
Entwicklung von QSAR-Modellen zur Beschreibung der Toxizität aliphatischer Amine gegenüber Embryos des Zebrafischlings *Danio rerio*

Martin Müller, Kristin Radke, Roland Nagel

Durchführung der Untersuchungen:

Kristin Radke bei Prof. Nagel / TU Dresden.

Ergebnisse publiziert als Dissertation von Frau Radke
(jetzt: BASF AG)

Wirkmechanismus 1

Klassifizierung¹

Primäre Amine

→ polar narkotisch / less inert

Sekundäre und tertiäre Amine

→ unpolar narkotisch / inert

¹ Verhaar et al. 1992

Wirkmechanismus 2

S. Ren 2002:

„Similar to ester narcosis, amine narcosis is higher than baseline toxicity and it has been concluded that a separate amine narcosis mechanism exists.“

QSAR-Modelle 1

Newsome et al. 1993: Akute Toxizität (*Pimephales promelas*)

Prim. unverzweigt	$0,82 \cdot \log Kow - 1,13$	N = 12, R ² = 0,98
Sek.	$0,72 \cdot \log Kow - 0,88$	N = 7, R ² = 0,82
Tert.	$0,41 \cdot \log Kow - 0,54$	N = 10, R ² = 0,44
alle	$0,70 \cdot \log Kow - 0,85$	N = 41, R ² = 0,84

Newsome et al. (1993)

„Tertiary amines in general are more poorly modeled than other subclasses, suggesting the possibility that steric effects are inadequately parametrized.“

QSAR-Modelle 2

Clements et al 1996

(Datensatz z.T. unbekannt, keine Unterscheidung prim, sek., tert.)

Fische (LC ₅₀)	$0,64 \cdot \log K_{ow} - 0,72$	N = 55, R ² = 0,82
Daphnien (LC ₅₀)	$0,58 \cdot \log K_{ow} - 0,52$	N = 10, R ² = 0,78
Algen (EC ₅₀)	$0,43 \cdot \log K_{ow} - 0,55$	N = 14, R ² = 0,74
Algen (chronisch)	$0,33 \cdot \log K_{ow} - 1,40$	N = 11, R ² = 0,61

Testdesign 1

- **DarT: Danio rerio Toxicity Assay**

- Untersuchung der Chemikalienwirkung auf die Embryonalentwicklung von *Danio rerio*
- Ersatzmethode „akuter Fischtest“

Testdesign 2

Testdurchführung

- pH- und O₂ - Messung (t₀); 26 ± 1 °C für 48 h
- 5 Konzentrationen + 1 Kontrolle

