

# ***ANALYTIK UND STOFFBEWERTUNG***

## **VORBEUGENDES RISIKOMANAGEMENT: NON-TARGET-ANALYTIK UND TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG**

### **BEISPIELE AUS OBERFLÄCHENWASSER- UND GRUNDWASSERUNTERSUCHUNGEN**

02.10.2019

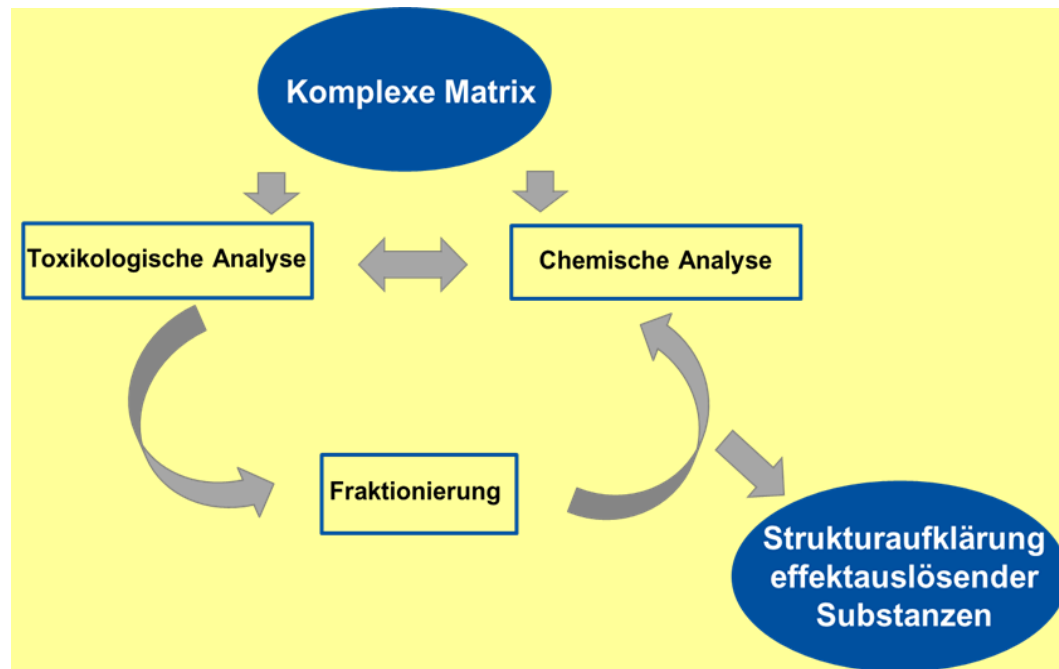
Peter Balsaa, Anne Gottschlich,  
Vanessa Hinnenkamp

## ■ Projektziele

- Aufbau einer **schnellen, robusten und routinetauglichen** Non-Target-Analytik für **organischen Mikroschadstoffen** in Rohwässern (Oberflächen- und Grundwässer), die u.a. zur Trinkwassergewinnung genutzt werden.
- In **Kombination** mit unterschiedlichen **humantoxikologischen Testsystemen** sollte ein Modul für eine **vorsorgende Rohwasserüberwachung** geschaffen werden.

## ■ Projektpartner

- Sieben Wasserversorgungsunternehmen



TOX muss positiv sein !

- Parallel chemische und biologische Untersuchungen
- Das Idealziel, die Strukturaufklärung einer „Stör“-Substanz, muss nicht zwingend erreicht werden
- Reduzierung der Komplexität einer Probe
- Hilfestellung bei der Priorisierung der „**Unknowns**“

# Endpunkte für die toxikologischen Untersuchungen

## Eingesetzte Bioassays

### Zytotoxizität

(Allgemeine Zellschädigung)

#### MTT-Test



U2-OS Zellen:

- ER $\alpha$
- AR
- p53

### Gentoxizität

(DNA-Schädigung)

#### umuC-Test

*S. typhimurium*  
TA1535 pSK1002



#### p53-CALUX

p53-Zellen

### Endokrine Aktivität

(Beeinflussung des Hormonstoffwechsels)

#### ER $\alpha$ -CALUX

ER $\alpha$ -Zellen

#### AR-CALUX

AR-Zellen

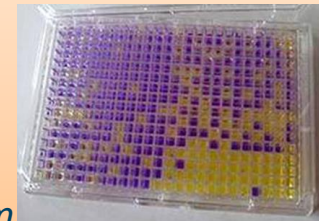


### Mutagenität

(Änderung der DNA-Sequenz, vererbare Mutation)

#### Ames-Test

*S. typhimurium*  
TA98 und TA100



## Überblick

### Zytotoxizität

(Allgemeine Zellschädigung)

#### MTT-Test

Positiv im g/l-Bereich

### Gentoxizität

(DNA-Schädigung)

#### umuC-Test

#### p53-CALUX

Positiv im µg/L-Bereich

### Endokrine Aktivität

(Beeinflussung des Hormonstoffwechsels)

#### ER $\alpha$ -CALUX

#### AR-CALUX

Positiv im ng/L-Bereich!

### Mutagenität

(Änderung der DNA-Sequenz, vererbare Mutation)

#### Ames-Test

Positiv im mg/L-Bereich

- 280 Proben wurden untersucht → 1680 Tests
- Einzelbefund bei der Östrogenität (<3%, aber kein Trinkwasser!)
  - BG 0,7 ng EEQ/L (EEQ = 17beta-Estradioläquivalente)
- Alle weiteren Tox-Tests zeigten **keine** Auffälligkeiten.

## Fazit:

- Die Sensitivität der Tox-Tests muss verbessert werden, um Risiken besser abschätzen zu können.

### a) **Anreicherung**

Faktor 1000 bedeutet 20 Liter müssen  
**diskriminierungsfrei** angereichert werden!

