

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΜΗ-ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

A. Ντόντος^{1,3*}, R. Smith^{2,3}, Γ. Σ. Ντόντος^{1,4}, G. Whale³

¹Eldon's AEBE, Αθήνα, ²wca Environment, UK, ³ERGTC EF, NL, ⁴ΕΜΠ

(* andreas.dodos@eldons.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κανονισμός REACH τέθηκε σε ισχύ το 2007 και αφορά στην καταχώριση, αξιολόγηση, αδειοδότηση και ενδεχόμενο περιορισμό των χημικών ουσιών (είτε αυτούσιες, είτε σε παρασκευάσματα/αντικείμενα) όσον αφορά στην κυκλοφορία και διάθεση τους στην Ε.Ε. Στα πλαίσια αυτά οι παραγωγοί/εισαγωγείς ουσιών έχουν υποχρέωση να διεξάγουν μια σειρά από δοκιμές και μελέτες οι οποίες να αποτυπώνουν σαφώς την περιβαλλοντική συμπεριφορά και τις ενδεχόμενες επιδράσεις και απειλές στην υγεία. Εντούτοις είναι δυνατή υπό προϋποθέσεις η αποφυγή δοκιμών των παραρτημάτων IX και X του Κανονισμού εφαρμόζοντας συγκεκριμένη μεθοδολογία που να αιτιολογεί την έλλειψη επικινδυνότητας. Μια από τις κρίσιμες μεθοδολογίας αφορά στη μελέτη της βιο-διαθεσιμότητας (bio-availability) που νοείται ο βαθμός στον οποίο μια ουσία είναι διαθέσιμη σε έναν οργανισμό ή στο περιβάλλον. Εντούτοις οι αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των επιμέρους συστατικών ενός παρασκευάσματος επηρεάζουν σημαντικά τη βιο-προσβασιμότητά τους. Συνεπώς οι αλληλεπιδράσεις αυτές θα πρέπει να αξιολογούνται και να λαμβάνονται υπόψη όταν πραγματοποιούνται οι αντίστοιχες δοκιμές και όταν ερμηνεύονται οι σχετικές επικινδυνότητες. Από την εμπειρία που συσσωρεύθηκε κατά τη φάση της προετοιμασίας των φακέλων καταχώρισης και την πειραματική διερεύνηση που απαιτήθηκε για ουσίες σε λιπαντικά παρασκευάσματα - στα οποία το λεγόμενο matrix/latticeeffect μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα βιοδιαθεσιμότητας - στη παρούσα εργασία παρουσιάζεται η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας που βρίσκει εν τέλει εφαρμογή συνολικά σε μη-υδατοδιαλυτά παρασκευάσματα. Με βάση τροποποιημένες συνθήκες στις δοκιμές έκπλυσης (leaching) αποτυπώνεται η στρατηγική που ενδείκνυται να ακολουθείται για την ορθή εκτίμηση και ερμηνεία των δεδομένων επικινδυνότητας και τη συνακόλουθη ορθή αξιολόγηση των σχετιζόμενων απειλών στο περιβάλλον και την υγεία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κανονισμός EU REACH 1907:2006 καθώς και οι αναθεωρήσεις αυτού ορίζουν συγκεκριμένο σύνολο δοκιμών που πρέπει να εκτελούνται σε κάθε ουσία που παράγεται ή εισάγεται στην ευρωπαϊκή ένωση με σκοπό την καταχώριση και εν συνεχεία την αξιολόγηση των κινδύνων που προκύπτουν από την παραγωγή, τη χρήση και τη διάθεσή της με βάση τις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον.

