

**Screening von Wasserproben:
Informationssystem für die Kategorisierung von unbekanntem Verbindungen.**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Stand der Identifizierung von Unbekanntem	1
2	Operatives Konzept zur Charakterisierung von Unbekanntem bei Screenings	3
2.1	Technisches Vorgehen	3
2.2	Auswahlkriterien und Evaluierung des Umweltbelastungspotentials	5
2.3	Dokumentation der Massenspektren ausgewählter unbekannter Verbindungen	6
3	Vergleich einer Spektrensuche basierend auf „Identität“ und „Ähnlichkeit“	6
4	Fallbeispiele des erweiterten Konzeptes zur Charakterisierung von Unbekanntem	8
4.1	Identifizierung von Abbauprodukten von Pharmaka/Pestiziden	8
4.2	Identifizierung von biogenen Verbindungen	10
5	Abklärung mögliche biologische Aktivität durch wirkungsbezogene Analytik	16
6	Alternative Ionisationsmethoden	17
7	Schlussfolgerungen	18

1 Einleitung und Stand der Identifizierung von Unbekanntem

Bei der Charakterisierung von organischen Verbindung in Wasserproben werden neben der Einzelstoffanalytik auch Screeningverfahren eingesetzt, welche das Vorkommen von weiteren Verbindungen abklären sollen. Zurzeit wird dabei normalerweise die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) kombiniert mit Elektronenionisation eingesetzt. Dabei wird wie folgt verfahren:

- Den Wasserproben wird **vor der Extraktion** ein oder mehrere **interne Standards** zugesetzt.
- Anschliessend werden in den Lösungsmittel-extrakten der Wasserproben diejenigen **Verbindungen für eine Identifizierung** ausgewählt, welche eine **vorgegebene Äquivalentmenge** in Bezug auf einen **festgelegten internen Referenzstandard überschreiten**. Diese dürfen in den **zugehörigen Feldblindproben nicht vorkommen** oder nur in Mengen, die höchstens **1/10 der Probenkonzentration** ausmachen.

- Die **hintergrundkorrigierten Massenspektren** dieser Verbindungen werden anschließend mit einer **Spektrenbibliothek (Datenbank) verglichen**.
- Dabei wird ein Algorithmus eingesetzt, der hauptsächlich auf **Identität prüft** (befindet sich das Massenspektrum der unbekanntes Verbindung in der Spektrenbibliothek).
- Eine **Überprüfung auf Ähnlichkeit** (gibt es Bibliotheksspektren, welche in Teilen oder vollständig dem unbekanntes Probenspektrum entsprechen) findet zwar statt, wird aber gering gewichtet.
- Da eine **Spektrensuche mit vollständigen Massenspektren** (ca. 200'000 in der Spektrenbibliothek) sehr **zeitaufwändig** ist, findet eine **Vorsuche mit reduzierten Massenspektren** statt, welche auf ca. 15-20 signifikante Massen reduziert wurden. Die dabei gefundenen Massenspektren (wenige hundert) werden dann in einem **zweiten Schritt mit den vollständigen Spektren** verglichen.
- **Übereinstimmungen von 80%** oder mehr zwischen Proben- und Bibliotheksspektrum deuten in der Regel darauf hin, dass **entweder die korrekte Struktur** gefunden wurde oder dass es sich um **verwandte (isomere) Verbindungen** handelt. Diese werden dann als tentativ identifiziert in eine Liste überführt.

Dieses Verfahren hat jedoch einige Schwächen, die dazu führen, dass die Struktur der Verbindungen nicht identifiziert werden:

- Das **Probenspektrum** der Verbindung enthält **Verunreinigungen** des chemischen Hintergrunds oder Reste von Massenspektrum anderer teilweise **ko-eluierender Substanzen**. Dadurch ist die Übereinstimmung bei Test auf Identität zu schlecht.
- Es treten **Fehler bei der Vorsuche** mit reduzierten Massenspektren auf, wodurch das entsprechende Bibliotheksspektrum eliminiert wird.

Das obige **Standardverfahren** ergibt daher immer eine **Liste von nicht identifizierbaren Verbindungen**, welche als unbekannt eingestuft werden. Diese kann bedeutend umfangreicher als diejenige der identifizierten Substanzen sein und manchmal 80-90% der Äquivalentmenge an Verbindungen ausmachen. Da bei fehlender Struktur **keinerlei Aussage zur Herkunft und zu umweltbelastenden Effekten** (Toxikologie) gemacht werden kann, werden diese Unbekannten oftmals bei einer Risikoabschätzung ignoriert.

Es gibt jedoch **Konzepte**, die es erlauben, Verbindungen mit **gestörten Massenspektren** oder solche deren Massenspektrum **nicht in der Spektrenbibliothek** enthalten sind, weiter zu charakterisieren, so dass in vielen Fällen deren **Stoffklasse** oder die **Struktur des Kohlenstoffgerüsts** sowie das Vorhandensein von **funktionellen Gruppen** eruiert werden kann. Ein solches operatives Verfahren und dessen Anwendung wird in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

2 Operatives Konzept zur Charakterisierung von Unbekannten bei Screenings

2.1 Technisches Vorgehen

Computerprogramme für den Vergleich von Massenspektren beinhalten **zusätzliche Möglichkeiten** zur Identifikation von Teilstrukturen und Stoffklassen, die jedoch **sehr gute Kenntnisse in der Strukturaufklärung verlangen** und daher kaum angewendet werden. Ein international anerkanntes Programm ist dasjenige des „National Institute of Standardization (NIST)“ der USA. Es wird nachfolgend beschrieben, wie mit dessen Hilfe Unbekannte weiter charakterisiert werden können. Anwendungsbeispiele werden anschliessend dargestellt und kommentiert.

Eine **Voraussetzung** für die Anwendung des in **Tabelle 1 beschriebenen Verfahrens** sind **gute Kenntnisse im Interpretieren von Strukturmerkmalen** und Fragmentierungsprozessen in Massenspektren, da die gemachten Vorschläge entsprechend überprüft werden müssen. Trotzdem ist die Zeitersparnis gegenüber einer reinen manuellen Interpretation (15-30 min pro Spektrum) bedeutend (Zeitbedarf reduziert sich auf 0,5-10 min pro Spektrum).

Tabelle 1: Verfahren zur weiteren Charakterisierung von Unbekannten mit Hilfe von Modulen des Spektrenvergleichsprogrammes des NIST.