### b) **Neuentwicklung** von empfindlicheren Testmethoden

## ■ Was ist Non-Target Analytik?

**Oberbegriff für die Untersuchung von unbekannten organischen Spurenstoffen in der Wassermatrix.**

## ■ Wer und wozu kann man sie gebrauchen?

**Alle WV die mehr über die organischen Spurenstoffe in ihrem Rohwasser wissen wollen.**

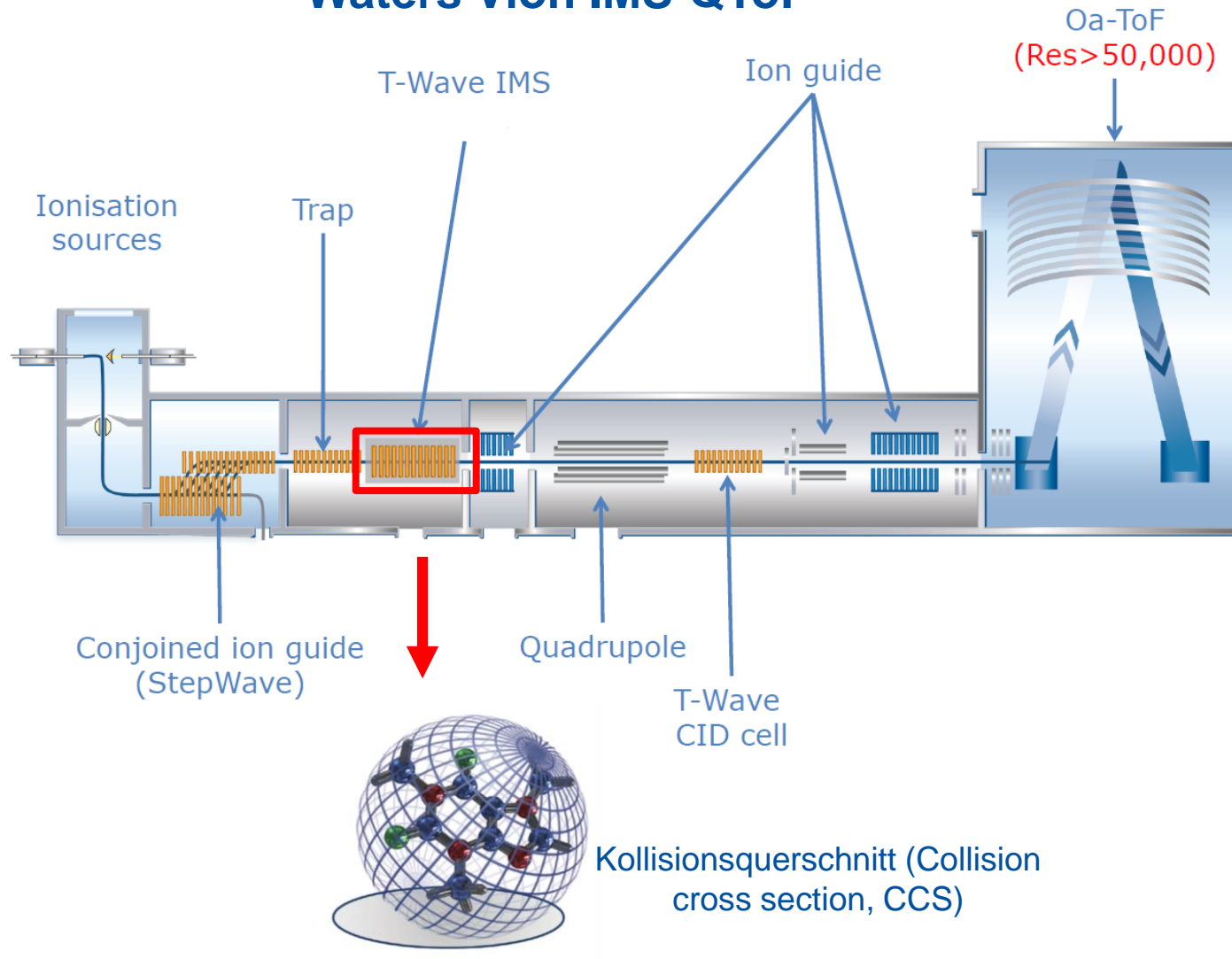
## ■ Was braucht man dazu?

**LC-HRMS und mindestens einen hochmotivierten MA**

## ■ Was kann man damit machen?

- **Target-Analytik (Validiert mit QS bzw. SQA)**
- **Suspect-Screening (Datenbankrecherchen)**
- **NT-Screening (Wer sucht, der findet!)**

## Waters Vion IMS-QToF





## ■ HRMS-Rohdaten:

- Max. ca. 40 TB pro Jahr möglich (100% Messzeit)!
- **IWW: ca. 25 TB pro Jahr**

## ■ Prozessieren der Daten zur Ergebnispräsentation

## ■ Archivierung

## ■ Sicherung (min. 5 Jahre)

**➔ eigene IT-Infrastruktur und IT-Spezialisten**

## ■ HRMS: Vion IMS Q-ToF (Waters)

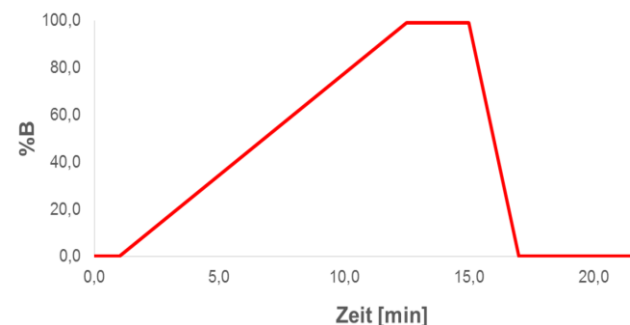
- Data independent acquisition mode (HDMSE)
- Massenbereich **100 bis 1000 Da**
- Messungen im ESI +/- Modus in getrennten Läufen

## ■ UPLC: Acquity I class (Waters)

- Säule: BEH Amid (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 5 mm) Vorsäule und HSS T3 (1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm) Hauptsäule
- Säulentemperatur: 40°C
- Eluent: Wasser (A) und Methanol (B) mit je 0,1 % Ameisensäure
- Flussrate: 0,35 mL/min
- **Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{L}$  (Wasserprobe)**

**Wichtig:**

**Die Methode darf gar nicht verändert werden!**



## ■ „Target“-Analytik (Semiquantitative Analyse (**SQA**) von ca. 150 Substanzen)

- Keine Berücksichtigung von Matrixeffekten
- Ergebnisangabe **geclustert** in Konzentrationsbereiche

Nicht nachweisbar (n.n.)

Konzentration < 100 ng/L

Konzentration zwischen 100 – 1000 ng/L

Konzentration > 1000 ng/L

## ■ Suspect Screening

- 3 Datenbank mit ca. **2000** Stoffeinträgen (PSM, Pharmaka, Metabolite, ...)