1. range - finding: 100 % und 0 % Mortalität

2. Toxizität: LC₅₀ - Bestimmung

- max. Verdünnung: Faktor 1,2

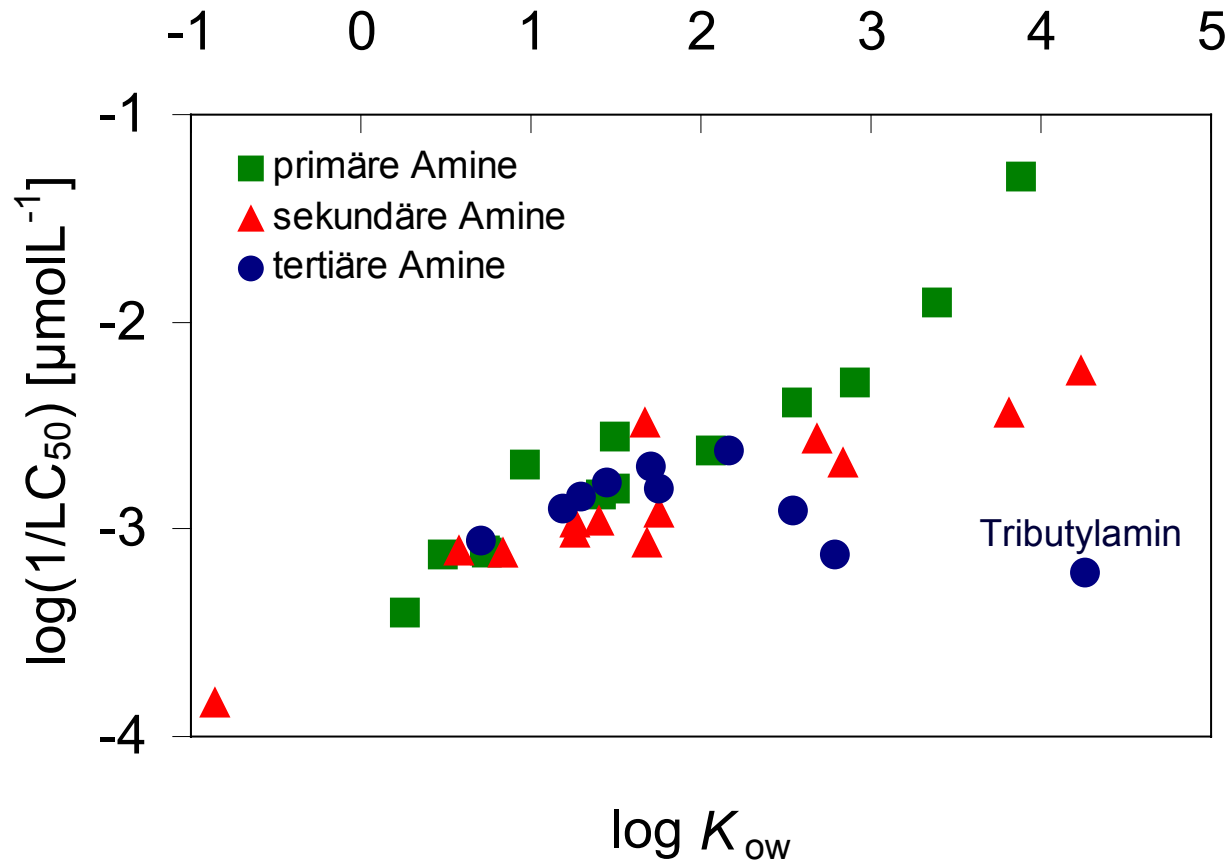
- keine pH - Neutralisierung

Testsubstanzen

	<i>primär</i>	<i>sekundär</i>	<i>tertiär</i>
<i>Substanzen (Anzahl)</i>	13	13	10
<i>funktionelle Gruppe</i>	R-NH ₂	R ₂ NH	R ₃ N
<i>C - Atome</i>	C ₃ - C ₁₀	C ₄ - C ₁₂	C ₄ - C ₁₂
<i>log K_{ow}</i>	0,26 - 3,78	(-0,56*) 0,81 - 4,37	0,53 - 4,46
<i>pK_a</i>	10,6 - 10,8	(8,49*) 10,4 - 11,4	10,1 - 10,9

* Morpholin (Oxazin)

