe Abbildung 21).

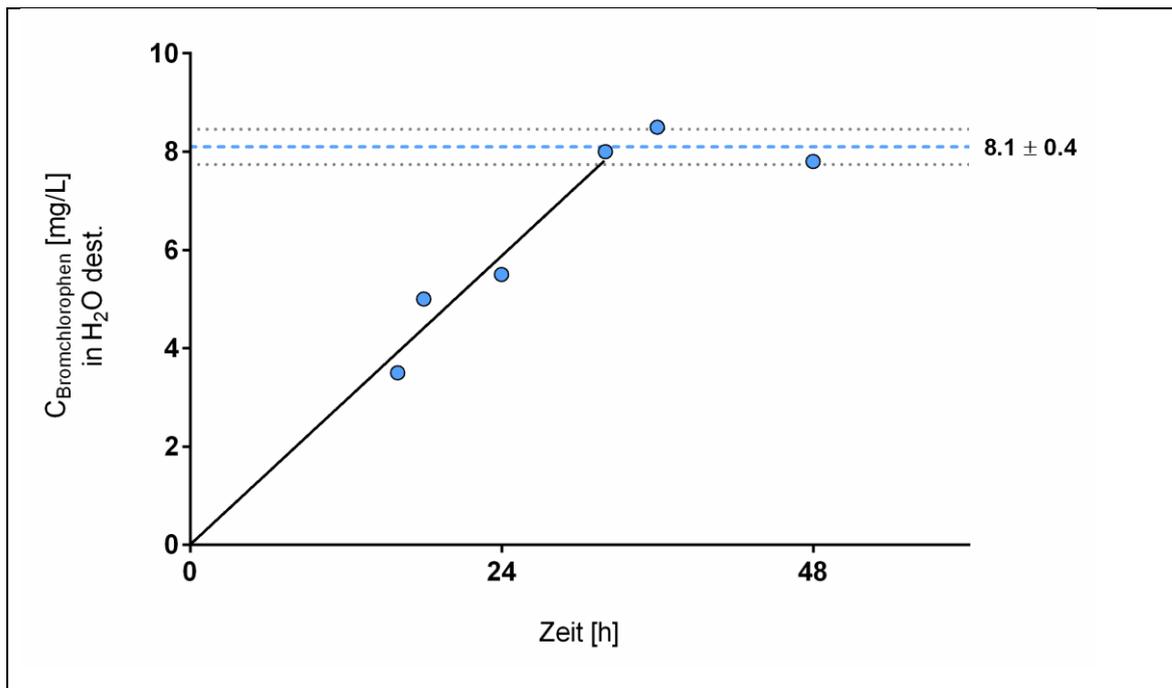


Abbildung 21: Löslichkeitsmessung von Bromchlorophen mittels Säulen-Elutionsmethode. Löslichkeit (Plateau) bei  $8,1 \pm 0,4$  mg/L.

Die Löslichkeit von Bromchlorophen in Elendt M4 Daphnienmedium, DIN Algenmedium und DIN-Wasser (für Fisch-Embryo-Toxizitätstest) wurde mittels konventionellem Passive Dosing durchgeführt. Das Prinzip der Gleichgewichtsverteilung zwischen Silikon O-Ringen und Medium führt bei maximal beladenem Silikon zur maximal löslichen Konzentration in ebendiesem Medium. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, wurden analog zur Durchführung der Ökotoxizitätstests, jeweils Tests ohne Organismen bei verschiedenen Beladungsstufen durchgeführt. Die Löslichkeit von Bromchlorophen wurde aus diesen Tests extrapoliert (berechnet aus der jeweils höchsten Beladungsstufe). Die Methode des Passive Dosing ist in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Zeitlich erfolgte dieser Schritt nach der finalisierten Methodenetablierung. Abbildung 22 zeigt die verschiedenen gemessenen Löslichkeitswerte.

- Elendt M4 Daphnienmedium  $6,0 \pm 1,7$  mg/L
- DIN Algenmedium  $6,5 \pm 7,5$  mg/L
- DIN Wasser (FET)  $20,7 \pm 4,2$  mg/L

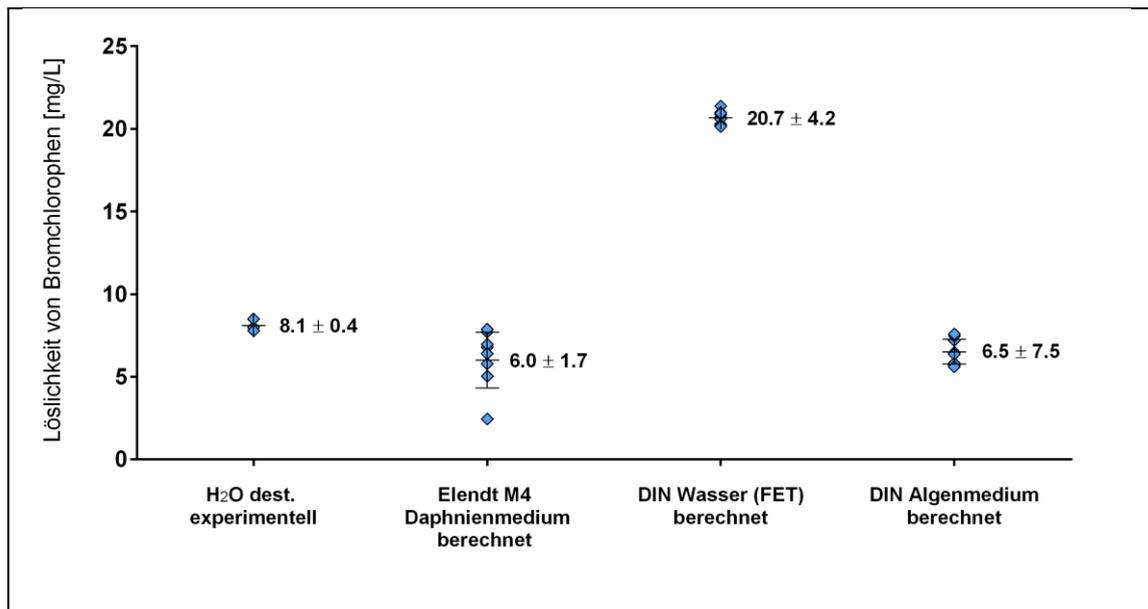


Abbildung 22: Löslichkeitswerte von Bromchlorophen in verschiedenen Medien.

## 4.2 Methodenetablierung und Ökotoxizität von Bromchlorophen (Arbeitspaket 3/4)

### 4.2.1 Etablierung des konventionellen Passive Dosing für Bromchlorophen (AP3)

Die Etablierung der Testmethoden wurde erfolgreich abgeschlossen. Die Methodik des Passive Dosing (konventionell) über Beladung von Silikon O-Ringen mittels Bromchlorophen:Methanol-Lösungen wurde analog zur Testsubstanz Dodecylbenzol durchgeführt.

### 4.2.2 Ökotoxizität von Bromchlorophen (AP4)

Zur Untersuchung der Ökotoxizität von Bromchlorophen wurde die Methodik des konventionellen Passive Dosing an verschiedene ökotoxikologische Standardtests angepasst: Durchgeführt wurden hier akute Daphnien-Immobilitätstests (OECD 202), Algenwachstumshemmtests (OECD 201) sowie Fisch-Embryo Toxizitätstests (FET; OECD 236). Zusätzlich wurde zum Vergleich von Passive Dosing und der Einbringung der Testsubstanz Bromchlorophen in einem Co-Solvent Setup akute Daphnien-Immobilitätstests mit DMSO:Bromchlorophen Lösungen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der ökotoxikologischen Ergebnisse findet sich in Tabelle 3. Die einzelnen Tests sind im Folgenden beschrieben.

Tabelle 3: Zusammenfassung der ökotoxikologischen Untersuchungen der Testsubstanz Bromchlorophen.

	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>
Daphnien-Immobilitätstest (Passive Dosing)	0,052 mg/L (48 h)	0,204 mg/L (48 h)
Daphnien-Immobilitätstest (Co-Solvent Setup)	0,133 mg/L (48 h)	0,177 mg/L (48 h)
Algenwachstumshemmtest (Passive Dosing)	0,046 mg/L (72 h)	0,084 mg/L (72 h)
Fisch-Embryo Toxizitätstest (Passive Dosing)	0,078 mg/L (48 h)	0,206 mg/L (48 h)

Außerdem wurde in allen aufgeführten Passive Dosing Tests eine vergleichende Untersuchung von frei gelöster Testsubstanz im Vergleich zur totalen Substanzkonzentration (inkl. sorbierter Substanz; in-test Analytik) aufgestellt.

Akuter Daphnien-Immobilitätstest

Es wurden insgesamt 4 valide akute Daphnien-Immobilitätstests über einen Testzeitraum von 48 h durchgeführt. Sechs der acht getesteten Beladungskonzentrationen von 25 % bis 1,56 % der maximalen Löslichkeit von Bromchlorophen in Elendt-M4 Daphnienmedium wurden in einem Blank Test quantifiziert (Abbildung 23), die Übrigen nachträglich interpoliert. Eine Dosis-Wirkungs-Analyse wurde durchgeführt mit resultierenden EC<sub>50</sub>-Werten von 0,559 mg/L nach 24 h und 0,204 mg/L nach 48 h (Abbildung 24).

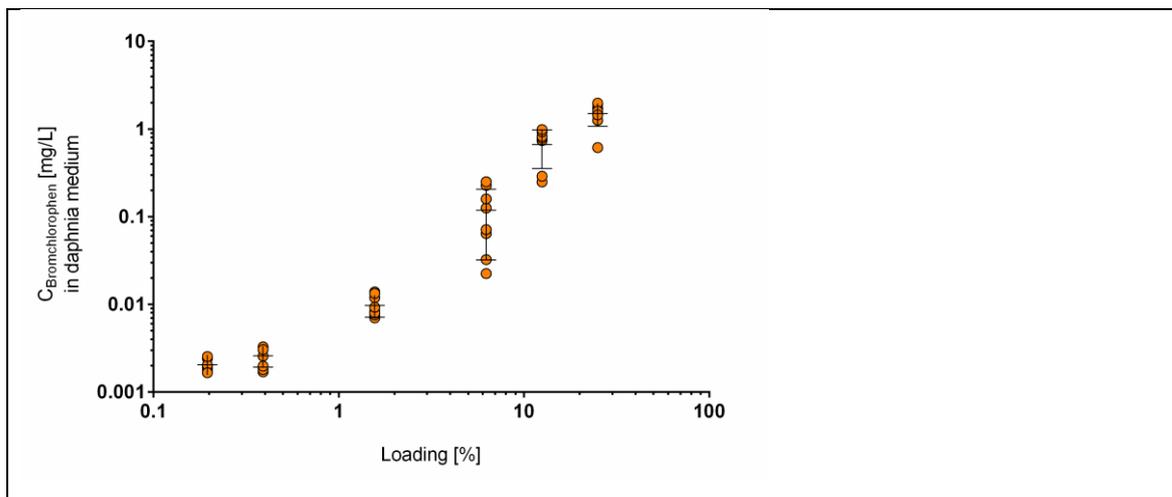


Abbildung 23: Quantifizierung der Beladungskonzentration von BCP in Elendt-M4 Daphnienmedium.

