

Afleiding richtwaarde voor pyrazol in drinkwater voor levenslange blootstelling

Advies aangevraagd door:	Jozef van Brussel (ministerie van IenM)
Datum eerste adviesaanvraag:	26-10-2015
Kenmerk adviesaanvraag:	IenM/BSK-2015/213236
Datum advies:	1-12-2016
Opsteller(s) advies:	Paul Janssen (RIVM/VSP)
Toetsers:	Bianca van de Ven (RIVM/VPZ), Ans Versteegh (RIVM/DMG)
Projectnummer RIVM:	M/270026/16/BA
Aanbieding:	Bijlage van brief 003/2017/DMG/AV

Samenvatting

Het RIVM heeft in augustus 2015 voor pyrazol een gezondheidskundige indicatieve richtwaarde voor drinkwater afgeleid van 15 µg/liter. Deze waarde gold voor een maximale duur van 2 jaar. Deze restrictie van 2 jaar was gebaseerd op de maximaal verwachte duur van de aanwezigheid van pyrazol in het drinkwater. Vanwege de mogelijke genotoxische werking van pyrazol (*structural alert* van de dubbele stikstofgroep) werd een worst case-berekening gedaan op basis van hydrazine voor de periode van 2 jaar. Dit leverde een extra kankerrisico op rond het maximaal toelaatbare niveau (MTR).

In 2016 zijn naar aanleiding van het RIVM-advies twee genotoxiciteitstesten met pyrazol uitgevoerd (een *in vitro* genmutatietest in zoogdiercellen OECD TG 490 en een *in vitro* micronucleustest in zoogdiercellen OECD TG 487). Deze beide testen lieten geen genotoxische werking zien. Pyrazol kan daarmee beschouwd worden als een niet-genotoxische stof. Dit betekent dat de eerdere restrictie tot 2 jaar en de berekening op basis van hydrazine in verband met de mogelijke genotoxische werking van pyrazol kunnen vervallen. Op basis van de huidige gegevens komt het RIVM tot een gezondheidskundige indicatieve richtwaarde voor levenslange blootstelling van 15 µg/liter. Deze waarde is indicatief omdat de van de gebruikte toxicologische studies slechts de samenvattingen van de resultaten zoals aanwezig in de ECHA-database beschikbaar waren.

1. Eerdere RIVM-adviezen

In verband met een verontreiniging met pyrazol in oppervlaktewater bestemd voor drinkwaterbereiding is door het RIVM aan het Crisis Expert Team (CET) geadviseerd op 30 juli, 12 augustus en 19 augustus 2015. De adviezen van 30 juli en 19 augustus hadden als doel het afleiden van een indicatieve richtwaarde voor pyrazol in drinkwater. Op basis van de beschikbare toxicologische data zoals opgenomen in het REACH-dossier voor pyrazol leidde het RIVM een voorlopige TDI af en berekende op basis daarvan een indicatieve richtwaarde. De uitkomst in het advies van 19 augustus was een indicatieve richtwaarde van 15 µg/liter voor een periode van

maximaal 2 jaar. Deze periode was de verwachte duur van de aanwezigheid van de verontreiniging op basis van informatie van de waterbeheerders. Voor deze 2-jaarsperiode heeft het RIVM in de afleiding van de indicatieve richtwaarde een oriënterende risicoberekening uitgevoerd in verband met de aanwezigheid in het pyrazolmolecuul van een hydrazine-groep, die als een *structural alert* voor een genotoxische werking en dus mogelijk een kankerverwekkende werking wordt beschouwd (KWR 2015).¹

