



Relevanz ionischer Mikroschadstoffe – Quantifizierung von Metformin und dessen Transformationsprodukt Guanylharnstoff in Biota

Sarah Knoll (sarah.knoll@uni-tuebingen.de), Stefanie Jacob (stefanie.jacob@uni-tuebingen.de), Rita Triebkorn (rita.triebhorn@uni-tuebingen.de), Carolin Huhn (carolin.huhn@uni-tuebingen.de)

Zusammenfassung

Zur Bestimmung von Metformin und Guanylharnstoff in Bachforellen wurde eine Methode basierend auf Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Massenspektrometrie entwickelt. Die Probenvorbereitung erfolgte durch eine einfache Extraktion mittels Methanol im Ultraschallbad. Durch eine Anpassung des Trennpuffers konnte die Methode an verschiedene Matrices und den damit verbundenen Matrixeffekten angepasst werden. Die Untersuchung von Bachforellenlarven aus einem Expositionsexperiment mit Metformin zeigte eine Abhängigkeit der Gewebekonzentration sowohl von der Expositionskonzentration als auch von der Temperatur.

Einleitung

Über die Kläranlagen gelangen viele organische Spurenstoffe aus verschiedenen Anwendungsgebieten in Oberflächengewässer. Vor allem Arzneimittel werden oft in Konzentrationen im ng/L bis µg/L-Bereich nachgewiesen (Halling-Sorensen et al., 1998). Über die Auswirkungen der eingetragenen Stoffe auf das aquatische Ökosystem und v.a. auf die darin lebenden Organismen ist bisher wenig bekannt. Dies zeigt sich auch am Beispiel des Antidiabetikums Metformin. Mit über 600 Millionen Tagesdosen gehört Metformin zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Arzneimitteln. Die verordnete Tagesdosis beträgt 500 bis 2500 mg als Metformin-Hydrochlorid. Nach der Einnahme wird davon nur etwa ein Drittel in den Körper aufgenommen, 70 % des Wirkstoffs werden unverändert ausgeschieden und gelangen über das Abwasser in die Kläranlage

(Scheurer et al., 2009, 2012). Dort wird Metformin mikrobiell anteilig zu Guanylharnstoff umgewandelt. Folglich werden beide Stoffe häufig in Gewässern nachgewiesen (Trautwein und Kümmerer, 2011). Das Forschungsprojekt Effect-Net beschäftigt sich u.a. mit der ökotoxikologischen Wirkung von Metformin und Guanylharnstoff auf aquatische Organismen, wie Bachforellen. Hierzu werden Expositionsversuche in Aquarien durchgeführt. Anschließend wird mittels analytischer Methoden die Aufnahme in verschiedene Gewebe untersucht.

Da Metformin und Guanylharnstoff sehr polar sind und bei umweltrelevanten pH Werten ionisch vorliegen (Tabelle 1), können die Stoffe mittels Routinemethoden wie Umkehrphasenchromatographie (RPLC) nur unzureichend retardiert bzw. getrennt werden (Hernandez et al. 2015, Reemtsma et al. 2016). Somit stellt sich die Herausforderung, neue analytische Methoden zu entwickeln. Die Kapillarelektrophorese (CE) stellt eine Alternative für den Nachweis polarer und v.a. für ionische Stoffe dar, da diese nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis getrennt werden. Weitere Vorteile sind vor allem die wesentlich höhere Trenneffizienz, häufig hohe Trennselektivität, der geringere Lösungsmittelverbrauch, die kürzere Analysenzeit und die hohe Matrixtoleranz. Darüber hinaus bietet die CE eine flexiblere Methodenentwicklung, da einfache Quarzkapillaren verwendet werden (Ramautar et al. 2011). Ein Nachteil ist jedoch die beschränkte Beladbarkeit, da Kapillaren mit Innendurchmessern (ID) von nur 50 µm verwendet werden. Dies kann zu relativ hohen Nachweisgrenzen führen.

