



Anwendung des Non-Target-Screenings mittels LC-ESI-HRMS in der Wasseranalytik

(Ausgabe 1.0 2019)

Wasserchemische Gesellschaft

Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker



GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

Impressum

Ausgabe 1.0 2019

Erschienen in Mülheim an der Ruhr, Dezember 2019

Verantwortlich für den Inhalt:

Dr. Wolfgang Schulz
Leiter des Fachausschusses "Non-Target Screening"
Zweckverband Landeswasserversorgung
Betriebs- und Forschungslabor
Am Spitzigen Berg 1
89129 Langenau
T: +49 7345 9638-2291
E: Schulz.W@lw-online.de

Herausgeber

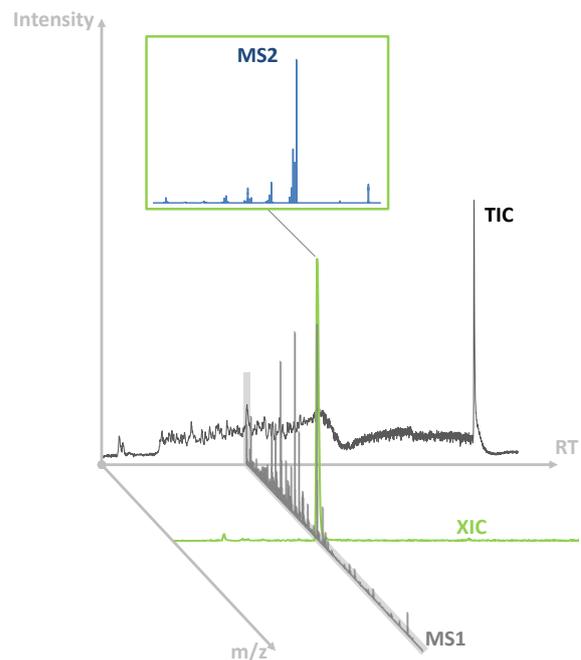
Fachausschuss "Non-Target Screening" der
Wasserchemische Gesellschaft
Fachgruppe in der GDCh
IWW Zentrum Wasser
Moritzstr. 26
45476 Mülheim an der Ruhr
T: +49 208 40 303 311
E: sekretariat@wasserchemische-gesellschaft.de
Web: <http://www.wasserchemische-gesellschaft.de>

©Wasserchemische Gesellschaft

Das Urheberrecht für dieses Dokument liegt bei den mitwirkenden Autoren. Alle Anfragen zur Wiedergabe und Reproduktion in jedem Medium, einschließlich Übersetzungen, sollten direkt an den Leiter des Fachausschusses "Non-Target Screening" gerichtet werden. Der Text darf zwecks Weiterverkaufs nicht kopiert werden.

Leitfaden

Anwendung des Non-Target- Screenings mittels LC-ESI-HRMS in der Wasseranalytik



Ausgabe 1.0 2019



Non-Target Screening in der Wasseranalytik

Leitfaden zur Anwendung der LC-ESI-HRMS für Screening-Untersuchungen

Ausgabe 1.0 2019

Dieser Leitfaden wurde von den Mitgliedern des Fachausschusses 'Non-Target Screening' der Wasserchemischen Gesellschaft erarbeitet.

Mitglieder des Fachausschusses

Leitung: Schulz, Wolfgang

Achten, Christine; Oberleitner, Daniela
Balsaa, Peter; Hinnenkamp, Vanessa
Brüggen, Susanne
Dünnbier, Uwe; Liebmann, Diana
Fink, Angelika; Götz, Sven
Geiß, Sabine
Hohrenk, Lotta
Härtel, Christoph
Letzel, Thomas
Liesener, André; Reineke, Anna
Logemann, Jörn
Lucke, Thomas
Petri, Michael
Sawal, George
Scheurer, Marco; Nürnberg, Gudrun
Schlüsener, Michael
Seiwert, Bettina
Sengl, Manfred; Kunkel, Uwe
Singer, Heinz
Türk, Jochen
Zwiener, Christian

Zweckverband Landeswasserversorgung

Universität Münster
Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung (IWW)
Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB)
Hessenwasser GmbH & Co. KG
Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie
Universität Duisburg-Essen
Ruhrverband
Technische Universität München (TUM)
Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH
Freie und Hansestadt Hamburg
Zweckverband Landeswasserversorgung
Zweckverband Bodensee-Wasserversorgung
Umweltbundesamt
DVGW-Technologiezentrum Wasser
Bundesanstalt für Gewässerkunde
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
Bayerisches Landesamt für Umwelt
Eawag
Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA)
Universität Tübingen

Zitierempfehlung

Zitation des Leitfadens wie folgt: „W. Schulz, T. Lucke et al., Non-Target Screening in der Wasseranalytik - Leitfaden zur Anwendung der LC-ESI-HRMS für Screening-Untersuchungen (2019). Download unter <http://www.wasserchemische-gesellschaft.de>”

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
1 Einleitung	9
2 Anwendungsbereich.....	11
3 Begriffe und Abkürzungen	11
4 Grundlage des Verfahrens	14
4.1 Non-Target Screening	14
4.2 Suspect-Target Screening.....	15
5 Blindwerte	15
5.1 Probenblindwerte	15
5.2 Systemblindwerte.....	15
5.3 Blindwertmessungen	16
6 Probenahme.....	16
6.1 Allgemein	16
6.2 Qualitätssicherung bei der Probenahme.....	16
6.3 Probenbezeichnung / Probenbeschreibung.....	17
7 Reagenzien.....	18
7.1 Allgemeines.....	18
7.2 Eluenten.....	18
7.3 Betriebsgase für Massenspektrometer	18
7.4 Referenzsubstanzen	18
7.5 Interne Standardsubstanzen (IS).....	18
7.6 Herstellung der Lösungen	18
7.6.1 Stammlösung (Referenzsubstanzen)	18
7.6.2 Dotierlösungen (IS)	18
7.6.3 QS-Standard (Kontrollstandard)	19
8 Geräte.....	20
8.1 Allgemeines.....	20
8.2 Probengläser.....	20
8.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.....	20
8.3.1 Allgemein	20
8.3.2 HPLC-Säule	20
8.4 Massenspektrometer.....	21
8.4.1 Allgemein	21
8.4.2 Ionenquelle	21
9 Durchführung	22
9.1 Probenvorbereitung.....	22
9.2 Chromatographie.....	23

9.3	Massenspektrometrie	23
9.3.1	Ionenquelle / Ionisationstechnik	23
9.3.2	Messtechnik	24
9.3.3	Massenkalibration und Massengenauigkeit	25
9.3.4	QS der LC-HRMS-Messung	26
10	Auswertung	26
10.1	Messdaten.....	26
10.1.1	Peakfinding	26
10.1.2	Alignment	27
10.1.3	Blindwertkorrektur	27
10.1.4	Komponentisierung	28
10.1.5	Summenformelgenerierung.....	28
10.2	Interpretation	28
10.2.1	Identifizierung.....	29
10.2.1.1	Datenbanken.....	31
10.2.1.2	Metadaten	31
10.2.2	Statistische Methoden	31
11	Angabe der Ergebnisse - Analysenbericht.....	32
12	Vergleichsuntersuchung.....	33
12.1	Teilnehmer	33
12.2	Durchführung	33
12.2.1	Vergleichsmessung A.....	34
12.2.2	Vergleichsmessung B.....	34
12.3	Ergebnisse	35
12.3.1	Eingesetzte Methoden.....	35
12.3.2	Sensitivität.....	35
12.3.3	Massengenauigkeit MS	35
12.3.4	Massengenauigkeit der Fragmentmassen (MS/MS)	37
12.3.5	Datenauswertung und Substanzidentifizierung.....	40
12.3.6	Workflowvergleich am Beispiel eines Labors.....	42
13	Literaturverzeichnis	44
Anhang A.	Fachausschuss „Non-Target Screening“	I
A.1	Hintergrund und Aufgaben	I
A.2	Mitglieder des FA	I
Anhang B.	Massen- und RT-Kontrolle.....	III
B.1	Isotopenmarkierte interne Standards.....	III
B.2	Standard zur Retentionszeitnormierung und Anwendung	V
Anhang C.	Methodisches	VII
C.1	Beispiele von LC-Methoden	VII
C.2	Beispiele von MS-Methoden.....	IX
C.3	Blindwertmessungen	XI
C.4	Retentionszeit-Masse Plot von Blindwerten.....	XIII
Anhang D.	Messtechnik	XIV
D.1	HRMS Massenspektrometer	XIV

Anhang E. Systemstabilität	XVI
E.1 Chromatographie.....	XVI
E.2 Massenspektrometrie	XVI
Anhang F. Datenauswertung	XVIII
F.1 Anpassung von intensitätsabhängigen Parametern für die Peak-Extraktion am Beispiel des „Noise Threshold“ der MarkerView™-Software (SCIEX)	XVIII
Anhang G. Adduktbildung beim Einsatz einer ESI-Quelle	XX
G.1 Addukte und <i>in-source</i> -Fragmente	XX
Anhang H. Workflow	XXIV
H.1 Beispiel für einen typischen Screening-Workflow	XXIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 9.1:	Schematische Darstellung verschiedener möglicher MS ² -Messmodi	25
Abbildung 12.1:	Vergleich der Detektionsgrenzen als Konzentration mit mindestens zwei detektierbaren Fragmentationen (Labore 6 und 3 Ausreißer) PFNA: Perfluorononansäure HCT: Hydrochlorothiazid	35
Abbildung 12.2:	Massenabweichungen im MS-Modus (Labore 8 und 11: undotierte Probe nicht gemessen).....	36
Abbildung 12.3:	Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (TOF-Geräte); geordnet nach Fragmentmasse und getrennt nach Ionisationsmodus -	38
Abbildung 12.4:	Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (Orbitrap-Geräte); geordnet nach Fragmentmasse und getrennt nach Ionisationsmodus	39
Abbildung 12.5:	Vergleich der identifizierten gesuchten Standardsubstanzen der teilnehmenden Laboratorien nach den Identifizierungskategorien 1 bis 4..	41
Abbildung 12.6:	Aufbau dreier unterschiedlicher Workflows zur Detektion und Identifizierung von Substanzen	42
Abbildung 12.7:	Vergleich Identifizierungsergebnisse eines Datensatzes mit drei unterschiedlichen Auswerteworkflows	43
Abbildung C.1:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A; Elektrospray positiv	XI
Abbildung C.2:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A; Elektrospray negativ	XI
Abbildung C.3:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B; Elektrospray positiv	XII
Abbildung C.4:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B; Elektrospray negativ	XII
Abbildung C.5:	Masse-RT-Scatterplots („Punktwolken“) der beiden Beispielmethoden A und B, jeweils im ESI positiven und negativen Modus	XIII
Abbildung D.1:	Schematischer Aufbau der Massenspektrometer Orbitrap (links) und Flugzeit-Massenspektrometer (rechts) mit deren Auflösungsvermögen in Abhängigkeit des Massenbereichs (unten) [32].....	XV
Abbildung E.1:	Retentionszeitstabilität über N = 134 Messungen (über einen Zeitraum von 10 Monaten).....	XVI
Abbildung E.2:	Stabilität der Gerätesensitivität über einen Zeitraum von 10 Monate (N=134) ohne (grau) und mit (grün) interner Standardisierung (*Phenazon als IS).....	XVI
Abbildung E.3	Dokumentationsmöglichkeit zur Kontrolle der MS-Performance über Massegenauigkeit, Auflösungsvermögen und Sensitivität	XVII