## ■ NT Screening

- Priorisierung der „**Unbekannten**“
- Ziel: exakte Masse → **eine** Summenformel → **eine** Molekülstruktur

## ■ Semiquantitative Analyse **aus 280 Proben** ca. 42.000 Einzelwerte

<b>n.n.</b>	<b>97 %</b>
< 100 ng/L	2 %
>100 bis 1000 ng/L	0,5 %
> 1000 ng/L	0,5 %

## ■ **Fazit:**

- **Grundvalidierung** analog der Targetanalytik **nur mit größerem Aufwand möglich!**
- SQA-Auswertung mit der derzeitigen Software sehr zeitaufwendig (**ca. 10 Arbeitstage für 10 Proben**), da **derzeit nicht automatisierbar**.

## Kriterien für einen Treffer:

- Exakte Masse ( $\pm 2$  mDa)
- Fragmentationen (mind. 1)
- CCS-Wert (Abw. max. 2%)
- Retentionszeit ( $\pm 0.05$  min)
- In allen Triplikat (ESI +/-) vorhanden
- Nicht in der Blank-Messung

## IWW-Klassifizierung

Level 1



Kriterien erfüllt; mittels Referenzstandard bestätigt

Level 2



Kriterien erfüllt; ohne Bestätigung durch Referenzstandard (Trefferquote  $< 10\%$ )

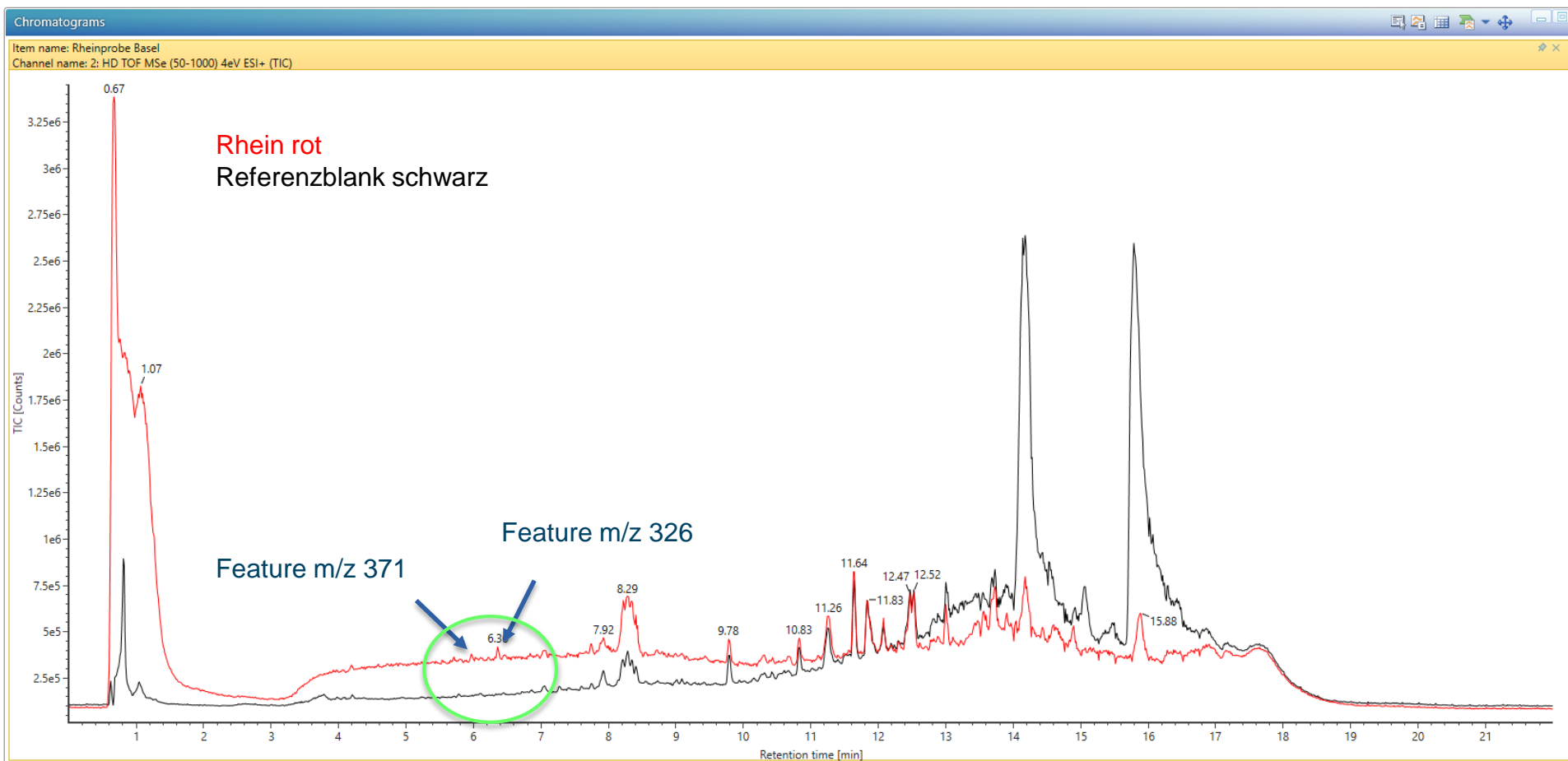
Level 3



Kein Treffer in der Datenbank („unknowns“) → Keine Liste nur elektronisch archiviert (40 Proben: ca. 4 TB!!!), retrospektiv **jederzeit** verfügbar <sup>13</sup>

