

Identifizierung von Markierungsfarbstoffen und deren Metaboliten in Grundwasser mittels Nano-Chip-LC/QTOF-MS nach HPTLC-AMD

Müller, A.^{1,2}, Langenau /D, Weiss, S. C.^{1,2}, Langenau/ D, Schulz, W.¹, Langenau/D,
Weber, W. H.¹, Langenau/D

Dr. Walter H. Weber,¹ Zweckverband Landeswasserversorgung,
Betriebs- und Forschungslaboratorium, Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau
²Universität Lüneburg, Fakultät Umwelt und Technik

Einleitung

Es ist bekannt, dass auch zur Trinkwassergewinnung verwendete Wasserressourcen durch anthropogene Einflüsse und somit beispielsweise durch organische Spurenstoffe kontaminiert sein können.^[1] Um eine hohe Trinkwasserqualität zu ermöglichen, ist für die Landeswasserversorgung (LW) deshalb eine regelmäßige und möglichst umfassende Überwachung der benützten Rohwässer zwingend notwendig. Für die Bestimmung von bekannten Substanzen (Target-Analytik) wird meistens die Gas- (GC) und Flüssigkeitschromatographie (LC) in Kopplung mit einem Massenspektrometer (MS) unter Verwendung von Multimethoden eingesetzt.^[2] Zur weitergehenden Beurteilung der verwendeten Rohwässer ist es jedoch erforderlich, ein Screening auf weitere mögliche Kontaminanten (Wirkstoffe, Metabolite und Transformationsprodukte) im Sinne einer Non-Target-Analytik durchzuführen. Bei der LW erfolgt dies im Rahmen eines multidimensionalen Screenings unter Zuhilfenahme zusätzlicher Trenn- und Detektionstechniken, wie der HPTLC/AMD und der QTOF-MS.

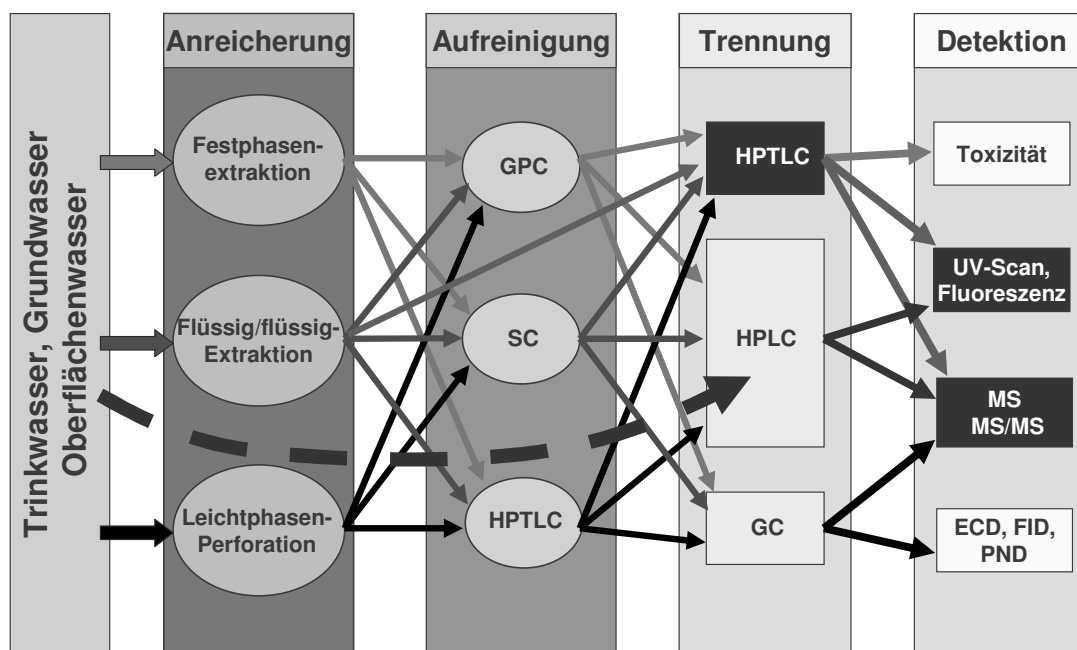


Abbildung 1: Schematische Darstellung des multidimensionalen Screenings für die Ressourcenuntersuchungen beim Zweckverband Landeswasserversorgung (LW)

Der Aufbau des multidimensionalen Screenings ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt.

