



Analyse von hochmolekularen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (6-8 Ring PAK) in diversen Umweltmatrices mittels Flüssigchromatographie – Atmosphärendruck-Laserionisation – Massenspektrometrie (LC-APLI-MS)

Jan B. Thiäner (janthiaener@uni-muenster.de), Christine Achten (achten@uni-muenster.de)

Abstract

Für den sensitiven und selektiven Nachweis von hochmolekularen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) mit 6-8 Ringen wurde eine Methode mittels Flüssigchromatographie – Atmosphärendruck-Laserionisation – Massenspektrometrie entwickelt. Die LC-APLI-MS-Methode ist etwa um den Faktor 1.000 empfindlicher, als die etablierte GC-MS Methodik und ermöglicht erstmals die Detektion von 7-8 Ring PAK in Umweltproben. Verschiedene Proben zeigen ähnliche, wiederkehrende Verteilungsmuster für 6-8 Ring PAK. Möglicherweise befinden sich toxikologisch bedeutsame Verbindungen darunter, die in der Umwelt auftreten; dies ist bisher noch unklar.

Einleitung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) entstehen bei unvollständigen Verbrennungen oder in geologischen Prozessen durch Kondensationsreaktionen während der Kohle- und Erdölgenese. PAK sind aufgrund der zahlreichen Emissionsquellen, wie beispielsweise Hausfeuerung, Verkehr, Industrie, Müllverbrennung, Vulkanausbrüche oder Waldbrände weltweit verbreitet und in unterschiedlichsten Umweltmatrices wie Böden, Sedimenten, Grundwasser, Klärschlämmen, Gletschereis, Ruß, Kohle oder Öl nachweisbar (Ravindra et al., 2008; Achten und Hofmann, 2009; Lima et al., 2005; Becker et al., 1997).

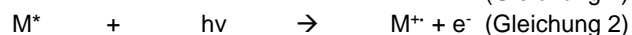
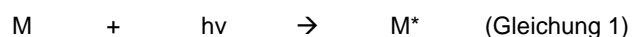
Die Stoffgruppe der PAK umfasst Hunderte bis Tausende Verbindungen, von denen üblicher Weise meist nur ein Bruchteil der niedermolekularen PAK (ausgewählte Muttersubstanzen) bis zu einem Molekulargewicht von m/z 278 auf die Umweltbedeutung untersucht werden (16 EPA-PAK). Mit zunehmender Ringanzahl der PAK nimmt auch die Toxizität meist zu, so dass es möglich wäre, weitere PAK mit sieben bis acht Ringen und starker Umweltrelevanz nachzuweisen. Es existieren hierzu jedoch kaum optimale Analysemethoden und folglich auch kaum Erkenntnisse über das Umweltvorkommen solcher Verbindungen. Einige wenige Studien belegen das erwartungsgemäße Vorkommen in pyrogenen Matrices (Bagley und Wornat, 2013; McClaine et al., 2006).

Die Toxizität von PAK wird analog dem Konzept bei den Dioxinen und polychlorierten Biphenylen (PCB) mittels Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) angegeben, wobei der am stärksten karzinogenen Substanz der 16-EPA-PAK, dem Benzo[α]pyren, per Definition der Wert 1 zugeordnet wird. Die Toxizität aller

weiteren PAK wird als Vielfaches zum TEF von Benzo[α]pyren angegeben. Als besonders toxisch und karzinogen gelten die Dibenzopyrene (m/z 302, 6-Ring PAK, TEF = 10, 10, 10 und 1 für die vier Isomere), die bis zu 31% der Gesamttoxizität von Dieselruß (Bergvall und Westerholm, 2009) und 63% der Gesamttoxizität von Holzruß (Achten et al., 2015) ausmachen können. Üblicherweise werden die Toxizitäten der Dibenzopyrene und höhermolekularer Verbindungen in Untersuchungen nicht erfasst. Auch mittels Flüssigchromatographie-Fluoreszenzdetektion werden meist nur die 16 EPA-PAK analysiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass höhermolekulare PAK meist hohe Siedepunkte aufweisen und somit nicht über die nötige Volatilität für die etablierte Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) verfügen. Zudem fehlt es an kommerziell erhältlichen 6-8 Ring PAK Referenzstandards.

