

# Massenspektrometrie in der Wasseranalytik

## Screening nach TNT-Umwandlungsprodukten in Wasser



► Dipl.-Ing. (FH) Alexander Müller, Zweckverband Landeswasserversorgung, Langenau, Universität Lüneburg, Fakultät Umwelt und Technik, Fachbereich Umweltwissenschaften, Scharnhorststr. 1, 21335 Lüneburg, Deutschland

**Zur Trinkwassergewinnung wird neben Grundwasser auch Oberflächenwasser nach Uferfiltration und vereinzelt Oberflächenwasser direkt verwendet. Der anthropogene Einfluss auf diese Wasserressourcen und damit verbunden das Vorkommen von organischen Spurenstoffen ist bekannt (0). Deshalb muss zur Sicherung der hohen Trinkwasserqualität eine regelmäßige Überwachung der verwendeten Wässer durchgeführt werden.**

Die Analysen erfolgen häufig mittels Gas- (GC) und Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt mit einem Massenspektrometer (MS) (0). Aufgrund der hohen Anforderung an die Analysensysteme bezüglich der geringen Analytkonzentrationen, ist meist eine zeitaufwändige und kostenintensive Anreicherung erforderlich. Deshalb gewinnt die anreicherungsfreie LC-MS/MS in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung (0). Die Anzahl an untersuchten Analyten ist bei solchen Multi-Methoden messtechnisch begrenzt (Dwell time) und kann nur bekannte Schadstoffe berücksichtigen. Sie eignet sich daher besonders bei der Überwachung im gesetzlich geregelten Bereich. Man spricht hier von Target-Analytik. Weitere Substanzen werden hierbei nicht erfasst.

Zur Beurteilung von Wässern, besonders bei Nutzung als Rohwasser zur Trinkwassergewinnung, ist es erforderlich möglichst viel über Art und Konzentration der Belastung mit organischen Spurenstoffen zu kennen. Das erfordert ein Non-Target-Screening. Für unpolare, flüchtige Substanzen wird hierfür die GC-MS eingesetzt. Unbekannte Peaks im Chromatogramm können unter Zuhilfenahme einer Spektrenbibliothek und Fragmentierungsregeln identifiziert werden (0-0).

Polare, nicht verdampfbare Komponenten wie beispielsweise Umwandlungs- oder Abbauprodukte sind meist mittels GC-Technik ohne Derivatisierung nicht analysierbar. Für diese Substanzen bietet sich die LC-MS bzw. die LC-MS/

MS an. Die Verwendung von allgemeinen Spektrenbibliotheken in der LC-MS/MS ist infolge der Abhängigkeit von den Fragmentierungsbedingungen und Gerätekonstruktionen derzeit nur begrenzt für ein Non-Target-Screening möglich.

Für das Screening eignen sich besonders MS-Analysatoren, die Spektren mit einem hohem Auflösungsvermögen und exakter Masse generieren (0). Die exakte Masse ermöglicht die Berechnung einer Summenformel für die unbekannte Substanz. Welche Molekülstruktur zu der ermittelten Summenformel gehört kann beispielsweise durch Fragmentierung (MS/MS-Experimente) geklärt werden.

Das Non-Target-Screening mit LC-MS gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung (0-0) da zur Analyse der LC-MS/MS-Daten (u. U. mehrere GigaBytes) heute eine Vielzahl von Softwaretools zur Verfügung stehen. Dieser Datensatz enthält die gesamte Information über die Probe soweit sie mit der verwendeten Methode zugänglich ist. Im Gegensatz zur GC-MS liegen im Totalionenstromchromatogramm (TIC) des LC-MS-Chromatogramms diese meist nicht als Peak vor, sondern werden durch den Untergrund überlagert.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung des Non-Target-Screenings bei der Suche nach TNT-Umwandlungsprodukten in der aquatischen Umwelt. In Wasserproben aus der Nähe von Munitionslagern wurden durch das Gewässer- und Bodenschutzlabor (GBL, Bern) zum Teil Rückstände von Explosivstoffen wie beispielsweise Nitropenta, Hexogen und Octogen gefunden (0-0). Durch Anwendung des Non-Target-Screenings sollten mittels Nano-LC-Chip-QTOF

