

Nitrioltriessigsäure und ihre Natriumsalze

MAK-Begründung, Nachtrag

A. Hartwig^{1,*}

MAK Commission^{2,*}

¹ *Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe, Deutschland*

² *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn, Deutschland*

* E-Mail: A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Keywords:

Nitrioltriessigsäure und ihre Natriumsalze, Arbeitsstoff, maximale Arbeitsplatzkonzentration, MAK-Wert, Toxizität, Gefahrstoff, Spitzenbegrenzung, Genotoxizität, Kanzerogenität, Entwicklungstoxizität

Abstract

The German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area has re-evaluated the Carcinogen Category, the maximum concentration at the workplace (MAK value) and the Pregnancy Risk Group of nitrioltriessigsäure [139-13-9] and its sodium salts [18994-66-6, 15467-20-6, 23255-03-0, 5064-31-3, 18662-53-8]. Available publications and unpublished study reports are described in detail.

Nitrioltriessigsäure and its sodium salts cause an increased incidence of carcinomas of the kidneys and urinary tract in rats and mice. Underlying mechanisms are cytotoxicity and, at higher doses, potential indirect genotoxicity. These processes are due to the complex-forming properties of nitrioltriessigsäure. As their thresholds have been examined in detail, nitrioltriessigsäure and its sodium salts are classified in Carcinogen Category 4.

A NAEL of 2.3 mg/kg body weight and day for hyperplasia of the urinary bladder epithelium, the most sensitive end point, was estimated for nitrioltriessigsäure from a 2-year study in rats. Based on this NAEL, the MAK value for nitrioltriessigsäure and its sodium salts is set at 2 mg/m³ I as acid.

Since the critical effect of nitrioltriessigsäure and its sodium salts is systemic, they are assigned to Peak Limitation Category II. As the half-life of nitrioltriessigsäure in humans is approximately 4 hours, an excursion factor of 4 is set.

There is an adequate margin between the NOAEL for developmental toxicity scaled to a concentration at the workplace and the MAK value. Therefore, damage to the embryo or foetus is unlikely when the MAK value is not exceeded and nitrioltriessigsäure and its sodium salts are assigned to Pregnancy Risk Group C.

As genotoxicity has been observed only at or near cytotoxic doses, the substance is not regarded as a germ cell mutagen.

The contribution of skin contact to systemic toxicity is expected to be relatively slight.

Limited data show no sensitization.

Citation Note:

Hartwig A, MAK Commission. Nitrioltriessigsäure und ihre Natriumsalze. MAK-Begründung, Nachtrag. MAK Collect Occup Health Saf. 2020 Dez;5(4):Doc073. DOI: [10.34865/mb13913d5_4ad](https://doi.org/10.34865/mb13913d5_4ad)

Manuskript abgeschlossen:
26 Mrz 2019

Publikationsdatum:
21 Dez 2020

License: This article is distributed under the terms of the Creative Commons 4.0 International License. See license information at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



MAK-Wert (2019)	2 mg/m³ E als Säure
Spitzenbegrenzung (2019)	Kategorie II, Überschreitungsfaktor 4
Hautresorption	–
Sensibilisierende Wirkung	–
Krebserzeugende Wirkung (2019)	Kategorie 4
Fruchtschädigende Wirkung (2019)	Gruppe C
Keimzellmutagene Wirkung	–
BAT-Wert	–
CAS-Nr.	Nitrotriessigsäure: 139-13-9 Mononatriumnitrotriacetat: 18994-66-6 Dinatriumnitrotriacetat: 15467-20-6 Dinatriumacetat monohydrat: 23255-03-0 Trinatriumnitrotriacetat: 5064-31-3 Trinatriumnitrotriacetat, Monohydrat: 18662-53-8
Molmasse	Nitrotriessigsäure: 191,14 g/mol Trinatriumnitrotriacetat: 257,09 g/mol
Löslichkeit	Nitrotriessigsäure: 1280 mg/l Wasser bei 22,5 °C (ECHA 2018 a, 2019) Trinatriumnitrotriacetat: 457 g/l Wasser bei 20 °C (ECHA 2018 b)
log K_{OW}	Nitrotriessigsäure: –3,81 (ber.; ECHA 2019, 2018 a) Trinatriumnitrotriacetat: –10,08 (ber.; ECHA 2018 b)
pKs-Wert	Nitrotriessigsäure: bei 20 °C: pKs 1: 3,03 pKs 2: 3,07 pKs 3: 10,7 (ECHA 2018 a) bei 25 °C: pKs 1: 1,8 pKs 2: 2,48 pKs 3: 9,65 (ECHA 2019)
Dampfdruck	Nitrotriessigsäure: < 0,000001 hPa (ECHA 2019) Trinatriumnitrotriacetat: 0,000000001 hPa bei 25 °C (ber.; ECHA 2018 b)

Hinweis: Mischexposition mit Eisenverbindungen vermeiden (FeNTA-Bildung)

Nitrotriessigsäure (NTA) und ihre Natriumsalze wurden im Jahr 2007 in die Kategorie 3 A für Kanzerogene eingestuft (Greim 2008). Mit diesem Nachtrag erfolgt eine Reevaluierung dieser Einstufung.

Es liegen seit der Begründung von 2008 (Greim 2008) nur wenige neue bewertungsrelevante Untersuchungen vor. Nur die davon betroffenen toxikologischen Endpunkte sowie die relevanten Endpunkte für die Reevaluierung der kanzerogenen Wirkung, des MAK-Wertes und der Schwangerschaftsgruppe sind in diesem Nachtrag aufgeführt.