Οι απαιτούμενες δοκιμές περιγράφονται αναλυτικά στα παραρτήματα του κανονισμού και διαφέρουν ανάλογα με την παραγόμενη ή εισαγόμενη ανά περίπτωση ποσότητα της κάθε ουσίας. Για ουσίες που υπόκεινται στους ποσοτικούς περιορισμούς του παραρτήματος VII (1 – 10 MT ανά έτος) απαιτείται ο μικρότερος αριθμός δοκιμών. Το συγκεκριμένο παράρτημα περιορίζεται σε φυσικοχημικές δοκιμές καθώς και σε απλές δοκιμές οξείας τοξικότητας, και άμεσης βιοαποικοδόμησης. Όσο αυξάνεται η ελεγχόμενη ποσότητα στα παραρτήματα VIII – X οι τοξικολογικές και οικο-τοξικολογικές δοκιμές που απαιτούνται αυξάνονται τόσο σε πλήθος όσο και σε πολυπλοκότητα. Οι δοκιμές ανώτερης βαθμίδας (higher tier testing) εκτελούνται μόνο μετά από σχετική έγκριση από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Χημικών Προϊόντων (ECHA) καθώς υπάρχει

πρόβλεψη από τον κανονισμό για την μείωση δοκιμών όπου απαιτείται η χρήση ζώων. Ειδικότερα, ο κανονισμός προβλέπει την ελαχιστοποίηση δοκιμών σε ζώα μέσω της συνεργασίας όλων των εταιριών με συμφέρον σε μία συγκεκριμένη χημική ουσία μέσω των ΦΑΠΟ (φόρουμ ανταλλαγής πληροφοριών για τις ουσίες). Επιπλέον ενθαρρύνεται η χρήση εναλλακτικών μεθόδων για την ελαχιστοποίηση δοκιμών σε σπονδυλωτά.

Η εμπειρία της βιομηχανίας από το 2008 όταν ο κανονισμός REACH μπήκε σε ισχύ έως και σήμερα έχει δείξει ότι ενώ αυτός αποτελεί ένα πολύ μεγάλο βήμα προς την κατεύθυνση της ασφαλούς χρήσης των χημικών ουσιών τόσο στο βιομηχανικό όσο και στο καταναλωτικό περιβάλλον, υπάρχουν ουσίες οι οποίες λόγω της φύσης τους ή και λόγω του τρόπου της χρήσης τους δεν είναι εύκολο να καταχωρηθούν με τις συμβατικές μεθόδους που περιγράφονται τα σχετικά παραρτήματα. Παραδείγματα τέτοιων είναι πολλές ουσίες UVCB (unknown or variable composition, complex reaction products or of biological materials) – ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύστασης. Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται παραδείγματος χάριν πολλά από τα κλάσματα της διύλισης πετρελαίου. Σε αυτές τις ουσίες κάποιες από τις ενώσεις που τις απαρτίζουν μπορεί να διαφέρουν σε επικινδυνότητα ή κατάταξη χωρίς αυτό να σημαίνει ότι και η ίδια η ουσία θα έχει την ίδια επικινδυνότητα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εναλλακτικής μεθοδολογίας για την αποφυγή δοκιμών ανώτερης βαθμίδας αποτελεί το πρωτόκολλο IP 346^[1]. Με βάση πλήθος δημοσιευμένων μελετών από την πετρελαϊκή βιομηχανία^[2,3] μπόρεσαν να μειωθούν στο ελάχιστο δοκιμές καρκινογένεσης μειγμάτων υδρογονανθράκων σε σπονδυλωτά (ποντίκια, κουνέλια) εκτελώντας μια απλή σχετικά εκχύλιση με DMSO. Αυτή η αντιμετώπιση σε αντίθεση με παραδοσιακές δοκιμές τοξικότητας αποτελούν μία βιώσιμη εναλλακτική και επιπλέον μειώνουν και το ηθικό δίλημμά της χρήσης πειραματόζων από την χημική βιομηχανία.

Αντίστοιχα μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές προσεγγίσεις οι οποίες δεν προσκρούουν στο ηθικό δίλημμά χρήσης πειραματόζων και για άλλες ουσίες οι οποίες δεν μπορούν να χαρακτηρισθούν και να ποσοτικοποιηθούν με βάση την παραδοσιακή αντιμετώπιση των κριτηρίων που περιγράφονται στον κανονισμό REACH. Παράδειγμα όπου μπορεί να έχει εφαρμογή η παρακάτω μεθοδολογία είναι για ουσίες οι οποίες είναι ασταθείς εκτός κάποιου πλέγματος/φορέα. Στην παρακάτω μελέτη παρουσιάζεσαι μία εναλλακτική μεθοδολογία καταχώρησης ουσιών οι οποίες παράγονται και χρησιμοποιούνται μέσα σε πλέγμα μειγμάτων μη υδατοδιαλυτών υδρογονανθράκων.

