



Heinz Singer, Umweltchemiker, untersucht das Vorkommen von Spurenstoffen in Gewässern. Koautoren: Matthias Ruff, Juliane Hollender

# Auf der Suche nach den Unbekannten

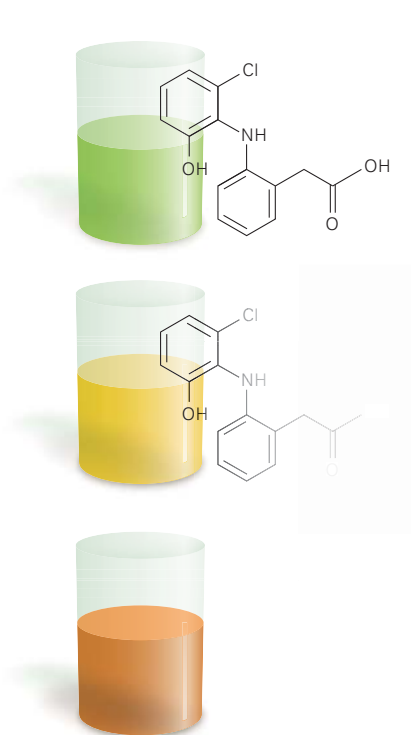
Organische Mikroverunreinigungen sind in Gewässern generell unerwünscht. Sie können Gewässerorganismen bereits in sehr niedrigen Konzentrationen schädigen. Bisherige Analysetechniken mussten sich technikbedingt auf den Nachweis weniger, bekannter Substanzen beschränken. Mit neuen Methoden lassen sich auch unentdeckte Stoffe erfassen.



Aus Haushalten, der Industrie oder der Landwirtschaft gelangen unzählige Mikroverunreinigungen in den Rhein (im Bild der Basler Rheinhafen).

Zurzeit sind in der weltweit grössten Chemikaliendatenbank SciFinder über 65 Millionen Substanzen registriert, ein Grossteil davon synthetische organische Stoffe. Das Inventar wächst täglich um 15 000 Einträge und ein Ende dieser rasanten Entwicklung ist nicht in Sicht. Das ist nicht erstaunlich, wenn man

bedenkt, dass theoretisch eine Dezillion (eine Eins mit 60 Nullen) verschiedene chemische Strukturen möglich sein sollte. Welcher Anteil der heute bekannten Substanzen in nennenswerten Mengen verwendet wird, ist schwer abzuschätzen. Einen Anhaltspunkt gibt die Anzahl Stoffe, die seit dem Inkrafttreten



<b>Strategie 1</b>	Substanz bekannt/ Referenzsubstanz vorhanden	Eindeutige Identifizierung und exakte Quantifizierung möglich
	Die Substanzanzahl pro Analyse unterliegt hierbei kaum einer Einschränkung.	
<b>Strategie 2</b>	Substanz vermutet / keine Referenzsubstanz vorhanden	Qualitative Detektion möglich
	Für die Detektion ist zunächst nur die Molekülstruktur und damit die exakte Masse nötig. Eine Bestätigung der Befunde kann durch den Abgleich mit Bibliothekenspektren oder nach- träglich gekauften Referenzsubstanzen erfolgen.	
<b>Strategie 3</b>	Substanz unbekannt	Zuordnung von Molekül- strukturen oft möglich
	Alle verbleibenden Massensignale werden durch unbekannte Substanzen aus der Probe erzeugt. Diesen Unbekannten lassen sich anhand der exakten Masse und der Fragmentierungs- information in vielen Fällen Molekülstrukturen zuordnen.	

Abb. 1: Mess- und Auswertestrategien für den umfassenden Substanznachweis mittels der an die hoch auflösende Massenspektrometrie gekoppelte Flüssigchromatografie (LC-HRMS-Technik) [1].

der Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (Reach) im Jahr 2007 in der EU gemeldet wurden. Demnach produziert oder importiert Europa etwa 140 000 Chemikalien.