Abbildung F.1:	Korrelation zwischen „Noise“ und dem berechneten „Noise Threshold“	XVIII
Abbildung F.2:	Änderung der Anzahl an Features, echten Peaks und falsch-positiv- Ergebnissen (FPs) auf Grund des verwendeten „Noise Threshold“ (100 cps und berechneter Wert aus der Anpassungsgleichung) für die Messungen („positiv ion mode“) einer aufdotierten Kläranlagenablaufprobe für drei verschiedene Empfindlichkeitsniveaus des Messgerätes. Links: LC-HRMS mit niedriger Sensitivität, Mitte: LC-HRMS während der Optimierung, Rechts: LC-HRMS mit höherer Sensitivität.....	XIX
Abbildung H.1:	Beispielworkflow für Suspect- und Non-Target Screening inkl. der Kategorisierung zur Identifizierung von Substanzen (siehe auch 10.2.1)	XXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht über typische Aufgabenstellungen in der Wasseranalytik.....	10
Tabelle 3.1:	Zusammenstellung von Abkürzungen und Begriffen der Massenspektrometrie und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie [6]	11
Tabelle 6.1:	Beispielhafte Zusammenstellung von Probenbegleitinformationen.....	17
Tabelle 9.1:	Vor- und Nachteile einzelner Schritte bei Probenvorbereitung und Probenaufgabe	22
Tabelle 9.2:	Addukt- und Fragmentbildung in der Quelle bei der Elektrospray- Ionisierung	24
Tabelle 9.3:	Zusammenstellung der unterschiedlichen MS-Messtechniken mit Kurzbeschreibung	25
Tabelle 10.1:	Schematische Darstellung des Vergleichs von Punktwolken.....	29
Tabelle 10.2:	Klassifizierung der Features aus dem HRMS Screening	30
Tabelle A.1	Mitglieder des Fachausschusses „Non-Target Screening“	I
Tabelle B.1:	Liste isotopenmarkierter interner Standards, eawag ($N_{ESI+} = 123$, $N_{ESI-} = 56$)	III
Tabelle B.2:	Liste isotopenmarkierter interner Standards, LW.....	V
Tabelle B.3:	Liste möglicher Referenzstandards zur RT-Kontrolle und Normierung (Verteilung über den mit RP-LC abdeckbaren Polaritätsbereich).....	V
Tabelle B.4:	Liste von in Ringversuch B gefundenen Substanzen mit der Anzahl RTI- Erfassungen aus 6 Laboren mit dem Mittelwert der logD-Abweichungen sowie Standardabweichung	VI
Tabelle C.1:	Beispiel einer MS Methode (TOF-System)	IX
Tabelle C.2:	Beispiel einer MS Methode (Orbitrap-System)	X
Tabelle G.1:	Beispiele für detektierte Addukte und in-source-Fragmente bekannter Substanzen	XX

1 Einleitung

Die Anwendung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) in Kopplung mit hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) ermöglicht den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von organischen Spurenstoffen. [1, 2, 3, 4, 5] Generell wird zwischen der quantitativen Target-Analytik und dem qualitativen Non-Target Screening (NTS) unterschieden. Bei der Target-Analytik werden feste Listen an Substanzen verwendet, die in einer (Wasser-)Probe nachgewiesen und deren Konzentrationen mit Hilfe von Referenzsubstanzen bestimmt werden sollen. Mit dem Non-Target Screening sind sowohl bekannte Substanzen als auch bisher nicht erfasste und häufig unbekannte Substanzen nachweisbar. Die retrospektive Auswertung von beispielsweise neu entdeckten bzw. zuvor nicht berücksichtigten Substanzen stellt einen besonderen Vorteil der HRMS gegenüber der Verwendung von niedrig auflösenden Massenspektrometern dar. [4]

In diesem Leitfaden werden die Voraussetzungen und die Anforderungen an die Messtechnik, Auswertung und Interpretation der Daten beschrieben.

Beispielhaft sind in Tabelle 1.1 typische quantitative und qualitative Fragestellungen der Wasseranalytik (Abwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser oder Trinkwasser) erläutert.

Tabelle 1.1: Übersicht über typische Aufgabenstellungen in der Wasseranalytik¹

Target-Analytik	Suspect-Target Screening	Non-Target Screening
<ul style="list-style-type: none"> Monitoring organischer Spurenstoffe zur Kontrolle von Grenzwerten Monitoring organischer Spurenstoffe zur Trendermittlung Monitoring organischer Spurenstoffe nach Kontaminationen (Havarie, Brand, etc.) Überwachung von einzelnen Prozessschritten bei der Abwasser- und Trinkwasseraufbereitung (z. B.: Durchbruch eines Adsorptionsfilters, Eliminationsleistung einzelner Prozessstufen) 	<ul style="list-style-type: none"> Suche nach bekannten Substanzen (z. B. Arzneimittelwirkstoffe, Haushalts- und Industriechemikalien, Pestizide, Transformationsprodukte, etc.) Suche nach Substanzen mit bestimmten Struktureigenschaften (Elemente im Molekül wie S, Cl, Br oder funktionelle Gruppen wie z. B. COOH) Vergleich von Positivfunden aus Untersuchungen anderer Labore oder aus Literaturdaten Retrospektive Betrachtung von archivierten HRMS-Messungen bei Informationen zu neuen Substanzen <ul style="list-style-type: none"> - schnelle Einschätzung zum Vorkommen der Komponente an der betrachteten Messstelle - Entscheidungsgrundlage zur Erweiterung von Monitoringprogrammen 	<ul style="list-style-type: none"> Suche nach zusätzlichen (über das Monitoring hinaus) vorhandenen Substanzen und deren Charakterisierung Ermittlung von Unterschieden (hinsichtlich organischer Spurenstoffe) zwischen mehreren Proben (Hydrogeologie, zeitlicher Verlauf, Prozessbetrachtung hinsichtlich Entfernung oder Bildung von unbekanntem Substanzen) Beschreibung von Prozessen hinsichtlich des Verhaltens organischer Spurenstoffe Detektion und Charakterisierung von Transformationsprodukten (z. B. bekannter Ausgangsverbindungen) Nachweis / Auftreten von Substanzen als Folge eines Ereignisses - Ursachenermittlung (Toxizität – Fischsterben, Geruch – Geschmack, Starkregen, Havarie, Brand, etc.) Erweiterung / Anpassung von Monitoringprogrammen (dynamisches Monitoring) Identifizierung von unbekanntem Substanzen unter Zuhilfenahme weiterer Informationen (Datenbankabgleich, Vergleich von MS/MS-Spektren aus Literaturdaten oder <i>in-silico</i>-Fragmentierungen) und Messungen (Referenzsubstanzen, Einsatz orthogonaler Techniken wie NMR oder Raman-Spektroskopie)

¹Überarbeitet aus „Möglichkeiten der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS), Einsatz der Suspect- und Non-Target Analytik in der Überwachungspraxis von Roh- und Trinkwasser“ DVGW-Information Wasser Nr. 93

2 Anwendungsbereich

Der vorliegende Leitfaden soll grundlegende Aspekte bei der Anwendung von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie aufzeigen. Hierzu gehören neben den gerätetechnischen Punkten, möglichen Verunreinigungen bei Probenahme und Messung auch die Datenauswertung und Qualitätssicherungsmaßnahmen. Der Leitfaden soll dem Anwender bei der Methodenentwicklung und Interpretation der Ergebnisse eine Hilfestellung geben.

3 Begriffe und Abkürzungen

Die wichtigsten Begriffe der Massenspektrometrie und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit ihren Definitionen sind in der folgenden Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Zusammenstellung von Abkürzungen und Begriffen der Massenspektrometrie und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie [6]

Akkurate Masse	Die akkurate Masse eines Ions ist die im Massenspektrometer experimentell bestimmte (und ggfs. mittels Referenzmassenstandard rekali-brierte) Masse
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
Auflösung	Kleinste Differenz Δm zweier m/z -Werte, bei der zwei massenspektrometrischen Peaks gleicher Intensität als voneinander getrennt angesehen werden (bei 10% bzw. 50% Talhöhe)
Auflösungsvermögen R ($R = m/\Delta m$)	Quotient aus der im Massenspektrometer bestimmten Masse m und der Differenz Δm zweier m/z -Werte, die voneinander getrennt werden können [6]. Die Massendifferenz Δm zweier m/z -Werte kann von Peakspitze zu Peakspitze oder durch die Peakbreite bei 5%, 10% oder bei 50% der Peakhöhe (full width at half maximum, FWHM) gemessen werden und sollte daher mit dem Auflösungsvermögen R angegeben werden.
CCS	Collision Cross Section Molekülquerschnittsfläche errechnet durch Ionenmobilitätsspektrometrie als Maß für die Molekülgröße. Verschiedene Massenspektrometer können durch Modifikation/Ergänzungen eines LC-MS-Systems um die Ionenmobilitätsspektrometrie erweitert werden.
ESI	Elektrospray-Ionisation
Exakte Masse	Die exakte Masse eines Ions oder Moleküls ist die berechnete Masse unter Berücksichtigung der vorgegebenen Isotopenzusammensetzung
Feature	Features sind peakförmige Signale, welche durch ihre akkurate Masse (m/z) und Retentionszeit (RT) definiert sind und die gewählten Kriterien zum Peakfinding (z. B. Intensitätsthreshold) erfüllen.

FT-ICR-MS	<i>Fourier-Transformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer</i>
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> , MS-koppelbare Alternative zur Normalphasenchromatographie zur Trennung von stark polaren Verbindungen bestehend aus einer polaren stationären Phasen (ähnlich der Normalphasenchromatographie; z. T. in Verbindung mit Kationen-/Anionenaustauscher-Funktionen) unter Verwendung herkömmlicher RP-Eluenten (Wasser, Methanol, Acetonitril)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
Isotopenmuster	Das sich ausbildende Muster im Massenspektrum durch die massenspektrometrische Trennung der unterschiedlichen Isotope der Atome im Molekül. Das Isotopenmuster ist abhängig von Kombination und Häufigkeit der einzelnen Atome im Molekül.
LC-HRMS	<i>Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry</i> , Flüssigkeitschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie
LIMS	<i>Labor Informations- und Management System</i>
MS	<i>Massenspektrum (engl. mass spectrum)</i> Zweidimensionale Darstellung der Signalintensität eines Ions (y-Achse) aufgetragen gegen das m/z Verhältnis (x-Achse)
m/z	Abkürzung für Masse-zu-Ladungsverhältnis Massenzahl dividiert durch Ladungszahl (dimensionslos)
Massendefekt	Der Massendefekt eines Atoms, Moleküls bzw. Ions ist die Differenz zwischen der nominellen und monoisotopischen Masse. Die meisten organischen Moleküle besitzen einen positiven Massendefekt, da sie sehr häufig aus Atomen mit beinahe vernachlässigbaren negativen (z. B. O, F) oder aber kleinen positiven Massendefekten (z. B. H, N) zusammengesetzt sind. Einige Elemente, wie Chlor und Brom, besitzen relativ große negative Massendefekte.
Mixed Mode	LC-Säulenmaterial (stationäre Phase) mit einer Kombination verschiedener Funktionalitäten zur Ausbildung hydrophober und ionischer (Ionenaustausch) Wechselwirkungen
Monoisotopische Masse	Exakte Masse eines Ions oder Moleküls, die sich aus den am häufigsten auftretenden natürlichen Isotopen der Elemente berechnet. Die monoisotopische Masse von Molekülen oder Ionen wird in diesem Kontext auch als exakte Masse bezeichnet.
MS²:	Aufnahme von Produktionenspektren (Fragmentationenspektren) durch Molekülfragmentierung mittels verschiedener Modi:
Gezielte MS²: MS², MS/MS, ddMS	Gezielt gerichtete (engl. <i>dedicated</i> , auch <i>Date Dependend</i>) Fragmentierung einzelner Ionen zur Erfassung möglichst reiner Fragmentationenspektren
Automatisch getriggerte MS²: MSMS^{all}, AIF, DIA	Fragmentierung von Molekülen in einem ganzen Massenbereich zur Erfassung möglichst vieler Fragmentationen liefert überlagerte Fragmentationenspektren (<i>All Ion Fragmentation, Data Independent Acquisition</i>)