Das Ziel dieser Studie ist die Methodenentwicklung und eine erste Anwendung zum Nachweis von PAK, einschließlich der 6-8 Ring PAK, in diversen Umweltproben mittels Flüssigchromatographie – Atmosphärendruck-Laserionisation – Massenspektrometrie (LC-APLI-MS).

Als Ionisationsquellen für unpolare Aromaten eignen sich Photoionisations- und Laserionisationsquellen (Schiewek et al., 2007). Hierbei gewinnen die Atmosphärendruckquellen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Bei der Atmosphärendruck-Laserionisation (APLI) werden die aromatischen Moleküle in einem resonanzverstärkten Mehrphotonenionisationsprozess (1+1 REMPI) bei einer Wellenlänge von 248 nm (entspricht 5 eV) ionisiert. Hierbei wird das Ausgangsmolekül M durch den Einfang eines ersten Photons in einen angeregten Zwischenzustand überführt M^* (Gleichung 1). Im zweiten Schritt wird ein weiteres Photon eingefangen und ein Radikalkation M^+ erzeugt (Gleichung 2).



Da lediglich aromatische Verbindungen ein ausreichend langlebigen Zwischenzustand M^* für den Einfang des zweiten Photons besitzen, wird mit der APLI eine starke Selektivität erreicht. Weitere nicht aromatische Moleküle, wie sie beispielsweise in der Probenmatrix auftreten können, werden aufgrund der niedrigen Photonenenergie von 5 eV nicht ionisiert. Da vor allem PAK einen hohen linearen Absorptionsquerschnitt auf-

weisen und die eingesetzten Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 248 nm nicht absorbieren, ermöglicht die APLI zudem Messungen mit sehr guter Sensitivität.

Während eine Kopplung von GC-APLI-MS bereits auf Umweltproben angewandt wurde (Stader et al., 2013), ist mit einer Kopplung von LC-APLI-MS bisher nur Rohöl untersucht worden (Lababidi et al., 2013).

Material und Methoden

Analytisches Setup

Für die Methodenentwicklung wurde ein Standard-Mix mit 59 PAK genutzt. Dieser Standard-Mix enthält neben den 16 EPA-PAK auch alkylierte PAK sowie Dibenzopyrene und Naphthofluoranthene (m/z 302). Der Schwerpunkt bei der Methodenentwicklung lag auf einer guten chromatographischen Trennung und sensitiven Detektion der höhermolekularen PAK ($m/z >300$). Für die Flüssigchromatographie wurde eine Shimadzu Prominence XR UFLC Anlage mit einer Macherey-Nagel Nucleodur C18 PAH Säule (100 mm, 2 mm ID, 1,8 μ m Partikel) ausgestattet. Im Gradientenverfahren mit Methanol und Acetonitril wurden 15 μ l bei einer Flussrate von 0,3 ml/min injiziert. Die Laserionisation erfolgte über eine spezielle, kommerziell erhältliche Ionenquelle (iGenTrax, Deutschland), in die Laserlicht mittels eines KrF-Excimerlasers (ATL Lasertechnik, Deutschland, 100 Hz, 5 mJ, 248 nm, 5eV) eingestrahlt wird. Die Detektion erfolgte mittels eines hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometers (Bruker Maxis 3G, Deutschland).

Probenmaterial und Extraktion

Für die PAK-Analytik wurden drei Probenmaterialien und ein zertifiziertes Referenzmaterial (CRM), das auch höhermolekulare PAK enthält, ausgewählt und analysiert:

- (1) CRM „Organics in Marine Sediment“ entnommen am Chesapeake Bay an der Mündung des Hafens von Baltimore, Maryland, USA (NIST 1941b)
- (2) Steinkohle aus dem Midland Valley Becken, nahe Edinburgh, Schottland
- (3) Urbaner Boden, eine Mischung aus Flugasche, Bauschutt, Kalkstein, Holz und Mergel aus dem Ruhrgebiet
- (4) Seesediment aus dem Aasee, Innenstadt von Münster (Westfalen)

Die Proben wurden mittels beschleunigter Lösungsmittel-extraktion mit Dichlormethan bei 120°C und 110 bar extrahiert (Büchi Speedextractor E-916).