Vorgehen	Resultat
1. Blockieren der Versuche mit reduzierten Massenspektren	Es werden nur vollständige Spektren verglichen. Fehler bei der Reduktion auf „signifikante Information“ werden eliminiert. Da bei der ersten Suche die Bibliothek restrukturiert wird, dauert diese 2-3 min, danach reduziert sich der Zeitbedarf auf ca. 10 s.
2. Einstellen des Suchalgorithmus auf „Ähnlichkeit“ (Similarity)	Der Algorithmus beruht auf der Frage: Passt das gesamte Bibliotheksspektrum oder Teile davon in das unbekannte Probenspektrum? Damit werden auch Resultate bei gestörten Massenspektren erhalten oder Teilstrukturen bzw. Stoffklassen können identifiziert werden. Dies bedarf aber einer Nachinterpretation
3. Wiederholung der Suche mit Filtermechanismen (Vorgabe der Molekülmasse oder des Vorhandenseins signifikanter intensiver Massen)	Der angepasste Vergleichsalgorithmus kann zusätzliche Informationen ergeben.
4. Zugriff auf das Informationselement „Substructure identification“	Dieses Unterprogramm basiert auf dem Programm „STIRS“ ("Self training Interpretative and Retrieval System"). Mit Hilfe des Vergleichs von Teilbereichen des Probenspektrums mit einer Referenzdatenbank wird getestet, ob typische Fragmentierungsmuster und somit Informationen über Teilstrukturen im Massenspektrum vorhanden sind. Dies ermöglicht sinnvolle Strukturvorschläge, ohne dass das Probenspektrum in der Datenbank vorhanden ist.

In Kapitel 3 werden einige Beispiele gegeben, wie mit den obigen Hilfsmitteln zusätzliche Strukturinformationen erhalten werden können. Vielfach ist es jedoch nicht möglich, einen tentativen Vorschlag einer Verbindungsstruktur zu erhalten. Es kann jedoch dann recht häufig die Stoffklasse identifiziert werden, was erlaubt, Aussagen zur Herkunft und zum umweltbelastenden Potential zu machen.

2.2 Auswahlkriterien und Evaluierung des Umweltbelastungspotentials

Da das vorher beschriebene Verfahren je nach Substanz eher aufwändig ist, sollte es nur auf unbekannte Strukturen angewendet werden, die **folgende Auswahlkriterien** erfüllen:

1. **Wiederholtes Auftreten in Proben:** Entweder in 20% aller Proben einer Messkampagne oder in 20% aller Proben eines Probenahmepunktes. Mindestens 4 Proben müssen dabei einen positiven Befund haben.
2. **Konzentrationsbereich:** Die unbekannte Substanz muss in abgeschätzten Mengen von >50 ng/l vorhanden sein in 50% aller Positivbefunde.
3. **Qualität Massenspektrum:** Die Massenspektren der einzelnen Proben mit Positivbefund müssen eine Vergleichbarkeit von mindestens 80% aufweisen (zur Dokumentierung der Massenspektren, siehe Kapitel 2.3).

Verbindungen, welche der vorher beschriebenen erweiterten Interpretation unterzogen wurden, sollten anschliessend noch wie folgt charakterisiert werden:

1. **Ursprung der Verbindung bzw. der Verbindungsklasse:** Rein biogen, biogen und anthropogen, rein anthropogen (Syntheseprodukte, Pestizide etc.), Abbauprodukt (z.B. eines Pestizids oder von Biopolymeren).
2. **Evaluierung des Umweltbelastungspotentials.** Hierzu können entweder Modellverbindungen oder Stoffklasseneigenschaften herangezogen werden. Falls z.B. die Mehrzahl einer Stoffklasse mutagene Effekte zeigt, so kann bei unbekanntem Vertretern davon ausgegangen werden, dass ein hohes Potenzial dafür besteht. Andererseits sind verzweigte Kohlenwasserstoffe oder Fettsäureester in der Regel ökotoxikologisch nicht relevant. Zusätzlich kann man mit Hilfe von Modellverbindungen (z.B. als „worst case“ der bekannteste toxische Vertreter einer Stoffklasse oder ein strukturell typischer Vertreter der Stoffklasse bei unvollständiger Charakterisierung) eine weitere Evaluierung vorgenommen werden.

2.3 Dokumentation der Massenspektren ausgewählter unbekannter Verbindungen

Das in Tabelle 1 beschriebene Vorgehen einer erweiterten Charakterisierung von unbekanntem Verbindungen bedingt, dass die Massenspektren in elektronischer Form vorliegen. Das bereits erwähnte Spektreninterpretationsprogramm der NIST ist internationaler Standard und erlaubt die Erstellung von individuellen Spektrenbibliotheken, aus denen die unbekanntem Massenspektren aufgerufen werden können. Andere Programme verfügen in der Regel über Import/Exportprogramme für das NIST-Format. Bei der Erstellung der NIST-lesbaren Spektrenbibliothek, welche die Massenspektren der zu interpretierenden Unbekanntem enthält, müssen unbedingt folgende Punkte beachtet werden:

1. Massenspektren sollten in der Regel nur von Signalen ausgewählt werden, deren **Äquivalentkonzentration** $>1 \mu\text{g/l}$ beträgt. Nur in Ausnahmefällen und bei ausreichender Spektrenqualität kann diese bis ca. $0,1 \mu\text{g/l}$ abgesenkt werden.
2. Es dürfen nur Massenspektren verwendet werden, die **keine grossen Konzentrationsgradienten** enthalten. Das bedeutet, dass Massenspektren in der Regel nur vom **GC-Signalmaximum** gewählt werden und dass das GC-Signal durch mindestens 12-15 Scans definiert ist.
3. Das abzuspeichernde Massenspektrum darf durch **ko-eluierende Verbindungen nicht verfälscht** sein (eventuell Kontrolle durch das Programm AMDIS der NIST).
4. Eine **Hintergrundsubtraktion** muss vorgenommen worden sein (einfache Subtraktion des Hintergrunds vor dem GC-Signal der Verbindung).

Bei Problemen und Zweifelsfällen in Bezug auf Spektrenreinheit sollte zudem eine Originaldatei eines GC-MS-„Runs“ eines Extraktes zugänglich sein, welche die Verbindung enthält. Diese sollte allerdings nur für Schlüsselverbindungen nachkontrolliert werden.

3 Vergleich einer Spektrensuche basierend auf „Identität“ und „Ähnlichkeit“

Das nachfolgende Beispiel in Abbildung 1 zeigt, dass ein Spektrenvergleich mit Hilfe von Ähnlichkeitsalgorithmen in der Lage ist, identische Teilstrukturen zu identifizieren:

- Der mit Hilfe der Einstellung „identity“ erhaltene Strukturvorschlag hat nur eine Übereinstimmung von 680 (von 1000). Zudem fehlen im vorgeschlagene Bibliothekspektrum signifikante Fragmente (m/z 229, 131, 117, 115, 103, 77).