Wirkungsmechanismus

Zytotoxizität

Die nephrotoxische Wirkung oral verabreichter NTA wird durch ein vermehrtes Zinkangebot erhöht, ohne dass sich hierbei die Konzentration, bei der erste Effekte auftreten, für NTA verändert (siehe detailliert in Greim 2008).

Kanzerogenität

Niere und Ureter

Im Bereich von 1 bis 2 mM NTA ist die Konzentration an essentiellen Calcium im Kulturmedium in In-vitro-Genotoxizitätsstudien durch Komplexbildung verringert und ruft klastogene Wirkungen hervor. Die überwiegend negativen Ergebnisse in den Studien zur Genotoxizität, die vielfältigen toxischen Wirkungen von NTA und NTA-Metallkomplexen auf Nieren und Übergangsepithelien der Ureter, die hyperplastischen Effekte und auch die (durch das Massenwirkungsgesetz beschriebenen) nicht-linearen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Bildung von Chelatkomplexen aus NTA und divalenten Metallionen, verbunden mit dem ausschließlichen Auftreten von Tumoren in nephrotoxischen Dosisbereichen weisen auf einen überwiegend zytotoxischen und nicht primär genotoxischen Wirkmechanismus hin. Das Auftreten der vielfältigen toxischen Wirkungen in den Nieren geht mit einem Anstieg von Zink bzw. Zink-NTA in Primärharn und Urin einher (siehe detailliert in Greim 2008).

Harnblase

Die Entstehung von Tumoren in der Harnblase wird neben dem möglichen Reizeffekt durch die gebildeten Kristalle einem möglichen Calcium-Entzug aus dem Blasengewebe zugeschrieben, da ein verringerter Calciumspiegel die Basalzellmitogenese von Blasengewebe ex vivo stimuliert (siehe detailliert in Greim 2008).

Harnblasenepithelhyperplasien sind als Indikatoren von zytotoxischen Wirkungen und damit als Vorstufen von Tumoren aufzufassen und treten bei weiblichen Ratten ab 70 mg NTA/kg KG und Tag statistisch signifikant erhöht auf. Männliche Ratten entwickeln zwar Harnblasenepithelhyperplasien, aber keine Tumoren. Die Ursache der Geschlechtsspezifität der Harnblasentumoren ist ungeklärt (siehe detailliert in Greim 2008).

Bedeutung von Eisen(III)-NTA, Kupfer- und Aluminium-NTA

Bei oraler Gabe lässt sich eine nennenswerte Bildung von Eisen(III)-NTA aus NTA und nutritiven oder endogenen Eisen-Quellen in vivo ausschließen.

Die vorliegenden Daten sprechen ebenfalls gegen die Beteiligung eines Kupfer-NTA-Komplexes an den Wirkungen von NTA oder deren Natriumsalzen. Und auch im Fall von Aluminium-NTA weisen die vorliegenden Untersuchungen nicht auf die Beteiligung eines Aluminium-NTA-Komplexes an den Wirkungen von NTA oder deren Natriumsalzen hin (siehe detailliert in Greim 2008).

Die Kinetik von Metallionen in Wechselwirkung mit NTA ist detailliert in der Begründung von 2008 (Greim 2008) beschrieben.

Zusammenfassung des kanzerogenen Wirkungsmechanismus

Zytotoxische Wirkungen sind neben einer möglichen Genotoxizität (Aneuploidien, Klastogenität) als Ursache für die Tumorbildung in Betracht zu ziehen (Greim 2008).

Trinatriumnitrotriessigsäure (Na_3NTA) und NTA können jedoch aufgrund ihrer Komplexbildungseigenschaften den Gehalt von divalenten essentiellen Ionen im Medium verringern und so vermutlich indirekt genotoxisch wirken.

Außerdem kann die Alkalität von Na_3NTA und die Azidität der NTA bei den beobachteten positiven In-vivo-Genotoxizitätsstudien eine Rolle spielen. Positive Befunde in In-vitro-Genotoxizitätstests wurden ab 1 mM NTA erhalten. Somit ist in vivo bei Konzentrationen unter 1 mM NTA ebenfalls nicht mit Genotoxizität zu rechnen, und die zytotoxischen Wirkungen stehen im Vordergrund der Tumorgenese. Bis zu 400 mg $\text{Na}_3\text{NTA}/\text{kg KG}$ sind die applizierten NTA-Dosen und die NTA-Konzentrationen im Urin und im Plasma von Ratten in etwa linear korreliert. Demnach entsprechen 15 mg $\text{Na}_3\text{NTA}/\text{kg KG}$ bei der Ratte etwa 2 μM NTA im Plasma und 0,2 mM im Urin. NTA-Konzentrationen in dieser Höhe wirken in vitro nicht genotoxisch (Greim 2008).

Die neuen Untersuchungen zur Genotoxizität unterstützen den bisher postulierten Wirkungsmechanismus, der besagt, dass die komplexbildenden Eigenschaften mit Calcium eine Rolle bei den klastogenen Effekten in hohen Dosierungen spielen. Da NTA über die Nieren eliminiert wird, kommt es hier vermutlich zu einem Mangel an divalenten Kationen inklusive Calcium, was zu einer lokalen indirekten Genotoxizität führt (Nesslany et al. 2008).