# Identifizierung von Unbekannten – Beispiel Rheinprobe

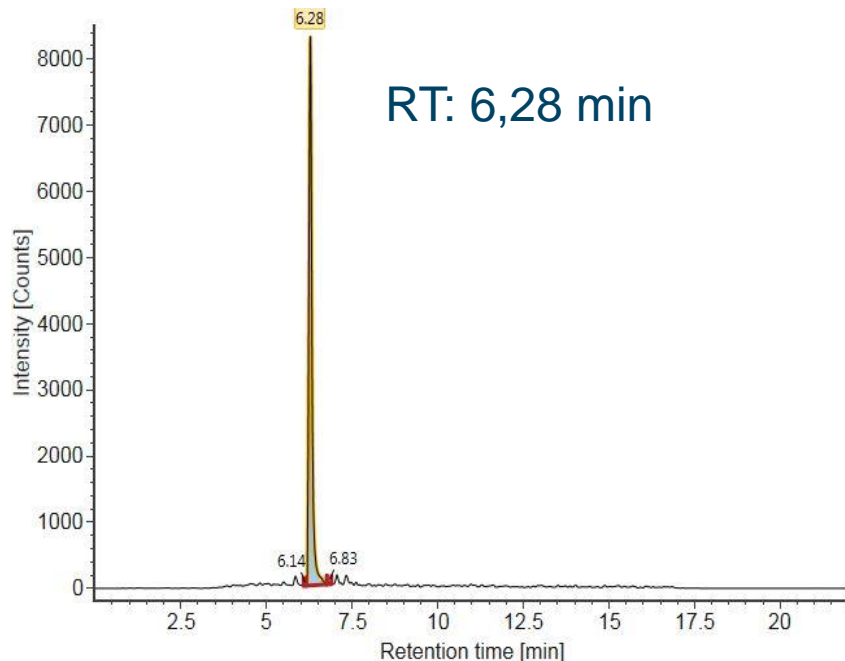
- **Treffer für Benalaxyl (Fungizid) über das Suspect Screening in einer Rheinprobe**



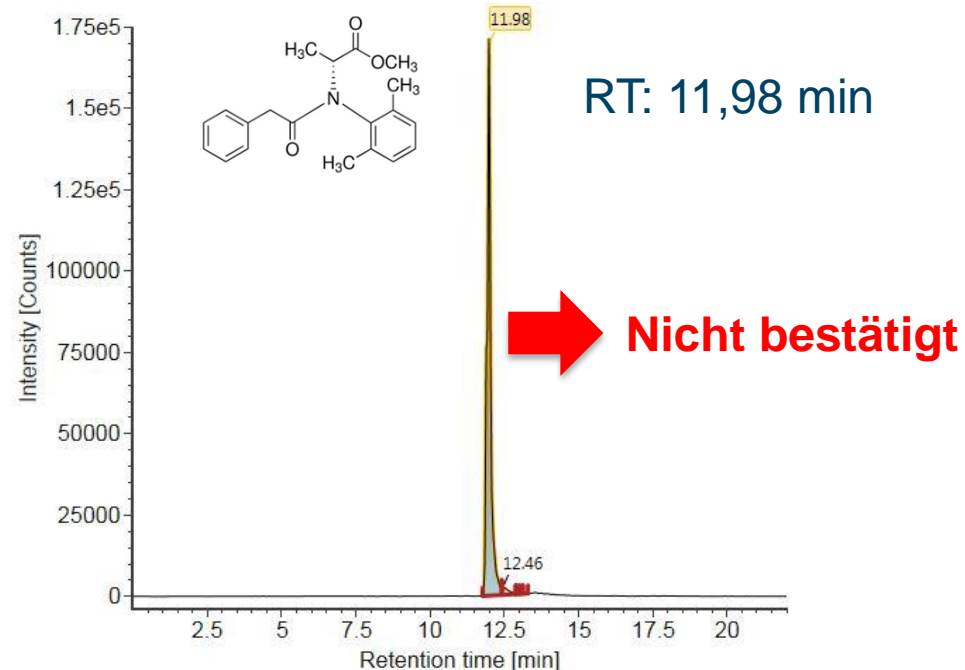
# Identifizierung von Unbekannten – Beispiel Rheinprobe

- Treffer für Benalaxyl über das Suspect Screening in einer Rheinprobe
- Übereinstimmung der Masse,  $[M+H]^+$  ( $m/z$  326,1751), einem Fragmentation und des CCS-Wert