- Der ähnlichkeitsbezogene Vergleich („similarity“) ergab eine sehr gute Übereinstimmung von 882 mit dem Spektrum eines Dihydronaphthalenons. Alle signifikanten Massen bis m/z 174 (aus Umlagerung) sind vorhanden.
- Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die unbekannte Verbindung diese oder eine isomere Teilstruktur der Elementarzusammensetzung $C_{12}H_{14}O$ enthält.

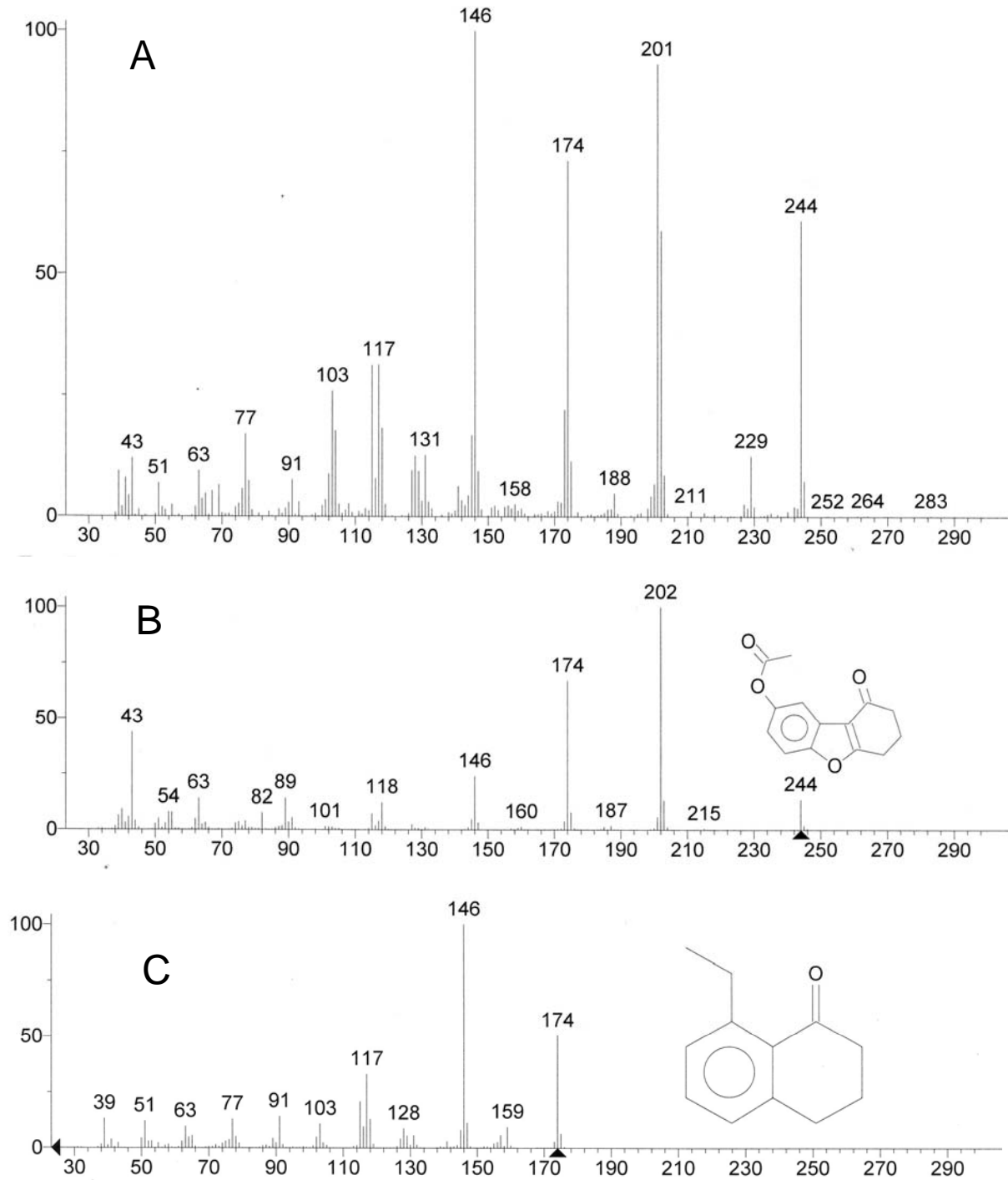


Abb. 1. Vergleich der Spektrensuche basierend auf den Algorithmen „identity“ und „similarity“. A: Originalspektrum, B: gefundene Struktur mit „identity“, C: gefundene Teilstruktur mit „similarity“.

Zudem ist die Auflistung möglicher Unterstrukturen bei einem Ähnlichkeitsbezug wesentlich aussagekräftiger wie Abbildung 2 zeigt. Hier werden identifizierte Teilstrukturen und ihre Wahrscheinlichkeit aufgeführt, dass sie in der Struktur vorhanden sind (Punkt 4, Tabelle 1).

Structures present:				Structures present:			
Number	Probability	Short Name	And Description	Number	Probability	Short Name	And Description
1	99	RDB5_PLUS,	rings + double bonds count >= 5	1	98	RDB5_PLUS,	rings + double bonds count >= 5
2	99	CH2/3,	primary or secondary saturated carbon	2	96	CH2/3,	primary or secondary saturated carbon
3	92	CH2,	methylene group	3	94	O,	contains oxygen
4	88	AR,	aromatic ring	4	94	>C=O,	carbonyl group
5	84	hetcyc,	ring containing at least one heteroatom	5	92	CH2,	methylene group
6	84	het_ring,	ring containing non-carbon atom(s)	6	91	.C=O,	ring carbonyl
7	83	O,	contains oxygen	7	91	AR,	aromatic ring
8	82	C2H5/CH2CH2,	primary or secondary ethyl linkage	8	86	-.CH2/3-	methylene or methyl group (chain)
9	75	-.CH2/3-	methylene or methyl group (chain)	9	86	CH3,	methyl
10	75	CH3,	methyl	10	82	C2H5/CH2CH2,	primary or secondary ethyl linkage
11	69	>C=O,	carbonyl group	11	71	hetcyc,	ring containing at least one heteroatom
12	66	.N.,	any nitrogen atom in ring	12	71	het_ring,	ring containing non-carbon atom(s)
13	63	N,	contains nitrogen	13	66	CH2C=O,	methylene carbonyl bond
14	63	C3+-alkyl,	methylene attached to saturated C-atoms (chain)	14	63	C3+-alkyl,	methylene attached to saturated C-atoms (chain)
15	59	.C=O,	ring carbonyl	15	59	CH&O,	contains only carbon, hydrogen and oxygen
16	58	N-C,	nitrogen-carbon single bond	16	54	CH2.C=O,	methylene carbonyl bond (ring)
17	51	C.C,	contains ring C=C bond bond (ring)	17	52	CO.CH2.CH2,	methylene attached to methylene and carbonyl (ring)
18	51	-.CH2/3-1,	exactly one methylene or methyl group (chain)	18	52	>=8-ring,	ring containing 8 or more atoms
19	51	C=C_any,	carbon-carbon double bond	19	51	-.CH2/3-1,	exactly one methylene or methyl group (chain)
20	42	N-odd,	odd number of nitrogen atoms	20	49	ArC,	aromatic carbon attached to carbon

Abb. 2. Tabelle möglicher Unterstrukturen, die mit der Einstellung „identity“ (links) und mit „similarity“ (rechts) gefunden wurden. Die rechte Tabelle enthält nützlichere Information wie z.B. die Carbonylfunktion >C=O. Einträge bis etwa 80% sind aussagekräftig.

