

ANALYTIK UND STOFFBEWERTUNG

VORBEUGENDES RISIKOMANAGEMENT: NON-TARGET-ANALYTIK UND TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG

BEISPIELE AUS OBERFLÄCHENWASSER- UND GRUNDWASSERUNTERSUCHUNGEN

02.10.2019

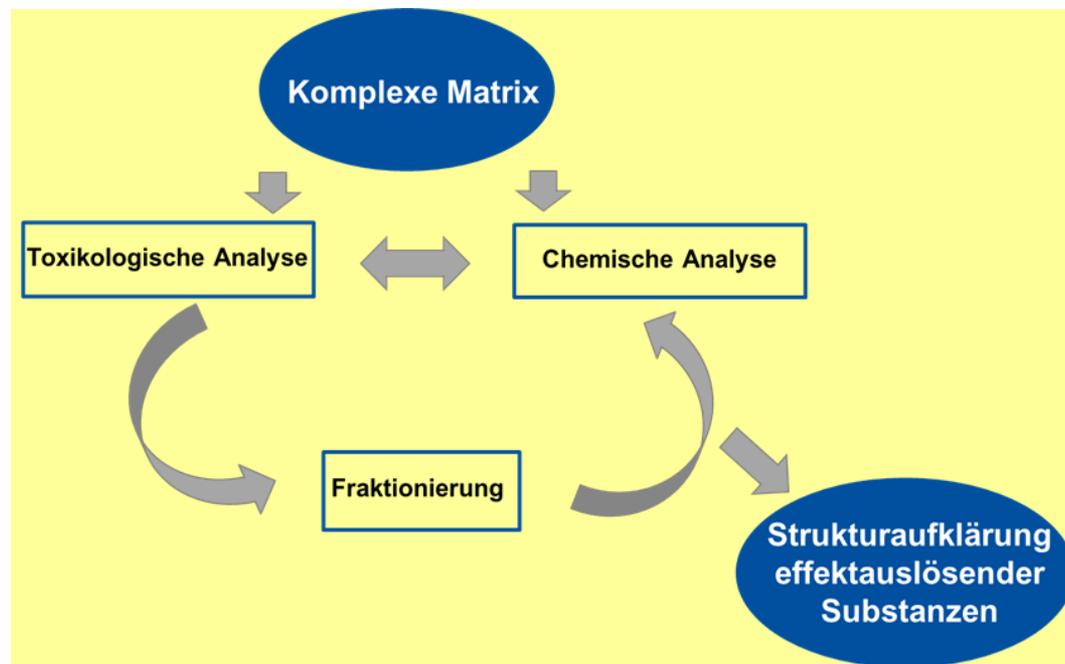
Peter Balsaa, Anne Gottschlich,
Vanessa Hinnenkamp

■ 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 α
- AR
- p53

Gentoxizität

(DNA-Schädigung)

umuC-Test



p53-CALUX

S. typhimurium
TA1535 pSK1002

p53-Zellen

Endokrine Aktivität

(Beeinflussung des Hormonstoffwechsels)

ER α -CALUX

AR-CALUX



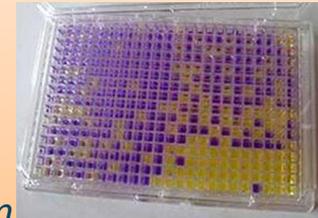
ER α -Zellen

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 α -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.

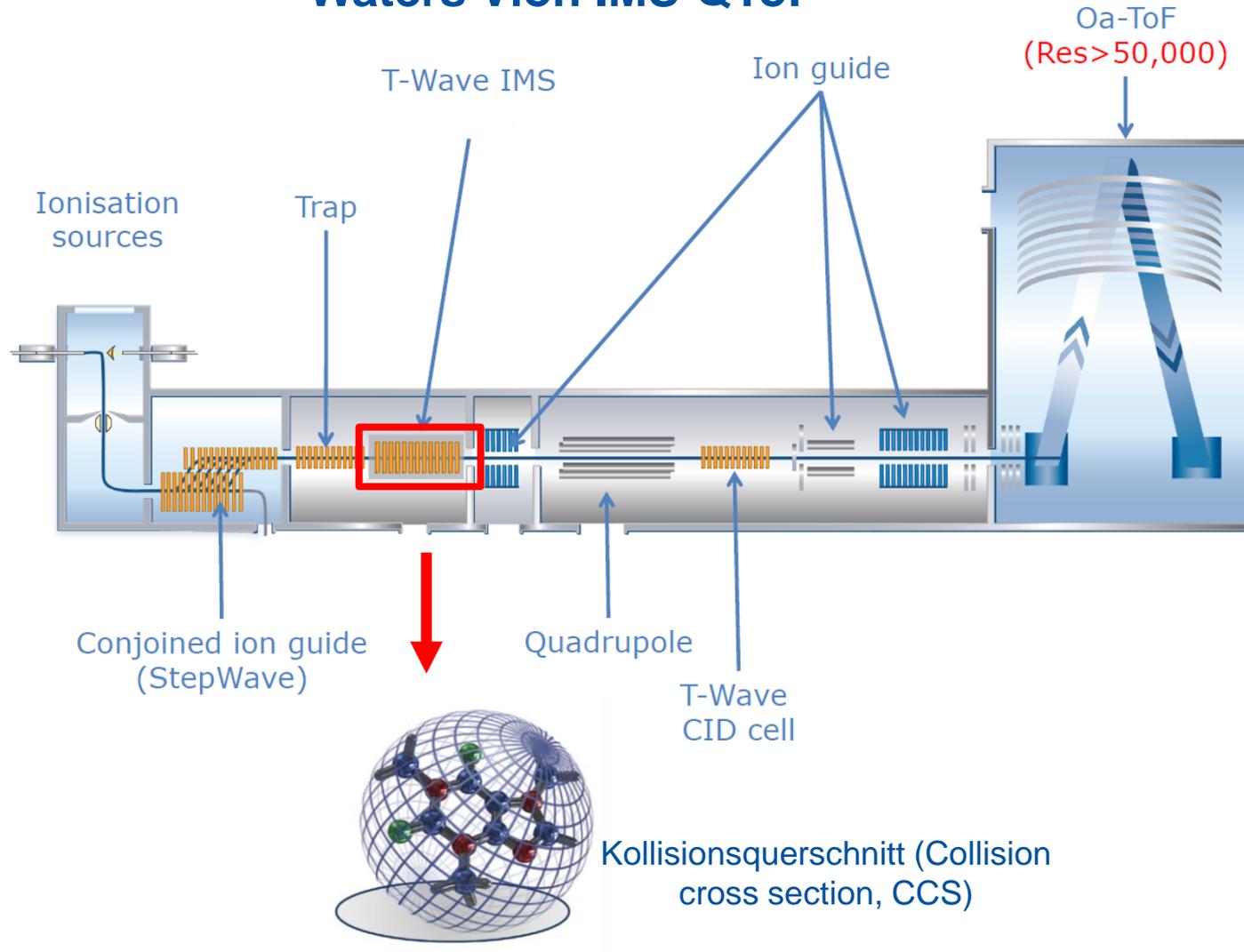
■ Was braucht man dazu?