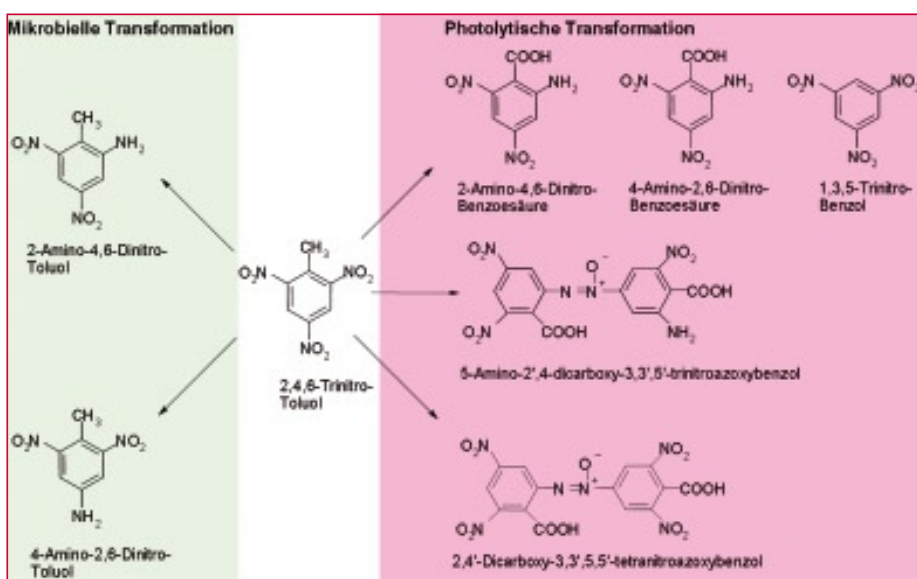


Abb. 1: Umwandlungsprodukte von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT)

m/z	Ion	Formula	Abundance
464.9921	(M+)	C14H19NO13	100.0

Best	Formula (M)	Ion Formula	Score	Mass	Calc Mass	Diff (ppm)	Abund Match	Spacing Match	Mass Match
1	C14H19NO13	C14H19NO13	98.64	465.9994	465.9993	-0.27	98.92	99.73	99.92

Isotope	Abund%	Calc Abund%	Calc Abund Sum%	m/z	Calc m/z	Diff (ppm)	Abund Sum%
1	100	100	01.92	464.9821	464.982	-0.28	93.68
2	18.11	17.89	14.05	465.9938	465.9948	1.77	13.48
3	3.38	4.19	3.43	466.9995	466.9964	-12.92	2.94

Best	Formula (M)	Ion Formula	Score	Mass	Calc Mass	Diff (ppm)	Abund Match	Spacing Match	Mass Match
2	C16H19NO14	C16H19NO14	97.29	485.9994	486.0806	2.69	92.9	96.97	93.24
3	C22H19NO15	C22H19NO15	92.33	485.9994	485.9995	0.13	46.96	98.97	95.98
4	C18H19NO15S	C18H19NO15S	82.1	485.9994	486.0802	1.99	43.39	97.96	97.44
5	C28H19NO15S	C20H19NO15S	81.5	485.9994	485.9861	-2.76	53.52	93.07	92.51
6	C14H14N2O12S2	C14H13N2O12	81.27	485.9994	485.9898	-1.29	41.11	95.3	96.34
7	C18H19O15	C18H19O15	79.17	485.9994	486.002	5.5	96.75	91.68	72.37
8	C12H12N5O11S2	C12H11N5O11	79.55	485.9994	485.9875	-4.16	42.88	98.22	83.74

Abb. 2: Summenformelvorschläge für die Masse 464.9921

Umwandlungsprodukte dieser Stoffe identifiziert werden. Die systematische Vorgehensweise wird im folgenden aufgezeigt.

