

TEXTE

77/2024

Abschlussbericht

# Non-Target Screening in Schwebstoff- und Biotaproben

von:

Georg Dierkes, Lise Boulard, Arne Wick  
Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz

Herausgeber:

Umweltbundesamt



TEXTE 77/2024

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für  
Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und  
Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3717 22 267 0  
FB001153

Abschlussbericht

## **Non-Target Screening in Schwebstoff- und Biotaproben**

von

Georg Dierkes, Lise Boulard, Arne Wick  
Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

## **Impressum**

### **Herausgeber**

Umweltbundesamt  
Wörlitzer Platz 1  
06844 Dessau-Roßlau  
Tel: +49 340-2103-0  
Fax: +49 340-2103-2285  
[buergerservice@uba.de](mailto:buergerservice@uba.de)  
Internet: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)

### **Durchführung der Studie:**

Bundesanstalt für Gewässerkunde  
Am Mainzer Tor 1  
56068 Koblenz

### **Abschlussdatum:**

Juni 2022

### **Redaktion:**

Fachgebiet II 2.4 Binnengewässer  
Jan Koschorreck

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, April 2024

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

### **Kurzbeschreibung: Non-Target Screening in Schwebstoff- und Biotaproben**

Ziel dieses Vorhabens war die Etablierung eines innovativen Monitoringansatzes für Fisch- und Schwebstoffproben auf Basis von generischen Analysenmethoden. Dazu wurden Extraktions- und Analysenmethoden, die eine große Bandbreite an Analyten erfassen, entwickelt und validiert. An ersten Schwebstoffprobensätzen wurden drei Datenauswertungs-Ansätze für eine retrospektive Betrachtung getestet: i) Datenbank gestützte Suche, ii) Suspect-Screening, iii) Unknown-Screening. Anhand der Ergebnisse und durch einen Abgleich mit vorhandenen Quantifizierungsdaten wurden die Chancen und Limitierungen der Screening-Ansätze kritisch beurteilt. Mit Hilfe der Screening-Ansätze konnten verschiedene Fragestellungen bzgl. Vorkommen und Verteilung sowie Priorisierung von Schadstoffen erfolgreich bearbeitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Art der Analysen viel Potential zur Verbesserung der Gewässerüberwachung und Beurteilung der Wirksamkeit von Minderungs- bzw. Verbesserungsmaßnahmen beinhalten. Allerdings zeigten sich Limitierungen bezüglich der Nachweisstärke, so dass das Screening für sehr niedrige Schadstoffkonzentrationen ( $<1 \text{ ng/g}$ ) nicht geeignet ist. Vor allem im Fall von Biotaproben zeigten sich auf Grund der komplexen Matrix starke Einschränkungen bezüglich der Anwendbarkeit im niedrigen Konzentrationsbereich. Hier sind Optimierung in Bezug auf die Probenvorbereitung und Datenaufnahme/-auswertung notwendig.

Die neu entwickelten Methoden sollen zukünftig zum Aufbau digitaler Probenarchive dienen und so die Identifizierung und Priorisierung neuartiger Schadstoffe in Biotaproben und Schwebstoffen ermöglichen.

### **Abstract: Non-target screening in suspended particular matter and biota**

Aim of this study was the establishment of an innovative monitoring approach based on generic analysis methods for fish and suspended particular matter. Therefore, extraction and analysis methods covering a broad range of analytes were developed and validated. Three approaches for data analysis were tested: i) data base assisted screening, ii) suspect screening and ii) unknown screening. Based on the results and comparison with existing quantification data chances and limitations of the screening approaches were critically evaluated. Using these screening approaches different scientific questions regarding occurrence and distribution of pollutants could be addressed. The high potential in improving monitoring and assessment of measurements was shown. However, limitation in sensitivity hamper detection of low concentrations ( $<1 \text{ ng/g}$ ). Especially in case of biota sensitivity is decreased by the complex matrix. Here optimizations in sample pretreatment and data analysis are necessary.

The newly developed methods should enable identification and prioritization of novel pollutants in biota samples and suspended particular matter in future.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis .....	9
Abkürzungsverzeichnis .....	10
Zusammenfassung.....	11
Summary .....	15
1 Einleitung.....	18
1.1 Hintergrund.....	18
1.2 Studienkonzept .....	18
1.3 Probenmaterial .....	19
2 Methodenentwicklung .....	20
2.1 Schwebstoffe.....	20
2.1.1 Extraktion polarer Verbindungen .....	20
2.1.2 Extraktion unpolarer Verbindungen .....	21
2.2 Biotaproben .....	22
2.3 Messmethoden .....	23
2.3.1 GC-QTOF-System.....	23
2.3.2 LC-QTOF-System .....	23
2.4 Datenverarbeitung.....	23
2.5 Validierung .....	24
2.5.1 Validierung Schwebstoffmethode .....	24
2.5.2 Validierung der Methode für Biotaproben .....	26
3 Entwicklung von Auswertealgorithmen .....	28
3.1 Suspect-Screening.....	28
3.1.1 Propiconazol .....	29
3.1.2 6-PPD-Chinon .....	29
3.1.3 Organophosphatflammschutzmittel.....	30
3.1.4 Fluorierte Verbindungen.....	31
3.2 Data Base Assisted Screening .....	32
3.2.1 Climbazol.....	32
3.2.2 Organophosphat-Flammschutzmittel.....	33
3.2.3 Trospium .....	36
3.3 Unknown-Screening.....	37
3.3.1 Substanzen mit steigenden Konzentrationstrends.....	37

3.3.2	Korrelation von Intensitätsverläufen .....	41
3.3.3	Standortbezogene Datenauswertung .....	43
4	Anwendungsbeispiele für Biotaproben (LC-HRMS) .....	45
4.1	Erfassung dotierter Substanzen durch automatische Peakerkennung .....	45
4.2	Screening in einer unbekannten Fischprobe (LC-HRMS) .....	47
4.3	Optimierungsansätze .....	48
4.3.1	Lösungsstrategie 1: Exklusion von natürlichen Stoffen .....	49
4.3.2	Lösungsstrategie 2: Ion independent Analyse .....	49
4.3.2.1	Evaluierung .....	50
4.3.2.2	Anwendung .....	52
4.3.2.3	Perspektive .....	52
5	Aufbau einer Metabolitendatenbank .....	53
5.1	Prinzip und Versuchsaufbau .....	53
5.2	Ergebnisse .....	53
5.2.1	Venlafaxin .....	53
5.2.2	Diclofenac .....	54
5.2.3	Carbamazepin .....	56
5.2.4	Diphenhydramin .....	57
5.2.5	Lidocain .....	57
5.2.6	Ethyltriphenylphosphonium .....	58
5.2.7	Butyltriphenylphosphonium .....	58
5.2.8	Didodecyldimethylammonium .....	59
5.2.9	Bumetizol .....	60
5.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	61
6	Schlussfolgerungen .....	62
7	Quellenverzeichnis .....	64
A	Anhang .....	66

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Extraktionsschema für Schwebstoffproben.....	21
Abbildung 2: Extraktionsschema für Biota-Proben .....	22
Abbildung 3: Vergleich Screening und einer Target-Methode für PCBs per GC-MS in Schwebstoffen .....	24
Abbildung 4: Vergleich NTS und Target-Analytik für Sitagliptin.....	25
Abbildung 5: Vergleich NTS und Target-Analytik für Aliskiren .....	26
Abbildung 6: Vergleich der Bestimmungsgrenzen ausgewählter Analyten in dotiertem Fischfilet für die Screening-Methode (LC-HRMS) und einer Referenzmethode (LC-MS/MS) .....	27
Abbildung 7: Ergebnis des Suspect-Screenings nach Propiconazol in Schwebstoffproben aus dem Rhein (Koblenz) und Vergleich der Peakintensitäten mit Quantifizierungsdaten .....	29
Abbildung 8: Intensität des 6PPD-Chinons in Schwebstoffproben aus Rhein, Saar und Elbe.....	30
Abbildung 9: Suspect-Screening TPP und TCPP in Schwebstoffproben aus dem Rhein (Koblenz) mittels GC-HRMS.....	31
Abbildung 10: Climbazol im Schwebstoff (Rhein bei Koblenz).....	33
Abbildung 11: Intensitäten von Organophosphaten in Schwebstoffen aus 2018 bestimmt mittels LC-HRMS .....	34
Abbildung 12: Intensitätsverlauf für Organophosphat-Flammschutzmittel über die Jahre 2006-2015 am Standort Barby (Elbe).....	35
Abbildung 13: Intensitätsverlauf für Organophosphat-Flammschutzmittel über die Jahre 2013 bis 2020 am Standort Wettin (Saale) .....	35
Abbildung 14: Intensitätsverlauf für Organophosphat-Flammschutzmittel über die Jahre 2013 bis 2020 am Standort Dessau (Mulde).....	36
Abbildung 15: Intensitätsverlauf für Trospium im Schwebstoff (Rhein bei Koblenz) über die Jahre 2005 bis 2018.....	37
Abbildung 16: Vorkommen des Massensignals 398.19 bei 8,9 min im Rhein .....	39
Abbildung 17: Zeitlicher Intensitätsverlauf des Massensignals m/z 372,18 RT=9,8 min für den Standort Barby (Elbe).....	44
Abbildung 18: Wiederfindungen durch automatische Peakerkennung in Dotierungsexperimenten a: 50 ng/g und b: 5 ng/g.....	46
Abbildung 19: Anzahl der Detektionen in dotierten Filet- und Leberproben für verschiedene Aufnahmemethoden (SWATH und DDA) und Dotierungslevel (5 ng/g und 50 ng/g).....	51
Abbildung 20: Anzahl false positive für verschiedene Aufnahmemethoden (SWATH und DDA) und drei verschiedene Testsets .....	51
Abbildung 21: Identifizierte Metaboliten für Venlafaxin .....	54
Abbildung 22: Identifizierte Metaboliten für Diclofenac .....	55
Abbildung 23: XIC von der Masse 472.05 entsprechend zum Diclofenac Glucuronid .....	56
Abbildung 24: Identifizierte Metaboliten für Carbamazepin .....	56

Abbildung 25: Identifizierte Metaboliten für Diphenhydramin .....	57
Abbildung 26: Identifizierte Metaboliten für Lidocain .....	58
Abbildung 27: Identifizierte Metaboliten für Butyltriphenylphosphonium .....	59
Abbildung 28: Identifizierte Metaboliten für Didodecyldimethylammonium .....	60
Abbildung 29: XIC von m/z 398,43 entsprechend zu den Hydroxylmetaboliten von Didodecyldimethylammonium .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenahmestellen und Jahre für Schwebstoffe aus der Umweltprobenbank.....	19
Tabelle 2: Zusammenfassung der Charakteristika der im Projekt erprobten Screening-Methoden.....	28
Tabelle 3: Ergebnis des Suspect-Screenings nach fluorhaltigen Verbindungen in Schwebstoffen .....	32
Tabelle 4: MS-Signale mit den 30 größten Intensitätszuwächsen in Schwebstoffen vom Standort Koblenz (Rhein) für die Jahre 2014-2018 im Vergleich zum Zeitraum 2005-2009 .....	38
Tabelle 5: Vorschläge für Summenformeln berechnet für [M+H+] 398,1954 .....	39
Tabelle 6: MS1-Spektrum der unbekannten Substanz.....	40
Tabelle 7: MS <sup>2</sup> -Spektrum zum Massensignal m/z 398,19 RT=8,9 min .....	40
Tabelle 8: Massensignale mit hoher Korrelation zu DDAC-C10 .....	41
Tabelle 9: Massensignale mit größtem Zuwachs zwischen Prossen/Zehren und Cumlosen .....	43
Tabelle 10: Mögliche Summenformeln für Fragmente im MS <sup>2</sup> -Spektrum von m/z 372,18 .....	44
Tabelle 11: Kriterien für die Substanzidentifizierung für beide Aufnahmemethoden .....	50
Tabelle 12: Für die Validierung der GC-HRMS-Methode ausgewählte Stoffe .....	66

## Abkürzungsverzeichnis

<b>BfG</b>	Bundesanstalt für Gewässerkunde
<b>DBAS</b>	Data Base Assisted Screening
<b>DDA</b>	Data Dependent Acquisition
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>GPC</b>	Gelpermeationschromatographie
<b>HRMS</b>	Hochauflösende Massenspektrometrie
<b>MS<sup>2</sup></b>	Tandem Massenspektrum
<b>NTS</b>	Non-Target Screening
<b>PAK</b>	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PCB</b>	Polychlorierte Biphenyle
<b>RAM</b>	Restricted Access Material
<b>RP-LC</b>	Umkehrphasen Flüssigchromatographie
<b>TS</b>	Trockensubstanz

## Zusammenfassung

Das Schadstoffmonitoring ist ein wichtiges Instrument für die Dokumentation und Bewertung der Umweltqualität. Schwebstoffe und Biotaproben wie Muscheln und Fische haben sich als gute Matrices für die Erfassung von Schadstoffen in limnischen Systemen etabliert. Die bisher mit hochsensitiven analytischen Methoden untersuchten „Targetstoffe“ (z.B. PCBs und PAKs) stellen nur einen kleinen Teil der Stoffvielfalt in biologischen Geweben und Schwebstoffpartikeln dar. Screening-Methoden mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie (in Kombination mit chromatographischer Trennung) sind vielversprechende Ansätze, um die Lücke zwischen gemessenen Stoffen und der Gesamtbelastung zumindest teilweise zu schließen. Im Gegensatz zur klassischen Target-Analytik müssen die Zielsubstanzen vor der Messung nicht bekannt sein, sondern es werden beim Screening alle extrahierbaren und detektierbaren Signale der in einer Probe enthalten Substanzen erfasst und aufgezeichnet. Hierdurch können neue Umweltkontaminanten identifiziert und anschließend sowohl priorisiert als auch räumliche und zeitliche Belastungen der Umweltproben mit diesen Stoffen charakterisiert werden. Dies ist nicht nur in aktuellen Proben, sondern auch retrospektiv mit Archivproben der Umweltprobenbank aus den letzten Jahrzehnten möglich. Somit können die Messdaten als eine Art zusätzliches digitales Probenarchiv angesehen werden. Ziel dieses Projekts war die Erarbeitung von Analysen- und Auswerteprotokollen für das Screening in Schwebstoffen und Biotaproben. Anhand von Probenserien aus dem Archiv der Umweltprobenbank wurden unterschiedliche Screeningansätze für verschiedene Fragestellungen getestet.

Zunächst wurden Extraktionsmethoden für Schwebstoffe und Biotaproben entwickelt. Um einen möglichst breiten Polaritätsbereich abdecken zu können, wurde für die Detektion der unpolaren Stoffe die Gaschromatographie (GC) und für die eher polaren Stoffe die Flüssigchromatographie (LC) eingesetzt. Die Detektion erfolgte in beiden Fällen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS). Eine Validierung der Methoden erfolgte durch den Vergleich mit Target-Daten für ausgewählte Stoffe. Es ergaben sich sehr gute Übereinstimmungen bezüglich der Trendverläufe. Eine weitere Plausibilisierung der Daten erfolgte durch einen Abgleich der ermittelten Trends mit Verbrauchsmengen von z.B. Arzneimittelwirkstoffen. Die Screeningdaten bildeten die Verbrauchsmengen sehr gut ab. Auch waren Änderungen im Konsumverhalten ausgelöst durch z.B. gesetzliche Beschränkungen in den ermittelten Zeittrends ablesbar.

Die neu entwickelten Methoden wurden auf einen großen Probensatz von Schwebstoffen aus der Umweltprobenbank des Bundes angewendet. Der Probensatz deckte die Flussgebiete Rhein, Saar, Elbe und Donau über die Jahre 2005 bis 2018 ab. Die generierten Analysendaten wurden mittels drei verschiedener Screening-Ansätze ausgewertet. Die Daten wurden über eine bekannte Summenformel nach einem bestimmten Stoff retrospektivisch durchsucht (Suspect-Screening), systematisch nach Substanzen aus einer Liste/Datenbank gefiltert (Data Base Assisted Screening) und nach zeitlichen oder räumlichen Trends von bislang nicht identifizierten Massen gesucht (Unknown-Screening). Die Methoden unterscheiden sich stark in ihrem Automatisierungsgrad, Identifizierungslevel und in ihrer Sensitivität. Durch die manuelle Auswertung können beim Suspect-Screening auch kleine Peaks erfasst werden. Allerdings erfordert dies, wie auch eine Identifizierung über Stabilisotopenpeaks, das MS-MS-Spektrum und die Plausibilisierung über die Retentionszeit, Erfahrung und Expertenwissen. Beim Data Base Assisted Screening laufen dagegen die Peakfindung und -identifizierung vollautomatisiert ab. Durch die in der Datenbank hinterlegten Identifizierungsmerkmale (exakte Masse des Quasi-Molekülions und dominanten Addukten, Retentionszeit, MS<sup>2</sup>-Spektrum) können die Substanzen eindeutig identifiziert werden. Allerdings ist die Sensitivität bedingt durch den Auswertealgorithmus etwas erniedrigt. Das Unknown-Screening basiert dagegen auf einer automatisierten Isolierung von Massenspuren, in denen ggfs. vorhandene Peaks detektiert und

diese mit formgleichen und zur selben Zeit eluierenden zu Gruppen zusammengefasst werden. Eine Identifizierung der zu den Massen gehörigen Substanzen ist in diesem Fall zunächst zweitrangig, da das primäre Ziel die Betrachtung von statistischen Unterschieden in Probenserien darstellt.

Das Suspect-Screening ermöglicht ein schnelles Reagieren auf neu entdeckte Schadstoffe und liefert ohne zusätzlichen Messaufwand und langwierige Beschaffung von Referenzstandards eine Übersicht über Zeit- und Flächentrends dieser Substanzen in kurzer Zeit. Ein gutes Beispiel ist das N-(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediaminchinon (6PPD-Chinon), das Ende 2020 als für Forellen stark toxische Substanz aus Reifen beschrieben wurde. Das 6-PPD-Chinon konnte in Schwebstoffproben aus Rhein und Saar in allen untersuchten Jahren nachgewiesen werden.

Neben einzelnen ausgewählten Verbindungen kann ein Suspect-Screening auch für die Überblicksanalyse einer ganzen Stoffgruppe angewendet werden. Als Beispiel wurde eine Stoffliste mit 130 fluorhaltigen Arzneimittelwirkstoffen, Pestiziden und Bioziden erstellt. Von den 130 Substanzen wurden 7 Substanzen gefunden, wovon 5 über die BfG-Datenbank identifiziert wurden. Zusätzlich wurden Melperon und Flusilazol über die online Datenbank Massbank identifiziert. Gefunden wurden das Fungizid Epoxiconazol und Arzneimittelwirkstoffe, von denen Citalopram, Flecainid, Fluoxetin und Sitagliptin bekannte Kontaminanten in Schwebstoff aus dem Rhein sind. Die vier Substanzen sind im Bereich von 5-35 ng/g im Schwebstoff vertreten, während für Verbindungen wie z.B. fluorierte Pflanzenschutzmittel in den Bundeswasserstrassen, wo die Schwebstoffe der Umweltprobenbank gesammelt werden, deutlich geringere Schwebstoffkonzentrationen zu erwarten sind. Dies zeigt, dass mit der Screening-Methode die mengenmäßig am bedeutendsten Verbindungen erfasst werden, sehr geringe Kontaminationen (in der Regel <1 ng/g) aber derzeit nicht erfasst werden können.

Für das Data Base Assisted Screening (DBAS) unterhält die BfG eine ständig wachsende Spektrendatenbank mit ca. 1088 Einzelsubstanzen. In Schwebstoffen von den 13 Standorten wurden insgesamt 318 verschiedene Verbindungen gefunden, wobei die Gesamtanzahl an Detektionen 18582 betrug. Die Daten wurden in die im Projekt „Non-Target Screening für die Umweltüberwachung der Zukunft“ (FKZ: 3720 22 201 0) entwickelte Datenbank eingetragen und können dort abgerufen werden ([www.ntspotal.bafg.de](http://www.ntspotal.bafg.de)).

Ein Anwendungsfall des Data Base Assisted Screenings ist zum Beispiel die Suche nach standortspezifischen Auffälligkeiten im Schadstoffmuster. Betrachtet man beispielsweise die Schwebstoffbelastung an verschiedenen Standorten mit Organophosphat-Flammschutzmitteln, so fällt eine stark erhöhte Belastung mit Triskresylphosphat (Isomerengemisch) in der Elbe am Standort Cumlosen auf. Dieser Befund ließ sich durch die retrospektive Betrachtung von Zeitreihen an benachbarten Elbestandorten bzw. Zuflüssen verifizieren.

Beim Unknown-Screening erfolgte die Datenauswertung vollautomatisiert durch ein Auswerteskript. Im ersten Schritt wurden die Chromatogramme in ihre einzelnen Massenspuren (0,02 amu Schritt) zerlegt und diese im zweiten Schritt nach Peaks durchsucht. Die Peaks werden dann mit formgleichen zur selben Retentionszeit detektierten Peaks zu Gruppen zusammengefasst. Am Ende ergeben sich so für die Schwebstoffproben lange Listen mit mehreren tausend Komponenten. Die weitere Auswertung dieser Listen hängt von der zu beantwortenden Fragestellung ab. So wurden in den Daten nach Substanzen, die im Zeitraum 2014-2018 einen starken Konzentrationsanstieg im Rhein erfahren haben, gesucht. Von den 30 Komponenten mit den größten Intensitätszunahmen konnten zwei der Massensignale über die Datenbank identifiziert werden. Es handelt sich um den Arzneimittelwirkstoff Sitagliptin und

das Kation Dimethyldioktylammnonium. Diese Liste kann als Grundlage für eine Priorisierung zur Identifizierung von unbekannten Signalen dienen.

Eine weitere Möglichkeit der Datenauswertung ist die Suche nach Massensignalen mit ähnlichen zeitlichen oder räumlichen Intensitätsverläufen. Hierzu können die Daten einer bekannten Substanz mit sämtlichen in einer Probenserie gefundenen Massensignalen abgeglichen werden und so z. B. unbekannte Transformationsprodukte oder anderweitig mit der bekannten Substanz assoziierte Substanzen identifiziert werden. Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise wurde der zeitliche Verlauf der Intensität des Peaks von Didecyldimethylammonium in Rheinschwebstoffproben (Weil) mit dem zeitlichen Verlauf (2005-2018) sämtlicher gefundener Massensignale abgeglichen. Neben anderen quartären Ammoniumverbindungen wie Diocetyltrimethylammonium oder Cetylpyridinium wurden mehrere potentielle Transformationsprodukte vom Didecyldimethylammonium detektiert. Diese Substanzen wurden bisher in Umweltstudien nicht berücksichtigt und es sind auch keine Standards kommerziell verfügbar. Durch das Screening konnte nun gezeigt werden, dass eine nähere Betrachtung der Belastung von Schwebstoffen mit diesen Transformationsprodukten in Zukunft lohnenswert sein könnte.

Biotaproben stellen eine äußerst komplex zusammengesetzte Matrix da, die hohe Ansprüche an die Analysenmethoden stellt. Das Herausfiltern von Messsignalen, die von natürlichen Bestandteilen wie Proteinen oder Lipiden stammen, ist bei der Betrachtung von Biotaproben besonders wichtig. Eine Möglichkeit der Elimination von natürlichen Substanzen aus den ermittelten Substanzlisten ist die Analyse von Referenzproben aus einem unbelasteten Gebiet. Als Beispiel wurden Brassen aus dem Stechlinsee als unbelastete Referenz für die Analyse von Brassen aus dem vergleichsweise sehr stark mit Abwasser belasteten Teltow Kanal verwendet. Zunächst wurde die Leistungsfähigkeit der Screeningmethoden durch die Analyse von dotierten Proben ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Methode bei dotierten Konzentrationen von 50 ng/g gute Ergebnisse lieferte. Bei Konzentrationen von 5 ng/g, die in Umweltproben eher zu finden sind, stieß die Methode an ihre Grenzen. Viele Substanzen wurden nicht mehr erfasst und nur sehr wenige MS<sup>2</sup>-Spektren aufgenommen. Dass die hohen Nachweisgrenzen und geringen Aufnahmeraten von MS<sup>2</sup>-Spektren eine starke Einschränkung bei der Anwendbarkeit der Methode auf Umweltproben darstellten, zeigte sich auch in den Ergebnissen des NORMAN CT NTS in biota Inter-Laborvergleichs. In den dotierten Proben konnten Schadstoffe nachgewiesen werden, während sich der Nachweis in den Umweltproben als schwierig herausstellte. Zwar konnte durch die Umstellung auf einen Data Independent Analyse Messmodus die Detektionsrate verbessert werden, aber es besteht dennoch viel Optimierungsbedarf.

Nach der Aufnahme in den Organismus unterliegen die meisten Xenobiotika einem metabolischen Um- bzw. Abbau. Daher ist für das Schadstoff-Screening in Biota die Verwendung einer Metabolitendatenbank empfehlenswert. Allerdings stehen für die wenigsten Schadstoffe umfangreiche Metabolisierungsdaten und Referenzstandards zur Verfügung. Daher wurde zum Aufbau einer Metabolitendatenbank ein Protokoll für die Durchführung von in-vitro Metabolismusversuchen etabliert. Bei diesem Ansatz werden ausgewählte Schadstoffe mit einem Fischleberextrakt inkubiert und die Hauptmetaboliten in eine Datenbank aufgenommen. Venlafaxin, Diclofenac, Carbamazepin, Diphenhydramin, Lidocain, Ethyltriphenylphosphin, Butyltriphenylphosphin, Didodecyldimethylammonium und Bumetrizol wurden mittels S9-Leberfraktion von Forellen umgesetzt und die Metaboliten mittels LC-HRMS analysiert. Die Ergebnisse dienen für den Aufbau einer Metabolitendatenbank, die zukünftig erweitert werden soll.