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)

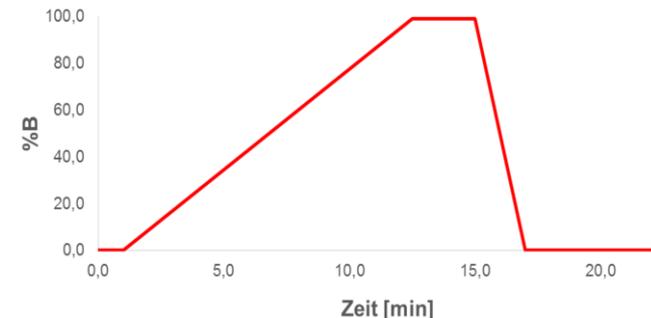
- Data independent acquisition mode (HDMSE)
- Massenbereich **100 bis 1000 Da**
- Messungen im ESI +/- Modus in getrennten Läufen

■ UPLC: Acquity I class (Waters)

- Säule: BEH Amid (1,7 μm , 2,1 x 5 mm) Vorsäule und HSS T3 (1,8 μm , 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 μL (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

n.n.	97 %
< 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 (± 2 mDa)
- Fragmentationen (mind. 1)
- CCS-Wert (Abw. max. 2%)
- Retentionszeit (± 0.05 min)
- In allen Triplikaten (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 $< 10\%$)