Toxikokinetik und Metabolismus

Die orale Resorption von Dinatriumnitritotriacetat bei Ratten ist praktisch 100 %. Dieses Salz liegt auch nach Gabe von NTA beim pH-Wert des Rattenmagens vor. Es wird mit dem Urin ausgeschieden und unterliegt nicht einem enterohepatischen Kreislauf. Die in manchen Versuchen mit den Faeces assoziierte Menge an NTA wurde von den Autoren auf die unvollständige Trennung von Urin und Faeces zurückgeführt. Die orale Resorption von NTA bei Mäusen ist ebenfalls vollständig. Von Kaninchen wird oral gegebenes Dinatriumnitritotriacetat nur zu 23 % mit dem Urin und zu weiteren 33 % mit den Faeces ausgeschieden. Von Menschen wird nur 12 % der oral applizierten Menge mit dem Urin ausgeschieden, 77 % mit den Faeces (Michael und Wakim 1971; Greim 2008).

In einer In-vitro-Studie mit Humanhaut gemäß OECD-Prüfrichtlinie 428 wurde die dermale Penetration einer 40%igen und einer 1%igen Na_3NTA -Lösung untersucht. Das Experiment mit der 40%igen Lösung wurde nach fünf Minuten abgebrochen, da die aufgrund des niedrigen pH-Wertes resultierende starke Hautschädigung die dermale Penetration stark erhöhte. Die Exposition mit der 1%igen Lösung (Hautbeladung 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) erfolgte über einen Zeitraum von sechs Stunden. Aus dem Experiment mit der 1%igen Lösung wurde eine Resorption von 0,1 % ermittelt (ECHA 2018 b). Unter Annahme einer einstündigen Exposition von 2000 cm^2 Haut mit einer noch hautverträglichen Konzentration von 38 % (Greim 2008) würde dies einer Aufnahme von 1,27 mg Na_3NTA (entspricht 0,942 mg NTA) entsprechen.

Für eine gesättigte wässrige Lösung berechnen sich mit dem Modell von Fiserova-Bergerova et al. (1990) und dem Algorithmus des IH SkinPerm-Modells (Tibaldi et al. 2014) für NTA Fluxe von 0,152 bzw. 0,043 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und Stunde. Unter der Annahme einer einstündigen Exposition von 2000 cm^2 Hautoberfläche würde dies dermalen Aufnahmemengen von 304 bzw. 86 μg entsprechen.

Tierexperimentelle Befunde und In-vitro-Untersuchungen

Akute Toxizität

Inhalative Aufnahme

Es liegen seit der Begründung von 2008 (Greim 2008) keine neuen Untersuchungen zur inhalativen Aufnahme vor.

Eine leichte sensorische Reizung (keine Definition der Messparameter) wurde ab 220 mg $\text{Na}_3\text{NTA}/\text{m}^3$ nach fünfminütiger Exposition von Mäusen berichtet. In dieser Studie wurde keine Konzentration ohne Effekt ermittelt. In einer neueren Studie zur sensorischen Irritation an Ratten wurde eine RD_{50} von 4300 mg/m^3 abgeleitet (Greim 2008).

Subakute, subchronische und chronische Toxizität

Inhalative Aufnahme

Es liegen seit der Begründung von 2008 (Greim 2008) keine neuen Untersuchungen zur inhalativen Aufnahme vor.

In älteren, vierwöchigen Inhalationsstudien mit Na₃NTA an Affen wurde ab der niedrigsten Konzentration von 10 mg/m³ eine Erhöhung der Atemfrequenz beschrieben, doch die Darstellung der Methodik ist unzureichend, um definitive Schlussfolgerungen über sensorische Reizeffekte zu ziehen (Greim 2008). Die Studie kann daher nicht zur Ableitung des MAK-Wertes herangezogen werden.

Reproduktionstoxizität

Entwicklungstoxizität

Es liegen seit der Begründung von 2008 (Greim 2008) keine neuen Untersuchungen zur Entwicklungstoxizität vor.

Zusammenfassend lässt sich aus einer älteren Fütterungsstudie an der Ratte über zwei Generationen mit Dosierungen von bis zu 450 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (entsprechend 335 mg NTA/kg KG und Tag) weder eine Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit noch eine fruchtschädigende Wirkung ableiten. Aus älteren Studien zur Entwicklungstoxizität ergeben sich keine Hinweise auf entwicklungstoxische Wirkungen von NTA oder Na₃NTA auf die Feten von Ratten bei Dosierungen von ca. 450 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (entsprechend 335 mg NTA/kg KG und Tag) bzw. auf die Feten von Kaninchen bei Dosierungen von bis zu 250 mg NTA/kg KG und Tag oder von Mäusen bei Dosierungen von ca. 400 mg NTA/kg KG und Tag. Maternaltoxische Effekte traten bei den getesteten Dosierungen nicht auf.

Genotoxizität

Die Datenlage zur Genotoxizität weist nicht auf direkte genotoxische Effekte durch NTA selbst hin (Greim 2008).

Eine zwischenzeitlich veröffentlichte Untersuchung beinhaltet mehrere Genotoxizitätstests (Nesslany et al. 2008), die im Folgenden beschrieben werden.

In vitro

Die Studien wurden mit in wässrigem Natriumhydroxid gelöster NTA durchgeführt, also eigentlich mit einem Natriumsalz der NTA.