Screening-Ansätze stellen ein nützliches Werkzeug in der Gewässerüberwachung dar. Vor allem am Beispiel des Schwebstoffs konnte gezeigt werden, dass durch ein flächendeckendes oder

retrospektives Screening Trends erkannt, Priorisierungen vorgenommen oder sogar bislang nicht als Umweltbelastungen bekannte Substanzen identifiziert werden können. Die dargestellten positiven Beispiele über die Einsatzmöglichkeiten der Screening-Ansätze dürfen allerdings nicht über die Grenzen dieser Analysenmethoden hinwegtäuschen. So können Diskriminierungen von bestimmten Substanzklassen oder Polaritäten während der Probenextraktion und -vorbereitung, die Empfindlichkeit der Methoden oder die komplexe Matrix den Nachweis von Substanzen stark einschränken. Trotz dieser Limitierungen, für die aktuell an Lösungs- bzw. Optimierungsansätzen gearbeitet wird, stellen die vorgestellten Screening-Ansätze bereits jetzt ein wertvolles Instrument für die Gewässerüberwachung dar. Vor allem durch die routinemäßige Analyse von Schwebstoffproben kann in Kooperation mit dem Projekt „Non-Target Screening für die Umweltüberwachung der Zukunft“ (FKZ: 3720 22 201 0) eine Probenbank aufgebaut werden, die durch retrospektive Trendanalysen und die gezielte Suche nach aktuellen Problemstoffen bei der Priorisierung im Zuge der Stoffauswahl für Messkampagnen herangezogen werden kann. So könnte bereits im Vorfeld abgeschätzt werden, welche Substanzen und Probenahmeflächen für eine aufwendige Target-Analytik lohnenswert sind und so wertvolles Probenmaterial und Analysenkapazitäten zielgerichtet und effektiv eingesetzt werden.

## Summary

Pollutant monitoring is an important tool for documentation and evaluation of the environmental quality status. Suspended particular matter (SPM) and biota samples, such as mussel and fish, are useful matrices for analysis of contaminants in limnic systems. Commonly analysed “target compounds” (e.g. PCBs or PAHs) are only a small part of the whole compound spectrum in biota and SPM. Screening methods based on high-resolution mass spectrometry in combination with chromatographic separation are promising approaches to close the gap between analysed compounds and total burden. In contrast to classical target-analysis analytes have not to be chosen prior to analysis, but all extractable compounds and detectable signals in the sample are recorded. Hence, new and emerging contaminants can be identified, prioritized and spatio-temporal trends can be determined. Such a “non-targeted” screening approach cannot only be used for continuous monitoring programmes, but also allows to analyse archived samples retrospectively, e.g. from the German Specimen Bank that have been sampled over the last decades. Thus, providing a digital sampling archive for the screening data.

The primary aim of this project was the development of analytical and data evaluation protocols for screening in SPM and biota samples. Different screening approaches were tested using data from sample series of the German Environmental Specimen Bank.

Initially, extraction methods for SPM and biota were developed. To cover a broad polarity range, both gas chromatography for apolar and liquid chromatography for polar analytes coupled to high resolution mass spectrometry (HRMS) were used.

Screening results are in good agreement with target data and compare well with trend analysis. For instance, a plausibility check, i.e. comparison of data with consumption trends of pharmaceuticals, was undertaken and screening data was in agreement with consumption behaviour, i.e. changes in consumption due to bans and restrictions could be assessed.

The newly developed methods were utilized to a large sample set of SPM from the German Environmental Specimen Bank, comprising of the rivers Rhine, Saar, Elbe and Donau for the period 2005 to 2018. Analytical data was evaluated using three different screening approaches, i) suspect-screening: search for a selected number of known molecular formula and masses, ii) data-base assisted screening: systematic search for a broad range of different compounds, iii) unknown-screening: search for statistically distinctive masses in spatial or temporal sample series. The three approaches strongly differ in degree of automatization, identification level and sensitivity. Due to manual data evaluation, even small peaks can be detected in suspect screening. However, a high degree of expertise is required to manually evaluate data and identify compounds by isotope patterns,  $MS^2$  spectra and retention time. In contrast, peak detection and identification is fully automated in data-base assisted screening. Compound identification is based on explicit information such as exact mass of quasi-molecular ions and dominant adducts, retention time and  $MS^2$  spectrum. Certainly, sensitivity is slightly lower, due to the (automated) peak picking algorithm. Unknown screening is based on automatic peak picking in isolated ion chromatograms and grouping of peaks with the same retention time and shape. Compound identification is secondary as the primary aim is the detection of statistical differences in sample series.

Overall, suspect screening enables a quick reaction on newly discovered pollutants and enables a quick overview about partial and time trends without additional time-consuming analysis efforts and purchase of reference standards. A good example is N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamin chinone (6PPD-chinone), a highly toxic substance in tire rubber,

which was discovered in 2020. 6PPD-chinone was recorded in SPM from Rhine and Saar over the whole sampling period. Other than for single substances only, suspect screening can be undertaken for whole compound classes, i.e. a list of 130 fluorinated pharmaceuticals, pesticides and biocides was established. From this list only seven compounds were recoded, and included the fungicide epoxiconazole and pharmaceuticals, of which citalopram, flecanide, fluoxetine and sitagliptin are well known contaminants in SPM. The latter (pharmaceuticals) were found in concentration ranges of 5–35 ng/g in SPM, whereas fluorinated pesticides are expected to show distinctively lower concentrations at analysed locations (e.g. Rhine, Saar and Elbe). Hence, it is evident that the screening approach (i) detects major compounds with high concentrations, whereas very low concentrated compounds (<1 ng/g) were lower than the (analytical) detection limit. For data-base assisted screening (DBAS, ii) the “Federal Institute of Hydrology” (BfG) maintains a growing spectral database with ca. 1088 single compounds. At 13 analysed locations, over 318 different compounds were recorded in SPM, with a total number of detections of 18582. These results were implemented into the database developed in the project “Non-Target Screening für die Umweltüberwachung der Zukunft” (FKZ: 3720 22 201 0), which is accessible via [www.ntspotal.bafg.de](http://www.ntspotal.bafg.de). These data can be used to look for statistical abnormalities in the pollution pattern. For instance, organophosphate flame retardants were recorded in SPM at different sampling locations, e.g. elevated concentrations of tricresyl phosphate (TCP; mixture of isomers) were found at Cumlosen (sampling location) in the river Elbe. This observation could be confirmed by retrospective analysis of time trends from nearby sampling sites.

In the case of unknown screening (iii) data evaluation is done automatically by pre-programmed/ pre-written scripts. Ion chromatograms were isolated with a resolution of 0.02 amu and searched for peaks. Following, peaks with the same retention time and shape are grouped and aligned with results from other samples. The final result are lists of several thousand compounds. Further data evaluation depends on the research question. Thus, data was analysed for compounds showing increasing concentrations in the years 2014-2018 and the compound list could be used for prioritization for identification of unknown signals. Out of 30 compounds, with highest increases, two could be identified by a database search, i.e the pharmaceutical sitagliptin and the quaternary ammonium compound dimethyldioctyl ammonium.

Another approach is the search for mass signals with similar temporal or spatial intensity trends. Here data of known compounds are compared with the whole dataset of a sample series. By this way unknown transformation products or otherwise associated substances can be found. This could be demonstrated for the time trend of didecyldimethyl ammonium (DDAC-C10) in SPM from the river Rhine (Weil) which was compared to all time trends (2005-2018) for this sampling site. Beside other quaternary ammonium compounds such as dioctyldimethylammonium or cetylpyridinium several potential transformation products of DDAC-C10 were found. There are no environmental studies and no commercial standards available for these compounds, but using the screening approach, the (environmental) relevance of these transformation products was shown.

Biota samples are very complex matrices with challenging analysis and data evaluation methods, i.e. filtering of detector signals from natural compounds such as proteins and lipids. One option for elimination of natural substances from the compound list is the analysis of references from pristine areas. As an example, bream from Lake Stechlin were used as unpolluted reference for the comparative analysis of bream from Teltow Canal, which are highly impacted by waste water. Initially, method performance was tested by analysis of spiked samples and at a concentration level of 50 ng/g good results could be achieved. However, at environmental

relevant concentration at about 5 ng/g limits of the method were reached. Many of the compounds were not detected and only a few MS<sup>2</sup>-spectra were recorded. The limited applicability of the method for environmental samples could be shown by the NORMAN CT NTS in biota interlaboratory test. Here detection of contaminants was possible in spiked samples, too, while detection in real environmental samples was challenging. By using data-independent analysis detection rates could be improved, but there is still a high need for (method) optimization.

After uptake into organisms most xenobiotica are biochemically transformed and therefore, contaminant screening should include metabolites. However, there is only few data about metabolism in fish and reference standards are scarce. To build up a metabolite database a protocol for in-vitro metabolism experiments was established. The approach is based upon incubation of the compounds with fish liver extract followed by a compound screening. Venlafaxin, diclofenac, carbamazepine, diphenhydramine, lidocaine, ethyltriphenylphosphine, butyltriphenylphosphine, didodecyldimethylammonium and bumetizole were treated with S9 liver fraction of trout and metabolites analysed by LC-HRMS. Detected compounds were integrated into a metabolite database which will be continued in the future.

Screening approaches are useful and beneficial tools for water monitoring. Especially for SPM the potential of retrospective or comprehensive screening in finding of trends, prioritization or identification of so far unrecognized compounds was shown. Beside the presented positive examples for application of screening methods limitations should be mentioned. For instance, discrimination of certain substance classes or polarities during sample extraction and clean-up, method sensitivity or massive matrix effects could hamper compound detection. Current research focuses on solutions and method optimization to overcome these limitations. However, routine analysis of SPM could be used in cooperation with the project “Non-Target Screening für die Umweltüberwachung der Zukunft” (FKZ: 3720 22 201 0) for development of a digital environmental specimen bank. By retrospective trend analysis and specific search for emerging contaminants it could be used for prioritization in the course of compound selection for monitoring campaigns. Using a non-targeted approach, the relevance of different compound could be estimated prior to elaborated target analysis and so valuable sample material and analysis capacities effectively used.

## 1 Einleitung

Das Projekt wurde von November 2017 bis Juni 2021 durchgeführt.

### 1.1 Hintergrund

Das Schadstoffmonitoring ist ein wichtiges Instrument für die Dokumentation und Bewertung der Umweltqualität. Schwebstoffe und Biotaproben wie Muscheln und Fische haben sich als gute Matrizes für die Erfassung von Schadstoffen in limnischen Systemen etabliert. Sie werden routinemäßig auf klassische organische (z.B. PCBs und PAKs) und anorganische Schadstoffe (z.B. Schwermetalle wie Quecksilber und Blei) sowie anlassbezogen auf mögliche neue Problemstoffe untersucht. Diese bisher mit hochsensitiven analytischen Methoden untersuchten „Targetstoffe“ stellen nur einen kleinen Teil der Stoffvielfalt dar, die sich tatsächlich in biologischen Geweben und an Schwebstoffpartikeln anreichern. Screening-Methoden mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie (in Kombination mit chromatographischer Trennung) sind vielversprechende Ansätze, um die Lücke zwischen gemessenen Stoffen und der Gesamtbelastung zumindest teilweise zu schließen. Durch das „Screening“ auf einen großen Massenbereich können bislang unbekannte Substanzen aufgrund ihrer Masse und ihrer Retentionszeit erkannt und deren Auftreten in biologischen Umweltproben und Schwebstoffen verfolgt werden. In Gegensatz zur klassischen Target-Analytik müssen die Zielsubstanzen vor der Messung nicht bekannt sein, sondern es werden beim Screening alle extrahierbaren und detektierbaren Signale der in einer Probe enthalten Substanzen erfasst und aufgezeichnet. Die eigentliche Datenauswertung erfolgt durch Software-basierte Tools. Hierdurch können neue Umweltkontaminanten identifiziert und anschließend sowohl priorisiert als auch räumliche und zeitliche Belastungen der Umweltproben mit diesen Stoffen charakterisiert werden. Dies ist nicht nur in aktuellen Proben, sondern auch retrospektiv mit Archivproben der Umweltprobenbank aus den letzten Jahrzehnten möglich. Somit können die Messdaten als eine Art zusätzliches digitales Probenarchiv angesehen werden.

Die Bundesanstalt für Gewässerkunde hat in den letzten Jahren eine Screeningmethode für Wasserproben entwickelt und weitestgehend etabliert [1-3]. Die Methode basiert auf einer LC-QTOF Analyse nach Direktinjektion der wässrigen Proben und einer Datenauswertung mit Hilfe eines Softwaretools in der Programmiersprache R. Die Übertragung dieser Methode auf Schwebstoffe und Biotaproben erfordert Anpassungen im Bereich der Probenextraktion und -vorbereitung sowie bei der Datenauswertung. Ziel dieses Projekts war die Erarbeitung von Analysen- und Auswerteprotokollen für das Screening in Schwebstoffen und Biotaproben. Anhand von Probenserien aus dem Archiv der Umweltprobenbank wurden unterschiedliche Screeningansätze für verschiedene Fragestellungen getestet.

### 1.2 Studienkonzept

Am Anfang des Projekts stand die Entwicklung von Extraktionsmethoden für Schwebstoffe und Biota. Um ein möglichst breites Stoffspektrum erfassen zu können, wurden möglichst generische Methoden entwickelt. Die Leistungsfähigkeit der Methoden wurde durch einen Vergleich mit Target-Daten überprüft. Im Anschluss an die Methodenentwicklung wurden Zeitreihen von Schwebstoffen und Brassen aus der Umweltprobenbank analysiert und drei verschiedene Screening-Ansätze an dem resultierende Datensatz durch den Einsatz unterschiedlicher Datenauswertungsprozeduren getestet.

### 1.3 Probenmaterial

Als Probenmaterial dienten Schwebstoffe und Brassenproben aus der Umweltprobenbank des Bundes. Tabelle 1 fasst die für die Schwebstoffanalytik ausgewählten Standorte und Jahre zusammen. Die ausgewählten Standorte decken die großen deutschen Flusssysteme Rhein, Elbe und Donau ab. Mit der Saar wurde zusätzlich ein stark durch Kläranlagen beeinflusstes Gewässer untersucht. Im Fall der Brassenproben wurde Filet und Leber untersucht. Als Probenahmestandorte wurde der Teltow-Kanal mit einer zu erwartenden hohen Belastung und der Stechlinsee mit einer zu erwartenden geringen Belastung ausgewählt.

**Tabelle 1: Probenahmestellen und Jahre für Schwebstoffe aus der Umweltprobenbank**

Standort	Jahre
Weil am Rhein (Rhein)	2005-2018
Iffezheim (Rhein)	2005-2015*
Koblenz (Rhein)	2005-2018
Bimmen (Rhein)	2005-2018
Rehlingen (Saar)	2005-2018
Güdingen (Saar)	2016-2018
Blankenese (Elbe)	2006-2018
Barby (Elbe)	2006-2015*
Cumlosen (Elbe)	2018
Prossen (Elbe)	2018
Zehren (Elbe)	2018
Ulm (Donau)	2018
Jochenstein (Donau)	2018

\*Probenahme 2015 eingestellt

## 2 Methodenentwicklung

Das Schadstoff-Screening in komplexen Umweltmatrices wie Schwebstoff- und Biotaproben stellt die Probenvorbereitung vor eine große Herausforderung. Auf der einen Seite müssen durch das Clean-Up störende Matrixbestandteile abgetrennt werden, da diese durch Ionensuppression und Kontamination der empfindlichen Analysengeräte die Analytik stören. Auf der anderen Seite sollen durch die Screening-Methoden möglichst alle in der Probe enthaltenden Xenobiotika erfasst werden. Durch das Clean-Up darf es folglich nicht zu einer Diskriminierung von Substanzen auf Grund ihrer Größe, Polarität oder anderer physikochemischen Eigenschaften kommen. Diese beiden gegensätzlichen Anforderungen werden niemals gleichermaßen erfüllbar sein und somit stellt das gewählte Clean-Up-Verfahren stets einen Kompromiss aus möglichst sauberen Extrakten und möglichst breitem Analytpektrum dar. In diesem Projekt wurden mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) und dem Einsatz von Restricted Access Material (RAM) Probenaufreinigungsverfahren eingesetzt, deren Trennprinzip auf der Größe der Analyten beruht. Die großen Matrixbestandteile wie Proteine und Triglyceride werden abgetrennt, während die kleineren Xenobiotika im Extrakt verbleiben. Hochmolekulare Xenobiotika werden folglich nicht miterfasst, da sie beim Clean-Up verloren gehen. Diese Limitierung des erfassbaren Analytpektrums wird zu Gunsten sauberer Extrakte in Kauf genommen. Um einen möglichst großen Polaritätsbereich abdecken zu können, wurde auf den Einsatz von Clean-Up-Verfahren deren Selektivitäten auf Unterschieden in der Polarität liegen, wie zum Beispiel der Festphasenextraktion, verzichtet. Für die Analyse der Extrakte werden sowohl die Flüssigchromatographie (LC), für die eher polaren Substanzen, und die Gaschromatographie (GC), für die eher unpolaren Substanzen, eingesetzt. Im Zuge der Methodenvalidierung wurde versucht das über die Methoden abgedeckte Analytpektrum bezüglich Polarität und Molekülgröße zu ermitteln.

### 2.1 Schwebstoffe

Für die Extraktion von Schadstoffen aus Schwebstoffen stellt die beschleunigte Lösungsmittlextraktion bei erhöhtem Druck und Temperatur (PLE) die Methode der Wahl dar. Die Polarität des eingesetzten Lösungsmittels bestimmt maßgeblich, welche Verbindungen extrahiert werden. Für polare Verbindungen benötigt man ein polares Lösungsmittel und für unpolare Verbindungen ein Unpolares. Da über das NT-Screening der gesamte Polaritätsbereich abgedeckt werden sollte, war der Einsatz von zwei verschiedenen Lösungsmitteln notwendig. An die Extraktion schlossen sich für den jeweiligen Polaritätsbereich optimierte Clean-Up-Verfahren an. Da sich die Probenvorbereitungsschritte und Analytik von polaren und unpolaren Verbindungen fundamental voneinander unterscheiden, wurden zwei komplett voneinander getrennte Arbeitsabläufe durchgeführt (s. Abbildung 1).

#### 2.1.1 Extraktion polarer Verbindungen

Die Extraktion der polaren Verbindungen erfolgte nach Boulard et al. 2020[4]. 0,5 g gefriergetrockneter Schwebstoff wurden in einer ASE 350 (Thermo Scientific) bei 100°C und 100 bar extrahiert. Der erste Extraktionsschritt erfolgte mit Methanol/Milli-Q (1/1, v/v; 15 min static time, 20 s purge time, 0% flush volume). Auf diesen folgten zwei Zyklen mit Methanol/2 % Ameisensäure (1/1, v/v; 15 min static time, 120 s purge time, 150% flush volume). Als Clean-Up

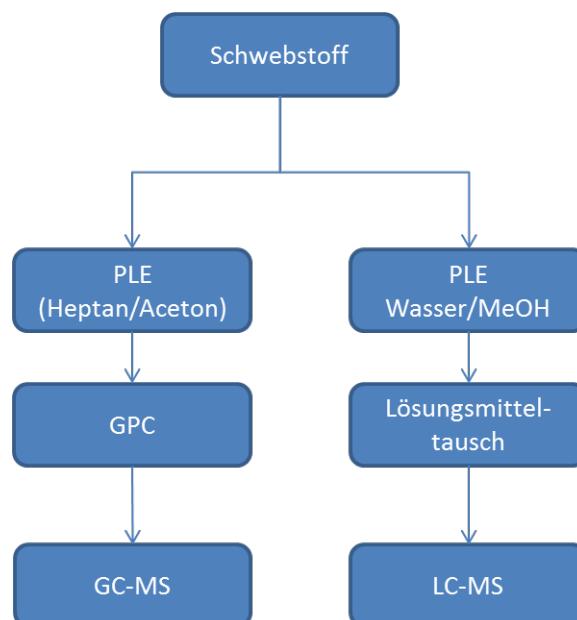
diente ein Lösemitteltausch. Die Extrakte wurden auf ein definiertes Volumen von 30 ml gebracht und davon ein Aliquot von 10 ml entnommen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels in einem TurboVap LV (Biotage, Uppsala, Sweden) wurde der Rückstand in 100 µl Milli-Q Wasser aufgenommen. Danach erfolgte eine Fällung unerwünschter Verunreinigungen durch die Zugabe von 900 µl Acetonitril. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl abgenommen und mit 900 µl Milli-Q verdünnt. Die Analyse erfolgte mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an die hochauflösende Massenspektrometrie (LC-HRMS).

## 2.1.2 Extraktion unpolarer Verbindungen

Die Extraktion unpolarer Verbindungen erfolgte in Anlehnung an Wick et al.[5]. 1 g gefriergetrockneter Schwebstoff wurden in einer ASE 350 (Thermo Scientific) bei 100°C und 100 bar extrahiert. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von n-Hexan und Aceton (90:10). Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: equilibration, 5 min; static time, 10 min; flush volume 120%; purge time, 300 s; static cycles, 3.

Die Extrakte wurden mittels GPC aufgereinigt. Verwendet wurde ein Knauer HPLC System (Knauer Smartline System, Berlin, Germany) mit einer GPC-Säule gefüllt mit Bio Beads S X3 Material (Bettlänge 320 mm) von LCTech (Dorfen, Germany). Als mobile Phase diente Cyclohexan und Ethylacetat (50/50; v/v). Die Flussrate betrug 4,8 ml/min und das Injektionsvolumen war 2 ml. Bei einer kompletten Laufzeit von 60 min wurde die Fraktion zwischen 14 und 32 min gesammelt. Die gesammelte Fraktion wurde eingedampft und in 1 ml Heptan aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels Gaschromatographie gekoppelt an die hochauflösende Massenspektrometrie (GC-HRMS).

**Abbildung 1: Extraktionsschema für Schwebstoffproben**

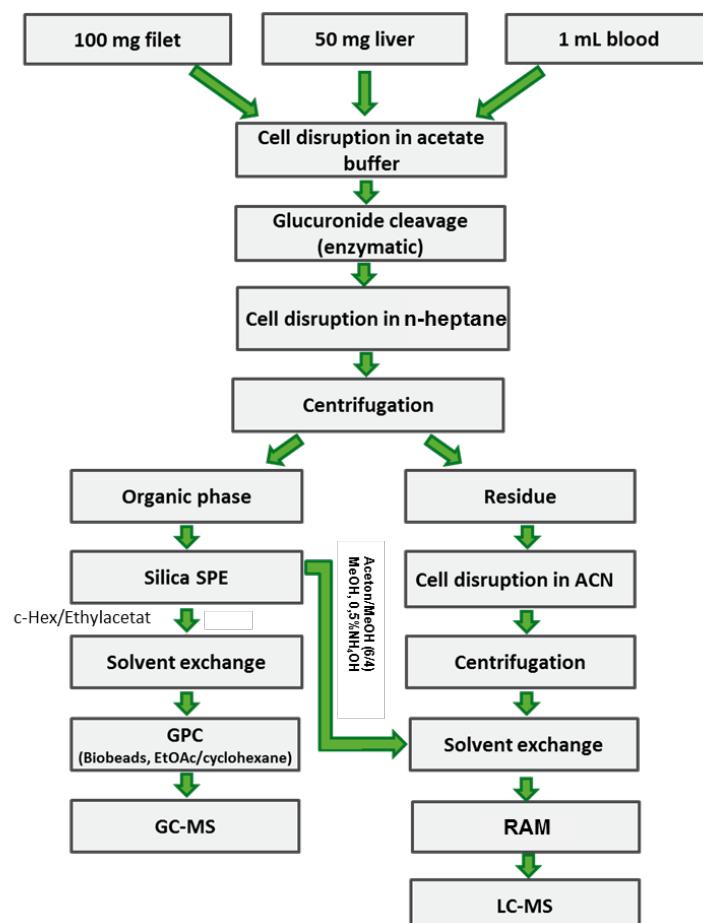


Quelle: eigene Abbildung BfG

## 2.2 Biotaproben

Die Biotaproben wurden mittels Lösungsmittelextraktion in einem FastPrep Zellhomogenisator nach Boulard et al. 2020[6] extrahiert. Um den ganzen Polaritätsbereich abdecken zu können, mussten auch in diesem Fall zwei verschiedene Lösungsmittel verwendet werden. Unpolare Analyten wurden mit Heptan und mittel- und polare Substanzen mit Acetonitril extrahiert. Entsprechend schlossen sich an die Extraktionen an den jeweiligen Polaritätsbereich angepasste Clean-Up-Schritte an. Abbildung 2 zeigt alle Probenvorbereitungsschritte in einem Fließschema zusammengefasst. Der Heptan-Extrakt wurde über eine Silika-Festphase gegeben. Die mitextrahierten polareren Verbindungen wurden am Sorbens zurückgehalten, während sich die unpolaren Verbindungen im Eluat befanden. Das Eluat wurde über eine GPC aufgereinigt und die Fraktion mit den niedermolekularen Bestandteilen mittels GC-MS analysiert. Die auf der Silika-Festphase sorbierten Substanzen wurden mit einer Mischung aus Aceton und Methanol eluiert und mit dem Acetonitril-Extrakt vereinigt. Nach einem Lösungsmitteltausch wurde der Extrakt über eine RAM-Kartusche aufgereinigt. Ähnlich wie bei der GPC wurden dabei große Moleküle wie Proteine nicht zurückgehalten und so von den sorbierten Analyten abgetrennt. Die verbleibende Fraktion wurde mittels LC-MS analysiert.

Abbildung 2: Extraktionsschema für Biota-Proben



Quelle: eigene Abbildung BfG

## 2.3 Messmethoden

Für die Analyse der Extrakte standen ein GC-QTOF sowie ein LC-QTOF System zur Verfügung.

### 2.3.1 GC-QTOF-System

Verwendet wurde ein GC-QTOF System der Firma Agilent bestehend aus einem 8890 B Gaschromatographen und einem 7200 QTOF-Massenspektrometer. Das Injektionsvolumen war 1  $\mu$ L im Splitless-Modus. Trägergas war Helium mit einem Fluss von 1.2 ml/min. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer HP5 MS Kapillarsäule (Länge: 15 m, Durchmesser: 0.25 mm, Filmdicke: 0.25  $\mu$ m) unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms: 40 °C halten für 4 min dann 14 °C min<sup>-1</sup> auf 320 °C gehalten für 6 min. Massenspektren wurden im Full-Scan (40-750 amu) mittels Elektronenionisation (70 eV) aufgezeichnet. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software MassHunter Qualitative Analysis B07.00 (Agilent). Im ersten Schritt wurden die Peaks integriert (Agile 2 Integrator) und über einen Filter alle Signale  $\geq$  1 % des größten Peaks aus der Peakliste entfernt. Im zweiten Schritt erfolgte die Identifizierung mittels der Spektrenbibliothek NIST 14 (minimum score  $\geq$  70). Die Daten wurden anschließend für die weitere Auswertung in Excel übertragen. Diese Methode wurde bereits im Vorfeld des Projekts erfolgreich für das Screening nach Schadstoffen in Kunststoffprodukten eingesetzt [7].

