



Metabolitenscreening in Umweltproben mit LC-Q-TOF und Elektrochemie-Massenspektrometrie

Marco Zedda (marco.zedda@uni-tuebingen.de),
Christian Zwiener (Christian.Zwiener@uni-tuebingen.de), Tübingen

Zusammenfassung

Die Wasserqualität von Oberflächen- und Grundwasser kann durch den menschlichen Gebrauch in Haushalten, Gewerbe und Industrie beeinträchtigt werden. In diesem Zusammenhang werden vermehrt Schadstoffeinträge über Kläranlagen diskutiert, die eine Vielzahl an Stoffen wie Haushaltschemikalien, Pestizide und Arzneimittelrückstände enthalten. Wenig bekannt ist oft die Bildung von Metaboliten und Transformationsprodukten dieser Substanzen in der Wasseraufbereitung und Umwelt sowie deren Einfluss auf die Wasserqualität. Die analytische Untersuchung wird dabei meist durch das Fehlen geeigneter Referenzstandards erschwert. Die Kombination aus Elektrochemie und Massenspektrometrie erlaubt die Simulation einiger enzymatischer Reaktionen und bietet damit eine schnelle und einfache Möglichkeit diese Metabolite für die Identifizierung und analytische Messung zu nutzen.

1. Einleitung

Die Verfügbarkeit von Wasser in ausreichender Quantität und Qualität ist eine der Grundvoraussetzungen für Leben, aber auch für das Funktionieren einer modernen Industriegesellschaft. Dabei ist Wasser als Ressource und als Lebensraum zu betrachten, dessen Qualität häufig durch Nutzung in Haushalten, Gewerbe, Industrie und als Transportweg beeinträchtigt wird. Hierbei werden vermehrt Schadstoffeinträge über Kläranlagen diskutiert, die eine Vielzahl an Stoffen aus Haushaltschemikalien, Pestiziden und Arzneimittelrückständen enthalten. Mit dem Eintrag dieser Stoffe sind Risiken für das Ökosystem und für den Menschen verbunden. Fragen nach langfristigen Auswirkungen dieser Einträge auf die Wasserqualität können oft nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Bisher werden ca. 150 bis 200 Substanzen untersucht. Wenig bekannt ist jedoch die Bildung von Metaboliten und Abbauprodukten dieser Substanzen in der Umwelt. Einzelne Beispiele zeigen, dass Metaboliten in höheren Konzentrationen auftreten als ihre Ausgangsverbindungen und diese von toxischer Relevanz sein können. Durch ihre oft höheren polaren Eigenschaften durchwandern diese Metaboliten problemlos den Nutzungskreislauf des Wassers und sind teilweise bis in das aufbereitete Trinkwasser verfolgbar. Zum Beispiel wurden die Metaboliten von iodierten Röntgenkontrastmitteln im Ablauf von Kläranlagen und im Trinkwasser nachgewiesen (Kormos et al., 2010). Carboxy-Acyclovir, ein Metabolit des Virostatikums-Acyclovir, ließ sich in Oberflächengewässern und in Trinkwasser in relevanten Konzentrationen detektieren, während das Acyclovir selbst nicht mehr nachweisbar war (Prasse et al. 2011). Oft wird in Monitoring-

Programmen nur die Originalsubstanz berücksichtigt, deren Verschwinden meist mit der Bildung von Metaboliten und Abbauprodukten verbunden ist. Aus diesem Grund wurde von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) ein systematischer Ansatz zur Risikobewertung erarbeitet, der alle Metaboliten mit einer Konzentration von mehr als 10 % der Ausgangsverbindung in die Betrachtung mit einbezieht (<http://www.emea.europa.eu>). Metaboliten wurden jedoch bisher kaum in Umweltuntersuchungen einbezogen, da für die analytische Untersuchung häufig keine Referenzverbindungen verfügbar und somit die gesuchten Stoffe analytisch nur schwer zu erfassen sind. In Umweltstudien wurden für ca. 160 Human- und Veterinärpharmaka nur 30 abiotische und biotische Transformationsprodukte berücksichtigt (Mompelat, Le Bot et al. 2009). Bei den berücksichtigten Metaboliten handelt es sich meist um bekannte Human- oder Tiermetaboliten, wie z.B. hydroxylierte und carboxylierte Derivate des Schmerzmittels Ibuprofen (Weigel et al. 2004).