**Material und Methoden**

**Probenvorbereitung**

Die Wasserproben aus dem Thuner- und Brienzensee wurden mittels Festphasenextraktion (SPE) angereichert. Die Probenahme erfolgte in unter-

schiedlichen Tiefen und zu verschiedenen Zeitpunkten. Jeweils 50 ml der 8 Wasserproben wurden sequenziell bei pH 7 und dann bei pH 2 auf je einer Phenomenex StrataX (Aschaffenburg, Deutschland) SPE-Kartusche angereichert (0).

**Nano-LC-Chip-Q-TOF**

Die Flüssigkeitschromatographie erfolgte mittels einer Agilent 1200 Series Nano-HPLC mit Chip-

Tab. 1: Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen

Nano-Pumpe	Eluent A	Reinstwasser + 5 mM Ammoniumacetat		
	Eluent B	Methanol + 5 mM Ammoniumacetat		
	Fluss	0,3 µL/min		
	Gradient	Zeit [min]	Anteil B [%]	
		0	20	
	3	20		
	13	95		
	30	95		
	30,2	20		
	35	20		
Kapillar-Pumpe	Eluent A	Reinstwasser		
	Eluent B	-		
	Fluss	2 µL/min		
Probengeber	Injektionsvolumen	1 µL		
Chip	Packungsmaterial	Zorbax 80SB-C18 (5µm)		
	Anreicherungssäule	40 nL		
	Analysensäule	160 nL (75 x 50 µm, 43 mm Länge)		
Chip-Cube	Injektionsspülvolumen	4 µL		
	Trocknungsgas	5 L/min		
	Trocknungstemperatur	300 °C		
	Elektrospray-Modus	HPLC-Chip (negativ)		
Q-TOF	Kapillarspannung	-1700 V		
	Fragmentorspannung	150 V		
	Skimmerspannung	65 V		
	Modus	MS-only (High Resolution, 4 GHz)		
	Scanbereich	50–1000 m/z		
	Scanrate	1 Spektrum/s		

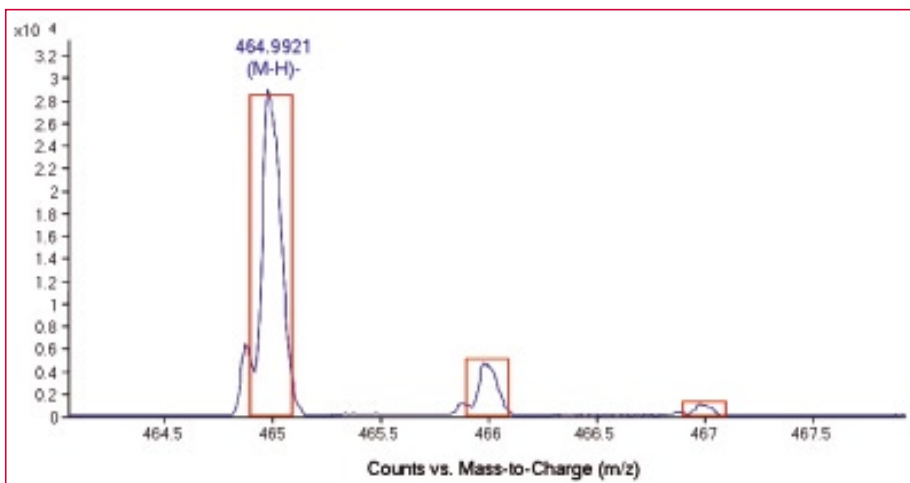


Abb. 3: Spektrum mit theoretischer Isotopenverteilung der Masse 464.9921

Cube gekoppelt mit einem Agilent 6520 Q-TOF. Für die chromatographische Trennung wird hierbei die Chip-Technologie verwendet. Auf dem Chip sind sowohl eine Anreicherungssäule als auch die Trennsäule integriert. Die Probenaufnahme auf die Anreicherungssäule erfolgt mittels der Kapillarpumpe mit 100% Reinstwasser ohne Zusatz von Modifiern. Durch das Schalten des Säulenventils wird die Probe von der Anreicherungssäule auf die Analysensäule transportiert und gelangt danach in die Ionisationsquelle.