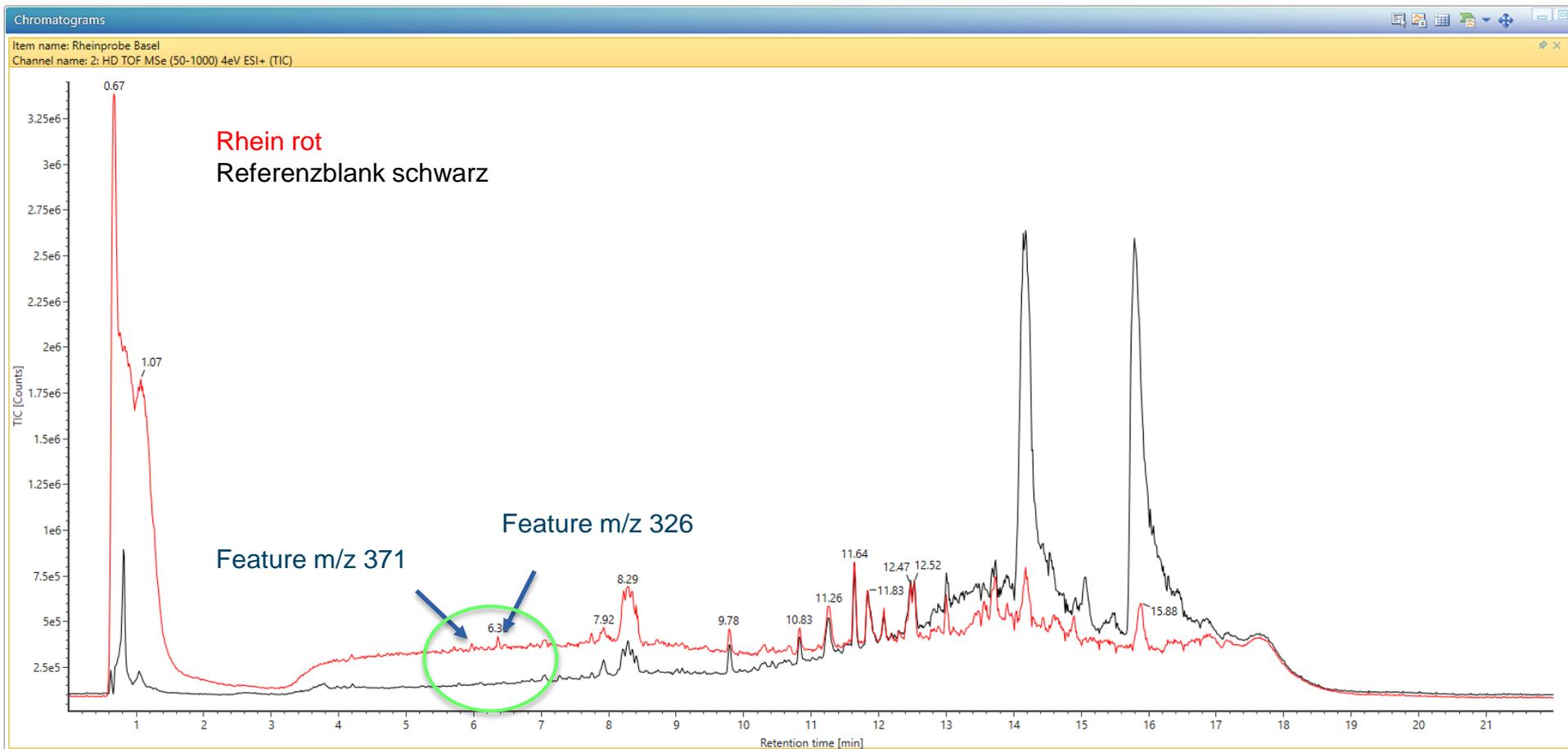
Level 3



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

Identifizierung von Unbekannten – Beispiel Rheinprobe

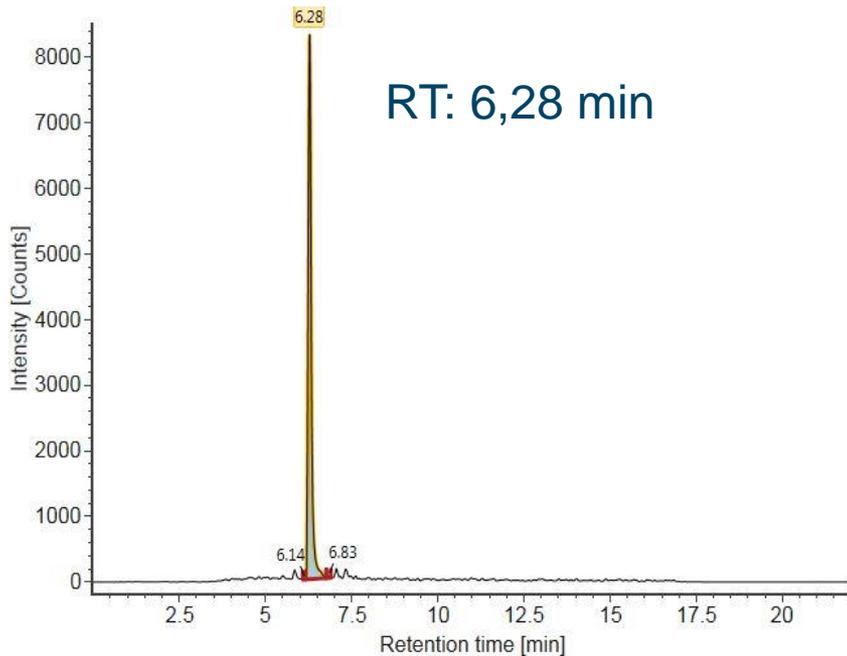
- Treffer für Benalaxyl (Fungizid) über das **Suspect Screening** in einer Rheinprobe



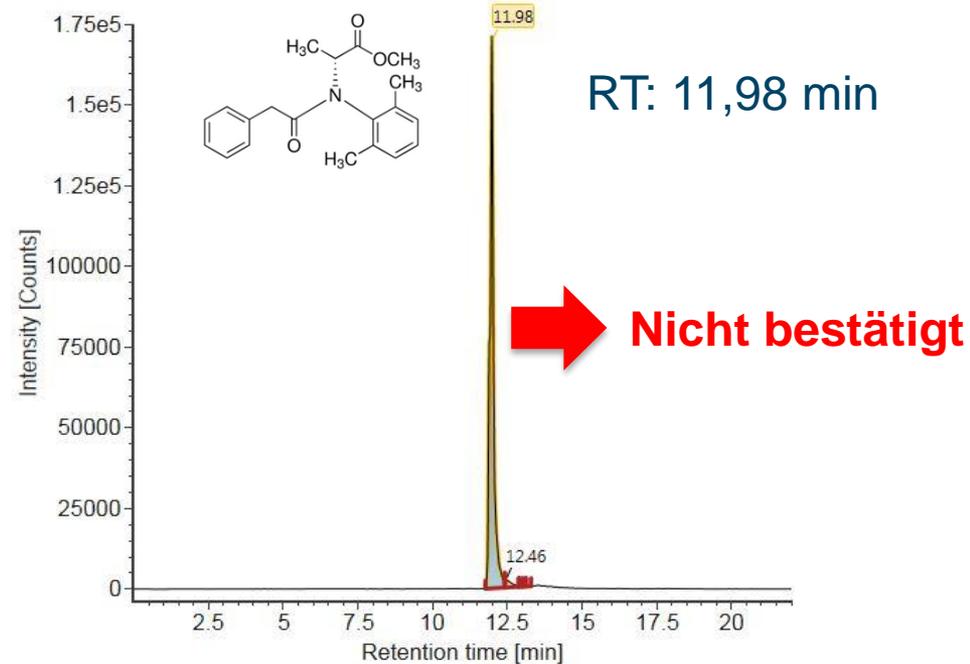
Identifizierung von Unbekannten – Beispiel Rheinprobe