Nominelle Masse	Die nominelle Masse eines Elements ist die ganze Zahl der Masse seines häufigsten Isotops, beispielsweise 12 u für Kohlenstoff, 35 u für Chlor. Zur Berechnung der nominellen Masse eines Moleküls oder Ions werden die nominellen Massen der Elemente mit der Anzahl der Atome von jedem Element im Molekül oder Ion multipliziert.
NTS	<i>Non-Target Screening</i> Nicht-zielgerichtetes Analysenverfahren ohne Begrenzung auf vorgegebene Substanzen. Detektiert werden alle Substanzen, die mit der eingesetzten Analysenmethode chromatographisch und massenspektrometrisch erfassbar sind.
QS	Qualitätssicherung
RP	<i>reversed phase; Umkehrphase in der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie</i>
Sector-MS	<i>Sektorfeld-Massenspektrometer</i>
TOF	Flugzeitmassenspektrometer (T ime of F light M assenspectrometer)
u	Atomare Masseneinheit definiert als der zwölfte Teil der Masse von einem Kohlenstoffatom in seinem Grundzustand: 1 u = 1,660 539 040 10 ⁻²⁷ kg Gleichwertig bzw. äquivalent zu Da (Dalton)
UPLC UHPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography,</i> <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography,</i> Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit sehr hoher chromatographischer Trennleistung auf Säulen mit kleinen Partikelgrößen (< 2 µm) und bei Säulendrücken von bis zu 1500 bar

4 Grundlage des Verfahrens

Die Grundlage des Verfahrens liegt in der Anwendung von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der hochauflösenden Massenspektrometrie (LC-HRMS). [1] [7] Diese ermöglicht es, zu jedem Zeitpunkt des Chromatogramms die in der Ionenquelle gebildeten Ionen im gewählten Massenbereich zu detektieren und deren akkurate Masse zu bestimmen. Die Massendetektion kann mit einem Time of Flight Massenanalysator (TOF), einer Orbitrap oder einem anderen hochauflösenden Massenspektrometer (FT-ICR, Sector-MS) erfolgen. Als Mindestanforderung an hochauflösende Massenspektrometer ist ein Auflösungsvermögen von > 10.000 (Definition bei 10%iger Überlappung der zu trennenden Massepeaks [8]) bzw. > 20.000 (Definition anhand der Halbwertsbreite des Massepeaks [9]) über den erfassten Massenbereich gefordert. Die Abweichung im MS-Spektrum zwischen gemessener (akkurater) und theoretischer (exakter) Massen sollte < 5 ppm [10] bei m/z 200 [9] betragen und durch regelmäßige Kalibration überprüft werden. Zur Identifizierung von Substanzen ist die Messung von MS²-Spektren mit akkurater Masse für einzeln ausgewählte (MS/MS bzw. ddMS²) oder wenn möglich gleichzeitig aller Precursorionen (MS/MS^{all} bzw. AIF oder DIA) erforderlich. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt abhängig von der Fragestellung und wird in das Suspect-Target und Non-Target Screening gegliedert (Tabelle 1.1).

4.1 Non-Target Screening

Beim Non-Target Screening werden LC-HRMS Chromatogramme mittels geeigneter Peakfinding-Software nach sog. Features durchsucht (Definition siehe Kapitel 3). Aufgrund von Isotopenpeaks sowie der Bildung unterschiedlicher Adduktionen eines Moleküls in der Ionenquelle und einer möglichen *in-source*-Fragmentierung ist eine Komponentisierung erforderlich, d. h. eine Zusammenfassung aller Signale, welche ursprünglich von einer Komponente herrühren (vgl. Abschnitt 10.1.4). Zur Entfernung von falsch positiven Features ist außerdem eine Blindwertkorrektur notwendig (vgl. Abschnitt 10.1.3). Für den Vergleich unterschiedlicher Proben ist darüber hinaus ein Alignment sinnvoll (vgl. Abschnitt 10.1.2). Anschließend erfolgt meist die Generierung von möglichen Summenformeln unter Verwendung der akkuraten Massen der Features und, wenn detektiert (Konzentration, Empfindlichkeit), der Isotopie (vgl. Abschnitt 10.1.5). Dabei spielt neben der Massengenauigkeit das Auflösungsvermögen eine ganz besondere Rolle, um die Anzahl möglicher Summenformelvorschläge zu reduzieren. Weiterhin sei an dieser Stelle auf die „Seven Golden Rules“ für die Reduktion der Summenformeln auf chemisch sinnvolle Vorschläge verwiesen. [11] Für die Identifizierung und Interpretation der Features stehen verschiedene Hilfsmittel zur Verfügung. Zur Ermittlung von Strukturen haben sich die zu den Features erfassten MS²-Informationen als essentiell erwiesen. Diese können neben der Abfrage von Inhouse- und/oder Online-Stoffdatenbanken (z. B. PubChem [12], ChemSpider [13], STOFF-Ident [14]) zusätzlich für die Abfrage analytischer Spektrendatenbanken (z. B. Massbank [15], mzCloud [16]) und *in-silico*-Fragmentierungs-Tools (z. B. Metfrag [17]) herangezogen werden (vgl. Abschnitt 10.2.1.1). Die Anzahl von möglichen Strukturvorschlägen zu einzelnen Features sinkt dabei sukzessive, je mehr Informationen in die Abfragen einfließen. Da eine eindeutige Identifizierung eines Features oftmals dennoch nicht möglich ist, hat sich die Einordnung in unterschiedliche Kategorien anhand des Erfüllungsgrades verschiedener Kriterien bewährt (vgl. Abschnitt 10.2.1). Außerdem können Metadaten, statistische Methoden und der Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher

Proben (auch ohne Identifizierung) wesentliche Hilfestellungen bei der Beantwortung der analytischen Fragestellung geben (z. B. Priorisierung relevanter Features).

4.2 Suspect-Target Screening

Beim Suspect-Target Screening liegt eine Liste für die Beantwortung der Fragestellung relevanter Substanzen bzw. Substanzgruppen vor. Im LC-HRMS-Chromatogramm der Probe(n) wird mittels geeigneter Software nach Hinweisen zum Vorhandensein dieser Suspects gesucht. Hierfür können unterschiedliche Strategien, beispielsweise die Verwendung von exakten Massen oder die Eingabe der Summenformeln, zum Einsatz kommen. Die Verifizierung positiver Hinweise (Identifizierung) erfordert im Allgemeinen ein MS²-Spektrum von Probe und Referenzsubstanz bzw. entsprechende Angaben aus der Literatur.

5 Blindwerte

Alle Arten von Blindwerten sind zu vermeiden bzw. zu minimieren. Die Herkunft von Blindwerten kann unterschiedlichen Arbeitsschritten bzw. Quellen zugeordnet werden. Die Ursachen von Blindwerten und deren Vermeidung bei den einzelnen Arbeitsschritten werden im Folgenden näher erläutert.

5.1 Probenblindwerte

Blindwerte durch die Probenahme sind so gering wie möglich zu halten. Zur Vermeidung von Querkontaminationen sollten Probenahmegefäße beispielsweise nur für die Probenahme von Trink-, Oberflächen- oder Abwasser klassifiziert werden. So wird der spätere Einsatz einer mit Abwasser befüllten Glasflasche zur Trinkwasserprobenahme vermieden. Alle verwendeten Probengefäße bzw. eingesetzten Glasgeräte können zur Minimierung der Blindwerte in einem Ausheizofen über Nacht bei mindestens 450 °C ausgeheizt werden. Es sollten möglichst inerte Behältnisse aus Glas oder Edelstahl verwendet werden. Ist dies z. B. aus technischer Sicht (Mischproben über automatische Probennehmer, Temperaturbeständigkeit) nicht möglich, sollten Gefäße aus weichmacherfreien Kunststoffen oder gut gespülte (oder alte) Kunststoffgebinde eingesetzt werden. Jede Handhabung der Probe, wie beispielsweise Umfüllen, Pipettieren oder Anreichern, kann zu Kontaminationen mit organischen Spurenstoffen führen (auch durch das Laborpersonal, z. B. durch Hautschutz- oder -pflegeprodukte).

5.2 Systemblindwerte

Zur Vermeidung von Kontaminationen sollte eine offene Handhabung (z. B. Umfüllen) vermieden werden. Die Zugabe von Ionisationshilfsmitteln (z. B. Ameisensäure) zu den eingesetzten Eluenten sollte idealerweise mit ausgeheizten Glasgeräten erfolgen (siehe Kapitel 8.1). Die eingesetzten Geräte und Analysensysteme sollten regelmäßig gewartet und auf mögliche Kontaminationen z. B. durch Schmierstoffe oder die eingesetzten Materialien (Leitungen, Dichtungen, ...) untersucht und überprüft werden.

5.3 Blindwertmessungen

Anhand regelmäßiger Blindwertmessungen ist der einwandfreie Zustand der Geräte und Chemikalien zu kontrollieren. Zur Blindwertkontrolle kann beispielsweise ein Probenblindwert und/oder ein Systemblindwert herangezogen werden. Als Probenblindwert dient i.d.R. eine Laborreinstwasserprobe oder ein synthetisches gepuffertes Wasser mit identischer Vorgehensweise bei Probenahme, -lagerung, -transport und -vorbereitung wie die Originalprobe. Der Systemblindwert ist definiert als das Chromatogramm ohne Probeninjektion (Nullinjektion). Die erhaltenen Totalionenstromchromatogramme können durch Vergleich der Signalintensität beurteilt werden (Beispiele siehe Anhang C.3). Zur Beurteilung des Blindwertes ist zusätzlich eine Auswertung entsprechend 10.1.1 durchzuführen. Eine Blindwertkontrolle ist in jeder Messsequenz durchzuführen. Bei der Messung von Proben mit unbekannter Belastung ist zwischen den Injektionen eine Blindwertmessung empfehlenswert, um Verschleppungen zu vermeiden bzw. zu erkennen.

6 Probenahme

6.1 Allgemein

Die Entnahme von Wasserproben ist in unterschiedlichen Normen für die verschiedensten Parameter bzw. Parametergruppen beschrieben. [18] Eine Kontrolle hinsichtlich Kontaminationen oder Verlusten (beispielsweise durch Adsorption oder Instabilität der Probe während des Proben transports ins Labor) kann anhand einzelner Komponenten überprüft werden; nicht jedoch beim Non-Target Screening für die gesamte Substanzzusammensetzung der Probe. Deshalb sind grundlegende Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenahme einzuhalten.

Das erforderliche Probenvolumen richtet sich nach der Probenvorbereitung und dem Injektionsvolumen. Eine Stabilisierung durch Zugabe von Säure oder Natriumazid (Mikrobiologie) kann zu einer Kontamination und chemischen Reaktionen führen. Empfohlen wird die sofortige Kühlung der Probe auf ca. 4 °C und schnellstmögliche Analyse. Ist dies nicht möglich sollten die Proben bei maximal -18 °C bis zur Analyse eingefroren werden. Dies gilt auch für Rückstellproben. Verluste durch Gefrier-/Auftau-Zyklen sind dabei möglich und zu beachten.

6.2 Qualitätssicherung bei der Probenahme

Die Durchführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen bei der Probenahme können Fehlinterpretationen der Messergebnisse vermeiden. Eine geeignete Qualitätssicherungsmaßnahme ist für die jeweilige Aufgabenstellung zu prüfen. Die Verwendung von sog. Feldblindproben hat sich bei einigen Aufgabenstellungen zur Qualitätskontrolle der Probenahme, beispielsweise bei Pumpprobenahmen, bewährt. Bei der Feldblindprobe handelt es sich um eine vor Ort abgefüllte Wasserprobe (z. B. Reinstwasser). Dadurch können Kontaminationen bei Probenahme oder Proben transport erkannt werden. Bei aufwendigem Proben transport ist je Transportgefäß (Kühlbox) zusätzlich ein Transportblindwert sinnvoll.

