



Screening des Verhaltens von Arzneimittelwirkstoffen in einem Wasser-Sediment-Testsystem

Michael Radke (michael.radke@itm.su.se),
Michael Maier¹ (michael.maier@helmholtz-muenchen.de)
¹Helmholtz Zentrum München

Abstract

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Persistenz einiger Arzneimittelwirkstoffe in Sediment-Wasser-Testsystemen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede der Dissipationszeiten zwischen Sedimenten beträchtlich sein können, im Extremfall von Ibuprofen wurden Unterschiede bis zu Faktor 20 zwischen zwei Flüssen beobachtet. In Sediment-Wasser-Tests werden üblicherweise zwei Sedimente eingesetzt, und die gemessenen absoluten Dissipationszeiten dienen als Grundlage zur Stoffbeurteilung. Auf Grund der beobachteten Variabilität der Eliminierung ist dieses Vorgehen insbesondere für solche Substanzen problematisch, deren Eliminierungsgeschwindigkeit in der Nähe solcher Limits liegt. Ein relativer Ansatz mit verschiedenen Referenzsubstanzen, der an Hand der vorliegenden Ergebnisse getestet werden kann, könnte hier eine objektivere Beurteilung ermöglichen.

Einleitung

Zur Beurteilung der Persistenz organischer Spurenstoffe werden häufig sogenannte Simulations-Tests eingesetzt. Für das System Sediment/Wasser basieren diese Tests in der Regel auf der OECD 308-Richtlinie [1]. Die Tests werden mit zwei Sedimenten durchgeführt, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Textur, C-Gehalt) substantiell unterscheiden und aus unkontaminierten Gewässern gewonnen werden. Üblicherweise werden solche Simulationstests mit radioaktiv markierten Testsubstanzen durchgeführt [2-5], um neben dem Primärabbau auch das Ausmaß der Mineralisierung sowie die Bildung von Transformationsprodukten zu erfassen. Dieses Vorgehen besitzt allerdings den Nachteil, dass nicht mehrere Substanzen im gleichen Testsystem untersucht werden können, ferner sind Tests mit radioaktiv markierten Substanzen verhältnismäßig teuer und aufwändig. Alternativ können solche Tests mit unmarkierten Substanzen durchgeführt werden. Dies erlaubt die simultane Untersuchung mehrerer Stoffe und damit den direkten Vergleich des Abbauverhaltens unter Ausschaltung einiger ansonsten unvermeidlicher Variabilitäten. Das Ziel dieser Studie war, den Primärabbau einiger gängiger Arzneimittelwirkstoffe im Sediment-Wasser-System vergleichend zu untersuchen, wobei die Unterschiede zwischen verschiedenen Sedimenten im Vordergrund standen. Hierzu wurden Sedimente verwendet, die an mehreren Probenahmepunkten in drei Flüssen gewonnen wurden. Untersucht wurden saure Pharmaka (Furosemid, Ibuprofen, Naproxen) sowie zwei Betablocker (Metoprolol, Propranolol). Es kam ein im Vergleich zur OECD-Richtlinie deutlich vereinfachter experimenteller Aufbau zu

Einsatz, der sich auf die Dissipation aus der Wasserphase als Zielgröße beschränkte.

Material und Methoden

Für die Studie wurde Sediment von den Flüssen Roter Main (bei Bayreuth, Deutschland), Gründlach (bei Erlangen, Deutschland) und Säva Brook (bei Uppsala, Schweden) verwendet. Aus dem Säva Brook, der keine Abwassereinträge enthält, wurde Sediment (tonige Textur) am Mittellauf (Sä_M; 2,4 % C_{org}) gewonnen. Am Roten Main wurden zum einen Proben vom Standort Schlehenmühle (Sand) gewonnen, der weitgehend unbeeinflusst von Abwassereinträgen ist. Sediment von diesem Standort wurde zwei Mal im Abstand von ca. einem Jahr getestet (RM_S_S bzw. RM_S_S1; 0,1 % C_{org}). Zum anderen wurde der Standort Heinersreuth beprobt, ca. 3 km unterstrom der Kläranlage Bayreuth. Hier wurde sowohl ein sandiges (RM_H_S; 0,1 % C_{org}) als auch ein toniges Sediment (RM_H_M; 2,0 % C_{org}) gewonnen. An der Gründlach wurden drei Sedimente entlang eines ca. 11 km langen Transekts abstromig der Kläranlage Heroldsberg beprobt. Diese Experimente sind noch nicht abschließend ausgewertet, so dass hier nur Ergebnisse der Rotmain- bzw. Säva-Sedimente vorgestellt werden können. Alle Sedimente wurden auf <2 mm nass gesiebt, um Steine und grobe organische Anteile zu entfernen, und bis zum Versuchsbeginn kühl gelagert.

