



Metabolisierung von Arzneimitteln in Pflanzen

Methodenentwicklung zur Detektion im umweltrelevanten Spurenbereich

Lisa Emhofer

Institut für Analytische Chemie, Johannes Kepler Universität

Durch das stetige Bevölkerungswachstum, zunehmende chronische Krankheiten, sowie die Fortschritte in der Medizin steigt der Arzneimittelkonsum kontinuierlich an. Allein für Deutschland soll bis 2045 die Zunahme zwischen 40 - 65% des momentanen Bedarfs betragen. [1]

Negative Auswirkungen sind, dass Rückstände von Arzneimitteln in die Umwelt eingetragen werden. Die größte Kontaminationsquelle sind Kläranlagen. Ausscheidung der vom Körper nicht aufgenommenen Pharmazeutika, Abwaschen von äußerlich applizierten Medizinprodukten (zum Beispiel Cremes) und auch die unsachgemäße Entsorgung von Präparaten führen dazu, dass Arzneimittel in die kommunalen Abwässer gelangen.

Obwohl die Abwässer in Kläranlagen aufgereinigt werden, sind diese häufig nicht im Stande, die verschiedenen pharmazeutisch aktiven Substanzen vollständig aus den Wässern zu entfernen. Werden die aufbereiteten Wässer in Oberflächengewässer rückgeleitet, kommt es unweigerlich zu einer Kontamination der Umwelt. Häufig werden dabei Antibiotika, nichtsteroidale Antirheumatika und Antiepileptika nachgewiesen, welche sich im ng/l bis in den niedrigen µg/l Bereich in aufgereinigten Wässern befinden können. [2]

Interaktionen von Arzneimitteln mit Pflanzen

Durch den Klimawandel und die damit größer werdende Trockenheit werden geklärte Wässer in Ländern wie zum Beispiel Israel mittlerweile direkt wiederverwendet und zur Bewässerung in der Landwirtschaft eingesetzt. Obwohl dies zur Schonung der Wasserressourcen

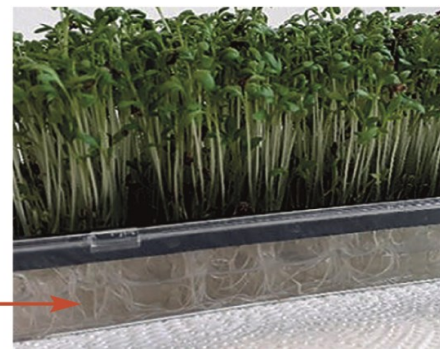
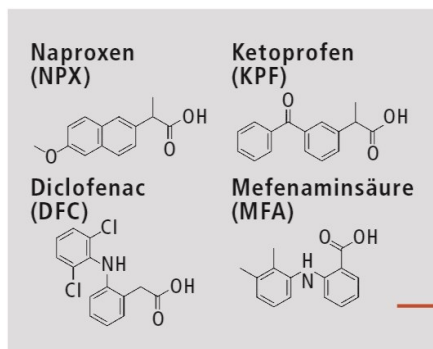


Abb. 1: Untersuchte Nichtsteroidale Antirheumatika

beiträgt, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass dies zu Interaktionen der (pharmazeutischen) Rückstände im Wasser mit den Pflanzen führen kann. Aufgereinigte Wässer sowie Klärschlamm als Düngemittel stellen somit eine Gefahr für die Lebensmittelsicherheit dar. [2]

Zahlreiche Studien präsentierten Methoden zur Spurenanalyse von Arzneimitteln und zeigten, dass verschiedenste Pflanzen (wie Salat, Tomate, Gurke, Spinat, ...) pharmazeutisch aktive Substanzen von ihrer Umwelt aufnehmen und auch innerhalb der Pflanze weiter transportieren [2].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen ist nicht auszuschließen, dass pharmazeutisch aktive Substanzen innerhalb der Pflanzen im Zuge der Detoxifizierung zu neuen Verbindungen umgewandelt bzw. metabolisiert werden. Erste Studien mit Zellkulturen oder Hydrokulturen zeigten, dass Hydroxylierungen und Konjugationen mit Zuckern und Aminosäuren der Arzneimittel stattfinden können (in Anlehnung an das Drei-Phasen-Modell) [3].

Die Identifizierung von Metaboliten ist dabei essenziell, um die Aufnahme von

Arzneimitteln durch Pflanzen in der Umwelt vollständig beschreiben und aufklären zu können. Denn eine ausschließliche Fokussierung auf die Wirkstoffe selbst, könnte dazu führen, dass das Ausmaß der Arzneimittelaufnahme unterschätzt wird, lediglich weil gebildete Metaboliten (möglicherweise vorliegend in hohen Konzentrationen) von den bisher angewandten Methoden nicht erfasst werden.