6.3 Probenbezeichnung / Probenbeschreibung

Die Probenbezeichnung ist so zu wählen, dass eine Zuordnung aller Daten (Rohdaten, Auswertung) zur Probe zweifelsfrei erfolgen kann. Die Verwendung einer eindeutigen Labornummer die lückenlos in allen Dateibezeichnungen und Dokumenten auftritt ist sinnvoll. In der folgenden Tabelle 6.1 sind beispielhaft Probenbegleitinformationen zusammengestellt. Zur weiteren Information wird auf die einschlägigen Normen zu den unterschiedlichen Varianten der Probenahme verwiesen. [18, 19, 20]

Zusätzliche Informationen oder Besonderheiten (Metainformationen) während der Probenahme sind den Dokumenten beizufügen. Dies erleichtert die Interpretation der Screening-Daten. Hierzu muss die Aufgabenstellung an die Probensätze definiert und dem Probenehmer bekannt sein.

Tabelle 6.1: *Beispielhafte Zusammenstellung von Probenbegleitinformationen*

Information	Beschreibung / Beispiel
Probenahmestelle	Genaue Bezeichnung: Beispielsweise Flusskilometer, Bezeichnung der Grundwassermessstelle, geographische Koordinaten
Art der Probenahme	Pumpprobe, Schöpfprobe, Zapfhahnprobe, Mischprobe, qualifizierte Stichprobe
Besonderheiten bei der Probenahme	Einsatz eines Stromerzeugers, Umgebungseinflüsse (z. B. Düngung zum Zeitpunkt der Probenahme in unmittelbarer Nähe, ...)
Probengefäß	Glas, Verschluss, Vorbehandlung der Gefäße, Mit welchen Materialien ist die Probe in Kontakt gekommen
Wetter	Sonne, Niederschlag
Blindproben	Feldblindprobe, Transportblindprobe
Metainformationen	Umfeld der Probenahmestelle
Analytische Fragestellung an den Probensatz sollte bekannt sein	Auffälligkeiten wie Einleitungen, Produktionsanlagen, landwirtschaftliche Aktivitäten, Hochwasser

7 Reagenzien

7.1 Allgemeines

An alle verwendeten Reagenzien sind besondere Reinheitsanforderungen zu stellen. Der Gehalt an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen, muss so gering wie möglich sein bzw. in Relation zu den für die Beantwortung der Fragestellung relevanten Signalen vernachlässigbar sein. Dies muss regelmäßig überprüft werden (siehe Kapitel 5).

7.2 Eluenten

Lösemittel (z. B. Methanol, Acetonitril) und Wasser müssen für die HPLC und Massenspektrometrie geeignet sein. Spezielle Qualitäten sind kommerziell erhältlich. Sind dazu verwendete Geräte nicht ausheizbar (siehe Kapitel 8.1), sollten sie gut zu reinigen und für den Einsatz im Screening reserviert sein.

7.3 Betriebsgase für Massenspektrometer

Die Betriebsgase für das Massenspektrometer müssen den Mindestanforderungen des Geräteherstellers entsprechen. Hierzu gehören auch die Materialien der Gasleitungen.

7.4 Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen sind für die sichere Identifizierung von Verbindungen erforderlich (siehe Kapitel 10.2.1). Sie sollten nach Möglichkeit einen Reinheitsgehalt von mindestens 95% haben. Lösungen mehrerer Referenzsubstanzen (Multikomponentenstandard) können auch zur Überwachung der Stabilität des LC-HRMS Systems eingesetzt werden (siehe Anhang E).

7.5 Interne Standardsubstanzen (IS)

Es sollten isotope-markierte Verbindungen eingesetzt werden (siehe Anhang B.1). Sie dienen zur Kontrolle der Messstabilität bei jeder Probe und geben mögliche Hinweise auf Matrixeffekte. Beispielsweise kann der IS über eine Koinjektion jeder Probe automatisiert mit dem Autosampler zugegeben werden (z. B. 95 µL Probe + 5 µL IS).

7.6 Herstellung der Lösungen

Bei der Herstellung von Lösungen ist jeder Arbeitsschritt hinsichtlich möglicher Kontamination zu überprüfen. Hierbei sollte nach Möglichkeit der Kontakt mit Kunststoffmaterialien vermieden werden. Der Einsatz von Glasspritzen hat sich in der Praxis als vorteilhaft erwiesen.

7.6.1 Stammlösung (Referenzsubstanzen)

Stammlösungen sollten bei maximal -18 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt werden. Unter diesen Bedingungen ist in der Regel eine Haltbarkeit von mindestens 1 Jahr zu erwarten.

7.6.2 Dotierlösungen (IS)

Ein Ansetzen der Dotierlösung in einer Konzentration, die der Detektionsempfindlichkeit der jeweiligen Substanz angepasst ist, ist sinnvoll. So kann die Detektion der internen Standards

sichergestellt, eine Überdosierung hingegen vermieden werden. Eine Überdosierung kann bei der Ionisation zu Signalsuppression in der Probe enthaltener Komponenten führen.

7.6.3 QS-Standard (Kontrollstandard)

Hierfür sollte ein Multikomponentenstandard eingesetzt werden, dessen enthaltene Substanzen sowohl den massenspektrometrischen als auch den chromatographischen Bereich der LC-HRMS-Methode möglichst umfassend abdecken. Insbesondere für die Überprüfung des generischen Peakfindings sollte auch ein Multikomponentenstandard in einer Realmatrix mit analysiert werden. Diese Referenzmatrix sollte im besten Falle ein Aliquot einer repräsentativen, in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden (ggfs. dotierten) Umweltprobe sein. Dadurch erweitert sich zudem das Substanzspektrum um unbekannte Substanzen in unterschiedlichsten Konzentrationsniveaus. Neben der Überprüfung der Wiederfindung und Signalintensität der dotierten Targets können dadurch zusätzlich die verwendeten intensitätsabhängigen Peakfinding-Parameter (siehe Kapitel 10.1.1), zur Vermeidung von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen überwacht werden.

8 Geräte

8.1 Allgemeines

Geräte oder Geräteteile, die mit der Wasserprobe in Berührung kommen, müssen frei von Rückständen sein, die Blindwerte verursachen können. Wenn möglich, sollten ausschließlich Glasgeräte eingesetzt werden, da diese durch Ausheizen, beispielsweise 4 h bei 450 °C, besonders gut zu reinigen sind (siehe auch Kapitel 5).

8.2 Probengläser

Passend zum Probenaufgabesystem z. B. Rollrandflasche mit Nennvolumen 1,5 mL mit Bördelkappe und Septum verwenden. Das Ausheizen für mindestens vier Stunden bei 450 °C hat sich bewährt. Die gereinigten Probengläser sind bis zur Verwendung geschützt vor Kontamination aufzubewahren. Dies gilt auch für die Probenahmegefäße. Da ein Ausheizen von Bördelkappen und Septen nicht möglich ist, sollten Septen aus Materialien mit möglichst geringen Blindwerteinträgen verwendet werden. So sind beispielsweise PTFE-beschichtete Septen bevorzugt gegenüber Kautschuk-Septen einzusetzen.

8.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

8.3.1 Allgemein

HPLC-Systeme, die mit Massenspektrometern gekoppelt für Screening-Zwecke eingesetzt werden sollen, bestehen i. d. R. aus Entgasungseinrichtung, pulsationsarmem analytischem Pumpensystem (geeignet für die binäre Gradientenelution), Probenaufgabesystem (optimal gekühlt zur schonenden Probenlagerung bis zur Messung) und Vorrichtung zur Thermostatisierung der Trennsäule.

8.3.2 HPLC-Säule

Ausgehend von der Aufgabenstellung, der zu erwartenden relevanten Substanzvielfalt und den Blindwertanforderungen der Detektion (Datenqualität) mit hochauflösender Massenspektrometrie sind HPLC-Säulen zu wählen, die mit dem Einsatz von MS-kompatiblen Eluenten (organischen Lösemitteln und flüchtigen Puffern) eine ausreichende Retention aufweisen.

Neben Umkehrphasen (reversed phase (RP)), typischerweise C18- oder polar modifizierte C18-Materialien, können auch Säulen mit anderen Trennmechanismen (wie beispielsweise HILIC, Mixed Mode Materialien) eingesetzt werden. Die notwendigen Anforderungen an Eluenten und Ionisationshilfsmittel müssen für das HRMS Spektrometer (beispielsweise für die Ionenquelle) und die Datenqualität erfüllt werden. Beispiele für angewandte Messmethoden sind in Anhang C.1 aufgeführt.

Zur Überprüfung der Robustheit sollten regelmäßig Referenzmaterialien (können auch IS sein) gemessen werden, die den gesamten Trennbereich abdecken. Ebenso können Referenzsubstanzen zur Normierung, d. h. dem Erstellen des sogenannten Retentionszeitindex RTI, benutzt werden (Tabelle B.3) und somit einen Ver- bzw. Abgleich der Retentionszeiten zwischen Laboratorien zulassen ().

8.4 Massenspektrometer

8.4.1 Allgemein

Die heute am häufigsten in der Routine eingesetzten HRMS Massenanalytoren sind Flugzeitmassenspektrometer ((Q-)TOF) und Orbitrap-Systeme. Beide werden für das Non-Target Screening typischerweise im Tandem-MS Modus mit automatisierter Aufnahme von Fragmentationenspektren betrieben. Normalerweise werden die Messungen jeweils in einem spezifischen Messmodus durchgeführt (d. h. im positiven oder im negativen Messmodus), so dass zur vollständigen Erfassung sämtlicher Ionenspezies zwei Messungen notwendig sind. Schemata und Erläuterungen zu QTOF- und Orbitrap-Systemen sind in Anhang D aufgeführt. Beispiele für MS-Methoden sind in Anhang C.2 aufgeführt.

Es sind gewisse Mindestanforderungen an grundlegende Geräteparameter nötig, um Screening-Messungen mittels LC-HRMS durchführen zu können:

- Das **Auflösungsvermögen** sollte mindestens 10.000 [8, 9] betragen (bei 10%iger Überlappung der zu trennenden Massepeaks). Dies ist in etwa vergleichbar mit 20.000 bei Berechnung der Auflösung über die Halbwertsbreite des Massenpeaks.
- Der **Massenbereich** sollte je nach Fragestellung an die Proben gewählt werden. Im Bereich der Umweltanalytik liegen die meisten Moleküle von Interesse im Bereich von m/z 100 bis maximal m/z 1200.
- Die **Massengenauigkeit** sollte bei m/z 200 bei mindestens 5 ppm [9, 10] liegen, um die Anzahl möglicher Summenformeln zu beschränken.
- Verschiedene in Tabelle 9.3 beschriebene Aufnahme-Modi für **Fragmentationenspektren (MS^2)** sind möglich. Auch in den MS^2 -Spektren sollten die grundlegenden Definitionen von HRMS erfüllt sein (R = mind. 10.000 [8, 9] und Abweichungen von max. 5 ppm [10])
- Die erforderliche **Sensitivität** richtet sich nach der Aufgabenstellung und der eingesetzten Chromatographie (Injektionsvolumen) und sollte eine Detektion von Substanzen im Bereich von etwa 10 pg absolut erlauben. Bei Untersuchung von Wasserproben sind Detektionsgrenzen im unteren ng/L-Bereich zur Grenzwertkontrolle erforderlich.
- Die **Systemstabilität** hinsichtlich Sensitivität und Massengenauigkeit muss stets gegeben sein (Beispiel siehe Abbildung E.3 Dokumentationsmöglichkeit zur Kontrolle der MS-Performance über Massengenauigkeit, Auflösungsvermögen und Sensitivität).

8.4.2 Ionenquelle

Die Auswahl der Ionenquelle richtet sich nach der Aufgabenstellung. Hier hat sich die Elektrospray-Ionisation (ESI) bisher durch die recht universelle und robuste Einsatzmöglichkeit am besten bewährt. Andere Ionisationstechniken (z. B. APCI) sind je nach Fragestellung oder den zu detektierenden Substanzen analog einsetzbar.