Anstelle von zum jeweiligen Probenahmepunkt korrespondierendem Flusswasser, wie in der OECD-Richtlinie vorgesehen, wurde ein synthetisches Flusswasser hergestellt, so dass die Sediment-Herkunft als einzige Variable untersucht werden konnte. Dieses Wasser enthielt Glucose als Kohlenstoff-Quelle sowie die wesentlichen Nähr- und Spurenelemente. Die Versuche wurden in 1L-Glasflaschen durchgeführt. Je Flasche wurden ca. 200 g Sediment (Nassgewicht) eingewogen, anschließend wurden 600 mL des synthetischen Flusswassers hinzugefügt; es wurden grundsätzlich 2 bzw. 3 Replikate untersucht. Die Versuche wurden bei 15°C und in Dunkelheit durchgeführt. Die Wasserphase wurde kontinuierlich mit Druckluft beaufschlagt, so dass diese durchgängig sauerstoffgesättigt war. Nach einer einwöchigen Equilibrierungsphase wurde die Wasserphase abgezogen und durch 600 mL frisches synthetisches Flusswasser ersetzt, dem die Testsubstanzen in einer Konzentration von 100 bzw. 200 µg L⁻¹ zudosiert waren. Ferner wurden sterile Kontrollen der Sedimente RM_S und Sä_M mitgeführt. Das Sediment wurde autoklaviert, und in die Wasserphase wurde NaN₃ (0,1%) gegeben.

Während der Inkubationszeit von max. 40 Tagen wurden zu mindestens 9 Zeitpunkten Proben aus der Wasserphase entnommen und über PTFE-Spritzenfilter filtriert. Vor der Analyse wurden deuterierte interne Standards zugegeben; anschließend wurden die Proben mittels UPLC-qTOF-MS analysiert. Aus dem Konzentrationsverlauf über die Zeit wurde die Zeit ermittelt, nach der 50 % der Testsubstanz aus der Wasserphase eliminiert wurden (DT_{50}). Hierzu wurde eine Kinetik pseudo-erster Ordnung herangezogen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Konzentration aller Substanzen ging im Lauf der Experimente zurück, die bestimmten DT_{50} lagen zwischen ca. 3 und 52 Tagen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der ermittelten DT_{50} . Die Elimination der untersuchten Substanzen folgte in aller Regel einer Kinetik pseudo-erster Ordnung, eine lag-Phase wurde für keine der Substanzen beobachtet.

	RM_H_M	RM_H_S	RM_S_S	RM_S_S1	Sä_M
Furosemide	21	15	15	21	52
Ibuprofen	5.0	3.2	2.4	3.2	45
Naproxen	4.8	14.	12	17	16
Metoprolol	6.1	10	25	14	11
Propranolol	3.0	13	14	12	10
Fluss	Roter Main	Roter Main	Roter Main	Roter Main	Säva Brook
Standort	Heinser-sr.	Heinser-sr.	Schlehen-m.	Schlehen-m.	Mittellauf
Textur	Ton	Sand	Sand	Sand	Ton
C_{org} (%)	1.98	0.11	0.12	0.12	2.36

Tabelle 1: Gemessene DT_{50} der fünf Arzneimittelwirkstoffe in den verschiedenen Experimenten sowie Details zu den verwendeten Sedimenten. Der Übersichtlichkeit halber wurde die Unsicherheit der einzelnen Werte nicht dargestellt. Die durchschnittliche relative Abweichung vom Mittelwert beträgt über alle Experimente und Stoffe 7 %.

An Hand der sterilen Kontrollen wird deutlich, dass die Elimination der Beta-Blocker Metoprolol und Propranolol auf eine Kombination aus Sorption und mikrobiellen Transformationsprozessen zurückzuführen ist, wobei Sorption der dominierende Prozess ist (Abbildung 1). Bei den sauren Wirkstoffen Ibuprofen, Naproxen und Furosemid dominiert hingegen die mikrobielle Transformation, Sorption ist von untergeordneter Bedeutung (Abbildung 1).