- 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



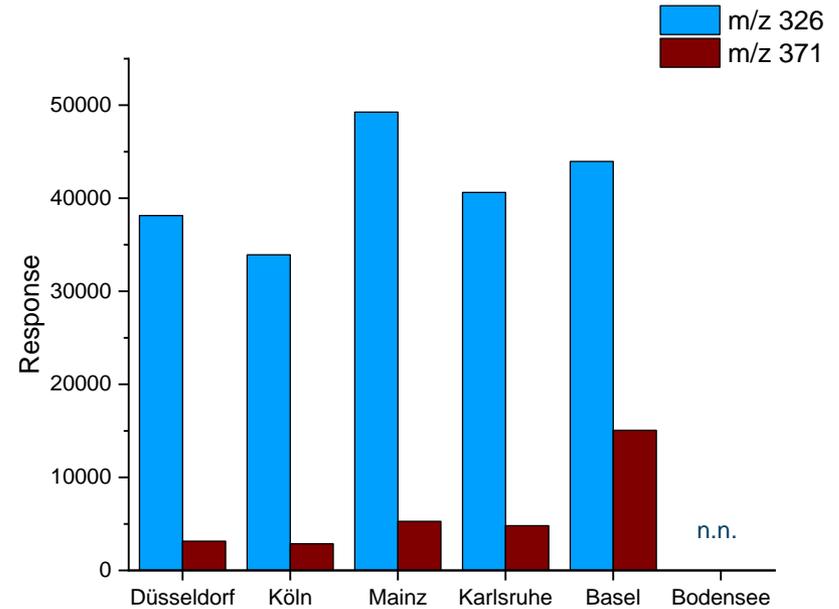
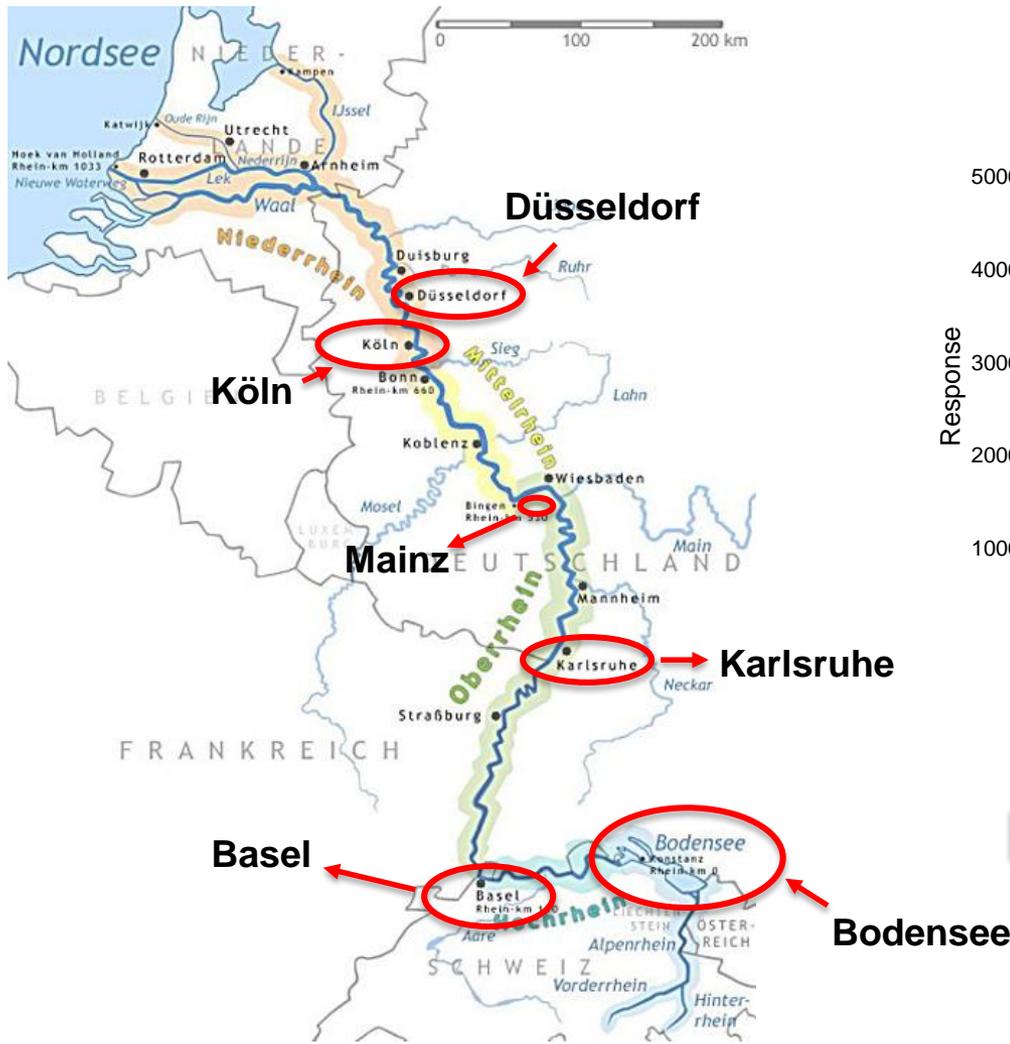
Suche nach der Eintragsquelle



