

2016

**oekotoxzentrum**  
**centre ecotox**



Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie  
Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée  
Eawag-EPFL

**EQS - Vorschlag des Oekotoxentrums für:**  
*Metformin*  
*und Haupttransformationsprodukt*  
*Guanylharnstoff*

Datenstand Ersterstellung: 22.10.2013  
Datenstand Aktualisierung: 13.04.2016  
Dossier Finalisierung: 11.11.2016

## **Qualitätskriterien-Vorschläge**

**CQK (AA-EQS):                    0.156 mg/L (vor Aktualisierung 1 mg/L)**

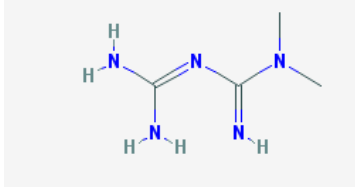
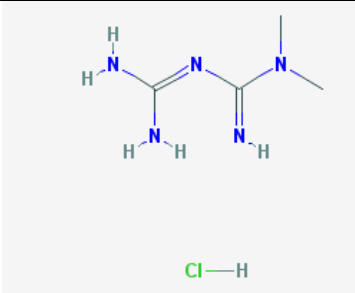
**AQK (MAC-EQS):                0.64 mg/L (vor Aktualisierung 9.1 mg/L)**

Das chronische Qualitätskriterium (CQK  $\triangleq$  AA-EQS) und das akute Qualitätskriterium (AQK  $\triangleq$  MAC-EQS) wurden nach dem TGD for EQS der Europäischen Kommission (EC, 2011) hergeleitet. Damit die Dossiers international vergleichbar sind, wird im Weiteren die Terminologie des TGD verwendet.

# 1 Physikochemische Parameter

In Tabelle 1 werden Identität sowie chemische und physikalische Parameter von Metformin angegeben. Wo bekannt, wird mit (exp) spezifiziert, dass es sich um experimentell erhobene Daten handelt, während es sich bei mit (est) gekennzeichneten Daten um abgeschätzte Werte handelt. Wenn keine dieser beiden Angaben hinter den Werten steht, fand sich in der zitierten Literatur keine Angabe.

**Tabelle 1** Geforderte Angaben zu Metformin und teilweise zu Metformin-Hydrochlorid nach dem TGD for EQS (EC 2011). **exp** = experimentell erhobene Werte; **est** = geschätzte Werte; **M** = Metformin; **M-HCl** = Metformin-Hydrochlorid.

Eigenschaften	Name/Wert	Referenz	
IUPAC Name	Metformin: (3-(diaminomethylidene)-1,1-dimethyl-guanidine und 1-carbamimidamido-N,N-dimethylmethanimidamide)  Metformin-Hydrochlorid: 3-(diaminomethylidene)-1,1- dimethylguanidine;hydrochloride 1,1-dimethylbiguanide monohydrochloride  1-carbamimidamido-N,N-dimethylmethanimidamide	Pubchem 2016  Pubchem 2016 EMA 2011  Drugbank 2013	
Strukturformel	Metformin ( <b>M</b> )		Pubchem 2016
	Metformin-Hydrochlorid ( <b>M-HCl</b> )		Pubchem 2016
Summenformel	<b>M:</b> C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> <b>M-HCl:</b> C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	Pubchem 2016 Roche 2013	
CAS-Nummer	<b>M:</b> 657-24-9 <b>M-HCl:</b> 1115-70-4	Pubchem 2016 Guidechem 2016 Roche 2013	
EINECS-Nummer	<b>M:</b> 211-517-8 <b>M-HCl:</b> 214-230-6	Pubchem 2016 Guidechem 2016	
SMILES-code	<b>M:</b> N=C(N)NC(=N)N(C)C <b>M-HCl:</b> CN(C)C(=N)N=C(N)N.Cl	EPI-Suite 4.11 Pubchem 2016	
Molekulargewicht (g·mol <sup>-1</sup> )	<b>M:</b> 129.17 <b>M-HCl:</b> 165.62	EPI-Suite 4.11 Roche 2013	
Schmelzpunkt (°C)	<b>M :</b> 74.45 (est); 223-226 (exp) <b>M-HCl:</b> 232 (exp) <b>M-HCl :</b> 218-232 (exp)	EPI-Suite 4.11 Guidechem 2016 Roche 2013	

Siedepunkt (°C)	<b>M:</b> 268.97 (est)	EPI-Suite 4.11
Dampfdruck (Pa)	<b>M:</b> 0.0101 (est), bei 25 Grad Celsius	EPI-Suite 4.11
Henry-Konstante (Pa·m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	<b>M:</b> 7.74 E-11 (est)	EPI-Suite 4.11
Wasserlöslichkeit (g·L <sup>-1</sup> )	<b>M:</b> 1000 (est), bei 25 Grad Celsius <b>M-HCl:</b> 300, keine zusätzliche Information	EPI-Suite 4.11 Roche 2013
Dissoziations-konstante (pK <sub>a</sub> )	<b>M:</b> 12.33 (est)	Drugbank 2013
<i>n</i> -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (log K <sub>ow</sub> )	<b>M:</b> -2.64 (est), log Dow = -1.1 at pH 7.4 (exp) <b>M-HCl:</b> -1.25 (exp)	EPI-Suite 4.11 EMA 2011 Roche 2013
Abbaubarkeit DT50	<b>M:</b> DT50 Wasser: 9.2 (Fluss) und 7.9 (Teich) in Tagen DT50 total: 22.0 (Fluss) und 22.3(Teich) days nach OECD 308	EMA 2011
Sediment/Wasser Verteilungs-koeffizient (log K <sub>oc</sub> )	<b>M:</b> 1.43 (est); -0.67 (est) <b>M:</b> K <sub>oc</sub> =2.45; 3.31; 3.51 (exp nach OECD106 für Böden)	EPI-Suite 4.11 EMA 2011

## 2 Allgemeines

Anwendung: Metformin ist als Monotherapie zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen, insbesondere bei übergewichtigen Patienten. Es kann alleine oder in Kombination mit anderen Antidiabetika oder Insulinen angewendet werden. Es ist ferner als Ergänzung zur Insulintherapie bei Diabetes mellitus Typ 1 zugelassen und kann den Insulinbedarf senken. Metformin wird unter anderem auch eingesetzt zur Vorbeugung von Diabetes bei Patienten unter antiretroviraler Therapie, bei Übergewicht ohne Hyperglykämie und beim polyzystischen Ovarialsyndrom. (Pharmawiki 2013).