## Rheinprobe $m/z$ 326,1751



## Benalaxyl Referenzstandard



# Suche nach der Eintragsquelle

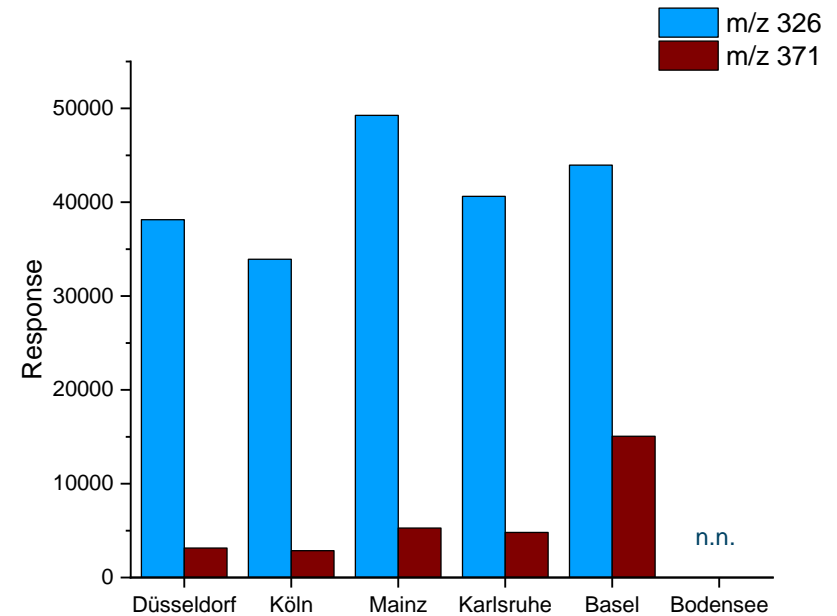
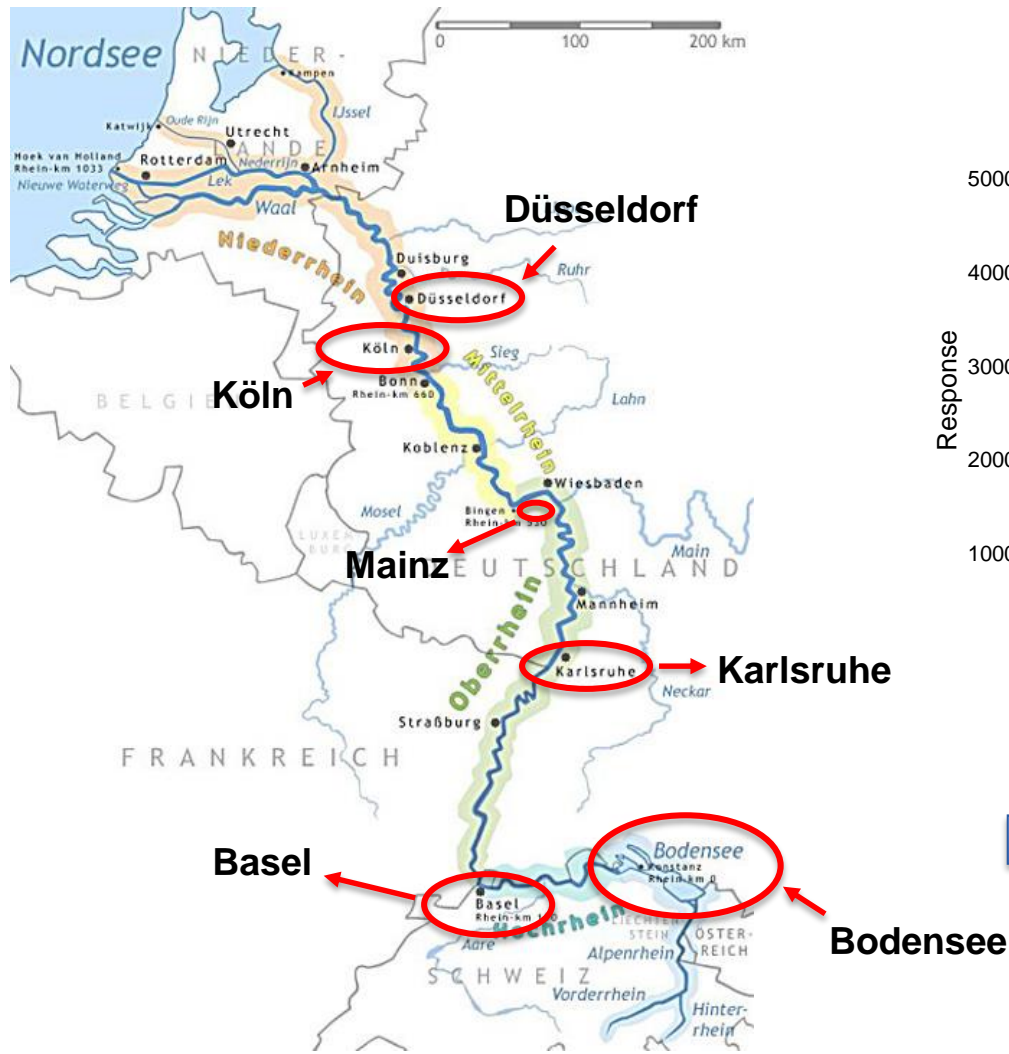


Bild: [https://www.radreisen-online.de/de/vergroesserte-karte-deutschland\\_\\_407/](https://www.radreisen-online.de/de/vergroesserte-karte-deutschland__407/)

Probe	m/z 326,1751 (6,3 min)	m/z 371,2328 (5,8 min)
Rhein (Düsseldorf)	✓	✓
Ruhr (Mülheim an der Ruhr)	—	—
Sieg (Meindorf)	—	—
Neckar	—	—
Mosel	—	—
Elbe (Magdeburg)	—	—
Main (Frankfurt)	—	—



# Suche nach der Eintragsquelle



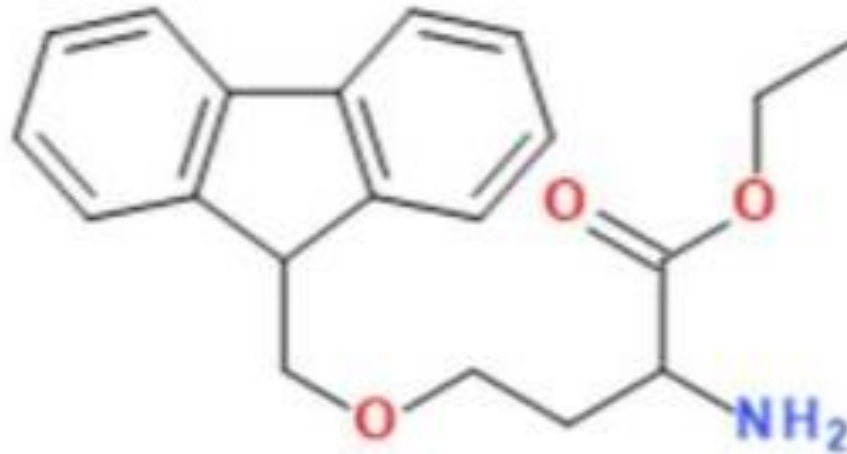
**Eintrag im Gebiet zwischen Bodensee und Basel**

**Abgeschätzte Menge:  
ca. 10 kg pro Tag**

Bild: <https://www.planet-schule.de/wissenspool/lebensraeume-im-fluss/inhalt/hintergrund/mensch-und-fluss/rheinbegradigung-i.html>

- Anreicherung von **50 Liter Rheinprobe** mit SPE-Kartuschen
- Fraktionierung der angereicherten Extrakte  
→ **ca. 10 µg F326**
- NMR-Untersuchung ( **$^1\text{H}$** ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ )
- UV-Spektrum, **Fluoreszenz**
- Derivatisierung (Fmoc-Cl, Veresterung ...)
- Tox-Test → **negativ!**
- Molekülstruktur?