### 2.3.2 LC-QTOF-System

Die Analysen erfolgten mittels eines TripleTOF 6600 (Sciex) gekoppelt über eine Electrosprayionenquelle (ESI IonDrive) an eine HPLC (1260 Infinity, Agilent) ausgestattet mit einer RP-C18-Säule (Zorbax Eclipse Plus, 2.1mm  $\times$  150mm, 3.5 $\mu$ m, Agilent). Als Laufmittel dienten Wasser und Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure. Nach einem isokratischen Intervall von einer Minute folgte ein linearer Gradient von 2% zu 20 % Acetonitril innerhalb von 1 min. Danach folgte ein flacherer Gradient von 20% auf 98% Acetonitril innerhalb von 14,5 min. Die finale Lösungsmittelzusammensetzung wurde für 5,5 min gehalten und dann innerhalb von 0,1 min die Ausgangsbedingungen wiederhergestellt. Am Schluss folgte eine Equilibrierung des Systems für 5 min. Die Flussrate wurde konstant bei 0,3 ml/min gehalten und die Säulentemperatur betrug 40 °C. Diese Methode wurde bereits im Vorfeld des Projekts erfolgreich für das Schadstoffscreening in Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen eingesetzt [1, 2].

## 2.4 Datenverarbeitung

Im Rahmen des Forschungsprojekts „Methodik zur Anwendung von Non-Target Screening (NTS) mittels LC-MS/MS in der Gewässerüberwachung“ (FKZ 3717 22 230 0 <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/methodik-zur-anwendung-von-non-target-screening-nts>) wurde an der BfG ein Workflow für die Auswertung von Screening-Daten erarbeitet. Die Datenverarbeitung und -auswertung erfolgte über ein R-Skript [1, 3]. Die Rohdaten wurden zunächst in das mzXML-Format konvertiert und dann über das R-Skript die Signalpeaks isoliert und gruppiert. Anschließend erfolgte ein Alignment der Signale über sämtliche Proben und ein Abgleich der Massenspektren mit einer Datenbank. Die resultierten Peaklisten wurden dann exportiert und in Excel die weitere Datenauswertung vorgenommen.

## 2.5 Validierung

Da bei Screening-Ansätzen vor der Analyse keine konkreten Zielanalyten ausgewählt werden, kann eine Validierung der Methode nicht wie bei anderen Methoden üblich erfolgen. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Methoden auf die entsprechenden Matrizes und zur Abschätzung der abgedeckten Bandbreite an Analyten wurden verschiedene Wiederfindungsexperimente durchgeführt.

### 2.5.1 Validierung Schwebstoffmethode

Zur Validierung der Methode wurden Substanzen ausgewählt, welche die gesamte Bandbreite an physikochemischen Eigenschaften der in den zu untersuchenden Umweltmatrizes vorkommenden Xenobiotika abdecken sollen.

Für die GC-MS-Analytik wurden polzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK) und schwerflüchtige halogenierte Kohlenwasserstoffe (z.B. PCBs) als typische Vertreter ausgewählt (Tabelle 12). Zur Validierung der Methode wurden die Ergebnisse des Screenings mit den über Target-Methoden gewonnenen Quantifizierungsdaten verglichen. Abbildung 3 zeigt den Vergleich zwischen Screening-GC-TOF MS Daten und den über eine GC-MS-MS-Methode bestimmten Konzentrationen von PCBs in einer Schwebstoffprobe. Die Peakflächen zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die mit Target Methoden gemessenen Konzentrationen. Die Screening-Methode gibt also einen guten Überblick über die tatsächliche PCB-Belastung. Allerdings wurden auf Grund der hohen Nachweisgrenze nur PCBs mit relativ hohen Gehalten (1 µg/Kg) erfasst.

**Abbildung 3: Vergleich Screening und einer Target-Methode für PCBs per GC-MS in Schwebstoffen**



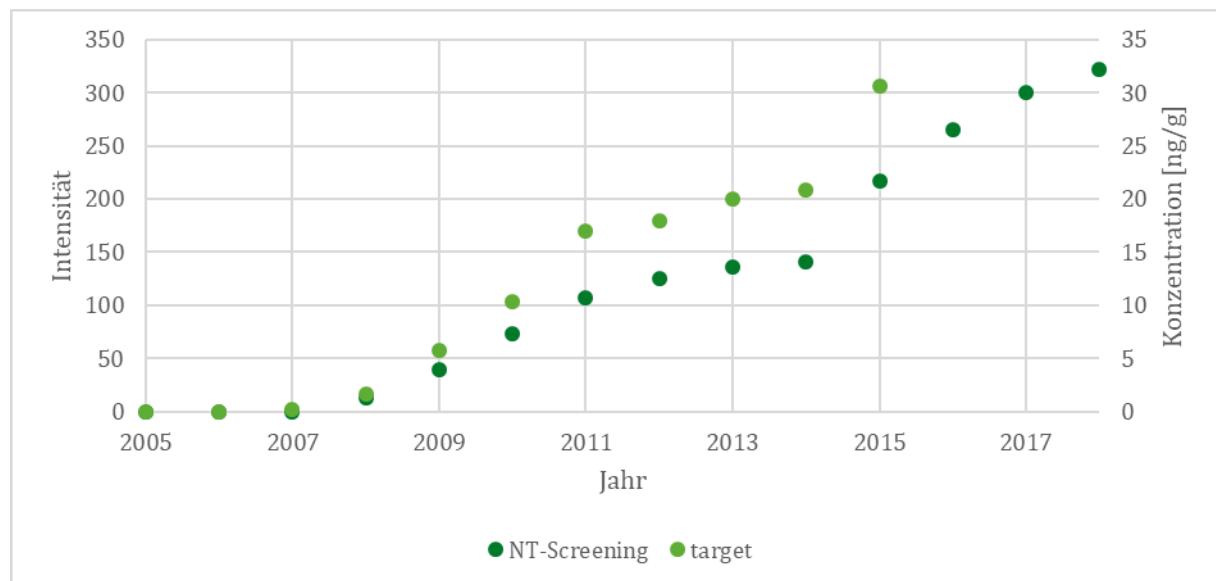
Quelle: eigene Abbildung BfG

Für die LC-MS-Analytik wurden 102 Arzneimittel und deren Metabolite ausgewählt (Tabelle 2). Die Substanzen decken einen breiten Polaritätsbereich ab und sowohl bei pH=7 neutrale als auch positiv sowie negativ geladene Substanzen wurden berücksichtigt. Abbildung 4 zeigt den Vergleich von Screening LC-Daten mit den Quantifizierungsdaten für Sitaliptin bestimmt mit einer LC-MS-MS Target-Methode. Als Proben dienten Schwebstoffe aus den Jahren 2005 bis 2018 gewonnen aus dem Rhein bei Koblenz. Das NTS erfolgte vollautomatisiert über die Auswertesoftware des NTS Portals. Die Identifizierung erfolgte über das so genannten Data Base

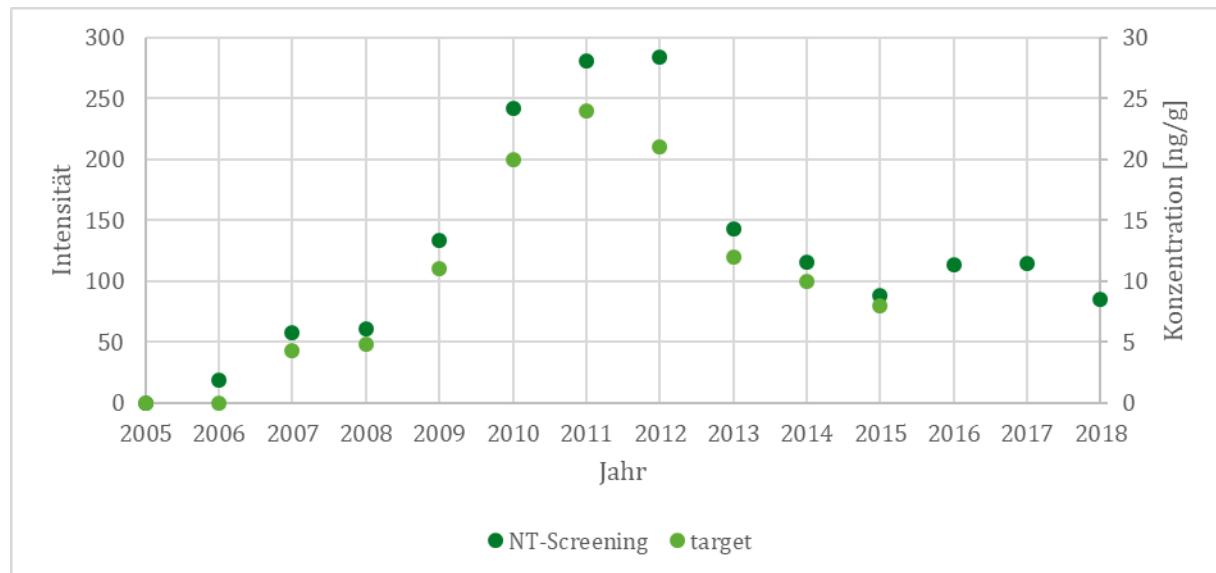
Assisted Screening (DBAS) im NTS Portals, einen Datenbankabgleich mit der hinterlegten Retentionszeit, der exakten Masse und des Fragmentierungsspektrums. Die unkorrigierten Peakintensitäten zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf im Vergleich zu den Quantifizierungsdaten. Ab einer Konzentration von 6 ng/g (Probe von 2010) wurde Sitagliptin mit der NTS-Methode vollautomatisch erfasst.

Durch den Verzicht auf ein übereinstimmendes Fragmentierungsspektrum als Identifizierungskriterium kann die Nachweisgrenze im Screening noch weiter abgesenkt werden. Dies lässt sich am Beispiel des Blutdrucksenkers Aliskirens verdeutlichen (s. Abb. 5). Die vollautomatische Methode mit allen drei Kriterien (exakte Masse, Retentionszeit und MS<sup>2</sup>-Spektrum) erfasst nur die drei höchsten Konzentrationen (20-24 ng/g). Durch eine manuelle Peakerfassung und Zuordnung lassen sich auch Konzentrationen bis 4 ng/g nachweisen. Der Verlauf über die Jahre stimmt wieder sehr gut mit dem aus der Target-Analytik überein. Der Vergleich zeigt, dass eine gezielte, manuelle Stoffsuche in den NTS Messungen Stoffe in Umweltkonzentrationen detektieren kann, die mit automatisierten Auswerteverfahren noch nicht erkannt werden.

**Abbildung 4: Vergleich NTS und Target-Analytik für Sitagliptin**



Quelle: eigene Abbildung BfG

**Abbildung 5: Vergleich NTS und Target-Analytik für Aliskiren**

Quelle: eigene Abbildung BfG

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des NTS und einer vollautomatischen Auswertung ähnliche Ergebnisse wie mit der Target-Analytik erzielt werden können. Allerdings stellt die Target-Analytik eine wesentlich empfindlichere Methode dar.

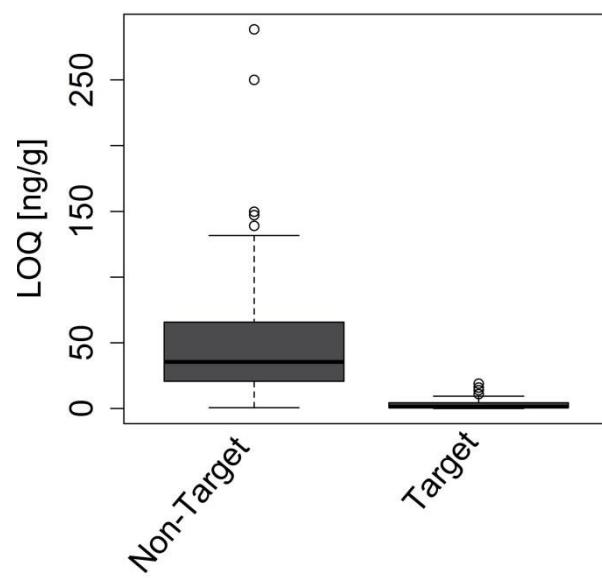
### 2.5.2 Validierung der Methode für Biotaproben

Die komplexe Matrix von biologischen Proben stellt die Spurenanalytik vor große Herausforderungen. Sorption der Umweltchemikalien an bspw. Proteine sowie Verluste bei der komplexen Aufarbeitung, Ionensuppression und Übersättigung des Massenspektrometers durch Matrixbestandteile können zu einer starken Verschlechterung der Empfindlichkeit führen. Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu überprüfen, wurden Fischfiletproben mit bekannten Substanzen dotiert und die Bestimmungsgrenzen, die einen wichtigen Parameter für die Leistungsfähigkeit einer analytischen Methode darstellen, ermittelt. Zwei Konzentrationsstufen – 50 ng/g TS und 5 ng/g TS – wurden untersucht. Diese entsprechen jeweils einer hohen bzw. mittleren Konzentration, die in Deutschland für Arzneimittel in Gewässerproben gemessen wurde.

Zur Bestimmung der LOQs wurden die jeweiligen Massenspuren manuell isoliert und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt. Die ermittelten Bestimmungsgrenzen variierten von 0.62 ng/g Trockensubstanz (TS) bis 288 ng/g TS mit einem Median LOQ bei 38 ng/g TS. Zum Vergleich, die bei der Target-Methode für dieselben Substanzen bestimmten LOQs variieren zwischen 0.1 und 16 ng/g TS mit einem Median bei 1.32 ng/g TS (Abbildung 6). Durch die Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers in Kombination mit der datenabhängigen Auswahl von Ionen für die Aufnahme von MS<sup>2</sup>-Spektren verliert man folglich einen Faktor von ca. 30 an Empfindlichkeit. Es ist wichtig, diesen Abstand in Zukunft zu verringern, damit die Vorteile der Screening Methoden für die Untersuchung von Biotaproben in vollem Umfang ausgenutzt werden zu können.

**Abbildung 6: Vergleich der Bestimmungsgrenzen ausgewählter Analyten in dotiertem Fischfilet für die Screening-Methode (LC-HRMS) und einer Referenzmethode (LC-MS/MS)**

---



Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3 Entwicklung von Auswertealgorithmen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten ein Screening mit hochaufgelösten massenspektrometrischen Daten durchzuführen. Die Wahl der Methode richtet sich nach der analytischen Fragestellung. So können die Daten über eine bekannte Summenformel nach einem bestimmten Stoff retrospektivisch durchsucht werden (Suspect-Screening). Des Weiteren können die Daten systematisch nach Substanzen aus einer Liste/Datenbank gefiltert werden (Data Base Assisted Screening). Zu guter Letzt kann in den Daten nach zeitlichen oder räumlichen Trends von bislang nicht identifizierten Massen gesucht werden (Unknown-Screening).

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Charakteristika der im Projekt erprobten Screening-Methoden**

Methode	Analytauswahl	Identifizierungslevel	Sensitivität
Target-Analytik	manuell	hoch	hoch
Suspect-Screening	manuell	mittel	mittel
Data Base Assisted Screening	automatisch	hoch	niedrig
Unknown-Screening	automatisch	-	mittel

Die Methoden unterscheiden sich stark in ihrem Automatisierungsgrad, Identifizierungslevel und in ihrer Sensitivität (vergl. Tabelle 2). Durch die manuelle Auswertung können beim Suspect-Screening auch kleine Peaks erfasst werden. Allerdings erfordert dies, wie auch eine Identifizierung über Stabilisotopenpeaks, das MS-MS-Spektrum und die Plausibilisierung über die Retentionszeit, Erfahrung und Expertenwissen. Beim Data Base Assisted Screening laufen dagegen die Peakfindung und -identifizierung vollautomatisiert ab. Durch die in der Datenbank hinterlegten Identifizierungsmerkmale (exakte Masse des Quasi-Molekülions und dominanten Addukten, Retentionszeit,  $MS^2$ -Spektrum) können die Substanzen eindeutig identifiziert werden. Allerdings ist die Sensitivität bedingt durch den Auswertealgorithmus etwas erniedrigt. Das Non-Target-Screening basiert dagegen auf einer automatisierten Isolierung von Massenspuren, in denen ggf. vorhandene Peaks detektiert und diese mit formgleichen und zur selben Zeit eluierenden zu Gruppen zusammengefasst werden. Eine Identifizierung der zu den Massen gehörigen Substanzen ist in diesem Fall zunächst zweitrangig, da das primäre Ziel die Betrachtung von statistischen Unterschieden in Probenserien darstellt.

Die Anwendbarkeit der drei beschriebenen Screening-Ansätze auf Schwebstoff- und Biotaproben wird im Zuge dieses Projekts untersucht.

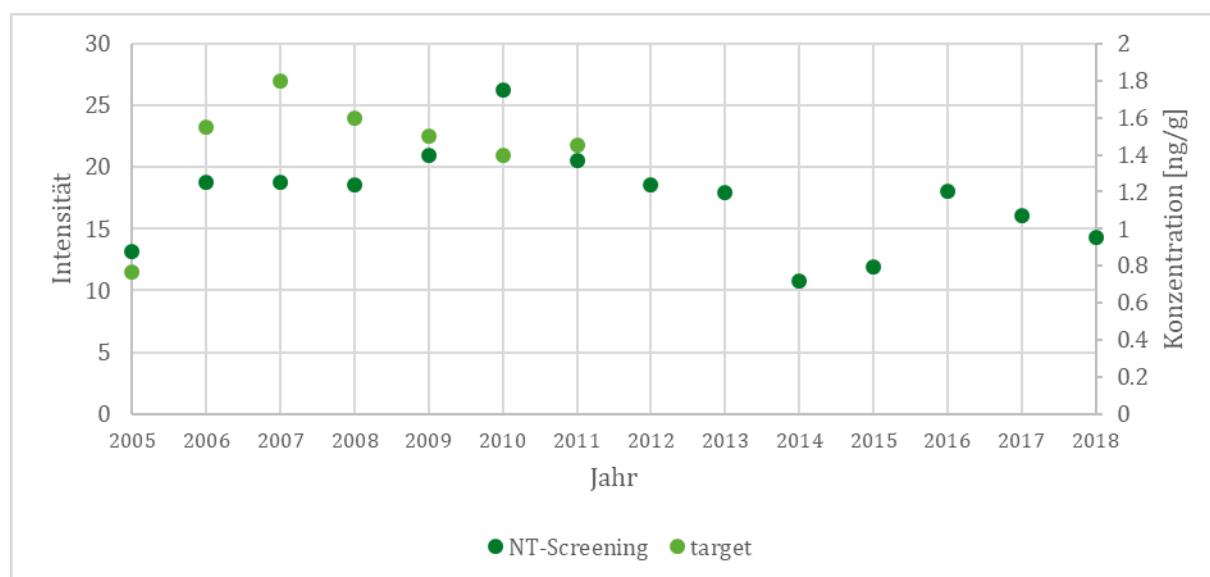
#### 3.1 Suspect-Screening

Bei diesem Ansatz werden die Daten anlassbezogen auf eine oder mehrere ausgewählte Substanzen durchsucht. Über die Substanzen muss lediglich die Summenformel und die aus dieser zu berechnenden Molekülmasse bekannt sein. Ein Referenzstandard wird zunächst nicht benötigt. Für eine eindeutige Identifizierung ist allerdings ein  $MS^2$ -Referenzspektrum notwendig.

### 3.1.1 Propiconazol

Als Beispiel für ein Suspect-Screening wurde das Biozid Propiconazol (Summenformel:  $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$ ) in Schwebstoffproben aus dem Rhein (Koblenz) aus den Jahren 2005 bis 2018 gesucht. Zu diesem Zweck wurde die Massenspur  $m/z = 342.07706$  isoliert, welche dem  $[M+H]^+$ -Ion des Biozids Propiconazol entspricht. Bei einer Retentionszeit von 13,4 min wurde in allen Proben ein Peak detektiert. Da in diesem Fall ein authentischer Referenzstandard zur Verfügung stand, konnte die Identität des Peaks über die Retentionszeit und das  $MS^2$ -Spektrum bestätigt werden. Abbildung 7 zeigt den zeitlichen Trend der Peakflächen über den untersuchten Zeitraum im Vergleich zu Analysendaten aus Traget Messungen, die bereits in der Umweltprobenbank hinterlegt waren. Beide Reihen zeigen einen ähnlichen Verlauf, was die korrekte Zuordnung des Peaks untermauert und die Zuverlässigkeit der Methode trotz Verzichts auf die Korrektur über einen internen Standard bestätigt.

**Abbildung 7: Ergebnis des Suspect-Screenings nach Propiconazol in Schwebstoffproben aus dem Rhein (Koblenz) und Vergleich der Peakintensitäten mit Quantifizierungsdaten**



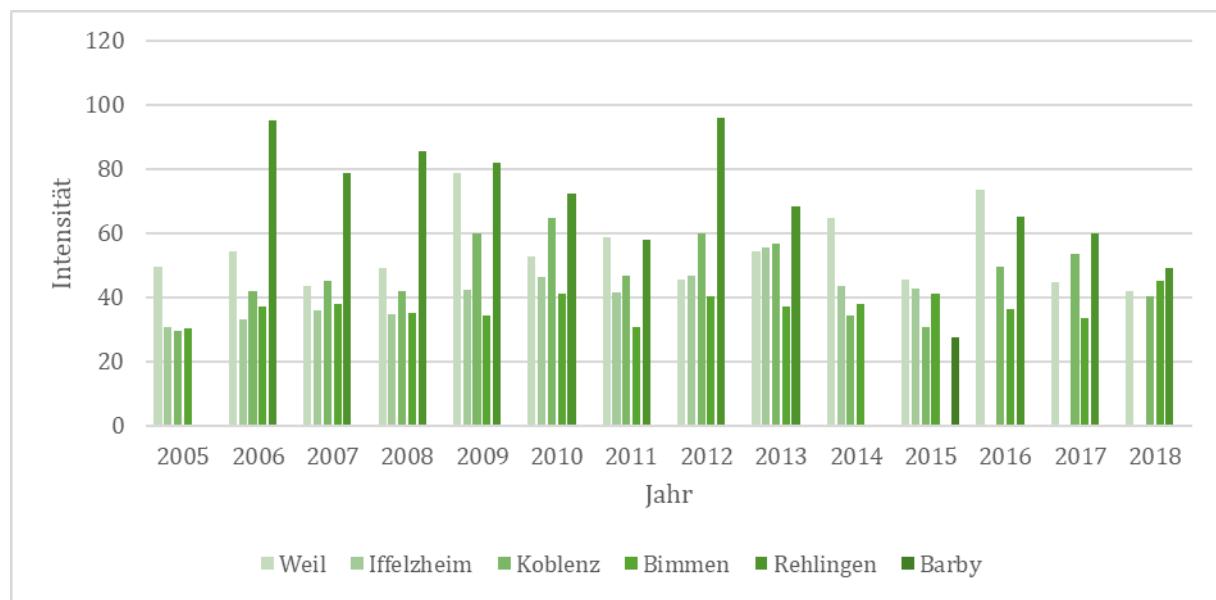
Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3.1.2 6-PPD-Chinon

Das Suspect-Screening ermöglicht ein schnelles Reagieren auf neu entdeckte Schadstoffe und liefert ohne Messaufwand und langwierige Beschaffung von Referenzstandards in kurzer Zeit eine Übersicht über Zeit- und Flächentrends dieser Substanzen. Ein gutes Beispiel ist dafür das N-(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediaminchinon (6PPD-Chinon), das Ende 2020 als für Forellen stark giftige Substanz aus Reifen beschrieben wurde[8]. Die in der Veröffentlichung genannten Daten zu exakter Masse ( $m/z 299.177$ ) und das  $MS^2$ -Spektrum wurden für ein Screening in Schwebstoffproben verwendet. Das 6-PPD-Chinon konnte in Schwebstoffproben aus Rhein und Saar in allen untersuchten Jahren nachgewiesen werden. In der Elbe wurde es dagegen am Standort Barby nur im Jahr 2015 detektiert. Die Ergebnisse konnten ein halbes Jahr später nach der Verfügbarkeit eines Referenzstandards bestätigt werden. Durch die Verwendung eines Deuterium markierten internen Standards konnte das 6-

PPD-Chinon sogar retrospektiv semi-quantitativ bestimmt werden. Die gefundenen Konzentrationen lagen zwischen 10 und 100 ng/g.

**Abbildung 8: Intensität des 6PPD-Chinons in Schwebstoffproben aus Rhein, Saar und Elbe**

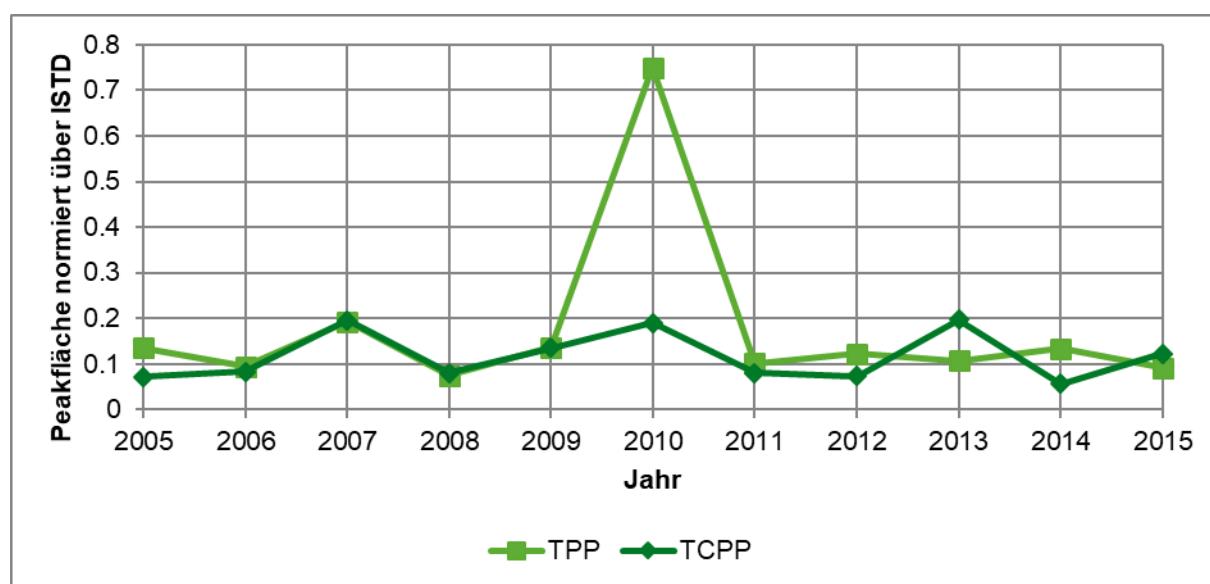


Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3.1.3 Organophosphatflammschutzmittel

In den GC-Extrakten wurde ein Suspect-Screening auf vier wichtige Organophosphatflammschutzmittel (Triphenylphosphat (TPP), Tri-Kresylphosphat (TCP), Tris(2-chlorisopropyl)phosphat (TCPP) und Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphat (TDCPP)) durchgeführt. TPP ( $m/z= 326.07025$ , RT=23.72 min) und TCPP ( $m/z=277.01578$ , RT=18.96 min) konnten in allen untersuchten Schwebstoffproben gefunden werden. Abbildung 9 zeigt die Intensitätsverläufe für beide Substanzen. Abgesehen von einem stark nach oben abweichendem Wert für TPP im Jahr 2010, bleiben die Intensitäten über den betrachteten Zeitraum von 10 Jahren im Mittel konstant.