Identifizierung von Metaboliten

In diesem Forschungsprojekt wurde die Aufnahme und Metabolisierung von Pharmazeutika in der Modellpflanze Kresse (*Lepidium sativum*) untersucht. Diese wurde den vier verschiedenen Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) Diclofenac (DCF), Naproxen (NPX), Ketoprofen (KPF) und Mefenaminsäure (MFA) ausgesetzt (Abbildung 1).

Die Pflanzen wurden hydroponisch kultiviert, geerntet und schließlich mit einem geeigneten Lösungsmittelgemisch extrahiert. Zur Identifizierung möglicher Metaboliten wurden die Extrakte mittels RP-HPLC getrennt und anschließend mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (hier Flugzeitmassenspektrometer) analysiert.

Durch intensive Analyse der erhaltenen Massenspektren und den Vergleich mit unbehandelten Pflanzen konnten 16 Metaboliten identifiziert und Strukturvorschläge erbracht werden. Dabei handelte es sich um Hydroxylierungsprodukte (OH) oder Konjugate mit Glukose (glu), Malonsäure (mal), Glutamin und Glutaminsäure (Abbildung 2). Für diese Experimente wurden die Pflanzen mit hohen Arzneimittelkonzentrationen (> 1 mg/l) behandelt, um die Identifizierung der Metaboliten zu erleichtern. [4]

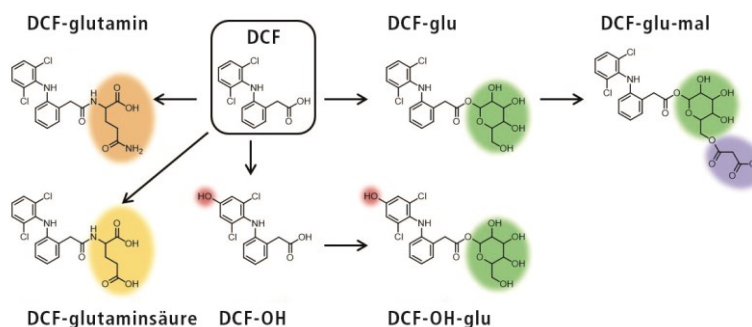


Abb. 2: Schematische Darstellung der Metabolisierung von DCF mit Strukturvorschlägen der Metaboliten

Nach dem dies geglückt war, war der weitere Anspruch, eine hochsensitive und selektive Methode zu entwickeln, die die Detektion der vier NSAR sowie ihrer Metaboliten erlaubt, wenn Pflanzen sehr niedrigen umweltrelevanten Konzentrationen ausgesetzt sind. Ein erster Schritt war die Adaptierung der Probenvorbereitung, sodass eine Aufkonzentrierung der Pflanzenextrakte möglich war.

Des Weiteren wurde zur Erhöhung der Sensitivität ein Triple-Quadrupole-Massenspektrometer im MRM-Modus (multiple reaction monitoring) als Detektor eingesetzt. Allerdings reichte die Leistung der zur Verfügung stehenden Analysengeräte nicht aus, um in den gewünschten Konzentrationsbereich vorzustoßen. Dies konnte schließlich durch die Kopplung der HPLC mit der neuesten Generation des Triple-Quadrupole-Massenspektrometers (LCMS-8060) realisiert werden.

LCMS zur Entwicklung einer hochsensitiven Methode

Ziel der Arbeit war es, eine hochsensitive und selektive Methode zu entwickeln, die die Detektion der Arzneimittel, aber vor allem auch der identifizierten Metaboliten erlaubt, wenn Pflanzen sehr niedrigen umweltrelevanten Konzentrationen ($\leq 1 \mu\text{g/l}$) ausgesetzt sind. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte auf einer Atlantis T3 Säule (3 μm ; 150 mm x 2,1 mm) von Waters unter Anwendung eines Wasser / Acetonitril-Gradienten (+ 0,1% Ameisensäure) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min.