Wirkungsweise: Der Wirkmechanismus von Metformin unterscheidet sich von denen anderer Blutzucker senkender Wirkstoffe (Drugbank 2013). Metformin ist antidiabetisch und antihyperglykämisch. Es hemmt die Gluconeogenese in der Leber, verringert die Insulinresistenz und erhöht die Glucoseaufnahme in den Muskeln. Es wird deshalb auch als „Insulinsensitizer“ bezeichnet. Ferner hat es zahlreiche weitere Effekte mit unterschiedlicher Wirkung, u.a. ist es kardioprotektiv, appetithemmend, lipidsenkend und vasoprotektiv (Pharmawiki 2013). Darüber hinaus kann Metformin die Testosteron-Produktion verringern und zu einer verweiblichenden Wirkung in Ratten beitragen (Misugi *et al.* 2006). Auch wenn die genauen Mechanismen zur Testosteronverringern nicht vollständig bekannt sind, kann eine endokrine Aktivität auch für aquatische Organismen nicht ausgeschlossen werden.

Chemische Analytik: Metformin kann auch mittels *non target analysis*, wie z.B. über Orbitrap-Verfahren sehr empfindlich nachgewiesen werden. Die Bestimmungsgrenzen in Abwasserproben werden mit 10 ng/L angegeben (Goetz *et al.* 2010).

Stabilität und

Abbauprodukte:

Metformin und Metformin-Hydrochlorid werden mal als stabil in der Umwelt und auch in der Abwasserbehandlung beschrieben, es ist biologisch nicht leicht abbaubar (<1% nach 28 Tagen) und ist auch über Photodegradation mit einer Halbwertszeit von 28 Tagen relativ stabil (Roche 2013). Hingegen wird Metformin auch in Kläranlagen gut abgebaut, z.B. in Kläranlagen mit einem Durchschnitt um 70% und einem Median um 80% (Scheurer *et al.* 2009, Scheurer *et al.* 2012, Santos *et al.* 2013). Es wurden jedoch Abwasserkonzentrationen über 4 µg/l berichtet (Goetz *et al.* 2010) und es wird aus den vorhandenen Messwerten eine mittlere Oberflächengewässerkonzentration in der Schweiz über 0.7 µg/L gefunden (Goetz *et al.* 2011). Zusätzlich zu erwähnen ist, dass es einen signifikanten Transfer (>10%) von der Wasserphase zur Sedimentphase gibt (EMA 2011), so dass auch Sedimentexpositionen in Betracht gezogen werden sollten. Aufgrund der hohen Einsatzmengen sind aber auch expositionsrelevante Abbauprodukte nicht auszuschliessen, doch werden diese nicht im Zulassungsdossier erwähnt (EMA 2011). Dennoch konnte mit Guanylarnstoff (Guanylharnstoff, CAS-Nr.141-83-3) ein bakterielles Transformationsprodukt des Metformins identifiziert werden (Kümmerer *et al.* 2009). Mittlerweile konnte dieser Stoff bereits im Kläranlagenablauf und in Oberflächengewässern in ähnlichen Konzentrationen wie die Ausgangssubstanz nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation Marco Scheurer TZW Karlsruhe 2013 und Scheurer *et al.* 2012 und siehe Tabelle 7 im Anhang). Da quellenabhängig und vom Vorhandensein von metabolisierenden Bakterien unterschiedliche Abbauraten angenommen werden können sind Langzeit-Biotests mit einer Überprüfung der Nominalkonzentration zu bevorzugen.

Existierende

Grenzwerte:

Es wurden keine Grenzwerte für Metformin in Oberflächengewässern gefunden. Die von Moermond und Smit 2015 (RIVM) vorgeschlagenen AA-EQS sowie MAC-EQS Werte liegen beide bei 780 µg/L und sind regulatorisch nicht verbindlich.

### 3 Effektdatensammlung

**Tabelle 2** Effektdatensammlung für Metformin. Eine Bewertung der Validität wurde nach den Klimisch-Kriterien (Klimisch *et al.* 1997) durchgeführt, bzw. nach den CRED-Kriterien für EQS relevante Studien die im Zuge der Aktualisierung herangezogen wurden (Moermond *et al.* 2016). Literaturdaten, die in grau dargestellt werden, erfüllen nicht die Datenanforderungen nach dem TGD for EQS, sollen aber als zusätzliche Information genannt werden. Effektwerte, von denen bekannt ist, dass sie sich auf Metformin-Hydrochlorid beziehen, wurden auf Metformin umgerechnet und zusätzlich in Klammern aufgeführt. Umrechnungsfaktor =  $MW_{\text{Metformin}} : MW_{\text{Metformin-Hydrochlorid}} = 129.17 \text{ g/mol} : 165.62 \text{ g/mol}$ ; Angaben zur chemischen Analytik, zum Testsystem und Reinheit: KA = keine Angaben; F = Durchfluss; R = semi-statisch; S = statisch; p.a. = analytische Reinheit; n = nominal; c=chemisch verifiziert, oder teilweise bestimmt

Kommentare:

<sup>a</sup> Einige Daten, die nicht für uns einsehbar waren, wurden von Caroline Moermond (RIVM) in Moermond und Smit 2015 als valide bewertet. Die Originalberichte konnten leider nicht eingesehen werden, da es gegen die Firmenpolitik verstieße. Im TGD for EQS (2011) steht dazu "Studies that have been performed to 'Good Laboratory Practice' (GLP) and submitted under a regulatory regime may be taken at 'face value' without further review. This is because they have already been reviewed by a competent authority and there is a precedent for their acceptability." Daher konnten die extern geprüften Studien als valide für die Herleitung von Umweltqualitätskriterien eingestuft werden.

EFFEKTDATENSAMMLUNG													
Sammel-bezeichnung	Organismus	Endpunkt	Dauer	Dimension	Parameter	Operator	Wert (mg/L)	Chemische Analyse	Testsystem	Reinheit	Bemerkungen	Validität <sup>1</sup>	Referenz
<b>akute Daten</b>													
Algen	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstum, Chlorophyllfluoreszenz	72	h	EC50	>	320	n	S	p.a.	European Guideline; EEC Directive 92/69/EEC C3	2	Cleuvers 2003
Algen	<i>Raphidocelis subcapitata</i> ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	Wachstumsrate	72	h	EC50	>	99 (77.2)	kA	kA	kA	OECD 201	1 <sup>a</sup>	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013, zitiert in Moermond und Smit, 2015, von RIVM als valide gewertet
Makrophyten	<i>Lemna minor</i>	Wachstumsrate, Blattfläche	7	d	EC50	=	110	n	S	p.a.	ISO/WD 20079	2	Cleuvers 2003
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	48	h	EC50	=	64	n	S	p.a.	European Guideline; EEC Directive 92/69/EEC. C2	2	Cleuvers 2003
Krebstiere	<i>Daphnia sp.</i>	Immobilisierung	48	h	EC50	=	130	kA	kA	kA	Review	4	FDA-CDER, 1996 in Webb, 2004 in Kummerer <i>et al.</i> , 2004 (ed).
Krebstiere	<i>Daphnia sp.</i>	Immobilisierung	48	h	EC50	=	60	kA	kA	kA	Review	4	LUA Brandenburg 2002 genannt in in Huschek <i>et al.</i> , 2004, Original kommt von Merck Liphä 1997
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	48	h	EC50	>	110	kA	kA	kA	OECD 202	1 <sup>a</sup>	Anmeldung bei EMA, 2013 laut

<sup>1</sup> Nach Moermond *et al.* (2016) wird die Validität unterteilt in Verlässlichkeit (R) und Relevanz (C), wobei die zu vergebenen Klassen (R1-4 bzw. C1-4) mit denen nach Klimisch (1-4) übereinstimmen.