**Abbildung 9: Suspect-Screening TPP und TCPP in Schwebstoffproben aus dem Rhein (Koblenz) mittels GC-HRMS**



Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3.1.4 Fluorierte Verbindungen

Neben einzelnen ausgewählten Verbindungen kann ein Suspect-Screening auch für die Überblicksanalyse einer ganzen Stoffgruppe angewendet werden. Als Beispiel wurde eine Stoffliste mit den am häufigsten verwendeten fluorhaltigen Arzneimittelwirkstoffen, Pestiziden und Bioziden erstellt. Als Grundlage dienten die Norman Stofflisten (SWISSPHARMA (85 fluorhaltige Substanzen), SWISSPEST (34 fluorhaltige Substanzen) und EUBIOCIDES (11 fluorhaltige Substanzen)) aus denen alle Substanzen mit mindestens einem Fluoratom herausgefiltert wurden. Die von der Auswertesoftware erstellten Peaklisten wurden nach den exakten Massen der Substanzen durchsucht und im Falle eines Treffers ein ggfs. vorhandenes MS<sup>2</sup>-Spektrum mit einer Datenbank abgeglichen. Tabelle 3 fasst die gefundenen fluorhaltigen Substanzen für die Standorte zusammen. Von den insgesamt 130 Substanzen wurden neun Substanzen gefunden, wovon 5 über die BfG-Datenbank identifiziert wurden. Flutamid und Melperon wurden über die online Datenbank Massbank zunächst identifiziert. Ein Abgleich mit den über einen nachträglich beschafften Standard bestimmten Retentionszeiten ergab nur für das Melperon eine Übereinstimmung. Der Fund des Flutamids konnte nicht bestätigt werden. Gefunden wurden das Fungizid Epoxiconazol und Arzneimittelwirkstoffe, von denen Citalopram, Flecainid, Fluoxetin und Sitagliptin bekannte Kontaminanten in Schwebstoff aus dem Rhein sind (Boulard et al. 2020). Die vier Substanzen sind im Bereich von 5-35 ng/g im Schwebstoff vertreten, während für Verbindungen wie z.B. fluorierte Pflanzenschutzmittel in den Bundeswasserstrassen, wo die Schwebstoffe der Umweltprobenbank gesammelt werden, deutlich geringere Schwebstoffkonzentrationen zu erwarten sind. Dies zeigt, dass mit der Screening-Methode die mengenmäßig am bedeutendsten Verbindungen erfasst werden, sehr geringe Kontaminationen (in der Regel <1 ng/g) aber derzeit nicht erfasst werden können.

**Tabelle 3: Ergebnis des Suspect-Screenings nach fluorhaltigen Verbindungen in Schwebstoffen**

Standort	Citalopram	Epoxiconazol	Flecainid	Flusilazol	Fluoxetin	Melperon	Sitagliptin
Weil	x		x		x	x	x
Koblenz	x		x		x	x	x
Bimmen	x		x		x	x	x
Rehlingen	x		x			x	x
Zehren	x	x	x			x	x
Barby	x	x	x	x		x	x
Jochen-stein	x		x			x	x

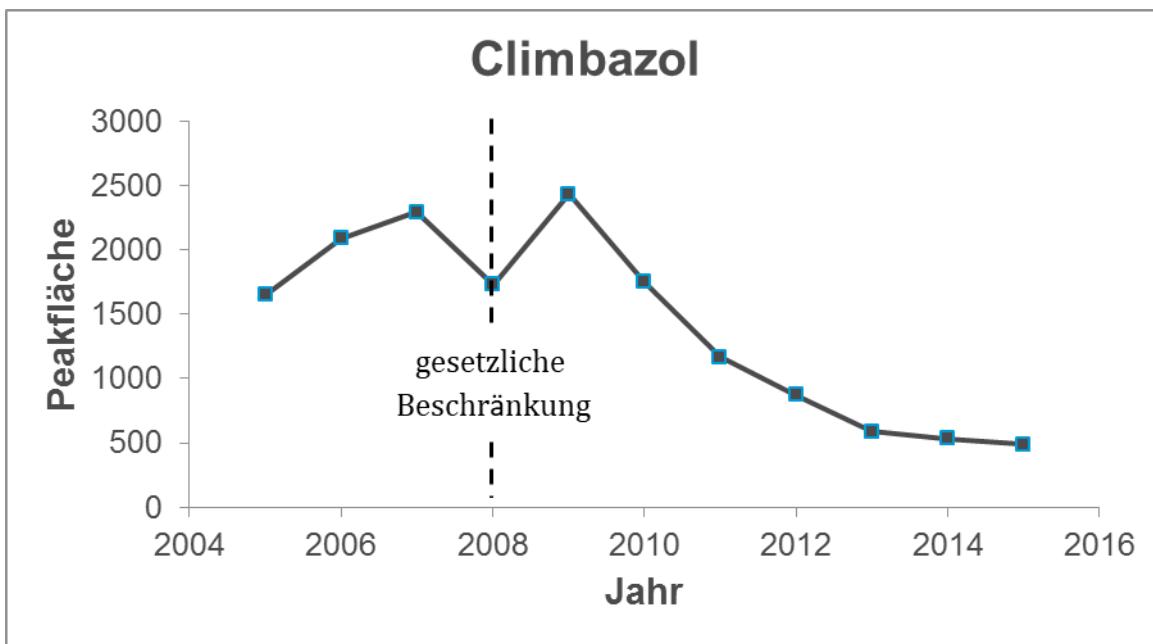
### 3.2 Data Base Assisted Screening

Die Extrakte von Schwebstoffen wurden mittels RP-LC-HRMS analysiert (s. Kapitel 2.1). Die Daten wurden mittels eines automatischen Auswertealgorithmus prozessiert und die isolierten Substanzpeaks mit Hilfe einer Spektrendatenbank identifiziert. Für das Data Base Assisted Screening (DBAS) unterhält die BfG eine ständig wachsende Spektrendatenbank, die für ca. 1088 Einzelsubstanzen die Summenformel, exakte Masse des Quasimolekül-Ions und der dominanten Addukte, die Fragmentspektren bei verschiedenen Fragmentierungsenergien und die Retentionszeit beinhaltet[1]. Zur Aufnahme von Substanzen in die Spektrendatenbank werden entsprechende Referenzstandards mittels LC-HRMS analysiert. In den 507 Messungen (270 postiver und 237 negativer Ionisierungsmodus) von den 13 Standorten wurden insgesamt 318 verschiedene Verbindungen gefunden, wobei die Gesamtanzahl an Detektionen 18582 betrug. Die Daten wurden in die im Projekt „Non-Target Screening für die Umweltüberwachung der Zukunft“ (FKZ: 3720 22 201 0) entwickelte Datenbank eingetragen und können dort abgerufen werden ([www.ntsportal.bafg.de](http://www.ntsportal.bafg.de)).

#### 3.2.1 Climbazol

In den Schwebstoffproben aus dem Rhein bei Koblenz aus den Jahren 2005-2018 konnten im Positivmodus 62 und im Negativmodus 27 Substanzen identifiziert werden (vergl. Tabelle 13 im Anhang). Bei den gefundenen Substanzen handelt es sich um Verbindungen aus der Gruppe der Arzneimittelwirkstoffe, Kunststoffadditive, Biozide und Pflanzenschutzmittel. Darunter das Antimykotikum Climbazol, dessen Intensitätsverlauf in Abbildung 10 dargestellt ist. Bis ins Jahr 2007 stiegen die Schwebstoffkonzentrationen an, um dann stark zurückzugehen und auf einem sehr viel niedrigeren als dem Ausgangsniveau zu stagnieren. Dieser Verlauf lässt sich durch eine gesetzliche Beschränkung der Climbazolgehalte in Körperpflegeprodukten im Jahr 2008 erklären.

Abbildung 10: Climbazol im Schwebstoff (Rhein bei Koblenz)

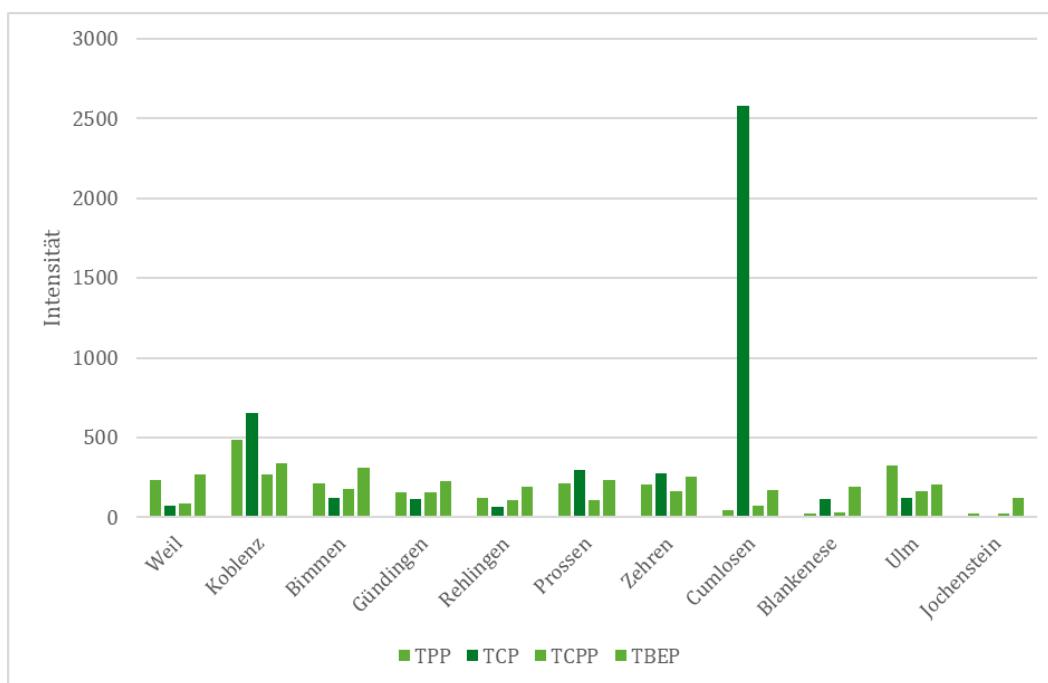


Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3.2.2 Organophosphat-Flammschutzmittel

Ein Anwendungsfall des Data Base Assisted Screenings ist zum Beispiel die Suche nach standortspezifischen Auffälligkeiten im Schadstoffmuster. Betrachtet man beispielsweise die Schwebstoffbelastung an verschiedenen Standorten mit Organophosphat-Flammschutzmitteln, so fällt eine stark erhöhte Belastung mit Triskresylphosphat (Isomerengemisch) (TCP) in der Elbe am Standort Cumlosen auf (vergl. Abb. 11).

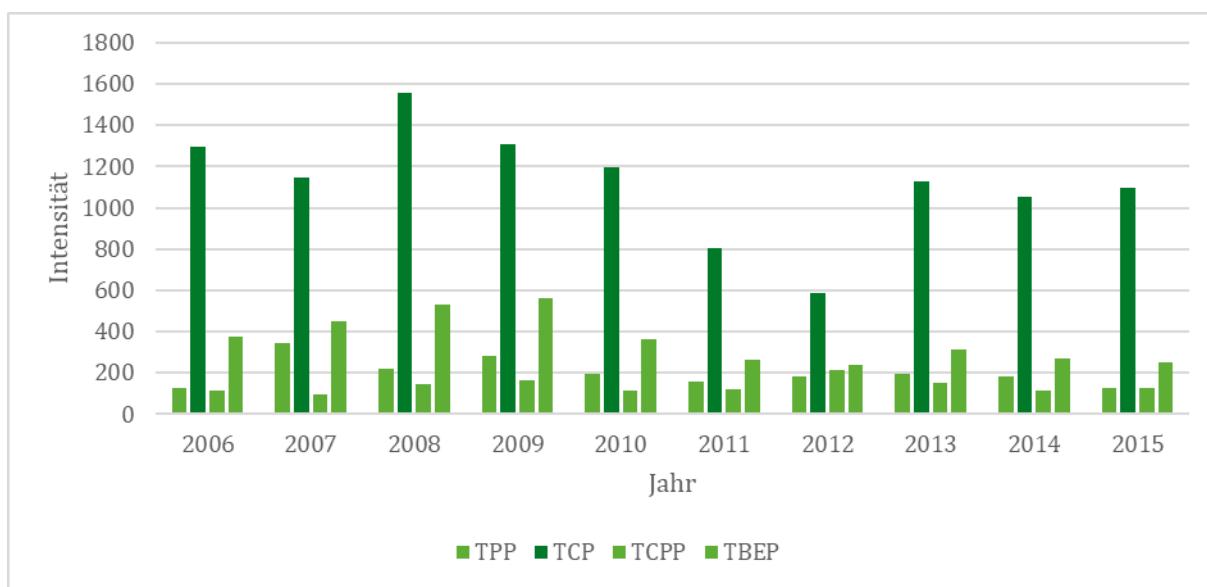
**Abbildung 11: Intensitäten von Organophosphaten in Schwebstoffen aus 2018 bestimmt mittels LC-HRMS**



Quelle: eigene Abbildung BfG

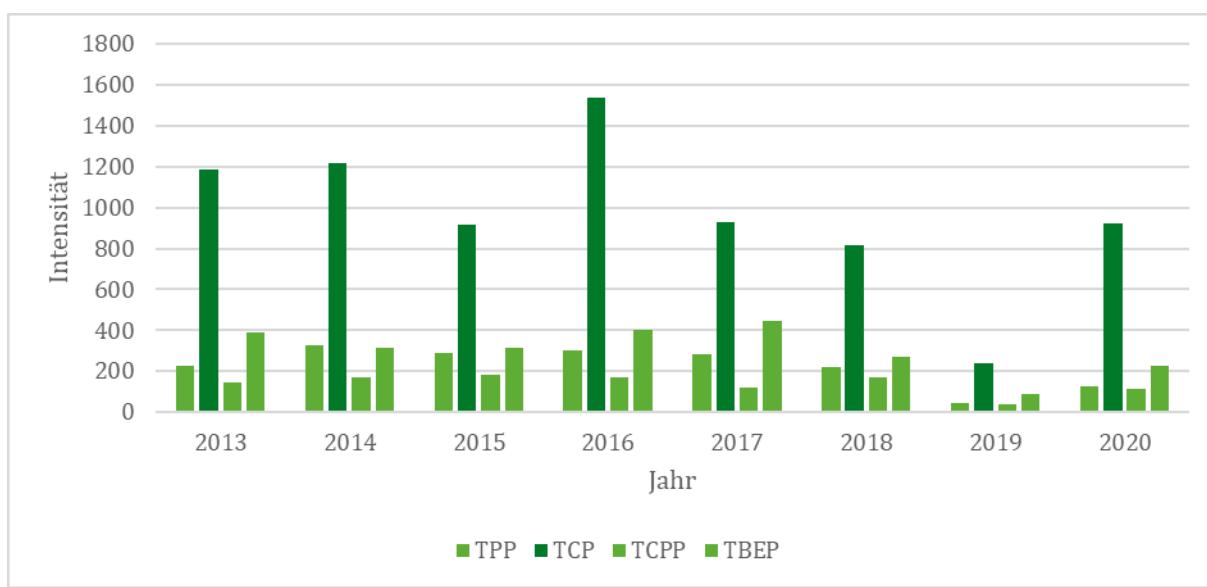
Bei der erhöhten Intensität handelt es sich nicht um einen Ausreißer oder ein Artefakt durch die Messmethode, sondern um Messwerte für eine seit mehreren Jahren mit TCP belastete Region, wie eine Zeitreihe vom Elbestandort Barby belegt, der stromaufwärts von Cumlosen liegt sowie die ebenfalls stromaufwärts gelegenen Probenahmestellen der Elbezuflüsse Saale (Wettin) und Mulde (Dessau) (s. Abb. 12-14). An allen vier Messstellen weist über den gesamten betrachteten Zeitraum das Trikrezylphosphat im Vergleich zu den anderen Flammenschutzmitteln deutlich höhere Intensitäten auf.

**Abbildung 12: Intensitätsverlauf für Organophosphat-Flammschutzmittel über die Jahre 2006-2015 am Standort Barby (Elbe)**



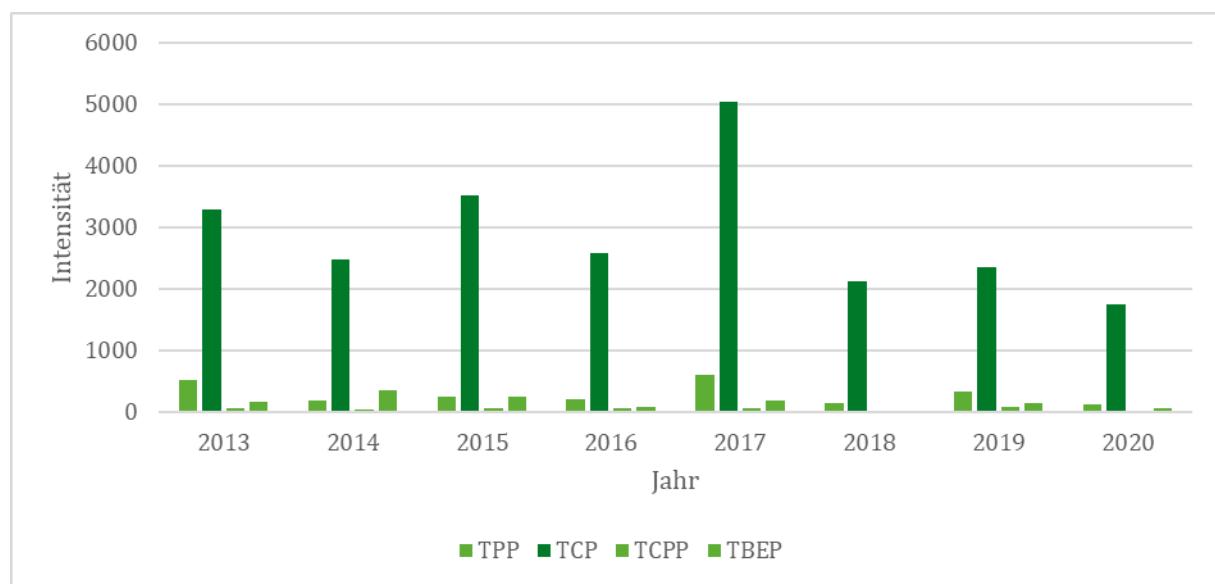
Quelle: eigene Abbildung BfG

**Abbildung 13: Intensitätsverlauf für Organophosphat-Flammschutzmittel über die Jahre 2013 bis 2020 am Standort Wettin (Saale)**



Quelle: eigene Abbildung BfG

**Abbildung 14: Intensitätsverlauf für Organophosphat-Flammschutzmittel über die Jahre 2013 bis 2020 am Standort Dessau (Mulde)**

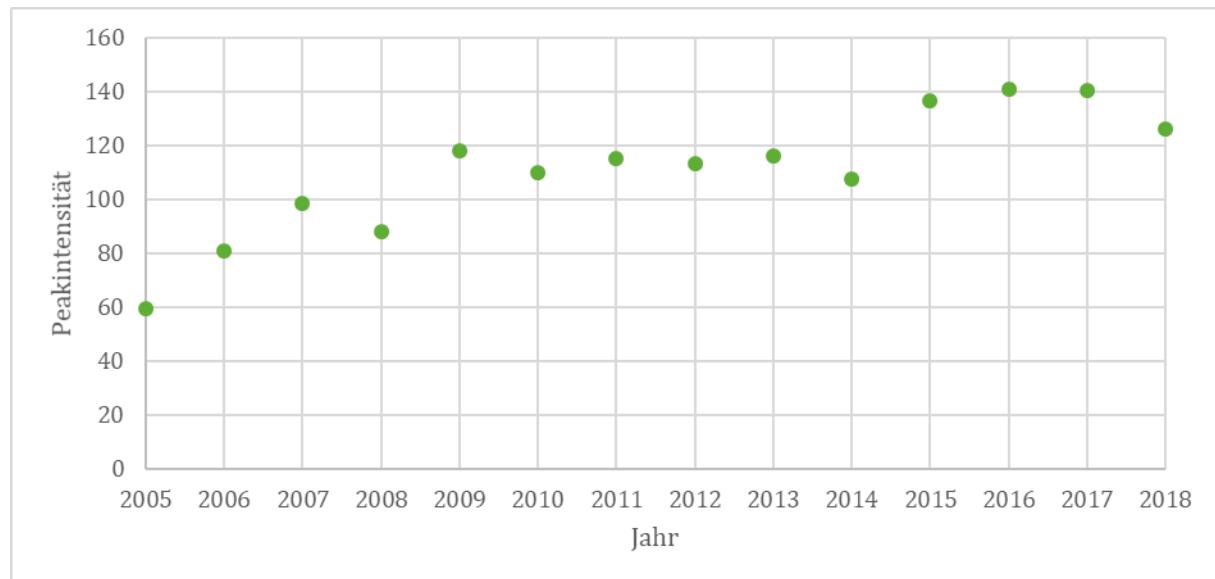


Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3.2.3 Trospium

Durch eine Erweiterung der Datenbank um weniger bekannte Stoffe, lassen sich auch bisher nicht untersuchte Substanzen in Schwebstoffen nachweisen. So konnte erstmalig das synthetische Anticholinergikum Trospium in Schwebstoffen nachgewiesen werden. Dieser zur Behandlung von der Drang- und Reflexinkontinenz eingesetzte Arzneimittelwirkstoff zeigt über die Jahre 2005 bis 2018 einen ansteigenden Trend in den Schwebstoffkonzentrationen (s. Abbildung 15). Nach unserem Wissen sind dies die ersten Umweltdaten für diesen Wirkstoff.

**Abbildung 15: Intensitätsverlauf für Trospium im Schwebstoff (Rhein bei Koblenz) über die Jahre 2005 bis 2018**



Quelle: eigene Abbildung BfG

### 3.3 Unknown-Screening

Die Datenverarbeitung bei dieser Methode erfolgte vollautomatisiert durch ein Auswerteskript[3]. Im ersten Schritt wurden die Chromatogramme in ihre einzelnen Massenspuren (0,02 amu Schritte) zerlegt und diese im zweiten Schritt nach Peaks durchsucht. Die Peaks werden dann mit formgleichen zur selben Retentionszeit detektierten Peaks zu Gruppen zusammengefasst. Von dieser Liste gefundener Komponenten wurden die Funde in Blindproben subtrahiert, um Verunreinigung aus der Probenvorbereitung und dem Messsystem zu eliminieren. Im letzten Schritt werden die Daten gefiltert, um falsch-positive Ergebnisse zu minimieren. So wurden nur Komponenten berücksichtigt, welche jeweils in sämtlichen Replikaten der Schwebstoffproben und in mindestens zwei verschiedenen Schwebstoffextrakten gefunden wurden. Am Ende ergeben sich so für die Schwebstoffproben lange Liste mit mehreren tausend Komponenten. Die weitere Auswertung dieser Liste hängt von der zu beantwortenden Fragestellung ab.

#### 3.3.1 Substanzen mit steigenden Konzentrationstrends

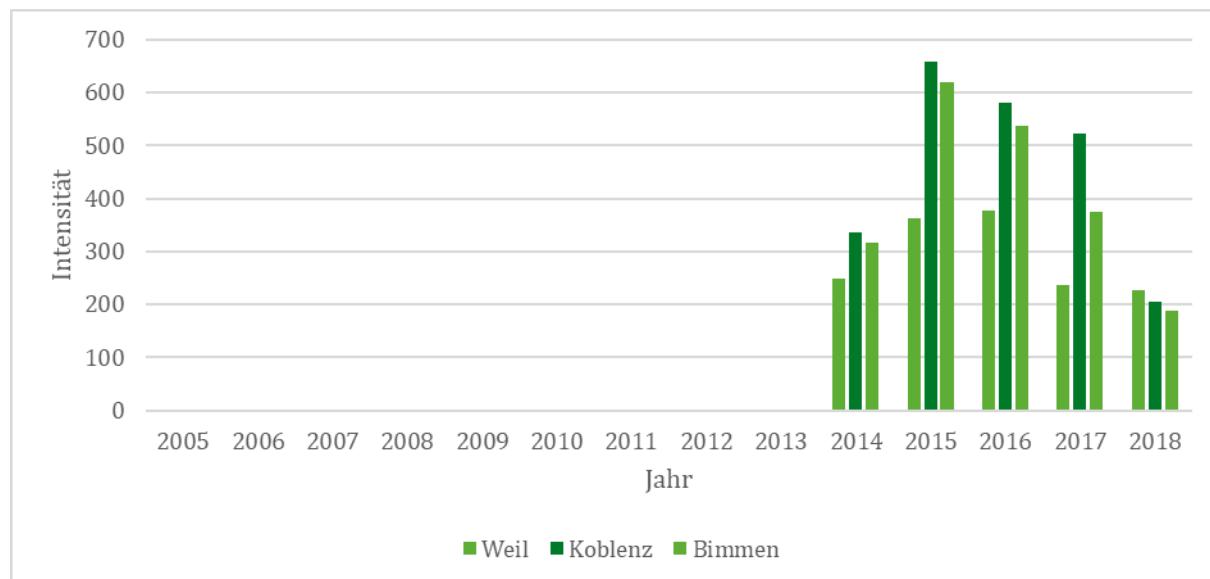
Im folgenden Beispiel wird in den Daten nach Substanzen, die im Zeitraum 2014-2018 einen starken Konzentrationsanstieg im Rhein erfahren haben, gesucht. Dazu wurde der Quotient aus der minimal gemessenen Intensität in diesem Zeitraum (über die drei Standorte Weil, Koblenz und Bimmen) und der maximalen Intensität, die im Zeitraum 2005 bis 2009 gemessen wurde, gebildet und die Daten nach der Höhe des Quotienten absteigend sortiert. Tabelle 4 zeigt die 30 Komponenten mit den größten Intensitätszunahmen. Zwei der Massensignale konnten über die Datenbank identifiziert werden. Es handelt sich um den Arzneimittelwirkstoff Sitagliptin und das Kation Dimethyldioktylammonium. Sitagliptin ist ein gutes Beispiel zur Überprüfung der Methodik, da bekannt ist, dass dieser Stoff ab dem Jahr 2009 im Schwebstoff nachweisbar ist und seitdem steigende Konzentrationen aufweist (vergl. Abbildung 4). Diese Liste kann als Grundlage für eine Priorisierung zur Identifizierung von unbekannten Signalen dienen.