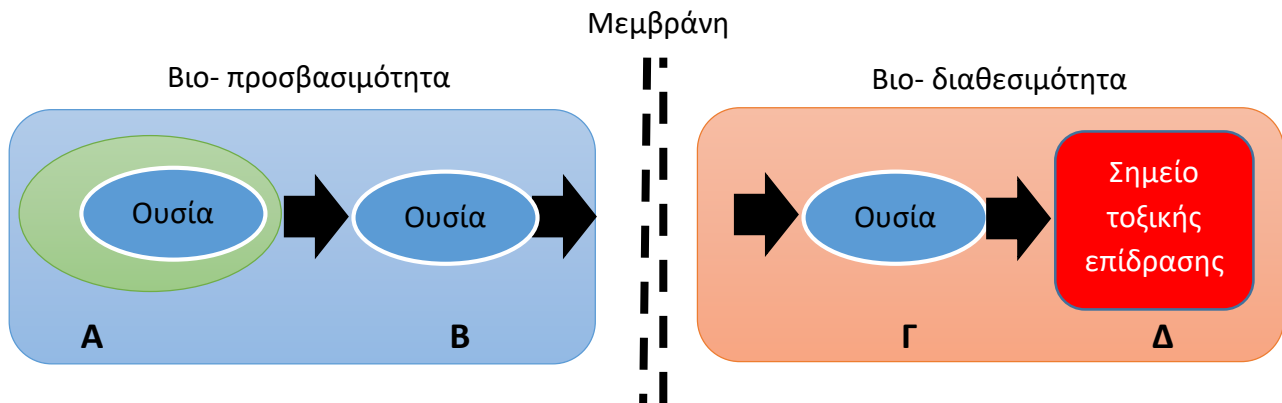
ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η έλλειψη υδατοδιαλυτότητας μειγμάτων καθώς και η πλεγματική επίδραση (lattice effect) που δημιουργούν ορισμένες οργανομεταλλικές ενώσεις διασκορπισμένες σε μείγματα υδρογονανθράκων (matrix effects) μπορεί να χρησιμοποιηθεί με υψηλό βαθμό βεβαιότητας για να ολοκληρωθεί ο φάκελος καταχώρησης των οργανομεταλλικών αυτών ενώσεων. Μέσα από συγκεκριμένες δοκιμές βιοδιαθεσιμότητας μπορεί να αναδειχθεί η μη επικινδυνότητα των ουσιών αυτών τόσο για το περιβάλλον όσο και για την ανθρώπινη υγεία.

Με τον τρόπο αυτό, και ανάλογα με τα αποτελέσματα μπορεί να σχεδιασθεί ένας οδικός χάρτης με την μορφή δέντρου αποφάσεων ο οποίος αντικειμενικά κάθε φορά μπορεί να καθοδηγή τον εκάστοτε καταχωρίζων στο να επιλέξει την πιο αποδοτική στρατηγική δοκιμών.

A. ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η επίδραση που έχει μία χημική ουσία στο περιβάλλον ή στην ανθρώπινη υγεία εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα αυτής. Η βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται ως το μέτρο κατά το οποίο μία ουσία μπορεί να εισέλθει σε έμβιους οργανισμούς ή στο σημείο της τοξικής επίδρασης. Για να μπορέσει μία χημική ουσία να είναι βιοδιαθέσιμη (bio-available) θα πρέπει πρώτα να είναι βιοπροσβάσιμη (bio-accessible). Θα πρέπει δηλαδή να μπορεί να απελευθερωθεί από το μέσο στο οποίο είναι εν δυνάμει εγκλωβισμένη (πλεγματική επίδραση) και στη συνέχεια να «μεταπηδήσει» στο σημείο της τοξικής επίδρασης όπως αναπαρίσταται στο Σχ. 1.