Ein Mutagenitätstest an den Salmonella-typhimurium-Stämmen TA98, TA100, TA102 und TA1537 mit Konzentrationen von bis zu 5000 µg NTA/Platte mit und ohne Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems (S9-Mix aus Rattenleber oder -nieren) verlief negativ. Bei Zugabe von Nieren-S9-Mix wurde im ersten Test NADP zugegeben, im zweiten Test wurde dieses durch Arachidonsäure ersetzt. Dieser Kofaktor wurde verwendet, da über die Prostaglandinsynthese oder Lipoxygenase in vivo häufig DNA-Adduktbildung in der Niere induziert wird (Nesslany et al. 2008).

Im Comet-Assay an L5178Y-Mauslymphom-Zellen induzierte NTA bei Konzentrationen von 312,5 bis 2500 µg/ml nach vierstündiger Inkubationszeit einen deutlichen statistisch signifikanten Anstieg des mittleren OTM (Olive Tail Moment) auf 2,35 bis 5,59, verglichen mit 1,01 in der Kontrolle. Zur Untersuchung, ob dieses Ergebnis durch die Blockierung der Komplex/Chelat-bildenden Aktivität von NTA verändert wird, wurden dem Testsystem äquimolare Mengen an Ca²⁺ zugegeben. Eine Induktion von DNA-Schäden war dann unter den gleichen Testbedingungen nicht mehr zu beobachten, es kam vielmehr zu einer statistisch signifikanten Abnahme der DNA-Schäden. Die Zugabe von EDTA alleine hingegen führte ebenfalls zu einem Anstieg der DNA-Schäden (Nesslany et al. 2008).

Im Comet-Assay an primären Nierenzellen von männlichen Sprague-Dawley-Ratten induzierte NTA nach vierstündiger Inkubationszeit bei den drei niedrigsten Konzentrationen von 156,25 bis 625 µg/ml einen statistisch signifikanten Anstieg an DNA-Schäden. Nach Zugabe von äquimolaren Mengen an Ca²⁺ traten hingegen bei den drei mittleren Konzentrationen von 312,5 bis 1250 µg/ml ein statistisch signifikanter Anstieg des mittleren OTM auf. Die Zugabe von EDTA oder Ca²⁺ alleine induzierte DNA-Schäden im gesamten Testkonzentrationsbereich (Nesslany et al. 2008).

Ein Mikronukleustest an L5178Y-Mauslymphomzellen wurde ebenfalls mit und ohne Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems aus Rattenleber oder -nieren sowie bei Zugabe von Nieren-S9-Mix mit NADP bzw. Arachidonsäure mit NTA in Konzentrationen von bis zu 2500 µg/ml durchgeführt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 (ohne metabolische Aktivierung) oder vier Stunden (mit metabolischer Aktivierung) inkubiert. NTA induzierte bei gleichzeitiger mäßiger Zytotoxizität (> 50 % relative Überlebensrate), nur ohne metabolische Aktivierung Mikronuklei. Bei 2000 untersuchten Zellen handelte es sich bei den Konzentrationen von 625 und 1250 µg/ml um 15 bzw. 10 Zellen mit Mikronuklei. Eine 50%ige relative Überlebensrate der Zellen wird für die Bewertung genotoxischer Effekte als akzeptabel betrachtet. Bei 312,5 µg/ml und 84,9 % relativer Überlebensrate trat keine Induktion von Mikronuklei auf. Nach 20-stündiger Erholungsphase wurden ebenfalls unter Zytotoxizität bei 625 und 1250 µg/ml eine erhöhte Anzahl an Mikronuklei beobachtet (21 bzw. 60 Zellen mit Mikronuklei von 2000 untersuchten Zellen; in der Kontrolle waren es fünf von 2000 Zellen mit Mikronuklei). Zur Blockierung der Komplex/Chelat-bildenden Aktivität durch NTA wurden äquimolare Konzentrationen an Ca²⁺ zum Testsystem gegeben. Eine Induktion von Mikronuklei war dann unter den oben genannten Bedingungen nicht mehr zu beobachten (Nesslany et al. 2008).

Ein weiterer Mikronukleustest sowie die Bestimmung von Apoptose wurde mit CTLL2- und CTLL2/Bcl2-Zellen durchgeführt. CTLL2 ist ein stabiler Subklon von zytotoxischen T-Lymphozyten, ursprünglich isoliert aus der C57BL/6-Maus. Die CTLL2/Bcl2-Zelllinie wurde durch stabile Transfektion mit dem pSFFV neo bcl2-Plasmid generiert. Unter Zugabe von Leber- oder Nieren-S9-Mix und bei NTA-Konzentrationen von 0, 625, 1250 oder 2500 µg/ml traten weder Mikronuklei noch Apoptose auf. Nur ohne Zugabe von S9 induzierte NTA in beiden Zelllinien einen statistisch signifikanten Anstieg der Mikronuklei, jedoch keinen Anstieg der Apoptose. In den CTLL2-Zellen waren nach 24-stündiger Behandlung ohne Erholungszeit bei den beiden hohen Konzentrationen von 1250 und 2500 µg/ml 15 bzw. 50 Mikronuklei, in der Kontrolle vier bei jeweils 2000 untersuchten Zellen zu verzeichnen. In CTLL2/Bcl2-Zellen war nur bei 2500 µg/ml mit 26 (drei in der Kontrolle) eine erhöhte Rate an Mikronuklei zu beobachten, bei gleichzeitig keiner bis mäßiger Zytotoxizität. Nach 20-stündiger Erholungszeit traten bei beiden Zelllinien bei 2500 µg/ml erhöhte Inzidenzen an Mikronuklei auf (29 und 26 Zellen mit Mikronuklei im Gegensatz zu fünf bzw. sechs in der Kontrolle) (Nesslany et al. 2008).