In welchem Ausmass und über welche Eintragswege diese Stoffe in die Gewässer gelangen, schätzt man mithilfe von Modellrechnungen ab. Zuverlässige Vorhersagen lassen sich jedoch nur selten machen, da die notwendigen Informationen zu Einsatzmengen, Anwendungsorten oder Substanzeigenschaften meist nicht hinreichend sind. Angesichts der kaum fassbaren Chemikalienvielfalt erscheint die Palette an Substanzen, die bisher auf diese Weise evaluiert und schliesslich in Gewässern auch nachgewiesen wurden, verschwindend klein, obwohl sie bereits mehrere tausend Verbindungen umfasst.

### Umfangreichere Analysen möglich

Forschungsinstitute und Behörden haben in den letzten Jahrzehnten im Abwasser, in Oberflächengewässern und im Grundwasser vor allem Haushalts-, Agro- und Industriechemikalien wie zum Beispiel Pestizide, Arzneimittel, Tenside, Weichmacher und Steroidhormone gefunden und überwacht. Zunehmend empfindlichere Detektionsverfahren ermöglichten dabei immer genauere Analysen.

Seit den 1990er-Jahren ist die Gaschromatografie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (siehe Kasten S. 11) die Methode der Wahl für viele unpolare oder leichtflüchtige Substanzen. Die Kopp-

lung der Flüssigchromatografie mit der Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht den Nachweis polarer und sehr wassergängiger Moleküle. Mit diesen Verfahren lassen sich allerdings pro Analyse nur einige Dutzend Stoffe untersuchen. Zudem muss man sich vor der Analyse für eine Auswahl von Substanzen entscheiden und die Empfindlichkeit des Detektors auf diese einstellen. Unter diesen Voraussetzungen lässt sich nicht einmal ansatzweise ermitteln, welche Substanzen sich in einer Probe befinden.

Die Einführung der hoch auflösenden Massenspektrometrie hat das grundlegend geändert. Mit dieser Technik ist es möglich, Molekülmassen extrem genau zu bestimmen. Ausserdem können Moleküle mit einer Massendifferenz getrennt werden, die sich nur um 0,001 atomare Masseneinheiten ( $1,66 \times 10^{-30}$  Kilogramm) unterscheiden. Nahezu jede detektierte Substanz liefert so ein spezifisches Signal. Das Verfahren eignet sich zudem für den gesamten Massebereich, in dem Umweltchemikalien vorkommen. Mit der Flüssigchromatografie kombiniert lassen sich damit viele der erfassten Chemikalien mit einer hohen Nachweisempfindlichkeit identifizieren. Anders als bisher kann die Identifizierung ohne Referenzsubstanzen erfolgen. Diese sind nur noch nötig, um die Befunde zu quantifizieren. Grundsätzlich können drei Analysestrategien verfolgt werden (Abb. 1).

Die an die hoch auflösende Massenspektrometrie gekoppelte Flüssigchromatografie (LC-HRMS-Technik) könnte sich dank diesen Vorzügen vor allem bei der routinemässigen Gewässerbeobachtung als Standardmethode etablieren. Neben der Mög-



Abb. 2: Nach dem Chemieunfall bei Schweizerhalle 1986 installierten die Anrainerstaaten des Rheins mehrere Überwachungs- und Probenahmestationen.

Arzneimittel und Umwandlungsprodukte (39,6%)



Abb. 3: Zurzeit analysiert die Rheinüberwachungsstation Weil am Rhein bei Basel täglich 318 bekannte Mikroverunreinigungen. So will man langfristige Entwicklungen erfassen und problematische Einleitungen möglichst schnell entdecken.

lichkeit, eine nahezu unbeschränkte Anzahl Substanzen mit optimaler Nachweisempfindlichkeit zu detektieren, kann man aus den hoch aufgelösten Daten auch jederzeit nachträglich weitere Stoffe bestimmen. So lassen sich zum Beispiel Chemikalien, die neu als gewässerrelevant erachtet werden, aus früheren Messungen herausfiltern und so Gewässerbelastungen der Vergangenheit rekonstruieren.