1.1 Beschikbare toxicologische informatie

Voor pyrazol waren alleen toxicologische gegevens beschikbaar uit de ECHA-database (REACH).² Deze gegevens laten zien dat pyrazol een toxische verbinding is. Voor wat betreft de genotoxiciteit was er slechts één in vitro test in bacteriën; deze test gaf geen indicatie voor genotoxiciteit. Dit is echter onvoldoende voor het trekken van conclusies ten aanzien van de genotoxiciteit. Carcinogeniteitsgegevens ontbreken. De belangrijkste studies in de dataset in de ECHA-database zijn twee subacute studies en twee ontwikkelingstoxiciteitstudies. In deze laatste studies induceerde pyrazol teratogene effecten bij doseringen vanaf 20 mg/kg lg/dag. Al bij een dosis van 25 mg/kg lg/dag was het voorkomen van nakomelingen met geboortefwijkingen sterk verhoogd. De NOAEL uit de ontwikkelingstoxiciteitstudies is 5 mg/kg lg/dag, zowel voor effecten op het zwangere moederdier als op de foetus. In de subacute studies (28 dagen dosering) veroorzaakte de stof toxische effecten in diverse weefsels en organen (bloed, lever, nieren, schildklier, milt, testes, prostaat). Eén van deze studies was een studie met toediening via het drinkwater uitgevoerd volgens OECD-richtlijnen. Uit deze studie komt een NOAEL van 1,5 mg/kg lg/dag; deze NOAEL is lager dan de 5 mg/kg lg/dag uit de ontwikkelingstoxiciteitstudie. De blootstellingswijze in deze studie komt overeen met het te beoordelen geval van mogelijke drinkwaterverontreiniging.

1.2 Afleiding indicatieve 2-jaarsrichtwaarde van 15 µg/liter

Op basis van een NOAEL van 1,5 mg/kg lg/dag leidde het RIVM met behulp van de assessmentfactoren conform de REACH-richtlijnen (4 x 2,5 voor extrapolatie van rat naar mens, 10 voor gevoelige groepen in de bevolking, 6 voor extrapolatie naar chronische blootstelling) een voorlopige orale norm (TDI) af van 2,5 µg/kg lg/dag. Hieruit zou op basis van een drinkwaterconsumptie van 2 liter per dag door een volwassene van 60 kg een indicatieve richtwaarde voor drinkwater resulteren van 75 µg/liter. Maar omdat de aanwezigheid van pyrazol in water geen uniek incident was (zoals aanvankelijk de veronderstelling was) en de stof ook op andere plaatsen in Nederland aantoonbaar bleek in oppervlaktewater, is slechts een deel van afgeleide voorlopige TDI toebedeeld aan drinkwater (20%). Aldus resulteerde een indicatieve richtwaarde van 15 µg/liter. Zoals gezegd bevat het pyrazolmolecuul een hydrazinegroep (dubbele stikstofgroep), die als een *structural alert* voor een genotoxische werking beschouwd kan worden. Een *structural alert* geldt als een indicatie voor een effect, die nader zou moeten worden onderzocht. Voor het alert van de dubbele stikstofgroep in de ring van het pyrazolmolecuul wordt geringere reactiviteit tegenover DNA

¹ KWR (2015) Identificatie LCAqua-033. KWR-memo d.d. 27 juli 2015

² <http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-d976d693-a26d-253b-e044-00144f67d031/AGGR-db158711-1907-4219-90e9-c0ef6a83db94> DISS-d976d693-a26d-253b-e044-00144f67d031.html#AGGR-db158711-1907-4219-90e9-c0ef6a83db94

verwacht dan voor de dubbele stikstofgroep van hydrazine met vrijstaande N-H groepen. Om het mogelijke carcinogene risico door pyrazol zoals gesuggereerd door de alert toch mee te nemen in de beoordeling heeft het RIVM aanvullend gerekend met het risicogetal voor hydrazine. De uitkomst van deze berekening moet als onzeker en als hoogstwaarschijnlijk risico-overschattend beschouwd worden. Voor hydrazine wordt op basis van een kwantitatieve risicoschatting door US-EPA (1988)³ bij een concentratie in drinkwater van 1 µg/liter het extra kankerrisico per leven geschat op 1 op 10.000 bij levenslange blootstelling. Dit extra risiconiveau komt precies overeen met het Maximum Toelaatbare Risico zoals gedefinieerd in het Nederlandse milieubeleid. Zoals gezegd gaat deze kankerrisicoschatting uit van levenslange blootstelling (gedurende 70 jaar). Bij een korter durende blootstelling zal het risico evenredig lager zijn. Voor de berekende richtwaarde van 15 µg/liter zal bij een periode van 2 jaar het extra risico beneden het MTR uit het Nederlandse milieubeleid blijven.⁴ Hiermee rekening houdend kwam het RIVM tot een indicatieve richtwaarde voor 2 jaar van 15 µg/liter.