**Verwendete Software und Datenbank**

Die Auswertung der Rohdaten (TIC) erfolgte mit der MassHunter Qualitative Analysis-Software (Version B.02.00, Build 2.0.192.0) von Agilent

(Waldbronn). Diese beinhaltet ein Softwaretool für die automatische Erkennung von chromatographischen Peaks im Signal-Untergrund auf Basis der Massenspektren (Molecular Feature Extractor MFE) und Extraktion der entsprechenden Ionenspuren (EIC), die Zuordnung von Summenformeln zur ermittelten exakten Masse und ein Programmteil zur Erstellung und Suche in einer Datenbank. In die lokale Datenbank wurden die bisher bekannten Umwandlungsprodukte von TNT in der Umwelt eingegeben.

**Ergebnisse und Diskussion**

In der Umweltanalytik liegen die organischen Spurenstoffe meist im ng/l- oder µg/l-Bereich vor. Deshalb ist eine hohe Empfindlichkeit des

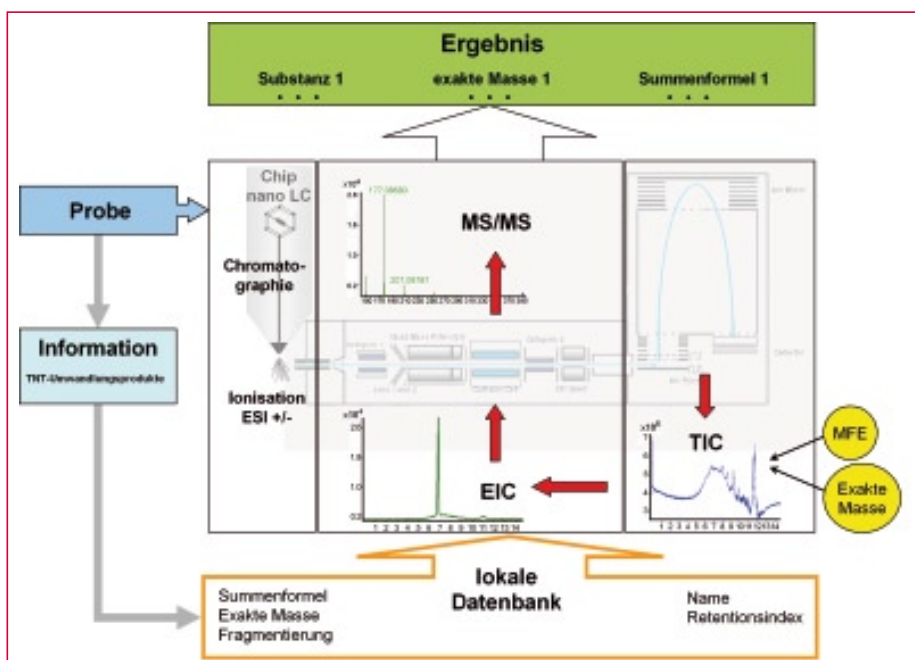


Abb. 4: Schematische Darstellung des Screenings für die TNT-Umwandlungsprodukte

verwendeten Analysensystems notwendig. Dies wird durch die Kopplung der Nano-LC mit der Q-TOF erreicht. Das Screening nach TNT-Umwandlungsprodukten in den SPE-Extrakten der Wasserproben gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

**Analyse (Messung)**

Die chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Ionisation erfolgte im negativen ESI-Modus.

**Extraktion der Ionenspuren**

Für die Wasserekktrate erfolgte eine automatische Extraktion der chromatographischen Peaks aus dem TIC. Die Parametereinstellungen wurden so gewählt, dass auch kleine Signale erkannt wurden. Hierzu wurde das minimale Signal-Rausch Verhältnis auf 5 gesetzt. Die Anzahl der gefundenen Komponenten lag zwischen 300 und 3000.