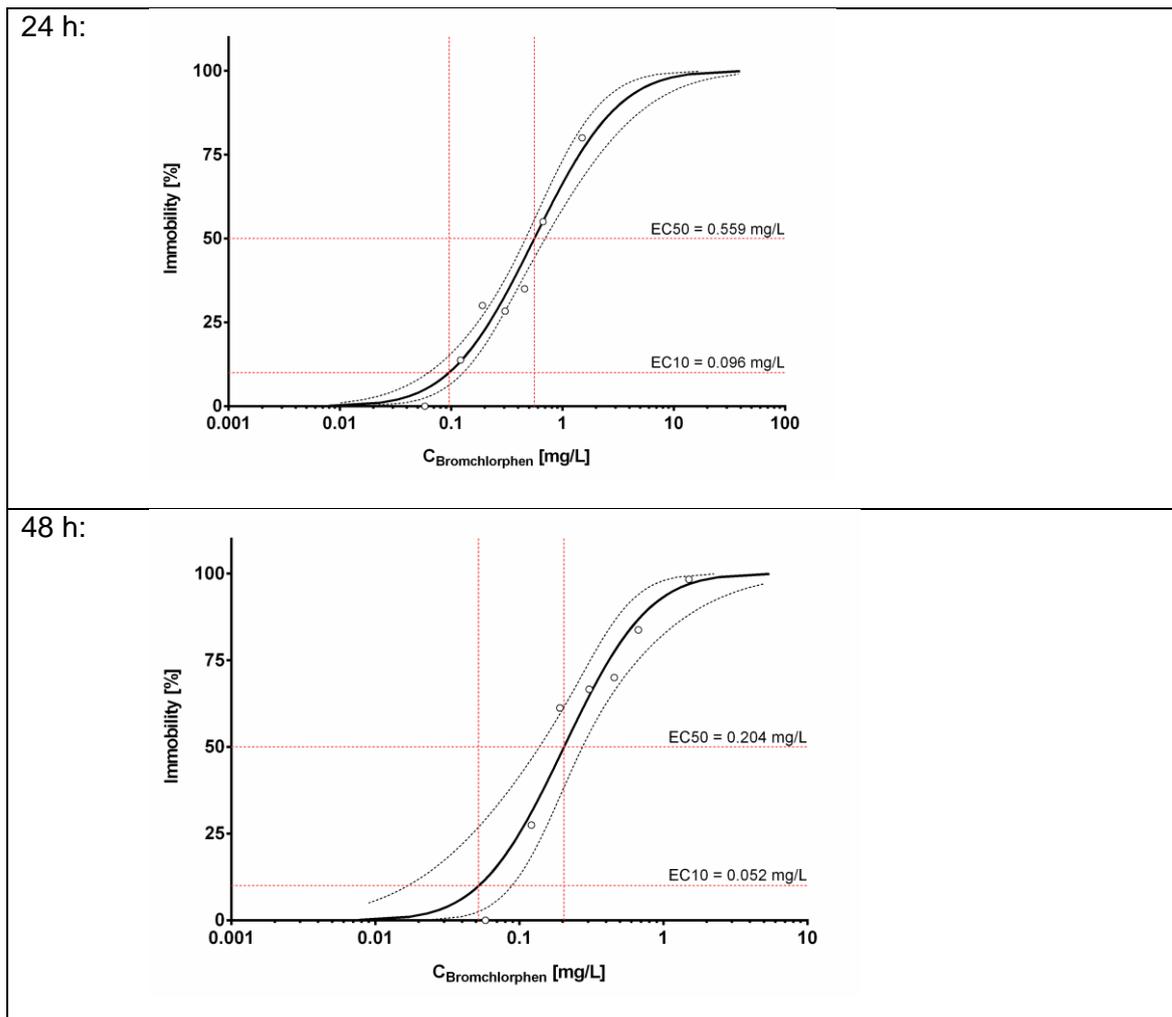


Abbildung 24: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier akuten Daphnientests (Gesamtdarstellung) nach 24 h und 48 h mit resultierenden EC<sub>10</sub> und EC<sub>50</sub> Werten.

#### Algenwachstumshemmtest

Es wurden insgesamt 4 valide Algenwachstumshemmtests über einen Testzeitraum von 72 h durchgeführt. Sechs der 12 getesteten Beladungskonzentrationen von 50 % bis 0,2 % der maximalen Löslichkeit von Bromchlorophen in DIN-Algenmedium wurden in einem Blank Test quantifiziert (Abbildung 25), die Übrigen nachträglich interpoliert. Eine Dosis-Wirkungs-Analyse wurde durchgeführt mit resultierenden EC<sub>50</sub>-Werten von 0,195 mg/L nach 24 h, 0,097 mg/L nach 48 h, 0,084 mg/L nach 72 h (Abbildung 26).

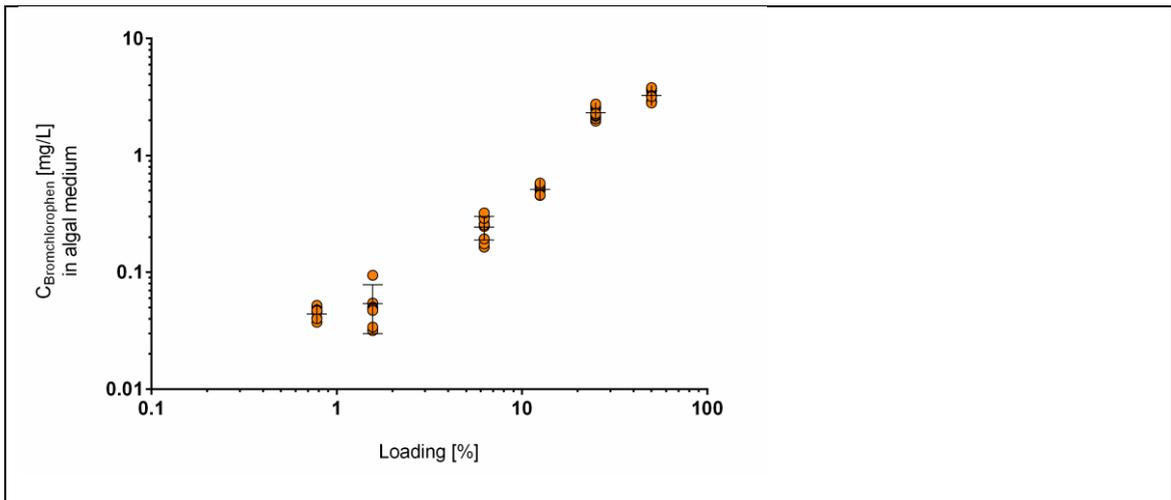


Abbildung 25: Quantifizierung der Beladungskonzentration von BCP in DIN-Algenmedium.

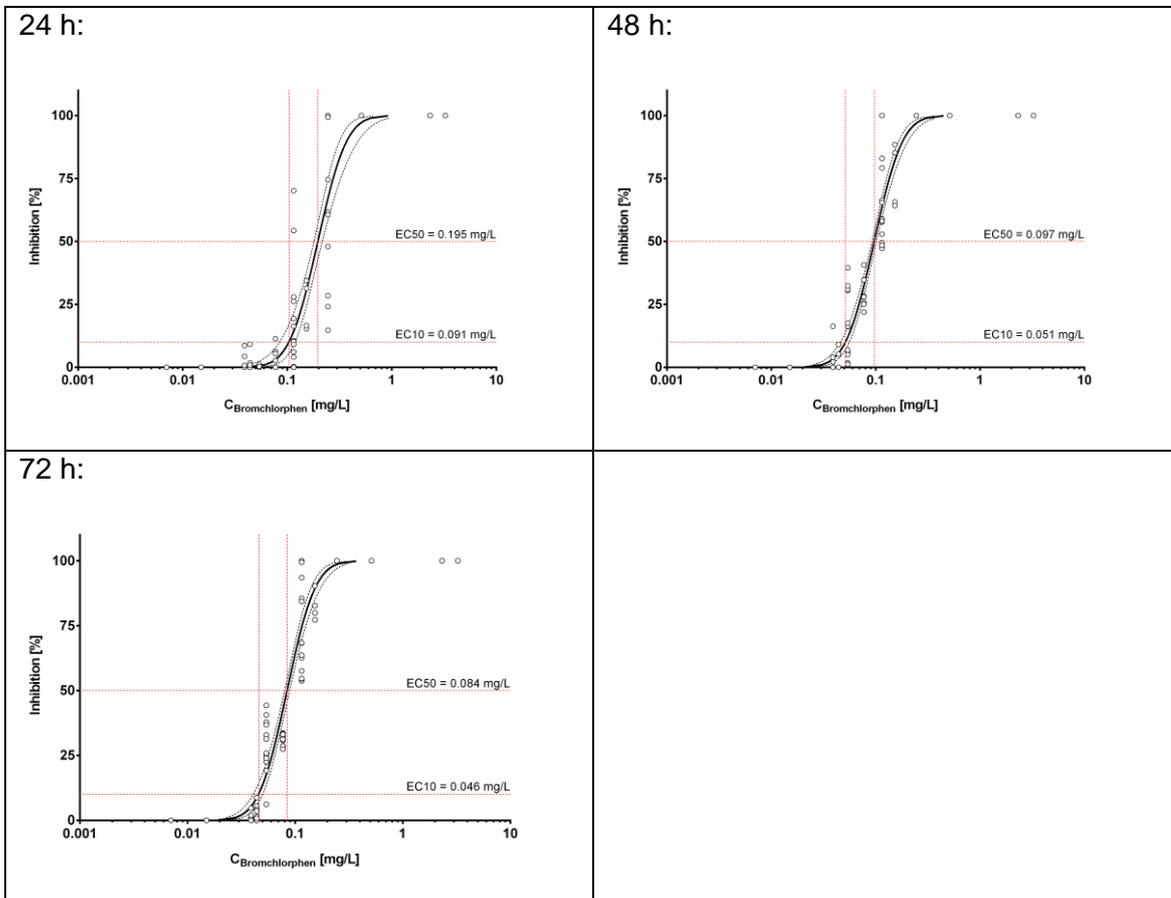


Abbildung 26: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier Algenwachstumshemmtests (Gesamtdarstellung) nach 24 h, 48 h und 72 h mit resultierenden EC<sub>10</sub> und EC<sub>50</sub> Werten.

**Fisch-Embryo Toxizitätstest (FET)**

Es wurden insgesamt 4 valide Algenwachstumshemmtests über einen Testzeitraum von 48 h durchgeführt. Sechs der acht getesteten Beladungskonzentrationen von 25 % bis 0,2 % der maximalen Löslichkeit von Bromchlorophen in DIN-Wasser wurden in einem Blank Test quantifiziert (Abbildung 27), die Übrigen nachträglich interpoliert. Eine Dosis-Wirkungs-Analyse wurde durchgeführt mit resultierenden EC<sub>50</sub>-Werten von 0,752 mg/L nach 24 h und 0,206 mg/L nach 48 h (Abbildung 28).

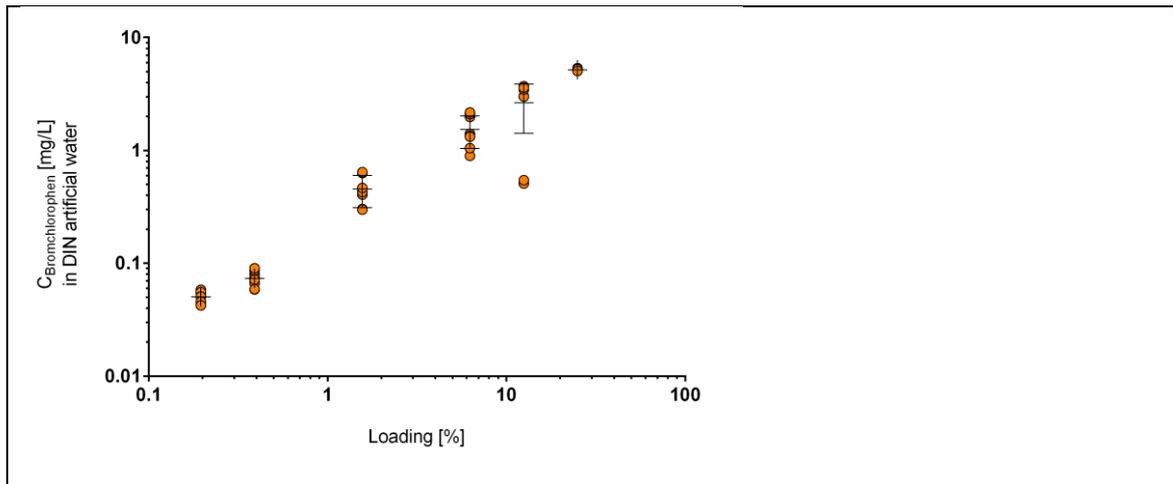


Abbildung 27: Quantifizierung der Beladungskonzentration von BCP in DIN-Wasser.