**Lehren aus Schweizerhalle**

Die internationale Rheinüberwachungsstation Weil am Rhein bei Basel setzt die neue Messtechnik bereits seit einigen Jahren erfolgreich ein. Mehr als 20 Millionen Menschen beziehen ihr Trinkwasser aus dem Rhein. Sein Einzugsgebiet erstreckt sich von den Schweizer Alpen bis in die dicht besiedelten Gebiete Deutschlands und der Niederlande. Neben gereinigtem Abwasser aus Haushalten und Industriebetrieben fließt auch Wasser aus intensiv genutzten landwirtschaftlichen Flächen und ausgedehnten Siedlungsgebieten in den Fluss. Die Überwachungsstation wurde 1992 in Betrieb genommen, nachdem sich 1986 der grosse Chemieunfall im Sandoz-Werk Schweizerhalle ereignet hatte (Abb. 2). Bei einem Grossbrand flossen damals mit dem Löschwasser grosse Mengen giftiger Chemikalien in den Rhein, was erhebliche ökologische Schäden verursachte und die tagelange Stilllegung der flussabwärts gelegenen Trinkwasserwerke erzwang.

Seitdem werden an der Rheinüberwachungsstation täglich Wasserproben gemessen, um langfristige Trends in der Gewässerqualität sowie zeitnah Fehleinleitungen und Havarien erfassen zu können. Dazu entwickelte die Eawag zusammen mit dem Amt für Umwelt und Energie Basel-Stadt basierend auf dem LC-HRMS-Verfahren eine mehrstufige Analysestrategie [2]. Innerhalb eines Tages werden die Proben schrittweise auf bekannte, verdächtige und unbekannte Substanzen untersucht. Die Stoffliste der bekannten Substanzen umfasst derzeit 318 Chemikalien und deren Umwandlungsprodukte aus der Gruppe der Pestizide, Biozide, Arzneimittel, Betäubungsmittel, Industriechemikalien, Korrosionsschutzmittel und Süsstoffe (Abb. 3). Die Liste wird laufend mit neuen Erkenntnissen aus Literaturstudien sowie mit Messresultaten aus nationalen und internationalen Monitoringprogrammen aktualisiert.

Die Analysen zeigen, dass 84 der 318 Stoffe aus Haushalt, Industrie und Landwirtschaft regelmässig im Rhein nachgewiesen werden (Abb. 4). Etwa die Hälfte der detektierten Substanzen verursacht mit Konzentrationen von weniger als 10 Nanogramm pro Liter eine kaum nachweisbare Belastung des Rheins. Wenige Substanzen überschreiten den gemäss Gewässerschutzverordnung geltenden Anforderungswert für Pestizide von 100 Nanogramm pro Liter. Bei dieser Konzentration und einem mittleren Abfluss von etwa 1000 Kubikmetern pro Sekunde verfrachtet der