Tabelle 1: Eigenschaften der untersuchten Zielsubstanzen

Substanz	Mr [g/mol]	log D (pH 7)	pK _s -Wert	Strukturformel (pH 7-Spezies)
Metformin	129,2	-5,7	10,3 und 12,3	
Guanylharnstoff	102,1	-3,9	9,8	

Material und Methoden

Expositionsversuche mit Bachforellenlarven

Bachforelleneier wurden im Augenpunktstadium (Alter: 48 Tage nach Befruchtung) gegenüber fünf verschiedenen Konzentrationen von Metformin (0, 1, 10, 100, 1000 µg/L) im Triplikat bei 7 und 11 °C in Klimakammern exponiert. Die Exposition fand in einem semi-statischen System mit belüfteten Glasaquarien statt, die jeweils 28 Eier und 10 L Testmedium enthielten. Nach 57 Tagen Exposition bei 11 °C bzw. 73 Tagen bei 7 °C wurde die Hälfte der Testorgansimen beprobt. Die zweite Probenahme fand nach 95 Tagen Exposition bei 11 °C bzw. 108 Tagen bei 7 °C statt. Hierbei befanden sich die Fische im Stadium acht Wochen nach Aufzehrung ihres Dottersacks. Zur Analyse der internen Metforminkonzentration in Geweben der Fische wurden Proben vom Kopf (ohne Kiemen) bis zur Schwanzflosse inklusive Niere und Muskel (keine Leber und Darm) extrahiert. Da bei Guanylharnstoff die aufgenommenen Konzentrationen sehr gering waren, wird hier der Fokus auf die Metforminanalytik gelegt.

Probenvorbereitung und Analytik

Um die Aufnahme von Metformin zu untersuchen, wurden Gewebeproben von Fischen untersucht, die den unterschiedlichen Konzentrationen bei 7 °C oder 11 °C gegenüber exponiert waren, wobei von jedem Testansatz drei Pools gebildet wurden, die von 21 Tieren stammten. Die bei -20°C gefrorenen Gewebeproben wurden unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Anschließend wurden Aliquote eingewogen,

interne Standardlösung hinzugefügt und die Proben im Ultraschallbad mit Methanol extrahiert. Nach Membranfiltration erfolgte die Messung mittels CE-MS. Zur Messung wurde eine Kapillarelektrophorese (CE 7100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) gekoppelt mit Massenspektrometrie (6550 iFunnel Q-TOF Massenspektrometer, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) und einer ESI Ionenquelle, welche durch ein Sheath Liquid Interface unterstützt wurde, verwendet. Für die elektrophoretische Trennung wurde eine unbeschichtete Quarzkapillare (Länge 80 cm, ID 50 µm) genutzt. Als Trennpuffer diente eine Mischung aus 25 mM Ammoniumacetat und 3 % Essigsäure in Methanol. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch über einen Druck von 100 mbar für 10 s. Während der Messungen wurde die Temperatur der Kapillare konstant auf 25 °C gehalten und eine Spannung von +30 kV angelegt.

Ergebnisse

Mit der beschriebenen kapillarelektrophoretischen Methode ließen sich Metformin sowie Guanylharnstoff in einer methanolischen Standardlösung mit ausreichender Auflösung in < 9 Min. trennen (Abbildung 1).

Die Leistungsfähigkeit der Analysemethode wurde weiterhin über vier Kriterien (Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Linearität und Präzision) bewertet (Tabelle 2).