**Datenbankabfrage**

Mit den ermittelten exakten Massen erfolgte eine Datenbankabfrage. Im vorliegenden Fall wurde eine selbst aus Literaturdaten erstellte Datenbank für Explosivstoffe und deren Abbauprodukte verwendet. Die Suche ergab folgende Substanzvorschläge:

- 2-Amino-4,6-dinitrotoluol
- 2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure
- 2,4'-Dicarboxy-3,3',5,5'-tetrinitroazoxybenzol
- 5-Amino-2',4-dicarboxy-3,3',5,5'-trinitroazoxybenzol

Bei diesen Substanzen handelt es sich mikrobielle und mögliche photolytische Umwandlungsprodukte von Trinitrotoluol (Abb. 1).

**Verifizierung**

Für die vier zugeordneten Substanzen wurden nun mit Hilfe der experimentell ermittelten exakten Massen und dem Formelgenerator mögliche Summenformeln generiert. Diese Summenformeln wurden mit der jeweiligen Summenformel der Treffer der Datenbankabfrage verglichen und bewertet. Die Bewertung erfolgte mit einem absoluten Score, der sich aus drei unterschiedlichen Scores zusammensetzt und automatisch durch den Formelgenerator berechnet wird. Neben der Abweichung der experimentellen exakten Masse (Wichtungsfaktor 10) und dem Isotopenmuster

Tab. 2: Ergebnisse der Berechnung der Summenformel mittels Formelgenerator

Substanz	2-Amino-4,6-dinitrotoluol	2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure	2,4'-Dicarboxy-3,3',5,5'-tetranitroazoxybenzol	5-Amino-2',4 dicarboxy-3,3',5'-trinitroazoxybenzol
Summenformel (M)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub>
Masse [u]	197,0437	227,0178	465,9993	436,0251
Masse [u] (gemessen)	197,0435	227,0176	465,9994	436,0280
Massendifferenz [ppm]	0,82	1,13	-0,27	-6,6
Score exakte Masse	99,73	99,38	99,92	65,64
Score	99,85	72,42	96,92	82,12
Istopenmuster				
Score Spacing	99,94	31,22	89,73	15,01
Gesamtscore (absolut)	99,82	75,45	96,64	58,29
Bewertung	nachgewiesen	wahrscheinlich nachgewiesen	nachgewiesen	nicht nachgewiesen
Doppelbindungs-äquivalente	6	7	15	
Untergrundkorrektur	nein	ja	ja	nein

(Wichtungsfaktor 6) von den berechneten Werten wird auch noch das so genannte Spacing (Wichtungsfaktor 5) berücksichtigt. Hierbei handelt es sich um den Abstand der Isotopenpeaks im Massenspektrum. Des Weiteren können der Massendefekt und Doppelbindungsäquivalente in die Bewertung mit eingezogen werden. Je näher der Score bei 100 liegt, desto sicherer ist die ermittelte Summenformel. In Tab. 2 sind die unterschiedlichen Scores und weitere Ergebnisse der Berechnung der Summenformeln mittels Formelgenerator dargestellt. Für die Substanz 2-Amino-4,6-dinitrotoluol liegt der ermittelte absolute Score bei 99,82, d.h. eine sehr gute Übereinstimmung der experimentellen und theoretischen Daten in allen Bewertungskriterien. Der absolute Score von 2,4'-Dicarboxy-3,3',5,5'-tetranitroazoxybenzol erreicht mit 96,64 eine ähnlich gute Übereinstimmung, jedoch erst nachdem eine Untergrundkorrektur des Massenspektrums durchgeführt wurde (Abb. 2). Massen aus dem Untergrund können das Isotopenmuster eines Analyten besonders bei geringer Konzentration verfälschen und somit den Score für das Isotopenmuster und Spacing stark erniedrigen (Abb. 3). Die ermittelte exakte Masse von 2-Amino-4,6-dinitrotoluol zeigt zur theoretischen lediglich eine Abweichung von 1,1 ppm (Score = 99,38), aber für die zwei weiteren Scores wurden trotz Untergrundkorrektur eine starke Abweichungen (Score 72,4 und 31,2) festge-

stellt. Für 5-Amino-2',4-dicarboxy-3,3',5'-trinitroazoxybenzol liegt mit 58,29 der geringste gesamt Score vor. Die Identität der Verbindung ist damit nicht gesichert.