Bild: https://www.radreisen-online.de/de/vergroesserte-karte-deutschland__407/

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



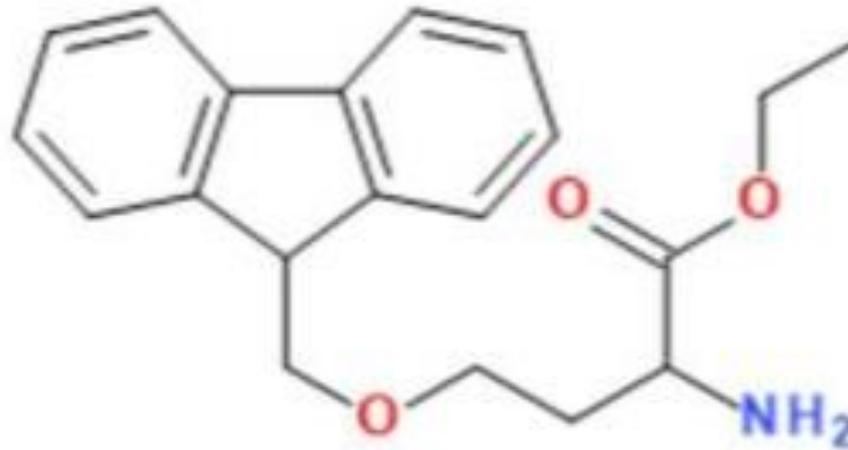
Eintrag im Gebiet zwischen Bodensee und Basel

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 (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P)
- UV-Spektrum, **Fluoreszenz**
- Derivatisierung (Fmoc-Cl, Veresterung ...)
- Tox-Test → **negativ!**
- Molekülstruktur?