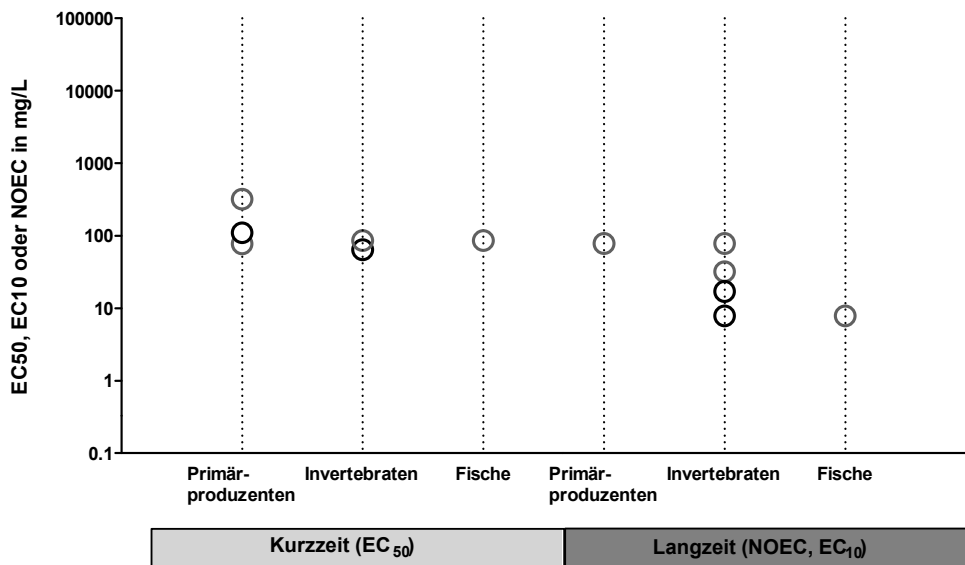
Sammel- bezeichnung	Organismus	Endpunkt	Dauer	Dimension	Parameter	Operator	Wert (mg/L)	Chemische Analyse	Testsystem	Reinheit	Bemerkungen	Validität <sup>1</sup>	Referenz
							(86)						pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013' zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	48	h	NOEC	=	110	kA	kA	kA	OECD 202	4	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013'
Fische	<i>Lepomis macrochirus</i>	Mortalität	96	h	LC50	>	982	kA	kA	kA	Review CDER/ U.S. FDA (1997)	4	FDA-CDER, 1996 in Webb, 2004 in Kummerer, 2004 (ed) wurden von RIVM als not assignable gewertet zitiert in Moermond und Smit. 2015,
Fische	<i>Lepomis macrochirus</i>	Mortalität	96	h	NOEC	≥	982	kA	kA	kA	FDA-TAD 4.11, CDER/ U.S. FDA (1997)	4	aus Fass.se, wurden von RIVM als not assignable gewertet zitiert in Moermond und Smit. 2015,
Fische	<i>Danio rerio</i>	Mortalität	96	h	EC50	>	110 (86)	kA	kA	kA	OECD 203	1 <sup>a</sup>	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013' zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Fische	<i>Danio rerio</i>	Mortalität	96	h	NOEC	≥	110	kA	kA	kA	OECD 203	4	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013'
Fische	Juvenile <i>Pimephales promelas</i>	Vitellogenin mRNA Induktion, ER, GnRH3, CYP3A126	7	d	LOEC	≤	0.001	c	R	p.a.	weitere Abkürzungen in Originalpublikation erklärt	R2/C3	Crago <i>et al.</i> 2016
Fische	Adulte <i>Pimephales promelas</i>	Vitellogenin mRNA Induktion, GnRH3, ER, CYP3A126	7	d	NOEC	≥	0.001	c	R	p.a.	weitere Abkürzungen in Originalpublikation erklärt	R2/C3	Crago <i>et al.</i> 2016
<b>(sub)chronische Daten</b>													
Algen	<i>Raphidocelis subcapitata</i> ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	Wachstumsrate	72	h	NOEC	=	99	kA	kA	kA	OECD 201	4	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013'
Algen	<i>Raphidocelis subcapitata</i> ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	Wachstumsrate	72	h	NOEC	≥	78	kA	kA	kA	OECD 201	2	EMA 2011
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion	21	d	NOEC	≥	32	kA	kA	kA	OECD 211	2 <sup>a</sup>	aus Fass.se, wurden von RIVM als valide gewertet
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion	21	h	NOEC	=	99	kA	kA	kA	OECD 211	4	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion, Mortalität	21	d	NOEC	=	17	kA	kA	kA	OECD 211	2 <sup>a</sup>	EMA 2011, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Mortalität	21	d	LC50	=	38	kA	kA	kA	OECD 211	2 <sup>a</sup>	EMA 2011
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Mortalität	21	d	LC100	=	55	kA	kA	kA	OECD 211	2	EMA 2011
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Unbekannt	21	d	NOEC	≥	100 (78)	kA	kA	kA	kA	1 <sup>a</sup>	Janssen vertrauliche Daten, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet

Sammelbezeichnung	Organismus	Endpunkt	Dauer	Dimension	Parameter	Operator	Wert (mg/L)	Chemische Analyse	Testsystem	Reinheit	Bemerkungen	Validität <sup>1</sup>	Referenz
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion, Mortalität	21	d	NOEC	=	10 (7.8)	kA	kA	kA	kA	2 <sup>a</sup>	Janssen vertrauliche Daten, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Fische	<i>Danio rerio</i>	Unbekannt	32	d	LOEC	>	10.3	kA	kA	kA	OECD 210	4	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013 <sup>1</sup>
Fische	<i>Danio rerio</i>	Unbekannt	32	d	NOEC	≥	10.3	kA	kA	kA	OECD 210	4	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013 <sup>1</sup>
Fische	<i>Danio rerio</i>	Schlupfrate und Schlupfzeitpunkt im Early Life Stage Tests	34	d	NOEC	≥	12 (9.4)	kA	kA	kA	OECD 210	4	aus Fass.se, in ECHA Datenbank unter M-HCI gelistet
Fische	<i>Pimephales promelas</i>	Unbekannt	32	d	NOEC	≥	10 (7.8)	kA	kA	kA	kA	1 <sup>a</sup>	Janssen vertrauliche Daten, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Fische	<i>Pimephales promelas</i>	Vitellogenin Induktion auf mRNA Ebene	28	d	LOEC	≤	0.04	c	R	kA	Effekte traten bei einzig getesteter Konzentration in exponierten Brutpaaren bei Männchen auf alle anderen gemessenen Endpunkte u.a. Reproduktion (Metabolic gene expression (total egg number, spawning frequency or clutch size GK, FBPase, FASN), Detoxification gene expression (CYP3A4, CYP11A, CYP17, PXR).) zeigten keine Effekte	R4/C4	Niemuth <i>et al.</i> 2015
Fische	<i>Pimephales promelas</i>	Intersex, Grösse und Reproduktion	360	d	LOEC	≤	0.04	c	R	kA	Effekte traten bei einzig getesteter Konzentration auf mit Evidenz verweiblichender Effekte in Männchen	R4/C1	Niemuth und Klaper 2015



## 4 Graphische Darstellung der Effektdaten

Abbildung 1 zeigt alle validen Kurzzeit- und Langzeiteffektwerte aus Tabelle 2 aufgeschlüsselt in Organismengruppen.



**Abbildung 1:** Grafische Darstellung aller validen Kurzzeit- und Langzeit-Effektdaten aus Tabelle 2 für Metformin (limnische Organismen), dabei wurden auch valide unpräzise Werte (grösser als Werte) einbezogen und in grau dargestellt.

Sämtliche Toxizitätsdaten bewegen sich in zwei Konzentrationsgrössenordnungen zwischen 10 und 1000 mg/L. Die Langzeittoxizitätsdaten sind erwartungsgemäss empfindlicher als die Kurzzeittoxizitäten, wobei Fischarten und Invertebraten niedrigere Toxizitätsdaten gegenüber den Algen und höheren Pflanzen aufzeigen.

## 5 Herleitung der EQS

Um chronische und akute Qualitätsziele herzuleiten, kann die Sicherheitsfaktormethode (AF-Methode) auf der Datenbasis von Kurzzeit- und Langzeiteffektdaten verwendet werden. Dabei wird mit dem tiefsten chronischen Datenpunkt ein AA-EQS (Annual-Average-Environmental-Quality-Standard) und mit dem tiefsten akuten Datenpunkt ein MAC-EQS (Maximum-Acceptable-Concentration-Environmental-Quality-Standard) abgeleitet. Wenn der Datensatz umfassend genug ist, können diese EQS zusätzlich mittels einer Speziessensitivitätsverteilung (SSD) bestimmt werden. Valide Mikro-/Mesokosmosstudien dienen einerseits zur Verfeinerung des AF, der durch eine SSD hergeleitet wurde. Andererseits können sie auch direkt zur Bestimmung eines EQS verwendet werden.

## 6 Chronische Toxizität

### 6.1 AA-EQS Herleitung mit AF-Methode

Tabelle 3 zeigt die kritischen Langzeiteffektwerte für Metformin mit Algen, Krebstieren und Fischen.

**Tabelle 3** Übersicht zu den kritischen Toxizitätswerten für Wasserorganismen aus längerfristigen Untersuchungen mit Metformin.

Gruppe	Art	Wert	Konz. in mg/L	Referenz
Primärproduzenten	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	NOEC	$\geq 78$	EMA 2011, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	NOEC	Geometrischer Mittelwert = $(17 \times 7.8)^{1/2} = 11.5$	EMA 2011 und Janssen vertrauliche Daten, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet
Fische	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC	$\geq 7.8$	Janssen vertrauliche Daten, zitiert in Moermond und Smit. 2015, von RIVM als valide gewertet

Ein OECD Fischtest mit *Pimephales promelas* wurde von RIVM als valide eingeschätzt und repräsentiert mit einem NOEC von  $\geq 7.8$  mg/L den niedrigsten gemessenen Wert, der auch dem niedrigsten validen Endpunkt bei Daphnien entspricht. Es handelt sich jedoch um keinen präzisen Langzeiteffektwert für Fische (was nach OECD Guideline über 10 mg/L auch nicht notwendig ist), der auch nur begrenzte Aussagekraft für Reproduktionseffekte oder potentiell endokrin disruptive Effekte wie sie durch Testosteron Senkung bei Metformin in Säugern beschrieben worden sind besitzt (Misugi *et al.* 2006). Desweiteren wurde ein potentieller endokrin disruptiver Effekt von Metformin auf *Pimephales promelas* in einer Studie von Niemuth *et al.* (2015) gefunden. Eine Nachfolgerstudie von Crago *et al.* (2016) bestätigt diese gefundenen Effekte bei herangereiften *Pimephales promelas* nicht, zeigt aber Effekte bei Jungtieren auf. Da diese Indikationen auf mRNA-Ebene erfasst wurden und die biologische Relevanz damit nicht ausreichend geklärt ist, besteht derzeit keine Möglichkeit Rückschlüsse auf apikale populationsrelevante Effekte zu ziehen. Weitere Evidenz auf potentielle endokrine Aktivität und Reproduktionstoxizität von Metformin wurde in einer zweiten Studie von Niemuth und Klaper (2015) geliefert. Da diese Studie als nicht eindeutig valide eingestuft wurde (CRED Beurteilung: R4/C1), ist es derzeit nicht möglich diese Ergebnisse in den EQS-Vorschlag direkt einzubringen. Hingegen zeigen sich in dieser Studie eindeutige Effekte auf apikale populationsrelevante Endpunkte, z.B. verringerte Reproduktionsleistung und Intersex, so dass endokrin disruptive Effekte bei Konzentrationen unterhalb von 40 Mikrogramm/L nicht auszuschliessen sind und bei der Generierung neuer Fischtestdaten und zukünftigen EQS Revisionen unbedingt berücksichtigt werden sollten.