4 Fallbeispiele des erweiterten Konzeptes zur Charakterisierung von Unbekannten

4.1 Identifizierung von Abbauprodukten von Pharmaka/Pestiziden

Beispiel 1:

- Die Ähnlichkeitsuche eines unbekanntes Probenspektrums ergab als Vorschlag das Sulfonamid Sulfisoxazol (siehe Abbildung 3).
- Das Proben- und Bibliothekspektrum waren bis Masse m/z 156 praktisch identisch, unterscheiden sich danach aber durch das Vorhandensein von m/z 200 (Probe) gegenüber m/z 267. Masse m/z 200 ist das Molekülion
- Die unbekannte Verbindung enthält 2 Stickstoffatome (gerade Molekülmasse), eines davon im Rest 44 u ($200-156$ u). Damit ist der Rest -NH-CHO.
- Da das Massenspektrum m/z 80 ($-\text{SO}_2\text{-NH}_2$) zeigt, ist die Struktur wahrscheinlich N^4 -Formyl-Sulfisoxazol ($\text{CHO-NH-Phenyl-SO}_2\text{-NH}_2$), ein Metabolit von Sulfisoxazol (Abbau durch Bodenorganismen?).
- Die ökotoxikologischen Eigenschaften dürfen sich wesentlich von denjenigen der Ausgangssubstanz unterscheiden.

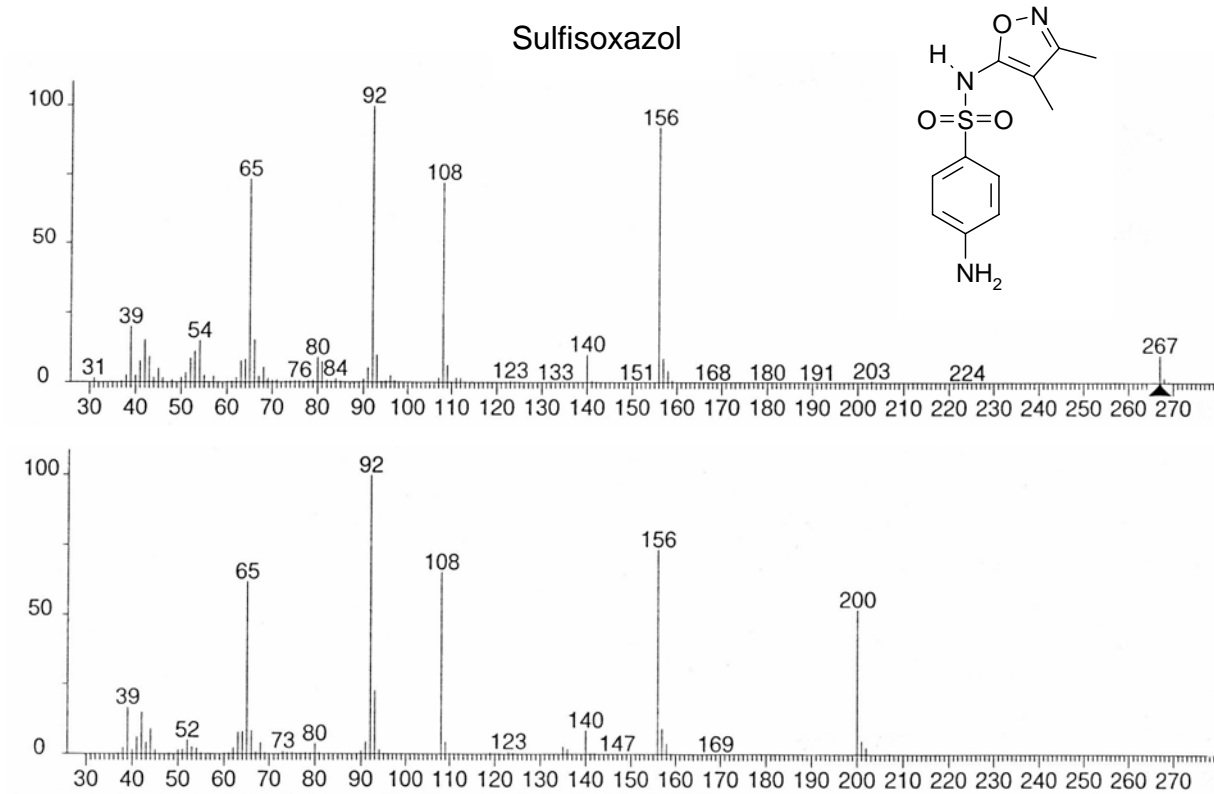
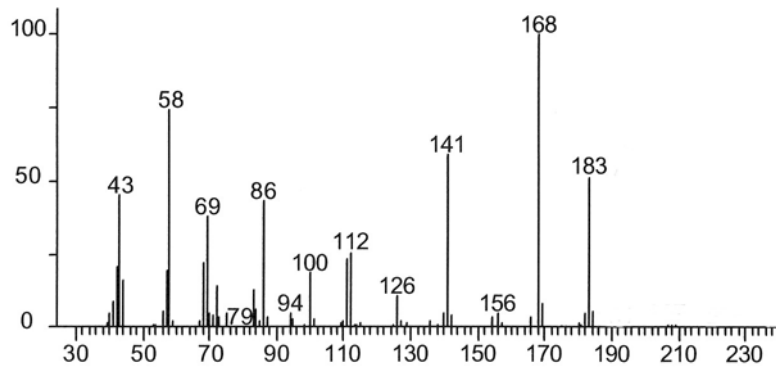


Abb. 3: Unten: Unbekanntes Probenspektrum. Oben: Strukturvorschlag der Ähnlichkeitssuche