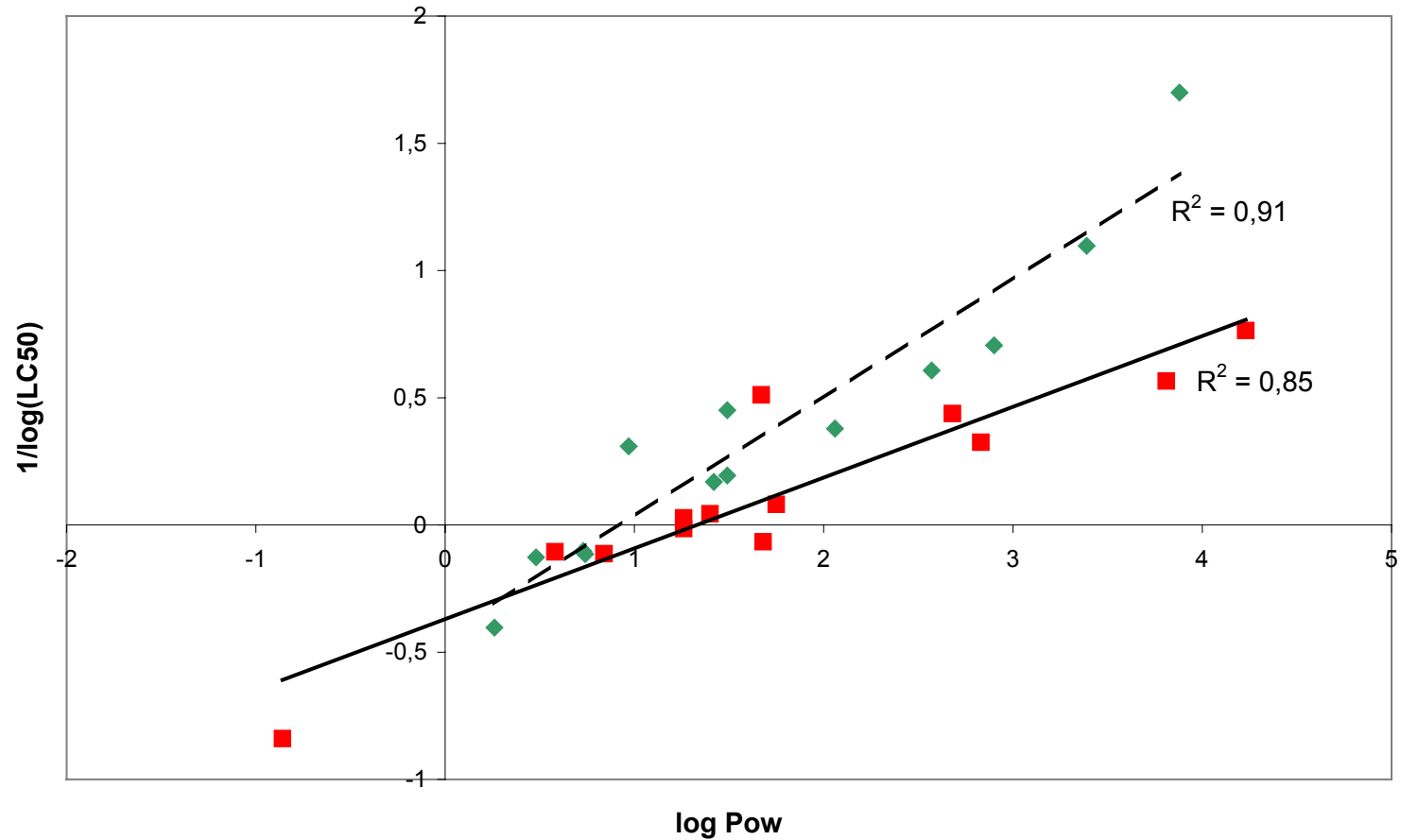
Log Kow-Modelle 1



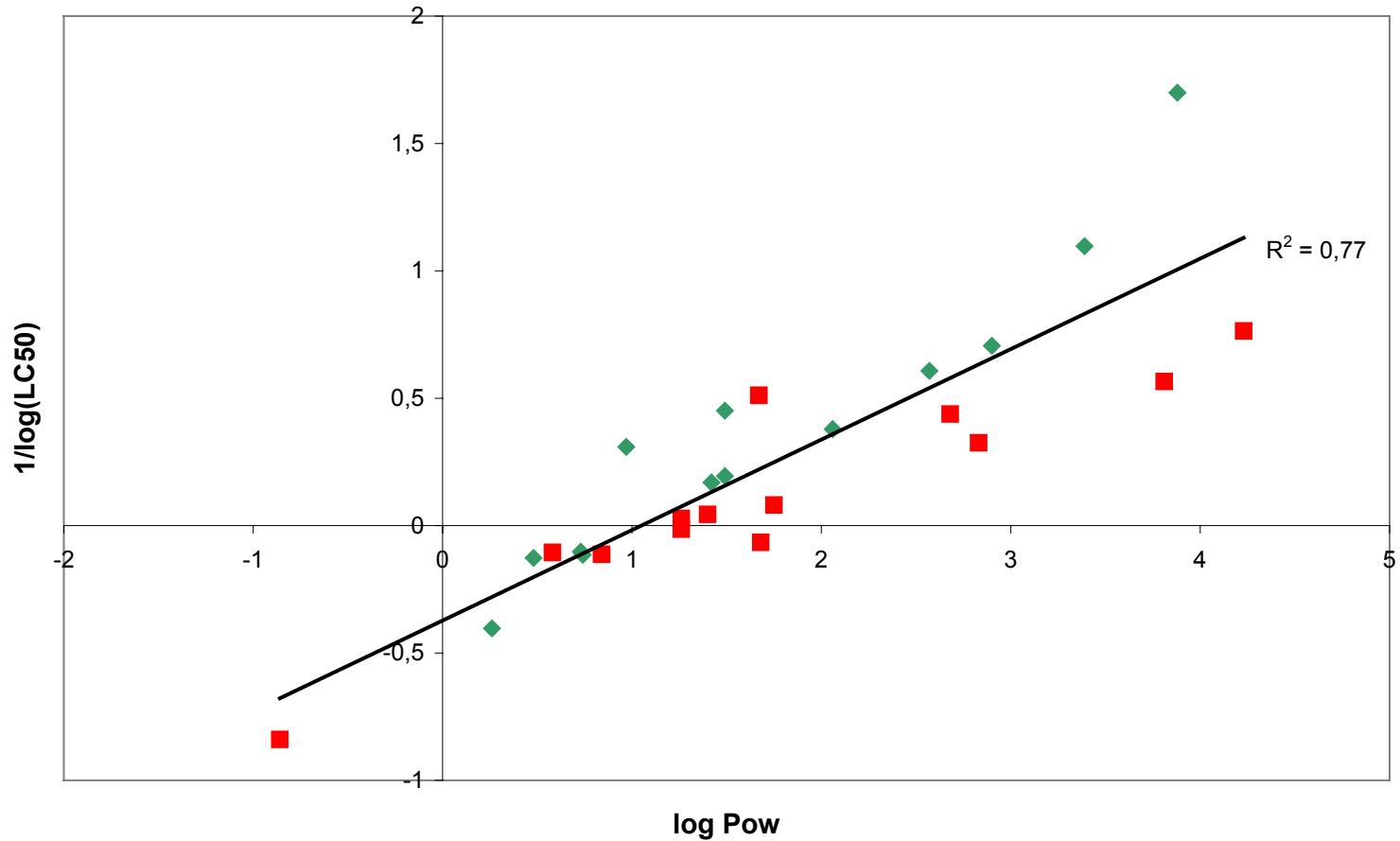
Log Kow-Modelle 2

Primäre Amine	$0,47 * \log Kow - 0,43$	$N = 13, R^2 = 0,91$
Sekundäre Amine	$0,28 * \log Kow - 0,37$	$N = 13, R^2 = 0,85$
Prim. + Sek. Amine	$0,36 * \log Kow - 0,37$	$N = 26, R^2 = 0,77$
Tertiäre Amine	-	$N = 10, R^2 = 0,23$
alle	-	$N = 36, R^2 = 0,48$