In einem TK^{+/-}-Mutationstest mit L5178Y-Mauslymphomzellen zeigte sich nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit NTA eine erhöhte Gesamtmutationsrate (kleine und große Kolonien). Bei 444,4 µg/ml (relatives Zellwachstum 33,5 %) betrug die Mutationsrate 1,9. Mutationsraten von < 2 werden als biologisch nicht signifikant gewertet. Höhere Konzentrationen induzierten Mutationsraten von > 2, begleitet von deutlicher Zytotoxizität mit einem relativen Zellwachstum von < 10 %. Die Mutationsrate von kleinen Kolonien (Hinweis auf Chromosomenaberrationen) betrug bei 444,4 µg/ml 2,5. Ein zweiter Test mit engeren Abständen der eingesetzten NTA-Konzentrationen zeigte bei 450 und 500 µg/ml (relatives Zellwachstum 31,1 bzw. 10,2 %) einen dosisabhängigen Anstieg der Gesamtmutationsrate (2,5 bzw. 4,1) sowie der Mutationsrate kleiner Kolonien (2,9 bzw. 4,7). Die höchste Konzentration von 550 µg/ml wurde aufgrund der Zytotoxizität (relatives Zellwachstum 8,9 %) nicht in die Bewertung aufgenommen. Aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Genotoxizitätstests wurde nur ohne Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems getestet (Nesslany et al. 2008).

Ein Chromosomenaberrationstest mit humanen Lymphozyten wurde nach vier Stunden Behandlung mit NTA und weiteren 16 Stunden Wachstum (1,5-fache Zellzyklus-Länge) durchgeführt sowie nach 20- und 44-stündiger Behandlung (1,5- bzw. 2,5-fache Zellzyklus-Länge) mit sofortiger Analyse der Metaphase. Die humanen Lymphozyten wurden von männlichen, gesunden, nicht rauchenden Probanden (< 40 Jahre) erhalten, die Zytotoxizität wurde mittels Mitose-Index bestimmt. Zwei Stunden vor Beendigung des Versuchs wurde den Zellkulturen Colcemid zuge-

setzt und am Ende jeweils 200 Metaphasen auf chromosomale Veränderungen untersucht: strukturelle Aberrationen (Gaps, Brüche, tri- und tetradiale Austausche) und numerische Aberrationen (Aneuploidie und Polyploidie). Basierend auf den Ergebnissen der vorherigen Untersuchungen wurde kein S9-Mix hinzugegeben. Nach vierstündiger Behandlung zeigte sich ein Anstieg von aberranten Zellen, jedoch ohne Konzentrationsabhängigkeit und nicht statistisch signifikant. Hingegen war nach 20-stündiger Exposition ein statistisch signifikanter und konzentrationsabhängiger Anstieg chromosomaler Brüche bei 1000 bis 2000 µg/ml zu beobachten. Nach 44-stündiger Behandlung trat eine statistisch signifikante Induktion an Aberrationen, jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes auf. Ebenfalls nach 44-stündiger Behandlung war die Häufigkeit von Polyploidie erhöht, wobei dieser Befund nicht statistisch signifikant war. Bei keiner der Behandlungszeiten wurde die Induktion von inter- oder intrachromosomalen Austauschen beobachtet (Nesslany et al. 2008).

In vivo

Nach einmaliger oraler Gabe von 0, 1000 oder 2000 mg NTA/kg KG an jeweils fünf männliche Sprague-Dawley-Ratten wurde nach 3 bis 6 oder 22 bis 26 Stunden ein Comet-Assay an den Nierenzellen durchgeführt. NTA induzierte bei beiden Dosierungen einen deutlichen statistisch signifikanten Anstieg an DNA-Schäden, jedoch ohne Dosisabhängigkeit. Die mittleren OTM betragen nach Gabe von 0, 1000 oder 2000 mg NTA/kg KG 6,31; 20,09 bzw. 16,81 nach 3 bis 6 Stunden und 4,30; 19,38 bzw. 16,8 nach 22 bis 26 Stunden. In einer Voruntersuchung wurden nach Behandlung mit 2000 mg/kg KG weder Mortalität noch klinische Symptome beobachtet. Ein NOAEL wurde nicht erhalten (Nesslany et al. 2008).

Zusammenfassung

Die Datenlage zur Genotoxizität weist nicht auf genotoxische Effekte durch NTA selbst hin (Greim 2008).

Indirekte genotoxische Effekte wie gestörte Chromosomenverteilung sind auf die chelatisierenden Eigenschaften von NTA und eine dadurch verursachte Störung des Spindelapparates zurückzuführen (Nesslany et al. 2008).

Die neuen Untersuchungen zur Genotoxizität in vitro und in vivo unterstützen die bisherige Datenlage. Sie weisen ebenfalls auf indirekte klastogene Effekte hin, die erst bei zytotoxischen Dosierungen oder knapp darunter auftreten. Positive Befunde werden nur ohne Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems erhalten (Nesslany et al. 2008).

Kanzerogenität

In Langzeitstudien an Ratten und Mäusen wurden nach oraler Verabreichung von NTA und ihren Natriumsalzen mit dem Trinkwasser oder dem Futter Tumoren in der Niere und den harnableitenden Organen gefunden (Greim 2008).

In Studien an Ratten und Mäusen wurden mit NTA nach Initiation mit Nitrosaminen tumorpromovierende Wirkungen auf Niere und Harnblase nachgewiesen (Greim 2008).