2. Untersuchungsmethoden zur Identifizierung von Metaboliten in der Umwelt

Für die Untersuchung von Metaboliten wird der Abbau von Umweltchemikalien häufig in Anlehnung an OECD-Teststrategien im Labor simuliert. Die Testverfahren werden dabei so gestaltet, dass Kläranlagen oder bestimmte Umweltsysteme wie Boden, aquatische Sedimente oder Oberflächenwasser simuliert werden. Hierbei wird meist eine niedrige Konzentration im Mikrogramm-pro-Liter Bereich der zu untersuchenden Chemikalie eingesetzt, so dass die resultierende Abbaukinetik derjenigen in realen Umweltsystemen annähernd entspricht. Der Abbau der Ausgangssubstanz sowie die Bildung von Metaboliten werden dabei über einen bestimmten Zeitraum mit verschiedenen chromatographischen und massenspektrometrischen oder spektroskopischen Methoden verfolgt. Zur Identifizierung werden die Hauptmetabolite meist aufwändig isoliert und mit Hilfe der Massenspektrometrie und/oder Kernresonanzspektroskopie untersucht. Mit dieser Herangehensweise wurden zum Beispiel acht Transformationsprodukte des Opiumalkaloids Codein in Abbauprodukten mit Klärschlamm erfolgreich identifiziert (Wick et al. 2011). Aufgrund der Vielzahl an Verbindungen, die über Haushalte, Gewerbe und Industrie in die Kläranlagen eingetragen werden, müssen umfassendere Methoden zur Untersuchung des Eintrags und der Bildung von Metaboliten und Abbauprodukten von Umweltchemikalien eingesetzt werden. Vielversprechende Ansätze sind sogenannte „Suspect“- und „Non-Target“-Screening-Methoden mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) (Zedda und Zwiener,

2012). HRMS-Screening-Methoden werden bereits für die Analyse von unbekanntem Umweltchemikalien und deren Metaboliten und Transformationsprodukte angewendet. Beide Screening-Methoden können nicht streng voneinander unterschieden werden. Im Allgemeinen werden beim „Suspect“-Screening Daten über eventuell auftretende Vorläufer-Verbindungen und deren Metabolite zur Beurteilung der HRMS-Daten herangezogen (Helbling et al., 2010). Im Gegensatz dazu startet das Non-Target Screening ohne jegliche Vorinformationen. Bei diesem Screening-Ansatz sind die chemischen Summenformeln unbekannter Verbindungen über die Messung der akkuraten Masse zugänglich. Über die massenspektrometrische Fragmentierung werden Strukturinformationen erhalten, die zusammen mit Daten aus Spektrenbibliotheken, chemischen Datenbanken und computerunterstützter Fragmentierung zu einer Auswahl von sinnvollen Strukturvorschlägen führen. Damit ist ein großer Schritt in Richtung der Identifizierung von unbekanntem Verbindungen getan und in einigen Fällen eine erfolgreiche Identifizierung möglich. Dennoch ist die eindeutige Identifizierung dieser Verbindungen von der Verfügbarkeit authentischer Referenzverbindungen abhängig. Hierbei kann eine Kombination aus Elektrochemie und Massenspektrometrie einen Beitrag zur Synthese und somit zur eindeutigen Identifizierung von Metaboliten leisten.