Σχήμα 1. Διαφορά μεταξύ βιοπροσβασιμότητας και βιοδιαθεσιμότητας. Α: Ουσία εγκλωβισμένη σε πλέγμα υδρογονανθράκων, Β: Ποσοστό της ουσίας η οποία απελευθερώνεται στο νερό ή σε γαστρικό υγρό, Γ: Ουσία η οποία απορροφάται από επιθηλιακή ή γαστρική μεμβράνη, Δ: κύτταρο, όργανο ή ολόκληρος οργανισμός που επηρεάζεται τοξικολογικά από την ουσία.

Βιοπροσβασιμότητα ορίζεται ως η δυνατότητα μίας ουσίας να αποδεσμεύεται από το πλέγμα στο οποίο είναι εγκλωβισμένη ώστε να γίνει διαθέσιμη και εν δυνάμει να επηρεάσει το περιβάλλον ή την υγεία.

Οι δοκιμή βιοπροσβασιμότητας βασίζεται στην μεθοδολογία που προβλέπεται από την OECD 2000, και μπορεί να εφαρμοσθεί είτε σε νερό για την μελέτη και επίδραση ουσιών κατά κανόνα στο φυσικό περιβάλλον (οικοτοξικολογικά χαρακτηριστικά) ή σε γαστρικό υγρό για τη μελέτη και επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό.

Για τα οικοτοξικολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιείται η μέθοδος WAF (Water Available Fraction)^[5] για δύσκολα διαχειρίσιμες ουσίες.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα δοκιμών έκπλυσης 3 ουσιών (Α, Β και Γ). Για την ουσία Α οι δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί σε νερό καθώς και σε γαστρικό υγρό (προσομοίωση - FeSSIF). Όλες οι ουσίες είναι μεταλλικά άλατα λιπαρών οξέων και είναι χημικά ανάλογα ουσιών για τις οποίες υπάρχουν εκτενή στοιχεία μέσα από τη βιβλιογραφία ^[6, 7].

Η πειραματική διαδικασία ορίζεται από τη δημιουργία WAF πρώτα σε νερό (OECD 2000) και στη συνέχεια εφόσον απαιτείται σε γαστρικό υγρό. Η συγκέντρωση της ουσίας ορίζεται στα 1000mg/lit

και η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας στο πλέγμα υδρογονανθράκων που χρησιμοποιείται.

Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της ουσίας A στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθεί το WAF. Οι ουσίες που ελέγχθηκαν έχουν διαφορετική υδατοδιαλυτότητα η οποία αναφέρεται στον πίνακα 1. Τα μείγματα που περιείχαν τις ουσίες ήταν κατά κανόνα μη υδατοδιαλυτά. Το πρωτόκολλο δοκιμών ορίζει τον χρόνο ανάμειξης/διάλυσης του δείγματος σε 72 ώρες. Στη συνέχεια λαμβάνεται δείγμα και γίνονται φασματοσκοπικά και χρωματογραφικά οι μετρήσεις συγκέντρωσης των κατιόντων (μεταλλικό μέρος του άλατος) και ανιόντων (λιπαρό οξύ του άλατος) τις ουσίες στην υδατική φάση (WAF) (Σχήμα 2). Τα αποτελέσματα φαίνονται επίσης στον Πίνακα 1.