Das TGD for EQS erlaubt eine Erhöhung des Sicherheitsfaktors, um Unsicherheiten bezüglich einer ausreichenden Abdeckung von relevanten Wirkmechanismen für trophische Ebenen entgegenzuwirken. Der OECD ELS Fisch Test kann die Unsicherheit bezüglich potentieller endokrin disruptiver Effekte nicht

ausreichend abdecken. Daher wird solange die Evidenz für potentielle endokrin disruptive Effekte und Reproduktionstoxizität aus den 3 Fischstudien Niemuth *et al.* 2015, Niemuth und Klaper (2015) und Crago *et al.* (2016) nicht durch eine belastbare Fischstudie widerlegt wird, als ausreichend erachtet, um den Sicherheitsfaktor von 10 auf 50 zu erhöhen.

$$\text{AA-EQS (AF)} = 7.8 \text{ mg/L} / 50 = 0.156 \text{ mg/L}$$

## 6.2 AA-EQS mit SSD-Methode

Es sind nicht genügend valide Daten vorhanden um ein AA-EQS mittels SSD abzuleiten.

## 6.3 AA-EQS aus Mikro-/Mesokosmosstudien

Es sind keine validen Effektwerte aus den Mikrokosmosstudien vorhanden, so dass ein AA-EQS basierend auf diesen Studien nicht direkt abgeleitet werden kann.

# 7 Akute Toxizität

## 7.1 MAC-EQS Herleitung mit AF-Methode

Tabelle 4 zeigt die kritischen akuten Effektwerte der Organismengruppen höhere Wasserpflanzen, Krebstiere und Fische.

**Tabelle 4** Übersicht der kritischen akuten Toxizitätswerte für Wasserorganismen aus kurzfristigen Untersuchungen mit Metformin.

Gruppe	Art	Wert	Konz. in mg/L	Referenz
Primärproduzenten	<i>Lemna minor</i>	EC50	110	Cleuvers 2003
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i>	EC50	64	Cleuvers 2003
Fische	<i>Danio rerio</i>	EC50	>86	Anmeldung bei EMA, 2013 laut pers. Mitteilung von D. Caldwell, 21.05.2013, wurden von RIVM als valide gewertet

**Tabelle 5** Gefährlichkeitsklassierung der akuten aquatischen Toxizität von Metformin anhand der niedrigsten gemessenen EC50-Werte (UN 2015)

Risikoklasse	Niedrigster EC50-Wert	Erreichter Wert
Nicht eingestuft	> 100mg/L	
3	10 mg/L – 100 mg/L	X
2	1 mg/L – 10 mg/L	
1	< 1mg/L	

Der tiefste Effektwert im Datensatz zur akuten Toxizität stammt aus einer Studie mit *Daphnia magna* bei 64 mg/L. Der akute Datensatz ist durch Vertreter der 3 trophischen Ebenen besetzt und auch Fische weisen im Gegensatz zum Langzeiteffektdatensatz akut niedrige Toxizitäten auf. Da keine der Organismengruppen eine deutlich erhöhte akute Sensitivität gegenüber Metformin aufzeigt, aber aufgrund der unpräzisen Fischtoxizitätswerte die Standardabweichung der logarithmierten Kurzzeittoxizitäten nicht errechnet werden kann, wird der Standard AF von 100 auf den geometrischen Mittelwert der Daphnien als angemessen betrachtet.

$$\text{MAC-EQS (AF)} = 64 \text{ mg/L} / 100 = \mathbf{0.64 \text{ mg/L}}$$

## 7.2 MAC-EQS mit SSD Methode

Es sind nicht genügend valide Daten vorhanden um ein MAC-EQS mittels SSD herzuleiten.

## 7.3 MAC-EQS aus Mikro-/Mesokosmosstudien

Es sind keine validen Effektwerte aus den Mikrokosmosstudien vorhanden, so dass ein MAC-EQS basierend auf diesen Studien nicht direkt hergeleitet werden kann.

## 8 Bioakkumulationsabschätzung für eine Bewertung des sekundären Intoxikationsrisikos

Das Bioakkumulationspotential soll gemäß TGD for EQS weiter untersucht werden, wenn der  $\log K_{ow} \geq 3$  ist und/oder der Biokonzentrationsfaktor (BKF) bzw Bioakkumulationsfaktor (BAF) > 100 beträgt. De Solla *et al.* (2016) berichtete einen gemittelten BAF von 0.66 (0.15 - 1.29) von Metformin in Frischwassermuscheln aus einer Freilandstudie. Folglich liegen für Metformin keine erhöhten Bioakkumulationsfaktoren vor, noch wurden diese im Rahmen des Zulassungsverfahrens bei der EMA 2011 als notwendig erachtet. Der  $\log K_{ow}$  liegt mit -2.64 für Metformin und -1.25 für Metformin-Hydrochlorid deutlich unter dem Triggerwert von 3 und die BAF-Werte sprechen für ein sehr schwaches Bioakkumulationspotential. Die Gefahr durch eine sekundäre Intoxikation kann daher als gering eingeschätzt werden. Ebenfalls weist ein  $\log D_{ow}$  von -1.1 bei pH 7.4 (EMA 2011) ebenfalls auf kein nennenswertes Bioakkumulationspotential hin.

## 9 Schutz der aquatischen Organismen

Der Effektdatensatz für Metformin umfasst alle 3 trophischen Ebenen bei den Kurzzeit- und Langzeittoxizitäten. Bei den Langzeiteffektstudien stellen Fische die empfindlichste Organismengruppen dar, bei den Kurzzeittoxizitäten sind es die Krebstiere. Der hergeleitete AA-EQS von 0.156 mg/l sollte einen ausreichenden Schutz für aquatische Organismen nach dem derzeitigen belastbaren Stand des Wissens bieten, jedoch können nachfolgende Fischstudien, die eine potentielle endokrine Aktivität und Reproduktionstoxizität abzuklären vermögen, zu einer Verringerung des AF führen oder den belastbaren Endpunkt zur Herleitung des EQS beeinflussen.

**AA-EQS = 0.156 mg/L**

**MAC-EQS = 0.64 mg/L**

## 10 Transformationsprodukt: Guanylharnstoff

Mit Guanylharnstoff (Guanylurea, CAS-Nr.141-83-3) konnte ein stabiles bakterielles Transformationsprodukt des Metformins identifiziert werden (Kümmerer *et al.* 2009). Die Datenlage bezüglich der aquatischen Toxizität von Guanylharnstoff ist derzeit zu gering um daraus einen EQS-Vorschlag erstellen zu können. Die im Anhang beschriebenen Informationen dienen deshalb als Grundlage für weiterführende Studien im Falle einer möglichen Erweiterung der Datenlage hinsichtlich dem Metformin-Transformationsprodukt Guanylharnstoff, siehe Anhang A.