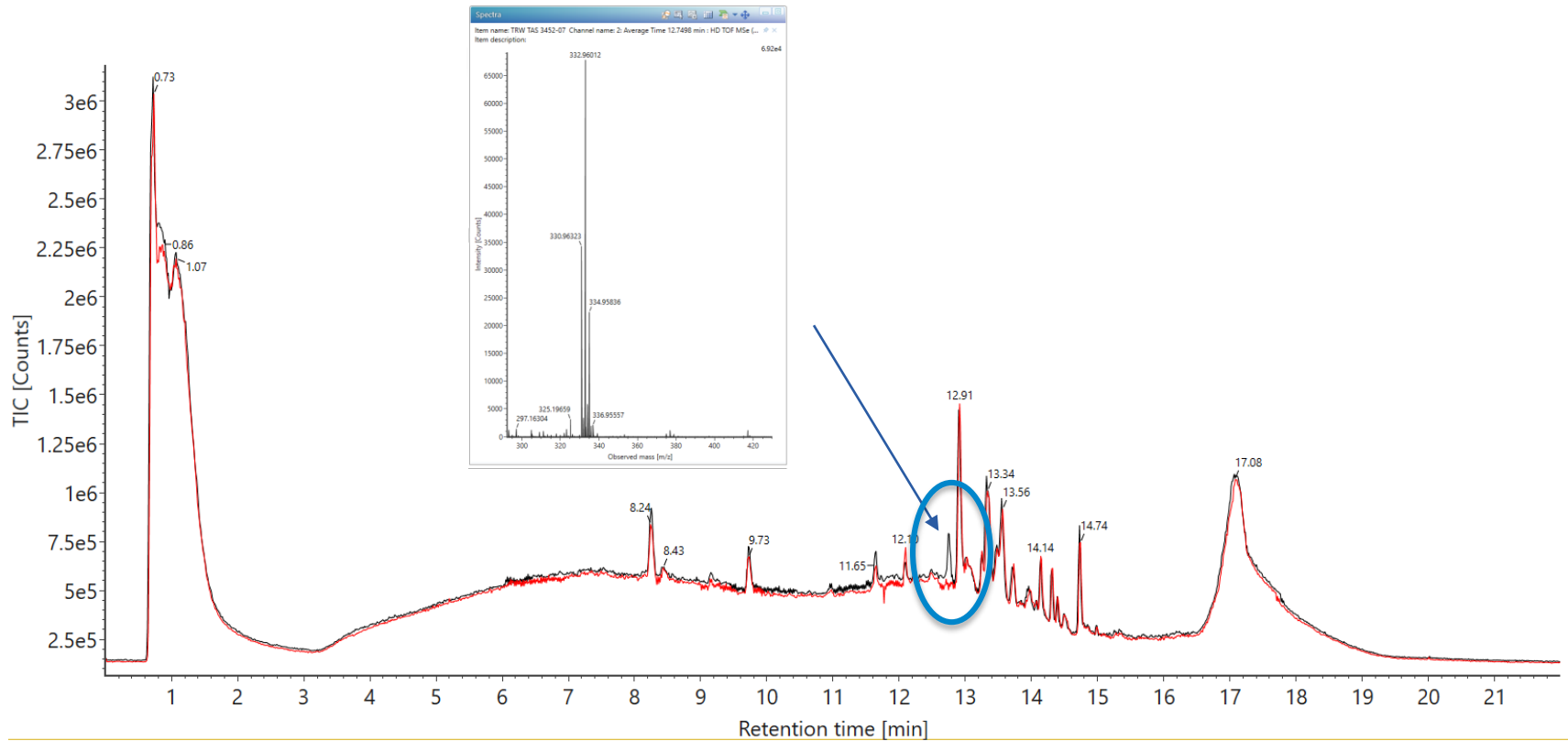
# Expertenvorschlag zur Molekülstruktur