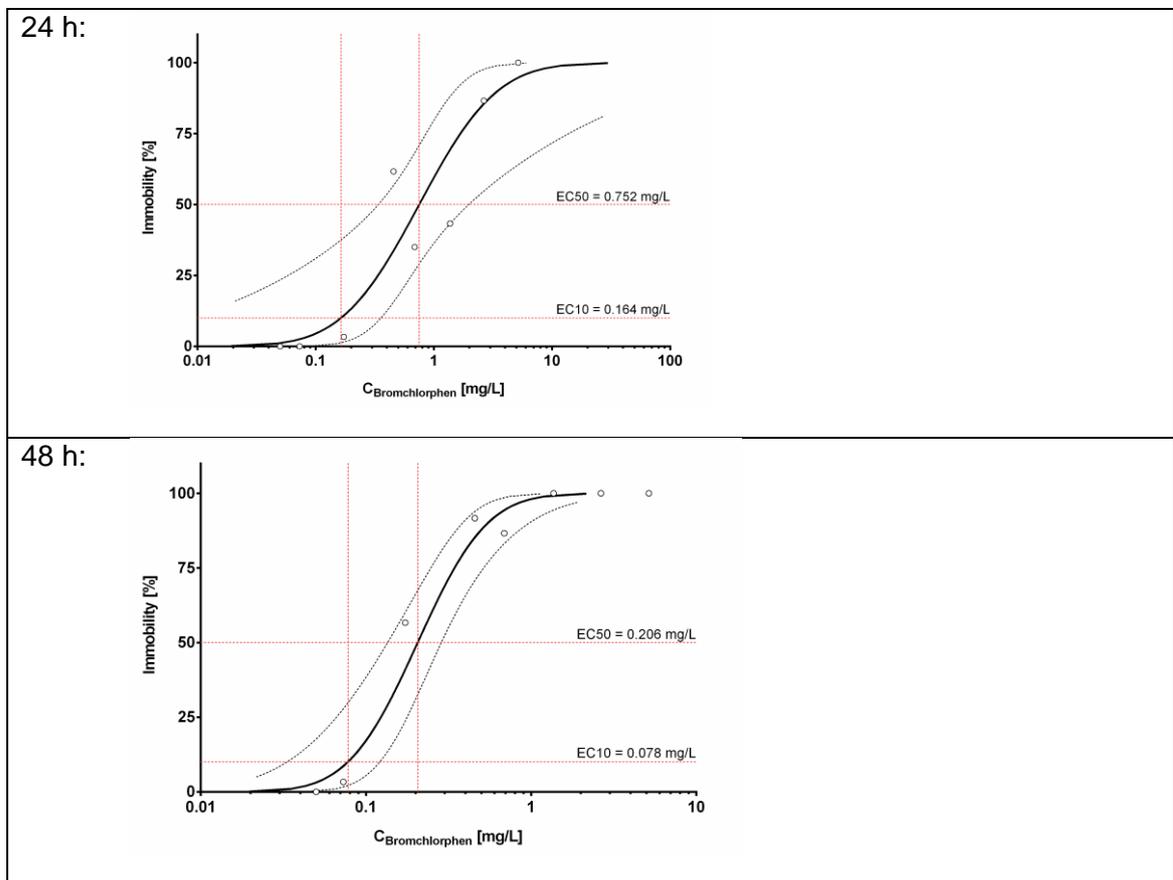


Abbildung 28: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier Fisch-Embryo Toxizitätstests (Gesamtdarstellung) nach 24 h und 48 h mit resultierenden EC<sub>10</sub> und EC<sub>50</sub> Werten.

Akuter Daphnien-Immobilitätstest im DMSO Co-Solvent Setup

Es wurden insgesamt 2 valide akute Daphnien-Immobilitätstests über einen Testzeitraum von 48 h im Co-Solvent Setup durchgeführt. Bromchlorophen wurde hier in sechs Konzentrationen von 0,05 mg/L bis 4 mg/L eingebracht, wobei die DMSO:Bromchlorophen-Lösung in einer Konzentration von 0,5 ml/L in das Testmedium aller Konzentrationsstufen eingebracht wurde. Eine Dosis-Wirkungs-Analyse wurde durchgeführt mit resultierenden EC<sub>50</sub>-Werten von 0,187 mg/L nach 24 h und 0,172 mg/L nach 48 h (Abbildung 29).

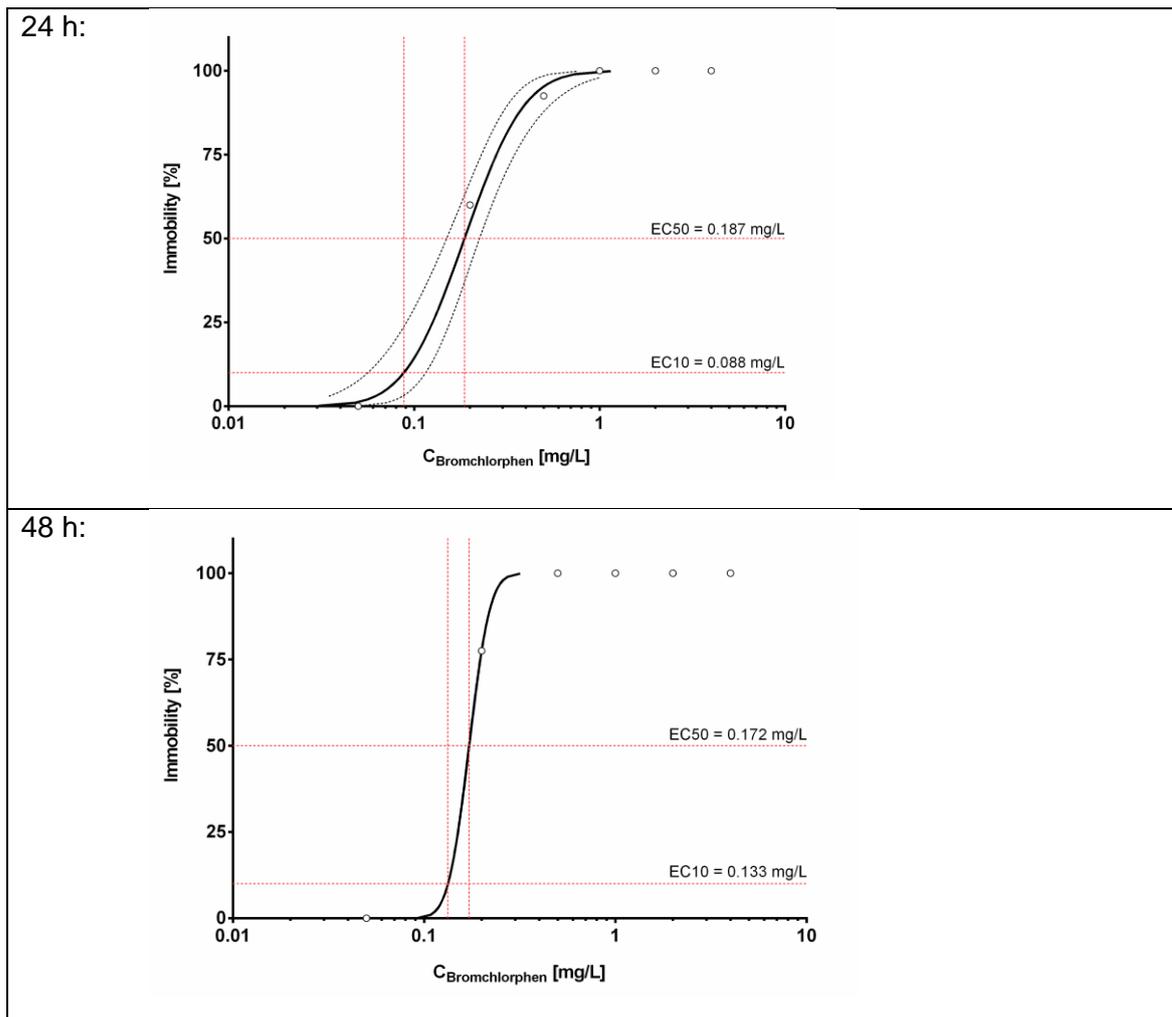


Abbildung 29: Dosis-Wirkungsbeziehung von BCP in vier akuten Daphnientests (Gesamtdarstellung) im DMSO-Co-Solvent Setup nach 24 h und 48 h mit resultierenden  $EC_{10}$  und  $EC_{50}$  Werten.

#### Vergleich von frei gelöster ( $C_{free}$ ) und totaler ( $C_{total}$ ) Bromchlorophen Konzentration

In allen durchgeführten Passive Dosing basierten Ökotoxizitätstests wurde die totale Bromchlorophen Konzentration nach Testende analytisch quantifiziert ( $C_{total}$ ). Im Falle des Algenwachstumshemmtests wurde das Medium zuvor mit inerten 20  $\mu$ m PTFE-Einmalfiltern gefiltert, um die Algen abzufiltrieren und das Medium analysieren zu können. Zusätzlich wurden die zuvor erwähnten Blank Tests analog zu den Ökotoxizitätstests durchgeführt um die frei gelöste Substanzkonzentration verschiedener Beladungen zu quantifizieren ( $C_{free}$ ). Abbildung 30 zeigt die gemeinsame Darstellung beider Messungen,  $C_{free}$  und  $C_{total}$ , aufgetragen gegen die verschiedenen Beladungsstufen. Gut erkennbar ist, dass in allen Testmedien die niedrigen Beladungskonzentrationen deutliche Unterschiede zwischen frei gelöster und totaler (z.B. auch an organisches Material sorbierter) Substanz zeigen, wohingegen höher Konzentrationen geringere Unterschiede aufweisen.

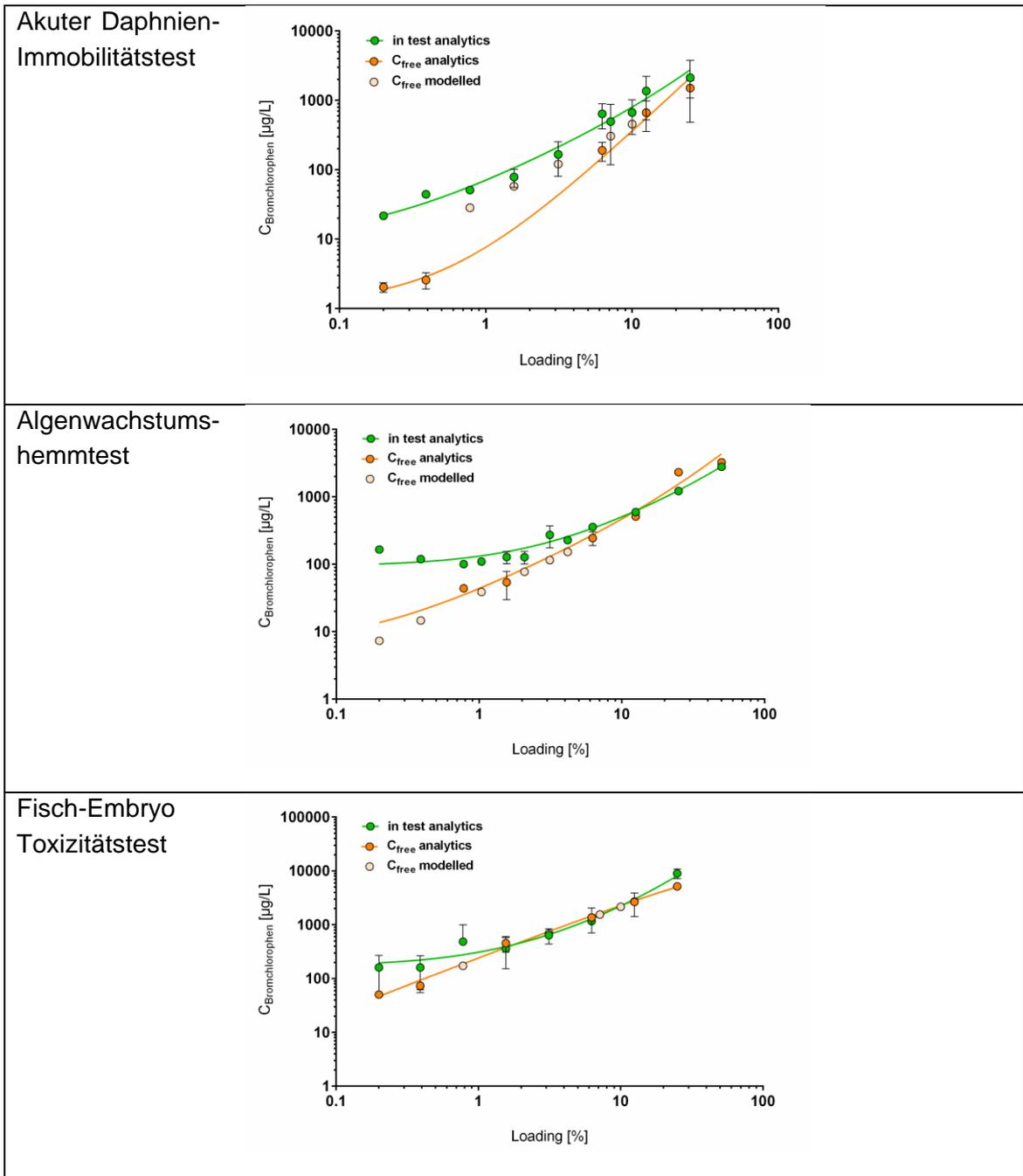


Abbildung 30: Vergleich von  $C_{\text{free}}$  und  $C_{\text{total}}$  von BCP in den Ökotoxizitätstests.