(A)



(B)

Σχήμα 2. (A) WAF ουσίας A με συγκέντρωση 25%, (B) Ανάλυση συγκέντρωσης μετάλλων στο WAF

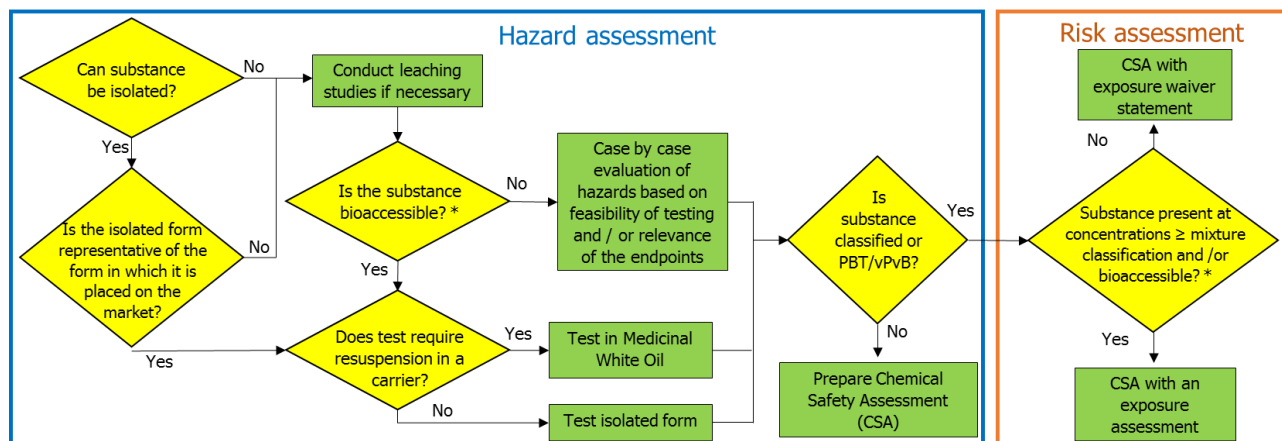
Ουσία	A	A	B	Γ
Συγκέντρωση	Συνήθης	Μέγιστη	Συνήθης	Συνήθης
% κ.β. στο μείγμα	3.5%	25%		8.5
Συγκέντρωση στο WAF	1000 mg/lit	1000 mg/lit	1000 mg/lit	1000 mg/lit
Solubility (OECD 105)	≤ 0.016 mg/L at 20°C		406 g/L based on anion 343 g/L based on cation	187 μg/L
Biodegradability (OECD 301B)	> 60 %	> 60 %	68.4 %	82.4 %
Συγκέντρωση κατιόντος στο WAF	< όριο ανίχνευσης LOD of 5 μg/L ICP MS		17% του θεωρητικού	< όριο ανίχνευσης LOD of 8 μg/L ICP MS
Συγκέντρωση ανιόντος στο WAF	< όριο ανίχνευσης		14% του θεωρητικού	< όριο ανίχνευσης
Τοξικότητα σε Daphnia (OECD 202)	-	-	Αρνητική	-
Βιο-προσβάσιμη ουσία	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι

Πίνακας 1. WAF ουσιών A, B, Γ. Συγκεντρώσεις δειγμάτων και αποτελέσματα βιο-προσβασιμότητας

Με την πειραματική μέθοδο καθώς και με τα αποτελέσματα υδατοδιαλυτότητας των ουσιών, μπορεί να γίνει προσδιορισμός εάν μία ουσία θα είναι βιο-διαθέσιμη για να επηρεάσει τοξικολογικά έναν οργανισμό ή ένα όργανο.

Γ. ΔΕΝΔΡΟ ΑΠΟΦΑΣΕΩΝ

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να συνταχθεί το παρακάτω δένδρο αποφάσεων:



Σχήμα 2. Δένδρο αποφάσεων για την κατάρτιση στρατηγικής καταχώρησης όπου απαιτούνται δοκιμές υψηλής βαθμίδας

Η χρησιμότητα του δένδρου αποφάσεων βασίζεται στο ότι για κάθε περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία τυποποιημένη μεθοδολογία, ώστε να είναι ευκολότερη η παρακολούθηση του φακέλου τόσο από τον καταχωρίζων όσο και από την αρμόδια αρχή (ECHA) σε όλα τα στάδια της αδειοδότησης (κατάθεση, καταχώρηση, ενημέρωση φακέλου).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση την αλληλουχία που ορίζεται από το Σχ. 2, μπορούν να αντιμετωπισθούν οι περισσότερες περιπτώσεις ουσιών οι οποίες δεν μπορούν να χαρακτηρισθούν ή να ελεγχθούν με βάση τις μεθόδους που προβλέπονται από το νομοθετικό πλαίσιο του EC 1907:2006 και των αναθεωρήσεων αυτού.