2. Ontwikkelingen na het verschijnen van het RIVM-advies

2.1 Duitse beoordeling door UBA

Na de adviezen van het RIVM en het CET is verdere informatie beschikbaar gekomen over de verontreiniging met pyrazol. Ook in Duitsland bleek lozing van de stof naar oppervlaktewater op te treden. In een beoordeling door het Duitse Umweltbundesamt (UBA) werd voor pyrazol een richtwaarde voor drinkwater afgeleid. Van deze afleiding is alleen informatie beschikbaar in de vorm van een persoonlijke communicatie.⁵ Op basis van dezelfde subacute NOAEL leidde het UBA eenzelfde voorlopige TDI af van 2,5 µg/kg lg/dag en op basis daarvan een mogelijke richtwaarde voor drinkwater van 9 µg/liter (10% allocatie, lichaamsgewicht 70 kg). De gemaakte extrapolatie van subacuut naar chronisch werd door het UBA echter als niet gebruikelijk voor milieucontaminanten aangemerkt (mogelijk zou een hogere factor dan 6 gebruikt moeten worden) en daarom werd uiteindelijk gekozen voor een algemene grens voor drinkwater van 3 µg/liter (UBA 2015).⁶ Deze algemene grens maakt deel uit van de Duitse systematiek van pragmatische gezondheidskundige oriënteringswaarden voor niet of onvolledig te beoordelen drinkwaterverontreinigingen. De onderbouwing van de keuze voor deze specifieke waarde voor pyrazol wordt slechts beperkt weergegeven in de beschikbare persoonlijke communicatie.

³ US-EPA (1988) http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0352_summary.pdf (geraadpleegd op 26-11-2015)

⁴ Berekening: $[15 \times 2] / [1 \times 70] \times 10^{-4} \times 0,5 = 2 \cdot 10^{-5}$

(De factor 0,5 is de correctie voor de mol-equivalentie voor de hydrazinegroep in pyrazol ten opzichte van hydrazine (verhouding molecuulmassa's)).

⁵ Mail van dr. Alexander Eckhardt (Umweltbundesamt) aan mevr. Ulrike Schweden (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) d.d. 1 september 2015.

⁶ Deze defaultwaarde geldt volgens de systematiek van het UBA voor stoffen die op basis van beschikbare toxicologische gegevens niet genotoxisch zijn, niet kiemcelbeschadigend, niet neurotoxisch via de orale route en waarvoor een 90-dagentoxiciteitsstudie aanwezig is op basis waarvan de drinkwaterrichtwaarde niet lager is dan 1 µg/liter (referenties: UBA (2003) Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz **46**:249–251; Grummt T (2010) Presentation at 2. Treffen des „Mitteldeutschen Netzwerkes für Innovative Umwelttechnik“ FH-Anhalt in Köthen, 29. März 2010

<http://docslide.de/documents/arzneimittelrueckstaende-im-wasserkreislauf-methodische-konzepte-zur-risikobewertung-tamara-grummt-umweltbundesamt-dienstgebaeude-bad-elster-2-treffen.html>).

2.2 Aanvullend onderzoek naar genotoxiciteit met Toxtracker

Naar aanleiding van de indicatieve berekening voor de mogelijke genotoxische werking van pyrazol door het RIVM, heeft DSM een aanvullende test laten uitvoeren met het systeem Toxtracker. Dit testsysteem test op activering van bepaalde biomarkergenen afkomstig uit muizenembryostamcellen als maat voor de cellulaire respons op genotoxische stoffen. De uitslag met pyrazol was negatief (geen effect).⁷

Het nieuwe onderzoek met Toxtracker is door deskundigen van de betrokken bedrijven (DSM, AnQore en Sitech) gepresenteerd bij het RIVM tijdens een informatiebijeenkomst op 27 januari 2016. Daarbij gaf het RIVM aan dat het resultaat van dit onderzoek een verdere aanwijzing is dat pyrazol niet genotoxisch is (naast de negatieve test voor genmutaties in bacteriën). Om voor wat betreft de genotoxische werking door pyrazol een definitieve conclusie te trekken zouden echter aanvullende studies in gevalideerde testsystemen nodig zijn. Aanvullend zou getest moeten worden op genmutaties in zoogdiercellen in vitro en op chromosoombreuken in zoogdiercellen in vitro.⁸ DSM, AnQore en Sitech zegden toe deze testen uit te zullen voeren om duidelijkheid te scheppen over de genotoxische potentie van pyrazol.