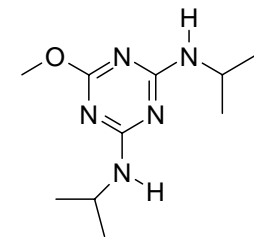
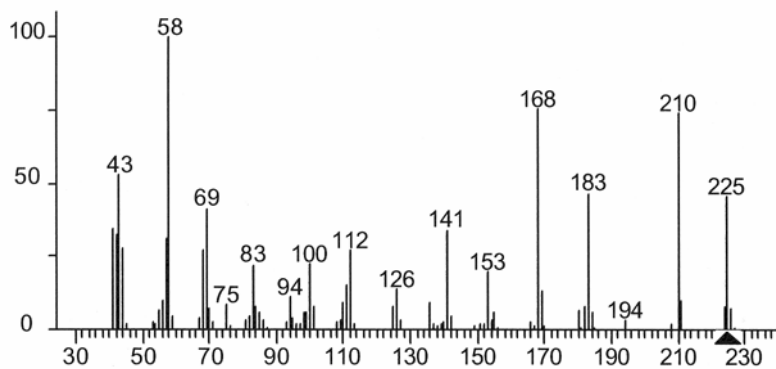
Beispiel 2:

Die Ähnlichkeitssuche des unbekanntes Probenspektrums (Abbildung 4) ergibt eine hohe Übereinstimmung von >80% mit dem Bibliothekspektrum von Prometon, hat aber eine geringere Molekülmasse sowie zusätzliche Signale:

- Die Massendifferenz von 42 u entspricht dem Ersatz einer N-Isopropylgruppe durch NH_2 (-58 u + 16 u), was z.B. durch Hydrolyse erfolgen kann.
- Im Massenspektrum der unbekanntes Verbindung kommen jedoch zusätzlich die Fragmente m/z 86 (48 %) und m/z 156 (10 %) vor. Diese werden durch eine ko-eluierende Verbindung verursacht, wie die Kontrolle der entsprechenden Massenchromatogramme ergab.



Unbekanntes
Spektrum



Prometon

Abb. 4. Die unbekannte Probenverbindung (oben) hat grosse Ähnlichkeit mit Prometon aber eine kleinere Molekülmasse.

4.2 Identifizierung von biogenen Verbindungen

Bei den nachfolgenden Beispielen handelt es sich um Verbindungen, die als unbekannt klassifiziert wurden, sich aber durch Fragmentierungsvergleich Stoffklassen zuordnen liessen, die biogenen Ursprungs sind. Diese können zwar biologisch aktiv sein, sind aber ökotoxikologisch kaum relevant.

Beispiel 3:

- Das Massenspektrum einer unbekanntten Verbindung in Abbildung 5 zeigt die typische Fragmentierung einer terpenoiden Struktur.
- Da isomere Terpenstrukturen fast identische Massenspektren besitzen, ist kein detaillierter Strukturvorschlag möglich. Es langt jedoch, die Stoffklasse festzustellen.
- Der Unterschied in der Molekülmasse (unbekannt 192 u, Vorschlag 166 u) wird durch einen zusätzlichen ungesättigten Kohlenwasserstoffrest verursacht. Eine weitere Interpretation ist in diesem Fall nicht nötig.

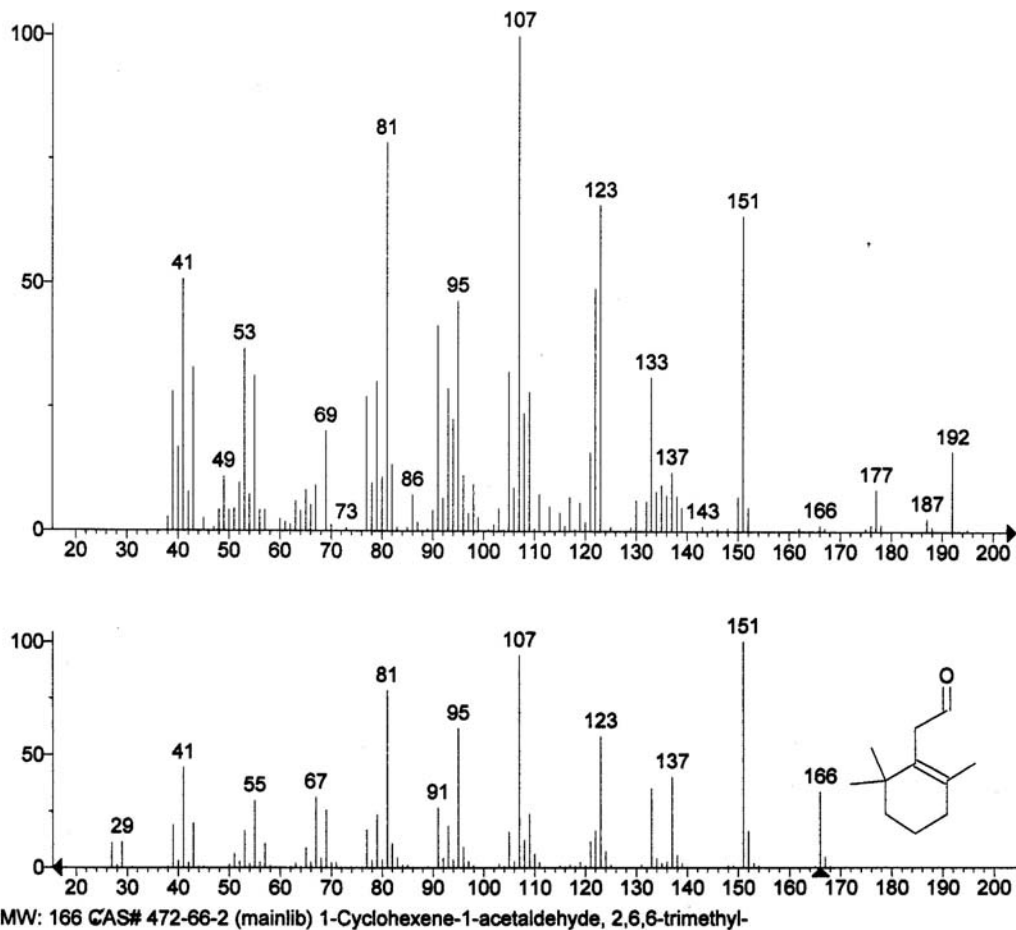


Abb. 5: Unbekanntes Probenspektrum (oben) und Strukturvorschlag der Ähnlichkeitssuche (unten). Da isomere terpenoide Strukturen praktisch identische Massenspektren zeigen, ist die vorgeschlagene Struktur nur als Modellverbindung zu betrachten.