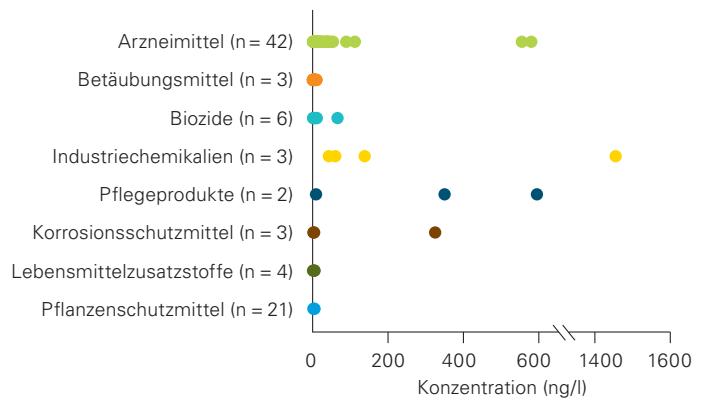
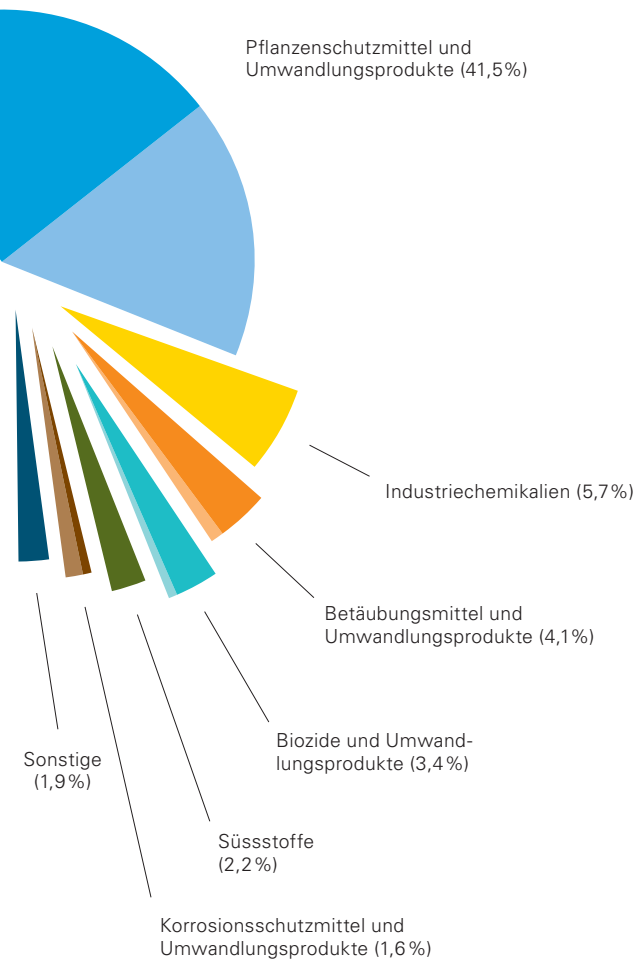


Abb. 4: 84 Chemikalien aus Haushalten, der Industrie und der Landwirtschaft können im Rhein regelmässig nachgewiesen werden.

Fluss jedoch bereits je über 10 Kilogramm dieser Substanzen pro Tag in Richtung Deutschland.

### Unbekannte Stoffe aufspüren

Obwohl der Analysenumfang verglichen mit bisherigen Methoden enorm ist, bleibt unklar, welcher Anteil der im Rhein vorhandenen Substanzen tatsächlich erfasst wird. Um auch die unbekanntesten Stoffe zu erfassen, hat die Eawag eine Software entwickelt, die aus den Massenspektrometriedaten alle vorhandenen Substanzsignale extrahiert, nach Intensität sortiert und Hintergrundsignale eliminiert. Die Auswertung offenbart, dass eine Probe neben den quantifizierten Mikroverunreinigungen durchschnittlich zwischen 2000 und 3000 weitere Chemikalien enthält. 100 bis 150 der Stoffe weisen Signalintensitäten auf, die eine Konzentration von über 10 Nanogramm pro Liter erwarten lassen. Eine Vielzahl organischer Substanzen im Rhein blieb bislang also unentdeckt. Ob dies synthetische oder natürlich vorkommende Stoffe sind, gilt es zu klären.

Für solche unbekanntesten Substanzen liegen ausser den Analysedaten wie der genauen Molekülmassen oder Isotopenmuster keine weiteren Informationen vor. Das Aufspüren verdächtiger Stoffe muss deshalb gemäss der Strategie 2 erfolgen (Abb. 1). Da Referenzsubstanzen fehlen, fahndet man innerhalb der gewässerrelevanten Gruppe der Pestizide, Biozide und Arzneimittel nach registrierten Wirkstoffen, die entsprechende Molekülmassen

aufweisen. Positive Treffer können gegebenenfalls mithilfe von Spektrenbibliotheken weiter abgesichert werden.