3. Elektrochemie zur Unterstützung der Identifizierung von Metaboliten in der Umwelt

Die Elektrochemie wird häufig zur Untersuchung des Phase I und II Metabolismus pharmazeutischer Wirkstoffe in der Arzneimittelforschung eingesetzt (Jahn and Karst, 2012). Hierbei handelt es sich um ein elektrochemisches Verfahren bei dem verschiedene, normalerweise von Enzymen katalysierte, Oxidationsreaktionen auf einer rein instrumentellen Basis einfach und in einer relativ kurzen Zeit simuliert werden können. Typische Oxidationsreaktionen die mit Hilfe der elektrochemischen Zelle durchgeführt werden können sind z.B. N-Dealkylierung, O-Demethylierung und Hydroxylierung (Johansson, et al., 2007). Zu diesem Zweck werden poröse Glaskohlenstoff-Elektroden oder mit Bor dotierte Diamantelektroden als Arbeitselektroden eingesetzt, die in Form von coulometrischen oder amperometrischen Durchflusszellen kommerziell verfügbar sind. Die elektrochemischen Durchflusszellen (EC) werden häufig direkt mit der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt, um die Bildung von Oxidationsprodukten in Abhängigkeit vom elektrochemischen Potential zu untersuchen. Neben der direkten Kopplung mit der MS können die Oxidationsprodukte in einem Probengefäß aufgefangen und vor der Detektion über die Flüssigchromatographie (LC) getrennt werden (Abbildung 1).

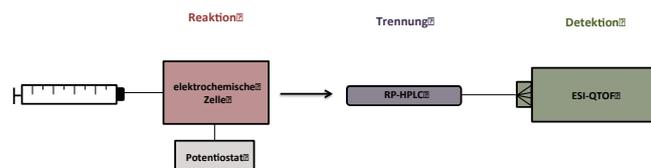


Abb. 1: Schematischer Aufbau der EC-LC-MS zur elektrochemischen Synthese, Trennung und Detektion von Oxidationsprodukten

Die Simulation und Synthese von Metaboliten in der Umwelt ist ein vielversprechender Anwendungsbereich für den Einsatz von elektrochemischen Durchflusszellen. Der natürliche Abbau von Umweltchemikalien umfasst in der Regel unterschiedliche Redox-Reaktionen wie Hydrolyse, mikrobieller Abbau oder durch Sonnenlicht induzierte Prozesse. Hoffmann untersuchte als erster das oxidative Verhalten verschiedener Veterinärantibiotika und deren Reaktion mit Catechol als Modellsubstanz für natürliches organisches Material (NOM) mit Hilfe der EC. Die Arbeit hat gezeigt, dass mit der Herangehensweise in einer relativ kurzen Zeitspanne umweltrelevante Abbaumechanismen simuliert, sowie die Reaktion von Oxidationsprodukten mit NOM untersucht werden können (Hoffmann et al., 2011).

4. Methoden

Im Rahmen eigener Untersuchungen zum Eintrag und Vorkommen von Umweltchemikalien und deren Metaboliten in Oberflächengewässern wurde die EC-LC-MS als Ergänzung zum Non-Target Screening mittels LC-QTOF angewendet. Hierzu wurden Flusswasserproben im Abstrombereich einer Kläranlage in der Nähe von Tübingen entnommen und über eine Festphasenextraktion (ENV+, Biotage, bei pH 2 und 7) mit einem Anreicherungsfaktor von 500 aufkonzentriert. Die Proben wurden anschließend mit LC-QTOF (Agilent iFunnel QTOF 6550) analysiert. Zur Identifizierung der Umweltchemikalien wurden in einem ersten Schritt die akkuraten Massen gemessen und daraus mögliche Summenformeln bestimmt. Diese wurden anschließend mit einer chemischen Datenbank verglichen, die eine Liste mit etwa 550 umweltrelevanten polaren Chemikalien umfasst. Hierbei wurde unter anderem der Beta-Blocker Metoprolol nachgewiesen, der mit Hilfe eines Referenzstandards eindeutig über die akkurate Masse und Retentionszeit identifiziert werden konnte. Der Referenzstandard wurde anschließend zur elektrochemischen Erzeugung von Metaboliten auf einer Glaskohlenstoff-Elektrode als Arbeitselektrode verwendet. Für die Untersuchung wurden 10 mg/L Metoprolol in 10 mM Ameisensäure mit 10% Acetonitril bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/min durch die EC befördert. Das elektrochemische Potential gegen eine Palladium-Wasserstoff-Referenzelektrode wurde auf 0 (Kontrollprobe) und 1000 mV über einen Potentiostaten reguliert. Die mit der EC erzeugten Oxidationsprodukte wurden anschließend mit der LC-HRMS getrennt und detektiert. Strukturinformationen zu den einzelnen Verbindungen wurden durch MS/MS-Experimente bei verschiedenen Kollisionsenergien erhalten. Die Identifizierung der Oxida-