2.3 Aanvullend onderzoek naar genotoxiciteit in zoogdiercellen in vitro

In opdracht van DSM voerde Charles River Laboratories te Den Bosch twee genotoxiciteitstesten uit, namelijk:

1. In vitro mammalian cell gene mutation test (OECD TG 490);
2. In-vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD TG 487)

Het RIVM heeft de resultaten van het aanvullende genotoxiciteitsonderzoek beoordeeld. De bevindingen zijn weergegeven in Bijlage 1 van dit document. De conclusie van deze beoordeling is dat pyrazol in beide testen negatief is bevonden zodat pyrazol beschouwd wordt als een niet-genotoxische stof.

3. Indicatieve richtwaarde voor levenslange blootstelling

De eerdere adviezen van het RIVM en het CET werden opgesteld ten behoeve van een incident en hielden rekening met een tijdelijke situatie. In verband met het mogelijk langduriger voorkomen van pyrazol in ruw water en drinkwater dan voor een periode van 2 jaar en gezien de Duitse gezondheidkundige oriëntatiewaarde van 3 µg/liter heeft het ministerie van IenM het RIVM gevraagd een (indicatieve) richtwaarde voor levenslange blootstelling aan pyrazol af te leiden.

Afleiding:

In de eerdere adviezen over pyrazol heeft het RIVM voor wat betreft de mogelijke genotoxische carcinogene werking bij gebrek aan informatie over pyrazol gerekend met de risicowaarde voor

⁷ Toxys (2015) Tox Tracker Test report version 1.0, Toxys project code 15009, sponsor reference PO 4500084780. Toxys B.V. rapport d.d. 1 december 2015. Vertrouwelijk rapport ter beschikking gesteld door DSM, Sittard, The Netherlands.

⁸ Voor genmutaties in zoogdiercellen werden de volgende testen geschikt geacht (OECD-richtlijnummers):
TG 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpvt genes
TG 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene
Voor chromosoombreuken:
TG 487: In vitro mammalian cell micronucleus test (voorkeurstest)
TG 473: in vitro mammalian cell chromosome aberration test

hydrazine. Uit het aanvullende onderzoek naar de mogelijke genotoxiciteit komt pyrazol naar voren als een niet-genotoxische stof. Dit maakt dat de kankerrisicoberekening op basis van hydrazine en de restrictie tot de periode van 2 jaar die deze berekening opleverde, kunnen vervallen. Op basis van een voorlopige TDI van 2,5 µg/kg lg/dag, geldend voor levenslange blootstelling, kan voor pyrazol een indicatieve richtwaarde van 15 µg/liter voor levenslange blootstelling afgeleid worden.

4. Conclusie

Op basis van de voorlopige TDI van 2,5 µg/kg lg/dag leidt het RIVM een indicatieve richtwaarde voor drinkwater af van 15 µg/liter. Deze waarde geldt voor levenslange blootstelling. Deze waarde is indicatief omdat de van de gebruikte toxicologische studies slechts de samenvattingen van de resultaten zoals aanwezig in de ECHA-database beschikbaar waren.

Bijlage 1

Beoordeling genotoxiciteitstesten RIVM (2016-09-28)

Genotoxicity assessment of pyrazole

For pyrazole, RIVM has received 2 test reports with in vitro genotoxicity tests (date: 15-7-2016).

In vitro mammalian cell gene mutation test (OECD TG 490).

Report summary

Effects of pyrazole on the induction of forward mutations at the thymidine-kinase locus (TK-locus) in L5178Y mouse lymphoma cells was tested in the absence of S9-mix with 3 and 24-hour treatment periods and in the presence of S9-mix with a 3 hours treatment period. Rat liver S9-mix was induced by a combination of phenobarbital and β -naphthoflavone. The experiments were in compliance with the most recent OECD guideline.