Ergebnisse und Diskussion

Analyse des Standard-Mix

Anhand der entwickelten Methode lassen sich 52 der 59 PAK trennen und detektieren (Abbildung 1). In Methodenrobustheitstests wurde ermittelt, dass die Methode hinsichtlich Temperatur ($\pm 2^\circ\text{C}$) Injektionsvolumen ($\pm 5\mu\text{l}$), Lösungsmittelbeschaffenheit (+ 5% H_2O) und Zeit (min. für 142 h) hinsichtlich PAK mit mehr als drei aromatischen Ringen robust ist. Zudem ermöglicht LC-APLI-MS auch eine äußerst sensitive Detektion, die im Mittel etwa um den Faktor 1.000 empfindlicher ist, als die etablierte GC-MS Methodik (Tabelle 1). Die Nachweisgrenzen (LOD, $S/N >3$) reichen bei LC-APLI-MS von 0,009 pg für Benzo[a]anthracen bis 2,002 pg für Naphtho[2,3-j]fluoranthen.

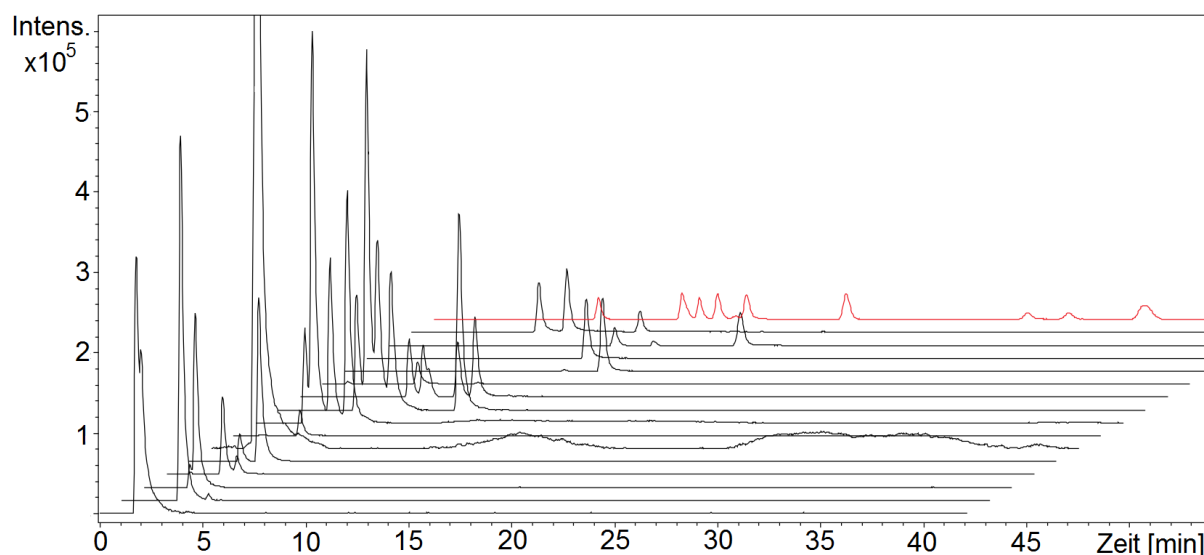


Abbildung 1: Ionenspur-Chromatogramme des Standard-Mix. Rot hervorgehoben sind die höhermolekularen PAK (hinterste Ionenspur) mit m/z 302.

Tabelle 1: Nachweisgrenzen für exemplarisch ausgewählte PAK und toxikologisch relevante Dibenzopyrene.

Verbindung	LOD LC-APLI-MS [pg]	LOD GC-MS [pg] (Stader et al, 2013)	Faktor GC-MS / LC-APLI-MS
9,10-Dimethylantracen (3-Ring PAK)	0,023	9	385
Benzo[c]phenanthren (4-Ring PAK)	0,026	31	1.214
Benzo[a]pyren (5-Ring PAK)	0,024	6	253
Anthanthren (6-Ring-PAK)	0,029	50	1.707
Dibenzo[a, <i>l</i>]pyren	0,116	49	424
Dibenzo[a, <i>e</i>]pyren	0,060	38	634
Dibenzo[a, <i>l</i>]pyren	0,177	68	384
Dibenzo[a, <i>h</i>]pyren	0,403	88	218