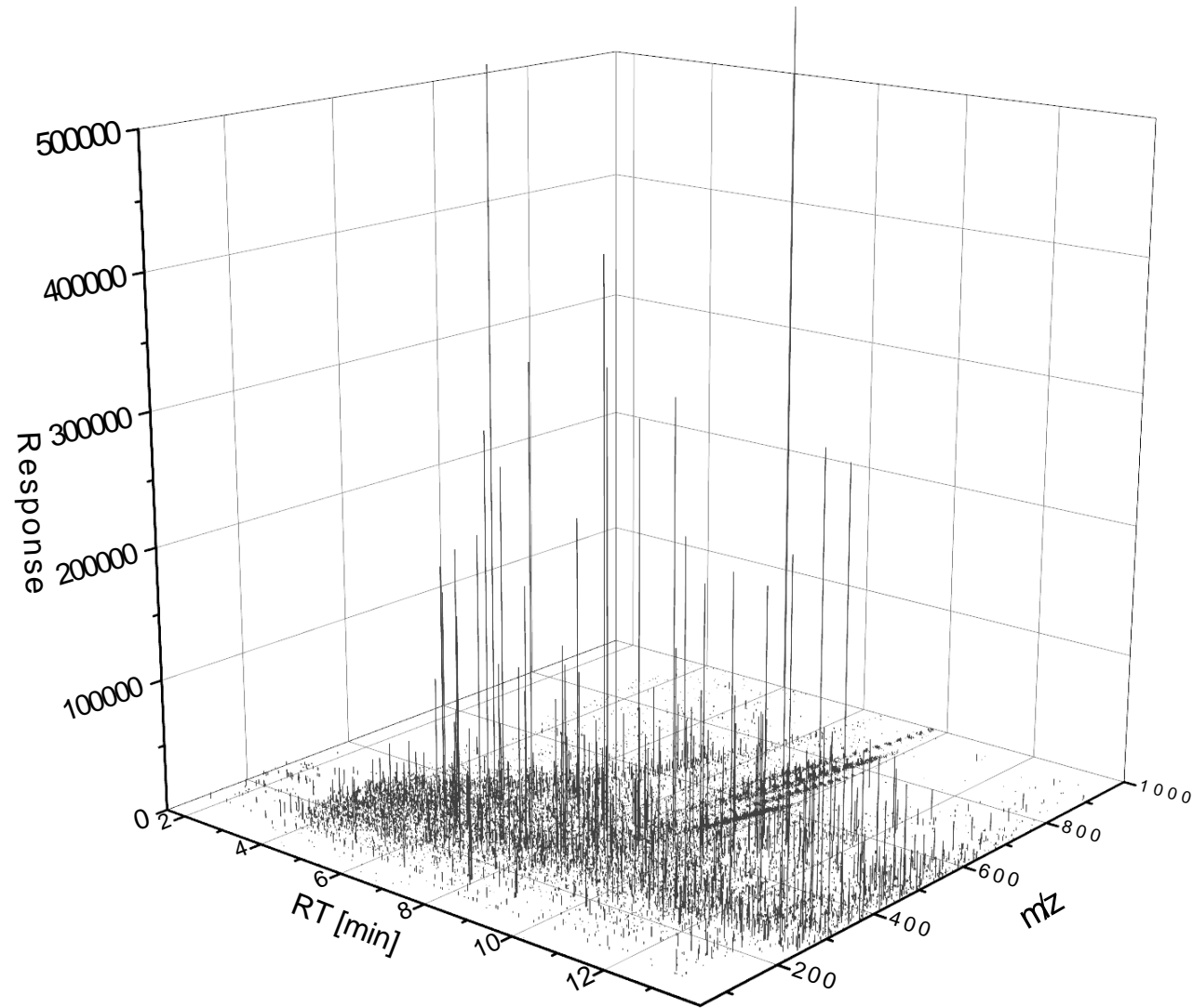


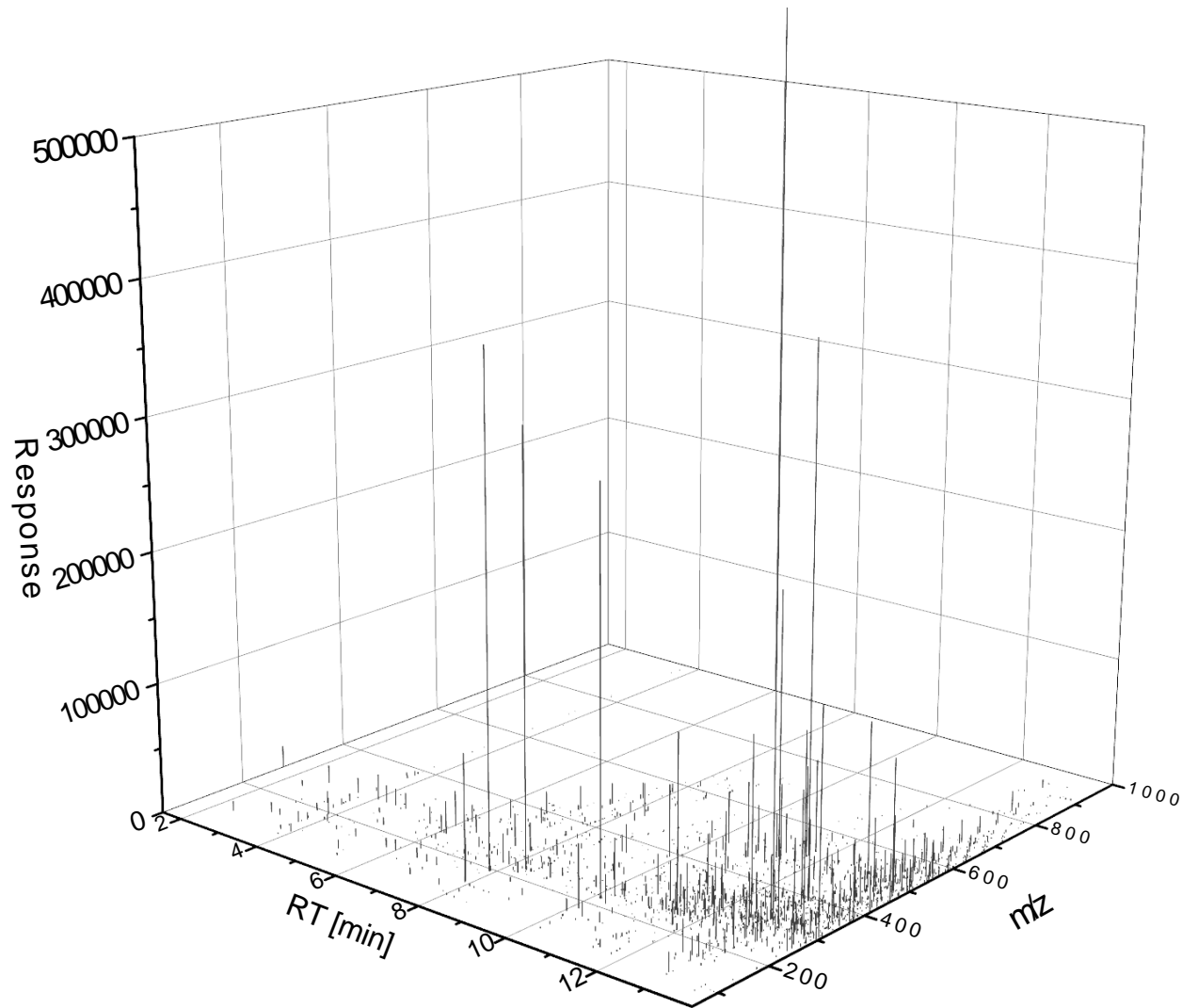
???