tionsprodukte erfolgte über die Interpretation der gemessenen MS/MS-Spektren und durch den Vergleich mit Referenzspektren einer Spektrenbibliothek der Firma Agilent (Forensic/ Toxicology accurate mass data base and MS/MS spectral-library). Aus den MS/MS-Spektren der elektro-chemisch erzeugten Oxidationsprodukte wurden jeweils zwei Massenübergänge für eine empfindliche Detektion im Flusswasser ausgewählt und an einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (Agilent iFunnel Triple Quadrupol 6490) im „multiple reaction monitoring (MRM)“ Modus untersucht.

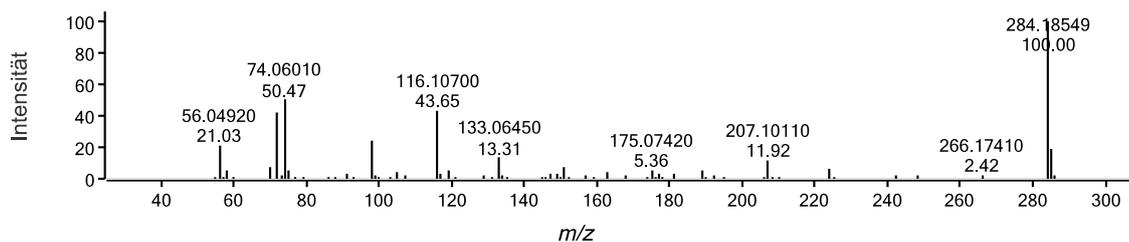
5. Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der EC konnten für das Metoprolol verschiedene enzymatische Oxidationsreaktionen wie z.B die Dealkylierung, Demethylierung und Hydroxylierung simuliert werden. Das Produkt einer benzyllischen Hydroxylierung von Metoprolol konnte durch den Vergleich des gemessenen MS/MS-Spektrums mit einem Referenzspektrum identifiziert werden. Die Abbildung 2 zeigt das gemessene MS/MS-Spektrum des elektrochemisch erzeugten Oxidationsprodukts im Vergleich

zum Referenz-Spektrum von α -Hydroxymetoprolol bei einer Kollisionsenergie von 20 eV. Die Bildung von α -Hydroxymetoprolol durch die benzyllische Hydroxylierung ist eine primäre Reaktion im menschlichen und mikrobiellen Metabolismus (Baranowska und Wilczek, 2009; Ma et al, 2007). Es ist bekannt, dass α -Hydroxymetoprolol pharmakologisch aktiv ist und somit für diesen Metaboliten auch eine Umweltrelevanz abgeleitet werden kann.

Über die MRM-Untersuchung am Triple-Quadrupol-Massenspektrometer konnte das α -Hydroxymetoprolol im Flusswasser nachgewiesen werden (Abbildung 3a). Weitere Oxidationsprodukte wurden nicht detektiert. Zur Bestätigung der gemessenen Substanz im Flusswasser wurde die Retentionszeit mit dem Oxidationsprodukt aus der EC-Synthese verglichen (Abbildung 3 b). Das Ergebnis zeigt, dass die Retentionszeiten in beiden untersuchten Proben übereinstimmen und die gemessene Substanz im Flusswasser somit über das synthetisierte Oxidationsprodukt identifiziert werden kann.