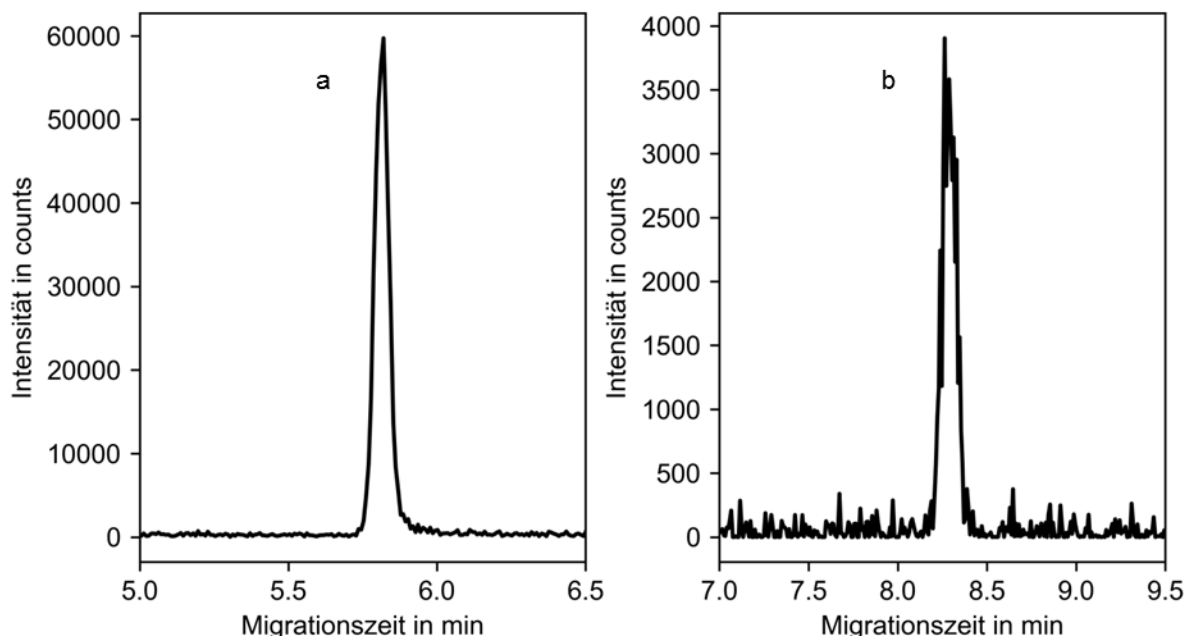


Abbildung 1: Extrahierte Ionenspuren der Zielsubstanzen, Puffer: 25 mM Ammoniumacetat in Methanol mit 3 % Essigsäure; a: Metformin; b: Guanylharnstoff; methanolische Standardlösung; Injektion: 100 mbar x 10s.

Tabelle 2: Untersuchte Analyte (methanolische Standardlösung) mit den zugehörigen LOD, LOQ, linearen Regressionskoeffizienten und Wiederholpräzision der Peakflächen (RSD).

Stoff	LOD [$\mu\text{g/L}$]	LOQ [$\mu\text{g/L}$]	Linearitätsbereich [$\mu\text{g/L}$]	R^2	RSD (Fläche, $n=6$) [%]
Metformin	0,5	1,4	0,1 – 40	0,998	2
Guanylharnstoff	1,9	5,6	5 - 70	0,993	9

Anschließend wurden mittels der entwickelten Methode Bachforellenlarvenextrakte aus den Expositionsversuchen mit Metformin untersucht. Aufgrund der komplexen Probenmatrix traten Quenchingeffekte, verursacht durch co-migrierende Matrixkomponenten, auf. Da Vorarbeiten zeigten, dass Ammo-

niacetat einen Einfluss auf die Trennselektivität hat, wurden verschiedene Salzkonzentrationen im Hintergrundelektrolyten getestet. Mit der Erhöhung der Ammoniumacetatkonzentration auf 100 mM konnte eine ausreichende Trennung erzielt werden (Abbildung 2).

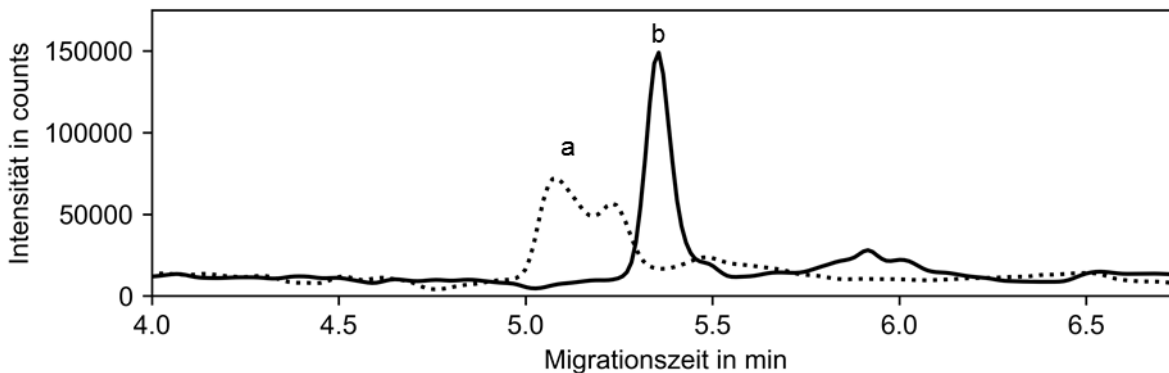


Abbildung 2: Extrahierte Ionenspuren von Metformin in einem Bachforellenlarvenextrakt, a: 50 mM Ammoniumacetat; b: 100 mM Ammoniumacetat; Injektion: 100 mbar x 10s.