Expertenvorschlag zur Molekülstruktur

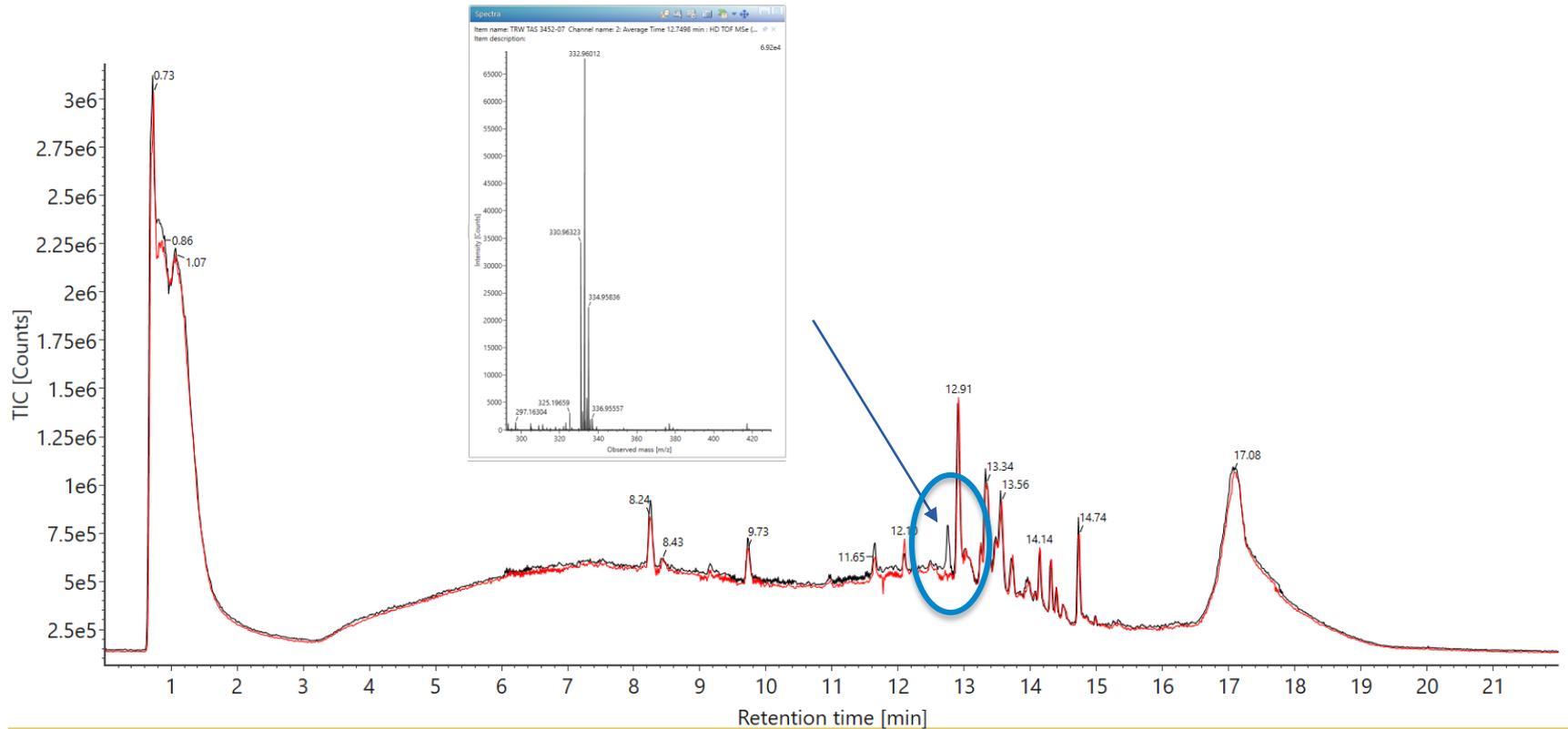


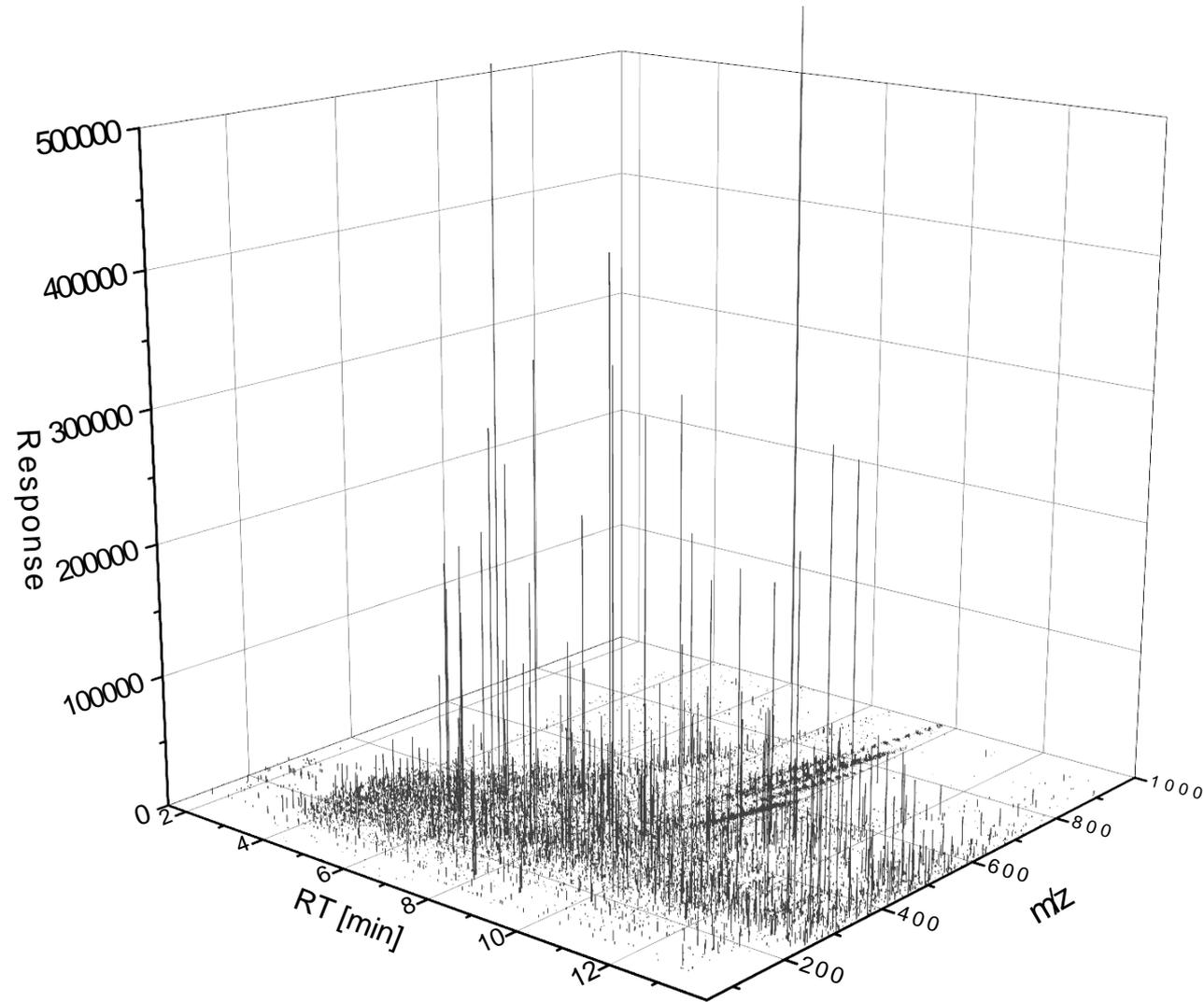
???