So ist es mit Hilfe dieses multidimensionalen Screenings bei einer Routineüberprüfung von Grundwasser aus einem Beobachtungsbrunnen, das eine auffällige Rosafärbung aufwies, gelungen, Rhodamin B und dessen desalkylierte Transformationsprodukte nachzuweisen. Hierbei war die Planarchromatographie (PC o. TLC) in Form der automatisierten Mehrfachentwicklung (HPTLC/AMD) neben der QTOF-MS von zentraler Bedeutung.

Da es sich bei der TLC/AMD um ein offenes Chromatographiesystem handelt, können verschiedenste Detektionstechniken, wie die UV-Absorption und die Fluoreszenz eingesetzt werden. Weiterhin ist es möglich, unter Verwendung eines speziellen Extraktors und Transfer des Extraktes in ein Massenspektrometer, entsprechende Untersuchungen durchzuführen^[3]. Zusätzlich können zur Unterstützung bei der Strukturaufklärung Farbreaktionen durch direkte Derivatisierung auf der TLC-Platte vorgenommen werden.^[4]

Durchführung und Ergebnisse

Zunächst wurde eine schnelle dünnschichtchromatographische Voruntersuchung ohne Anreicherung durch direktes Auftragen von 100 µL Probe durchgeführt. Dabei wurden auf der TLC-Platte mehrere eigenfluoreszierende Zonen (Hinweis auf Markierungsfarbstoffe) sichtbar.

Durch Optimierung der Chromatographie mittels HPTLC/AMD konnte eine Auftrennung in sieben Zonen erreicht werden (vgl. Abbildung 3, linker Bildteil), wobei die siebte Zone durch Abgleich mit mehreren Referenzfarbstoffen als Rhodamin B identifiziert werden konnte. Eine Zuordnung der sechs weiteren Zonen mit einem der anderen Farbstofftracer, z.B. Eosin und Uranin, gelang nicht. Es lag deshalb die Vermutung nahe, dass es sich um Abbauprodukte von Rhodamin B handeln könnte.

Nun folgte zur Identifikation der Substanzen eine offline-Kopplung der HPTLC/AMD mit einem MS (Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer, QTOF-MS). Dabei wurden die einzelnen Zonen unter Zuhilfenahme des in Abbildung 2 dargestellten Extraktors von der Platte extrahiert und anschließend mittels Nano-Chip-LC/QTOF-MS analysiert.^[5]

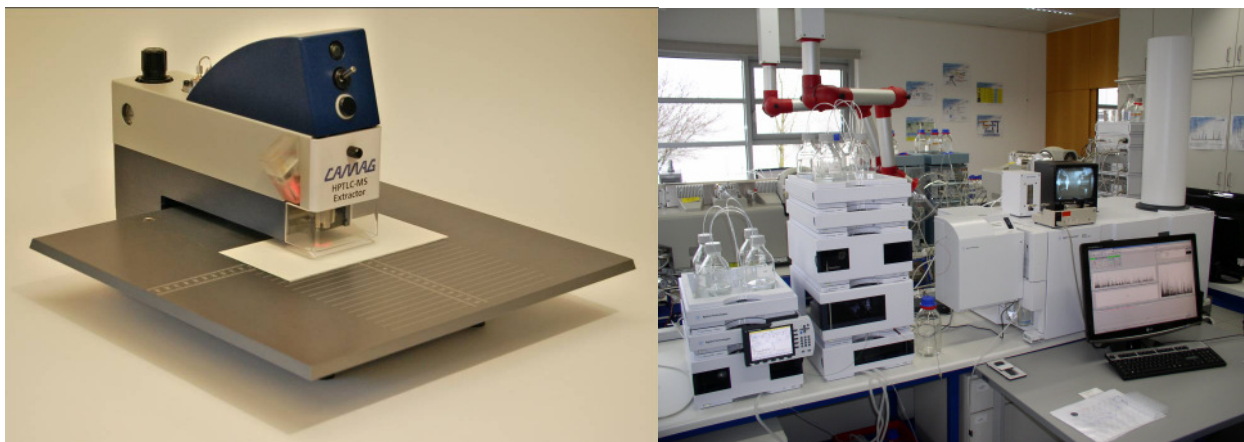


Abbildung 2: TLC/MS-Extraktor (Camag, links) und Nano-Chip-LC/QTOF-MS (Agilent, rechts)

Zunächst konnte in dem Extrakt der siebten Zone Rhodamin B mittels eines MS/MS-Experimentes bestätigt werden (Abb. 3).