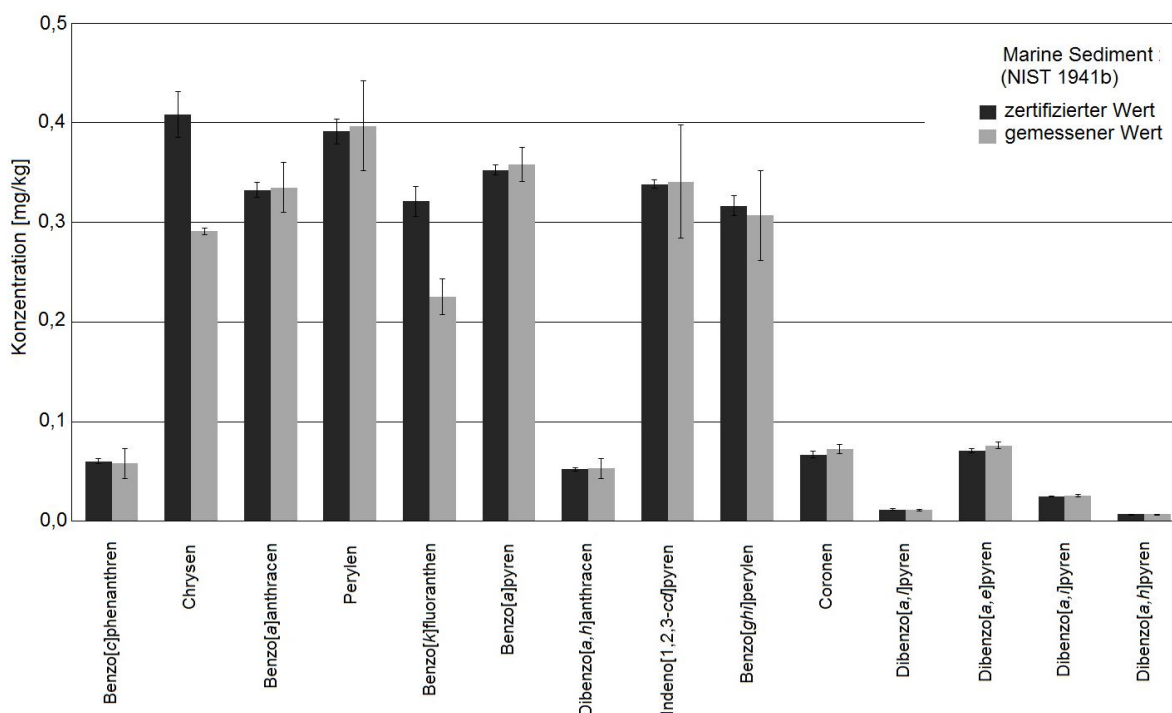


Abbildung 2: Validierung mittels zertifiziertem Referenzmaterial (NIST 1941b). Die Fehler des zertifizierten Wertes beruhen auf den Angaben im Zertifikat, der Fehler des gemessenen Wertes basiert auf einer Dreifachmessung ($n = 3$).

Methodenvalidierung mittels zertifiziertem Referenzmaterial (CRM)

Eine Validierung mittels CRM zeigt, dass die gemessenen Werte mit den zertifizierten Werten gut übereinstimmen (Abbildung 2). Dies zeigt sich vor allem für die Dibenzopyrene. Abweichungen vom zertifizierten Wert treten für Chrysen und Benzo[k]fluoranthren auf. Dies ist auf eine geringe Überlappung dieser Peaks mit den Peaks benachbart eluierender Isomere zurückzuführen.

Vergleich LC-APLI-MS mit etablierter GC-MS Methodik

Für einen Methodenvergleich von LC-APLI-MS mit der etablierten GC-MS Technik wurde ein urbaner Boden als komplexe Matrix gewählt. Über einen zweiseitigen t-Test kann

mathematisch ermittelt werden, ob die beiden Methoden signifikant bei einer Toleranz von 5% voneinander abweichen. Der t-Test bestätigt mit einem Wert von 1,03 unterhalb des Grenzwertes von 2,12 die Übereinstimmung beider Techniken. In Abbildung 3 wird dies grafisch veranschaulicht. Eine Schwierigkeit beim Methodenvergleich stellen alkylierte Verbindungen dar, da diese in der GC separiert und in der LC als Summe erfasst werden. Dibenzo[a,*l*]pyren und Dibenzo[a,*h*]pyren wurden in geringsten Konzentrationen lediglich mit LC-APLI-MS aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode detektiert.