**Tabelle 4: MS-Signale mit den 30 größten Intensitätszuwachsen in Schwebstoffen vom Standort Koblenz (Rhein) für die Jahre 2014-2018 im Vergleich zum Zeitraum 2005-2009**

Mittelwert m/z	mittlere Retentionszeit [min]	Name	Zuwachsfaktor
398.1954	9.09	unbekannt	203
429.2372	8.52	unbekannt	107
539.208	12.08	unbekannt	83
400.2112	9.24	unbekannt	76
411.2272	8.47	unbekannt	64
498.211	8.74	unbekannt	63
517.2347	9.12	unbekannt	39
263.2354	18.04	unbekannt	33
282.2495	13.06	unbekannt	27
723.4497	9.99	unbekannt	27
287.0903	8.51	unbekannt	27
238.2231	17.66	unbekannt	26
241.1422	6.71	unbekannt	24
296.213	5.06	unbekannt	21
591.4204	5.06	unbekannt	19
444.2427	4.86	unbekannt	19
163.0851	4.63	unbekannt	17
544.8458	8.46	unbekannt	16
534.2904	4.9	unbekannt	14
398.1957	8.04	unbekannt	10
408.1241	6.57	Sitagliptin	3
340.32	6.98	unbekannt	3
270.3145	10.92	Dimethyldioctylammonium	2
492.4401	8.87	unbekannt	2
472.2743	5.11	unbekannt	2

Von der Substanz mit der größten Zunahme ( $m/z$  398.1954 Doppelpeak bei 8.97 und 9.02 min) wurden die Zeitreihen an den Rheinstandorten genauer betrachtet (s. Abbildung 16). An allen Standorten kann die Substanz ab dem Jahr 2014 detektiert werden. In Proben von den anderen im Projekt untersuchten Flüssen konnte die Substanz nicht nachgewiesen werden. Folglich muss es sich um eine Substanz handeln, die stromaufwärts von Weil am Rhein exklusiv in den Rhein eingeleitet wird.

**Abbildung 16: Vorkommen des Massensignals 398.19 bei 8,9 min im Rhein**



Quelle: eigene Abbildung BfG

Im Folgenden wird das generelle Vorgehen für die Identifizierung einer unbekannten Substanz skizziert. Zunächst lassen sich aus der exakten Masse Vorschläge für Summenformeln berechnen. Grundlage für die Berechnung ist die Annahme, dass es sich bei der Masse  $m/z$  398.1954 um das  $M+H^+$  Ion handelt.

**Tabelle 5: Vorschläge für Summenformeln berechnet für  $[M+H^+]$  398,1954**

Summenformel	Molekülmasse [Da]	$m/z$ $[M+H^+]$	Abweichung [ppm]
$C_{23}H_{27}NO_5$	397,1889	398,1962	2
$C_{16}H_{32}NO_8P$	397.1866	398,1938	-4
$C_{27}H_{27}NS$	397,1864	398,1937	-4
$C_{20}H_{32}NO_3PS$	397,1841	398,1913	-10
$C_{20}H_{31}NO_5S$	397,1923	398,1996	11

Im zweiten Schritt wird das Muster der Isotopensignale im  $MS^1$ -Spektrum betrachtet und darüber die Anzahl der Kohlenstoffatome abgeschätzt und nach Elementen mit auffälligem Isotopenmuster wie bspw. Chlor oder Brom geguckt. Im  $MS^1$ -Spektrum sind keine Hinweise auf Elemente mit auffälligem Isotopenmuster zu finden. Aus den rel. Intensitäten der um 1 amu (ein  $^{13}C$ ) bzw. 2 amu (zwei  $^{13}C$ ) schwereren Signalen lässt sich die Anzahl der im Molekül vorhandenen C-Atome abschätzen. Über die rel. Häufigkeit des Kohlenstoffisotops  $^{13}C$  von 1,1 %

ergibt sich eine Kohlenstoffatomanzahl von  $28 \pm 4$  (s. Tabelle 6). Dies bestätigt die in Tabelle 5 berechneten möglichen Summenformeln  $C_{23}H_{27}NO_5$  und  $C_{27}H_{27}NS$ . Letztere lässt sich allerdings ausschließen, da das Schwefelisotop  $^{34}S$  natürlicherweise mit 4,2 % vorkommt und die rel. Intensität der Masse  $m/z$  400,2 somit deutlich höher sein müsste als 7 %. Für die weiteren Identifizierungsschritte wird daher zunächst die mögliche Summenformel  $C_{23}H_{27}NO_5$  weiter betrachtet.

**Tabelle 6: MS<sup>1</sup>-Spektrum der unbekannten Substanz**

<b>m/z</b>	<b>Rel. Intensität</b>	<b>Berechnete Anzahl C-Atome</b>
398,2	100	
399,2	$31 \pm 4$	$28 \pm 4$
400,2	$7 \pm 1$	$24 \pm 1$

Eine Internetrecherche nach der Summenformel  $C_{23}H_{27}NO_5$  ergab für die Datenbank molport ([www.molport.com](http://www.molport.com) besucht am 25.11.2021) 1667 kommerziell erhältlicher Chemikalien. Unter diesen waren unter anderem Fmoc-Derivate von Aminosäuren, die für die Peptidsynthese eingesetzt werden und großtechnisch hergestellt werden. Die Analyse des Fmoc-N-Methyl-O-tert-butyl-Serin als Referenzsubstanz ergab allerdings eine durch die Fmoc-Gruppe wesentlich höhere Retentionszeit (13,9 min) und ein durch ein von der Fmoc-Gruppe stammendes Fragment dominiertes MS<sup>2</sup>-Spektrum. Daher können Fmoc-Derivate ausgeschlossen werden.

Zur Aufklärung der molekularen Struktur der unbekannten Substanz erfolgt im nächsten Schritt eine Interpretation des MS<sup>2</sup>-Spektrums. Für die einzelnen Fragmente lassen sich mögliche Summenformeln berechnen (S. Tabelle 7). Trotz des Einsatzes hochauflösender Massenspektrometrie kommt eine große Anzahl möglicher Summenformeln und Molekülstrukturen in Betracht, so dass eine Identifizierung der unbekannten Substanz auf Grund der vorhandenen Daten nicht möglich war. Für eine erfolgreiche Strukturaufklärung wäre eine sehr zeit- und arbeitsintensive Isolation der Substanz in Reinform notwendig.

**Tabelle 7: MS<sup>2</sup>-Spektrum zum Massensignal  $m/z$  398,19 RT=8,9 min**

<b>m/z</b>	<b>rel. Intensität</b>	<b>mögliche Summenformel</b>	<b>Abweichung [ppm]</b>
398,1930	14	$C_{23}H_{28}NO_5$	2
234,1247	11	$C_{17}H_{16}N$	4
218,1153	40	$C_{13}H_{16}NO_2$	10
217,1050	20	$C_{10}H_{16}O_5$	9
216,0999	100	$C_{13}H_{14}NO_2$	9
190,0830	30	$C_{11}H_{12}NO_2$	17
188,0690	66	$C_{11}H_{10}NO_2$	9
172,0745	14	$C_{11}H_{10}NO$	7

m/z	rel. Intensität	mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]
160,0724	13	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> NO	21
145,0866	59	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	-5
144,0781	95	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N	19
91,0524	69	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub>	20

### 3.3.2 Korrelation von Intensitätsverläufen

Eine weitere Möglichkeit der Datenauswertung ist die Suche nach Massensignalen mit ähnlichen zeitlichen oder räumlichen Intensitätsverläufen. Hierzu können die Daten einer bekannten Substanz mit sämtlichen in einer Probenserie gefundenen Massensignalen abgeglichen werden und so z. B. unbekannte Transformationsprodukte oder anderweitig mit der bekannten Substanz assoziierte Substanzen identifiziert werden. Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise wurde der zeitliche Verlauf der Intensität des Peaks von Didecyldimethylammonium (DDAC-C10, m/z 326,37, RT=13,4 min) in Rheinschwebstoffproben (Weil) mit dem zeitlichen Verlauf (2005-2018) sämtlicher gefundener Massensignale abgeglichen. Tabelle 8 zeigt die Massensignale mit der besten Übereinstimmung (Pearson-Korrelation). Neben anderen quartären Ammoniumverbindungen wie Dioctylmethylammonium oder Cetylpyridinium wurden mehrere potentielle Transformationsprodukte vom DDAC-C10 detektiert. Basierend auf der exakten Masse und dem MS<sup>2</sup>-Spektrum wurden Hydroxyl-, Carboxyl- und Carbonsäurederivate vom DDAC-C10 vorläufig identifiziert. Die Entstehung dieser Transformationsprodukte ist aus der Literatur [9] bekannt und die entsprechenden Analoga wurden auch in den in-vitro Metabolismusstudien von Didodecyldimethylammonium gefunden (s. Abschnitt 5 Aufbau einer Metabolitendatenbank). Allerdings wurden diese Substanzen bisher in Umweltstudien nicht berücksichtigt und es sind auch keine Standards kommerziell verfügbar. Durch das Screening konnte nun gezeigt werden, dass eine nähere Betrachtung der Belastung von Schwebstoffen mit diesen Transformationsprodukten in Zukunft lohnenswert sein könnte.

**Tabelle 8: Massensignale mit hoher Korrelation zu DDAC-C10**

m/z	RT [min]	R <sup>a</sup>	Summenformel	Name	Identifizierung
326.378	13.4		C <sub>22</sub> H <sub>48</sub> N	DDAC-C10	BfG-Datenbank
284.3306	12.8	0.85	C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> N	Trimethylhexadecyl	BfG-Datenbank
312.3615	14	0.86	C <sub>21</sub> H <sub>46</sub> N	Trimethyloctadecyl	BfG-Datenbank
369.3829	13.3	0.86			
270.3142	12.7	0.91	C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> N	DDAC-C8	BfG-Datenbank
342.3722	10.8	0.97	C <sub>22</sub> H <sub>48</sub> NO	DDAC-C10-OH	exakte Masse
544.3385	13.5	0.80			

m/z	RT [min]	R <sup>a</sup>	Summenformel	Name	Identifizierung
370.366	14.9	0.87	C23H48NO2	<u>N,N-Didecyl-2-hydroxypropanamide</u>	über exakte Masse
282.2779	11.3	0.82	C18H36NO	Ölsäureamid	über exakte Masse
342.372	10.9	0.91	C22H48NO	DDAC-C10-OH	exakte Masse
304.2984	13	0.85	C21H38N	Cetylpyridinium	BfG-Datenbank
342.3718	11.1	0.83	C22H48NO	DDAC-C10-OH	exakte Masse
370.3858	13.3	0.85			
328.3195	11.9	0.83	C20H42NO2	DDAC-C10-Carbonsäure-C2H4	exakte Masse
340.3563	11.1	0.90	C22H46NO	DDAC-C10-Carboxy	exakte Masse
340.3562	11.3	0.86	C22H46NO	DDAC-C10-Carboxy	exakte Masse
325.3777	13.4	0.93	C22H47N		
342.3717	11.9	0.87	C22H48NO	DDAC-C10-OH	exakte Masse
342.3715	11.3	0.89	C22H48NO	DDAC-C10-OH	exakte Masse
340.3557	12.1	0.87	C22H46NO	DDAC-C10-Carboxy	exakte Masse
286.3364	12.8	0.85			
340.3192	12.4	0.83	C22H46NO	DDAC-C10-Carboxy	exakte Masse
245.1844	5.5	0.83			
214.2513	11	0.86			
245.1841	5.3	0.81			
253.2623	10.9	0.89			
329.3869	13.4	0.91			
281.2935	12.1	0.84			
322.3091	12.4	0.82			

a Pearson-Korrelationskoeffizient

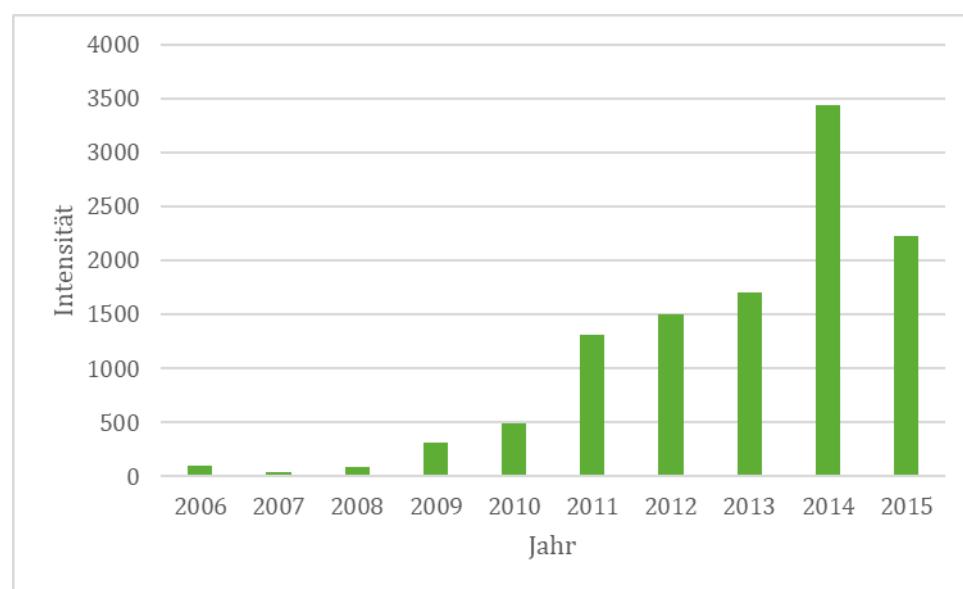
### 3.3.3 Standortbezogene Datenauswertung

Neben Zeitreihen lassen sich auch vergleichende Analysen verschiedener Probenahmestandorte durchführen: So wurden Schwebstoffe aus dem Jahr 2018 entlang der Elbe (Zehren, Prossen und Cumlosen) verglichen und nach Signalen gesucht, die flussabwärts der stark industriell geprägten Zuflüsse Mulde und Saale in der Elbe nachweisbar sind. Dazu wurde für jedes Massensignal der Quotient aus der minimalen Intensität am Standort Cumlosen und der maximalen Intensität über die Standorte Prossen und Zehren gebildet. Tabelle 9 zeigt die Massensignale mit den zehn höchsten Quotienten. Zur Verifizierung und Eingrenzung der Quellen wurde nach diesen Massen in den Schwebstoffproben von den Standorten Dessau (Mulde) und Wettin (Saale) gesucht. Von den zehn Massensignalen konnte eines über die BfG-Spektrendatenbank als Tetrabutylphosphonium identifiziert werden. Als Quelle wurde wie bereits in Brand et al. 2017[10] beschrieben die Saale identifiziert. Das Massensignal mit dem höchsten Quotienten ( $m/z$  372,19, Doppelpeak bei RT=9,8 min und 10,0 min) war nur in den Proben aus Cumlosen nachweisbar. Die Quelle muss folglich an der Elbe oder kleineren Zuflüsse nach Zehren oder in der Saale hinter Wettin lokalisiert sein. In Proben von anderen Flüssen (Rhein, Saar und Donau) ist das Signal nicht detektierbar, während für den Standort Barby ein steigender Trend ab dem Jahr 2009 erkennbar ist (s. Abbildung 17). Zur Identifizierung der unbekannten Substanz werden dieselben Schritte durchgeführt wie bereits oben beschrieben. Neben dem Hauptsignal ( $m/z$  372,19) und dem  $^{13}\text{C}$ -Signal ( $m/z$  373,19) wurde noch ein um zwei Dalton erhöhtes Signal (375,19) detektiert. Dies deutet stark auf das Vorhandensein eines Chloratoms im Molekül hin. Die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -Signals ergab eine Kohlenstoffanzahl von 23-24 Kohlenstoffatomen. Über die exakte Masse lässt sich  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClFN}$  als mögliche Summenformel berechnen. Für die Fragmente im  $\text{MS}^2$ -Spektrum können wieder mögliche Summenformeln berechnet werden (s. Tabelle 10). Auch hier ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Strukturen, so dass eine Identifizierung der Substanz mit den derzeit vorliegenden Informationen nicht möglich ist. Auch in diesem Fall müsste eine größere Menge der Substanz für weitere Analysen präparativ aus Umweltproben gewonnen werden.

**Tabelle 9: Massensignale mit größtem Zuwachs zwischen Prossen/Zehren und Cumlosen**

<b><math>m/z</math></b>	<b>RT [min]</b>	<b>Zehren</b>	<b>Prossen</b>	<b>Cumlosen</b>	<b>Dessau</b>	<b>Wettin</b>	<b>Quotient</b>	<b>Name</b>
372.1883	9.77	1	1	1526	11	1	1503	unbekannt
336.3248	16.76	1	1	1406	109	55	979	unbekannt
291.1926	14.05	1	1	978	47	1	972	unbekannt
372.188	10.04	1	1	960	1	1	960	unbekannt
498.2816	8.83	1	1	770	560	1	720	unbekannt
481.3149	18.19	1	1	640	45	1	625	unbekannt
259.2542	9.91	1	13	8899	45	8571	597	Tetrabutylphosphonium
374.1863	9.77	1	1	534	1	1	529	unbekannt
488.3572	13.01	1	1	527	1	1	492	unbekannt
537.2654	13.22	1	1	499	476	1	445	unbekannt

**Abbildung 17: Zeitlicher Intensitätsverlauf des Massensignals m/z 372,18 RT=9,8 min für den Standort Barby (Elbe)**



Quelle: eigene Abbildung BfG

**Tabelle 10: Mögliche Summenformeln der Fragmente im MS<sup>2</sup>-Spektrum von m/z 372,18**

m/z	Summenformel	PPM-Abweichung
372,1871	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> ClFN	5
245,0507	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF	9
210,0816	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> F	11
149,0126	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl	18
133,0428	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> F	-24
126,1351	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N	21

## 4 Anwendungsbeispiele für Biotaproben (LC-HRMS)

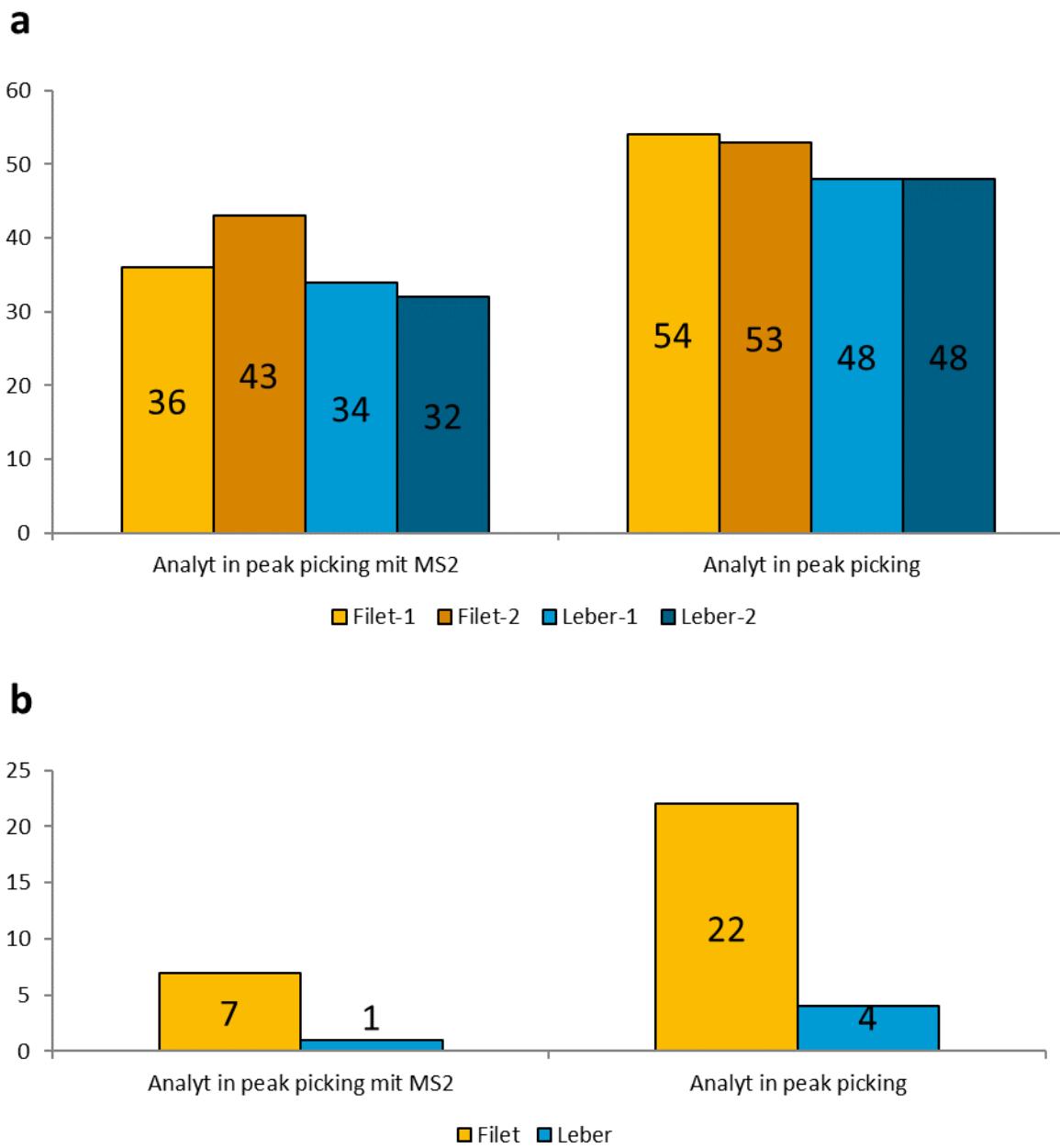
Biotaproben stellen eine äußerst komplex zusammengesetzte Matrix dar, die hohe Ansprüche an die Analysenmethoden stellt. Natürliche Bestandteile wie Proteine, Peptide, Lipide und Kohlenhydrate übertreffen die für das Screening interessanten Xenobiotika zahlen- und mengenmäßig bei weitem. Daher ist das Herausfiltern von Messsignalen, die von natürlichen Bestandteilen stammen, bei der Betrachtung von Biotaproben besonders wichtig. Hierfür ist eine genaue Kenntnis der Matrixzusammensetzung erforderlich. Eine Möglichkeit der Elimination von natürlichen Substanzen aus den ermittelten Substanzlisten ist die Analyse von Referenzproben aus einem unbelasteten Gebiet. Als Beispiel wurden Brassen aus dem Stechlinsee als unbelastete Referenz für die Analyse von Brassen aus dem vergleichsweise sehr stark mit Abwasser belasteten Teltow Kanal verwendet. Zunächst wurde die Leistungsfähigkeit der Screeningmethoden durch die Analyse von dotierten Proben ermittelt. Im Anschluss wurde das Screening auf undotierte Proben angewendet.

### 4.1 Erfassung dotierter Substanzen durch automatische Peakerkennung

Eine wichtige Methodenkenngröße von Non-Target-Methoden ist die Rate der richtig erfassten Substanzen. Daher wurde in Dotierungsexperimenten die Anzahl der Substanzen, die durch die automatische Peakerkennung erfasst werden und für die  $MS^2$ -Spektren aufgenommen werden, ermittelt. Zu diesem Zweck wurden Leber und Filet Proben mit einer Mischung aus 63 Analyten in zwei Konzentrationsstufen (5 und 50 ng/g) dotiert.

Bei der mit 50 ng/g dotierten Probe konnte die Mehrheit der dotierten Substanzen sowohl in Filet als auch in Leber durch die automatische Peakerkennung wiedergefunden werden. Für die Hälfte der 63 Analyten wurde ein  $MS^2$ -Spektrum aufgenommen (Abbildung 13). Bei einer Dotierungsmenge von 5 ng/g wurden in der Filet Probe nur noch 22 Analyten automatisch erkannt und nur 1 in der Leberprobe. Für nur 7 Substanzen wurden in der Filet-Probe  $MS^2$ -Spektren aufgenommen, in der Leberprobe nur für eine Substanz. Die angewandte Screeningmethode eignet sich folglich für relativ hohe Konzentrationen (50 ng/g). Im umweltrelevanten Konzentrationsbereich (5 ng/g) werden allerdings die meisten Analyten nicht mehr erfasst. Durch das Fehlen von  $MS^2$ -Spektren ist zu dem die Identifizierung der erfassten Substanzen erschwert.

**Abbildung 18: Wiederfindungen durch automatische Peakerkennung in Dotierungsexperimenten a: 50 ng/g und b: 5 ng/g**



Quelle: eigene Abbildung BfG

Zur Einordnung der Leistungsfähigkeit der im Projekt entwickelten Methode wurden zusätzlich zu den selbstdurchgeführten Dotierungen die über den NORMAN CT NTS in biota Inter-Laborvergleich zur Verfügung gestellten Proben analysiert. Im Rahmen des Ringversuchs wurden drei Arten von Brassenproben untersucht: 1. Eine mit einem weitestgehend unbekannten Substanzmix dotierte Probe, 2. eine Probe aus einem stark belasteten Gewässer und 3. eine Probe aus einem unbelasteten Referenzgewässer. Diese Proben wurden mit der

bereits vorgestellten Extraktionsmethode aufgearbeitet und mittels LC-HRMS analysiert. Zunächst wurde in dem Datensatz der dotierten Probe und der Referenzprobe eine automatisierte Peakerkennung durchgeführt und sämtliche Signale, deren Intensität nicht mindestens zehnmal so hoch war wie die entsprechenden Signale in der Referenzprobe, aus dem Datensatz entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Signale herausgefiltert, die in allen drei analysierten Replikaten gefunden wurden. Dieser reduzierte Datensatz wurde mittels Data Base Assisted Screening auf anthropogene Stoffe untersucht. Für den Abgleich kamen folgende Datenbanken zum Einsatz: BfG interne Spektrendatenbank, mzcloud, massbank, massbank of North America und Metfrag. Über die Datenbanksuche konnten die vier vom Ringversuchsveranstalter im Vorfeld genannten Substanzen (Ifosfamide, Mebendazol, Glybenclamide, 4-Amino-6-(trifluoromethyl)benzene-1,3-disulfonamide) wiedergefunden werden. Weitere 13 Xenobiotika konnten über die entsprechenden MS<sup>2</sup>-Spektren identifiziert werden. Somit konnten insgesamt 17 der 32 gespikten Substanzen wiedergefunden werden. Dieser Wert liegt über alle teilgenommenen Labore betrachtet im mittleren Bereich. Die dotierten Konzentrationen waren mit 50 µg/L im Extrakt relativ hoch und spiegeln daher nur bedingt ein realistisches Belastungsszenario wider.