Beispiel 4:

(Verzweigte) Alkylalkohole haben im unteren Massenbereich charakteristische Fragmente, sind aber sonst sehr schwer zu identifizieren, da sofort eine Wasserabspaltung erfolgt und viele Fragmente dann ein Alken vortäuschen.

- Im vorliegenden Fall in Abbildung 6 handelt es sich vermutlich um einen Alkylalkohol mit unbekannter Molekülmasse (m/z 138 ist eine Störung) zwischen ca. 130-150 u.
- Weitere Heteroatome sind nicht vorhanden, da sonst die Fragmente von α - bzw. induzierten Bindungsspaltungen vorhanden sein müssten. Solche Verbindungen sind oft biogenen Ursprungs und eine weitere Charakterisierung ist wegen Mangel an Information nicht möglich.

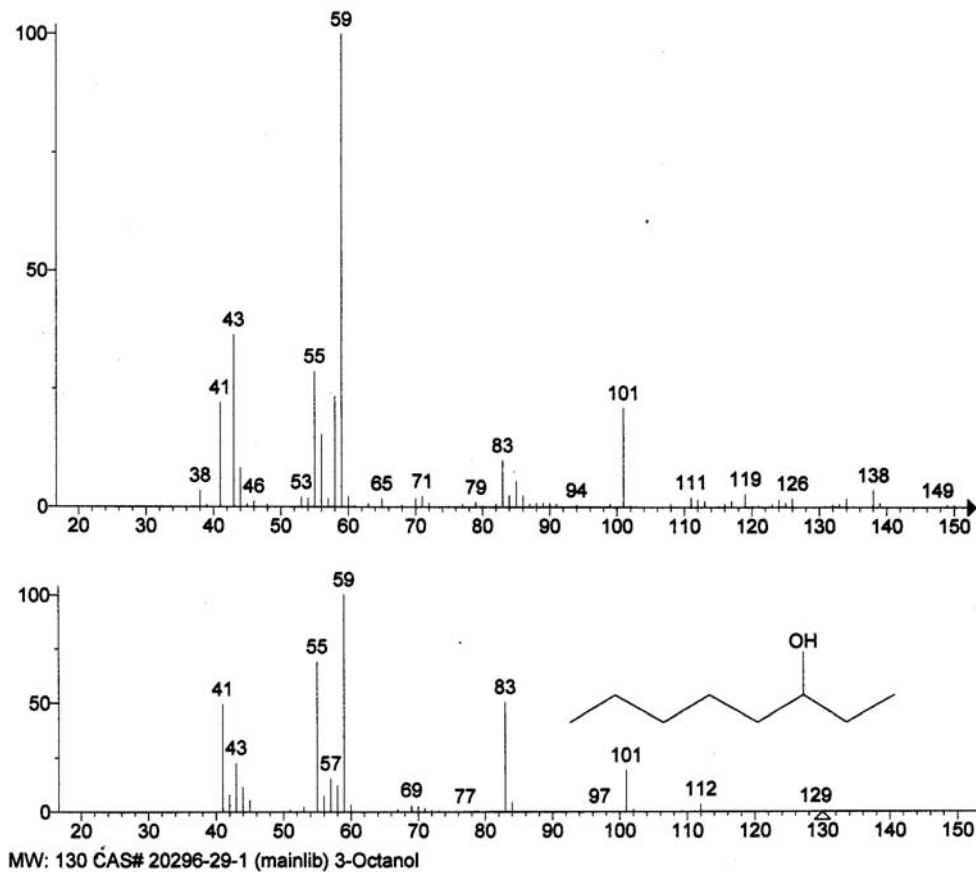


Abb. 6: Unbekanntes Probenspektrum (oben) und Strukturvorschlag der Ähnlichkeitssuche (unten). Die vorgeschlagene Struktur ist nur als Modellverbindung eines Alkylalkohols zu betrachten. m/z 138 ist eine Störung.

Beispiel 5:

Auch Steroidstrukturen haben ein charakteristisches Fragmentierungsmuster, wobei ab ca. Masse 200 ein Bereich mit wenig intensiven Fragmenten auftritt, bis dann je nach Substitution das Molekölion sichtbar ist:

- In Abbildung 7 zeigt das unbekannte Probenspektrum die typische Steroidring-Fragmentierung im Bereich m/z 40-140, darüber wird diese durch unterschiedliche Substitution und Strukturelemente beeinflusst.
- Ob Masse 304 u eine Molekölion ist, lässt sich nicht sagen (Masse 281 u ist eine Verunreinigung). Auch hier deutet die gefundene Verbindung lediglich an, dass es sich wohl um ein Steroid handelt. Es kann jedoch nicht abgeklärt werden, ob dieses biogenen oder anthropogenen Ursprungs ist.