9 Durchführung

9.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung richtet sich zum einen nach der Aufgabenstellung, der Art der Wasserprobe (z. B. Sickerwasser, Abwasser, Oberflächenwasser, Grundwasser, Trinkwasser) und zum andern nach der Empfindlichkeit des zur Verfügung stehenden LC-HRMS-Systems. Aus Gründen der Vermeidung von Blindwerten durch Verunreinigungen (siehe Kapitel 5), sollte das Ziel der Probenvorbereitung sein, nur unbedingt erforderliche Schritte durchzuführen und sich dabei jeder Kontaminationsquelle bewusst zu sein. [21] In der Tabelle 9.1 sind beispielhaft verschiedene Probenvorbereitungen und Probenaufgaben zusammengestellt.

Tabelle 9.1: Vor- und Nachteile einzelner Schritte bei Probenvorbereitung und Probenaufgabe

Bezeichnung	Vorgehensweise (Beispiel)	Vorteile	Nachteile
<u>Probenvorbereitung</u>			
Filtration	Vorsatzfilter mit Membranfilter aus regenerierter Cellulose, Celluloseacetat, PTFE oder Glasfaser	homogene Probe	Kontamination, Sorption, arbeits- und materialintensiv, Verstopfung
Konservierung	Kühlung (4 °C, -18 °C), Stabilisator	Wirkt auf unterschiedliche Analyten unterschiedlich	
Festphasenextraktion (SPE)	Sorbensmaterial und -menge, pH-Wert, Lösemittel	ggf. hoher Anreicherungsfaktor, Matrixabtrennung	Kontamination, Sorption, Substanzgruppen spezifisch, arbeits- und materialintensiv
Zentrifugation	mind. 2500 x g, 10 min	einfache und schnelle Durchführung	Bruchgefahr, Kontamination und Absorption bei evtl. Umfüllen
<u>Probenaufgabe</u>			
Direktinjektion, ohne SPE	maximal 100 µL	unveränderte Probe, benötigtes Probenvolumen gering	Probenlagerung großer Restmengen
Koinjektion von internem Standard (IS)	95 µL Probe und 5 µL IS	zeitsparend, hohe Reproduzierbarkeit	nicht mit jedem Autosampler möglich
Online SPE	Sorbensmaterial und Menge, pH-Wert, Lösemittel	Vollständige Automatisierung möglich	Kontamination, Sorption, Substanzgruppen spezifisch, materialintensiv

9.2 Chromatographie

Die chromatographische Trennung darf trotz des selektiven HRMS nicht vernachlässigt werden. Die Retentionszeit (RT) stellt ein wichtiges Kriterium für die Identifizierung einer Substanz dar und spiegelt physiko-chemische Eigenschaften (z. B. Polarität) wider. Welche Chromatographie zur Anwendung kommt, richtet sich nach der Aufgabenstellung. Reicht die Trennleistung einer klassischen C18-HPLC Säule nicht aus, kann auf Säulenmaterialien mit kleineren Partikeldurchmessern (z. B. UHPLC-Säulen) zurückgegriffen werden. Die eingesetzte Phase muss dem zu erfassenden Polaritätsbereich (log D) angepasst werden. So kann neben C18-Materialien auch polaritätserweiterte Chromatographie notwendig werden.

An die Chromatographie ergeben sich durch die Aufgabenstellung zusätzliche Anforderungen. Zur Trennung müssen MS-kompatible, flüchtige und verdampfbare Puffer bzw. Ionisationshilfsmittel eingesetzt werden. Die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Trennung ist hierbei sehr wichtig, um Vergleiche innerhalb und zwischen verschiedenen Datensätzen sinnvoll vornehmen zu können. Der Vergleich von Chromatogrammen, beispielsweise einer Zeitreihe über Monate, erfordert eine hohe Langzeitstabilität (siehe Anhang E und E.2). Eine RT-Toleranz von 0,15 Minuten (analog [10]) kann als Mindestanforderung an die RT-Stabilität definiert werden. Die Kontrolle der Retentionszeiten kann mit chromatographischen Referenzmaterialien erfolgen. Zum einen ermöglicht dies die Erfassung der Robustheit der Trennung; zum anderen ermöglicht dies zugleich die Normierung des abgedeckten Trennbereichs (in Bezug auf Polarität). Diese Retentionszeitnormierung über einen RT-Index (RTI) kann die Übertragbarkeit von Ergebnissen zwischen Laboren mit unterschiedlichen LC-Methoden im Screening ermöglichen (Beispiel für einen RT-Standard siehe Tabelle B.3).

9.3 Massenspektrometrie

Die heute am häufigsten in der Routine eingesetzten HRMS Massenanalytoren sind Q-TOF und Orbitrap (siehe Anhang D).

9.3.1 Ionenquelle / Ionisationstechnik

Für die Anwendung des Non-Target Screenings in der Wasseranalytik hat sich die Verwendung einer Elektrospray-Ionisationsquelle als bevorzugte Ionisierungstechnik herausgestellt. Für ein Non-Target Screening ist eine Ionenquelle erforderlich, die einen weiten Polaritätsbereich an Analyten mit ausreichender Sensitivität erfasst. Dafür ist es zielführend, dass die Quellenparameter (z. B. Temperatur, Gasflüsse, Spannungen) bei der Ionisierung so gewählt werden, dass möglichst wenig Fragmentierungsreaktionen (*in-source*-Fragmentierung) oder Adduktbildungen in der Quelle stattfinden. Trotz der eher sanften Ionisierung bei der ESI sind Fragmentbildungen in der Quelle selten komplett zu vermeiden. Alternativ können je nach Fragestellung bzw. Proben auch andere Ionisierungstechniken, wie beispielsweise APCI, sinnvoll sein. In der Tabelle 9.2 sind typische Addukte und Fragmente, die bei der Elektrospray-Ionisierung entstehen können, aufgelistet. Für eine detailliertere Zusammenstellung typischer Addukte und Fragmente inkl. Substanzbeispielen wird auf Anhang G verwiesen.

Tabelle 9.2: Addukt- und Fragmentbildung in der Quelle bei der Elektrospray-Ionisierung

	ESI+	ESI-
Substanz-eigenschaften	Ausreichend basische Verbindungen, die Protonen oder andere Kationen anlagern	Ausreichend azide Verbindungen, die ein Proton (in der Gasphase) abgeben
Ionisation	Addition von Kationen z. B. H ⁺ , Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺	Abgabe eines Protons oder Anlagerung eines Anions z. B. -H ⁺ , +Cl ⁻ , +HCOO ⁻
typische Addukte	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+NH ₄] ⁺ , [M+nH] ⁿ⁺	[M-H] ⁻ , [M+HCOO] ⁻ , [M+Cl] ⁻ , Dimere
Fragmentierung	Sanfte Ionisation und dadurch relativ wenige Fragmente (<i>in-source</i> -Fragmentierung nicht immer einfach zu erkennen), Fragmentierung durch MS/MS Kollisionsenergie	
Typische Fragmente	[M+H-H ₂ O] ⁺ , [M+H-CO ₂] ⁺ , [M+H-C ₂ H ₆ O] ⁺	[M-H-CO ₂] ⁻ , [M-F] ⁻

9.3.2 Messtechnik

Das Ziel bei Suspect-Target und Non-Target Screening besteht darin, möglichst viel analytische Information über die Probe bei der LC-HRMS Messung zu gewinnen. Hierfür können je nach Aufgabenstellung unterschiedliche Messmodi eingesetzt werden. Die Messtechniken sind in Tabelle 9.3 zusammengestellt. Neben der Aufnahme von hochaufgelösten Massenspektren kann je nach Scangeschwindigkeit des eingesetzten Gerätes eine vorgegebene oder auch eine vom System automatisch getriggerte MS²-Spektren-Aufnahme erfolgen (siehe Abbildung 9.1). Die massenspektrometrische Erfassung der Messdaten (je Zyklus ein Full-Scan-Spektrum inkl. MS²-Spektren) muss so gewählt werden, dass stets eine ausreichend gute Abbildung der chromatographischen Peaks gewährleistet ist. Die Gesamtdauer eines massenspektrometrischen Messzyklus (cycle-time) muss an die chromatographische Methode angepasst werden. Dabei soll eine Abtastung von Peaks für robuste Auswertungen mindestens 12 Datenpunkte betragen. [10] Zur Erfassung von mehr Informationen bei qualitativen Screening-Messungen kann eine geringere Abtastrate akzeptiert werden. Mindestens 6 bis 8 Datenpunkte sind jedoch auch hier erforderlich, da ansonsten die Zunahme der Messschwankungen eine reproduzierbare Auswertung schwierig bzw. unmöglich macht.

Tabelle 9.3: Zusammenstellung der unterschiedlichen MS-Messtechniken mit Kurzbeschreibung

Messtechnik	Beschreibung
HRMS bzw. FS	<i>HRMS: High Resolution Mass Spectrometry</i> <i>FS: Full-Scan</i> Detektion der akkuraten Massen aller in der Ionenquelle gebildeten Ionen in einem vorgegebenen Massenbereich über die gesamte chromatographische Laufzeit.
MS/HRMS	Selektion und Fragmentierung eines Ions (Vorläuferion / engl. Precursor) und Detektion der akkuraten Massen der gebildeten Fragmente. Die Auswahl des Vorläuferions erfolgt nach unterschiedlichen Kriterien: <i>MS/MS Target</i> Vorgabe spezifischer Massen, von welchen ein MS/MS gemessen wird. <i>Data dependent acquisition (DDA)</i> Festlegung mehrerer MRM/SRM Experimente in einer Messung. Gerät scannt über die gesamte Messzeit nach Vorläuferionen und sobald ein Schwellenwert an Signalintensität überschritten wird, setzt MS/MS Fragmentierung ein. (Beispiel in Anhang D) <i>Data independent acquisition (DIA)</i> Permanente/Alternierende Fragmentierung aller Molekülionen <i>und analoge Messmodi (MS^E, MS/MS^{all} bzw. AIF)</i> Option zum schnellen Scannen kleinerer Massenfenster nacheinander (MS ^E , SWATH®) bei einigen Herstellern vorhanden. Deutlich komplexere Datenauswertung! (Beispiel in Anhang D)

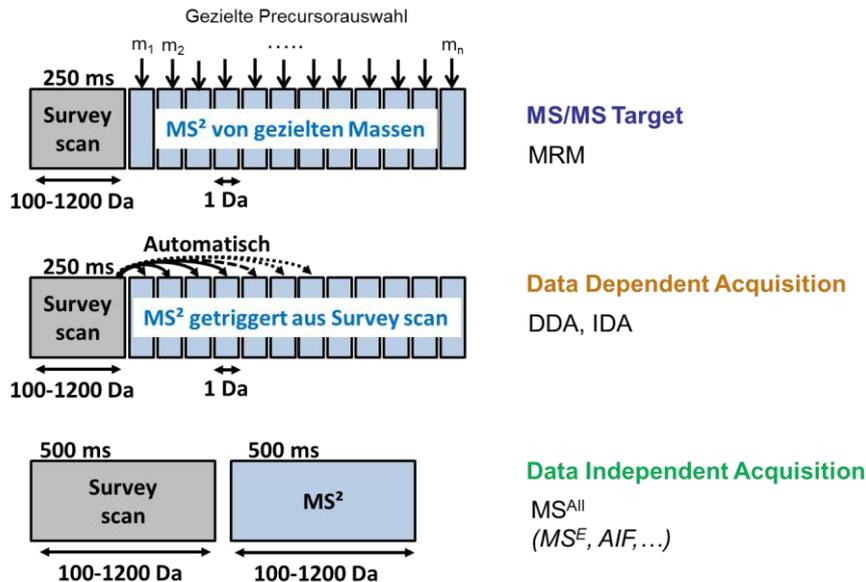


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung verschiedener möglicher MS²-Messmodi

9.3.3 Massenkalkulation und Massengenauigkeit

Abhängig vom verwendeten Messsystem ist regelmäßig eine Durchführung und/oder Überprüfung der Massenkalkulation erforderlich und zu dokumentieren. Bei der Kalkulation aller Messmodi (MS und MS²) und Ionisationsmodi (ESI positiv und negativ) ist entsprechend der Herstellervorgaben vorzugehen. Die vorgeschriebenen Kalibrierlösungen bzw. Standards sind zu verwenden. Diese Massenkalkulation kann intern und/oder extern erfolgen und muss den relevanten Massenbereich abdecken.