$M = 325,1678$   
 $C_{20}H_{23}NO_3$

TIC ESI negativ, vor Chlordioxid rot, Trinkwasser schwarz







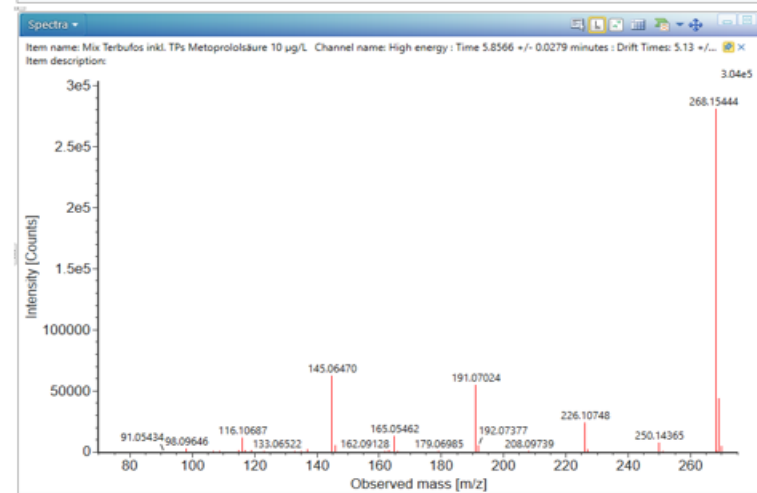
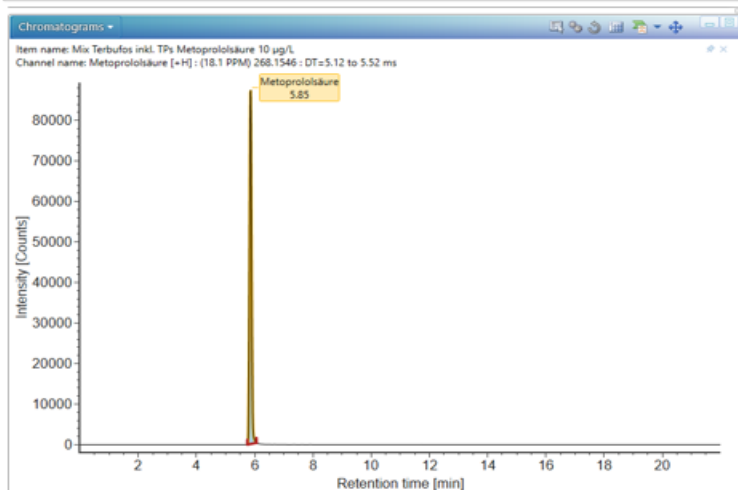
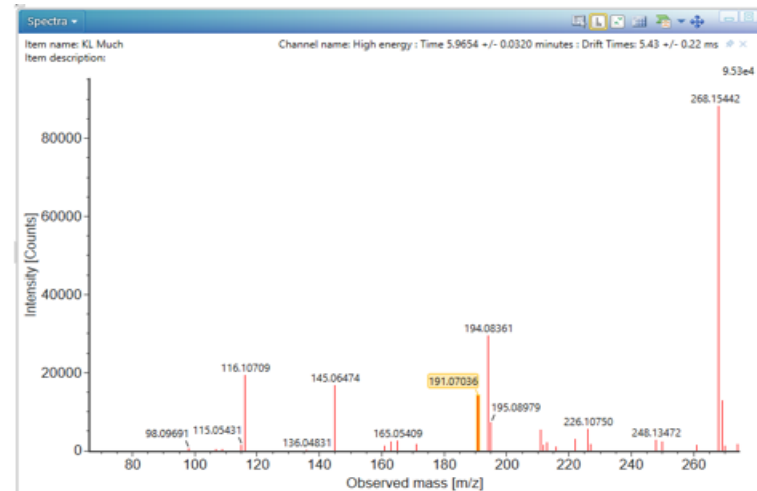
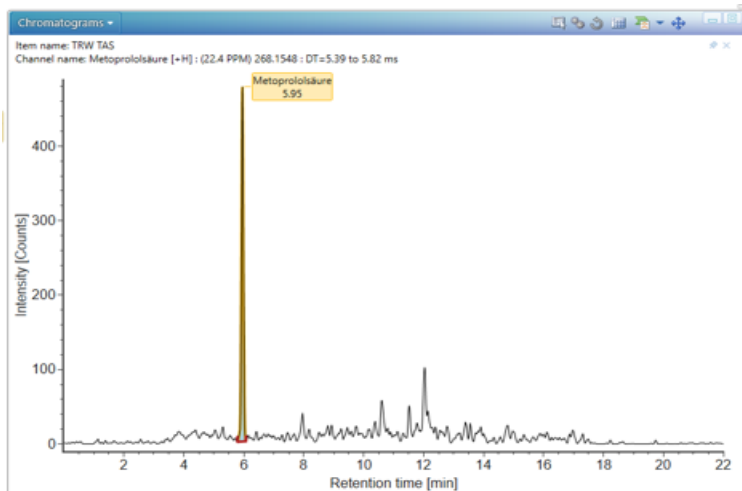
## ■ Datenreduktion am Beispiel Trinkwasser

Bearbeitungsschritt	Anzahl Peaks ESI +	Anzahl Peaks ESI -
Trinkwasser (1. Replikat) Rohdaten	2280	771
Adduktkorrektur	2215	769
Peaks in <b>allen</b> Triplikaten	1147	269
Blank-Abzug (100%)	409	134
Schnittmengenbildung (Kläranlage, 4 Rohwässer und TRW)	52	20
Manuelle Prüfung der Peaks	25	11
Summenformelgenerierung (i-Fit confidence > 80%)	8	3

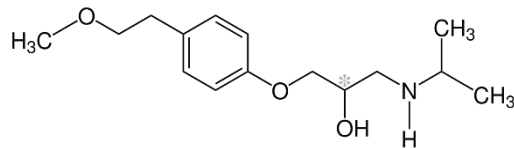
- Von 11 Kandidaten konnte dann 1 identifiziert werden
- m/z: 268.1546
- RT: 5.96 min
- Summenformel:  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4$
- Treffer ForIdent Datenbank
- Absicherung durch Referenzstandard



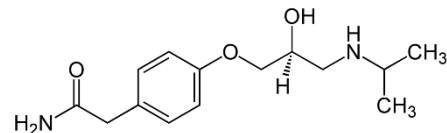
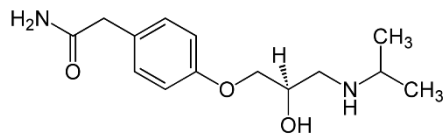
## ■ Identifizierung durch Referenzstandard



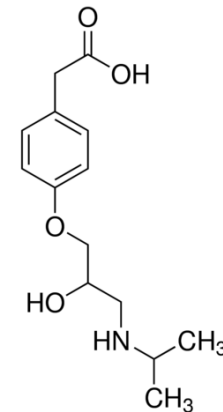
## ■ Struktur Metoprololsäure (Atenololsäure) ( $\log K_{ow,est}$ : -2,34)



Metoprolol



Atenolol



Metoprololsäure

**Zeitaufwand von der Analyse bis zur Identifizierung: 2 Wochen!**

## Vorteile der NT-Analytik:

- Schnelle Untersuchung von Wasserproben durch Direktinjektion.
- Unmittelbare Information zu spontan auftretenden Störstoffen (TIC).
- Rechtzeitiges Eingreifen im Trinkwasseraufbereitungsprozess möglich.
- Identifizierung von Eintragsquellen von Spurenstoffen, auch wenn deren Molekülstruktur unbekannt ist.
- Beurteilung von Aufbereitungsprozessen.
- Erkennen von Veränderungen im Wasserkörper (Stichwort: automatisierte Trendanalyse).
- Retrospektive Auswertung von Rohdaten (Big Data, Archivierung, Sicherung!)
- SQA und Suspect Screening liefert Informationen welche Substanzen in der Target-Analytik untersucht werden sollen (Beispiel: Sartane, Metoprololsäure).

## Vorteile der Kombination NTA-Tox

- Ganzheitlicher Ansatz, nicht nur chemische, sondern auch toxikologische Informationen.
- Ziel: Tox-Tests geben Hinweise zur Relevanz von unbekannten Stoffen und unterstützen damit die Priorisierung (Stichwort: diskriminierungsfreie Anreicherung).
- Robustere Datenbasis für eine Risikoabschätzung.