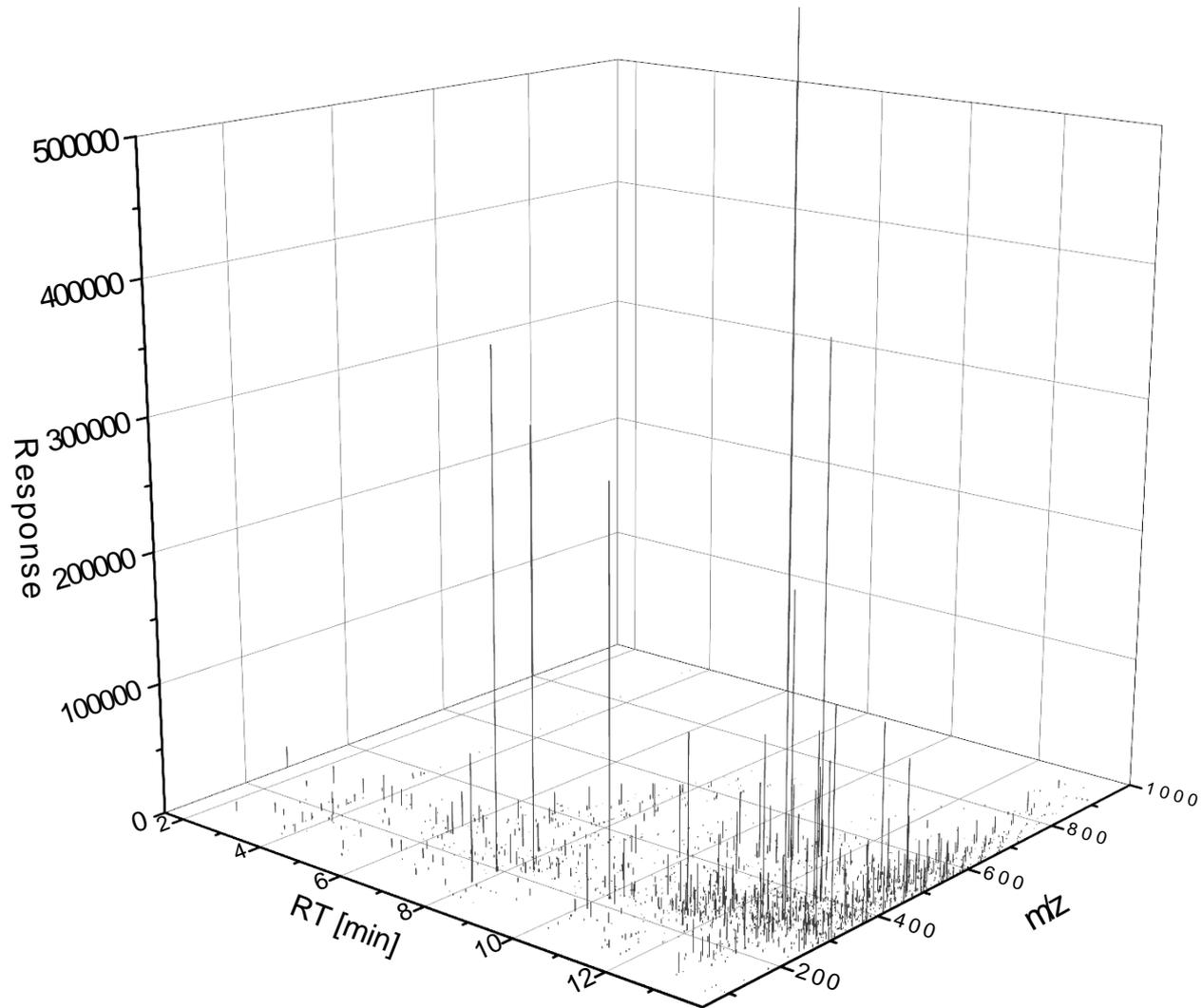
M = 325,1678
C₂₀H₂₃NO₃

Neues Feature

TIC ESI negativ, vor Chlordioxid rot, Trinkwasser schwarz





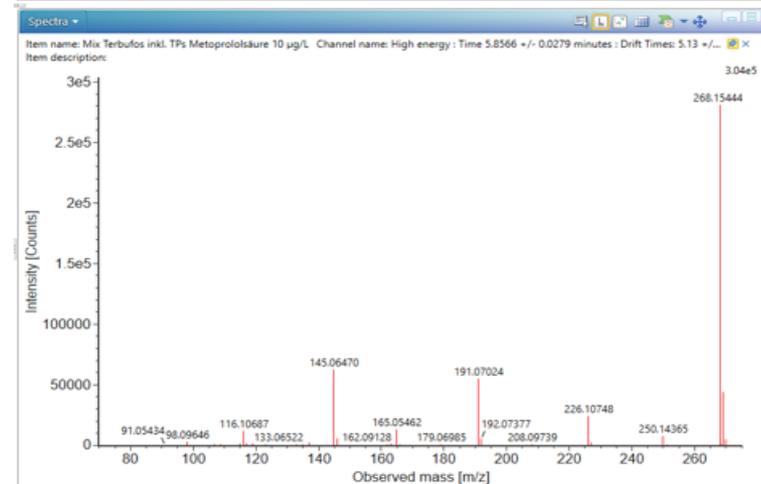
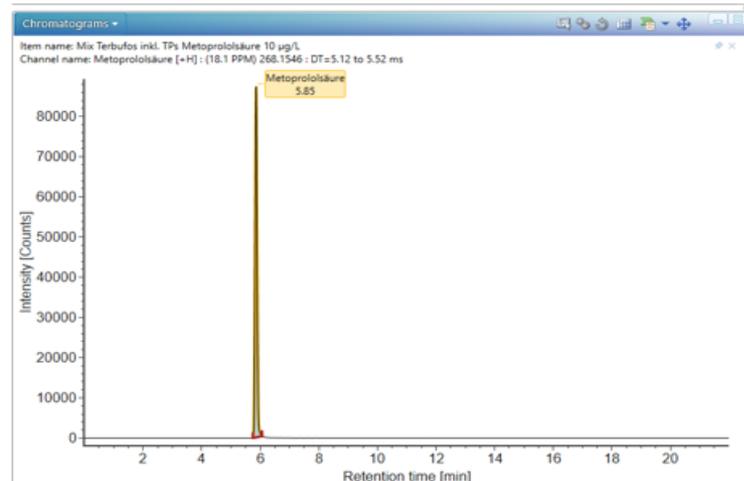
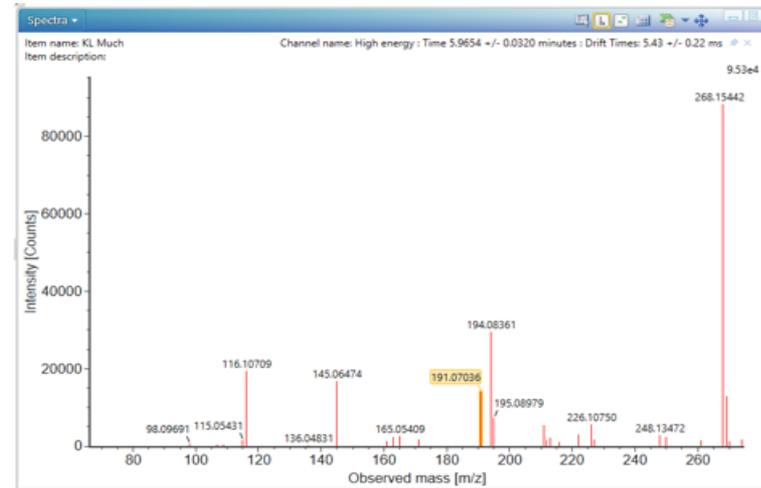
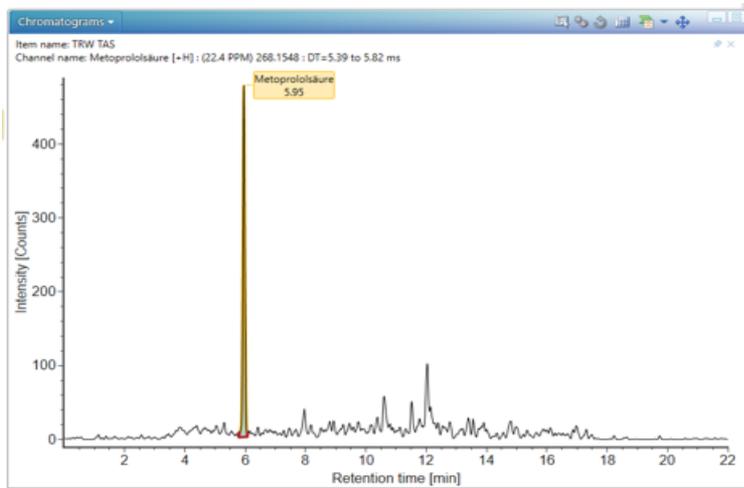


■ Datenreduktion am Beispiel Trinkwasser

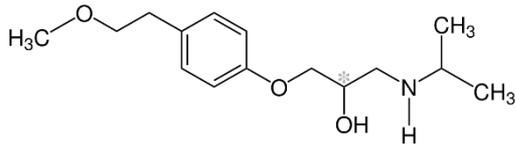
Bearbeitungsschritt	Anzahl Peaks ESI +	Anzahl Peaks ESI -
Trinkwasser (1. Replik) Rohdaten	2280	771
Adduktkorrektur	2215	769
Peaks in allen Triplikaten	1147	269
Blank-Abzug (100%)	409	134
Schnittmengenbildung (Kläranlage, 4 Rohwässer und TRW)	52	20
Manuelle Prüfung der Peaks	25	11