9.3.4 QS der LC-HRMS-Messung

Die Verwendung von isotoopenmarkierten Substanzen (siehe Kapitel 7.5) als interne Standards, verteilt über den Retentionszeit- und Massenbereich, ist zur Kontrolle der Systemstabilität bezüglich der Retentionszeit, Massengenauigkeit sowie der Empfindlichkeit und Erkennung von Matrixeffekten erforderlich.

10 Auswertung

10.1 Messdaten

Zur Auswertung der LC-HRMS-Daten wird in der Regel die Software des Geräteherstellers eingesetzt. Diese kann durch Software anderer Hersteller oder eigener Entwicklungen problembezogen ergänzt oder ersetzt werden. Daneben wurden bereits zahlreiche *open-source*-Algorithmen entwickelt, welche ebenfalls Vorteile gegenüber den jeweiligen Einzellösungen darstellen können. Neben der freien Verfügbarkeit ist hierbei vor allem die Vergleichbarkeit der Auswertung trotz verschiedener Gerätetechnik anzuführen. Nach Konvertierung der Akquisitionsdaten in freie Formate, beispielsweise *.mzML oder *.mz(X)ML, können verschiedenste Datenformate mit demselben Workflow prozessiert werden.

Die ersten Schritte der Datenprozessierung sind entscheidend für das Ergebnis des Non-Target Screenings [22] und sollen im Folgenden einzeln und näher erläutert werden.

10.1.1 Peakfinding

Die Ermittlung von Features ist bei der Auswertung der Messdaten der erste Schritt, von dessen Ergebnis alle weiteren Auswertungen abhängen. Abhängig von der Aufgabenstellung kann das Peakfinding manuell erfolgen, beispielsweise mit einer Suspect-Target Liste. Beim Non-Target Screening erfolgt dies mittels eines speziellen Peakfinding-Algorithmus. Hierbei gibt es unterschiedliche Strategien von denen exemplarisch drei genannt sind:

- Die erste Strategie betrachtet die beiden Koordinaten RT und m/z unabhängig voneinander. Über die m/z -Achse wird die Schwankung einer Masse betrachtet und über die Retentionszeitachse der Verlauf der Intensität. Die Festlegung eines Intensitätsschwellenwertes (Threshold) ist hierbei ein entscheidendes Kriterium für die Feature-Erkennung.
- Die zweite Strategie besteht in der Analyse von extrahierten Ionen-Chromatogrammen innerhalb eines engen m/z -Bereichs. Diese Chromatogramme können dann, unabhängig voneinander mit einem geeigneten Filter (z. B. Gaußfilter zweiter Ordnung) auf chromatographische Peaks untersucht werden. Bei dieser Strategie wird die Suche nach Peaks im kompletten m/z -Bereich umgangen.
- Die dritte Strategie zur Extraktion von Features aus einem LC-HRMS Datensatz besteht in einer Modellanpassung an die Rohdaten. Ein Modell kann beispielsweise die dreidimensionale Anpassung eines Isotopenmusters beginnend beim intensivsten Peak und anschließender Subtraktion sein. Dieser Prozess wird iterativ angewendet bis nur noch Rauschen vorliegt.

Für weitere Details wird auf [23] verwiesen.

Die falsch-positiv- bzw. falsch-negativ-Problematik sollte bei der Optimierung aller Peakfinding-Parameter berücksichtigt werden. Zu strenge Kriterien führen zu falsch-negativ-

Befunden, d. h. reale Signale werden nicht mehr automatisiert erkannt. Zu großzügige Einstellungen hingegen erhöhen die falsch-positiv-Rate durch das Erfassen von Rauschen, welches fälschlicherweise als Peak erkannt wird. Dieses gegenläufige Verhalten von falsch-positiv- bzw. falsch-negativ-Befunden erschwert die Optimierung des Peakfindings und erfordert Kompromisse. An dieser Stelle wird geraten, die Anzahl an falsch-negativ-Befunden zu minimieren und zunächst eine erhöhte falsch-positiv-Rate zu akzeptieren. Diese kann durch Filterkriterien (nach dem eigentlichen Peakfinding) reduziert werden. Einen sehr großen Einfluss auf das Ergebnis hat der sog. Intensitätsschwellenwert (Threshold), welcher definiert, bis zu welcher Signalthöhe nach Features gesucht werden soll. Dieser Wert sollte so gewählt werden, dass der Großteil bekannter Komponenten im relevanten Konzentrationsbereich noch erfasst werden kann.

Zur Überprüfung dieses Peakfinding-Schrittes für jede neue Messkampagne wird das Dotieren bekannter (isotopenmarkierter) Substanzen im relevanten Konzentrationsbereich (z. B. 0,1 µg/L) in Realmatrices empfohlen (QS Kontrollprobe, siehe Kapitel 7.6.3). Die Intensitätsabhängigkeit dieses Schrittes erfordert eine gute Langzeitstabilität der Empfindlichkeit des Messgerätes (siehe Anhang E.2), welche somit überprüft werden kann. Bei der generischen Peak-Extraktion sind die intensitätsabhängigen Parameter (z. B. Schwellenwert für das Rauschen („Noise threshold“)) besonders entscheidend, um die Anzahl an gefundenen Features zu definieren. Einerseits durch die Limitierung an falsch-positiv-Ergebnissen im Datensatz sowie der Vermeidung wichtige Features auszuschließen. Aus technischen Gründen (z. B. Anpassung der Detektorspannung, Austausch des Detektors oder ESI-Nadel) kann die Grundempfindlichkeit des Messgerätes zwischen zwei Messreihen zu stark voneinander abweichen, als dass die während der Methodenentwicklung bzw. –validierung ermittelten Werte für die intensitätsabhängigen Parameter noch zu guten Ergebnissen führen können. Auch bei der Etablierung der bestehenden Auswertemethode auf ein neues Messsystem ist es wahrscheinlich, dass sich die Empfindlichkeiten der Messgeräte unterscheiden. In diesen Fällen ist eine Anpassung der Methodik erforderlich, in Anhang F wird eine solche Strategie beispielhaft dargestellt.

Durch eine Validierung, basierend auf der QS Kontrollprobe, kann die „Leistungsfähigkeit“ der Auswertemethode beurteilt werden. Gängige Größen, wie beispielsweise die falsch-positiv-Rate, „Recall“ oder „Precision“, erlauben eine umfassende Bewertung dieses Schrittes. Die Qualität aller Folgeschritte, und somit auch der Endergebnisse, werden maßgeblich durch diesen Schritt beeinflusst und unterstreichen damit dessen Wichtigkeit.

10.1.2 Alignment

Das Alignment besteht in der Zuordnung gleicher Features innerhalb einer einzelnen Probe oder zwischen verschiedenen Proben. Der Abgleich der detektierten Features erfolgt in der Retentionszeit- und der Massen-Domäne. Das Ergebnis ist eine Datenmatrix bestehend aus Features (Zeilen) und Proben (Spalten) mit der Peakintensität oder Peakfläche als Matrixeintrag. Zur Verbesserung der Zuordnung zwischen den Proben kann eine Retentionszeitkorrektur und Massenrekalibration beispielsweise über die internen Standards (siehe Anhang B.1) durchgeführt werden.

10.1.3 Blindwertkorrektur

Bei der Datenprozessierung ist die Berücksichtigung des Blindwertes besonders hervorzuheben. In erster Linie soll dieser die falsch-positiven Befunde minimieren. Dazu muss der Blindwert zu den Proben passend gewählt werden. Wird der falsche Blindwert in die

Auswertung mit einbezogen, besteht die Gefahr der Elimination von realen Features (Generierung falsch-negativer Befunde). Als Beispiel ist bei der Direktmessung von Proben ein System- bzw. Feld- oder Transportblindwert sinnvoll. Bei Messungen aufbereiteter Proben, wie z. B. SPE-Extrakten, werden falsch-positive Befunde durch die Wahl eines Extraktionsblindwertes minimiert. Nähere Erläuterungen zu möglichen Blindwerten und deren Berücksichtigung sind in Kapitel 5 genannt.

10.1.4 Komponentisierung

Ein Molekül kann bei der Ionisation unterschiedliche Addukte erzeugen (siehe Anhang G). Zu jedem dieser Addukte liegt zudem das Isotopenmuster vor. Zusätzlich können in der Ionenquelle Fragmentierungen auftreten, die weitere Features zu dem Molekül erzeugen. So können einem Molekül unter Umständen zahlreiche Features zugeordnet werden. Durch die Komponentisierung sind diese Features zu erkennen und zu einer Komponente zu vereinen. Die verwendeten Begriffe für diese zusammengefassten Komponenten sind unterschiedlich je nach Softwarepaket und Gerätehersteller (z. B. Molecular Feature (Agilent), Bucket (Bruker), Feature (Sciex), Merged Feature (Thermo)).

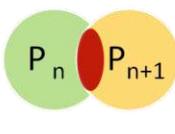
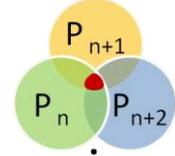
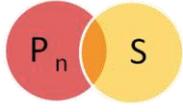
10.1.5 Summenformelgenerierung

Anhand der ermittelten akkuraten Masse und des Isotopenmusters können mögliche Summenformeln angegeben werden. Die „Seven Golden Rules“ zur Ermittlung von Summenformeln aus Messdaten sind in [11] beschrieben. Je genauer die ermittelte Masse, desto weniger Möglichkeiten an Summenformeln ergeben sich. Das Spektrum der Summenformelvorschläge ist in Art und Umfang zudem abhängig von den für die Berechnung der Summenformel verwendeten Elementen. Eine eindeutige Summenformel kann aus den Messdaten nur selten erhalten werden. [11]

10.2 Interpretation

Voraussetzung für die Beantwortung der Fragestellung (Tabelle 1.1) sind validierte Daten der Auswertung (siehe Kapitel 10.1). Die Ergebnisse können beispielsweise in einem Masse-Retentionszeit-Plot (Punktwolke) dargestellt werden. Die ermittelten Punktwolken können als Mengen P_n (im mathematischen Sinn) betrachtet werden. Die Elemente der Mengen sind die Features (Komponenten), charakterisiert durch die akkurate Masse und die Retentionszeit. Die Mengen können entsprechend der Fragestellung vergleichend ausgewertet werden. Beispielhaft sind einige Fragestellungen an eine zeitliche Probenserie in Tabelle 10.1 mit der symbolischen Darstellung und der Formulierung in der Mengenschreibweise zusammengestellt.

Tabelle 10.1: Schematische Darstellung des Vergleichs von Punktwolken

Fragestellung	Symbolische Darstellung	Mengentheoretische Beschreibung
Feature ist in zwei aufeinander folgenden Proben enthalten		$P_n \cap P_{n+1}$
Feature ist in drei aufeinander folgenden Proben enthalten		$P_n \cap P_{n+1} \cap P_{n+2}$
Feature ist in allen 14 Proben der Serie enthalten	$S = P_n \cap P_{n+1} \cap \dots \cap P_{14}$	
Feature ist ausschließlich in einer Probe der Serie enthalten		$P_n \setminus S$

10.2.1 Identifizierung

Abhängig von den vorliegenden Informationen ist es sinnvoll den Grad der Identifizierung in Kategorien bzw. Level einzuteilen. [24] Eine einheitliche Kategorisierung ist Voraussetzung für den Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Laboratorien. Hierbei ist es zweckmäßig bei der Kommunikation der Ergebnisse aus dem Non-Target Screening zwei Gruppen von Adressaten zu unterscheiden. Die eine Gruppe stellt Adressaten ohne Detailkenntnisse der Messtechnik und Auswertung dar, während die andere Gruppe dieses Detailwissen hat. Sinn dieser Differenzierung in der Ergebniskommunikation ist eine Fokussierung auf die für den Adressaten wesentliche Information. Tabelle 10.2 zeigt die Klassifizierung mit den entsprechenden Voraussetzungen.