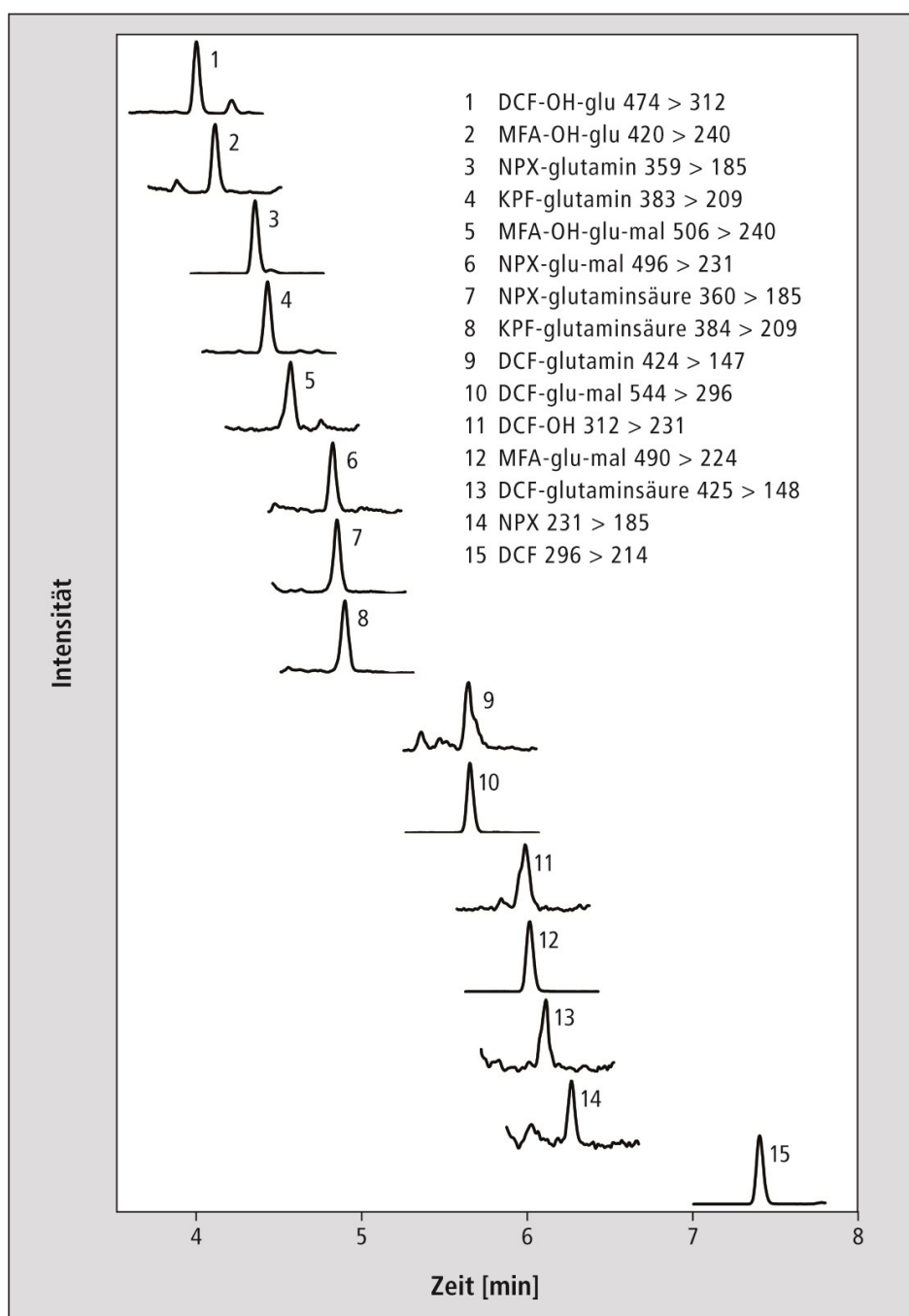


Abb. 3: HPLC-MS/MS Chromatogramme eines Wurzelextrakts nach der Behandlung von Kresse mit 1 $\mu\text{g/l}$ je NSAR

Nach der Anpassung und intensiver Optimierung der HPLC sowie der Triple-Quadrupole-Methode zeigte sich bereits, dass die Nachweisgrenzen der vier NSAR um einen Faktor 25 gesenkt werden konnten. Bei der Analyse der Pflanzenextrakte, bei denen Kresse 1 µg/l je NSAR ausgesetzt wurde, konnten in den Wurzeln der Pflanzen 15 Analyten (sprich 75% der Analyten) nachgewiesen werden (Abbildung 3). Im oberen Teil der Pflanze ließen sich bei dieser Konzentration noch neun Analyten detektieren. Bei einer Arzneimittelkonzentration von lediglich 0,1 µg/l je NSAR wurden mit der entwickelten Methode noch sieben Analyten in den Kressewurzeln nachgewiesen.

SFC – eine alternative komplementäre Trennmethode?

Es konnte außerdem eine alternative Methode entwickelt werden, bei der die Analyten mittels Überkritischer Flüssigkeitschromatographie (SFC) aufgetrennt wurden. Es wurden verschiedene Säulen getestet und die Parameter der SFC (Art und Flussrate des Modifiers und des Make-up Flusses) sowie des Massenspektrometers optimiert. Schließlich wurden die Extrakte auf einer Shim-pack UC-Diol (3 µm; 4,6 mm x 150 mm) Säule getrennt. Als mobile Phase wurde überkritisches CO₂ mit Methanol (5 - 45%) als Modifier bei einer Flussrate von 3 ml/min verwendet und zur besseren Ionisierung wurde post-column ein Make-up Fluss zudosiert.