Bei Ratten treten Karzinome der Nierentubuli und des Übergangsepithels in Niere und ableitenden Harnwegen ab 100 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (74 mg NTA/kg KG und Tag) auf, bei Mäusen ab 1125 mg NTA/kg KG und Tag.

Bei NTA-Dosen ab 38 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (27 mg NTA/kg KG und Tag) kommt es zu zytotoxischen Effekten in den Nieren von Ratten und zu einem Anstieg der Zink-Konzentration im Urin von Hunden. Der NOAEL für erhöhte Zinkausscheidung bei Ratten beträgt 9 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (6,7 mg NTA/kg KG und Tag) oder 15 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (11,2 mg NTA/kg KG und Tag) und für Hunde 8 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (5,6 mg NTA/kg KG und Tag) (Greim 2008).

Harnblasenepithel-Hyperplasien treten bei männlichen Ratten nicht statistisch signifikant erhöht ab 10 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (6,9 mg NTA/kg KG und Tag; 3/23 Tiere) und bei weiblichen Ratten statistisch signifi-

kant erhöht ab 70 mg NTA/kg KG und Tag auf. Harnblasentumoren werden vor allem bei weiblichen Ratten ab 260 mg NTA/kg KG und Tag beobachtet (Greim 2008).

Bewertung

Kritischer Effekt ist die kanzerogene Wirkung auf Niere und harnableitende Organe.

MAK-Wert. Untersuchungen mit inhalativer Exposition, die zur Ableitung eines MAK-Wertes geeignet sind, liegen nicht vor.

Der niedrigste LOAEL für systemische Effekte (siehe Tabelle 1) stammt aus einer Zwei-Jahre-Fütterungsstudie an Ratten und liegt bei 10 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (6,9 mg NTA/kg KG und Tag). Hier treten bei 3/23 Tieren Hyperplasien des Harnblasenepithels auf (Greim 2008 und Abschnitt „Kanzerogenität“). Da kein NOAEL erhalten wurde, wird ein NAEL von 2,3 mg NTA/kg KG und Tag als ein Drittel des LOAEL abgeschätzt. Zur toxikokinetischen Übertragung dieses NAEL in eine Konzentration in der Luft am Arbeitsplatz werden berücksichtigt: die tägliche Exposition der Tiere im Vergleich zur fünftägigen Exposition pro Woche am Arbeitsplatz (7 : 5), der dem toxikokinetischen Unterschied zwischen Ratte und Mensch entsprechende speziesspezifische Korrekturwert (1 : 4), die nachgewiesene orale Resorption (100 %; Greim 2008), das Körpergewicht (70 kg) und das Atemvolumen (10 m³) des Menschen sowie die angenommene 100%ige inhalative Resorption. Damit errechnet sich eine entsprechende Konzentration von 5,6 mg NTA/m³. Da dieser Wert von einem NAEL aus tierexperimentellen Untersuchungen stammt (1 : 2), kann unter Anwendung des Preferred Value Approach ein MAK-Wert von 2 mg NTA/m³ E abgeleitet werden.

Tab. 1 Effekt-Level (LOAEL) von NTA und Na₃NTA im Vergleich (Greim 2008)

Spezies	Befund		Na ₃ NTA×H ₂ O	Na ₃ NTA (mg/kg KG u. Tag) ^{a)}	NTA
Maus	Karzinome	Niere			1125
Ratte	Karzinome	Niere		100	74
Ratte	Zytotoxizität	Niere		38	27
Ratte (weiblich)	Karzinome	Harnblase	375		258
Ratte (weiblich)	Hyperplasien	Harnblase	100		69
Ratte (männlich)	Hyperplasien (nicht stat. sign.)	Harnblase	10		6,9 NAEL 2,3
Ratte	Anstieg Zink-Konzentration	Urin		38 NOAEL 9	27 NOAEL 6,7
Ratte	Anstieg Zink-Konzentration	Urin			342 mg/m ³ NOAEC 213 mg/m ³
Ratte	Genotoxizität in vitro ab 1 mM NTA	1 mM im Urin entspricht:	80	75	56

^{a)} wenn nicht anders angegeben

Die Dosis, von der der MAK-Wert abgeleitet wurde (2,3 mg NTA/kg KG und Tag), hat einen ausreichenden Abstand zur niedrigsten Dosis, bei der Nierentumoren bei Ratten auftreten (siehe Tabelle 1), von 100 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (entsprechend 74 mg NTA/kg KG und Tag) (Greim 2008 und Abschnitt „Kanzerogenität“).

Eine Reizwirkung ist bei Exposition in Höhe des MAK-Werts nicht zu erwarten, weil NTA nicht ätzend ist und für ätzende Säuren wie Zitronensäure ein MAK-Wert von 2 mg/m³ E festgelegt ist.

Der gleiche MAK-Wert kann auch für die Natriumsalze berechnet als NTA aufgestellt werden. Eine Reizwirkung ist auch hier nicht zu erwarten, da die RD_{50} für Na_3NTA 4300 mg/m^3 beträgt und auch die Natriumsalze nicht ätzend sind.

Des Weiteren ist aufgrund der guten Wasserlöslichkeit keine Akkumulation in der Lunge zu erwarten.