Gemessenes Spektrum



Bibliotheksspektrum " α -Hydroxymetoprolol"

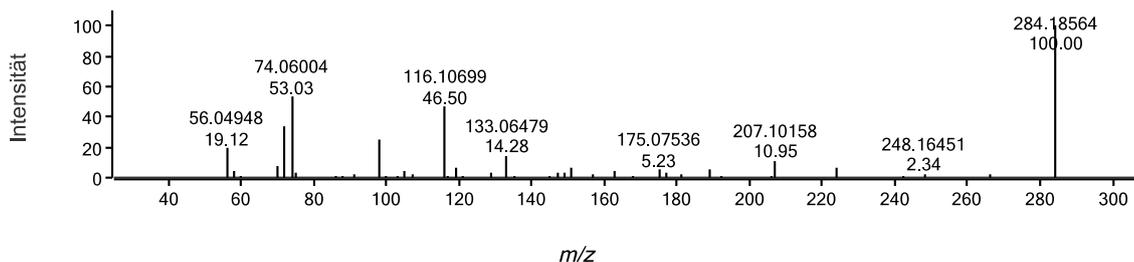


Abb. 2: MS/MS-Spektrum (CE 20 eV) des elektrochemisch erzeugten Oxidationsprodukts im Vergleich zum Referenz-Spektrum von α -Hydroxymetoprolol.