Im Gegensatz zur HPLC zeigte die SFC ein komplementäres Elutionsverhalten der Analyten, und die apolareren NSAR eluierten bei kürzeren Retentionszeiten. In Abbildung 4 sind die SFC-MS/MS-Chromatogramme eines Wurzelextrakts (Kresse behandelt mit 0,1 mg/l je NSAR) dargestellt. Interessanterweise zeigten dabei drei Analyten (KPF-glutamin, DCF-OH und KPF-glu-mal) in der SFC (im Gegensatz zur HPLC) je zwei Peaks. Dieser Umstand stellt ein mögliches Indiz für die Präsenz zweier Strukturisomere dar. Diese Vermutung konnte aber innerhalb des Projekts nicht mehr aufgeklärt werden.

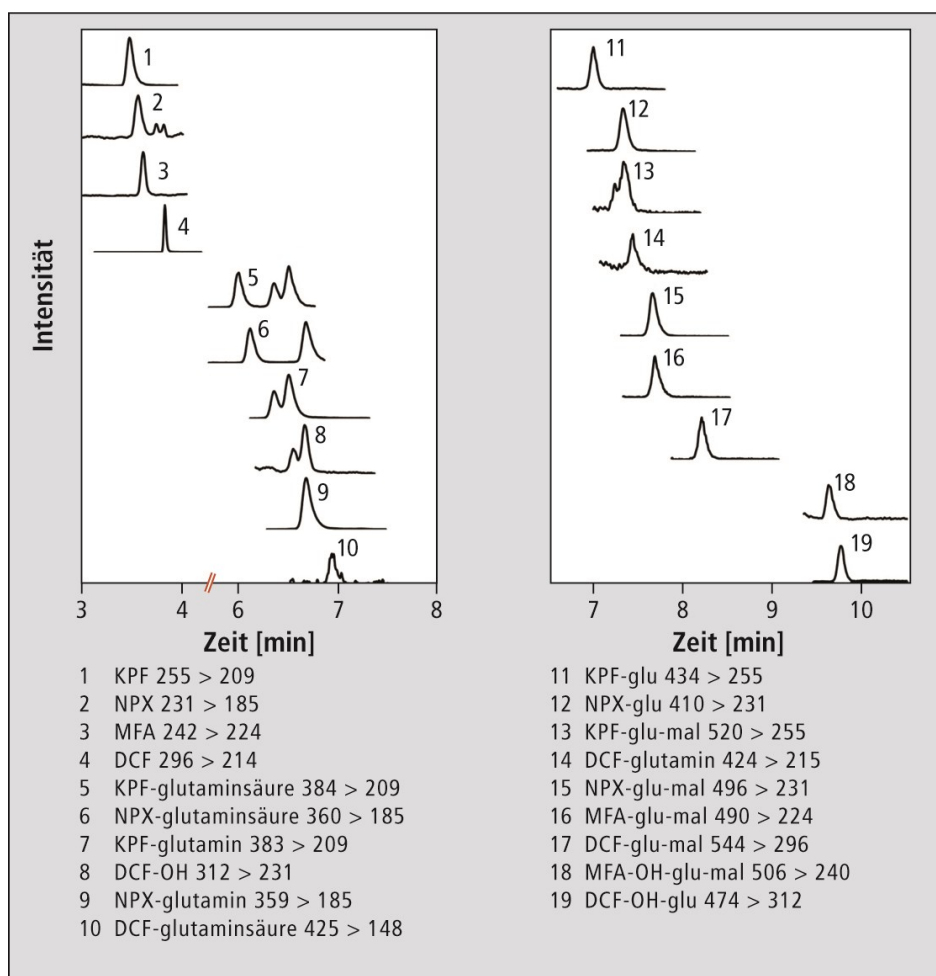


Abb. 4: Trennung eines Wurzelextrakts (Behandlung mit 0,1 mg/l je NSAR) mittels SFC-MS/MS

Fazit

Durch den Einsatz des LCMS-8060 konnte eine hochsensitive LC-MS/MS Methode entwickelt werden, die die Detektion der NSAR und ihrer Metaboliten im Spurenbereich ermöglichte, also wenn Pflanzen umweltrelevanten Konzentrationen ausgesetzt sind. Darüber hinaus konnte mit der SFC auch eine alternative Trennmethode getestet und für die Trennung der Analyten angewandt werden.

Literatur

- [1] *Civity Management Consultants (Hrsg.): Arzneimittelverbrauch im Spannungsfeld des demografischen Wandels, Berlin, 2017*
- [2] *Wu X., Dodgen L.K., Conkle J.L., Gan J., Science of the Total Environment, 536 (2015) 655-666.*
- [3] *Klampfl C.W., Trends in Analytical Chemistry, 111 (2019) 13-26.*
- [4] *Emhofer L., Himmelsbach M., Buchberger W. Klampfl C.W., Journal of Chromatography A, 1491 (2017) 137-144.*