## 5. Literaturrecherche und Review-Artikel (Arbeitspaket 1)

Eine ausführliche Literaturrecherche zu den Themen schwer wasserlösliche Kosmetikinhaltsstoffe, ökotoxikologische Bewertung lipophiler Substanzen (Methoden, Probleme), Poorly Solubles Approach und Passive Dosing wurde zu Beginn des Projekts durchgeführt.

Bedingt durch eine Reihe unerwartet aufgetretener methodischer und personeller Schwierigkeiten (u.a. Wechsel des Doktoranden, Notwendige Etablierung einer neuen Substanzdosierungstechnik (Passive Dosing) für Löslichkeits- und Ökotoxizitätsuntersuchungen, etc.) während der Projektlaufzeit wurde die geplante Zeit für die Erstellung eines Review-Artikels zugunsten der notwendigen deutlich im Umfang erweiterten experimentellen Arbeiten und der Publikationen der konkreten Ergebnisse des Projekts aufgegeben. Momentan sind verschiedene Publikationen (3x) in Arbeit und sollen zeitnah veröffentlicht werden. Die Arbeitstitel der geplanten Publikationen sind:

- Aquatic toxicity testing of liquid hydrophobic chemicals – passive dosing exactly at the saturation level (Dodecylbenzene and algal toxicity)
- Comprehensive aquatic toxicity testing of a hydrophobic cosmetic ingredient - comparison of Passive Dosing and solvent spiking (Bromchlorophene)
- Ecotoxicity investigations on poorly soluble compounds – evaluation of methods and concepts (Dodecylbenzene and the Poorly Solubles Approach)

## 6. Diskussion und Schlussfolgerung

### 6.1 Dodecylbenzol

Zwei Analytikmethoden (GC-MS und GC-FID) zur reproduzierbaren Bestimmung verschiedener Dodecylbenzolkonzentrationen bis in den unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich konnten erfolgreich etabliert werden, wobei die Arbeiten aufgrund des niedrigeren Detektionslimits im weiteren Verlauf mittels GC-MS durchgeführt wurden. Generell muss jedoch deutlich angemerkt werden, dass es sich um eine Quantifizierung im analytischen Grenzbereich handelte, und dementsprechend unvermeidliche vergleichsweise große Schwankungen nicht selten auftraten.

Die Bestimmung der Löslichkeit des Dodecylbenzol als Voraussetzung der geplanten Untersuchungen zur Aussagefähigkeit des „Poorly Solubles Approach“ konnte mit hinreichender Genauigkeit erfolgreich durchgeführt werden. Insbesondere die Langzeitmessung der Löslichkeit der Substanz in verschiedenen Medien erfüllte trotz gewisser Schwankungen die Erwartungen im prognostizierten unteren  $\mu\text{g/l}$ -Bereich. Die Bestimmung der Löslichkeit über ein zweites Verfahren (Passive Dosing Limit Test) zeigte etwas höhere Löslichkeitswerte (Faktor 1,4 bis 2,4), welche aber aufgrund der Grenzbereichsanalytik vernachlässigbar erscheinen. Beide Löslichkeitsbestimmungsmethoden bestätigten eine vergleichbare Löslichkeit von Dodecylbenzol in wässrigen Medien wie sie in den Ökotoxizitätstests eingesetzt werden (Wasser, DIN Algenmedium und Elendt-M4 Daphnienmedium). Diskussionswürdig ist die experimentelle

Bestimmung der Löslichkeit mit Bezug auf den für den Poorly Solubles Approach relevanten statistischen Grenzwert  $ETNC_{\text{aqua}}$  von  $1,9 \mu\text{g/L}$ . Eine exakte Quantifizierung der Testsubstanz mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,1 \mu\text{g/L}$  ist aufgrund der gemachten Erfahrungen mit den genutzten analytischen Verfahren trotz zeitaufwendiger Optimierung als unrealistisch anzusehen. Trotz der um etwa den Faktor 3-10 über dem  $ETNC_{\text{aqua}}$  liegenden experimentell gemessenen Löslichkeitsdaten, kann deshalb nicht eindeutig von einem Ausschluss der Testsubstanz Dodecylbenzol aus dem Gültigkeitsbereich des Poorly Solubles Approach gesprochen werden. Die Werte liegen alle im Grenzbereich des  $ETNC_{\text{aqua}}$ . Zusätzlich muss hier darauf hingewiesen werden, dass der  $ETNC_{\text{aqua}}$  durch Anwendung eines Sicherheitsfaktors von 10 aus experimentellen Daten abgeleitet wurde (De Wolf et al. 2005), diesen also eine auf alle ausgewerteten Untersuchungen bezogene NOEC (No observed effect concentration) von  $19 \mu\text{g/L}$  zugrunde liegt. Nahezu alle im Projekt gemessenen Löslichkeitsdaten von Dodecylbenzol lagen deutlich unterhalb dieses Wertes.

Das technische Ziel des Projekts, die Etablierung von Methoden, welche die ökotoxikologische Testung von schwerlöslichen Verbindungen erlauben, konnte auf Basis des Passive Dosing erreicht werden. Zahlreiche Optimierungsschritte führten letztendlich zur Entwicklung zweier Passive Dosing Methoden, welche die Testung von Substanzen, sowohl unterhalb, als auch exakt an der Löslichkeitsschwelle im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich erlauben. Das konventionelle Passive Dosing auf der einen, der Passive Dosing Limit Test auf der anderen Seite, bilden zusammen ein Testsetup welches eine aussagefähige Testung solcher sehr schwer löslicher Substanzen erlaubt. Kommerziell verfügbare Silikon O-Ringe erwiesen sich als das geeignetste Material zur Durchführung des Passive Dosing. Die Adaptation mehrerer Standard-Ökotoxizitätstests an die Methoden konnte erfolgreich etabliert werden.

Die Durchführung der Ökotoxizitätstests auf Basis des konventionellen Passive Dosing, unterhalb der Löslichkeit des Dodecylbenzols und in offenen Testsystemen, zeigte keinerlei Effekte. Einzig der chronische Daphnien-Reproduktionstest (einmalig durchgeführt) zeigte leichte Effekte auf die Reproduktion der Daphnien über einen Testzeitraum von 21 Tagen. Diese Effekte wurden ausschließlich bei Konzentrationen unterhalb der Löslichkeitsgrenze von Dodecylbenzol im Elendt-M4 Daphnienmedium gemessen werden, während bei maximaler DDB-Konzentration keine signifikanten Effekte auftraten. Generell scheint es aufgrund der gemessenen starken Konzentrationsschwankungen bei höheren Konzentrationen jedoch unsicher, ob die maximale Beladung auf Basis des konventionellen Passive Dosing wirklich zum Erreichen exakt der maximalen Löslichkeit führte.

Die letztere Unwägbarkeit war auch der Hauptgrund für eine Optimierung des Passive Dosing in Form des Limit Tests, der ausschließlich auf die Testung bei exakt der maximalen Löslichkeit ausgerichtet ist. Als maximales Schwellungs-Potenzial der Silikon O-Ringe in Dodecylbenzol wurden  $14,5 \%$  (w/w) gemessen. Diese hohen Konzentrationen stellen ein mehr als ausreichendes Testsubstanz-Reservoir dar, welches das Erreichen der maximalen Löslichkeit in wässrigen Medien über einen langen Testzeitraum gewährleistet. Als zusätzliche Modifikation wurde der Passive

Dosing Limit Test prinzipiell in einem geschlossenen Testsystem durchgeführt, um einer potentiellen Verdampfung der Testsubstanz entgegenzuwirken. So zeigten sich nach Testdurchführung mit dem optimierten Testregime im Algenwachstumshemmtest und im akuten Daphnien-Immobilitätstest signifikante Effekte bei maximaler Löslichkeit von Dodecylbenzol auf die jeweiligen Endpunkte (Algenwachstums-Inhibition:  $10,8 \pm 5,1$  % (72 h) und Daphnien-Mobilität:  $56 \pm 35$  % (96 h)). Die jeweiligen frei gelösten Konzentrationen der Testsubstanz in den Testmedien, DIN-Algenmedium und Elendt-M4 Daphnienmedium, wurden analytisch auf  $11,8 \pm 5$  µg/L bzw.  $15,1 \pm 3,4$  µg/L quantifiziert. Der Fisch-Embryo Toxizitätstest zeigte auch im Limit Test keine Effekte.

Die ermittelten ökotoxikologischen Effekte von Dodecylbenzol auf Algen und Daphnien bei maximaler Löslichkeit in der Wasserphase sind weiter zu diskutieren und bieten Ansatzpunkte für nachfolgende Untersuchungen. Sowohl bei Algen als auch bei Daphnien fielen die innerhalb der Standard-Testdauer gemessenen Effekte relativ gering aus (ca. 11 % Wachstumshemmung bzw. 16 % Daphnien-Immobilität). Bei den Daphnien zeigten sich innerhalb der verlängerten Testdauer von 96 h jedoch deutlich höhere Effekte während die zugehörigen Prozesskontrollen keine Auffälligkeiten zeigten. Auffällig ist der Zusammenhang der bei Daphnien beobachteten Effekte in Abhängigkeit einerseits von der Oberflächenreinigung der Silikon O-Ringe nach Beladung sowie andererseits von der räumlichen Distanz der Tiere zum O-Ring. Es konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Mortalität ohne räumliche Trennung von Daphnien und O-Ringen größer war. Die Tiere waren somit offenbar physikalisch an die O-Ringe gebunden was auf Oberflächeneffekte hinweist. Bei räumlicher Trennung wurden diese Effekte jedoch nicht beobachtet. Alle immobilen Tiere lagen am Grund der Testgefäße. Außerdem zeigten die Blank Tests vertrauenswürdig niedrige Substanzkonzentrationen im Medium. Ob es sich bei den beobachteten Effekten um physikalische Effekte von am Test-Organismus adsorbierter Substanz handelt, auf den Daphnien sensitiv reagieren, kann nicht anhand dieses Testsetups festgestellt werden. Eine Übersättigung des Mediums über die Löslichkeit der Substanz hinaus kann aufgrund der Blank Tests jedoch ausgeschlossen werden. Die Methode des Passive Dosing Limit Tests ist noch neu und sollte weiter validiert werden, bevor eine abschließende Bewertung daraus erhaltener Daten stattfinden kann.

Die hier gemachten Überlegungen müssen zudem berücksichtigen, dass die ermittelten Konzentrationen für statistisch signifikante Effekte im Bereich der  $ETNC_{\text{aqua}}$  liegen, welche aus der statistischen Auswertung bisher vorhandener ökotoxikologischer Stoffdaten abgeleitet wurde und einen Sicherheitsfaktor (application factor) von 10 enthält (De Wolf et al. 2005). Somit kann mit diesem Ergebnis noch keine endgültige Bewertung des Poorly Solubles Approach (Tolls et al. 2009b) abgeleitet werden, zumal mit den in diesem Projekt erhobenen Daten lediglich eine Modellsubstanz abgedeckt ist und dem Poorly Soluble Approach widersprechende Effekte unterhalb von  $1,9$  µg/L ( $ETNC_{\text{aqua}}$ ) nicht gemessen wurden. Auch weist Dodecylbenzol Löslichkeiten leicht oberhalb dieses Wertes auf, und fällt somit nicht in die Grundgesamtheit der Hypothese. Jedoch erfordern die gezeigten Effekte innerhalb des 10-fachen Sicherheitsbereichs des  $ETNC_{\text{aqua}}$  noch weitere Untersuchungen, bevor zur Aussagefähigkeit des Poorly Solubles Approach ein verlässliches Urteil abgegeben werden kann.