Zur Frage, welche Wirkungen auf die Atemwege ein Chelatbildner wie NTA hat, kann zum Vergleich eine 90-Tage-Inhalationsstudie an Ratten mit Na_2H_2EDTA herangezogen werden. Mit dem verglichen mit NTA bzgl. Ca^{2+} und Zn^{2+} deutlich stärkeren Komplexbildner Na_2H_2EDTA werden in einer 90-Tage-Studie an Ratten bei 3 mg/m^3 beginnende Effekte an der Lunge (alveoläre Histiozytose Grad 1) und an der Epiglottis (adaptive epitheliale Veränderungen Grad 1–2, plattenepithelartige Metaplasie Grad 1) sowie ein Anstieg der absoluten und relativen Lungengewichte bei den weiblichen Tieren beobachtet. Die Studienautoren geben 3 mg/m^3 als NOAEC und 15 mg/m^3 als LOAEC an (ECHA 2018 c).

EDTA bindet Calciumionen bei einem pH-Wert von 7 etwa 4000 mal stärker als NTA, Zink-Ionen etwa 40 000 mal stärker:

Konditionelle Komplexbildungskonstanten für NTA:

$\log K (Ca^{2+}) = 2,6$; $\log K (Zn^{2+}) = 7,9$ (Greim 2008).

Konditionelle Komplexbildungskonstanten für Na_2H_2EDTA :

$\log K (Ca^{2+}) = 6,2$; $\log K (Zn^{2+}) = 2,5$ (BASF SE 2018).

Bei einem MAK-Wert von 2 mg NTA/m^3 E sind daher, verglichen mit den bei 3 mg/m^3 beginnenden lokalen Effekten von EDTA, dem deutlich stärkeren Chelator als NTA, keine zytotoxischen lokalen Effekte an den Atemwegen zu erwarten.

Eine gleichzeitige inhalative Exposition gegen durch NTA chelatisierbare Eisenverbindungen ist wegen der Möglichkeit einer Bildung und inhalativen Aufnahme von Eisen-NTA zu vermeiden.

Spitzenbegrenzung. Der MAK-Wert wird von einem systemischen Effekt abgeleitet, daher erfolgt die Zuordnung zu Spitzenbegrenzungskategorie II. Die Halbwertszeit von NTA beim Menschen beträgt etwa vier Stunden (Greim 2008). Daraus ergibt sich ein Überschreitungsfaktor von 4 (Hartwig 2011) für Nitritotriessigsäure und ihre Natriumsalze.

Fruchtschädigende Wirkung. In den Studien zur Entwicklungstoxizität gibt es keine Hinweise auf eine schädigende Wirkung von NTA oder Na_3NTA auf die Feten von Ratten bis zur höchsten getesteten Dosierung von ca. $450\text{ mg Na}_3NTA/\text{kg KG und Tag}$ (entsprechend $335\text{ mg NTA/kg KG und Tag}$) bzw. auf die Feten von Kaninchen bei Dosierungen von bis zu $250\text{ mg NTA/kg KG und Tag}$ oder auf die von Mäusen bei der einzigen getesteten Dosis von ca. $400\text{ mg NTA/kg KG und Tag}$. Maternaltoxische Effekte treten bei diesen Dosierungen nicht auf.

Zur toxikokinetischen Übertragung der NOAEL von $335\text{ mg/kg KG und Tag}$ bei der Ratte bzw. $250\text{ mg/kg KG und Tag}$ beim Kaninchen und $400\text{ mg/kg KG und Tag}$ bei der Maus in eine Konzentration in der Luft am Arbeitsplatz werden berücksichtigt: die speziesspezifischen Korrekturwerte (1 : 4; 1 : 2,4 bzw. 1 : 7), die nachgewiesene orale Resorption von 100 % für Ratte und Maus sowie 23 % für Kaninchen, das Körpergewicht (70 kg) und das Atemvolumen (10 m^3) des Menschen sowie die angenommene 100%ige inhalative Resorption. Damit errechnen sich entsprechende Konzentrationen von 586, 168 bzw. 400 mg/m^3 . Da der 293-, 84- bzw. 200-fache Abstand der berechneten NOAEC zum MAK-Wert von 2 mg/m^3 ausreichend groß ist, werden Nitritotriessigsäure und ihre Natriumsalze der Schwangerschaftsgruppe C zugeordnet.

Krebserzeugende Wirkung. In Langzeitstudien an Ratten und Mäusen werden nach oraler Verabreichung von NTA und ihren Natriumsalzen mit dem Trinkwasser oder dem Futter Tumoren in der Niere und den harnableitenden Organen gefunden. In Studien an Ratten und Mäusen sind nach Initiation mit Nitrosaminen tumorpromovierende Wirkungen von NTA auf Niere und Harnblase nachgewiesen.

Für die Nierentoxizität ist bei Ratten ein NOAEL von 15 mg Na₃NTA/kg KG und Tag identifiziert. Die niedrigste Dosis, bei der bei Ratten Nierentumoren auftreten, ist 100 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (entsprechend 74 mg NTA/kg KG und Tag) (Greim 2008).

Allerdings scheint die Harnblase empfindlicher zu reagieren, hier beträgt der LOAEL 10 mg Na₃NTA/kg KG und Tag (6,9 mg NTA/kg KG und Tag). Bei dieser Dosis sind in der Langzeitstudie bei 3/23 Ratten Hyperplasien des Harnblasenepithels berichtet. Harnblasenepithel-Hyperplasien sind als Indikatoren von zytotoxischen Wirkungen und damit als Vorstufen von Tumoren aufzufassen. Sie treten bei weiblichen Ratten ab 70 mg NTA/kg KG und Tag statistisch signifikant erhöht auf, Harnblasentumoren werden ab 260 mg NTA/kg KG und Tag beobachtet (Greim 2008).