Desweiteren sind verlässliche Daten bezüglich Abbau und Expositionsrelevanz notwendig, um eine valide Aussage bezüglich dem Verhalten von Guanylharnstoff in der Umwelt treffen zu können. Da in Zukunft mit einem Anstieg an Diabetes erkrankten Menschen gerechnet werden kann, wird ebenso ein wachsender Gebrauch an Metformin erwartet (van der Aa *et al.*, 2011). Dieser steigende Einsatz von Metformin und die damit einhergehende Bildung von Guanylharnstoff erfordert weitere Untersuchungen, um mögliche ökotoxikologischen Auswirkungen und Risiken in aquatischen Ökosystemen erkennen und entsprechende Massnahmen ergreifen zu können (Oosterhuis *et al.* 2013).

Aufgrund der derzeitigen fehlenden Effektdatenlage und der lückenhaften Monitoringdaten, müssten andere Bewertungsmöglichkeiten, z.b. über die Gleichsetzung des EQS mit der Muttersubstanz oder über QSAR Methoden angewendet werden.

## 11 Änderungen gegenüber der Version vom 22.10.2013

Durch die im Zuge der Aktualisierung in den Effektdatensatz aufgenommenen und neu validierten Studien verringerte sich der AA-EQS von 1 mg/L auf 0.156 mg/L, der MAC-EQS wurde von 9.1 mg/L auf 0.64 mg/L herabgesetzt. Drei Studien von Niemuth *et al.* (2015), Niemuth und Klaper (2015) und Crago *et al.* (2016) weisen auf einen potentiellen endokrin-disruptiven Effekt von Metformin auf *Pimephales promelas* hin. Da die biologische Relevanz noch nicht ausreichend geklärt ist und Einschränkungen bei der Validität bestehen, konnten diese Studien derzeit nicht mit in den EQS-Vorschlag einbezogen werden, führten aber zu einer Erhöhung des AF. Guanylharnstoff wurde als Transformationsprodukt von Metformin identifiziert und die Ergebnisse der Datensuche befinden sich im Anhang A. Es wurden keine Effektdaten gefunden, aber bestehende Informationen zu Guanylharnstoff wurden als Grundlage für mögliche weiterführende Studien zusammengetragen.

Insbesondere weil Guanylharnstoff eine weitaus höhere Expositionsrelevanz im Vergleich zur Muttersubstanz aufweisen kann, wäre eine ökotoxikologische Datengenerierung zu empfehlen.

# Anhang A: Guanylharnstoff Datensammlung

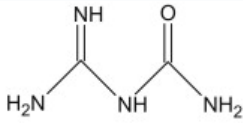
## A1 EQS-Vorschläge

Die Datenlage ist zu gering um daraus einen EQS-Vorschlag erstellen zu können. Die untenstehenden Informationen dienen als Grundlage für weiterführende Studien im Falle einer möglichen Erweiterung der Datenlage hinsichtlich dem Metformin-Transformationsprodukt Guanylharnstoff.

## A2 Physikochemische Parameter

In Tabelle 1 werden Identität sowie chemische und physikalische Parameter von Guanylharnstoff angegeben. Wo bekannt, wird mit (exp) spezifiziert, dass es sich um experimentell erhobene Daten handelt, während es sich bei mit (est) gekennzeichneten Daten um abgeschätzte Werte handelt. Wenn keine dieser beiden Angaben hinter den Werten steht, fand sich in der zitierten Literatur keine Angabe.

**Tabelle 6** Geforderte Angaben zu Guanylharnstoff nach dem TGD for EQS (EC 2011). Bei den angegebenen Werten wurde zwischen experimentellen Werten (exp) und abgeschätzten, modellierten Werten (est) unterschieden.

Eigenschaften	Name/Wert	Referenz
IUPAC Name	Diaminomethylideneurea, 1-carbamimidoylurea	Pubchem (2016), ECHA (2016)
Weitere Namen	Guanylharnstoff (Guanylurea), Amidinourea, Dicyandiamidine, N-Amidinourea	Pubchem (2016)
Strukturformel		Scheurer (2012)
Summenformel	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O	ECHA (2016)
CAS-Nummer	141-83-3	Pubchem (2016)
EINECS-Nummer/EC-Nummer	205-504-6	ECHA (2016)
SMILES-code	NC(=N)NC(N)=O	ChemAxon (2016)
Molekulargewicht (g·mol <sup>-1</sup> )	102.09524	Pubchem (2016)
Schmelzpunkt (°C)	173 – 175 94.48 (est)	Guidechem (2016) EPI Suite 4.11
Siedepunkt (°C)	319.8 (bei 760 mmHg) 281.23 (est)	Guidechem (2016) EPI Suite 4.11
Dampfdruck (Pa)	0.044 (est, at 25°C) 0.116 (est, at 25°C)	Guidechem (2016) EPI Suite 4.11
Henry-Konstante (Pa·m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	2.51 *10 <sup>-10</sup> (est)	EPI Suite 4.11
Wasserlöslichkeit (g·L <sup>-1</sup> )	1000 (est) 6.202*10 <sup>4</sup> (est)	EPI Suite 4.11
Dissoziations-konstante (pK <sub>a</sub> )	8 und 13.5	Ter Laak und Baken (2014), Scheurer (2012)
n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (log K <sub>ow</sub> )	-1.22 (est)	EPI Suite 4.11
Sediment/Wasser Verteilungs-koeffizient (log K <sub>oc</sub> )	0.8 (estimated from MCI), 0.2 (estimated from log K <sub>ow</sub> ) (est)	EPI Suite 4.11

### A3 Allgemeines

Nachweis: Guanylharnstoff (Guanylurea, CAS-Nr.141-83-3) konnte als ein bakterielles Transformationsprodukt des Metformin identifiziert werden (Kümmerer *et al.* 2009). Guanylharnstoff repräsentiert dabei das Haupttransformationsprodukt von Metformin, welches durch Biotransformation (2-fache Dealkylierung sowie durch oxidative Desaminierung) unter aeroben Bedingungen gebildet wird (Richardson und Ternes 2014, Bletsou *et al.* 2015). Guanylharnstoff kann mithilfe des geschlossenen Flaschentest, des manometrischen Respirationstest und mit dem Zahn-Wellens-Test, durchgeführt mit Belebtschlamm, nachgewiesen werden (Trautwein und Kümmerer 2011).

Vorkommen: Mittlerweile konnte dieser Stoff bereits im Kläranlagenablauf und in Oberflächengewässern in ähnlichen Konzentrationen wie die Ausgangssubstanz nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation Marco Scheurer TZW Karlsruhe 2013 und Scheurer 2012). Tabelle 2 zeigt gemittelte Konzentrationen von Metformin und Guanylharnstoff, die im Kläranlagenzulauf und –ablauf gemessen wurden. Die letzte Tabellenspalte stellt die Abbaurrate sowie das Verhältnis von Guanylharnstoff zu Metformin dar. Metformin weist eine hohe Abbaurrate auf und Schwankungen in dem Verhältnis zwischen Transformationsprodukt und Muttersubstanz sind zu erkennen. Im Allgemeinen scheint Guanylharnstoff dabei einen grossen Anteil im Vergleich zu der Muttersubstanz Metformin auszumachen. Im Grossen und Ganzen lässt sich aus diesen Ergebnissen schliessen, dass ein grosser Anteil des Metformins im Abwasser als Guanylharnstoff im Kläranlagenablauf und damit auch in den empfangenden Oberflächengewässern wiederzufinden ist und aufgrund dessen nicht ausser Acht gelassen werden sollte (Oosterhuis 2013, ter Laak und Baken 2014, Scheurer 2015).