Το βασικότερο πρόβλημα το οποίο αντιμετωπίζει και αντιμετωπίζει η βιομηχανία είναι σε σχέση με μη παραδοσιακές χημικές ουσίες είναι η σταθερότητα ή ακόμα και η ύπαρξη μίας ουσίας έξω από ένα πλέγμα (matrix). Εφόσον μία ουσία δεν διατηρεί τα χαρακτηριστικά της εκτός ενός τέτοιου πλέγματος το οποίο μπορεί να επηρεάζει (πχ σταθεροποιητής βλ. περίπτωση Infineum^[4]) ή να μην επηρεάζει αυτήν την ουσία (ουσίες UVCB), θα μπορούσε να ακολουθηθεί εναλλακτική από την προβλεπόμενη μεθοδολογία κάνοντας χρήση της βιο-προσβασιμότητας της ουσίας σε σημεία τοξικής επίδρασης.

Η μελέτη επίδρασης ουσιών εντός πλέγματος είναι μια μεθοδολογία η οποία χρησιμοποιείται παραδοσιακά σε μελέτες τοξικότητας και τοξικο - κινητικότητας σε θηλαστικά καθώς είναι σύνηθες τόσο στην έκθεση μέσω κατάποσης όσο και μέσω του δέρματος να γίνεται διασπορά της ουσίας σε φαρμακευτικό παραφινέλαιο ώστε να ελέγχεται η δοσολογία.

Στην περίπτωση που παρατηρείται ότι μία ουσία δεν είναι βιοπροσβάσιμη, και δεν υπάρχει περίπτωση αυτή να είναι και εν συνεχεία βιο-διαθέσιμη, τα σενάρια έκθεσης που απαιτούνται από την νομοθεσία μπορούν δυνητικά να παραληφθούν εφόσον παρέχονται συμπληρωματικά στοιχεία που να ποσοτικοποιούν την πιθανότητα έκθεσης ή όχι στην συγκεκριμένη ουσία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] IP 346: Determination of polycyclic aromatics in unused lubricating base oils and asphaltene free petroleum fractions - Dimethyl sulphoxide extraction refractive index method
- [2] R.J. Ellison, B.J. Simpson, CONCAWE, 1992
- [3] A. Hedelin, M. Thomas, T. Riley, P. Boogaard, M. Vaissiere (Study monitor), H. Ketelslegers (Science Executive), M. H. Kung (EXXONMOBIL), CONCAWE, 2016
- [4] CCH-D-0000002759-61-02/F of 19 November 2012 adopted by the European Chemicals Agency (hereinafter, the 'Agency') pursuant to Article 41 of Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (OJ L 396, 30.12.2006, p. 1; corrected by OJ L 136, 29.5.2007, p. 3; hereinafter, the 'REACH Regulation')
- [5] HERA (Human and Environmental Risk Assessment). 2002. Fatty Acid Salts Human Health Risk Assessment. Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products (Draft: June 2002).
- [6] CIR (Cosmetics Ingredients Review). 1982. Final report of the safety assessment of lithium stearate, aluminum distearate, aluminum stearate, aluminum tristearate, ammonium stearate, calcium stearate, magnesium stearate, potassium stearate, sodium stearate and zinc stearate. Journal of the American college of toxicologists. 1 (12); 143-177.
- [7] NTP (National Toxicology Program). 1992. NTP technical report on the toxicity of studies on castor oil in F344/N rats and B6C3F1 mice (dosed feed studies). NTP Tox 12. Testing laboratory: Irwin R, National Toxicology Program, PO Box 12233, Research Triangle Park, NC 27709. Report no.: NIH Publication No. 92-3131. Owner company: National Toxicology Program, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Report date: 1992-03-01.