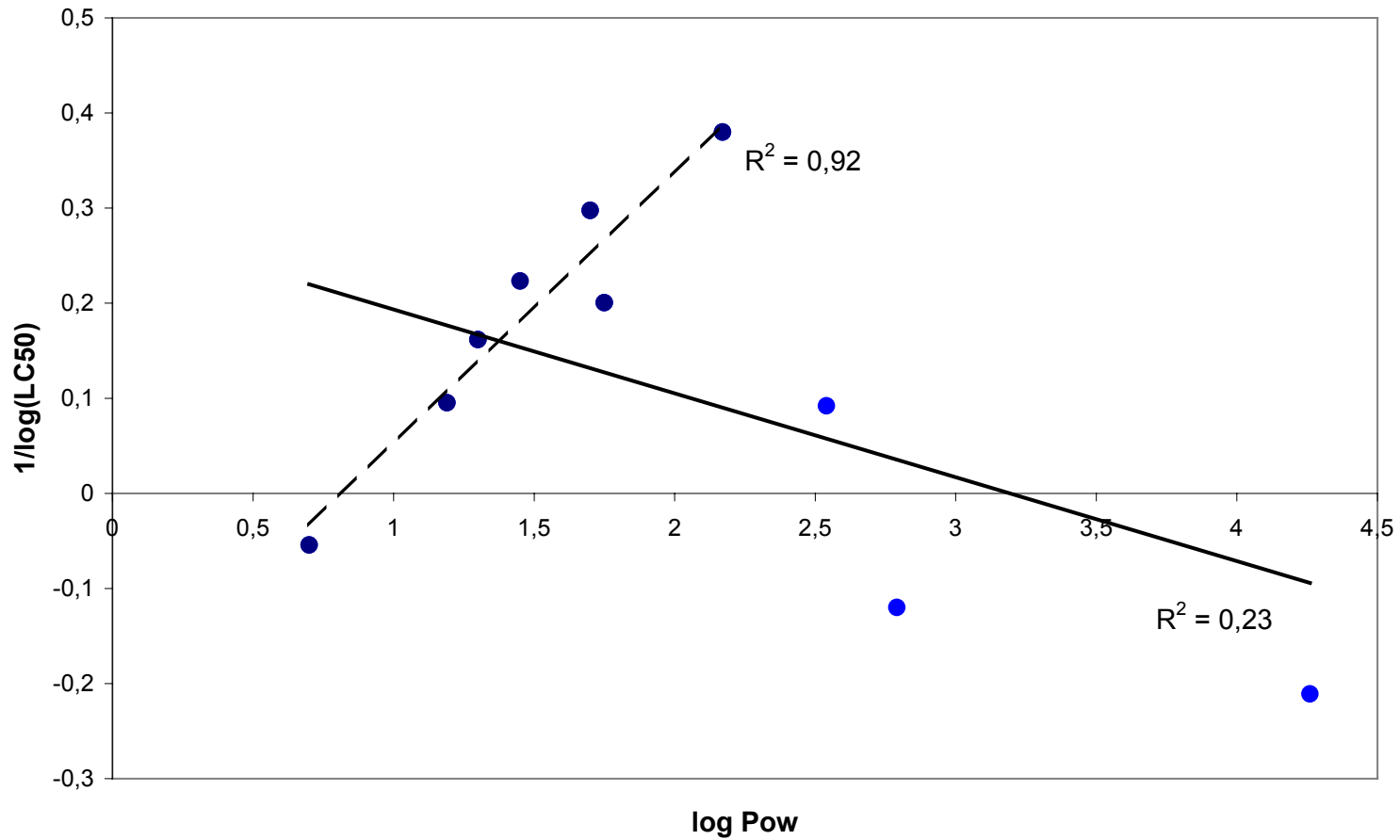
Primäre und sekundäre Amine



Primäre und sekundäre Amine



Tertiäre Amine



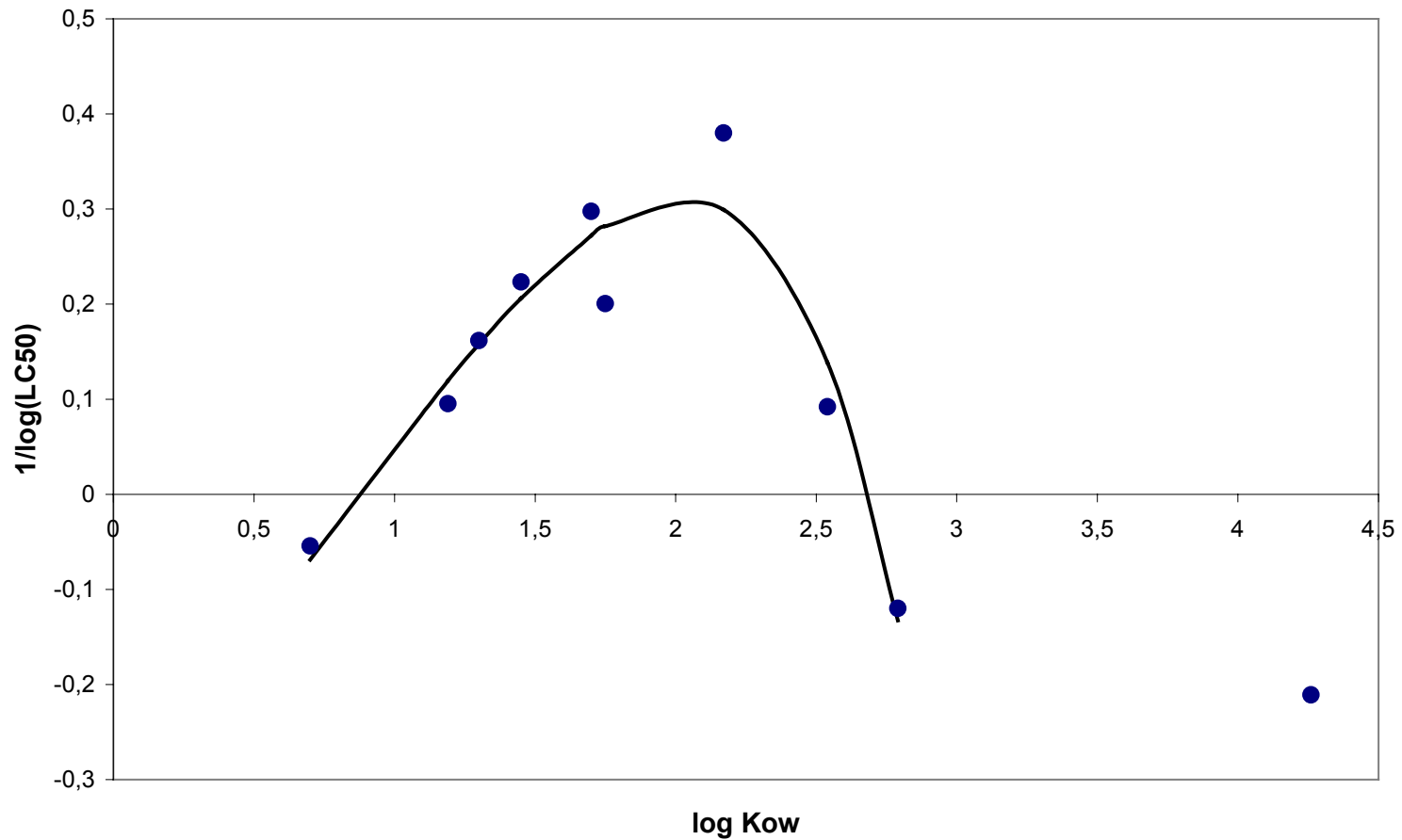
Bilineares Modell nach Kubinyi

Bilinearer Zusammenhang für tertiäre Amine (ohne Tributylamin):

$$\log(1/LC50) = 0,424 \cdot \log Kow - 5,945 \cdot \log(0,00073 \cdot Kow + 1) - 0,356$$

(n = 9; R² = 0,915; Q² = 0,684)

Bilineares Modell



Multivariate Modelle: Deskriptoren

- physikalisch-chemische Deskriptoren z.B. Lipophilie ($\log K_{ow}$), Säure- oder Basenkonstanten (pK_a / pK_b)
- topologische Deskriptoren z.B. Konnektivitätsindizes (1χ)
- geometrische Deskriptoren z.B. molares Volumen, Moleküldurchmesser (D_{eff})
- quantenchemische Deskriptoren z.B. Dipolmoment, eLUMO, eHOMO, atomare Ladungen (H^{+max})

Multivariate Modelle: Statistik

1. Lineare Regression
2. $N=36$, Anzahl Deskriptoren: 37
→ stepwise Regression problematisch
3. Modelle mit maximal 3 Deskriptoren
→ Interpretierbarkeit!
4. Validierung

Multivariate Modelle: Validierung

Cross validation

- „leave one out“
- „leave several out“
- Q^2 als Qualitätsmaß: $Q^2 = 1 - (\text{PRESS}/SS_y)$

Multivariate Modelle:

Modell mit 2 Parametern:

$$\log(1/LC_{50}) = 0,33 \cdot \log Kow - 0,22 \cdot D_{eff} - 1,96$$

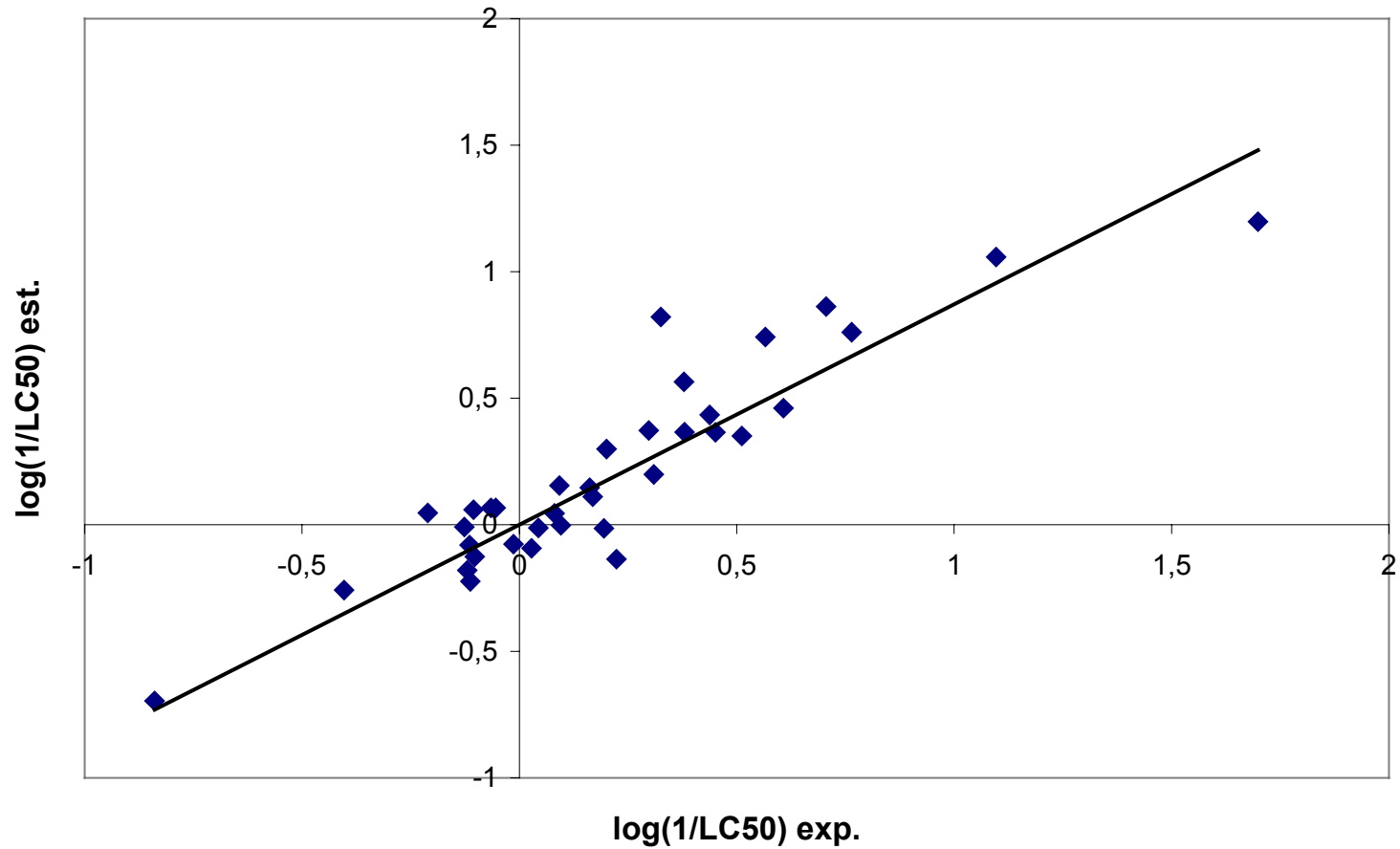
$$(n = 36; R^2 = 0,812; Q^2 = 0,731)$$

Modell mit 3 Parametern:

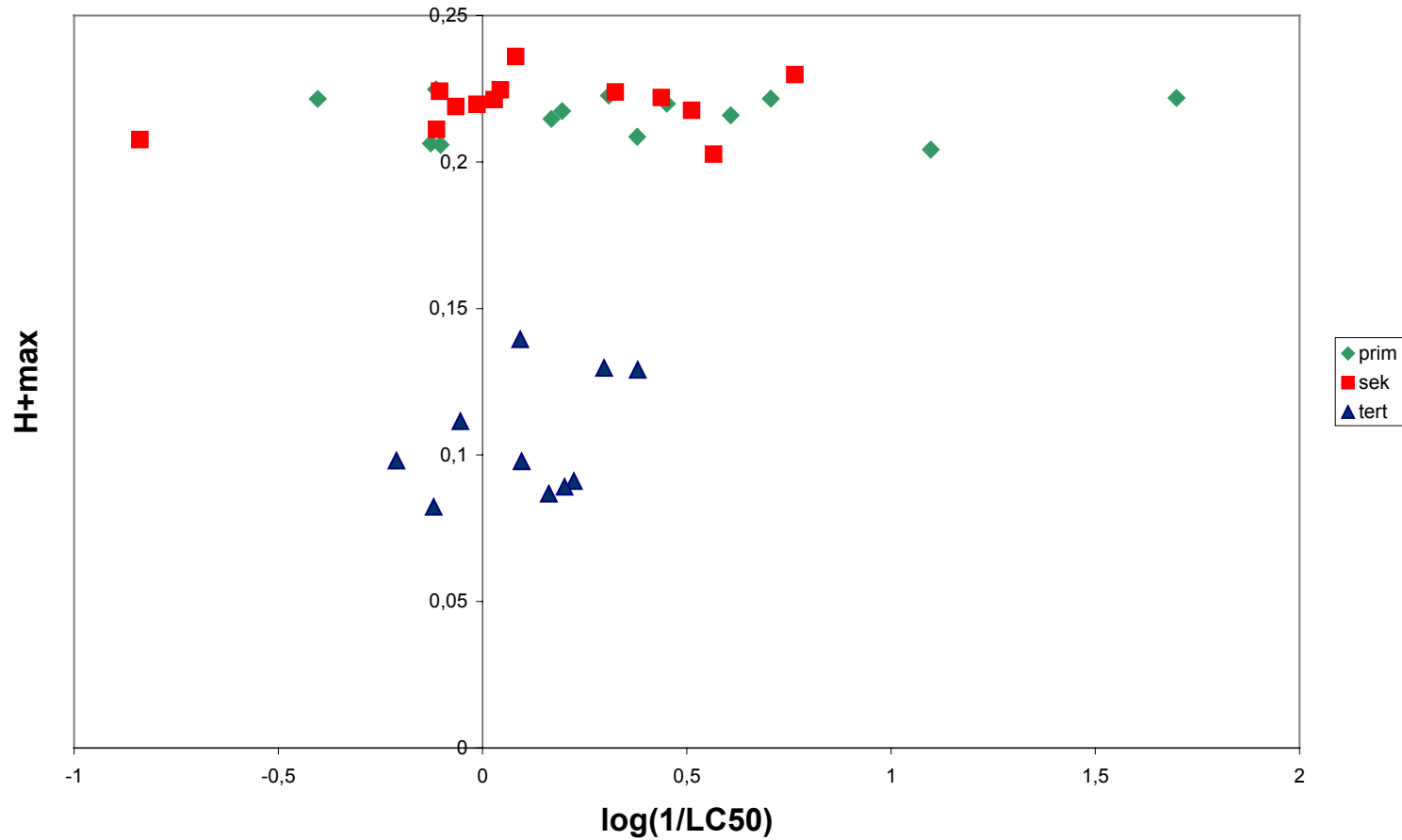
$$\log(1/LC_{50}) = 0,34 \cdot \log Kow - 0,27 \cdot D_{eff} - 1,73 \cdot H^+_{max} - 1,34$$

$$(n = 36; R^2 = 0,824; Q^2 = 0,763)$$

Multivariates Modell



Einfluß von H^+_{max}



Multivariates Modell: Indikatorvariable

1. Einführung einer Indikatorvariablen I.
I=1: es existiert eine NH-Bindung
I=0: es existiert keine NH-Bindung (→ tert. Amin)
2. $\text{Log}(1/\text{LC50}) = 0,34 \cdot \log \text{Kow} - 0,26 \cdot \text{Deff} - 0,18 \cdot I - 1,58$

(n = 36; R² = 0,819; Q² = 0,757)

Fazit 1:

- Toxizität aliphatischer Amine im DaRT-Assay beschreibbar durch log Kow (primäre und sekundäre Amine)
- Primäre und sekundäre Amine zeigen unterschiedliche Korrelationen → Wirktyp unterschiedlich?
- Tertiäre Amine: keine Korrelation mit log Kow auf Grund sterischer Probleme
- Im akuten Fischttest etwas bessere Korrelation für tertiäre Amine → sterischer Einfluß geringer?

Fazit 2:

- Multivariates Modell fasst die drei Substanzgruppen zusammen: sterische Effekte werden berücksichtigt
- Leichte Verbesserung des Modells durch Hinzunahme einer Unterscheidung zwischen prim./sek. und tertiären Aminen → Bedeutung unklar