Summenformelgenerierung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

- Von 11 Kandidaten konnte dann 1 identifiziert werden
- m/z: 268.1546
- RT: 5.96 min
- Summenformel: $C_{14}H_{21}NO_4$
- **Treffer ForIdent Datenbank**
- **Absicherung durch Referenzstandard**

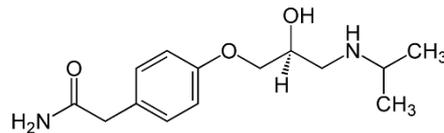
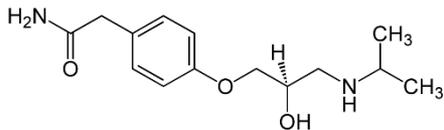
■ Identifizierung durch Referenzstandard



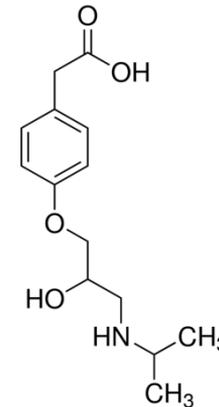
■ Struktur Metoprololsäure (Atenololsäure) ($\log K_{ow,est} = -2,34$)



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 unbekanntem Stoffen und unterstützen damit die Priorisierung (**Stichwort: diskriminierungsfreie Anreicherung**).
- Robustere Datenbasis für eine **Risikoabschätzung**.