Die meisten unbekanntesten Substanzmassen muss man allerdings einer aufwändigen Auswertungsprozedur unterziehen (Strategie 3). Anhand der exakten Masse und des Isotopenmusters lässt sich für jede Substanz zunächst eine eindeutige Summenformel angeben. Danach sucht man in spezialisierten Datenbanken dazu passende Substanzstrukturen. Ein Vergleich der Fragmentierungsmuster führt schliesslich zur wahrscheinlichsten Struktur. Mit diesem Vorgehen konnten wir zum Beispiel das Antidepressivum Moclobemid erfolgreich nachweisen. Zwischen dem 12. und 28. Januar 2011 tauchte die Chemikalie in den Rhein-Proben plötzlich als starkes Massesignal auf, das sich der Summenformel  $C_{13}H_{17}Cl_1N_2O_2$  zuordnen liess (Abb. 5). Eine Messkampagne entlang des gesamten Rheins während einer zweiten Einleitungsphase vom 9. bis zum 15. März 2011 wies dabei eindeutig auf eine Punktquelle zwischen Rheinfelden und Basel hin. Abschätzungen ergaben, dass in diesem Zeitraum etwa 14 Kilogramm Moclobemid in den Fluss gelangten, im Januar waren es rund 40 Kilogramm. Die Substanzspur liess sich bis zur Mündung in die Nordsee verfolgen. Abschätzungen zeigten, dass die detektierten Moclobemid-Konzentrationen kein erhöhtes Risiko für den Rhein und das aus dem Uferfiltrat hergestellte Trinkwasser darstellten [3].