Die Anwendung des Poorly Solubles Approach zum Ausschluss ökotoxischer Effekte bei einer maximalen Löslichkeit unterhalb des  $ETNC_{\text{aqua}}$ -Grenzwerts kann auf Basis der vorliegenden Daten zum jetzigen Zeitpunkt nicht unterstützt werden. Eine Überprüfung anhand von weiteren Modellsubstanzen unter Anwendung des Passive Dosing Limits wird als notwendig erachtet.

Durch die Optimierung und Modifizierung der ökotoxikologischen Standardmethoden auf Basis des Passive Dosing konnte ein vielversprechendes Instrument zur Ermittlung der Ökotoxizität bisher nicht nach Standardkriterien bewertbarer, umweltrelevanter Stoffgruppen (schwerlösliche Substanzen, z.B. Kosmetikinhaltsstoffe) geschaffen werden. In Anbetracht des anhand der vorliegenden Untersuchungen als notwendig erkannten hohen Aufwands hinsichtlich einer ausreichend empfindlichen Analysenmethode, der Ermittlung der maximalen Löslichkeit und der Messung der aquatischen Toxizität unter diesen Randbedingungen kann jedoch sicherlich nicht von einer künftig als Routine einsetzbaren Methodik die Rede sein. Dennoch konnte unter Anwendung dieses Sets an Untersuchungsmethoden erstmals eine aussagekräftige, experimentell basierte Bewertung der aquatischen Toxizität einer extrem schwerlöslichen Testsubstanz im Bereich ihrer maximalen Wasserlöslichkeit erhalten werden. Auf dieser Grundlage könnte bei wichtigen umweltrelevanten schwerlöslichen Stoffen eine experimentelle Prüfung ihrer aquatischen Toxizität bei maximaler Löslichkeit erfolgen. Eine umfangreichere Testung weiterer Modellsubstanzen ist damit möglich und kann zur weiteren Bewertung des Poorly Solubles Approach genutzt werden.

## 6.2 Bromchlorophen

Die Ergebnisse der Modellsubstanz Bromchlorophen haben in besonderem Maße zur Entwicklung der optimierten Methoden des Passive Dosing beigetragen und konnten zu einer umfangreichen ökotoxikologischen Untersuchung weiterentwickelt werden.

Bromchlorophen ist, obwohl industriell von zweitrangiger Bedeutung, der Vertreter einer wichtigen Gruppe von Kosmetikinhaltsstoffen, der Konservierungsstoffe. An diesem Inhaltsstoff zeigte sich, dass die Prognose der Wasserlöslichkeit auf Basis eines berechneten log Kow nicht unbedingt zutreffend ist. Vermutlich bedingt durch die Polarität der Substituenten war die real gemessene Wasserlöslichkeit um mehrere Größenordnungen höher als prognostiziert. Daher konnte diese Verbindung letztlich nicht als Modellsubstanz für sehr schwerlösliche Verbindungen benutzt werden. Da jedoch bisher zu Bromchlorophen keine ökotoxikologischen Daten zur Verfügung standen, schien eine Datengenerierung als Teil der Einarbeitung der Testmethodik sinnvoll. Besonders im Algenwachstumshemmtest ( $EC_{50} = 0,084$  mg/L) ergaben sich vergleichsweise niedrige Effekt-Konzentrationen. Die Methode des Passive Dosing konnte durch den Co-Solvent Testsetup, einem in der aktuellen Chemikalienbewertung weit verbreitetem Ansatz, im akuten Daphnien-Immobilitätstest validiert werden. Die gemessenen Effekt-Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) von 0,204 mg/L nach 48 h im Passive Dosing Test und 0,172 mg/L nach 48 h im DMSO-Co-Solvent Setup weichen nur marginal voneinander ab. Obwohl der Einsatz des Passive Dosing, aufgrund der

vergleichsweise guten Löslichkeit der Substanz und des relativ niedrigen Dampfdrucks hier keine effektiven Vorteile bringt (z.B. Kompensation von Sorption und Verdampfung), so konnte doch gezeigt werden, dass es sich um eine einfach anzuwendende, sichere Methode zur Testung schwerlöslicher Substanzen handelt.

### **6.3 Abschlussdiskussion**

Unter Einbeziehung der Daten beider Testsubstanzen Dodecylbenzol und Bromchlorophen, kann davon ausgegangen werden, dass die Methodik des Passive Dosing eine wesentlich stabilere Methode zur Testung schwerlöslicher Substanzen darstellt als Co-Solvent- oder Standardtests. Insbesondere an den Passive Dosing Limit Test angepasste Standardtests in geschlossenen Systemen sind eine vielversprechendes Instrument für die Bewertung der ökotoxikologischen Relevanz (Löslichkeit, Ökotoxizität) ausgewählter schwer löslicher Stoffe. Die Entwicklung und Anwendung geeigneter experimenteller Methoden für die Bewertung solcher Substanzen konnte somit erfolgreich abgeschlossen werden.

Die experimentellen Ergebnisse können zur Erarbeitung eines brauchbaren und ökonomischen Verfahrens zur Risikobewertung von hoch lipophilen Substanzen beitragen. Auch bietet der hier entwickelte Ansatz die Möglichkeit, Chemikalien hinsichtlich ihrer potenziellen PBT-Eigenschaften zu untersuchen und zu bewerten. Eine abschließende Bewertung des „Poorly Solubles Approach“, nach dem für narkotisch wirkende Chemikalien mit einer Wasserlöslichkeit unterhalb des  $ETNC_{\text{aqua}}$  von  $1,9 \mu\text{g/L}$  prinzipiell keine ökotoxikologischen Effekte für exponierte Wasserorganismen zu erwarten sind, kann mit den erarbeiteten Ergebnissen nicht erfolgen. Hierzu müsste die Datengrundlage mit mehr Testsubstanzen erweitert werden.

## 7. Präsentation des Projekts

Die Vorstellung des Projekts in der Zeitschrift „Environmental Science Europe“ erfolgte im August 2011. Der Artikel wurde am 08. August 2011 publiziert (Damme et al., 2011).

Weiterhin wurden Abstracts für Poster und Vorträge bei den folgenden Konferenzen eingereicht, akzeptiert und präsentiert:

- ICCE 11.-15. September 2011 in Zürich, Schweiz (Vortrag; Damme et al.).
- SETAC World Congress 20.-24. Mai 2012 in Berlin (Poster; Damme et al.).
- YES-Meeting 11.-13. Februar 2013 in Krakau, Polen (Poster; Stibany et al.).
- SETAC Europe Annual Meeting 12.-16. Mai 2013 in Glasgow, UK (Poster; Stibany et al.).
- ICCE 25.-28. Juni 2013 in Barcelona (Poster; Stibany et al.).
- SETAC Europe Annual Meeting 11.-15. Mai 2014 in Basel, Schweiz (Poster; Stibany et al.).
- Projektvorstellung 15. Juli 2014 KIST Europe, Saarbrücken (Vortrag; Stibany et al.).
- SETAC GLB/GDCh Konferenz 07.-10. September 2014 in Gießen (Poster; Stibany et al.).
- SETAC North America 09.-13. November 2014 in Vancouver, Kanada (Vortrag; Stibany et al.).
- SETAC Europe Annual Meeting 03.-07. Mai 2015 in Barcelona, Spanien (Poster; Stibany et al.).
- Projektvorstellung 10. Juni 2015 Leuphana Universität Lüneburg (Vortrag; Stibany et al.).
- ICCE 20.-24. September 2015 in Leipzig, Deutschland (Poster; Stibany et al.).

Des Weiteren sind 3 Veröffentlichungen der Ergebnisse des Projekts in Arbeit und sollen zeitnah veröffentlicht werden.

## 8. Literatur

- COURANT C, THORET-BAUCHET I AND WOODGET B. 1995. High-performance liquid chromatographic method for the determination of bromochlorophene in toothpaste. *Analytical Proceedings including Analytical Communications* 32: 111-113.
- DE WOLF W, SIEBEL-SAUER A, LECLOUX A, KOCH V, HOLT M, FEIJTEL T, COMBER M AND BOEIJE G. 2005. Mode of action and aquatic exposure threshold of no concern. *Environ Toxicol Chem* 24: 479 - 485.
- DIN. 2012. DIN EN ISO 8692: Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae (ISO 8692:2012); German version EN ISO 8692:2012. DIN - Deutsche Norm: 26.
- ECHA ECA. 2015. European Chemicals Agency (ECHA) database - [echa.europa.eu](http://echa.europa.eu). European Chemicals Agency (ECHA) database.
- EPA UEPA-U. 1996. Product Properties Test Guidelines OPPTS 830.7860 Water Solubility Generator Column Method. NEPIS: 19.
- KWON JH, WUETHRICH T, MAYER P AND ESCHER BI. 2009. Development of a dynamic delivery method for in vitro bioassays. *Chemosphere* 76: 83-90.
- LEE JN, PARK C AND WHITESIDES GM. 2003. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Analytical chemistry* 75: 6544-6554.
- MAHOMED A, HUKINS DWL AND KUKUREKA SN. 2010. Swelling of medical grade silicones in liquids and calculation of their cross-link densities. *Med Eng Phys* 32: 298-303.
- MAYER P AND HOLMSTRUP M. 2008. Passive dosing of soil invertebrates with polycyclic aromatic hydrocarbons: Limited chemical activity explains toxicity cutoff. *Environmental science & technology* 42: 7516-7521.
- MAYER P, NYHOLM N, VERBRUGGEN EMJ, HERMENS JLM AND TOLLS J. 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environ Toxicol Chem* 19: 2551-2556.
- MAYER P AND REICHENBERG F. 2006. Can highly hydrophobic organic substances cause aquatic baseline toxicity and can they contribute to mixture toxicity? *Environ Toxicol Chem* 25: 2639-2644.
- MAYER P, WERNING J, TOLLS J, DE MAAGD PGJ AND SIJM DTHM. 1999. Establishing and controlling dissolved concentrations of hydrophobic organics by partitioning from a solid phase. *Environmental science & technology* 33: 2284-2290.
- OECD. 2011. Alga, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the testing of chemicals 201: 25 pages.
- OECD. 2015. eChemportal - [www.echemportal.org](http://www.echemportal.org). OECD, eChemportal.
- RUFLI H ET AL. 1998. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile, and unstable substances and interpretation and use of data. *Ecotox Environ Safe* 39: 72-77.
- SHERBLOM PM, GSCHWEND PM AND EGANHOUSE RP. 1992. Aqueous Solubilities, Vapor-Pressures, and 1-Octanol-Water Partition-Coefficients for C9-C-14 Linear Alkylbenzenes. *J Chem Eng Data* 37: 394-399.
- SMEDES F, GEERTSMA RW, VAN DER ZANDE T AND BOOIJ K. 2009. Polymer-Water Partition Coefficients of Hydrophobic Compounds for Passive Sampling: Application of Cosolvent Models for Validation. *Environmental Science and Toxicology* 43: 7047-7054.
- SMITH KEC, DOM N, BLUST R AND MAYER P. 2010a. Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing. *Aquatic toxicology* 98: 15-24.
- SMITH KEC, OOSTINGH GJ AND MAYER P. 2010b. Passive Dosing for Producing Defined and Constant Exposure of Hydrophobic Organic Compounds during in Vitro Toxicity Tests. *Chem Res Toxicol* 23: 55-65.