Die Kategorisierung beruht auf den mittels LC-HRMS erzeugbaren Informationen Retentionszeit, akkurate Masse und die gemessenen MS²-Spektren. Weitere Messdaten, wie beispielsweise CCS-Werte (Collision Cross Section) aus Ionenmobilitätsmessungen, können einen weiteren Beitrag zur Eingrenzung von Datenbanktreffern und einer eindeutigen Substanzidentifizierung leisten. [25]

Tabelle 10.2: Klassifizierung der Features aus dem HRMS Screening

Ergebnisdarstellung und Bearbeitung der Features (Signale) aus dem HRMS Screening

Protokoll Auftraggeber		Protokoll Bearbeiter					Referenzdaten			
Signal*	Aussage	Signal*	Aussage	akkurate Masse	RT (RTI)	MS2 Datenbank	MS2 Referenz	MS2 Insilico		
Kat. 1	Identifizierte Substanz	Kategorie 1	Bestätigte Substanz/Struktur	✓	✓	✓	✓	!		
Kat. 2	Wahrscheinliche Substanz	Kategorie 2***	Wahrscheinliche Substanz/Struktur*	✓	! :	✓	✗	!		
Kat. 3	Substanzvorschläge aus Summenformel	Kategorie 3a	Mögliche Struktur, Angabe von Metadaten	✓	!	✗	✗	✓		
		Kategorie 3b	Mögliche Substanz	✓	✓	✗	✗	✗		
Kat. 4	Signal einer Substanz	Kategorie 4a**	Summenformel	✓	✗	✗	✗	✗		
		Kategorie 4b	Feature (Signal)	✗	✗	✗	✗	✗		

* Ein Signal ist charakterisiert durch die exakte Masse, die Retentionszeit und einer Intensität.

** Eine Summenformel kann angegeben werden, wenn mind. 2 Isotope und/oder Addukte in den Signalen zugeordnet werden können.

*** Die Bestätigung durch eine Referenz steht aus.

Legende:

✗ nicht vorhanden
! : kann vorhanden sein
✓ muss vorhanden sein

10.2.1.1 Datenbanken

Die Nutzung von Datenbanken zur Unterstützung der Identifizierung von Features, kann eine schnelle und effektive Vorgehensweise sein. Der Erfolg ist von den Suchkriterien und dem Umfang der Datenbankeinträge abhängig. Im Internet steht eine Vielzahl von unterschiedlichen Stoff-Datenbanken zur Verfügung. Für allgemeine chemische Datenbanken mit mehreren Millionen Einträgen wie beispielsweise PubChem [12], ChemSpider [13] ergeben sich u. U. hunderte von Treffern zu einer abgefragten Masse oder Summenformel. Teilweise erlauben die Datenbanken die Priorisierung von Mehrfachtreffern durch Metainformationen. Beispielsweise kann eine Retentionszeit-Abschätzung mittels quantitativer Struktur-Retentionsmodelle helfen, zum gemessenen Retentionsverhalten passende Strukturvorschläge zu priorisieren. [26] Weitere zur Priorisierung von Treffern anwendbare Metainformationen sind z. B. Literaturreferenzen, Toxizitätsdaten oder Einsatzzweck und -menge. Die Arbeitsplattform FOR-IDENT [27] mit der hinterlegten Stoffdatenbank STOFF-IDENT [14] und weitere umweltrelevante Stoff-Datenbanken wie Chemistry Dashboard [28] und Norman Network Databases [29] stellen eine Unterstützung bei der Identifizierung speziell von gewässerrelevanten Substanzen dar, bei der die Datenbank nicht nur nach akkurater Masse oder Summenformel abgefragt wird, sondern zusätzliche Informationen (Metadaten siehe 10.2.1.2) mit einbezogen werden können. Zur Priorisierung eines einzelnen Vorschlags bei Mehrfachtreffern zu einer abgefragten Masse oder Summenformel werden bei der FOR-IDENT Plattform beispielsweise die normierte Retentionszeit, Summenformel und/oder Produktionenspektren (Abgleich mit *in-silico*-Fragmentationenspektren) verwendet.

10.2.1.2 Metadaten

Zur Identifizierung von Features bzw. Komponenten sind Informationen über die untersuchte Probe hilfreich. Solche Metadaten sind beispielsweise Eigenschaften von Substanzen, Vorkommen, Einsatzgebiete, Einsatzmengen, mögliche Transformations- oder Nebenprodukte durch Produktion oder ihre Anwendung.

10.2.2 Statistische Methoden

Aufgrund der anfallenden Datenmenge beim Non-Target Screening sind für die Auswertung multivariate statistische Methoden beispielsweise die Hauptkomponentenanalyse (PCA) hilfreich. [30] Zur statistischen Auswertung von Analysendaten bieten verschiedene Softwaretools unterschiedliche Möglichkeiten. [22]

11 Angabe der Ergebnisse - Analysenbericht

Um Analysenergebnisse aus LC-HRMS-Messungen möglichst vergleichbar zu machen, ist eine Dokumentation des eingesetzten Workflows zwingend erforderlich. Insbesondere bei der Einbindung von Datenbanken bietet sich die Möglichkeit, durch die richtige Wahl und die Dokumentation der Parametrierung der Abfrage, eine vergleichende Betrachtung der Datenbanktreffer durchzuführen. Die Parametrierungen von Datenprozessierung und Datenbankabfragen sind zur Nachvollziehbarkeit möglichst umfassend zu dokumentieren.

Des Weiteren bildet die einheitliche Beschreibung der analytischen Sicherheit (Kategorisierung) von Identifizierungsergebnissen unbekannter Features eine Basis für den Vergleich von LC-HRMS-Screening-Ergebnissen (siehe 10.2.1).

12 Vergleichsuntersuchung

12.1 Teilnehmer

Name	Institution / Firma
Brüggen, Susanne	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW D - 47051 Duisburg
Dünnbier, Uwe	Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB) D - 13629 Berlin
Fink, Angelika	Hessenwasser GmbH & Co. KG
Götz, Sven	D - 64293 Darmstadt
Geiß, Sabine	Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie Umweltanalytik/Umweltradioaktivität D-07745 Jena
Letzel, Thomas	Technische Universität München (TUM)
Grosse, Sylvia	AFG, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft D - 80333 München
Petri, Michael	ZV Bodensee-Wasserversorgung Betriebs- und Forschungslabor D - 78354 Sipplingen
Scheurer, Marco	DVGW-Technologiezentrum Wasser D - 76139 Karlsruhe
Schlüsener, Michael	Bundesanstalt für Gewässerkunde
Kunkel, Uwe	D - 56068 Koblenz
Schulz, Wolfgang	Zweckverband Landeswasserversorgung
Lucke, Thomas	D - 89129 Langenau
Singer, Heinz	Eawag CH - 8600 Dübendorf
Stötzer, Sebastian	Bachema AG CH - 8952 Schlieren
Schlett, Claus	Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH D - 45891 Gelsenkirchen
Seiwert, Bettina	Department Analytik Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ D - 04318 Leipzig
Sengl, Manfred	Bayerisches Landesamt für Umwelt D - 86179 Augsburg
Türk, Jochen	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) D - 47229 Duisburg
Zwiener, Christian	Universität Tübingen Umweltanalytik am ZAG D - 72074 Tübingen

12.2 Durchführung

Im Rahmen des Fachausschusses „Non-Target Screening“ der Wasserchemischen Gesellschaft (siehe 12.1) wurden zwei Vergleichsmessungen durchgeführt.

12.2.1 Vergleichsmessung A

- Teilnehmer:
 - Versand an 18 Teilnehmer (Rücklauf 15 Datensätze)
 - MS-Hersteller: Agilent, SCIEX, Thermo, Waters
- Probensatz:
 - Blanks und methanolische Referenzstandards (10 mg/L) zur Verdünnung beim Teilnehmer
 - Jeweils 5 Substanzen für positive und negative Elektrospray-Ionisation
 - 2 zusätzliche Substanzen mit einer Ionisierbarkeit in beiden ESI-Modi
- Vorgaben:
 - Fixes Injektionsvolumen von 10 µL (zur vergleichenden Auswertung der Gerätesensitivität)
 - Literaturspektren der bekannten Verbindungen
- Analytik:
 - (Suspect-) Target Screening auf die bekannten Verbindungen mit den bei den Teilnehmern etablierten LC-HRMS-Methoden
- Aufgabe:
 - Verdünnung der Standardlösung in dekadischen Schritten
 - Einfach-Messung der Verdünnungen zur Festlegung der Detektionsgrenzen (Detektion von mindestens zwei der angegebenen Fragmentionen)
 - Abgleich der Produktionenspektren mit Literaturspektren
 - Dreifachmessung an der Detektionsgrenze
- Erfasste Daten:
 - Angewandte Methodik
 - Precursor-Massen
 - Detektionsgrenzen

12.2.2 Vergleichsmessung B

- Teilnehmer:
 - 21 Teilnehmer (Rücklauf 18 Datensätze)
 - MS-Hersteller: Agilent, SCIEX, Bruker, Thermo, Waters
- Probensatz:
 - 4 randomisiert dotierte Donauwasserproben (undotiert, 0,025, 0,10 und 0,50 µg/L)
 - 24 dotierte Verbindungen (dem Teilnehmer nicht bekannt, aber in Suspect-Liste enthalten)
- Vorgaben:
 - Suspect-/Non-Target Screening (jeweils etablierter Workflow)
 - Suspect-Liste (ca. 200 Substanzen)
 - RTI-Std. (TUM) – Datenrücklauf und Auswertung TUM
- Analytik:
 - Etablierter Screening-Workflow (Suspect- oder Non-Target)
- Aufgabe:
 - Ermittlung der dotierten Verbindungen
 - Prüfung der Summenformel (Isotopie)
 - Art der Identifizierung (Datenbank, Referenzstandard)
 - Identifizierung und Kategorisierung (nach 10.2.1)

12.3 Ergebnisse

12.3.1 Eingesetzte Methoden

Bei allen Teilnehmern erfolgte die Trennung auf einer Umkehrphasenchromatographie unter Verwendung von Methanol bzw. Acetonitril mit Zugabe eines Ionisationshilfsmittels im sauren pH-Wert-Bereich. Alle Teilnehmer verwendeten die Elektrospray-Ionisation sowohl im positiven als auch negativen Messmodus. Die automatisierte Erfassung von MS/MS-Spektren im selben Lauf war abhängig von der Datenaufnahmegeschwindigkeit der Massenspektrometer. Falls keine automatische Aufnahme möglich war, wurden MS/MS-Spektren in separaten Läufen erfasst und für die Auswertung herangezogen.

12.3.2 Sensitivität

Die Bewertung der Sensitivität der Systeme erfolgte durch Verdünnung der methanolischen Lösungen von 10 mg/L je Substanz in 10er Schritten mit Wasser. Als Detektionsgrenze definiert war die Verdünnung, bei der noch zwei der angegebenen Fragmentionen bei 10 µL Injektionsvolumen detektiert werden konnten (Abbildung 12.1).