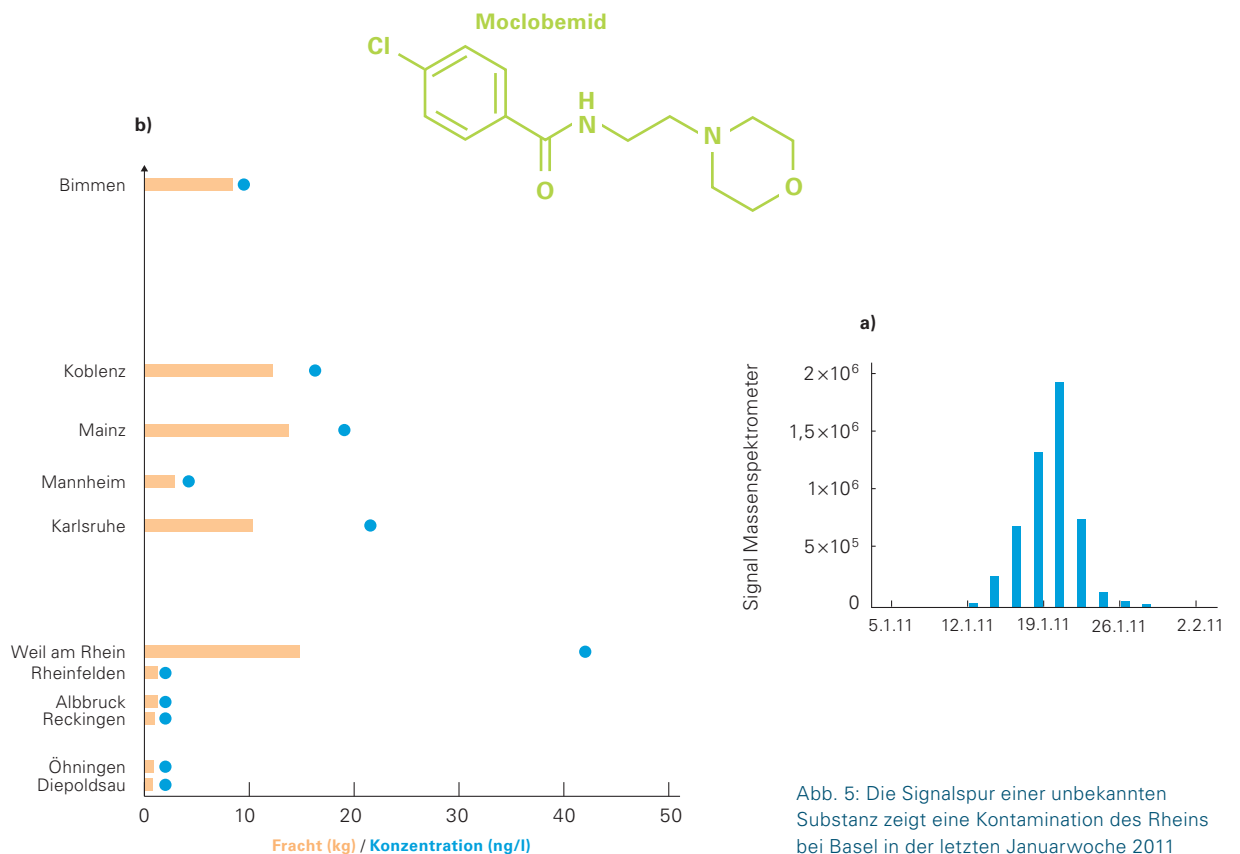


Abb. 5: Die Signalspur einer unbekanntem Substanz zeigt eine Kontamination des Rheins bei Basel in der letzten Januarwoche 2011 an (a). Während der zweiten Einleitungswelle wurde die Substanz von der Schweiz bis in die Niederlande mit Messungen verfolgt (b).

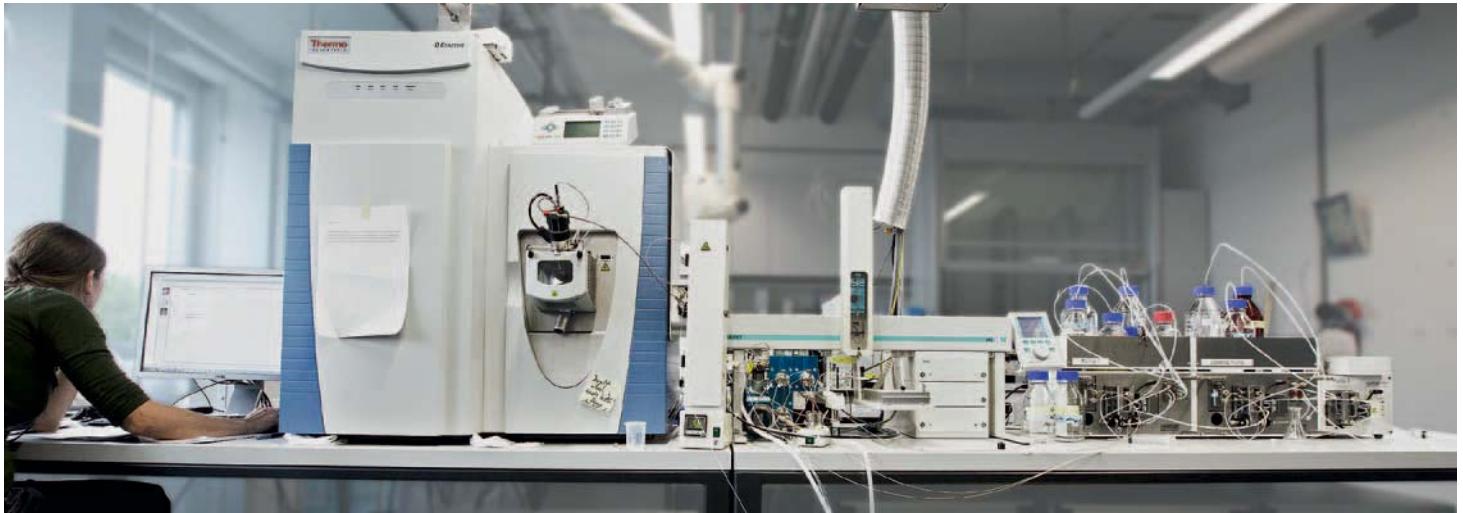
Mit der LC-HRMS-Technik hat man eine Methode zur Hand, um Havarien und Fehleinleitungen aufzuspüren. Da die Verursacher solche Unfälle oft gar nicht bemerken oder die Einleiter die genaue Zusammensetzung des abgegebenen Abwassers sehr häufig nicht kennen, kann die tägliche Messung Schadstoffspitzen im Rhein zeitnah erfassen und die Identität der Stoffe im Idealfall aufklären. Allerdings ist das Identifizierungsprozedere für die tägliche Routine im Moment noch zu zeitaufwändig. Deswegen soll als nächster Schritt die Detektion von plötzlich auftretenden Substanzmassen mithilfe statistischer Auswertemethoden in den Tagesablauf der Messstation eingebunden werden.