- SMITH KEC, REIN A, TRAPP S, MAYER P AND KARLSON UG. 2012. Dynamic Passive Dosing for Studying the Biotransformation of Hydrophobic Organic Chemicals: Microbial Degradation as an Example. *Environmental science & technology* 46: 4852-4860.
- TOLLS J, BERGER H, KLENK A, MEYBERG M, MULLER R, RETTINGER K AND STEBER J. 2009a. Environmental Safety Aspects of Personal Care Products a European Perspective. *Environ Toxicol Chem* 28: 2485-2489.
- TOLLS J, MÜLLER M, WILLING A AND STEBER J. 2009b. A New Concept for the Environmental Risk Assessment of Poorly Water Soluble Compounds and Its Application to Consumer Products. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5: 374–378.
- ULLMANN F, GERHARTZ W, YAMAMOTO YS, CAMPBELL FT, PFEFFERKORN R AND ROUNSAVILLE JF 1995. Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry. VCH.
- VAN DER HEIJDEN SA, HERMENS JL, SINNIGE TL, MAYER P, GILBERT D AND JONKER MT. 2015. Determining high-quality critical body residues for multiple species and chemicals by applying improved experimental design and data interpretation concepts. *Environmental science & technology* 49: 1879-1887.
- WCMUC WCMUC-. 1994. Standard Procedure for MICROTOX Analysis.

## 9. Anhang

### 9.1 *Bestimmung der Löslichkeit von Dodecylbenzol in Methanol*

Da Methanol in allen konventionellen Passive Dosing Testsystemen zum Beladen der festen Phase genutzt wurde, wurde zunächst die Löslichkeit von Dodecylbenzol in Methanol bestimmt. Hierzu wurde schrittweise Dodecylbenzol unter Rühren zu 1 L Methanol bis zum Erreichen der Sättigung (Emulsionsbildung, Ausfallen des Dodecylbenzols) hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Lösung bis zur eintretenden Phasentrennung stehen gelassen und der Überstand mehrfach beprobt und analysiert. Die Löslichkeit von Dodecylbenzol in Methanol wurde somit experimentell bestimmt und liegt bei 29,7 g/L. Die Stammlösung zur Beladung der feste Phase (Passive Dosing) wurde anhand dieses Wertes standardmäßig „übersättigt“ mit mind. 35 g Dodecylbenzol/L hergestellt.

### 9.2 *Etablierung des Passive Dosing mittels PDMS-Schichten (Dodecylbenzol)*

Zur Etablierung des Passive Dosing wurden zunächst verschiedene Tests mit gegossenen PDMS-Schichten durchgeführt. In den durchgeführten Tests wurden entweder 100 ml Schottflaschen mit Teflon-Verschluss und 4 g Silikonschicht (PDMS;  $\pm 1$  %) für entsprechend 80 ml Medium oder 40 ml Glasvials mit Teflon-Verschluss und 1 g Silikonschicht (PDMS;  $\pm 1$  %) für entsprechend 20 ml Medium verwendet.

Der Löslichkeit des Dodecylbenzols in Methanol entsprechend wurde zum Ansetzen der Tests eine übersättigte Dodecylbenzol-Methanol Lösung hergestellt. Die Beladung

der PDMS-Schicht der Testgefäße erfolgte hier immer nach der gleichen Vorgehensweise. Aus der Stammlösung wurden unter Rühren definierte Mengen entnommen und in die gereinigten Testgefäße überführt. Zum Erreichen der maximalen Löslichkeit wurden die entsprechenden Gefäße ausschließlich mit Stammlösung beladen, für niedrigere Konzentrationen wurde die Stammlösung entsprechend mit reinem Methanol verdünnt (z.B. 1:1, 1:2, 1:4). Die Beladungszeit, also die Zeit die die Stammlösung im Testgefäß verbleibt, betrug immer exakt 72 Stunden. Nach Ablauf der Beladungszeit wurden die Gefäße mit Methanol und/oder Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen, um verbliebene Testsubstanz zu entfernen. Außerdem wurden die Gefäße „mechanisch“ mit Präzisionswischtüchern („lint-free cloth“) gereinigt. Diese Waschvorgänge haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Konzentrationseinstellung während des Passive Dosing (s.u.). Aus diesem Grund wurden die zum Waschen verwendeten Lösungsmittel, die Verwendung von Präzisionswischtüchern, die Anzahl und die Dauer der Waschvorgänge während der Methodenetablierung variiert und detailliert untersucht.

Nach Beendigung der unterschiedlichen Waschschritte wurden die Testgefäße mit Testmedium befüllt. Nachfolgend wurde vor dem eigentlichen Testbeginn bei allen Versuchen eine Äquilibrierungszeit von exakt 24 Stunden eingehalten. Zeitpunkt 0 h (später der Zeitpunkt des Einsetzens der Tiere) ist also exakt 24 h nach Befüllung der beladenen Testgefäße mit dem entsprechenden Medium.

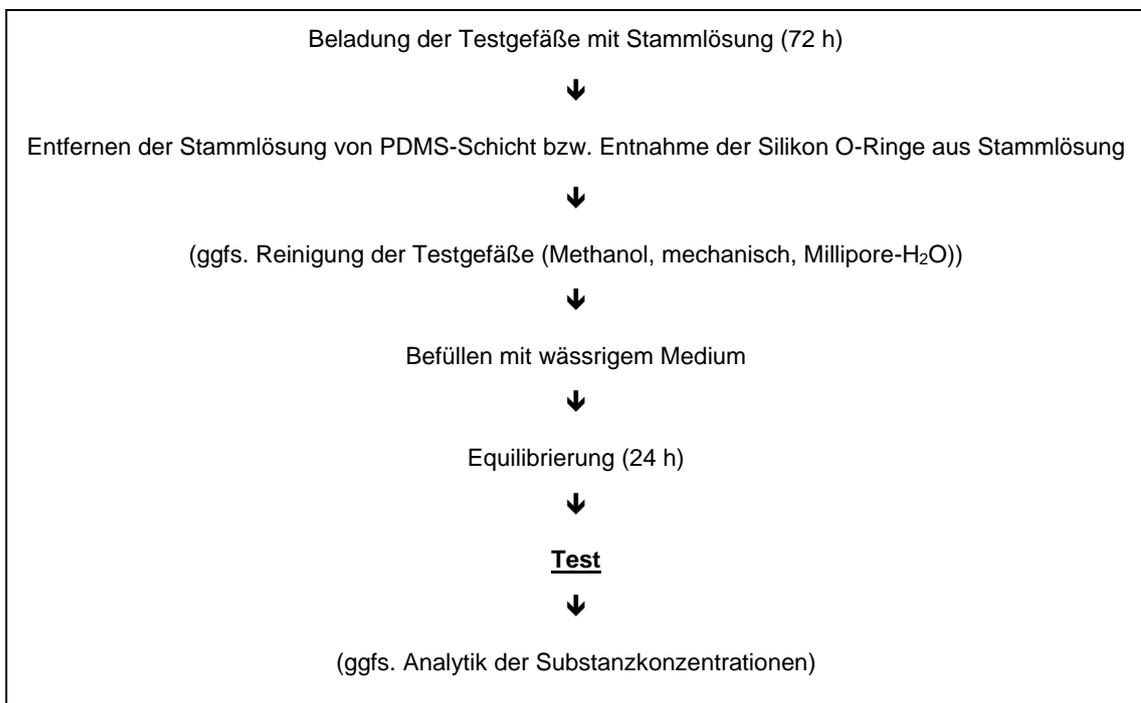


Abbildung A1: Schematischer Ablauf der Passive Dosing Methodik wie sie in allen Löslichkeitstests- und Ökotoxizitätstests angewendet wurde.

In Abbildung A2, A3 und A4 sind sowohl Testergebnisse der ersten Passive Dosing Tests mit gegossenen PDMS-Schichten, als auch Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Spül- und Reinigungsschritte dargestellt. Hinsichtlich der im nächsten Schritt vorgesehenen Ökotoxizitätstests wurde versucht, die Methodik des Passive

Dosing so anzupassen, dass eine genaue Einstellung der maximalen Löslichkeit von Dodecylbenzol und entsprechenden Verdünnungsstufen in verschiedenen Medien möglich ist.

Die Herstellung der PDMS-Schicht und die Beladung dieser Schicht vor den jeweiligen Tests wurden immer auf die gleiche Weise durchgeführt. Diese Methodik ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Mayer et al. 1999). Aufgrund der auftretenden starken Schwankungen in den mittels Passive Dosing eingestellten Dodecylbenzolkonzentrationen, wurde versucht durch unterschiedliche Nachbehandlung der Testgefäße nach der Beladung die Methodik zu optimieren. Variierte Parameter waren hier die Reinigung mit Methanol, die Reinigung mit Millipore-H<sub>2</sub>O, und die mechanische Reinigung mit Präzisionswischtüchern.

Um sicherzustellen, dass das Dodecylbenzol zu Beginn des Tests ausschließlich in der PDMS Schicht vorliegt, sollten die Testgefäße nach der Beladung mit Stammlösung zunächst mit Methanol gereinigt werden. Durch die gute Löslichkeit der Substanz in Methanol sollten durch mehrfaches Spülen die an Glas- und Teflonoberflächen verbliebenen Rückstände entfernt werden. In den ersten hier dargestellten Tests (Abbildung A2 und A3) wurden die Testgefäße nach der Beladung jeweils 6x für 10 Sekunden mit je 10 ml Methanol gespült. Zur vollständigen Bilanzierung der Beladung und der mit dem Methanol entfernten Substanz wurde die Stammlösung vor der Beladung und nach der Beladung sowie jeder Spülvorgang separat beprobt und mittels GC-FID analysiert. Nachfolgend wurde hier nicht mechanisch gereinigt, sondern lediglich 2x 2 Stunden + 1x 1 Stunde mit Millipore-H<sub>2</sub>O gespült (ohne Schütteln der Testgefäße). Die Tests wurden über 2 Testzeiträume (44 + 120 h) mit je 3 Konzentrationsstufen (gesättigt, ½-gesättigt, ¼-gesättigt) und 3 Replikaten pro Konzentrationsstufe durchgeführt. Neben der Bilanzierung der Beladung und der Reinigungsschritte sollte hier der Vergleich der unterschiedlichen Testzeiträume Aufschluss über die notwendige Testdauer zum Erreichen der Sättigung des Wassers mit Dodecylbenzol geben.

In den Tests (Abbildung A2) schwanken die Werte bei 44-stündiger Versuchszeit zwischen 108,4 und 179,3 µg/L bei maximaler Beladung. Die gemessenen Werte ½-gesättigter Beladung liegen im gleichen Bereich und schwanken zwischen 111,6 und 213,7 µg/L. Die Werte bei ¼-gesättigter Beladung führen zu Konzentrationen um 80 µg/L. Nach 120-stündiger Versuchszeit liegen die Werte maximaler Beladung bei 63,6 bis 83,1 µg/L, bei ½-gesättigter Beladung deutlich höher bei 89,0 bis 195,8 µg/L. Es sind also deutliche Schwankungen der Messwerte zu erkennen, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchszeiträumen und den verschiedenen Konzentrationen. Ersteres kann als erfolgreiche Gleichgewichtseinstellung über die gesamte Versuchszeit gedeutet werden. Zweiteres zeigte jedoch, dass eine Konzentrationseinstellung so nicht möglich ist.

Die Bilanzierung der absoluten, im einzelnen Replikat vorliegenden Dodecylbenzolmenge (Abbildung A3) zeigt vor allem das Folgende: je höher die Konzentration der Beladung ist, d.h. je größer die Menge Dodecylbenzol, die im Silikon vorliegt ist, desto mehr Dodecylbenzol scheint mit jedem Methanol-Spülvorgang

ausgewaschen zu werden. Da in den einzelnen Testgefäßen teilweise Substanzmengen im zweistelligen mg-Bereich ausgewaschen werden, ist davon auszugehen, dass es sich nicht nur um auf Glas- und Teflonoberflächen vorliegendes Material handelt, sondern auch um aus der Silikonschicht ausgewaschene Substanz. Die Auswaschung der Substanz aus dem Testsystem könnte zu der Angleichung der Dodecylbenzolkonzentrationen zwischen den verschiedenen Konzentrationsstufen geführt haben.