Pyrazole (crystals, CAS No 288-13-1, batch BCBK5273V, purity 99.3%) was dissolved in exposure medium (R5). In the first experiment, pyrazole was tested up to concentrations of 681 $\mu\text{g/ml}$ (~ 0.01 M, recommended in the guidelines) in the absence and presence of S9-mix. The incubation time was 3 hours. In the second experiment, pyrazole was again tested up to concentrations of 681 $\mu\text{g/ml}$ in the absence of S9-mix. The incubation time was 24 hours.

No toxicity was observed at this dose level in the absence and presence of S9-mix. This is the highest concentration recommended in the guidelines. The mutation frequency found in the solvent control cultures was within the acceptability criteria of this assay. Positive control chemicals, methyl methanesulfonate and cyclophosphamide, both produced significant increases in the mutation frequency.

Pyrazole did not induce a significant increase in the mutation frequency in the absence of S9-mix (3 hours and 24 hours incubation) or in the presence of S9-mix (3 hour incubation). It is concluded that pyrazole is not mutagenic in the mouse lymphoma L5178Y test system. [1]

Remarks of evaluator

The test was performed in accordance with the prevailing OECD technical guideline 490 and under GLP. The evaluator agrees with the conclusion in the study report that pyrazole is negative in this *in vitro* mammalian cell gene mutation test.

In-vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD TG 487)

Report summary

The effect of pyrazole on the number of micronuclei formed in cultured peripheral human lymphocytes was tested in the presence and absence of a metabolic activation system. Rat liver S9-mix was induced by a combination of phenobarbital and β -naphthoflavone. The possible clastogenicity and aneugenicity of pyrazole was tested in two independent experiments in compliance with the most recent OECD guideline.

Pyrazole (crystals, CAS No 288-13-1, batch BCBK5273V, purity 99.3%) was dissolved in culture medium. In the first cytogenetic assay, pyrazole was tested up to 681 $\mu\text{g/ml}$ ($= 0.01$ M) for a 3 hours exposure time with a 27 hours harvest time in the absence and presence of S9-fraction. This is the highest dose level recommended for testing in the guideline. In the second cytogenetic assay,

pyrazole was tested also up to 681 µg/ml for a 24 hours exposure time with a 24 hours harvest time in the absence of S9-mix.

The number of mono- and binucleated cells with micronuclei found in the solvent control cultures was within the 95% control limits of the distribution of the historical negative control database. The positive control chemicals, mitomycin C and cyclophosphamide both produced a statistically significant increase in the number of binucleated cells with micronuclei. The positive control chemical colchicine produced a statistically significant increase in the number of mononucleated cells with micronuclei. In addition, the number of mono- and binucleated cells with micronuclei found in the positive control cultures was within the 95% control limits of the distribution of the historical positive control database. It was therefore concluded that the test conditions were adequate and that the metabolic activation system (S9-mix) functioned properly.

Pyrazole did not induce a statistically significant and biologically relevant increase in the number of mono- and binucleated cells with micronuclei in the absence and presence of S9-mix, in either of the two experiments. It is concluded that this test is valid and that pyrazole is not clastogenic or aneugenic in human lymphocytes in this *in vitro* micronucleus test. [2]

Remarks of evaluator

The test was performed in accordance with the prevailing OECD technical guideline 487 and under GLP. The evaluator agrees with the conclusion in the study report that pyrazole is negative in this *in vitro* micronucleus test

Overall conclusion

Pyrazole was tested negative in an *in vitro* mammalian cell gene mutation test (OECD 490) and in an *in-vitro* mammalian cell micronucleus test' (OECD 487) and can therefore be considered as a non-genotoxic compound.

Jan van Benthem and Bianca van de Ven (RIVM); September 2016

References

1. Evaluation of mutagenic activity of pyrazole in an *in vitro* mammalian cell gene mutation test with L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Test Facility Study No. 512866. Charles River Laboratories Den Bosch B.V., 's-Hertogenbosch, The Netherlands. 5 July 2016
2. An *in vitro* micronucleus assay with pyrazole in cultured peripheral human lymphocytes. Test Facility Study No 512865 WIL Research Europe B.V. 's-Hertogenbosch, The Netherlands, 30 June 2016.