#### Nachweis unbekannter Umwandlungsprodukte

Das Monitoring organischer Mikroverunreinigungen in grossen Einzugsgebieten und auf nationaler Ebene umfasst aus Kostengründen meist nur ausgewählte Leitsubstanzen. Um die Auswahl dieser Substanzen überprüfen zu können, wendete die Eawag in Zusammenarbeit mit dem Bund und den Kantonen die LC-HRMS-Technik im Rahmen mehrerer Pilotstudien an. Im nationalen Grundwasserbeobachtungsnetz (Naqua), im Beobachtungsnetz für Oberflächengewässer (Nawa) sowie im Boden- und Vierwaldstättersee wurden Analysen durchgeführt. Expositionsmodelle, welche die Belastung rechnerisch vorhersagen, ergänzten die Messungen. So liessen sich zum Beispiel mit einem Stoffflussmodell die Belastungen für das Einzugsgebiet des Bodensees voraussagen und die Substanzen komplementär dazu mit der Analytik gezielt an ausgewählten Standorten bestimmen [4].

Dass dieses Vorgehen auch in extrem grossräumigen Einzugsgebieten wie dem Haihe-Flusssystem im Nordosten Chinas funktioniert, zeigen die Ergebnisse aus einer internationalen Zusammenarbeit (siehe auch Artikel Seite 36). Das Flusssystem erstreckt sich über 300 000 Quadratkilometer. Mehr als 20 Millionen Einwohner leben und arbeiten im Einzugsgebiet. Die Vorhersage, welche organischen Mikroverunreinigungen vorgefunden werden, ist damit äusserst schwierig. Mit LC-HRMS-Analysen liessen sich die relevanten Substanzen aufgrund weniger Proben ermitteln. Nachfolgend wurden diese Leitsubstanzen hinsichtlich ihres Eintrags und Verbleibs im Einzugsgebiet untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Kläranlagen von Peking die grösste Quelle für organische Mikroverunreinigungen darstellen. Da über 90 Prozent des Wassers flussabwärts zur Bewässerung eingesetzt werden, gelangen die organischen Mikroverunreinigungen auch auf die Felder [5].

Neben der Gewässerbeobachtung liefert die hoch auflösende Massenspektrometrie ebenso in Experimenten wichtige Zusatzinformationen. So konnte die Eawag bei Versuchen zum biologischen Abbau im Abwasser im Labor bisher unbekannte Umwandlungsprodukte von Arzneimitteln nachweisen [6]. Ein computerbasiertes Expertensystem lieferte zunächst mögliche Umwandlungsprodukte. Mittels LC-HRMS wurde dann im Abwasser nach den vermuteten Strukturen gesucht. Die nachgewiesenen Verbindungen liessen sich zum Teil nach dem Vergleich mit Referenzsubstanzen in Proben von Kläranlagen identifizieren [7].



Rauf, Schäffner

Die Beispiele aus Forschung und Praxis offenbaren das grosse Potenzial der neuen Analysetechnik. Dieses lässt sich allerdings nur dann voll ausschöpfen, wenn die Entwicklung effizienter und für die Automatisierung geeigneter Software-Routinen vorangetrieben wird. Denn wie in anderen datenintensiven Fachgebieten hängt der Erfolg massgeblich von den Fortschritten in der Datenanalyse ab. Die Verschmelzung von massenspektrometrischen Methoden mit geeigneten computergestützten Auswertungsalgorithmen stellt eine Grundvoraussetzung dar, damit diese Technik in Zukunft ihre volle Leistungsfähigkeit entfalten kann.

