

# Mikroverunreinigungen, LC-MS/MS und LC-MS-Screenings

## Mikroverunreinigungen

Im Zusammenhang mit der nachhaltigen Nutzung unserer Trinkwasserressourcen ist in den letzten Jahren vermehrt das Stichwort «Mikroverunreinigungen» aufgetaucht. Damit bezeichnet man organische und anorganische Verunreinigungen anthropogener Herkunft, die in unseren Gewässern in Konzentrationen von Mikro- bis Nanogramm pro Liter vorkommen. Aus der Humanmedizin und aus Haushalten stammen beispielsweise Antibiotika, Schmerzmittel (z.B. Diclofenac), bzw. Süsstoffe (Aspartam) und Drogen. Aus Industrie und Gewerbe stammen Oberflächenbehandlungsmittel (perfluorierte Verbindungen), Weichmacher (Phthalate), Flammschutzmittel und Schwermetalle. Aus der Landwirtschaft stammen hauptsächlich Pflanzenschutzmittel (Pestizide) und Tierarzneimittel.

## Analytik von Mikroverunreinigungen

Organische Mikroverunreinigungen sind meistens polar und somit gut wasserlöslich. Seit gut zwei Dekaden können sie in der Umwelt im Spurenbereich nachgewiesen werden. Dazu ist die Kopplung der Massenspektrometrie (MS) an die Flüssigchromatographie (LC, liquid chromatography) die Methode der Wahl, die sich seitdem immer weiter entwickelt hat. Bei der LC-MS/MS-Technik werden zwei Massenspektrometer nacheinander geschaltet. Damit kann eine sehr hohe Empfindlichkeit erreicht werden.

Bestimmungsgrenzen im ng/L-Bereich sind heutzutage ohne vorgängige Anreicherung erreichbar. Ein solches Analysensystem weist zudem eine sehr hohe Selektivität auf. Das bedeutet, dass eine gesuchte Mikroverunreinigung auch unter einer Vielzahl ähnlicher Verbindungen eindeutig identifiziert und quantifiziert werden kann.

Die Bachema AG betreibt zur Analyse von organischen Mikroverunreinigungen zwei LC-MS-Systeme. Seit 2006 ist sie im Besitz eines LC-MS/MS-TripleQuad-Gerätes und hat zahlreiche eigene Analysemethoden dafür entwickelt; unter anderem für Pflanzenschutzmittel (inkl. Glyphosat), Abwassertracer, perfluorierte Verbindungen, Triazole und Explosivstoffe. Seit 2015 ist auch ein hochauflösendes Massenspektrometer in Betrieb, ein sogenanntes LC-QTOF (Quadrupol-Time of Flight-Massenspektrometer), das weitergehende Möglichkeiten in der Analyse von Mikroverunreinigungen bietet (siehe Kasten «Was ist hochauflösende Massenspektrometrie?»). Neben der bisherigen Target-Analytik (Quantifizierung von Zielsubstanzen) können nun mit dem hochauflösenden Massenspektrometer auch LC-MS-Screenings nach Verdachtssubstanzen (Suspect-Screening) oder unbekanntem Substanzen (Non-Target-Screening) durchgeführt werden. Diese Methoden sind im Vergleich zur Target-Analytik nicht quantitativ, erweitern aber die Anzahl der untersuchbaren Substanzen um ein Vielfaches (siehe folgende Tabelle).

## Was ist hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)?

Durch die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS = High Resolution Mass Spectrometry) kann man Substanzen auftrennen, deren Massen sich nur um wenige Tausendstel einer Masseneinheit unterscheiden. Dadurch kann man von jeder Substanz die exakte Molekülmasse bestimmen und somit auch deren Elementarzusammensetzung (Summenformel).

Da mindestens jede Sekunde ein vollständiger Scan aller Massen (Fullscan) durchgeführt wird, können sehr viele Substanzen auf einmal gemessen werden und es werden neben bekannten Substanzen auch vorher unbekannte Substanzen erfasst. Durch die Kopplung mit zwei vorgeschalteten Quadrupol-Massenspektrometern können zusätzlich für jede Substanz MS/MS-Fragmentspektren aufgenommen werden, die neben der exakten Masse, der Retentionszeit und dem Isotopenverhältnis zur Identifikation der Substanzen benötigt werden.

## Möglichkeiten mit LC-MS Screenings

Die hochauflösende Massenspektrometrie erlaubt sogenannte Suspect- und Non-Target-Screenings mittels LC-MS. Die Möglichkeiten solcher Screenings sind sehr vielfältig. Damit man sich nicht im «Substanzen-dschungel» verliert, sollte die individuelle Fragestellung klar definiert sein, bevor an die Analyse herangegangen wird.