Die Interpretation der Konzentrationsverläufe der Betablocker bereitet mehrere Schwierigkeiten: i) Im Lauf des Tests stellt sich kein Sorptionsgleichgewicht ein, wie an Hand der Sterilkontrolle (Abbildung 1) erkennbar ist. Dies kann vermutlich auf den rein diffusiven Austausch zwischen Wasser und Sediment sowie die relativ dicke Sedimentschicht zurückgeführt werden. Ferner bildet sich – bedingt durch die anfängliche Störung des Sediments bei der Herstellung der Tests – durch Ablagerung von Feinmaterial an der Sediment-Oberfläche häufig eine Art Kolmationsschicht, die den Transfer über die Sediment-Wasser-Grenze zusätzlich erschwert. Auch ein kinetisch kontrollierter Sorptionsprozess kann nicht ausgeschlossen werden. An Hand der Ibuprofen-Daten, die die Sterilität des Ansatzes bestätigen, erscheint ein Beitrag mikro-

bieller Prozesse zur Konzentrationsabnahme von Propranolol unwahrscheinlich. ii) Die Konzentrationsabnahme in der Sterilkontrolle erfolgt teilweise geringfügig schneller als in den unsterilen Tests mit dem gleichen Sediment. Dies deutet auf eine Modifikation des Sediments durch die Sterilisierung im Autoklaven hin; dies war auch beim visuellen Vergleich der Sedimente zu Versuchsbeginn erkennbar. Daher können die Ergebnisse der sterilen und unsterilen Ansätze nicht direkt miteinander verrechnet werden, um den Beitrag des mikrobiellen Primärabbaus zu ermitteln. iii) Die Auswirkung der Autoklavierung auf die Sedimentstruktur ist besonders drastisch bei feinerem Sediment; bei den verwendeten tonigen Sedimenten war es auf Grund der Zerstörung der Tonminerale teilweise nicht möglich, aussagekräftige Sterilkontrollen durchzuführen. Hier wäre die direkte Messung der am Sediment sorbierten Stoffmenge in den unsterilen Ansätzen hilfreich, die jedoch auf Grund des Experiment-Designs nicht möglich ist.

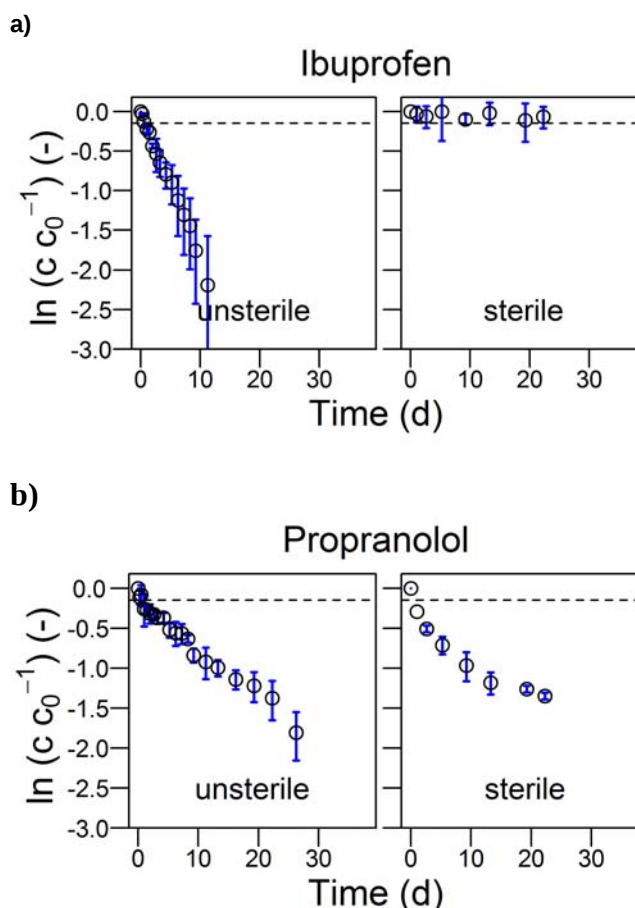


Abb 1: Konzentrationsverläufe von Ibuprofen (a.) und Propranolol (b.) in Experiment RM_S_S. Jeweils dargestellt sind die Mittelwerte der drei (unsteril) bzw. zwei (steril) Replikate sowie die Spanne der ermittelten Konzentrationen. Die im Lauf des Versuchs zunehmende Streuung bei Ibuprofen (unsteril) kann auf die unterschiedliche Kinetik in den drei Replikaten zurückgeführt werden, die Kinetik für die einzelnen Replikate war jeweils linear. Die gestrichelte horizontale Linie stellt die Konzentration dar, die bei Equilibrierung zwischen Wasserphase und Sediment zu erwarten ist.