heinz.singer@eawag.ch

- [1] Krauss M., Singer H., Hollender J. (2010): LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 397, 943–951.
- [2] Singer H., Huntscha S., Hollender J., Mazacek J. (2009): Multi-komponenten-Screening für den Rhein bei Basel. Abschlussbericht, Eawag, in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Umwelt BAFU, S. 62.
- [3] F. Hoffmann-La Roche AG/Ltd Basel: Predicted no-effect concentration (PNEC) according to EU Technical Guidance Document (TGD) on Risk Assessment; derived no-effect level (DNEL) according to Straub and Flückiger, 2010, SETAC Europe.
- [4] Longrée P., Singer H., Moschet C., Götz C., Schärer M., Keusen M. (2011): Organische Mikroverunreinigungen im Bodensee. GWA 7.
- [5] Heeb F., Singer H., Pernet-Coudrier B., Qi W., Liu H., Longrée P., Müller B., Berg M. (2012): Organic micropollutants in rivers downstream of the megacity Beijing: Sources and mass fluxes in a large-scale wastewater irrigation system. *Environmental Science and Technology* 46, 8680–8688.
- [6] Helbling D., Hollender J., Kohler H.P., Singer H., Fenner K. (2009): High-throughput identification of microbial transformation products of organic micropollutants. *Environmental Science and Technology* 44, 6621–6627.
- [7] Kern S., Fenner K., Singer H., Schwarzenbach R., Hollender J. (2009): Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 43, 7039–7046.

## Nachweismethoden

Mit der **Chromatografie** lassen sich Substanzgemische in die Einzelstoffe auftrennen. Das Gemisch wird dabei mittels einer mobilen Phase durch eine Trennsäule geleitet, die mit einer stationären Phase (modifizierte Kieselgelpartikel oder beschichtete Kapillarsäule) versehen ist. Von dieser werden die einzelnen Inhaltsstoffe aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften mehr oder weniger stark zurückgehalten und dadurch voneinander getrennt. Ein Detektor misst die nacheinander aus der Säule austretenden Stoffe als elektrische Signale. Ein Vergleich mit den Kurven von Referenzsubstanzen (Kalibrierkurven) ermöglicht die Identifizierung. Anhand von Höhe und Breite der Signale (Peaks) lassen sich die Stoffmengen berechnen. Bei der **Gaschromatografie** wird als mobile Transportphase Gas (meist Helium oder Wasserstoff) eingesetzt und bei der **Flüssigchromatografie** werden Flüssigkeiten (Gemische aus organischen Lösungsmitteln oder Wasser) verwendet. Somit können mit der Gaschromatografie lediglich verdampfbare Substanzen analysiert werden, wogegen mit der Flüssigchromatografie alle löslichen Verbindungen getrennt werden können. Aufgrund der Selektivität und Nachweisempfindlichkeit werden als Detektoren heute meist Massenspektrometer eingesetzt.

Mit der **Massenspektrometrie** kann die Molekülmasse bestimmt werden. Dazu werden die zu analysierenden Substanzen nach der chromatografischen Trennung in einem Interface ionisiert. Im Massenspektrometer werden die Ionen anschliessend in einem elektrischen oder magnetischen Feld nach ihrer Masse und Ladung getrennt und detektiert. Neben den intakten Molekülen entstehen auch Fragmente. Deren Grösse und Häufigkeit können zur Identifizierung der Stoffe herangezogen werden. Um die Selektivität und Messempfindlichkeit zu verbessern, schaltet man bei der **Tandem-Massenspektrometrie** zwei Geräte hintereinander. Ein **hoch auflösendes Massenspektrometer** kann die Ionenmasse sehr genau bestimmen. Dadurch lassen sich auch Ionen mit sehr ähnlicher Masse und Ladung auftrennen. Dies nutzt man bei unbekanntem Verbindungen zur Entschlüsselung ihrer Strukturen.