Guanylharnstoff wurde zudem in der Elbe (9 ng/L), Weser (137 ng/L), im Bodensee (16 ng/L) sowie in mariner Umgebung bis 200 km offshore in der Nordsee (11 ng/L) gefunden (Trautwein *et al.* 2014). Auch Scheurer *et al.* (2012) fand Konzentrationen von Guanylharnstoff zwischen 0.1 und 28 µg/L in deutschen Flüssen und Bächen.



**Tabelle 7** Gemittelte Konzentrationen von Metformin und Guanylharnstoff im Kläranlagenzulauf und -ablauf

	Gemittelte Konzentration im Kläranlagenzulauf [µg/L]		Gemittelte Konzentration im Kläranlagenablauf [µg/L]		Transformationsrate Metformin [%] (Verhältnis Guanylharn./ Metformin im Kläranlagenablauf)
	Metformin	Guanylharnstoff	Metformin	Guanylharnstoff	
<b>Trautwein &amp; Kümmerer (2011)</b>	56.8	0.4	0.76	1.86	98.7 % (2.4)
<b>Scheurer et al. (2012)</b>	18 - 105	< 0.25 - 3	1.2 - 10	< 0.25 - 99	44.4 - 98.9 % (0.025 – 82.5)
<b>Oosterhuis et al. (2013)</b>	79.07	Nicht detektiert	1.52	48.01	98.1 % (31.6)
<b>Trautwein et al. (2014)</b>	111.8 (86.2-142.3)	1.3 (0.9-2)	4.8 (3.4-6.4)	44.0 (28.2-67.2)	95.7 % (9.2)
<b>Kosma et al. (2015)</b>	< LOQ - 0.346 (max=1.167)	< LOQ - 0.029 (max=0.084)	< LOQ (max=0.026)	< LOQ - 188 (max=0.627)	Nicht berechenbar

Chemische Analytik: Guanylharnstoff kann mittels einer HPLC–MS/MS Methode mit direkter Injektion und Bestimmungsgrenzen (LOQs) von 2 – 10 ng/L sehr empfindlich nachgewiesen werden (Trautwein *et al.* 2014). Desweiteren ist ein Nachweis mittels Screening-Verfahren mit hochauflösender Massenspektrometrie möglich (Kosma *et al.* 2015).

Stabilität und Abbaubarkeit:

Metformin wird durch aerobe Biotransformation zu Guanylharnstoff abgebaut, welches als einziges biologisches Transformationsprodukt identifiziert wurde (Trautwein und Kümmerer 2011). Der biologische Transformationsprozess war im Zahn-Wellens-Test nach 9 Tagen abgeschlossen. Die für die Transformation verantwortlichen Bakterien scheinen zudem häufig in Kläranlagen vorzukommen. Da Guanylharnstoff nicht komplett für den entfernten Anteil von Metformin in Kläranlagenabläufen aufzukommen scheint, müssen noch weitere Abbaureaktionen stattfinden (Trautwein und Kümmerer 2011). Guanylharnstoff gilt als schwer abzubauenendes Transformationsprodukt, welches stabil gegenüber weiterem Photo- oder Bioabbau ist (Evgenidou *et al.* 2015, Trautwein und Kümmerer 2011). Trautwein *et al.* (2014) gehen von einer omnipräsenten Verteilung des Guanylharnstoffs aus, da keine effizienten Abbauprozesse bekannt sind und relativ hohe Konzentrationen an Guanylharnstoff in Gewässern gemessen wurden.

#### Zusätzliche

#### Informationen:

Metformin und auch Guanylharnstoff weisen strukturelle Ähnlichkeiten (stickstoffhaltige funktionelle Gruppen) mit mehreren endogenen Pflanzenstoffen wie zum Beispiel Guanidin auf. Dies würde bedeuten, dass eine Aufnahme dieser Stoffe durch proteinbasierte Prozesse sowie ein Transport über die Zellmembran möglich ist (Miller *et al.* 2015).

### **A4 Effektdatensammlung**

Im Zuge der Datensuche konnten keine Effektdaten, betreffend aquatischer Organismen, bezüglich Guanylharnstoff gefunden werden.

Die einzigen gefundenen Effektdaten beziehen sich auf einen manometrischen Respirationstest mit einer Bakteriengemeinschaft. Guanylharnstoff zeigte dabei keine toxischen Effekte bei einer Konzentration von 11.9 mg/L (Trautwein und Kümmerer 2011).

### **A5 Herleitung der EQS, akute und chronische Toxizität**

Es sind nicht genügend Daten vorhanden um ein AA-EQS oder ein MAC-EQS herzuleiten, weder mit der AF-Methode noch mittels SSD oder basierend auf Mikro-/Mesokosmosstudien.

### **A6 Bioakkumulationsabschätzung für eine Bewertung des sekundären Intoxikationsrisikos**

Das Bioakkumulationspotential soll gemäß TGD for EQS weiter untersucht werden, wenn der  $\log K_{ow} \geq 3$  ist und/oder der Biokonzentrationsfaktor (BKF) bzw Bioakkumulationsfaktor (BAF)  $> 100$  beträgt. Der modellierte  $\log K_{ow}$  liegt mit -1.22 für Guanylharnstoff deutlich unter dem Triggerwert von 3. Die Gefahr durch eine sekundäre Intoxikation kann daher als gering eingeschätzt werden.