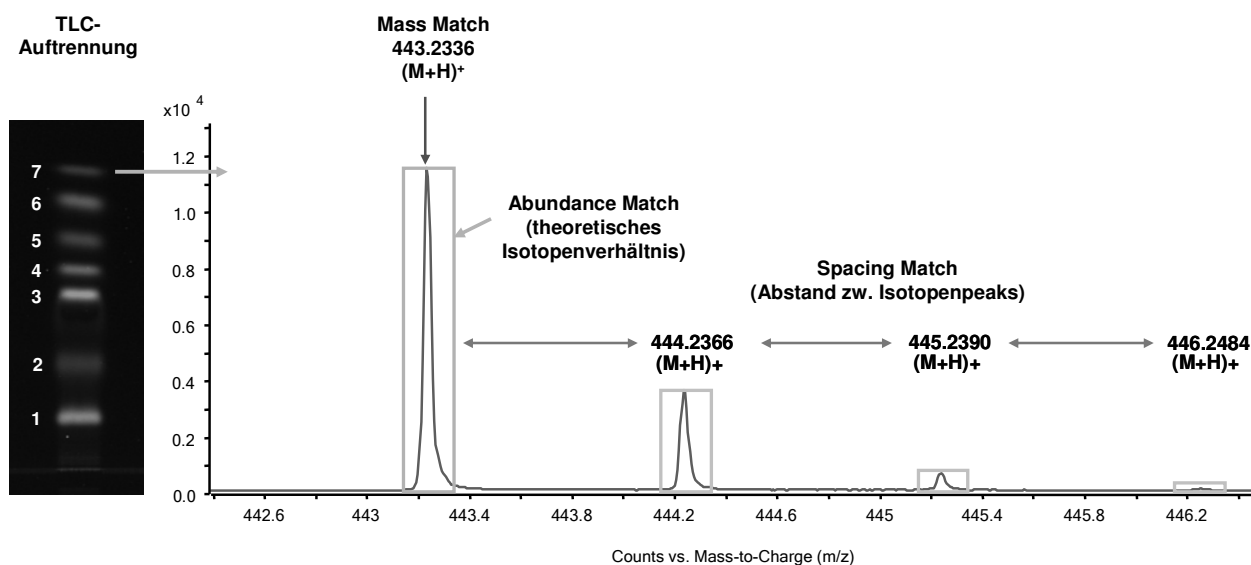


Abbildung 3: Isotopenmuster für Rhodamin B und Überstimmung mit dem theoretischen Verhältnis nach Extraktion von der TLC-Platte

Die Substanzen in den weiteren Extrakten der sechs zusätzlichen Zonen konnten über ihre exakten Massen den desalkylierten Abbauprodukten von Rhodamin B, deren Strukturformeln in der Abbildung 4 dargestellt sind, zugeordnet werden.

Dies gelang mittels einer softwareunterstützten Auswertung mit Hilfe des Formelgenerators, wobei den gefundenen Massen entsprechende Summenformeln zugeordnet wurden. Die vorgeschlagenen Summenformeln stimmten mit denen der Abbauprodukte überein. Die Bewertung der Zuordnung erfolgte mittels eines absoluten Scores, der sich aus drei unterschiedlichen Matches für Masse, Isotopenverhältnis und Isotopenabstand zusammensetzt (vgl. Abbildung 3).

Je näher der Score bei 100 liegt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um die richtige Summenformel handelt. Da im vorliegenden Fall die berechneten Summenformeln sehr hohe Scores besitzen, kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den unbekannt Substanzen um die desalkylierten Abbauprodukte des Rhodamin B handelt. Eine abschließende Verifizierung mittels eines MS/MS-Experimentes konnte aufgrund fehlender Referenzsubstanzen bisher nicht durchgeführt werden.

Auf Grundlage der exakten Massen war es jedoch immer noch nicht möglich, eine abschließende Strukturzuordnung für die beiden Isomeren des doppelt desalkylierten Rhodamin B-Abbauproduktes (Didesethyl-Rhodamin B; Zonen 4 und 5) zu treffen.

Da es sich bei einer der beiden Substanzen (Zone 4) um ein primäres Amin handelt, das im Gegensatz zur zweiten Substanz (sekundäres Amin, Zone 5) nach Diazotierung und Azokupplung mittels Bratton-Marshall-Reagenz reagiert, ^[6] wurde eine entsprechende Derivatisierung auf der TLC-Platte durchgeführt. Hierbei reagierten alle Substanzen, die mindestens eine primäre Amingruppe enthalten (vgl. Abb. 4; Zonen 1, 3 und 4). Die Substanz auf Zone 2 konnte bisher nicht zugeordnet werden.