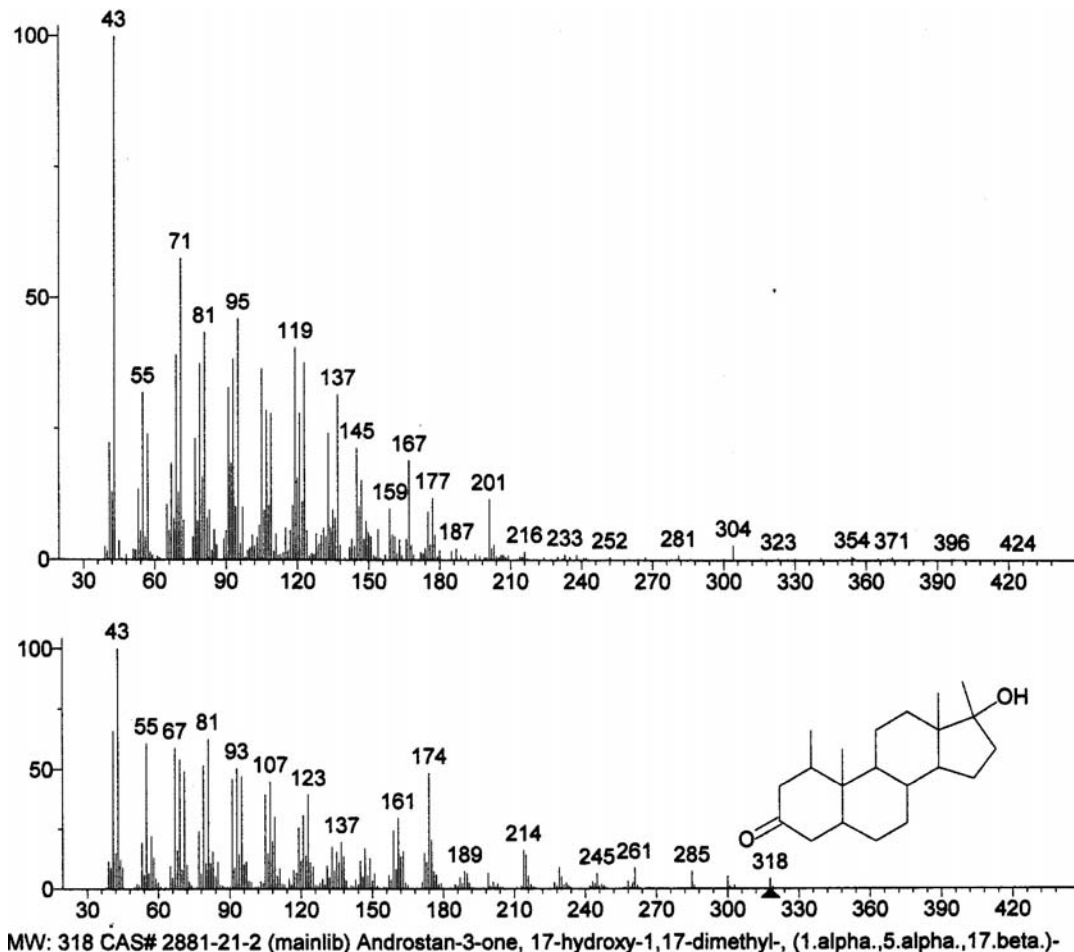


Abb. 7: Unbekanntes Probenspektrum (oben) und Strukturvorschlag der Ähnlichkeitssuche (unten). Die vorgeschlagene Struktur ist nur als Information zu deuten, dass es sich um eine Steroidstruktur handelt.

4.3 Verbindungen mit ungenügender Information im Massenspektrum

Unter den unbekanntem Verbindungen gibt es immer wieder Substanzen, deren Massenspektren zu wenig Information enthalten. Es werden zwei typische Kategorien präsentiert:

- Es gibt Strukturen, deren Massenspektren praktisch nur ein Fragment enthalten. Ein Beispiel sind Substanzen mit m/z 72, welches durch eine alkylierte N-Funktion ($C_4H_{10}N$) gebildet wird.
- Falls es über m/z 100 weder Fragmente noch ein Molekülion gibt, bedeutet dies, dass auf dem restlichen Molekül keine Ladung stabilisiert wird. Beispiele sind verzweigte Alkylamine sowie Derivate von Aminosäuren.
- Bei anderen Verbindungen wie z.B. den Insektizid Isolan, sieht man zusätzlich ein deutliches Molekülion, aber sonst kaum Fragmente. Ohne Zusatzinformationen durch andere Ionisationsmethoden (siehe Kapitel 5) kann man hier kaum Schlüsse ziehen.

Das in Abbildung 8 dargestellte Beispiel zeigt, wie gefährlich eine unkritische Interpretation einer Ähnlichkeitssuche sein kann.

- Die intensive Masse m/z 275 deutet zunächst auf das Molekülion einer N-haltigen Verbindung hin (z.B. polyzyklischer substituierter Aromat).
- Die Differenz von 17 u zum Fragment m/z 258 wäre dann ein Verlust 17 u, was einer OH-Gruppe entspricht. Dies machen aber nur aromatische Säuren, bei denen dann auch ein Verlust von 45 u ($-COOH$) auftreten muss.
- Somit ist m/z 336 ein besserer Kandidat für ein Molekülion einer Substanz, die kein N enthält.
- Der Vorschlag der Ähnlichkeitssuche bestätigt lediglich, dass es sich um einen mehrfachsubstituierten (O-haltige Gruppen) polyzyklischen Aromaten handeln kann, was man auch aus den Aromatenfragmenten unter m/z 100 sehen kann. Mehr lässt sich hier mit Hilfe der GC-MS mit Elektronenionisation nicht aussagen.