## 4.2 Screening in einer unbekannten Fischprobe (LC-HRMS)

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Methode auf reale Umweltproben, wurden undotierte Fischproben aus einem belasteten Gewässer untersucht. Diese wurden sowohl mit der im Zuge dieses Projektes entwickelten Extraktionsmethode und mit einer Referenz Methode der schwedischen Agraruniversität (SLU) (Dürig et al., 2020[11] ) extrahiert. Der Unterschied zur an der BfG eingesetzten Methode liegt im Clean-Up. Bei der SLU-Methode werden störende Fette und Proteine ausgefroren, während diese bei der BfG-Methode durch eine Extraktion mit Heptan und durch die Aufreinigung über die RAM entfernt werden. Die aufwendigere Aufreinigung in der BfG-Methode könnte zu einer Diskriminierung von eher unpolaren Substanzen führen. Nach der automatischen Peakerkennung und Bereinigung des Datensatzes durch Abzug der Referenzstelle und Konsolidierung der Replikate wurde ein Data Base Assisted Screening mit der BfG Spektrendatenbank durchgeführt. Dieses lieferte mit N-Benzylidimethylstearylammnonium nur einen positiven Befund im Extrakt der Referenzmethode. Diese Substanz wurde von keinem anderen teilnehmenden Labor gefunden.

Zur Identifizierung von anthropogenen Stoffen wurde zudem spezifisch nach Signalen, die das typische Chlor- bzw. Bromisotopenmuster aufweisen, gesucht. Es konnten mittels LC-HRMS keine Verbindungen mit Bromisotopenmuster identifiziert werden und alle Chlor enthaltenen Signale waren ebenfalls in der unbelasteten Referenzprobe enthalten.

Über ein Unknown-Screening wurden Signale, die in der belasteten Probe deutlich höhere Intensitäten zeigten als in der unbelasteten Referenzprobe, priorisiert. Die 50 intensivsten Signale, die mit beiden Extraktionsmethoden (BfG und SLU Referenzmethode) gefunden wurden, wurden mit weiteren Datenbanken wie m/z Cloud, MassBank of North America und Mass-Bank verglichen. Zusätzlich wurde nach vergleichbaren MS<sup>2</sup> Spektren in Metfrag gesucht. 13 Features konnten anhand der charakteristischen Fragmente 86.09 und 184.07 als Phosphatidylcholine bzw. allgemein als Phospholipide identifiziert werden. 9 wurden als weitere natürliche Biomoleküle wie Gallensäurederivate identifiziert. Für 21 wurde kein MS<sup>2</sup> aufgenommen und 7 weitere konnten gar nicht identifiziert werden.

Anschließend wurden die Proben einzeln betrachtet. Die 200 intensivsten Signale (nach Abzug der Referenzstelle) von jeder Probe wurden priorisiert, wobei diejenigen Signale, für die kein MS<sup>2</sup>-Spektrum aufgenommen wurde und diejenigen, die auf dem ersten Blick als natürliche

Stoffe identifiziert werden konnten, nicht betrachtet wurden. Diese priorisierten Signale wurden mit den Datenbank m/z Cloud, MassBank of North America und Metlin sowie der In-Silico Datenbank Metfrag abgeglichen. Dadurch konnten in der mit der Referenzmethode bearbeiteten Probe drei Umweltkontaminanten identifiziert werden, nämlich Galaxolidon, Tonalid und N-Benzylidimethylstearylammmonium. Das Galaxolidon wurde auch von drei anderen Laboren gefunden. In dieser Probe waren die identifizierten natürlichen Stoffe hauptsächlich Fettsäuren und Phosphatidylcholine. Bei den mit der BfG-Methode bearbeiteten Proben wurden keine anthropogenen Stoffe identifiziert. Es konnten allerdings viele endogene Stoffe identifiziert werden, insbesondere Peptide, einige Guaninderivate und ein Prostaglandin Metabolit. Für diese Probe wurde anschließend versucht, sich auf die Signale mit Masse unter 500 Da zu fokussieren. Dabei konnte eine Substanz als Methamphetamine Derivat identifiziert werden, die möglicherweise dem Amfepentorex entspricht (kein Referenzspektrum). Die Aufhebung der Intensitätspriorisierung führte allerdings zu vielen MS<sup>2</sup>-Spektren die der simultanen Fragmentierung von mehreren Parent Ionen entsprechen, was deren Identifizierung beinah unmöglich machte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der mit der BfG-Methode und mit der SLU-Referenzmethode erfasste Polaritätsbereich sich deutlich unterscheidet. Die Referenzmethode extrahiert vor allem apolare Substanzen (Fettsäure, Phosphatidylcholine). Apolare Umweltkontaminanten haben ein höheres Bioakkumulationspotential und zeigen entsprechend in der Regel höhere Konzentrationen. In Folge dessen konnten mehrere Umweltkontaminanten mit dieser Methode identifiziert werden. Die BfG-Methode hingegen basiert auf einer Methode für Arzneimittelwirkstoffe und ist daher eher auf polare Analyte fokussiert, deren Konzentrationen sich in Fisch als sehr gering erwiesen haben. Entsprechend liefert der Data dependent analysis (DDA) Mode nur in wenigen Fällen brauchbare MS<sup>2</sup>-Spektren. Für eine erfolgreiche Identifizierung von Schadstoffen in diesen Extrakten ist folglich eine Optimierung der Datengenerierung notwendig.

### 4.3 Optimierungsansätze

Das Anwendungsbeispiel hat gezeigt, dass das Screening grundsätzlich funktioniert, wie die hohe Anzahl ermittelter Substanzen und aufgenommener MS<sup>2</sup>-Spektren für die mit 50 ng/g dotierten Fischproben und die Identifizierung der dotierten Substanzen in der dotierten Probe vom Norman Ring Versuch gezeigt haben. Allerdings offenbart die niedrige Anzahl ermittelter Substanzen und aufgenommener MS<sup>2</sup> in den mit 5 ng/g dotierten Fischproben und die Schwierigkeiten Schadstoffe in undotierten Fischproben zu finden eine starke Limitierung der Methodik bezüglich geringer Schadstoffkonzentrationen. Dies bestätigt auch eine erste Auswertung des Ringversuchs. In den nicht dotierten Proben wurden gerade einmal sechs Substanzen von 2-3 Laboren gefunden. Ansonsten handelte es sich bei den Funden immer um Einzelnachweise einzelner Labore. Die Ursache liegt vermutlich in der großen Schwierigkeit die niedrigkonzentrierten Schadstoffe zwischen der immensen Anzahl natürlicher Substanzen zu finden. Hier können kleine Unterschiede in der Probenvorbereitung oder in der chromatografischen Trennung oder auch der Zufall dazu führen, dass eine Substanz mal erkannt wird und mal nicht.

Die zwei Hauptlimitierungen der hier vorgestellten Methode sind folgende:

- ▶ Aufgrund der erhöhten Bestimmungsgrenzen von TOF-Systemen im Vergleich zu Tandemmassenspektrometern ist die Methodik in vielen Fällen nicht empfindlich genug, um die niedrigen Konzentrationen der polaren Schadstoffe in der komplexen Matrix Fisch nachweisen zu können.

- Bedingt durch die Datenaufnahme im sogenannten Ion Dependent Acquisition Mode werden pro Messzyklus nur  $MS^2$  Spektren für die 8 intensivsten Massen aufgenommen. Durch die hohe Anzahl von co-extrahierten natürlichen Substanzen (wie z.B. Phosphorylcholine und Phospholipide) und deren im Vergleich zu den anthropogenen Schadstoffen viel höheren Konzentrationen werden hauptsächlich  $MS^2$  Spektren von diesen natürlichen Verbindungen aufgenommen. Als Konsequenz werden für die anthropogenen Verbindungen keine  $MS^2$  Spektren aufgezeichnet, was die Identifizierung deutlich erschwert.

Eine Lösung dieser Problematik wäre eine starke Abreicherung der natürlichen Substanzen im Zuge der Probenvorbereitung. Dies würde allerdings irgendeine Art von Selektion voraussetzen, die eine Abkehr vom Grundprinzip der universellen Erfassung sämtlicher Substanzen in einem Screening-Ansatz hin zu auf bestimmte Substanzklassen bzw. Fragestellungen zugeschnittene methodische Ansätze bedeuten würde. Löst man sich von diesem Grundprinzip, dann wäre es bspw. möglich, die größere chemische Stabilität bestimmter anthropogener Substanzen auszunutzen und die natürlichen Substanzen durch eine der Analytik vorangeschaltete Chemolyse aus dem Probenextrakt entfernen. Ein Beispiel wäre hier die Bestimmung von halogenierten Verbindungen wie PCBs oder PBDEs nach einem Clean-Up mittels mit  $H_2SO_4$  beladenem Kieselgel.

Ein anderer Ansatz wäre die Verbesserung der Aufnahmerate von  $MS^2$ -Spektren von niedrigkonzentrierten anthropogenen Stoffen. Dazu bieten sich zwei verschiedene Ansätze an: 1.) die Exklusion von natürlichen Stoffen über eine Ausschlussliste und 2.) die Verwendung des so genannten Data Independent Analyse Messmodus.

#### **4.3.1 Lösungsstrategie 1: Exklusion von natürlichen Stoffen**

Bei der Auswahl der Massen für die Aufnahme eines  $MS^2$ -Spektrum werden in der Regel die intensivsten Signale berücksichtigt. Allerdings können ausgewählte Massen im Vorfeld der Analyse generell ausgeschlossen werden. Es wurde eine Ausschlussliste erstellt, d.h. eine Liste von Massensignalen mit dazugehörigen Retentionszeiten, die bei der Auswahl der Massen, für die  $MS^2$ -Spektren aufgezeichnet werden, nicht berücksichtigt werden. Diese Ausschlussliste wurde anhand der ermittelten Daten aus der unbelasteten Referenzprobe erzeugt. Davon wurden die 20.000 Features mit der höchsten Intensität priorisiert, da die originale Liste (mehr als 80.000 Features) zu lang für die Software war.

Eine Wiederholung der Messung der mit 5 ng/g dotierten Probe mit dieser Ausschlussliste führte zu derselben Anzahl aufgenommen  $MS^2$  wie vorher. Die Erklärung dafür ist wahrscheinlich, dass die  $MS^2$ -Exklusion nur über die vom Quadrupol aufgelöste  $MS^1$ -Masse durchgeführt werden kann, d.h. über einen „sehr breiten“  $MS^1$ -Bereich (ungefähr  $\pm 0.1$  Da). Des Weiteren erfolgt die zeitliche Steuerung in relativ großen Zeitfenstern von 60 s. Dies führte dazu, dass für eine Vielzahl von Massen, die eigentlich nicht ausgeschlossen werden sollten, kein  $MS^2$ -Spektrum aufgenommen wurde. Dies verdeutlicht die Komplexität von Biotaproben und die damit einhergehenden Herausforderungen für die Analytik von Spurenstoffen in diesen.

#### **4.3.2 Lösungsstrategie 2: Ion independent Analyse**

Die andere Alternative, um die Aufnahmerate von  $MS^2$ -Spektren zu erhöhen, stellt die Nutzung des so genannten Data Independent Analyse Messmodus dar. In diesem Messmodus findet für die Aufnahme von  $MS^2$ -Spektren keine Vorauswahl der Ionenmassen durch den Quadropolmassenfilter statt. Viel mehr werden sämtliche, zu einem bestimmten Zeitpunkt

gebildeten Ionen, in die Stoßzelle überführt und dort fragmentiert. Die erhaltenen  $MS^2$ -Spektren enthalten somit Fragmentmassen aller zu einem Zeitpunkt eluierender Substanzen. Es gehen somit keine Informationen verloren, allerdings können die Fragmente nicht ohne weiteres ihrer Ausgangsmasse zugeordnet werden. Dies muss durch einen zusätzlichen Dekonvolutionsschritt während der Datenverarbeitung erfolgen.

SWATH ist eine Form von Data Independent Analyse, bei welcher die Fragmentierung in mehrere MS1-Massensfenster von typischerweise 50-100 Da durchgeführt wird. Entsprechend werden alle Ionen fragmentiert, aber es werden weniger Substanzen simultan fragmentiert als in klassischer Data Independent Acquisition Mode, was die Interpretation der Daten vereinfacht.

#### 4.3.2.1 Evaluierung

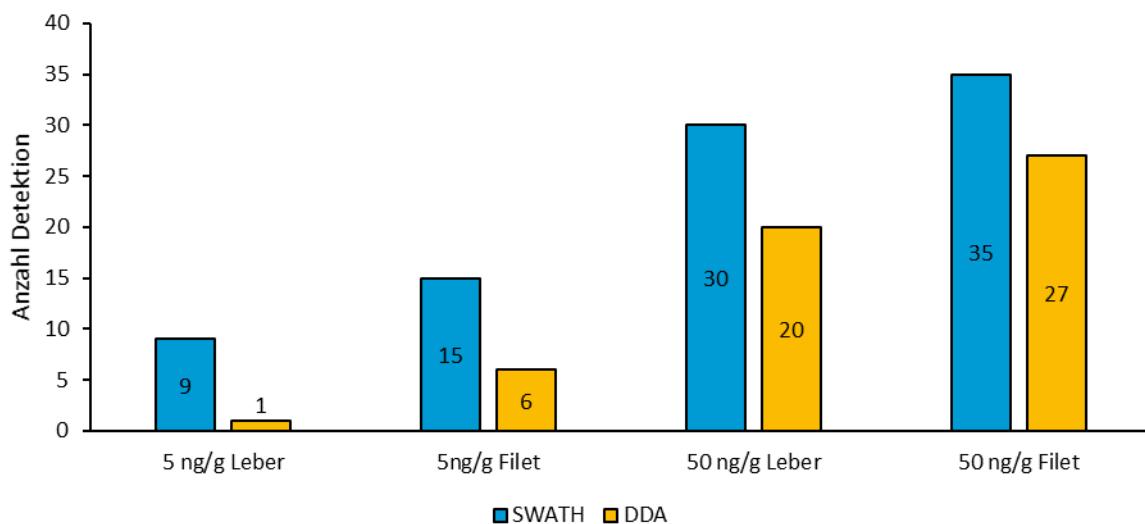
Um den Ansatz zu testen wurde zuerst ein detaillierter Vergleich zwischen Data Dependent Acquisition (DDA) und SWATH bezüglich Wiederfindungsraten in dotierten Filet- und Leberproben durchgeführt. Die dafür definierten Kriterien für die Substanzerfassung und -identifizierung sind in der Tabelle 11 zusammengefasst. Bei der DDA erfolgte die Peakidentifizierung über die  $MS^1$ -Masse und einem Abgleich der aufgezeichneten  $MS^2$ -Spektren mit der Datenbank. Im Fall von SWATH wurde bei der Retentionszeit von Peaks mit entsprechender  $MS^1$ -Masse in der  $MS^2$ -Spur nach den zwei intensivsten Peaks aus dem  $MS^2$ -Spektrum aus der Datenbank gesucht.

**Tabelle 11: Kriterien für die Substanzerfassung und -identifizierung für beide Aufnahmemethoden**

Data Dependent Acquisition (DDA)	SWATH
Peakerkennung: $S/N=2$ , $Min(I)=1$ , Noise Scan=100) mit $RT\pm 0.5\text{min}$ , Masse $\pm 0.005$ Identifizierung: Übereinstimmung mit $MS^2$ in der Spektrendatenbank $S/N$ 10 Mal höher als in Blindprobe	Peakerkennung: $MS^1$ Masse ( $\pm 0.005$ , $RT\pm 0.5\text{min}$ ) mit $S/N>2$ Identifizierung: zwei intensivsten Fragmente aus der Spektrendatenbank in $MS^2$ vorhanden ( $S/N>2$ ; Masse $\pm 0.01$ ; $RT\pm 0.5\text{min}$ ); $S/N$ 10 Mal höher als in Blindprobe

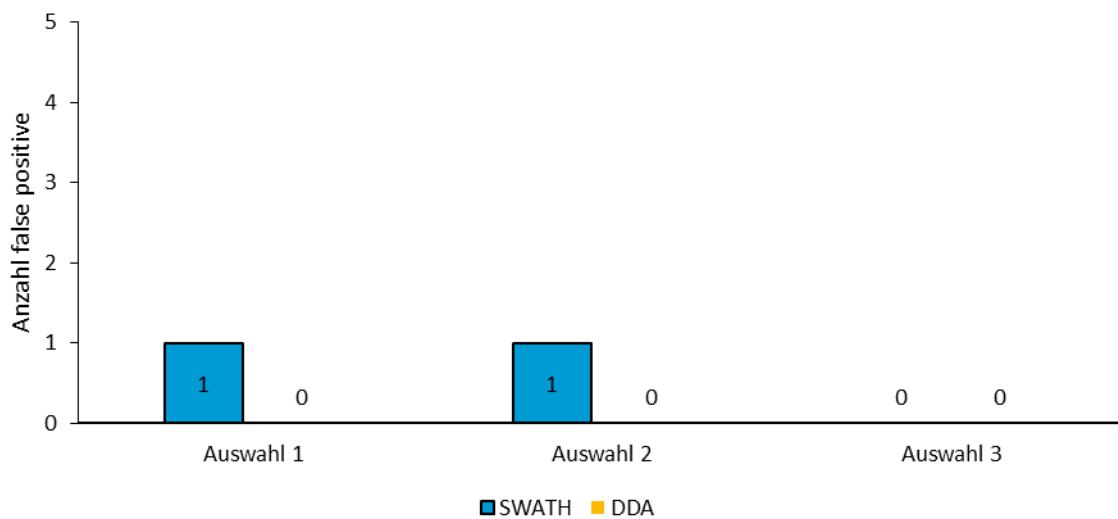
Durch die Verwendung von SWATH für die Aufnahme der MS-Daten konnte die Detektionsrate erhöht werden. Einen besonders starken Effekt zeigte sich bei der niedrig konzentrierten Probe (5 ng/g) (Abbildung 19). Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Evaluierung einer Non-Target Methode ist die Anzahl an *false positives*, d.h. die Anzahl vermeintlicher Substanzen, die fälschlicherweise als detektiert gelten. Es ist generell eine Herausforderung die Anzahl der *false positives* in den Umweltproben zu bestimmen, da Proben nie absolut sicher frei von Kontamination sind. In diesem Fall wurden die Referenzprobe aus dem Stechlinsee als vergleichsweise gering mit anthropogenen Substanzen belastet betrachtet, die aus industriellen und kommunalen Kläranalagen stammen. Es wurden drei zufällige Auswahlen von je 100 Substanzen der Spektrendatenbank getroffen. Anschließend wurde deren Vorkommen in den Proben anhand der in die Tabelle 11 beschriebenen Kriterien evaluiert. Insgesamt wurden nur zwei *false positives* mit der SWATH Methode und kein *false positive* mit der DDA Acquisition Mode bestimmt (Abbildung 20). Beide *false positives* hatten Retentionszeit in der Nähe der Totzeit (2.1 und 2.2 min). Entsprechend eignet sich SWATH für die Untersuchung von Fischproben mit der Einschränkung, dass Detektionen in der Nähe der Totzeit mit Vorsicht interpretiert werden sollten.

**Abbildung 19: Anzahl der Detektionen in dotierten Filet- und Leberproben für verschiedene Aufnahmemethoden (SWATH und DDA) und Dotierungslevel (5 ng/g und 50 ng/g)**



Quelle: eigene Abbildung BfG

**Abbildung 20: Anzahl false positive für verschiedene Aufnahmemethoden (SWATH und DDA) und drei verschiedene Testsets**



Quelle: eigene Abbildung BfG

#### 4.3.2.2 Anwendung

Die SWATH-Aufnahmemethode wurde zur Untersuchung von Brassen-Filet und Leber aus dem Teltowkanal und Karpfenfilet aus einem Bioakkumulationsteich einer Kläranlage angewendet. Dabei wurde das Databank assisted-Screening auf alle Verbindungen der BfG-internen Spektrendatenbank mit  $m/z > 100$  in positiv Mode (800 Substanzen) durchgeführt. In den Proben aus dem Teltowkanal konnten mit Diclofenaclactam (Metabolit von Diclofenac), Terbutryl (ein Herbizid), 2-Hydroxy-N-phenylpropanamide, Methyl-N-(3-aminophenyl)carbamate und 1-(3,4-Dichlorophenyl)urea und Flecainid sechs anthropogene Stoffe detektiert werden. Ein anfänglicher positiver Befund von 2-Oxaspiro[4.5]decan-3-one stellte sich als falsch heraus. Auf Grund von verdächtig hohen Intensitäten

Wurde das entsprechende Signal genauer untersucht. Im DDA Mode und mittels manuellen Vergleiches der Massenspektren mit Referenzspektren konnte die Verbindung schließlich als Fettsäure identifiziert werden.

Zwei weitere Stoffe (Atrazine-desisopropyl-2-hydroxy und Ganciclovir) wurden mit einer Retentionszeit nahe der Totzeit detektiert, deren Identität durch die Anwendung einer geeigneteren Chromatographie bestätigt werden sollte.

Sieben weitere anthropogene Substanzen konnten in mindestens einem der Karpfenfilets aus dem Kläranlagenbioakkumulationsteich detektiert werden: Ambroxol (Schleimlöser), 10-Hydroxycarbamazepine und Acridine-9-carboxylic acid (Metaboliten von Carbamazepin), Tramadol und sein Metabolit O-desmethyl-Tramadol, Lamotrigine (Antiepileptika) und Prometryn (Herbizid). Zwei weitere Stoffe wurden nahe der Totzeit (Adefovir und Gemcitabine) detektiert, deren Identität ebenfalls bestätigt werden sollte.

Die Anwendung der SWATH Methode erlaubte die Detektion einiger Analyten in den mit der BfG-Methode aufgearbeiteten Fischextrakten. Allerdings wurden alle detektierten Analyten in Konzentrationen nahe ihrer Bestimmungsgrenzen gefunden. Dies bestätigt erneut die eingeschränkte Anwendbarkeit von Screeningmethoden für in Fischproben in niedrigen Konzentrationen vorkommende Umweltkontaminanten.

#### 4.3.2.3 Perspektive

SWATH stellt eine interessante Alternative zu DDA im Rahmen der Untersuchung komplexer Matrices dar, da durch diese Messmethode die starke Limitierung durch eine begrenzte Anzahl aufgenommener  $MS^2$  entfällt. SWATH konnte für das Suspect-Screening erfolgreich implementiert werden. Allerdings ist noch weitere Entwicklungsarbeit notwendig, um das Suspect-Screening in SWATH-Daten zu automatisieren. Des Weiteren erfordert die Implementierung von SWATH für das NT-Screening die Entwicklung passender Software-Lösungen, insbesondere bezüglich der Dekonvolution der  $MS^2$ -Daten.

## 5 Aufbau einer Metabolitendatenbank

Nach der Aufnahme in den Organismus unterliegen die meisten Xenobiotika einem metabolischen Um- bzw. Abbau. Im Falle eines schnellen und umfassenden Umbaus kann dies zu einer nicht Erfassung von z.B. Arzneimittelwirkstoffen in Biota führen. In diesen Fällen ist eine Bestimmung der Metabolite vorteilhaft gegenüber der Bestimmung der Ausgangssubstanzen. Daher ist für das Schadstoff-Screening in Biota die Verwendung einer Metabolitendatenbank empfehlenswert. Allerdings stehen für die wenigsten Schadstoffe umfangreiche Metabolisierungsdaten zur Verfügung. Wenn diese Daten zur Verfügung stehen, handelt es sich außerdem meistens um menschliche Metabolismusdaten, die sich vom Fischmetabolismus signifikant unterscheiden können, da z.B. Fische weniger Formen des Enzyms Cytochrom P450 als der Mensch besitzen[12]. Zudem sind nicht sämtliche Metaboliten als Referenzstandards kommerziell verfügbar. Daher wurde zum Aufbau einer Metabolitendatenbank ein Protokoll für die Durchführung von in-vitro Metabolismusversuchen etabliert. Bei diesem Ansatz werden ausgewählte Schadstoffe mit einem Fischleberextrakt inkubiert und im Anschluss die entstandenen Metabolite mittels LC-HRMS analysiert. Die Hauptmetaboliten werden identifiziert und Masse,  $MS^2$  und Retentionszeit in eine Datenbank aufgenommen.

### 5.1 Prinzip und Versuchsaufbau

Als Enzymquelle wurde die Leberfraktion S9 aus Forellen verwendet, da diese eine bessere Haltbarkeit und eine leichtere Handhabung aufweisen als intakte Leberzellen. Das Aufarbeitungsprotokoll wurde an die OECD Prüfrichtlinie 319B angelehnt. Erste Tests wurden mit Arzneimitteln durchgeführt, da für diese bereits die meisten Metabolismusdaten vorhanden waren. Insbesondere bei Venlafaxin wurde der Fischmetabolismus schon zumindest teilweise beschrieben[13].

Jeder Versuch wurde in Replikaten durchgeführt. Für die untersuchten Umweltkontaminanten wurde ein Suspect-Screening nach den in der Literatur beschriebenen Metaboliten und/oder nach Produkten typischer metabolischer Reaktionen durchgeführt. Außerdem wurde im Rahmen eines Non-Target-Screenings nach typischen Abspaltungen, Fragmenten und gegebenenfalls nach charakteristischen Isotopenmustern gesucht.