Beispielsweise können Proben miteinander verglichen werden. Ohne jede einzelne Substanz kennen zu wollen, kann man sich ein «Bild» der generellen Belastung machen, z.B. anhand eines Diagramms, in dem für jedes Massensignal (das bestenfalls jeweils einer Substanz entspricht) die Masse, die Retentionszeit und die Intensität dargestellt ist (siehe Masse-Retentionszeit-Diagramme in der Abbildung auf Seite 57). Falls man einzelne Substanzen identifizieren möchte, muss man vorgängig Kriterien für die Auswahl der Signale treffen, denn aufgrund des hohen Auswerteaufwandes können nie alle Signale innert nützlicher Frist ausgewertet werden. Beispiele von Auswahlkriterien:

- die intensivsten Signale in einem Chromatogramm
- Signale, die in einer Probe aber nicht in einer anderen Probe vorkommen
- nur halogenierte Verbindungen

| Target-Analytik   | Suspect-Screening   | Non-Target-Screening   |
|---|---|--|
| <b>Suche nach Zielsubstanzen und Quantifizierung</b>  | <b>Suche nach Substanzen, die in der Probe vermutet werden</b>  | <b>Suche nach unbekanntem Substanzen</b>   |
| Konzentrationsbestimmung von Mikroverunreinigungen (z.B. Pflanzenschutzmitteln) in Grund-, Oberflächen- oder Abwasser (mittels Referenzstandards) | Wasserproben können aufgrund exakt bestimmbarer Molekülmassen auf viele Substanzen durchsucht werden (auch nachträglich noch, wenn die Messung bereits erfolgt ist). Dabei können je nach Fragestellung Substanzlisten mit dutzenden bis hunderten Substanzen verwendet werden. Positive Befunde können durch nachträgliche Messung von Referenzstandards bestätigt und quantifiziert werden. | Welche Substanzen stecken hinter den grössten Signalen?<br>Vergleichende Analyse: Welche Substanzen kommen in der einen, aber nicht in der anderen Probe vor (z.B. vor und nach der Einleitung von Abwasser)?<br>Wiederholte Analysen über längeren Zeitraum:<br>Wie verändert sich die Zusammensetzung der Schadstoffe? |



### Durchführung von LC-MS-Screenings

In verschiedensten Wasserproben (z.B. Grundwasser, Oberflächenwasser, gereinigtem Abwasser) kann mittels LC-MS-Screenings nach polaren, ionisierbaren organischen Verbindungen gesucht werden. Dabei können üblicherweise Substanzen erfasst werden, die:

- ein Molekulargewicht zwischen 100 und 1000 g/mol aufweisen
- polar bis mittelpolar sind (ca.  $-2 < \log K_{ow} < 5$ )
- nicht flüchtig sind
- ionisierbar mit der Elektrospray-Ionisation sind, das heisst mindestens ein Heteroatom N, O, S, P in der Struktur aufweisen. Dazu gibt es jedoch Ausnahmen.

Für Suspect- und/oder Non-Target-Screenings werden die Proben zweimal gemessen, einmal mit positiver und einmal mit negativer Ionisierung. Dann werden über den kompletten chromatographischen Lauf hochaufgelöste Massenspektren (HRMS-Fullscan) und für die darin auftretenden intensivsten Massen automatisch MS/MS-Fragmentspektren aufgenommen. Die Auswertung erfolgt in Identifikationslevels bezogen auf die Fragestellung und den Screening-Typ (siehe Identifikationsschema).

### Auswertung Suspect-Screening

Bei einem Suspect-Screening werden die gemessenen Proben nach Verdachtssubstanzen durchsucht. Werden in den Proben gewisse Substanzen oder Substanzgruppen erwartet, können diese mittels ihrer chemischen Summenformel und damit exakten Masse im HRMS-Fullscan gesucht werden (bis zu mehreren hundert Substanzen möglich). Werden Verdachtssubstanzen in diesem ersten Schritt gefunden, gelten sie als noch nicht sicher identifiziert und erhalten Identifikationslevel 3. Ziel der weiteren Auswertung ist es, das Identifikationslevel jeder Verdachtssubstanz zu verbessern bis hin zur eindeutigen Identifikation einer Substanz (Level 1), die nur mittels eines Referenzstandards möglich ist (siehe folgende Tabelle).