Aufgrund des mechanistisch gut abgesicherten Dosisbereiches ohne genotoxische und zytotoxische Effekte, ohne gesteigerte Zellproliferation in den Nieren und ohne nennenswerte Bildung von NTA-Metallkomplexen werden NTA und ihre Natriumsalze der Kanzerogenitäts-Kategorie 4 zugeordnet.

Keimzellmutagene Wirkung. Die neuen Untersuchungen zur Genotoxizität *in vitro* und *in vivo* unterstützen die bisherige Datenlage. Sie weisen ebenfalls auf indirekte klastogene Effekte hin, die nahe oder bei zytotoxischen Dosierungen auftreten. NTA wird daher weiterhin nicht in eine der Kategorien für Keimzellmutagene eingestuft.

Hautresorption. Es liegen experimentelle Daten zur Hautpenetration von Na₃NTA, jedoch nicht von NTA vor.

Für den Menschen lässt sich aus einer *In-vitro*-Studie mit Na₃NTA (Abschnitt „Toxikokinetik“) bei Exposition gegen eine 38%ige, nicht mehr reizende Lösung unter Standardbedingungen (2000 cm² Hautoberfläche, eine Stunde Exposition) eine maximale dermale Aufnahme von 1,27 mg Na₃NTA (entspricht 0,942 mg NTA) abschätzen.

Aus einer Modellrechnung (Abschnitt „Toxikokinetik“) ergibt sich für NTA eine maximale dermale Aufnahme von 0,304 mg bei Exposition gegen eine gesättigte wässrige Lösung unter Standardbedingungen (2000 cm² Hautoberfläche, eine Stunde Exposition).

Es kann angenommen werden, dass die Aufnahmemengen für das Mono- und das Dinatriumsalz zwischen denen des Trinatriumsalzes und der Säure liegen.

Bei einer achtstündigen Exposition in Höhe des MAK-Wertes von 2 mg/m³ würde demgegenüber unter Annahme einer 100%igen inhalativen Resorption und einem Atemvolumen von 10 m³ eine inhalative Aufnahme von 20 mg resultieren. Demzufolge sind die abgeschätzten Mengen der dermalen Aufnahme sowohl für die NTA als auch für das Na₃NTA so gering, dass der MAK-Wert auch bei zusätzlichem dermalen Kontakt ausreichend vor systemischen Effekten schützt. Dies gilt auch für die anderen Natriumsalze, daher unterbleibt für NTA und ihre Natriumsalze die Markierung mit „H“.

Sensibilisierende Wirkung. Zur sensibilisierenden Wirkung liegen weiterhin keine Befunde beim Menschen und keine positiven Ergebnisse aus experimentellen Untersuchungen am Tier oder aus *In-vitro*-Untersuchungen vor. Nitritotriessigsäure und ihre Natriumsalze werden daher weiterhin weder mit „Sh“ noch mit „Sa“ markiert.

Literatur

- BASF SE (2018) Mitteilung von Herrn Dr. Edgar Leibold. E-Mail, 16 Okt 2018
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018 a) Information on registered substances. Dataset on nitrotriessigic acid (CAS Number 139-13-9), joint submission, first publication 02 Mar 2011, last modification 18 May 2018. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/11946>, abgerufen am 08 Okt 2018
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018 b) Information on registered substances. Dataset on trisodium nitrotriessigic acid (CAS Number 5064-31-3), joint submission, first publication 17 Mar 2011, last modification 19 Feb 2018. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14301>, abgerufen am 08 Okt 2018
- ECHA (European Chemicals Agency) (2018 c) Information on registered substances. Dataset on disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate (CAS Number 139-33-3), joint submission, first publication 20 Dec 2010, last modification 03 Aug 2018. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14817>, abgerufen am 15 Okt 2018
- ECHA (European Chemicals Agency) (2019) Information on registered substances. Dataset on nitrotriessigic acid (CAS Number 139-13-9), joint submission, first publication 17 May 2013, last modification 14 May 2019. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/12171>, abgerufen am 22 Mai 2019
- Fiserova-Bergerova V, Pierce JT, Droz PO (1990) Dermal absorption potential of industrial chemicals: criteria for skin notation. *Am J Ind Med* 17: 617–635. DOI: [10.1002/ajim.4700170507](https://doi.org/10.1002/ajim.4700170507)
- Greim H (Hrsg) (2008) Nitrotriessigic acid and its sodium salts. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 45. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb13913verd0045](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb13913verd0045)
- Hartwig A (Hrsg) (2011) Spitzenbegrenzung. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 51. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mbpeakexpd0051](https://doi.org/10.1002/3527600418.mbpeakexpd0051)
- Michael WR, Wakim JM (1971) Metabolism of nitrotriessigic acid (NTA). *Toxicol Appl Pharmacol* 18: 407–416. DOI: [10.1016/0041-008x\(71\)90133-5](https://doi.org/10.1016/0041-008x(71)90133-5)
- Nesslany F, Simar-Meintières S, Watzinger M, Talahari I, Marzin D (2008) Characterization of the genotoxicity of nitrotriessigic acid. *Environ Mol Mutagen* 49: 439–452. DOI: [10.1002/em.20403](https://doi.org/10.1002/em.20403)
- Tibaldi R, ten Berge W, Drolet D (2014) Dermal absorption of chemicals: estimation by IH SkinPerm. *J Occup Environ Hyg* 11: 19–31. DOI: [10.1080/15459624.2013.831983](https://doi.org/10.1080/15459624.2013.831983)