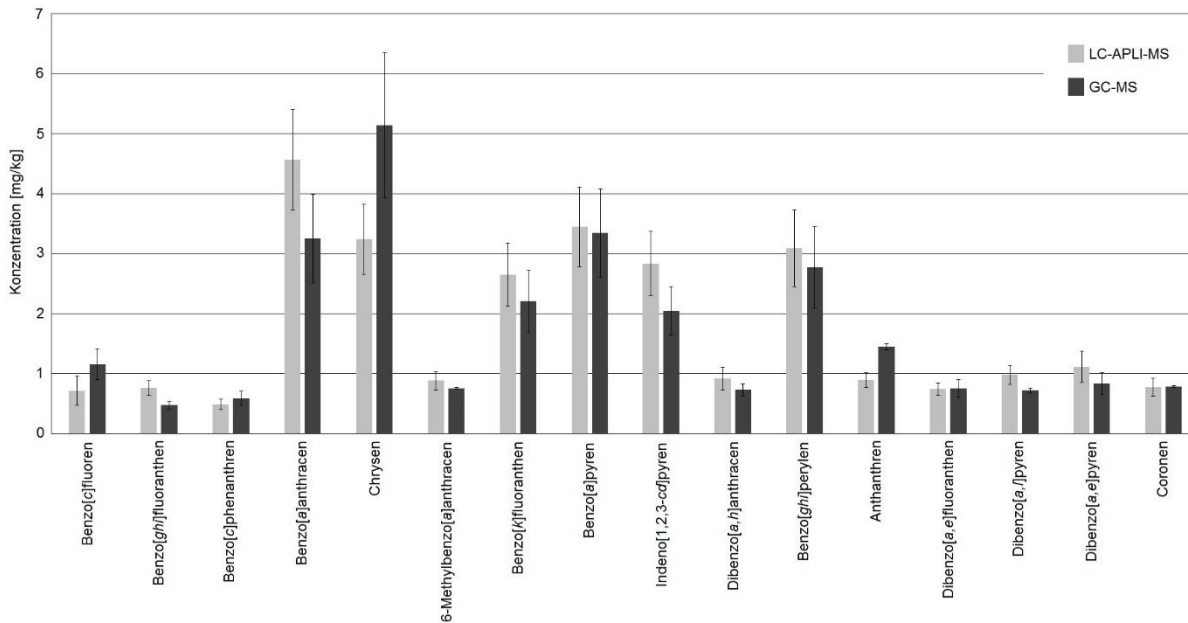


Abbildung 3: Vergleich von LC-APLI-MS und GC-MS anhand einer komplexen Bodenprobe aus dem urbanen Raum (Fehler beruhen auf $n = 3$).

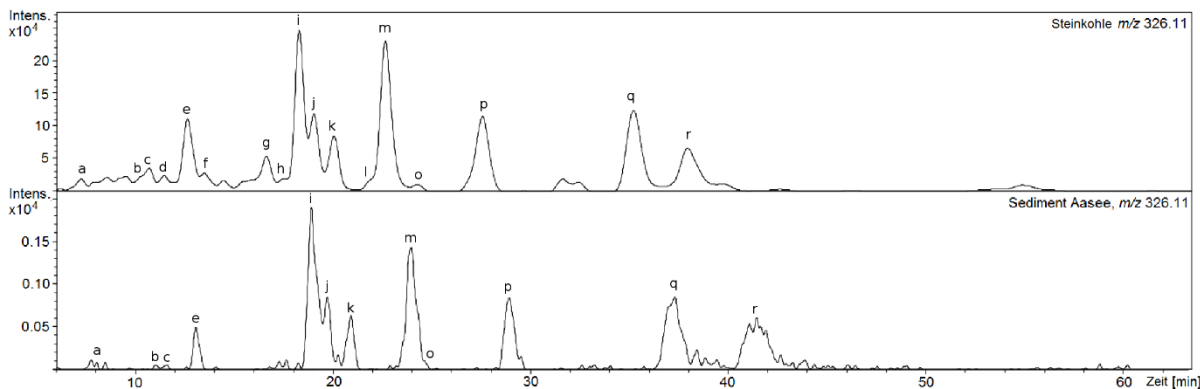


Abbildung 4: Ionenspur-Chromatogramm für m/z 326 der Steinkohle und des Seesedimentes. Beide Proben zeigen ähnliche Verteilungsmuster.