Die Schwankungen der absoluten Menge Dodecylbenzol in den einzelnen Replikaten, insbesondere bei maximaler Beladung, kann darauf zurückzuführen sein, dass die Beprobung vor der Beladung (in Abbildung A3 = blauer Balken) in übersättigter Dodecylbenzol-Methanol-Lösung durchgeführt wurde. Diese wurde zwar kontinuierlich gerührt, durch ausfallende Substanz während der Probenahme kann es aber durchaus zu Schwankungen gekommen sein. Da die absolute Menge Dodecylbenzol in der Silikonschicht aus der Differenz der Messungen vor der Beladung und nach der Beladung berechnet wurde, pflanzen sich diese Schwankungen fort. Die Tendenz einer erhöhten „Auswaschung“ bei höheren Konzentrationen ist aber dennoch deutlich erkennbar. Diese Auswaschung bedeutet auch, dass eine Bestimmung der maximalen Löslichkeit des Dodecylbenzols mittels der Methodik des Passive Dosing nicht oder nur grob näherungsweise durchgeführt werden kann, wenn nach dem Beladungsvorgang mit Methanol oder anderen Dodecylbenzol-lösenden Substanzen gespült wird. Wie zuvor beschrieben, kann die maximale Löslichkeit der Substanz im Medium nur bei maximal beladenem Silikon eingestellt werden. Wird zuvor Substanz aus dem Silikon ausgewaschen, sinkt auch die resultierende Konzentration im Medium.

Die Angleichung der Konzentrationen zueinander durch Auswaschung bei Spülvorgängen mit Methanol ist problematisch, erklärt allerdings nicht die stark erhöhte gemessenen Löslichkeitswerte des Dodecylbenzol von bis zu 213,7 µg/l im Vergleich zu den erwarteten und im konventionellen Löslichkeitsversuch gemessenen Löslichkeitswerten im einstelligen µg/l-Bereich. Hier lag die Vermutung nahe, dass geringe Mengen Methanol, sei es aus der Beladungslösung oder den Spüllösungen, auch nach den folgenden Millipore-H<sub>2</sub>O Spülvorgängen im System verbleiben und aufgrund der Lösungsvermittlung zu erhöhten Konzentrationen von Dodecylbenzol im Medium führen.

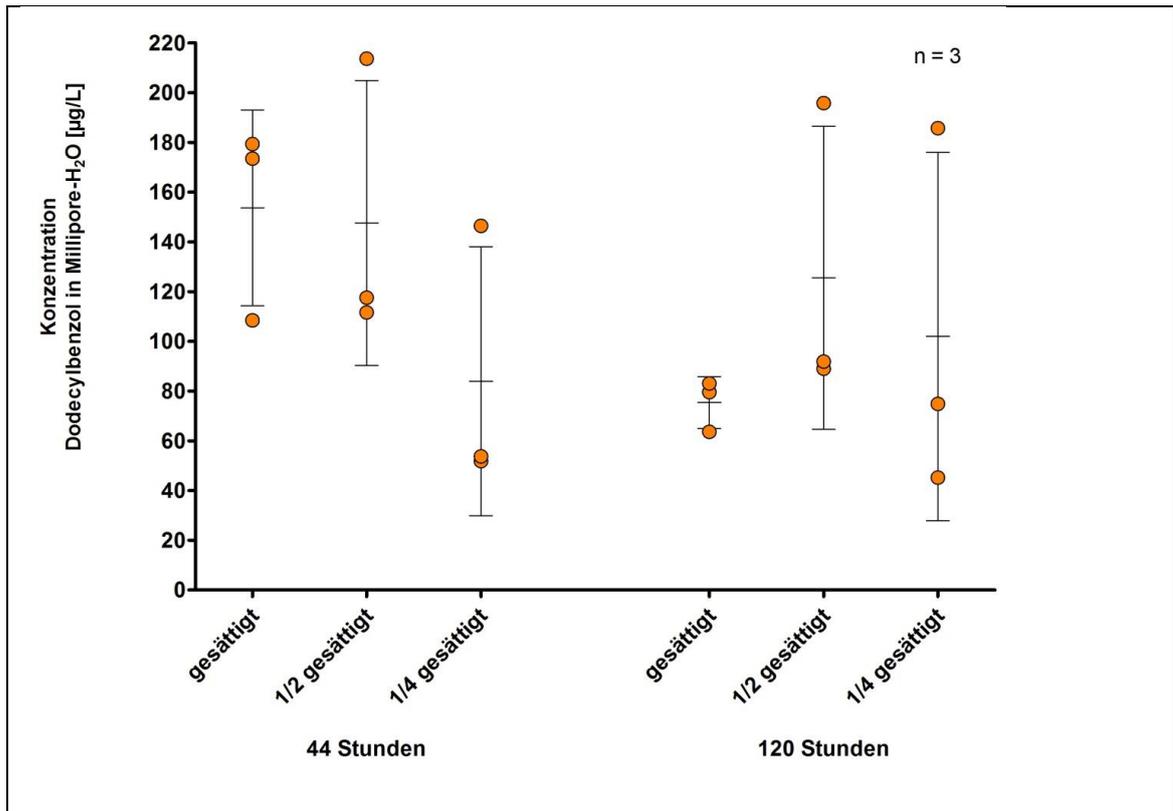


Abbildung A2: Messung der Dodecylbenzolkonzentration in H<sub>2</sub>O dest. nach konventionellem Passive Dosing im Medium (Mittelwert und Standardabweichung) nach 44 bzw. 120 Stunden mit je 3 verschiedenen Beladungen.

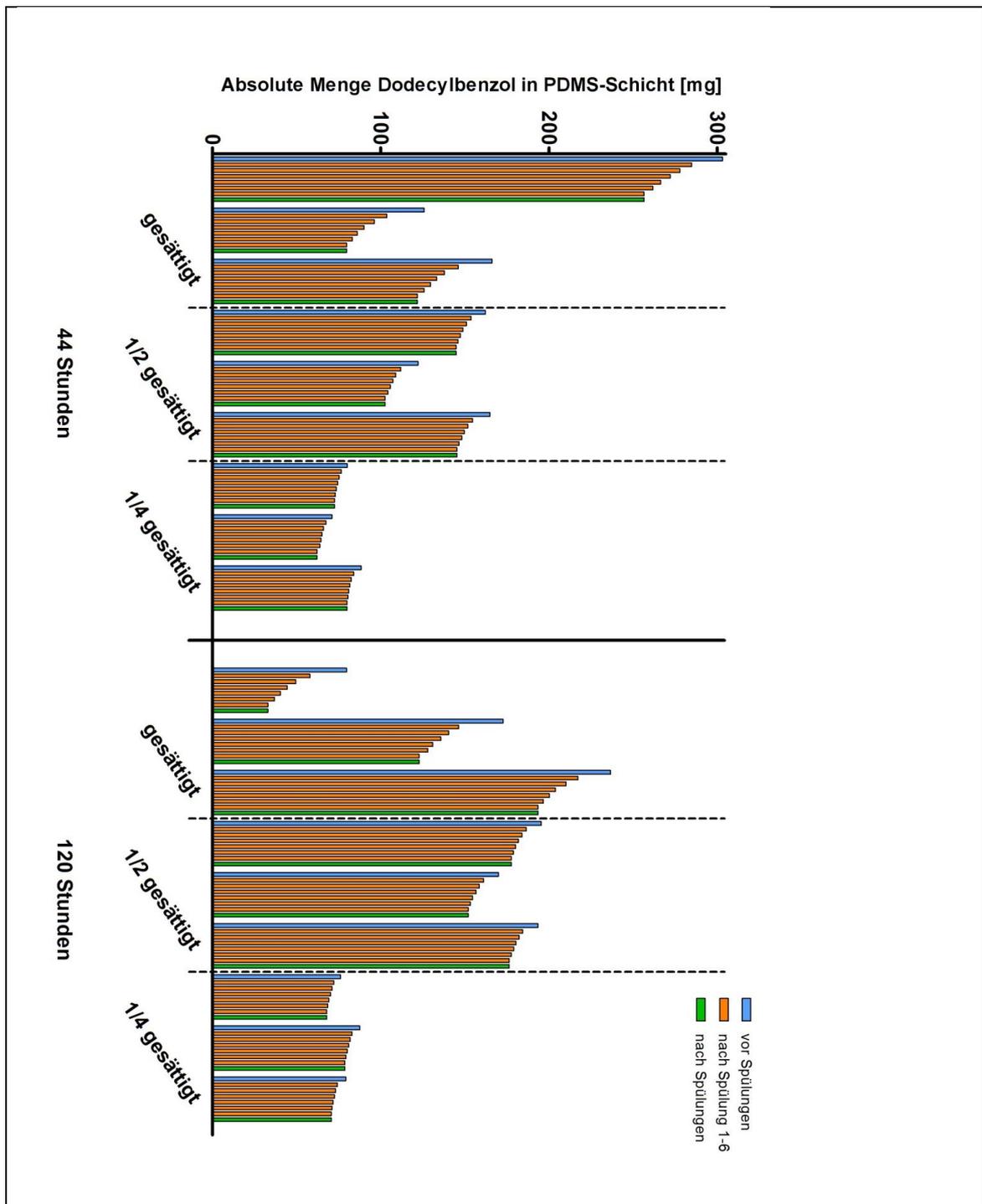


Abbildung A3: Messung der Dodecylbenzolkonzentration in H<sub>2</sub>O dest. nach konventionellem Passive Dosing. Absolute Dodecylbenzolkonzentration in Silikon-Schicht nach Beladung (blau) sowie nach je 6 Methanol-Spülvorgängen (orange/grün). Testzeitraum 44 und 120 Stunden und je 3 verschiedenen Beladungen.

Zur Überprüfung der Hypothese des Einflusses von Methanol auf die Substanzkonzentrationen wurden weitere Tests mit unterschiedlicher Nachbehandlung durchgeführt (Spül- und Reinigungsvorgänge), wobei aufgrund der zuvor beschriebenen Vermutung größtenteils auf Methanol-Spülungen verzichtet wurde (Abbildung A4).

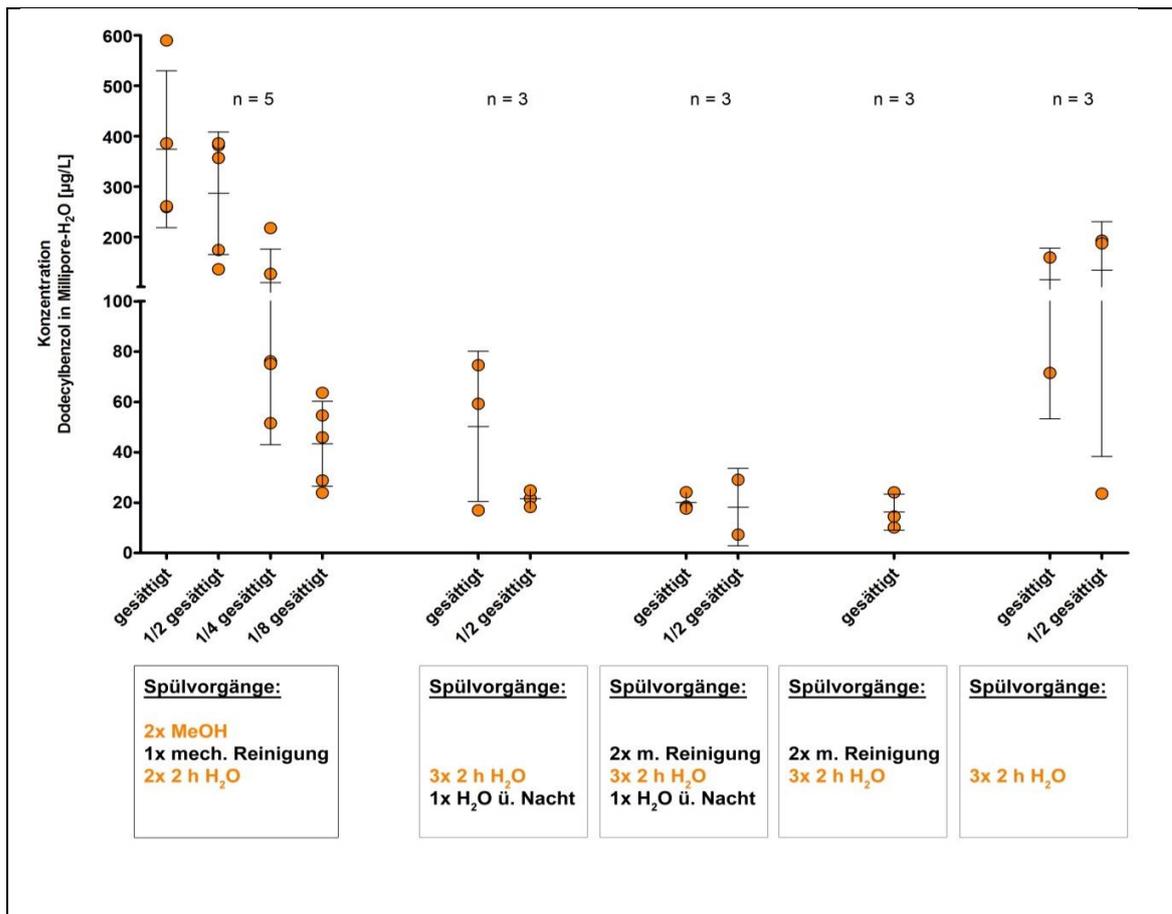


Abbildung A4: Messung der Dodecylbenzolkonzentration in H<sub>2</sub>O dest.. Mehrere Tests mit konventionellem Passive Dosing von je 48 h. Spülvorgänge der jeweiligen Tests im Vergleich.