Insgesamt verdeutlicht der Vergleich der Sedimente sowie der Testsubstanzen, dass die Aussagekraft von Sediment-Wasser-Tests Limitierungen unterworfen ist. Die Ergebnisse können von Ort und Zeitpunkt der Sediment-Gewinnung stark beeinflusst werden, wobei diese Randbedingungen sich nicht systematisch auf alle Stoffe gleich auswirken. Die Variation der DT_{50} in Sedimenten innerhalb eines Gewässers kann für manche Substanzen erheblich größer sein als in Sedimenten von zwei stark verschiedenen Fließgewässern, für andere Substanzen ist es umgekehrt. Dies legt nahe, dass bei einem Test mehr als die normalerweise eingesetzten 2 Sedimente verwendet werden sollten, um belastbare Ergebnisse über die Persistenz zu erhalten. Ferner erscheint es aus unserer Sicht auf Grund dieser Variabilitäten problematisch, die Über-/Unterschreitung eines festgelegten DT_{50} -Werts als hartes Kriterium für die Einstufung der Persistenz-Eigenschaften eines Stoffes zu verwenden. Alternativ bietet sich die Möglichkeit, Stoffe mit ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften relativ zu bewerten. Dies ist am Beispiel von Naproxen in Abbildung 2 dargestellt, dessen DT_{50} relativ zu Ibuprofen und Furosemid als „Referenzsubstanzen“ berechnet wurde. Diese Darstellung verdeutlicht die Chancen der Betrachtung relativ zu einer oder mehreren Referenzsubstanzen: während Naproxen im Vergleich zur Referenz Ibuprofen meist langsamer aus der Wasserphase eliminiert wurde, war seine Eliminierung durchgängig schneller als die von Furosemid. Eine geeignete Auswahl solcher Referenzsubstanzen, die parallel zur eigentlichen Zielsubstanz des Tests untersucht werden, erlaubt folglich Aussagen, die wesentlich weniger von experimentellen Variabilitäten und Unsicherheiten abhängen als die Verwendung absoluter DT_{50} .

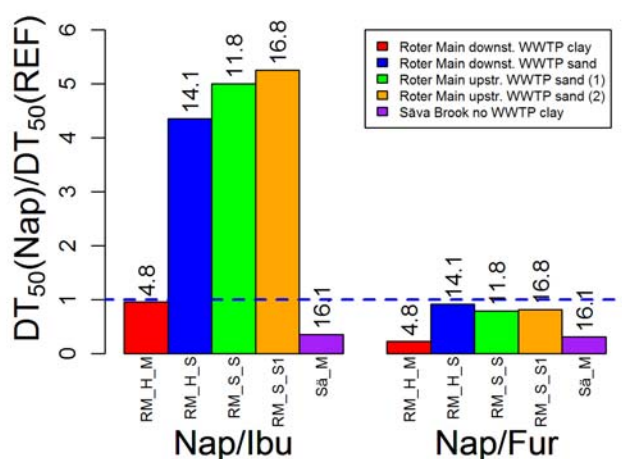


Abb. 2: Relative DT_{50} von Naproxen normiert auf Ibuprofen (links) bzw. Furosemid (rechts). Zur Information ist die DT_{50} jeweils oberhalb der entsprechenden Säule dargestellt.

Das hier eingesetzte Testsystem ermöglicht die vergleichsweise einfache Durchführung von Sediment-Wasser Tests, so dass es zur Priorisierung der in weitergehenden Tests zu untersuchenden Substanzen eingesetzt werden kann. Modifikationen des Systems, zum Beispiel eine Homogenisierung des Systems nach der Zudosierung der Testsubstanzen und

der weitgehende Verzicht auf einen wässrigen Überstand, würden die Aussagekraft weiter erhöhen und die Ableitung von Geschwindigkeitskonstanten ermöglichen. Dies gilt analog für das Test-Design in der OECD 308-Richtlinie, das den selben Limitierungen unterworfen ist.

Danksagung

Die Arbeiten wurden im Rahmen der DFG-Projekte Ra 896/10-1 bzw. -2 durchgeführt und darüber hinaus vom DAAD unterstützt.

Referenzen

- [1] OECD, Test 308: Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2002.
- [2] Prasse, C.; Löffler, D.; Ternes, T., Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system. Chemosphere 2009, 77, 1321-1325.
- [3] Davis, J. W.; Stanley, J. G.; Markham, D. A.; Friedrich, U.; Hunziker, R. W.; Ariano, J. M., Biodegradation and product identification of [14C]hexabromocyclododecane in wastewater sludge and freshwater aquatic sediment. Environ. Sci. Technol. 2006, 40, 5395-5401.
- [4] Ericson, J. F., An evaluation of the OECD 308 water/sediment systems for investigating the biodegradation of pharmaceuticals. Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 5803-5811.
- [5] Kalsch, W., Biodegradation of the iodinated X-ray contrast media diatrizoate and iopromide. Sci. Tot. Environ. 1999, 225, 143-153.

Korrespondenzadresse:

Michael Radke
Department for Applied Environmental Science
Stockholm University
10691 Stockholm, Sweden