Die chemische Analyse des Gewebes der Bachforellenlarven zeigt zum einen den Anstieg der Metforminkonzentration in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration (Abbildung 3). Zusätzlich konnte der Einfluss der Expositionstemperatur auf die Anreicherung von Metformin im Fischgewebe gezeigt werden. Insbesondere für die höchste Metforminkonzentration war die Gewebekonzentration des Arzneimittels bei Fischen, die bei 11 °C exponiert waren, höher als bei der niedrigeren Temperatur. Diese Tatsache kann durch einen erhöhten Metabolismus und/oder eine höhere Metforminaufnahme bei höheren Temperaturen erklärt werden (Jacob et al. 2018). Allgemein liegen die internen Konzentrationen im ng/g-Bereich und der daraus resultierende höchste Biokonzentrationsfaktor wurde zu 0,5 berechnet. Somit ist das Kriterium „bioakkumulierbar“ für Metformin gemäß der REACH-Verordnung nicht erfüllt. Dies ist u.a. auf die hohe Polarität von Metformin (Tabelle 1) zurückzuführen.

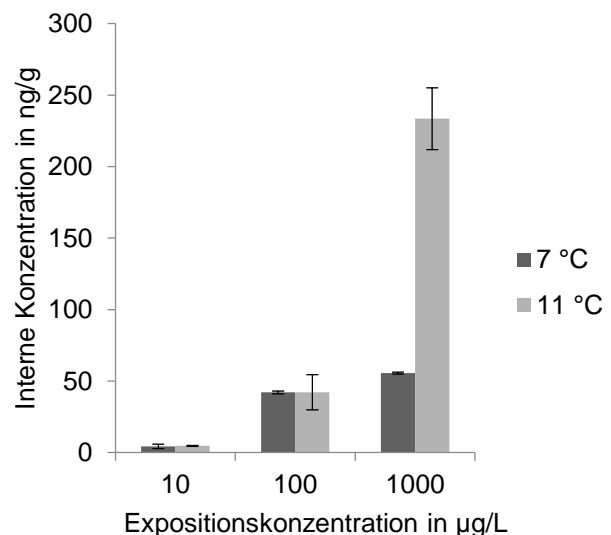


Abbildung 3: Korrelation zwischen der Metforminkonzentration in Bachforellen und deren Exposition bei zwei Temperaturen

Diskussion und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass sich die entwickelte Methode, basierend auf Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Massenspektrometrie, für den Nachweis von Metformin vor allem aufgrund der hohen Trennselektivität in komplexen Matrices sehr gut eignet. Durch eine einfache Pufferadaption kann die Methode an verschiedene Matrices angepasst werden. Weiterhin ist die vorgestellte Analysenmethode durch die einfache Probenvorbereitung und den geringen Lösungsmittelverbrauch weit umweltschonender als andere Trenntechniken. Für die Analytik von Oberflächengewässern muss die Bestimmungsgrenze von Metformin, die derzeit bei 1,4 µg/L (Tabelle 2) liegt, allerdings über weitere Aufkonzentrierung noch verbessert werden.

Danksagung

Die Autoren danken dem Wassernetzwerk Baden-Württemberg für die Finanzierung des Forschungsprojektes Effect-Net, in dessen Rahmen diese Studie durchgeführt wurde.

Literatur

- Halling-Sorensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Holten, H.C.; Liitzhofl and Jorgensen, S.E., Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 1998, 36 (2), 357-393.
- Hernandez, F.; Ibanez, M.; Portoles, T.; Cervera, M. I.; Sancho, J. V.; Lopez, F. J., Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters. *J Hazard Mater* 2015, 282, 86-95.
- Jacob, S.; Dotsch, A.; Knoll, S.; Kohler, H. R.; Rogall, E.; Stoll, D.; Tisler, S.; Huhn, C.; Schwartz, T.; Zwiener, C.; Triebskorn, R., Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? *Environ Sci Eur* 2018, 30 (1), 48.
- Ramautar, R.; Mayboroda, O. A.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J., CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008-2010. *Electrophoresis* 2011, 32 (1), 52-65.
- REACH Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH).
- Reemtsma, T.; Berger, U.; Arp, H. P.; Gallard, H.; Knepper, T. P.; Neumann, M.; Quintana, J. B.; Voogt, P., Mind the gap: Persistent and mobile organic compounds-water contaminants that slip through. *Environ Sci Technol* 2016, 50 (19), 10308-10315.
- Scheurer, M.; Michel, A.; Brauch, H.-J.; Ruck, W.; Sacher, F., Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Research* 2012, 46 (15), 4790-4802.

Scheurer, M.; Sacher, F.; Brauch, H. J., Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *J Environ Monit* 2009, 11 (9), 1608-13.

Trautwein, C.; Kümmerer, K., Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product guanylurea. *Chemosphere* 2011, 85 (5), 765-73.

Korrespondenzadresse

Sarah Knoll
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Eberhard Karls Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen
E-Mail: sarah.knoll@uni-tuebingen.de