Alle Tests liefen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Der erste Test dieser Reihe wurde noch mit Methanol gespült (2x), alle übrigen Tests wurden nach Entfernung der Beladungslösung ausschließlich und exakt 3x 2 Stunden bei 170 rpm schüttelnd auf dem Horizontalschüttler mit Millipore-H<sub>2</sub>O gespült. Zwei Tests wurden zusätzlich ein weiteres Mal über Nacht (ca. 16 Stunden) geschüttelt/gespült. Zusätzlich wurde nach Entfernung der Beladungslösung in einigen Tests je 2x mit Präzisionswischtüchern ausgewischt (mechanische Reinigung).

Der direkte Vergleich der Tests (Abbildung A4) zeigt deutlich, dass der Einsatz von Methanol zum Reinigen der Testgefäße zu deutlich höheren Messwerten führt, als der Einsatz von ausschließlich Millipore-H<sub>2</sub>O. Die in der Originalliteratur beschriebene mechanische Reinigung der Testgefäße mit Präzisionswischtüchern nach der Beladung scheint demnach ebenso wichtig wie die exakte und lange Millipore-H<sub>2</sub>O-Spülung (schüttelnd) um reproduzierbar niedrige Konzentrationen von Dodecylbenzol in der Wasserphase einzustellen. Da die Testgefäße nach der Beladung nicht mit Methanol gespült wurden, ist außerdem davon auszugehen, dass die Auswaschung von im Silikon vorliegendem Dodecylbenzol sehr gering ist, die resultierenden Löslichkeitsmesswerte also theoretisch nah an der realen maximalen Löslichkeit im Wasser liegen; außerdem liegt zum Zeitpunkt des Testbeginns nur noch wenig Methanol im System vor, welches die Messwerte beeinflussen könnte. Dennoch ist fest

zu halten, dass die im optimierten Passive Dosing-Verfahren erhaltenen Löslichkeitswerte noch immer deutlich über der mit der konventionellen Methode ermittelten Löslichkeit von Dodecylbenzol lagen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte in den folgenden Tests völlig auf die Verwendung von Methanol oder anderen Lösungsmitteln zur Reinigung der Testgefäße nach der Beladung verzichtet werden. Das folgende optimierte Schema wurde in den folgenden Passive Dosing Tests, auch der ökotoxikologischen Tests, zur Reinigung der Testgefäße verwendet:

- Entfernung der Beladungslösung
- Mechanische Reinigung (2x)
- 4x 2h Spülen mit Millipore-H<sub>2</sub>O schüttelnd bei 170 rpm
- Über Nacht Spülen mit Millipore-H<sub>2</sub>O schüttelnd bei 170 rpm

Hinsichtlich der nachfolgenden Ökotoxizitätstests wurde nach diesem Schema die Löslichkeit von Dodecylbenzol in Elendt-M4 Daphnienmedium getestet (Abbildung 8). Die Werte liegen im unteren µg/L-Bereich, jedoch wie schon zuvor höher und mit größeren Schwankungen als bei den Löslichkeitstests ohne Passive Dosing (Kapitel 2.1.2). Auch gestaltete sich die Einstellung der Konzentrationsstufen weiterhin als schwierig; der Mittelwert aller Verdünnungsstufen lag hier im Bereich von 20 µg/L.

Fazit: Aufgrund der stark erhöhten Konzentration der Testsubstanz im Medium im Vergleich zu den konventionellen Löslichkeitstests, der schwierigen Analytik aufgrund sehr starker Schwankungen, und dem unklaren Einfluss der verschiedenen Reinigungsschritte, wurde der Fokus auf das Passive Dosing mit industriell hergestellten Silikon O-Ringen gelegt. Vortests zeigten hier eine wesentlich einfachere Handhabung und eine vertrauenswürdige Quantifizierbarkeit der Testsubstanz.

### **9.3 Ökotoxizität von Dodecylbenzol über Passive Dosing mit PDMS-Schichten**

#### Akuter Daphnien-Immobilitätstest

Die ersten durchgeführten Tests zur akuten Daphnientoxizität sollten als erster Versuch gelten, die Methodik des Passive Dosing experimentell zu überprüfen. Alle Tests wurden zunächst noch mit der Methode der gegossenen PDMS-Schichten durchgeführt. Akute Daphnientests wurden basierend auf der OECD Guideline 202 an die Methodik des Passive Dosing adaptiert. Die Tests wurden in Testgefäßen mit 20 ml Elendt-M4 Daphnienmedium durchgeführt. Es wurden jeweils 5 Kontrollreplikate und 4 Replikate pro Konzentrationsstufe eingesetzt. Nach Ablauf der Äquibrierungszeit wurden pro Testgefäß 5 neonate Daphnien eingesetzt und nach jeweils 24 und 48 Stunden ausgewertet. Ein zusätzliches Replikat pro Konzentration und Kontrolle wurde parallel zur Überprüfung von pH und Sauerstoffgehalt zu Beginn des Tests und nach Ablauf von 48 Stunden angesetzt. Letztgenanntes Replikat wurde aufgrund der möglichen Beeinflussung der Dodecylbenzolkonzentration durch Adsorption an die Messelektroden nicht in die Auswertung einbezogen.

Wie in Abbildung A5 zu sehen ist, zeigte keiner der durchgeführten Tests eine signifikante Anzahl immobilisierter Tiere. Jedoch wurde ein Effekt beobachtet, der nicht explizit in der OECD Guideline (202) erwähnt ist: Bei höheren Dodecylbenzolkonzentrationen hafteten die betroffenen Daphnien an der Oberfläche des Mediums und schienen nicht in der Lage zu sein in die Wasserphase zu gelangen. Die Tiere zeigten Schwimmbewegungen, können also nicht als immobil gelten, zeigten aber ebenso kein natürliches Schwimmverhalten in der freien Wasserphase. Da dies ausschließlich in den Treatments auftrat, und die Kontrollen nicht betroffen sind, wurde der Effekt in die Auswertung der Tests einbezogen (Abbildung 17). Es wird vermutet, dass die Substanz an den betroffenen Daphnien, begünstigt durch die ständige Nachlieferung aus der PDMS-Schicht, akkumuliert und so zu dem beobachteten Effekt führt. Dies konnte in den Passive Dosing Limit Tests (Kapitel 2.2.3) genauer untersucht werden.

Die effektiv gemessenen Substanzkonzentrationen im Medium zeigten in allen Beladungsstufen starke Schwankungen und lagen weit oberhalb der im konventionellen Löslichkeitstest gemessenen Konzentrationen.

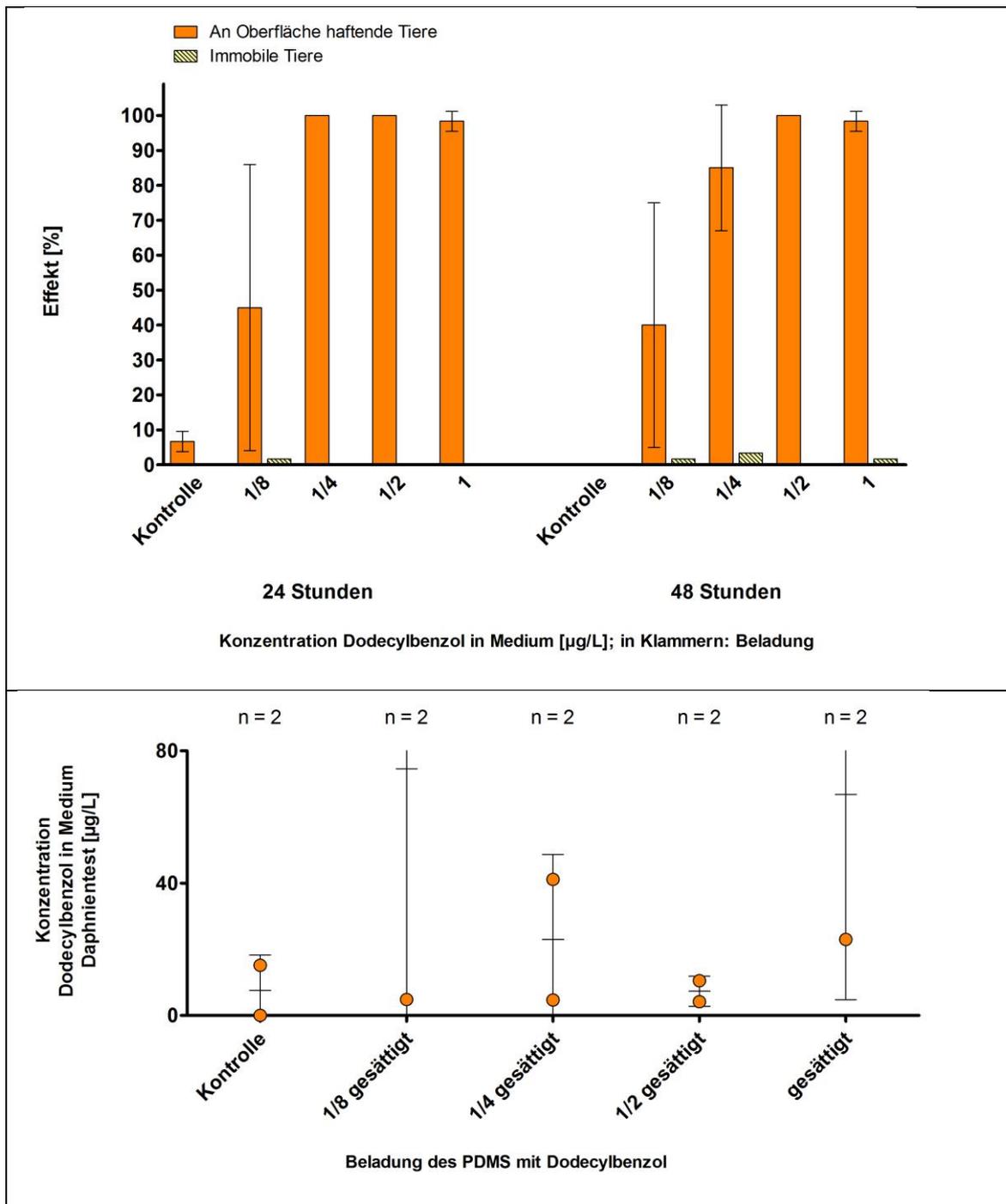


Abbildung A5: Akute Daphnientests (3x) über Passive Dosing mittels PDMS-Schichten (Gesamtdarstellung). Effekt (Immobilität), Mittelwert und Standardabweichung von immobilisierten Tieren bzw. an Oberfläche haftenden Tieren. Zusätzlich Quantifizierung der Dodecylbenzolkonzentration im Medium der Tests.

**Fazit:** Bedingt in den weiterhin sehr hohen Substanzkonzentrationen und Schwankungen in der Analytik, wurde wie schon zuvor erwähnt, völlig auf die weitere Verwendung von gegossenen PDMS-Schichten verzichtet, und auch die Adaption der Ökotoxizitätstests auf industriell hergestellte Silikon O-Ringe fokussiert.