## 10 Referenzen

- Bletsou, A. A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., & Thomaidis, N. S. (2015). Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 32-44.
- ChemAxon (2016): [www.chemicalize.org](http://www.chemicalize.org) (zuletzt abgerufen am 12.04.2016)
- Cleuvers M (2003): Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* 142:185-194.
- CDER/U.S. FDA (1997): Retrospective review of ecotoxicity data submitted in environmental assessments for public display. Docket-No. 96N-0057.
- Crago, J., Bui, C., Grewal, S., Schlenk, D., Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin, *General and Comparative Endocrinology* (2016), doi: [doi:10.1016/j.ygcen.2015.12.030](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.030)
- de Solla, S. R., Gilroy, È. A., Klinck, J. S., King, L. E., McInnis, R., Struger, J., ... & Gillis, P. L. (2016). Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products in the unionid mussel *Lasmigona costata* in a river receiving wastewater effluent. *Chemosphere*, 146, 486-496.
- Drugbank (2013): <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00331> (Zugriff am 17.06.2013 und 6.9.2013)
- EC (2011): Common implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance document No. 27. Technical guidance for deriving environmental quality standards. Technical report 2011-055. European Communities
- EMA (2011): Assessment report. Jentaduetto. linagliptin / metformin hydrochloride. Procedure No.: EMEA/H/C/002279
- Evgenidou, E. N., Konstantinou, I. K., & Lambropoulou, D. A. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Science of The Total Environment*, 505, 905-926.
- ECHA (2016): <http://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.010.472> (zuletzt abgerufen am 13.04.2016)
- EPI Suite (2011): Version 4.11 .The EPI (Estimation Programs Interface) Suite™. A Windows®-based suite of physical/chemical property and environmental fate estimation programs developed by the EPA's Office of Pollution Prevention Toxics and Syracuse Research Corporation (SRC)
- FDA-CDER, 1996 in Webb, 2004 in Kummerer, 2004 (ed). *Pharmaceuticals in the environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer Verlag Second Edition 2004.
- Götz C, Singer H, Longrée P, Hollender J (2010): Micropoll Messkampagne – Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser: Screening von organischen Spurenstoffen in kommunalen Kläranlagen, Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU).
- Götz, C.W., R. Kase und J. Hollender (2011). „Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser, Studie im Auftrag des BAFU. Eawag, Dübendorf
- Guidechem (2016): <http://www.guidechem.com/reference/dic-414624.html> (zuletzt abgerufen am 12.04.2016)
- Huschek G, D. Hansen P D, Maurer H H, Kregel D, Kayser A (2004): Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use According to European Commission Recommendations. Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 19: 226–240,
- Klimisch H J, M Andrae, U Tillmann (1997): A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25:1-5.
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2015). Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanyurea in Greek wastewaters. *Water research*, 70, 436-448.

- Kümmerer K, Schuster A, Längin A (2009): Universitätsklinikum Freiburg Projektbericht : Identifizierung und Bewertung ausgewählter Arzneimittel und ihrer Metaboliten (Ab- und Umbauprodukte) im Wasserkreislauf. UBA Forschungsbericht; FKZ 206 61 202
- Landesumweltamt Brandenburg (2002): [http://www.lugv.brandenburg.de/cms/media.php/lbm1.a.3310.de/lu\\_a\\_bd39.pdf](http://www.lugv.brandenburg.de/cms/media.php/lbm1.a.3310.de/lu_a_bd39.pdf)
- Metformin Anmeldung bei EMA 2013: persönliche Mitteilung Daniel Caldwell vom 21.05.2013. Die Daten wurden vorerst als nicht bewertbar (Klimisch 4) eingestuft und in Tabelle 2 gelistet.
- MERCK LIPHA (1997). Material Safety Data Sheet Metforminhydrochlorid.
- Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G., & Pedersen, J. A. (2016). Root uptake of pharmaceuticals and personal care product ingredients. *Environmental science & technology*, 50(2), 525-541.
- Misugi T, Ozaki K, El Beltagy K, Tokuyama O, Honda K, Ishiko O (2006): Insulin-lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-induced PCOS rats. *Gynecol Obstet Invest* 61, 208-215.
- Moermond C. T. and Smit C. E. (2015): Derivation of water quality standards for carbamazepine, metoprolol, and metformin and comparison with monitoring data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 35, No. 4: 882–888.
- Moermond C. T., Kase, R., Korkaric, M., & Ågerstrand, M. (2016). CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*. *Environ Toxicol Chem.* 2016 35(5):1297-309. doi: 10.1002/etc.3259.
- Niemuth, N. J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R., & Klaper, R. D. (2015). Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(2), 291-296.
- Niemuth, N. J., & Klaper, R. D. (2015). Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, 135, 38-45.
- OECD (1992a): Fish, early life stage toxicity test. OECD guideline for testing of chemicals, No. 210. Organisation for Economic Co-Operation and Development, Paris, France.
- OECD (1992b): Fish, acute toxicity test. OECD guideline for testing of chemicals, No. 203. Organisation for Economic Co-Operation and Development, Paris, France.
- Oosterhuis, M., Sacher, F., & ter Laak, T. L. (2013). Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Science of The Total Environment*, 442, 380-388.
- PharmaWiki (2013): <http://www.pharmawiki.ch> (zuletzt abgerufen am 12.06.2013)
- Pubchem (2016): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (zuletzt abgerufen am 07.04.2016)
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2014). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical chemistry*, 86(6), 2813-2848.
- Roche (2013): Sicherheitsdatenblatt Metformin-Hydrochlorid. (zuletzt abgerufen am 17.06.2013)  
[http://www.roche.com/de/responsibility/environment/safety\\_data\\_sheets/safety\\_data\\_sheets-row.htm?sdssearch\\_name=metformin&sdssearch\\_sum=&sdssearch\\_cas=&submit=Show+SDS](http://www.roche.com/de/responsibility/environment/safety_data_sheets/safety_data_sheets-row.htm?sdssearch_name=metformin&sdssearch_sum=&sdssearch_cas=&submit=Show+SDS)
- Santos L *et al.* (2013): Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 461–462: 302–316
- Scheurer M, Sacher F, Brauch H J (2009): Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *Journal of Environmental Monitoring*. DOI: 10.1039/b909311g
- Scheurer M, Michel A, Brauch H J, Ruck W, Sacher F (2012): Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Research* 46: 4790-4802

- Scheurer M, Heß S., Lüddeke F, Sacher F, Güde H, Löffler H, Gallert C (2015). Removal of micropollutants, facultative pathogenic and antibiotic resistant bacteria in a full-scale retention soil filter receiving combined sewer overflow. *Environ Sci: Processes Impacts* 17, 186-196.
- ter Laak, T., & Baken, K. (2014). The Occurrence, Fate and Ecological and Human Health Risks of Metformin and Guanylurea in the Water Cycle—a Literature Review. The Water Research Institute. KWR, 24.
- Trautwein, C., Berset, J. D., Wolschke, H., & Kümmerer, K. (2014). Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environment international*, 70, 203-212.
- Trautwein, C., & Kümmerer, K. (2011). Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere*, 85(5), 765-773.
- UN (2015): Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 6th revised edition ed. United Nations, New York.
- Van der Aa, N. G. F. M., Kommer, G. J., Van Montfoort, J. E., & Versteegh, J. F. M. (2011). Demographic projections of future pharmaceutical consumption in the Netherlands. *Water Science & Technology*, 63(4).