Hochmolekulare PAK und PAK-Muster

Steinkohlen zeigten bereits in früheren Studien ein breites Spektrum an PAK (Meyer et al., 2013). Bei einer Analyse einer Steinkohle mittels LC-APLI-MS wurden 211 vorläufige Peaks für PAK mit 6-8 Ringen ermittelt. Diese Identifizierung erfolgte auf Ebene der Summenformel. Analysen anderer Probenmatrices, wie beispielsweise Sedimente des Aasees in Münster, zeigten ebenfalls zahlreiche höhermolekulare PAK mit m/z 326,1. Bei einem Vergleich dieser Proben fällt auf, dass ähnliche Verteilungsmuster für m/z 326 auftreten, wie es auch bei umweltrelevanten, niedermolekularen PAK bekannt ist (Abbildung 4). Dies ist ein Indiz, dass zahlreiche noch toxikologisch unbekannte PAK mit 6 oder mehr Ringen in diversen Umweltmatrices auftreten.

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde eine robuste LC-APLI-MS Methode zum sensitiven und selektiven Nachweis von höhermolekularen PAK mit 6-8 aromatischen Ringen und $m/z > 300$ in verschiedenen Umweltmatrices entwickelt. Die Methode wurde mittels zertifiziertem Referenzmaterial validiert und ist durch Nachweisgrenzen im Mittel etwa um den Faktor 1.000 empfindlicher, als die etablierte GC-MS Methodik gekennzeichnet. Derzeit ist es unklar, ob über die sehr stark toxischen Dibenzopyrene hinaus noch weitere höhermolekulare, ggf. ebenfalls stark toxische PAK in der Umwelt auftreten. Die höhermolekularen PAK, die in dieser Studie mittels LC-APLI-MS detektiert werden konnten, treten in mehreren Probenmatrices in ähnlichen Mustern auf. Eine genauere Identifizierung dieser Verbindungen und Untersuchungen des toxikologischen Potentials ist für zukünftige Studien geplant.

Literatur

- Achten, C., Hofmann, T. (2009): Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – A hardly recognized source of environmental contamination. *Sci Total Environ* 407: 2461-2473.
- Achten, C., Beer, T., Stader, C. et al. (2015): Wood-specific polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) patterns in soot using gas chromatography – atmospheric pressure laser ionization – mass spectrometry (GC-APLI-MS). *Environ Forensics* 16: 42-50.
- Bagley, S., Wornat, M. (2013): Identification of six- to nine-ring polycyclic aromatic hydrocarbons from the supercritical pyrolysis of n-decane. *Energy & Fuels* 27: 1321-1330.
- Becker, L., Glavin, D., Bada, J. (1997): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Antarctic Martian meteorites, carbonaceous chondrites and polar ice. *Geochim Cosmochim Acta* 61: 475-481.
- Bergvall, C., Westerholm, R. (2009): Determination of highly carcinogenic dibenzopyrene isomers in particulate emissions from two diesel-and two gasoline fueled light-duty vehicles. *Atmos Environ* 43: 3883-3890.
- Lababidi, S., Panda, S., Andersson, J., et al. (2013): Direct coupling of normal phase high-performance liquid chromatography to atmospheric pressure laser ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the characterization of crude oil. *Anal Chem* 85: 9478-9485.
- Lima, A., Farrington, J., Reddy, C. (2005): Combustion-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment – A Review. *Environ Forensics* 6: 109-131.
- McClaine, J., Ona, J., Wornat, M. (2006): Identification of a new C₂₈H₁₄ polycyclic aromatic hydrocarbon as a product of supercritical fuel pyrolysis: Tribenzo[*cd,ghi,lm*]perylene. *J Chrom A* 1138: 175-183.
- Meyer, W., Seiler, T., Reininghaus, M., et al (2013): Limited waterborne acute toxicity of native polycyclic aromatic compounds from coals of different types compared to their total hazard potential. *Environ Sci Technol* 47: 766-775.
- Ravindra, K., Sokhi, R., van Grieken, R. (2008): Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ* 42: 2895-2921.
- Schiewek, R., Schellenträger, M., Mönnikes, R., et al. (2007): Ultrasensitive determination of polycyclic aromatic compounds with atmospheric-pressure laser ionization as an interface for GC/MS. *Anal Chem* 79: 4135-4140.
- Stader C., Beer, F., Achten, C. (2013): Environmental PAH analysis by gas chromatography atmospheric pressure laser ionization time-of-flight mass spectrometry (GC-APLI-MS). *Anal Bioanal. Chem.* 405:7041-7052.

Korrespondenzadresse:

Jan. B. Thiäner
Institut für Geologie und Paläontologie – Angewandte Geologie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Corrensstraße 24
48149 Münster