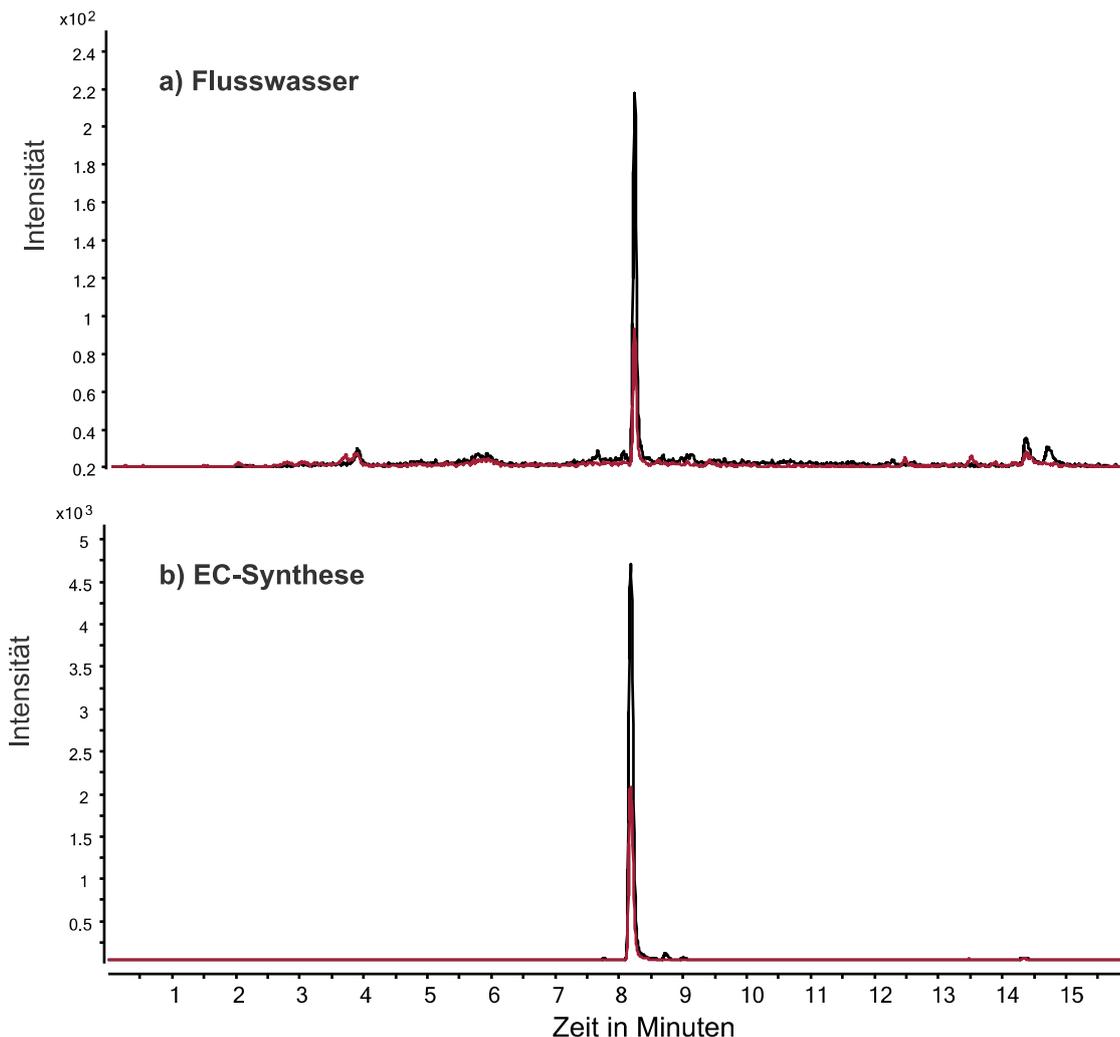


Abb.3: MRM-Messung von a) α -Hydroxymetoprolol im Flusswasser und b) des elektrochemisch erzeugten Oxidationsprodukts.

6. Schlussfolgerung

Aufgrund der Änderung der chemischen Struktur von Chemikalien während des Abbauvorgangs in der Umwelt, sind Metaboliten und Transformationsprodukte ohne geeignete Referenzstandards analytisch nur schwer zu erfassen. Wie das hier gezeigte Beispiel belegt, bietet die EC-LC-MS zusätzlich zu den bereits bestehenden Labor- und Screening-Methoden die Möglichkeit, enzymkatalysierte Reaktionen einfach und in einer relativ kurzen Zeitspanne zu simulieren. Mit Hilfe der synthetisierten Metaboliten können empfindliche Messmethoden entwickelt werden, mit denen die Oxidationsprodukte in der Umwelt qualitativ nachgewiesen und die Ergebnisse von LC-MS Untersuchungen verifiziert werden können.

Literatur

- Baranowska, I. and Wilczek, A. (2009) Simultaneous RP-HPLC determination of sotalol, metoprolol, alpha-hydroxymetoprolol, paracetamol and its glucuronide and sulfate metabolites in human urine, *Anal. Sci.*, 25, 769-772.
- Helbling, D.E., et al. (2010) High-throughput identification of microbial transformation products of organic micropollutants, *Environ. Sci. Technol.*, 44, 6621-6627.
- Hoffmann, T., et al. (2011) Electrochemistry-mass spectrometry for mechanistic studies and simulation of oxidation processes in the environment, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399, 1859-1868.
- Jahn, S. and Karst, U. (2012) Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry-Current state and future perspectives, *J. Chromatogr. A*, 1259, 16-49.
- Johansson, T., Weidolf, L. and Jurva, U. (2007) Mimicry of phase I drug metabolism - novel methods for metabolite characterization and synthesis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2323-2331.
- Kormos, J.L., et al. (2010) Biotransformation of selected iodinated X-ray contrast media and characterization of

- microbial transformation pathways, Environ. Sci. Technol., 44, 4998-5007.
- Ma, B., et al. (2007) Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*, Acta Pharmacol. Sin. 28, 1067-1074.
- Mompelat, S., Le Bot, B. and Thomas, O. (2009) Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, Environ. Int., 35, 803-814.
- Prasse, C., et al. (2011) Biotransformation of the antiviral drugs acyclovir and penciclovir activated sludge treatment, Environ. Sci. Technol., 45, 2761-2769.
- Weigel, S., et al. (2004) Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites, Chemosphere, 56, 583-592.
- Wick, A., Wagner, M. and Ternes, T.A. (2011) Elucidation of the transformation pathway of the opium alkaloid codeine in biological wastewater treatment, Environ. Sci. Technol., 45, 3374-3385.
- Zedda, M. and Zwiener, C. (2012) Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools, Anal. Bioanal. Chem., 403, 2493-2502.

Korrespondenzadresse:

Dr. Marco Zedda
Universität Tübingen
Fachbereich Geowissenschaften
Umweltanalytik
Hölderlinstr. 12
72076 Tübingen
Tel.: 07071-29-77551
Fax: 07071-29-5059

E-Mail: marco.zedda@uni-tuebingen.de

Web:

www.geo.uni-tuebingen.de/arbeitsgruppen/angewandte-geowissenschaften/umweltanalytik.htm