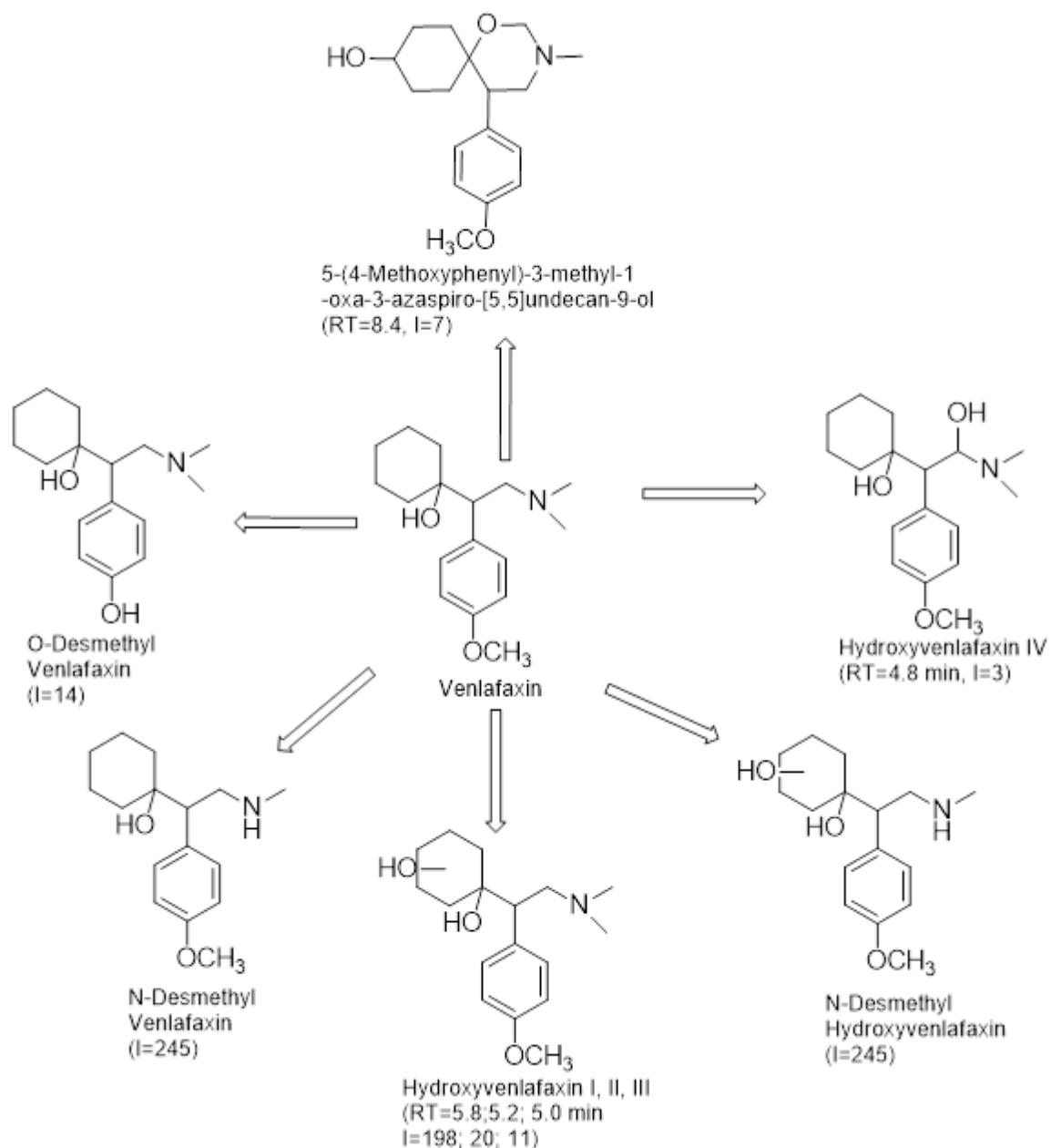
### 5.2 Ergebnisse

Es folgt eine detaillierte Beschreibung der identifizierten Metaboliten für die getesteten Umweltkontaminanten.

#### 5.2.1 Venlafaxin

Im Abbildung 21 werden die für Venlafaxin identifizierten Metaboliten dargestellt. N-Desmethyl-venlafaxin und eines der Hydroxy-Venlafaxin-Isomere zeigen von allen gebildeten Metaboliten die höchsten Intensitäten. Drei weitere Hydroxy-Venlafaxin Metaboliten konnten ebenfalls identifiziert werden. Die Interpretation des  $MS^2$  Spektrum zeigte, dass die Hydroxylierung am Cyclohexan Ring (3 Isomere) und in alpha-Stellung des Stickstoffes stattfinden. Es konnte auch ein hydroxylierter Metabolit von N-Desmethylvenlafaxin identifiziert werden.

Interessanterweise wurde O-Desmethylvenlafaxin, der menschliche Hauptmetabolit von Venlafaxin [14, 15], nur in geringen Mengen gebildet. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Burkina et al. [13], die in ihrer in-vitro Metabolismusstudie von Venlafaxin keine Bildung von O-Desmethylvenlafaxin festgestellt haben. Zusätzlich wurde 5-(4-Methoxyphenyl)-3-methyl-1-oxa-3-azaspiro-[5,5]undecan-9-ol als möglicher Nebenmetabolit identifiziert.

**Abbildung 21: Identifizierte Metaboliten für Venlafaxin**

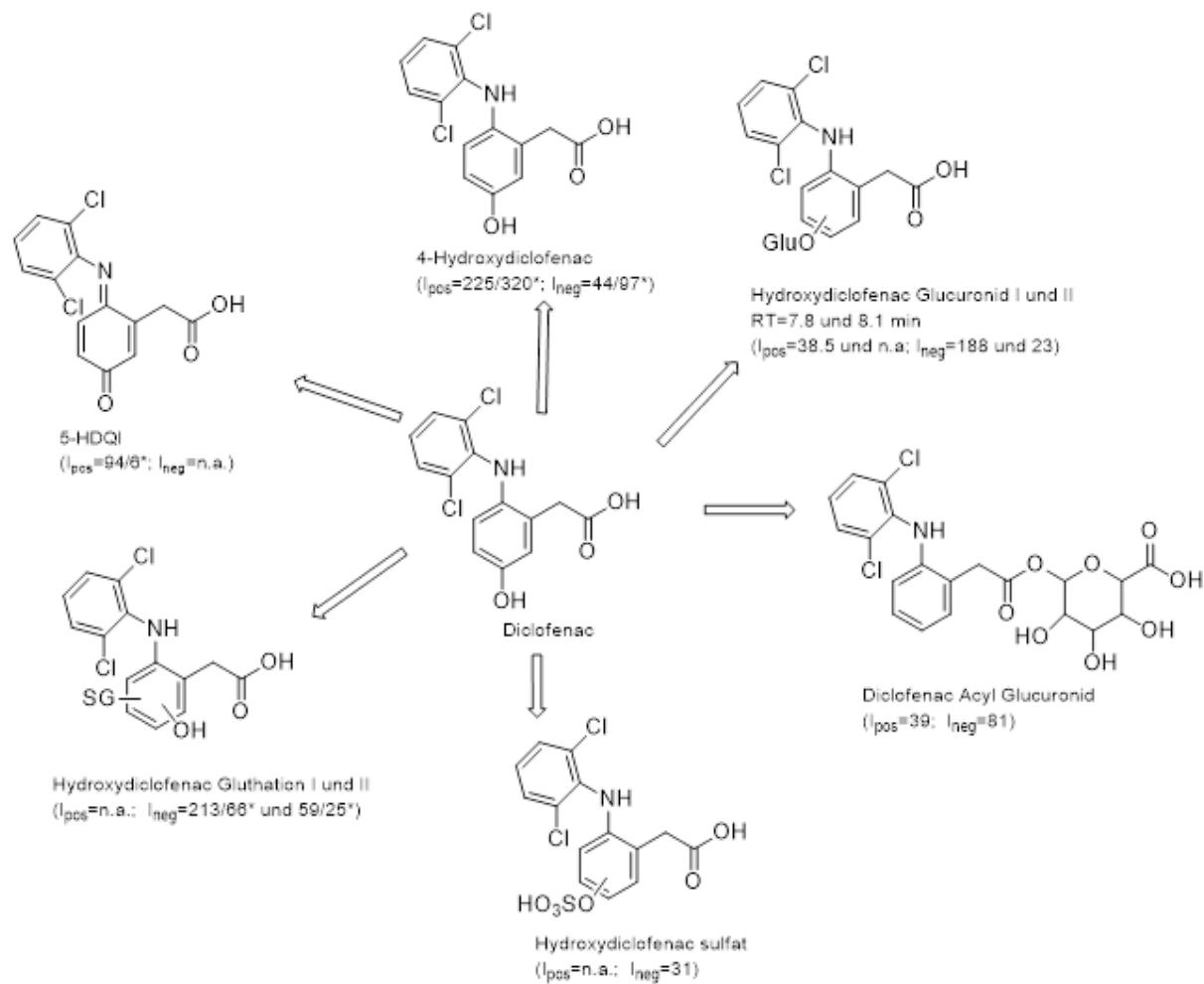
Quelle: eigene Abbildung BfG

### 5.2.2 Diclofenac

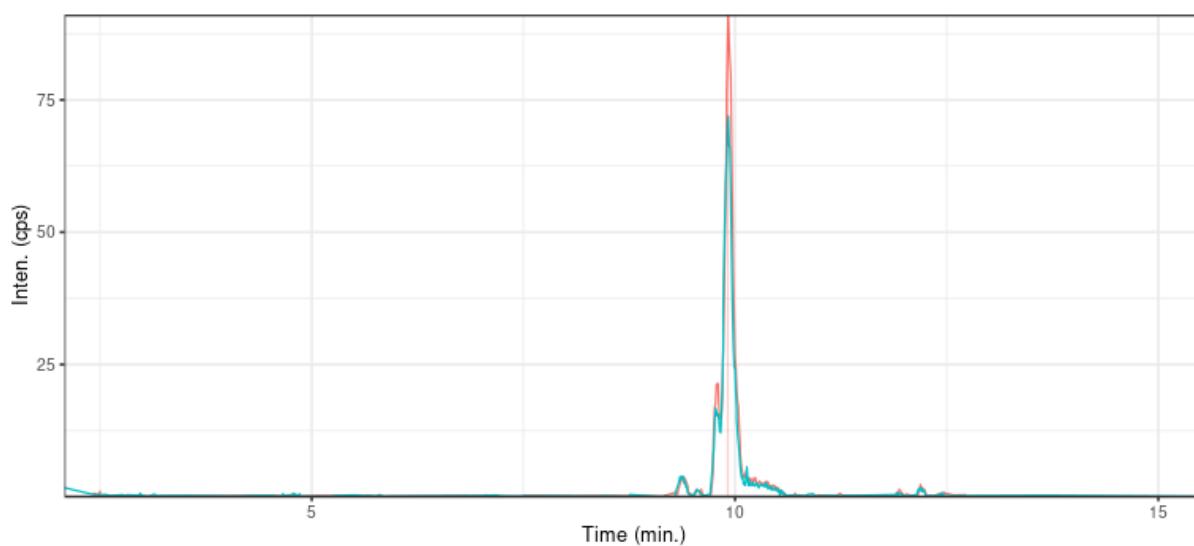
In Abbildung 22 werden die identifizierten Metaboliten von Diclofenac dargestellt. Bei Diclofenac konnten für mehrere Metaboliten bedeutende Unterschiede zwischen den Intensitäten für beide Replikate festgestellt werden, weswegen für die meisten Metaboliten die Intensität von beiden Replikaten erläutert werden. 4-Hydroxydiclofenac zeigte von allen detektierten Metaboliten die höchste Intensität. Als einziger anderer Phase I Metabolit wurde 5-HDQI (5-Hydroxydiclofenac-Quinone Imine) identifiziert, wobei dieser Metabolit extreme

Intensitätsunterschiede zwischen beiden Replikaten zeigte (94 gegen 6 cps). Beim Diclofenac-Metabolismus wurden mehrere Phase II Metaboliten gebildet. So wurde ein Glucuronid-Konjugat von Diclofenac identifiziert, es handelt sich vermutlich um 1-O-acylglucuronid Diclofenac. Die entsprechende isolierte Massenspur zeigt allerdings die Anwesenheit von anderen Isomeren (siehe Abbildung 23) für welche kein  $MS^2$ -Spektrum aufgenommen wurde und die vermutlich einer Umlagerung der Acylgruppe durch Migration entsprechen [16]. Es konnten auch zwei Hydroxydiclofenacglucuronid Konjugate identifiziert werden. Gemäß eines Referenz  $MS^2$  Spektrums aus der Literatur [17] handelt es sich um Ether-Glucuronide. Die Position der Hydroxylgruppe konnte nicht bestimmt werden. Des Weiteren konnte ein Hydroxydiclofenac Sulfat-Konjugat sowie zwei Gluthation Konjugate identifiziert werden. Die Funde verdeutlichen die Notwendigkeit einer Spaltung der Phase II Metaboliten für einen empfindlichen Nachweis von Schadstoffen bzw. deren Metaboliten in Biotaproben.

**Abbildung 22: Identifizierte Metaboliten für Diclofenac**



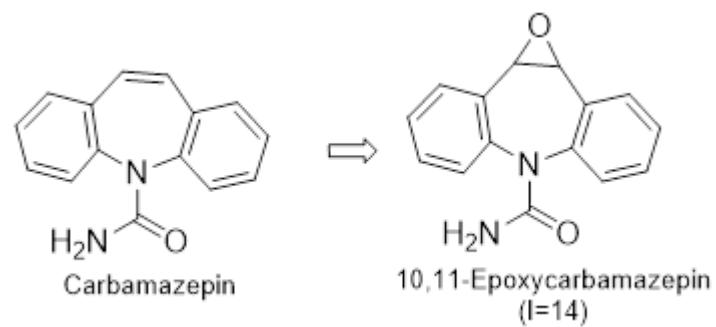
Quelle: eigene Abbildung BfG

**Abbildung 23: XIC von der Masse 472.05 entsprechend zum Diclofenac Glucuronid**

Quelle: eigene Abbildung BfG

### 5.2.3 Carbamazepin

Für Carbamazepin wurde nur ein Metabolit identifiziert, das 10,11-Epoxykarbamazepine und dieses weist nur eine geringe Intensität auf (s. Abbildung 24). Es ist ein Hinweis darauf, dass Carbamazepin weniger von Fisch als von Menschen metabolisiert wird. Im Menschen wird Carbamazepin zu 85% metabolisiert und es entstehen mindestens 14 Phase I Metaboliten sowie eine weitestgehende Glucuronidierung[18]. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Connors et al.[19] überein, die ebenfalls nur eine schwache Metabolisierung von Carbamazepin in der Leber Fraktion S9 von Fischen nachweisen konnten. Dies liegt vermutlich an einer schwachen Aktivität des Enzyms CYP3A4.

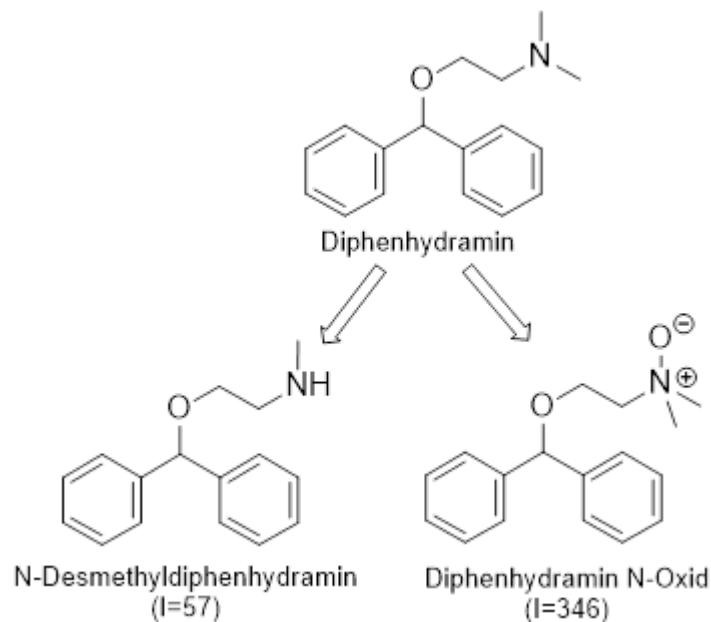
**Abbildung 24: Identifizierte Metaboliten für Carbamazepin**

Quelle: eigene Abbildung BfG

## 5.2.4 Diphenhydramin

Für Diphenhydramin wurden nur zwei Metaboliten identifiziert (Abbildung 25), N-Desmethyldiphenhydramin und Diphenhydramin N-Oxid, wobei letzteres eine deutlich höhere Intensität aufwies (s. Abbildung 25).

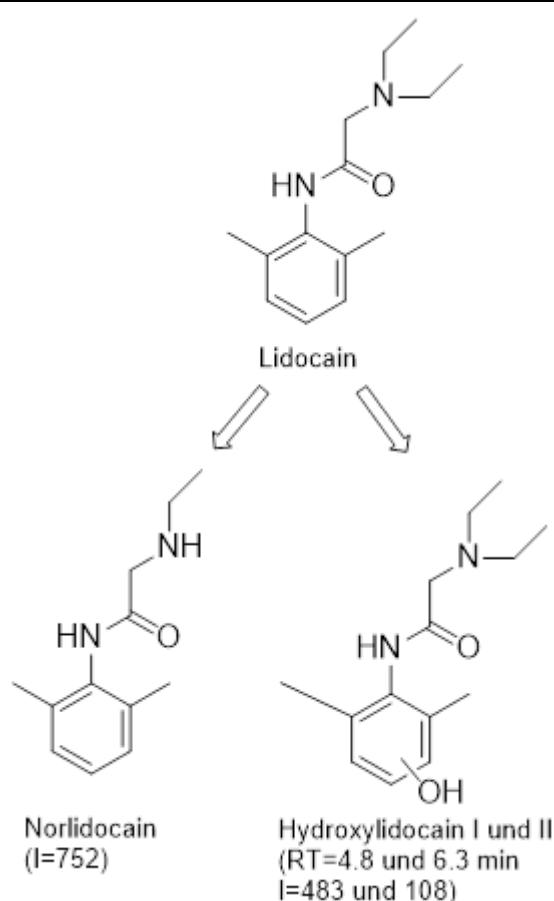
**Abbildung 25: Identifizierte Metaboliten für Diphenhydramin**



Quelle: eigene Abbildung BfG

## 5.2.5 Lidocain

Für Lidocain wurden drei Metaboliten identifiziert, die alle relativ hohe Intensität (>100) zeigen (s. Abbildung 26). Von denen weist Norlidocain, einer der menschlichen Hauptmetaboliten [20] die höchste Intensität auf. Die zwei weiteren identifizierten Metaboliten waren das 3-Hydroxylidocain und das 4-Hydroxylidocain. Beides sind als Metaboliten bekannt, die im Menschen [21] bzw. Pferd [22] gebildet werden und konnten nicht voneinander unterschieden werden, da die jeweiligen Referenzspektren fast identisch sind. Ein Abgleich der Retentionszeiten mit authentischen Referenzstandards würde hier Klarheit verschaffen.

**Abbildung 26: Identifizierte Metaboliten für Lidocain**

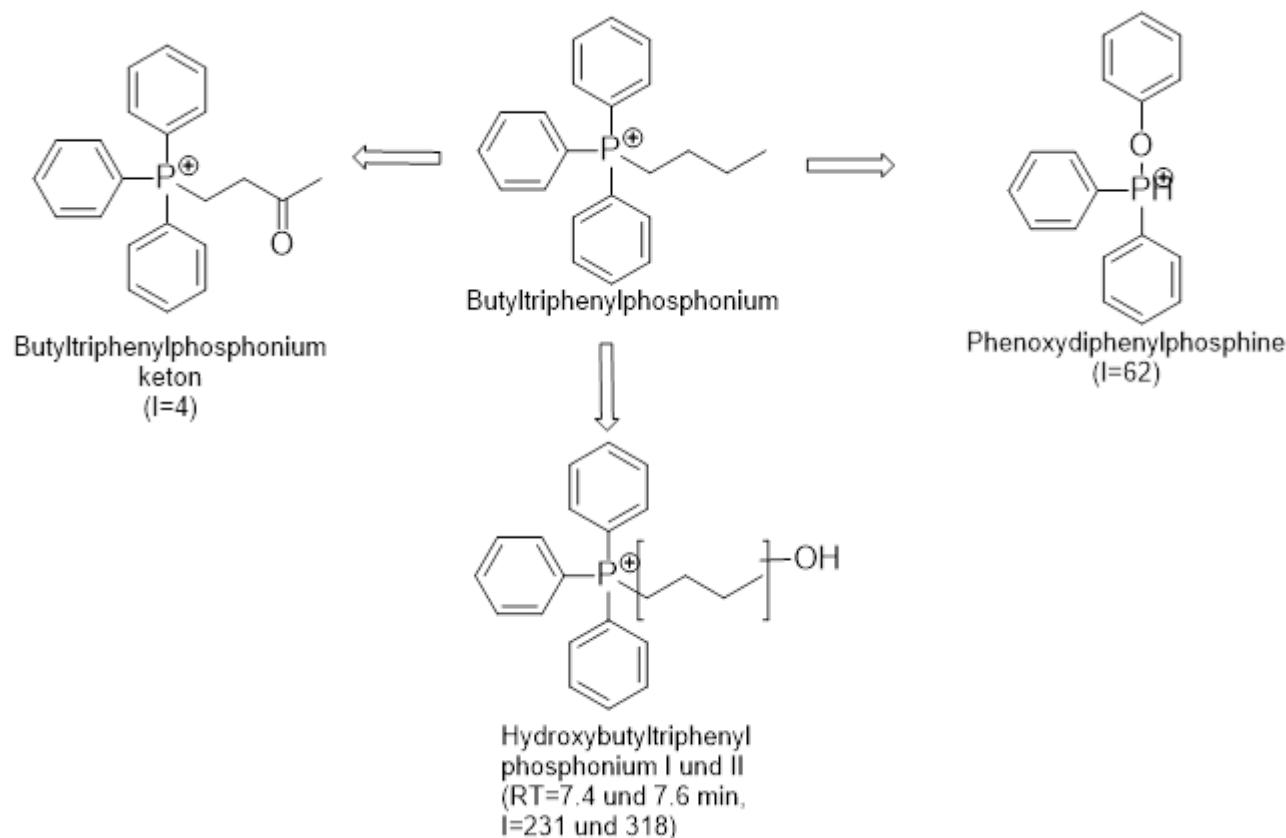
Quelle: eigene Abbildung BfG

### 5.2.6 Ethyltriphenylphosphonium

Für Ethyltriphenylphosphonium konnten keine Metaboliten gefunden werden. Da weder das Suspect-Screening nach möglichen Metaboliten, noch das Non-Target-Screening nach typischen Fragmenten Treffer ergeben haben, ist anzunehmen, dass Ethyltriphenylphosphonium in der Fischleber nicht metabolisiert wird.

### 5.2.7 Butyltriphenylphosphonium

Trotz der Strukturähnlichkeiten mit Ethyltriphenylphosphonium konnten für Butyltriphenylphosphonium vier Metaboliten identifiziert werden. Die Hauptmetaboliten waren zwei Hydroxymetaboliten, wobei die Position der Hydroxygruppe nicht bestimmt werden konnte (s. Abbildung 27). Die längeren Butylketten scheinen im Gegensatz zu den Ethylresten für einen enzymatischen Umbau zugänglich zu sein. Ein weiterer Metabolit mit derselben Masse und einem  $MS^2$ -Spektrum, das dem von Triphenylphosphine sehr ähnelt, aber eine viel höhere Retentionszeit (14.9 gegenüber 10.5 min) aufweist, wurde unter Vorbehalt als Phenoxydiphenylphosphine identifiziert.