In Abb. 4 ist die prinzipielle Vorgehensweise zusammenfassend schematisch dargestellt.

### Fazit und Ausblick

Voraussetzung für ein schnelles und erfolgreiches Non-Target-Screening ist die Ermittlung der exakten Masse und Einsatz geeigneter Softwaretools. Eine problembezogene Datenbank, die nicht nur die exakte Masse der Substanz, sondern auch Daten zu MS/MS enthält ist ein wichtiger Bestandteil für ein Non-Target-Screening.

Die Verwendung von absoluten Scores zur Bewertung der Zuordnung ist eine wichtige Unterstützung. Für eine endgültige Identifizierung sind MS/MS-Experimente erforderlich.

### Literatur

- [1] Daughton, C.G.; Ternes, T.A.: Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?, *Environmental Health Perspectives* 107, 907–944 (1999)
- [2] Zwiener, C.; Richardson, S.D.: Analysis of disinfection by-products in drinking water by LC-MS and related MS techniques, *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (7), 613–621 (2005)

- [3] Seitz, W.; Schulz, W.; Weber, W.H.: Novel applications of highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry for the direct detection of ultra-trace levels of contaminants in water, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2281–2285. (2006)
- [4] Bobeldijk, I.; Vissers, J.P.C.; Kearney, G.; Major, H.; van Leerdam, J.A.: Screening and identification of unknown contaminants in water with liquid chromatography and quadrupole-orthogonal acceleration-time-of-flight tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 929, 63–74 (2001)
- [5] Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.R.: Matching unknown empirical formulas to chemical structure using LC/MS TOF accurate mass and database searching: example of unknown pesticides on tomato skins, *Journal of Chromatography A*, 1067, 127–134 (2005)
- [6] Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; McMillan, D.; Rao, R.; Hernández, F.: Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.*, 2008, doi:10.1016/j.trac.2008.03.007.
- [7] Berset, J. D., Schiesser, N., Schnyder, T., Affolter, A., Schreiber, A., Quantitative analysis of explosives in surface water comparing off-line solid phase extraction and direct injection LC/MS/MS, *Application Note Applied Biosystems*, 1–7 (2008)
- [8] Berset, J. D.; Ochsenbein, U.; Zeh, M.: Are lake Thun and lake Brienz contaminated with explosive residues?, *Highlights of Analytical Chemistry in Switzerland*, 61. (2007)
- [9] Vollmer, M.; Hörth, P.; Rozing, G.; Couté, Y.; Grimm, R.; Hochstrasser, D.; and Sanchez, J.-C.: Multi-dimensional HPLC/MS of the nucleolar proteome using HPLC-chip/MS, *J. Sep. Sci.*, 29(4), 499–509 (2006)

### ► KONTAKT

#### Dipl.-Ing. (FH) Alexander Müller

Zweckverband Landeswasserversorgung, Langenau,  
Universität Lüneburg  
Fakultät Umwelt und Technik

#### Dr. Wolfgang Schulz

#### Dr. Wolfram Seitz

#### Dr. Walter H. Weber

Zweckverband Landeswasserversorgung,  
Betriebs- und Forschungslaboratorium  
Langenau  
schulz.w@lw-online.de  
www.lw-online.de

#### Dr. Jean-Daniel Berset

Amt für Gewässerschutz und Abfallwirtschaft des  
Kantons Bern  
Gewässer- und Bodenschutzlabor  
Bern, Schweiz