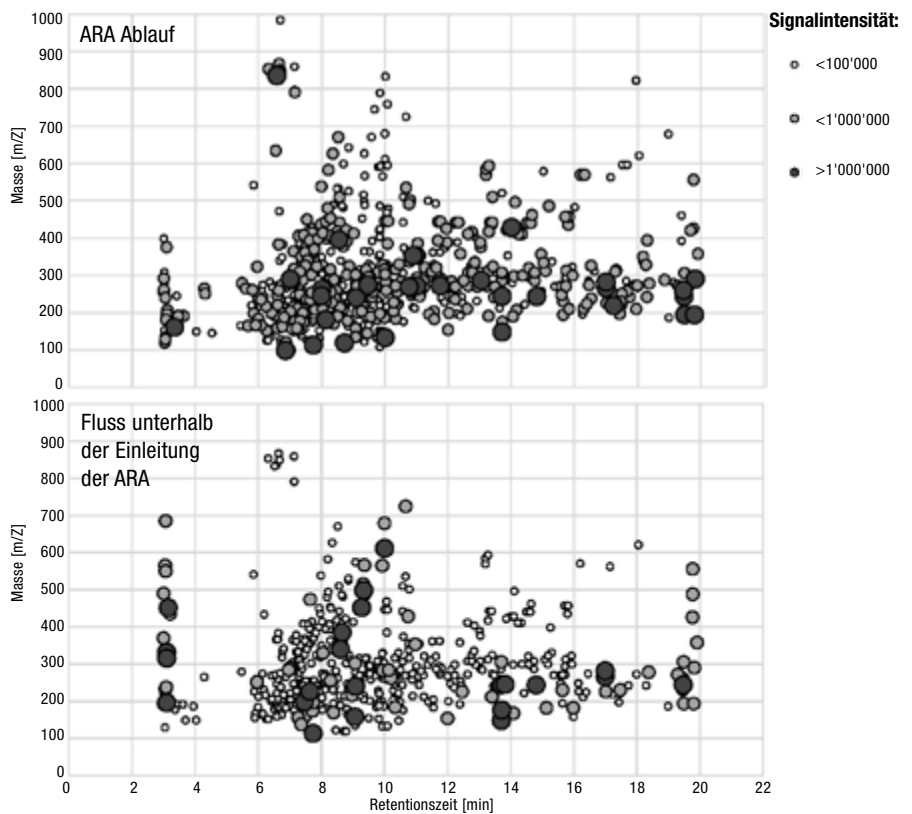


Abbildung: Masse-Retentionszeit-Diagramme mit Intensitäten eines Kläranlagenablaufs und der korrespondierenden Probe des Flusses nach Einleitung dieses Abwassers

### Auswertung Non-Target-Screening

Bei einem Non-Target-Screening wird im HRMS-Fullscan automatisiert nach Signalen gesucht, die in einem vorher definierten Retentionszeitenfenster auftreten. In einer belasteten Probe können hunderte bis tausende Signale entstehen, die entsprechend viele verschiedene Substanzen repräsentieren. Für jede Probe entsteht so eine Liste von Signalen, die jeweils durch eine exakte Masse, eine Retentionszeit und eine Intensität charakterisiert sind. Um diese Liste zu erstellen, ist eine aufwändige Auswertung eines erfahrenen Analytikers notwendig, da sie nur teilweise automatisiert stattfinden kann. Die Auswertung beruht auf vielen Schritten, die sicherstellen, dass eine gute Datenqualität entsteht, so dass möglichst wenige falsch positive und falsch negative Resultate rapportiert werden.

Grundsätzlich erhält jedes Signal in dieser Liste das Identifikationslevel 5, das aber durch weitere Auswerteschritte immer noch verbessert werden kann. Zu diesem Zweck können für beide Screening-Varianten alle Signale mit einer MS/MS-Spektren-Datenbank abgeglichen werden. Der Bachema AG steht dafür eine Datenbank mit derzeit knapp 1200 Substanzen zur Verfügung. Bei einem positiven Datenbankabgleich kann so für einen kleinen Teil der Peaks Identifikationslevel 2 erreicht werden, was einer sehr guten, aber noch nicht eindeutigen Identifikation einer Substanz entspricht.

Preis in Fr.  
**LC-MS-Screening** **200.- / Std. Aufwand**

### Identifikationsschema für Target-, Suspect- und Non-Target-Screenings (abgeleitet von Schymanski et al. 2015 Anal Bioanal Chem)

|                  |                   | Level                | Identifikation | zu erreichendes Resultat | wird erreicht durch      |  |
|------------------|-------------------|----------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--|
| Target-Screening | Suspect-Screening | Non-Target-Screening | 1              | maximal                  | bestätigte Struktur      | Abgleich mit Referenzstandard                    |
|                  |                   |                      | 2              | ▼                        | wahrscheinliche Struktur | Abgleich mit MSMS-Datenbanken                    |
|                  |                   |                      | 3              |                          | mögliche Struktur        | Abgleich mit Chemikaliendatenbanken bzw. -listen |
|                  |                   |                      | 4              |                          | Summenformel             | Analyse von HRMS- & MS/MS-Massenspektren         |
|                  |                   |                      | 5              | minimal                  | Masse                    | HRMS-Fullscan-Messung                            |