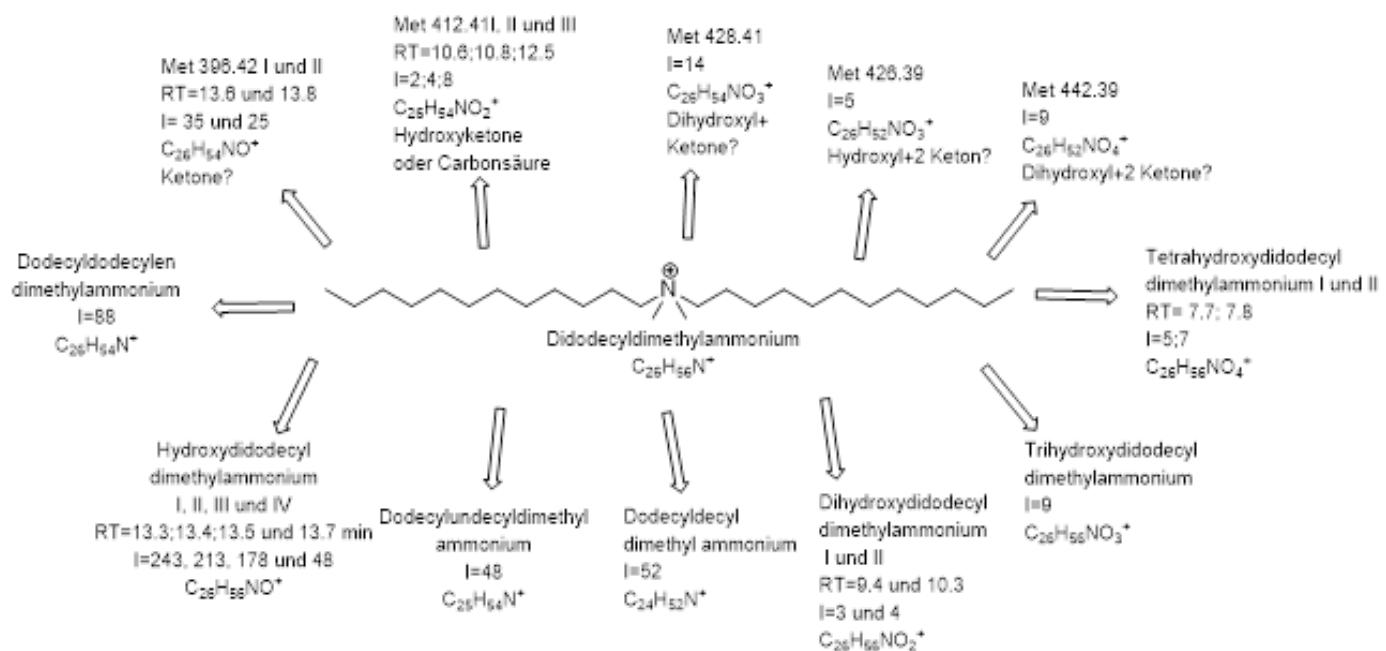
**Abbildung 27: Identifizierte Metaboliten für Butyltriphenylphosphonium**

Quelle: eigene Abbildung BfG

### 5.2.8 Didodecyldimethylammonium

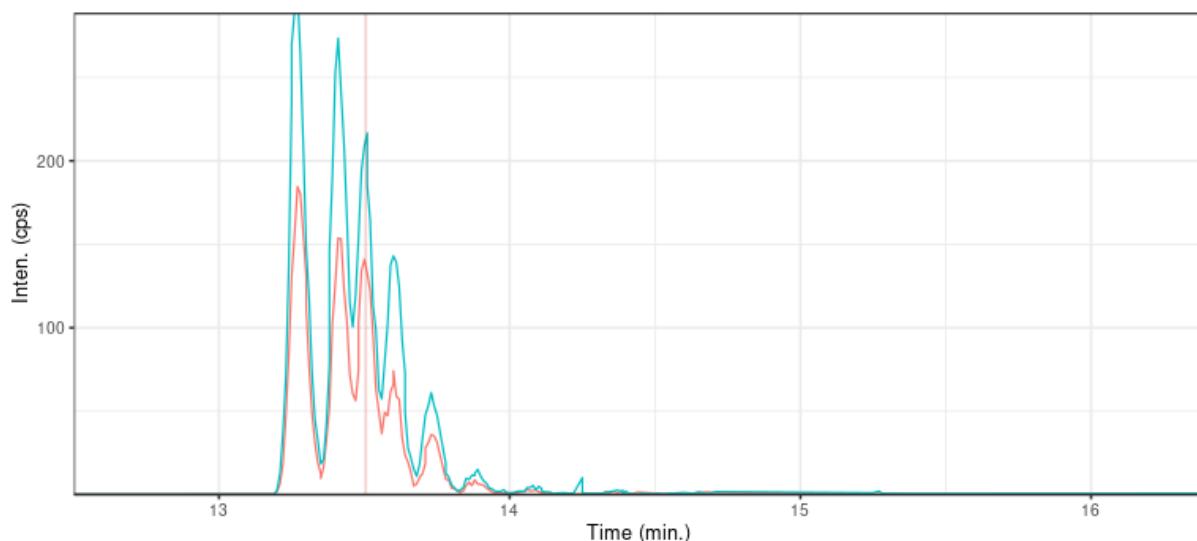
Für Didodecyldimethylammonium wurden insgesamt 21 Metaboliten identifiziert. Für diese Verbindungen sind die  $MS^2$  Spektren wenig aussagekräftig und es stehen viele mögliche Stellen für die chemischen Veränderungen zur Verfügung. Deswegen werden die Metaboliten der Übersicht in Abbildung 28 nur als Summenformeln dargestellt. Die am meisten gebildeten Metaboliten waren die Hydroxydidodecyldimethylammonium für welche vier Isomere identifiziert werden konnten. Die extrahierten Massenspuren von der entsprechenden  $m/z$  (398.43) lässt vermuten, dass noch weitere Hydroxymetaboliten gebildet wurden (Abbildung 29), allerdings mit geringeren Intensitäten, so dass kein  $MS^2$  für diese aufgenommen wurde. Der Metabolit mit der zweithöchsten Intensität war das Dodecylidodecylendimethylammonium. Interessanterweise war nur ein einziges Isomer zu beobachten, was darauf hinweist, dass die Dehydrierung nur an einer einzigen Stelle stattfindet. Weitere wichtige Metaboliten von Didodecyldimethylammonium sind das Dodecylundecyldimethylammonium, wo eine der Didodecylketten um eine Methylengruppe verkürzt wurde und das Dodecyldecyldimethylammonium, wo eine der Dodecylketten um eine Ethylengruppe verkürzt wurde. Die letzten Umwandlungsprodukte mit höheren Intensitäten waren die Metaboliten 396.42 I und II ( $I=35$  und  $25$ ), wobei es sich wahrscheinlich um Ketone handelt. Die wenig aussagekräftigen  $MS^2$ -Spektren lassen aber auch einen Dehydrierhydroxylmetaboliten als Möglichkeit zu. Die weiteren Metaboliten mit niedrigen Intensitäten lassen auf mehrfach Hydroxylierungen und Dehydrierungen schließen.

Abbildung 28: Identifizierte Metaboliten für Didodecyldimethylammonium



Quelle: eigene Abbildung BfG

Abbildung 29: XIC von  $m/z$  398,43 entsprechend zu den Hydroxylmetaboliten von Didodecyldimethylammonium



Quelle: eigene Abbildung BfG

## 5.2.9 Bumetrizol

Es konnte kein Metabolit für Bumetrizol gefunden werden. Allerdings führte eine geringe Wasserlöslichkeit des Stoffs zu deutlichen Verlusten. Für sehr lipophile Stoffe ist ggf. die Verwendung von Lösungsvermittlern erforderlich. Die Ergebnisse lassen trotzdem vermuten, dass Bumetrizol nur in sehr geringem Umfang metabolisiert wird.

### **5.3 Zusammenfassung und Ausblick**

Es konnte gezeigt werden, dass das etablierte Protokoll plausible und mit der Literatur übereinstimmende Ergebnisse liefert. Es konnten neue Daten über den Metabolismus in Fischen für mehrere Arzneimittel und vier Industriechemikalien generiert werden. Langfristig könnten diese Metaboliten in spezielle Metabolitendatenbanken aufgenommen werden, um eine größere Bandbreite an Umweltkontaminanten in Fisch zu betrachten. Selbst diejenigen, für welche die Struktur noch nicht bestätigt werden konnte, können die ermittelten Retentionszeiten, exakten Massen und  $MS^2$ -Spektren für eine Annotierung als Metabolit von der Substanz XY herangezogen werden. Allerdings Bedarf das Protokoll weiteren Anpassungen und Optimierungen, um eine Anwendung auch für unpolare Substanzen zu ermöglichen.

## 6 Schlussfolgerungen

Screening-Ansätze stellen ein nützliches Werkzeug in der Gewässerüberwachung dar. Vor allem am Beispiel des Schwebstoffes konnte gezeigt werden, dass durch ein flächendeckendes oder retrospektives Screening Trends erkannt, Priorisierungen vorgenommen oder sogar bislang nicht als Umweltbelastungen bekannte Substanzen identifiziert werden können. Mit Hilfe der drei vorgestellten Screening-Ansätze lassen sich unterschiedliche Fragestellungen beantworten. Das Suspect-Screening ermöglicht die Suche nach Substanzen von aktuellem Interesse wie am Beispiel des 6-PPD-Chinon demonstriert werden konnte. Da die Methode ohne Referenzstandards auskommt und nach den entsprechenden Massen in bereits vorhandenen Datensätzen gesucht werden kann, ermöglicht diese Methode einen schnellen Überblick über die Belastungssituation mit neuen oder aktuell relevanten Stoffen. Neben der gezielten Suche nach ausgewählten Stoffen, kann auch ein breit angelegtes Screening nach einer sehr großen Bandbreite an Stoffen durchgeführt werden. Durch die Verwendung von entsprechend breit aufgestellten Datenbanken, kann mit dem Database Assisted Screening parallel nach Substanzen aus unterschiedlichen Stoffklassen gesucht werden. So können flächendeckende Trends für z.B. Arzneimittelwirkstoffe, Kunststoffadditive oder Industriechemikalien ermittelt werden. Durch den Abgleich mit am selben Gerät aufgenommenen Präzisionsmassen, MS<sup>2</sup>-Spektren und Retentionszeiten bietet die Datenbanksuche eine hohe Sicherheit bei der Substanzerkennung bei gleichzeitiger Automatisierung der Suchroutine. Wie der Vergleich mit Target-Daten, die in anderen Studien der Umweltprobenbank in Teilproben derselben Proben, zeigt, bilden die über die Screening-Methoden erhaltenen Intensitäten die Schadstoffkonzentrationen in den Schwebstoffen sehr gut ab. Das Unknown-Screening als dritter Ansatz bietet über den Vergleich von Zeit- und Flächentrends die Möglichkeit der Priorisierung von auffälligen Messsignalen bei der Suche nach bislang unbekannten Schadstoffen. Auf diese Weise lassen sich Massensignale herausfiltern, für die sich eine aufwendige Identifizierung lohnen könnte. Einen anderen Ansatz stellt die Korrelation von Intensitätsverläufen von bekannten Substanzen mit unbekannten Massensignalen dar. Auf diese Weise lassen sich unbekannte Transformationsprodukte/Metaboliten oder anderweitig assoziierte Substanzen erkennen.

Die dargestellten positiven Beispiele über die Einsatzmöglichkeiten der Screening-Ansätze dürfen allerdings nicht über die Grenzen dieser Analysenmethoden hinwegtäuschen. So können Diskriminierungen von bestimmten Substanzklassen oder Polaritäten während der Probenextraktion und -vorbereitung, die Empfindlichkeit der Methoden oder die komplexe Matrix den Nachweis von Substanzen nach wie vor stark einschränken. Hierzu laufen Weiterentwicklungen.

Um Schadstoffe der Analyse zugänglich zu machen, müssen diese zunächst aus der Umweltmatrix isoliert werden. In den meisten Fällen ist im Anschluss noch eine Aufreinigung der Extrakte erforderlich, um eine ungestörte chromatographische Trennung zu ermöglichen und eine Kontamination der empfindlichen Analysengeräte zu verhindern. Je nach eingesetzter Extraktions- und Clean-Up-Methode kann es zu einer Diskriminierung einzelner Verbindungen oder ganzer Stoffklassen bzw. Polaritätsbereichen kommen. Im Projekt wurden möglichst generische und umfassende Methoden eingesetzt, dennoch konnte vor allem bei der Biota-Analytik eine Diskriminierung von eher apolaren Substanzen beobachtet werden.

Vergleiche mit spezifischen Targetmethoden zeiern starke Einschränkungen bezüglich der Empfindlichkeit. Aktuelle hochauflösende Massenspektrometer erreichen bislang nicht die Nachweisstärke von Tandemmassenspektrometern, die standardmäßig in der Spurenanalytik eingesetzt werden. Somit können sehr geringe Schadstoffkonzentrationen noch nicht erfasst werden. Für die Interpretation der Ergebnisse aus dem Suspect- und dem Data Base Assisted Screening ist die Kenntnis oder zumindest die Abschätzung der Nachweisgrenze für eine

bestimmte Substanz von großer Bedeutung. Ohne dieses Wissen hat eine Nicht-Detektion einer Substanz keinerlei Aussagewert. Eine der großen Herausforderungen wird folglich die Abschätzung der Nachweisgrenzen für verschiedene Substanzen, ohne dass auf Referenzstandards zurückgegriffen werden kann, sein.

Eine weitere große Herausforderung stellt die Identifizierung unbekannter Massensignale dar. Trotz exakter Masse und  $MS^2$ -Spektrum ist eine Identifizierung vor allem ohne Hinweis auf die Quelle der Substanz bislang sehr schwierig und zeitaufwendig. Häufig ergeben sich für die berechneten Summenformeln eine Vielzahl an möglichen Strukturen, die nicht alle durch kommerzielle oder synthetisierte Referenzstandards überprüft werden können. Auch eine Präparation der Substanz aus belasteten Umweltproben ist in vielen Fällen auf Grund des hohen Aufwands nicht sinnvoll. Durch eine Kopplung von chromatographischen und toxikologischen Methoden lässt sich das Gefährdungspotential der Substanz abschätzen und über dieses ggfs. einen großen Aufwand bei der Identifizierung rechtfertigen. Des Weiteren haben neue Verfahren der Datenwissenschaften und künstlichen Intelligenz haben Potenzial, die Strukturaufklärung zu erleichtern.

Eine weitere Herausforderung stellen die in den komplexen Umweltmatrices Schwebstoff und insbesondere Biota zahlen- und konzentrationsmäßig weit höher vertretenen natürlichen Substanzen dar. Diese erschweren ein effektives Herausfiltern und Priorisieren der für die Beantwortung der analytischen Fragestellung wichtigen Substanzen. Zudem wird die Identifizierung von anthropogenen Stoffen erschwert, wenn auf Grund von co-eluierenden natürlichen Substanzen keine  $MS^2$ -Spektren von diesen aufgezeichnet werden. Im Fall von Biotaproben wurde versucht diese Problematik durch die Verwendung von Data Independent Analysis und ins Besonderen SWATH zu beheben. Dies führte zwar zu einer Verbesserung der Analytik, allerdings konnte die Auswertung zunächst nur manuell erfolgen, da für die automatisierte Datenverarbeitung zunächst noch entsprechende Softwarelösungen gefunden werden müssen.

Trotz dieser Limitierungen, für die in den nächsten Jahren Lösungsansätze entwickelt werden müssen, stellen die vorgestellten Screening-Ansätze bereits jetzt ein wertvolles Instrument für die Gewässerüberwachung dar. Vor allem durch die routinemäßige Analyse von Schwebstoffproben könnte eine digitale Probenbank aufgebaut werden, die durch retrospektive Trendanalysen und die gezielte Suche nach aktuellen Problemstoffen bei der Priorisierung im Zuge der Stoffauswahl für Messkampagnen herangezogen werden könnte. So könnte bereits im Vorfeld abgeschätzt werden, welche Substanzen und Probenahmeflächen für eine aufwendige Target-Analytik lohnenswert sind und so wertvolles Probenmaterial und Analysenkapazitäten zielgerichtet und effektiv eingesetzt werden.

## 7 Quellenverzeichnis

1. Jewell, K.S., et al., Comparing mass, retention time and tandem mass spectra as criteria for the automated screening of small molecules in aqueous environmental samples analyzed by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. 2020. **34**(1): p. e8541.
2. Nürenberg, G., et al., Development and validation of a generic nontarget method based on liquid chromatography – high resolution mass spectrometry analysis for the evaluation of different wastewater treatment options. *Journal of Chromatography A*, 2015. **1426**: p. 77-90.
3. Dietrich, C., A. Wick, and T.A. Ternes, Open source feature detection for non-target LC-MS analytics. *n/a(n/a)*: p. e9206.
4. Boulard, L., et al., Spatial distribution and temporal trends of pharmaceuticals sorbed to suspended particulate matter of German rivers. *Water Research*, 2020. **171**: p. 115366.
5. Wick, A., et al., Benzotriazole UV stabilizers in sediments, suspended particulate matter and fish of German rivers: New insights into occurrence, time trends and persistency. *Environmental Pollution*, 2016. **212**: p. 401-412.
6. Boulard, L., et al., Development of an analytical method to quantify pharmaceuticals in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection and application to environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 2020. **1633**: p. 461612.
7. Zimmermann, L., et al., Benchmarking the in Vitro Toxicity and Chemical Composition of Plastic Consumer Products. *Environmental Science & Technology*, 2019. **53**(19): p. 11467-11477.
8. Tian, Z., et al., A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon. *Science*, 2021. **371**(6525): p. 185-189.
9. Droege, S.T.J., et al., Biotransformation Potential of Cationic Surfactants in Fish Assessed with Rainbow Trout Liver S9 Fractions. 2021. **40**(11): p. 3123-3136.
10. Brand, S., et al., Quaternary (triphenyl-) phosphonium compounds: Environmental behavior and toxicity. *Water Res*, 2018. **136**: p. 207-219.
11. Dürig, W., et al., New extraction method prior to screening of organic micropollutants in various biota matrices using liquid chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 2020. **219**: p. 121294.
12. Armitage, J.M., et al., Assessing the bioaccumulation potential of ionizable organic compounds: Current knowledge and research priorities. *Environ Toxicol Chem*, 2017. **36**(4): p. 882-897.
13. Burkina, V., et al., In Vitro Metabolic Transformation of Pharmaceuticals by Hepatic S9 Fractions from Common Carp (*Cyprinus carpio*). 2020. **25**(11): p. 2690.
14. Howell, S., et al., Metabolic disposition of 14C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. *Xenobiotica*, 1993. **23**(4): p. 349-359.
15. Howell, S.R., et al., Metabolic disposition of 14C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. *Xenobiotica*, 1993. **23**(4): p. 349-359.
16. Hammond, T.G., et al., Mass spectrometric characterization of circulating covalent protein adducts derived from a drug acyl glucuronide metabolite: multiple albumin adductions in diclofenac patients. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2014. **350**(2): p. 387-402.

17. Sarda, S., et al., Diclofenac metabolism in the mouse: novel in vivo metabolites identified by high performance liquid chromatography coupled to linear ion trap mass spectrometry. *Xenobiotica*, 2012. **42**(2): p. 179-94.
18. Bahlmann, A., et al., Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res*, 2014. **57**: p. 104-14.
19. Connors, K.A., et al., Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fractions. 2013. **32**(8): p. 1810-1818.
20. Bill, T.J., et al., Lidocaine metabolism pathophysiology, drug interactions, and surgical implications. *Aesthet Surg J*, 2004. **24**(4): p. 307-11.
21. Hermansson, J., et al., Metabolism of lidocaine in human liver in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 1980. **47**(1): p. 49-52.
22. Soma, L.R., et al., Pharmacokinetics of intravenous, subcutaneous, and topical administration of lidocaine hydrochloride and metabolites 3-hydroxylidocaine, monoethylglycinexylidide, and 4-hydroxylidocaine in horse. *J Vet Pharmacol Ther*, 2018. **41**(6): p. 825-837.

## A Anhang

**Tabelle 12: Für die Validierung der GC-HRMS-Methode ausgewählte Stoffe**

Klasse	Substanz
PAK	Naphthalene
	Acenaphthylene
	Acenaphtene
	Fluorene
	Phenanthrene
	Anthracene
	Fluoranthene
	Pyrene
	9,10-Dimethylanthracene
	Benzo(a)anthracene
	Chrysene
	Benzo(b)fluoranthene
	7,12-Dimethylbenz(a)anthracene
	Benzo(k)fluoranthene
	Benzo(a)pyrene
	Perylene
SHKW	Indeno(1,2,3-cd)pyrene
	Dibenzo(ac)anthracene
	Dibenzo(a,h)anthracene
	Benzo(g,h,i)perylene
	1,3,5-Trichlorbenzol
	1,2,4-Trichlorbenzol
	1,2,3-Trichlorbenzol
	Pentachlorbenzol
	α-HCH (Hexachlorcyclohexan)
	γ-HCH (also Lindane)
	β-HCH
	δ-HCH
	ε-HCH
	PCB 28

Klasse	Substanz
	PCB 31
	PCB 52
	PCB 49
	o,p-DDE
	PCB 101
	o,p-DDD
	p,p'-DDE
	o,p-DDT
	PCB 118
	p,p'-DDD
	PCB 114
	PCB 153
	PCB 105
	p,p'-DDT
	PCB 138
	PCB 202
	PCB 180
	PCB 170
	PCB 209
Moschus Duft	Galaxolide (HHCB)
	Tonalide (ATHN)
UV-Filter	Eusolex 2292 OMZ (Octylmethoxycinnamate)
	Octocrylene
Biozid	Triclosan
	Methyltriclosan

Tabelle 13: Über DBAS in Schwebstoffproben vom Rhein bei Koblenz (2005-2018) gefundene Substanzen

Massen	Retentionszeit [min]	Name	CAS	Massen Datenbank	Retentionszeit Datenbank	Formel	Score
307.1246	8.01	(Methoxymethyl)triphenylphosphonium	4009-98-7	307.1246	7.5	C20H20OP	813
363.1496	8.64	1-(Ethoxycarbonyl)ethyltriphenylphosphonium	30018-16-7	363.1508	8.09	C23H24O2P	806
278.1889	8.21	2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine	30223-73-5	278.1904	NA	C20H23N	684
152.0151	7.96	2-Hydroxybenzothiazole	934-34-9	152.0165	7.78	C7H5NOS	938
139.0381	5.45	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	139.039	5.62	C7H6O3	781
298.0956	4.87	5`-Deoxy-5`-(methylthio)adenosin	2457-80-9	298.0969	4.79	C11H15N5O3S	768
134.0701	7.02	5-Methyl-1H-benzotriazole	136-85-6	134.0713	7.02	C7H7N3	798
180.0797	5.7	Acridine	260-94-6	180.0808	5.78	C13H9N	771
196.0741	8.39	Acridone	578-95-0	196.0757	8.5	C13H9NO	889
552.3971	8.27	Aliskiren	173334-57-1	552.4001	8.2	C30H53N3O6	520
370.1779	5.56	Amisulpride	71675-85-9	370.1795	5.57	C17H27N3O4S	860
412.3183	12.17	Benzethonium	10172-60-8	412.321	11.46	C27H42NO2	661
304.2994	11.99	Benzyl-dimethyl-dodecylammonium	10328-35-5	304.2999	11.59	C21H38N	840
360.3612	14.37	Benzyl-dimethyl-hexadecylammonium	51895-89-7	360.3625	13.87	C25H46N	765
332.3302	13.2	Benzyl-dimethyl-tetradecylammonium	5285-67-6	332.3312	12.78	C23H42N	838
192.1733	5.26	Benzyl-triethylammonium	16652-03-2	192.1747	5.09	C13H22N	740
353.1436	9.3	Benzyltriphenylphosphonium	15853-35-7	353.1454	8.71	C25H22P	747

Massen	Retentionszeit [min]	Name	CAS	Massen Datenbank	Retentionszeit Datenbank	Formel	Score
366.1383	10.92	Bezafibrate-d4	1189452-53-6	366.1393	11.05	C19H16ClNO4 2H4	732
319.1591	9.18	Butyl-triphenylphosphonium	22444-89-9	319.161	8.85	C22H24P	673
319.1593	8.98	Butyl-triphenylphosphonium	22444-89-9	319.161	8.85	C22H24P	752
319.1598	8.72	Butyl-triphenylphosphonium	22444-89-9	319.161	8.85	C22H24P	646
237.1024	9.04	Carbamazepine	298-46-4	237.1022	8.87	C15H12N2O	756
208.1319	4.59	Ciclopirox	29342-05-0	208.1333	4.49	C12H17NO2	559
325.17	7.83	Citalopram	59729-33-8	325.1711	7.76	C20H21FN2O	792
293.1043	8.85	Climbazole	38083-17-9	293.1051	8.76	C15H17ClN2O2	504
325.2256	8.09	Denatonium	47324-98-1	325.2274	7.58	C21H29N2O	618
226.1579	6.4	Dibenzylidemethylammonium	14800-26-1	226.159	6.13	C16H20N	534
326.3775	13.81	Didecyl-dimethylammonium	20256-56-8	326.3781	13.39	C22H48N	667
256.1682	7.73	Diphenhydramine	58-73-1	256.1696	7.72	C17H21NO	815
280.167	7.89	Doxepin	1668-19-5	280.1696	7.45	C19H21NO	622
226.0958	15.32	Drometrizole	2440-22-4	226.0975	15.2	C13H11N3O	878
291.1295	7.9	Ethyltriphenylphosphonium	39895-79-9	291.1297	7.39	C20H20P	850
502.292	8.66	Fexofenadine	83799-24-0	502.2952	NA	C32H39NO4	687
500.2774	9.17	Fexofenadinone	76811-98-8	500.2795	8.71	C32H37NO4	840

Massen	Retentionszeit [min]	Name	CAS	Massen Datenbank	Retentionszeit Datenbank	Formel	Score
415.1431	7.99	Flecainide	54143-55-4	415.1451	7.98	C17H20F6N2O3	731
794.8918	4.81	Iopromide-d3	1189947-73-6	794.8955	4.82	C18H21I3N3O8 2H3	617
379.1219	8.95	Mefloquine	53230-10-7	379.124	8.43	C17H16F6N2O	623
310.215	8.79	Methadone	76-99-3	310.2166	NA	C21H27NO	762
153.0535	7.72	Methyl 3-hydroxybenzoate	19438-10-9	153.0546	7.88	C8H8O3	700
153.0535	7.72	Methyl 4-hydroxybenzoate	99-76-3	153.0546	7.59	C8H8O3	725
277.1136	7.5	Methyltriphenylphosphonium	15912-74-0	277.1141	7.19	C19H18P	793
300.1454	5.81	Metoclopramide	364-62-5	300.1473	5.46	C14H22ClN3O2	570
273.0752	9.05	Naringenin	67604-48-2	273.0757	9.18	C15H12O5	740
388.392	15.48	N-Benzylidemethylstearylammomium	37612-69-4	388.3938	14.95	C27H50N	806
311.1534	7.71	N-desmethyl-citalopram	62498-67-3	311.1555	NA	C19H19FN2O	614
362.2087	17.84	Octocrylene	6197-30-4	362.2115	17.66	C24H27NO2	532
298.3457	12.73	Octyl-decyl-dimethylammomium	105169-78-6	298.3468	12.37	C20H44N	614
453.2487	7.26	Olmesartan-d6	1185144-74-4	453.2527	7.31	C24H20N6O3 2H6	770
453.2499	7.26	Olmesartan-d6	1185144-74-4	453.2527	7.31	C24H20N6O3 2H6	914
368.0857	7.78	Pantoprazolesulfide	102625-64-9	368.0875	7.58	C16H15F2N3O3S	645

Massen	Retentionszeit [min]	Name	CAS	Massen Datenbank	Retentionszeit Datenbank	Formel	Score
408.1235	6.52	Sitagliptin	486460-32-6	408.1254	6.57	C16H15F6N5O	828
199.0589	5.8	Syringicacid	530-57-4	199.0601	5.7	C9H10O5	626
242.1416	9.82	Terbutryn	886-50-0	242.1434	9.67	C10H19N5S	813
242.2831	9.23	Tetrabutylammonium	429-41-4	242.2842	8.91	C16H36N	815
339.1288	8.98	Tetraphenylphosphonium	18198-39-5	339.1297	8.63	C24H20P	592
186.2206	5.78	Tetrapropylammonium	13010-31-6	186.2216	5.57	C12H28N	797
329.1513	5.02	Tiapride	51012-32-9	329.153	4.86	C15H24N2O4S	696
254.1132	5.48	Triamterene	396-01-0	254.1149	5.2	C12H11N7	858
200.2359	7.34	Tributylmethylammonium	29814-63-9	200.2373	7.01	C13H30N	711
183.0765	7.68	Triethylphosphate	78-40-0	183.0781	7.41	C6H15O4P	663
327.0765	14.21	Triphenylphosphate	115-86-6	327.0781	14.07	C18H15O4P	847
279.0922	10.6	Triphenylphosphineoxide	791-28-6	279.0933	10.46	C18H15OP	823
295.0689	14.65	Triphenylphosphinesulfide	3878-45-3	295.0705	14.51	C18H15PS	834
430.885	13.71	Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate	13674-87-8	430.8892	13.31	C9H15Cl6O4P	587
369.1229	16.36	Tris(4-methylphenyl)phosphate	78-32-0	369.125	15.92	C21H21O4P	669
436.23	11.46	Valsartan	137862-53-4	436.2343	11.44	C24H29N5O3	742
455.2887	8.68	Verapamil	52-53-9	455.2904	8.54	C27H38N2O4	774