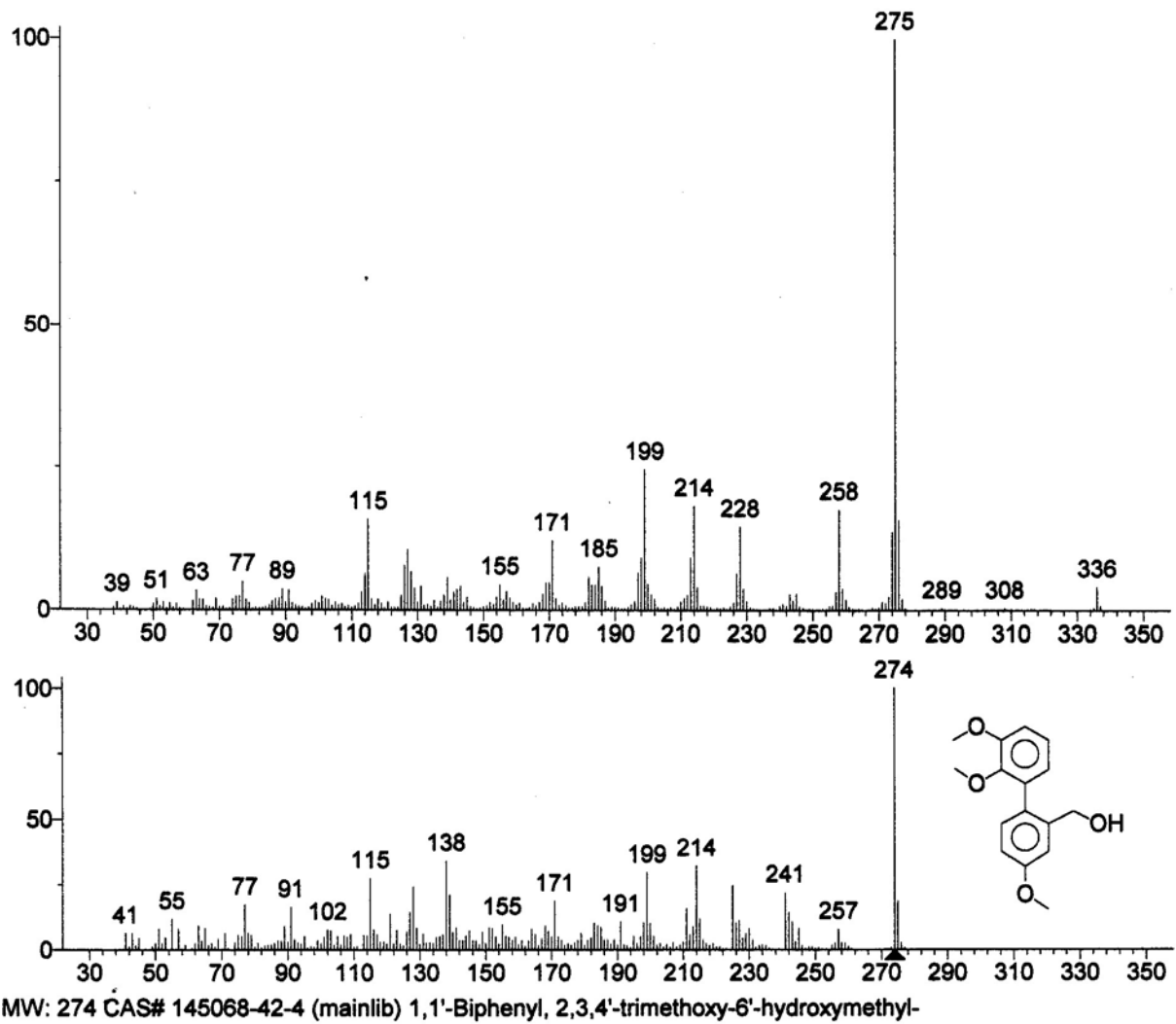


Abb. 8: Unbekanntes Probenspektrum (oben) und Strukturvorschlag der Ähnlichkeitssuche (unten). Die vorgeschlagene Struktur deutet lediglich an, dass es sich um eine (polyzyklische) aromatische Struktur mit diversen O-haltigen Substituenten handelt.

5 Abklärung mögliche biologische Aktivität durch wirkungsbezogene Analytik

Das Prinzip der wirkungsbezogenen Analytik (WBA) beruht darauf, dass der Probenextrakt mittels hochauflösender Dünnschichtchromatographie (HPTLC) vorgetrennt wird und danach die biologische Aktivität der einzelnen Substanzen durch Aufbringen einer Leuchtbakteriensuspension, eines Acetylcholin-Esterase-Tests oder durch weitere Verfahren bestimmt wird. Die Landeswasserversorgung Baden-Württemberg, Werk Langenau hat in letzter Zeit diese Testverfahren für die Routine weiterentwickelt. Vier verschiedene HPTLC-Trennverfahren ergeben die gleiche Auflösung wie hochauflösende Flüssigchromatographie und erlauben apolar bis hochpolare Verbindungen zu trennen. Gegenüber "in vitro"-Tests ist die Empfindlichkeit mindestens drei Größenordnungen besser (bis in den unteren pg-Bereich), und die Erstellung von Dosis-Effektkurven ist möglich.

Die WBA kann Aussagen zur biologischen Aktivität des Gesamtextraktes machen sowie zu einzelnen getrennten Verbindungen. Ein Ansprechen des Tests deutet auf eine biologische Aktivität der Substanz, wobei dies nicht mit einem zu erwartenden toxischen Effekt gleichgesetzt werden darf. Die WBA erlaubt aber eine Vorselektion von unbekanntem Verbindungen. In einem zweiten Schritt wird dann versucht, diejenigen mit einer starken Hemmung der Leuchtintensität mittels LC-MS weiter zu charakterisieren. Eine neue automatische Kopplung von HPTLC mit LC-MS VEREINFACHT SEIT KURZER Zeit diesen Schritt.

Der Bezug zu mit GC-MS gefundenen Verbindungen kann auch hergestellt werden, ist aber aufwändig. Dazu müssen Trennungen des GC-MS-Probenextraktes mit HPTLC durchgeführt und die Identität der getrennten Substanzen durch erneute GC-MS-Analysen bestätigt werden (u.U. durch Herauslösen aus der HPTLC-Platte). Die WBA kombiniert mit LC-MS sollte daher eher als eigenständige Ergänzung der Extraktcharakterisierung mittels GC-MS angesehen werden.

6 Alternative Ionisationsmethoden

Biologische Prozesse sowie die biologische Aktivität einer Verbindung sind häufig mit Elektronentransfer- und Redoxprozessen verknüpft. Verbindungen, welche negative Ladungen stabilisieren können, zeigen daher oft diverse toxische Effekte. In der Massenspektrometrie wird auch die Negativionen-Detektion angewendet („negative ion chemical ionisation“, NICI-MS). Diese kann Verbindungen nachweisen, die eine hohe Elektronenaffinität haben.

Frühere Studien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Detektionsfähigkeit mittel NICI-MS sowie gewissen toxischen Effekten besteht^{*)}. Diese wurden in den letzten Jahren bestätigt. Ein extremes Beispiel ist die Gruppe der polyzyklischen Aromaten (PAK, inklusive Methyl-PAK, N-PAK etc.), bei denen nur Vertreter einen NICI-Respons ergeben, welche karzinogen und/oder mutagen sind (Übereinstimmung >90%). So ist z.B. das nichtkarzinogene Benzo(e)pyren unsichtbar, während das karzinogene Benzo(a)pyren mit NICI-MS nachweisbar ist. Andere Verbindungen, die einen hohen NICI-Respons ergeben, sind z.B. Pyrethroide, Triazine oder Nitroaromaten. Substanzklassen wie Alkane, Alkene, Fettsäuren, Terpene etc. haben keinen NICI-Respons.

Eine zusätzliche Detektion mittels NICI-MS ist daher eine weitere Informationsquelle bei Probenextrakten, die eine hohe Anzahl nicht identifizierbarer Unbekannter enthält. Können diese nicht mit NICI nachgewiesen werden, so sind sie in der Regel weniger von Interesse. Dagegen sollten Verbindungen mit einem hohen NICI-Respons zusätzlich abgeklärt werden.

^{*)} Determination of isomeric polycyclic aromatic hydrocarbons in air particulate matter by high resolution gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. M. Oehme, Anal. Chem. 55, 2290-2295 (1983).
Selective determination of substituted PAH in aerosols using liquid CO₂-extraction, HPLC prefractionation on chemically activated silica and HRGC combined with negative ion mass spectrometry. H. Stray, S. Manø, A. Mikalsen and M. Oehme, HRC & CC 7, 74-82 (1984).

Negative ion chemical ionization mass spectrometry - A useful technique for the selective detection of polar substituted polycyclic aromatic hydrocarbons with mutagenic properties. M. Oehme, Chemosphere 14, 1285-1297 (1985).

7 Schlussfolgerungen

Die Charakterisierung von unbekanntem Verbindungen (nicht in Spektrensammlungen vorhanden) kann durch das beschriebene operative Konzept wesentlich verbessert werden. Es erlaubt in vielen Fällen Aussagen zu:

- Stoffklasse,
- Herkunft, und
- ökotoxikologischen Aspekten

Dadurch wird die Beurteilung von Wasserproben in Bezug auf das Vorkommen umweltrelevanter Verbindungen erleichtert. Zusätzliche Pilotprojekte sind jedoch nötig, um die Validität des beschriebenen Konzeptes weiter zu untermauern.