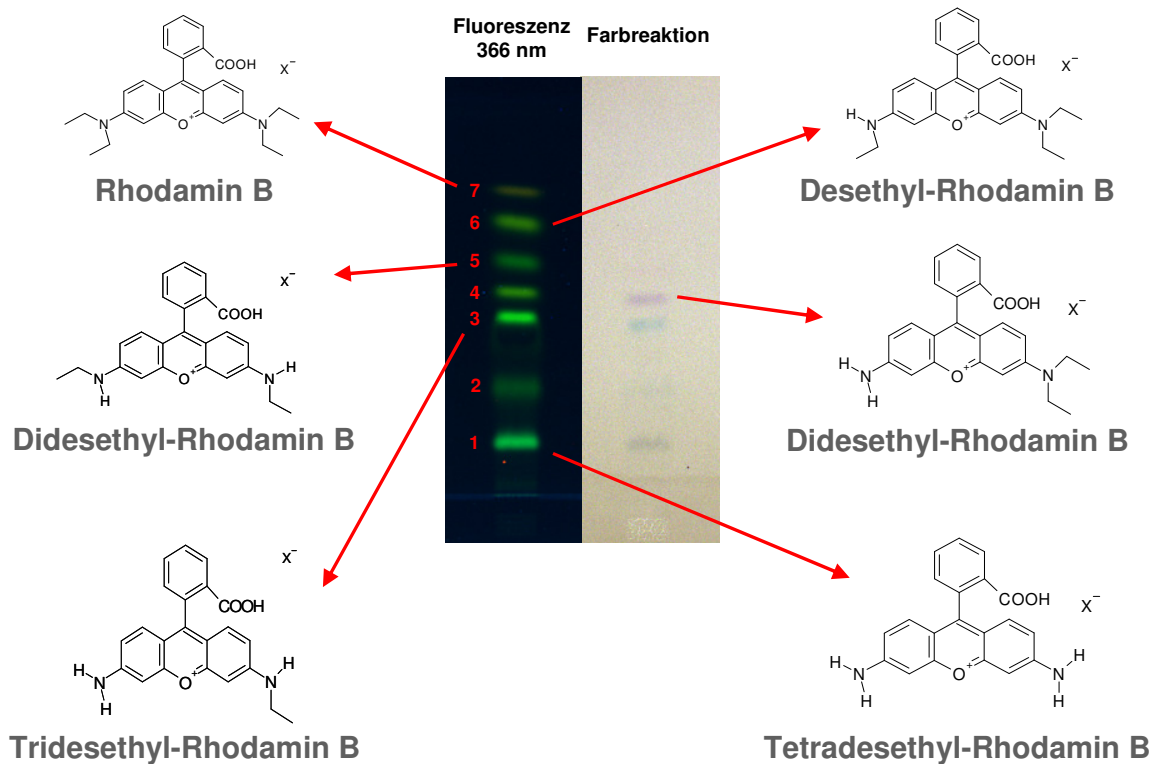


Abbildung 4: Zuordnung der Strukturformeln zu den einzelnen Dünnschichtzonen

Zusammenfassung

Die Kombination der Planarchromatographie mit der Massenspektrometrie ermöglichte eine schnelle Identifikation von bisher unbekanntem Substanzen in einer farblich auffälligen Grundwasserprobe.

Die Untersuchung der gefärbten Wasserprobe mittels HPTLC/AMD ergab sieben getrennte Zonen, von denen eine durch Vergleich mit Referenzmaterial dem Farbstofftracer Rhodamin B zugeordnet werden konnte. Bei der anschließenden Nano-Chip-LC/QTOF-Analyse der weiteren 6 Substanzen konnten erstmals 5 desalkylierte Abbauprodukte von Rhodamin B in einer Grundwasserprobe identifiziert werden. Die Zuordnung der zweifach desalkylierten Rhodamin B-Abbauprodukte gelang durch eine Farbreaktion mit Bratton-Marshall-Reagenz.

Literatur:

- [1] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environmental Health Perspectives* **1999**, 107, 907-944. [2] C. Zwiener, S.D. Richardson, *Trends* **2005**, 24 (7), 613-621. [3] H. Luftmann, M. Aranda, G.E. Morlock, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21 (23), 3772-3776. [4] W. Seitz, W. Schulz, W.H. Weber, *GIT Separation* **2007**, 1, 28. [5] W.H. Weber, W. Seitz, W. Schulz, H.-A. Wagener, *Vom Wasser*, **2007**, 105 (1), 7. [6] G. E. Morlock, *CAMAG Bibliography Service* **2006**, 96.