		Detektionsgrenzen in µg/L										
		Nr. 1	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 10	Nr. 11	Nr. 13	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 12
ESI pos	Alachlor	1	100	1	1	100	10	0.1	0.01	100	0.1	0.01
	Atrazin	0.1	10	0.1	0.1	10	0.1	0.1	0.1	0.0001	0.01	0.01
	Clarithromycin	0.1	1000	1	1	10	1	0.1	0.1	0.001	0.1	0.01
	Gabapentin	1	100	0.1	1	10	1	0.1	n.n.	0.0001	0.01	1
	Quinoxifen	0.1	1000	0.1	0.1	10	0.1	0.1	0.01	0.0001	0.1	0.01
	Valsartan	0.1	n.n.	0.1	1	100	1	0.1	0.01	0.0001	0.01	1
	Candesartan	0.001	100	0.1	0.1	1	1	0.1	0.1	0.0001	0.01	1
ESI neg	PFNA	n.n.	1000	0.1	1	100	10	n.a.	1	0.0001	0.1	0.1
	HCT	1	1000	1	1	10	10	n.a.	0.1	0.0001	0.1	1
	Mecoprop	1	1000	1	1	10	10	n.a.	0.1	0.0001	0.1	1
	Ioxynil	0.01	1000	0.1	0.1	1	1	n.a.	0.01	0.0001	0.1	0.1
	Dinoseb	0.01	100	0.1	0.1	0.1	0.1	n.a.	0.01	0.0001	0.1	0.01
	Valsartan	0.01	n.n.	0.1	1	10	10	n.a.	0.1	0.0001	0.1	1
	Candesartan	0.001	100	0.1	1	10	10	n.a.	0.1	0.001	0.1	1
nicht vermessen/analysiert												

TOF-Geräte

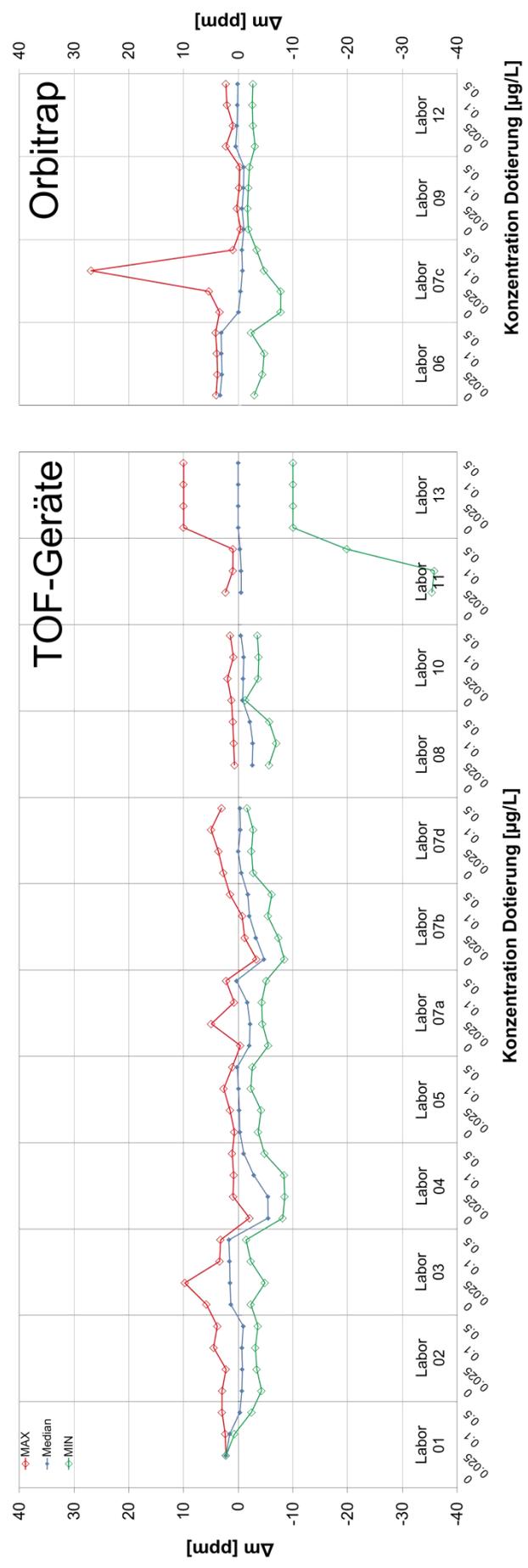
OrbiTrap

Abbildung 12.1: Vergleich der Detektionsgrenzen als Konzentration mit mindestens zwei detektierbaren Fragmentionen (Labore 6 und 3 Ausreißer) PFNA: Perfluorononansäure HCT: Hydrochlorothiazid

12.3.3 Massengenauigkeit MS

Der Median der Massenabweichungen der Molekülionen der dotierten Verbindungen lag unter 5 ppm. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Massengenauigkeit der unterschiedlichen Systeme TOF und Orbitrap. Ebenso waren die Massenabweichungen unabhängig von der dotierten Konzentration (Abbildung 12.2).

Abbildung 12.2: Massenabweichungen im MS-Modus (Labore 8 und 11: undotierte Probe nicht gemessen)



12.3.4 Massengenauigkeit der Fragmentmassen (MS/MS)

Qualitative Unterschiede in den Fragmentationenspektren waren hauptsächlich durch die Kollisionsenergie bedingt. Wird die Massengenauigkeit der Fragmente betrachtet, so zeigt sich ein Unterschied zwischen den TOF- und den Orbitrap-Geräten. Flugzeitmassenspektrometer (Abbildung 12.3) weisen eine etwas größere Massenabweichung bei MS/MS-Experimenten gegenüber Orbitrap-Geräten (Abbildung 12.4) auf. Die Abweichungen liegen für TOF-Geräte meist im Bereich von unter 5 mDa, entsprechend einer relativen Abweichung von 5 bis 50 ppm. Bei den Orbitrap-Geräten liegen die absoluten Massenabweichungen meist unter 2 mDa, entsprechend einer relativen Abweichung von 2 bis 40 ppm (Massenbereich m/z 50 - 1000).

Abbildung 12.3: Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (TOF-Geräte); geordnet nach Fragmentmasse und getrennt nach Ionisationsmodus -

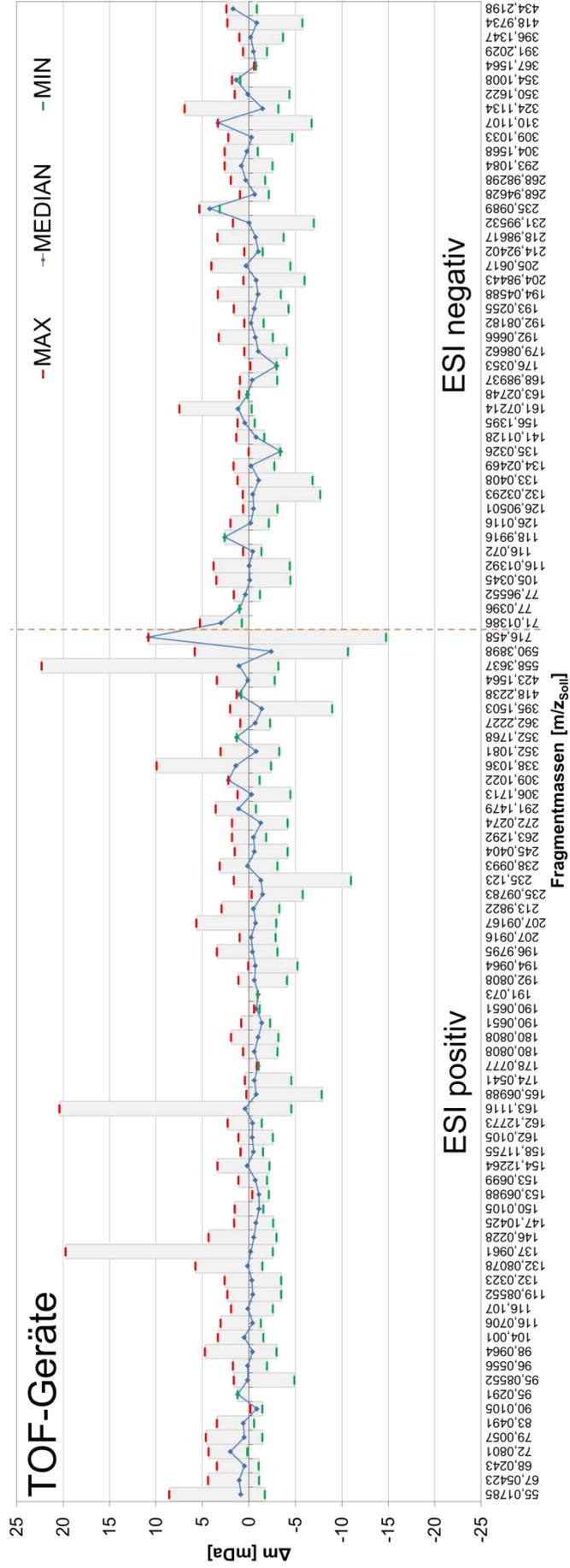
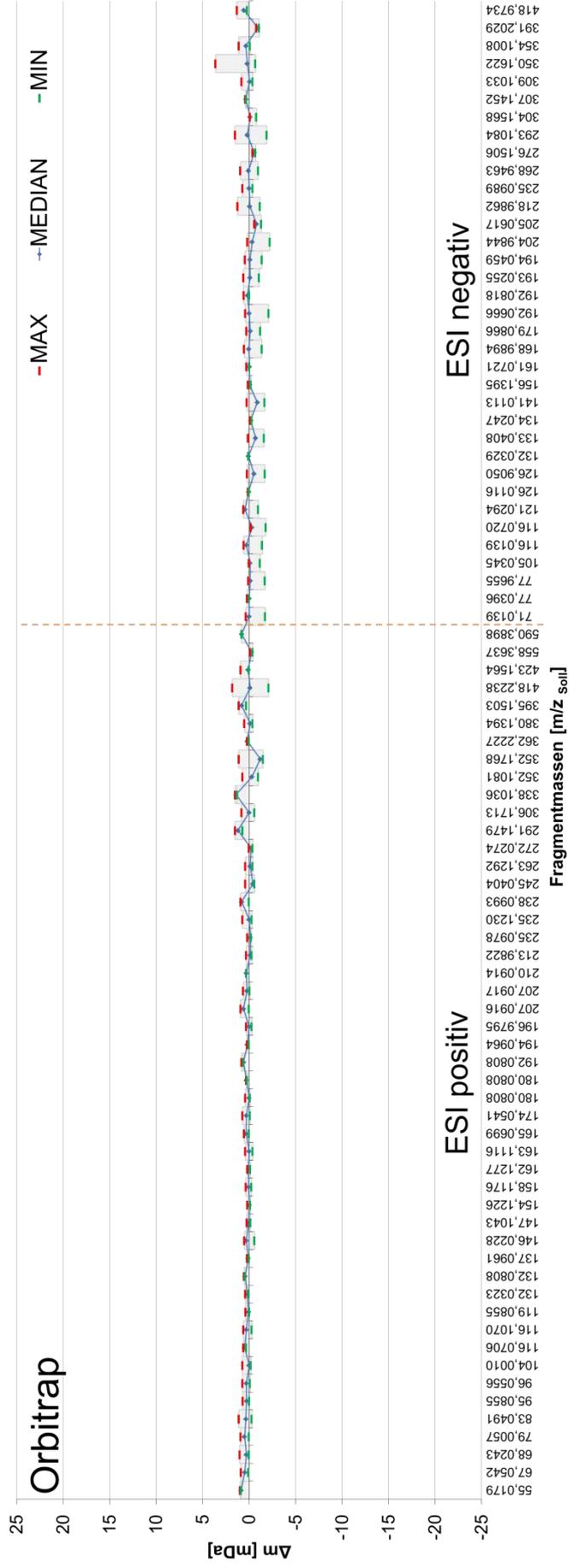


Abbildung 12.4: Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (Orbitrap-Geräte); geordnet nach Fragmentmasse und getrennt nach Ionisationsmodus

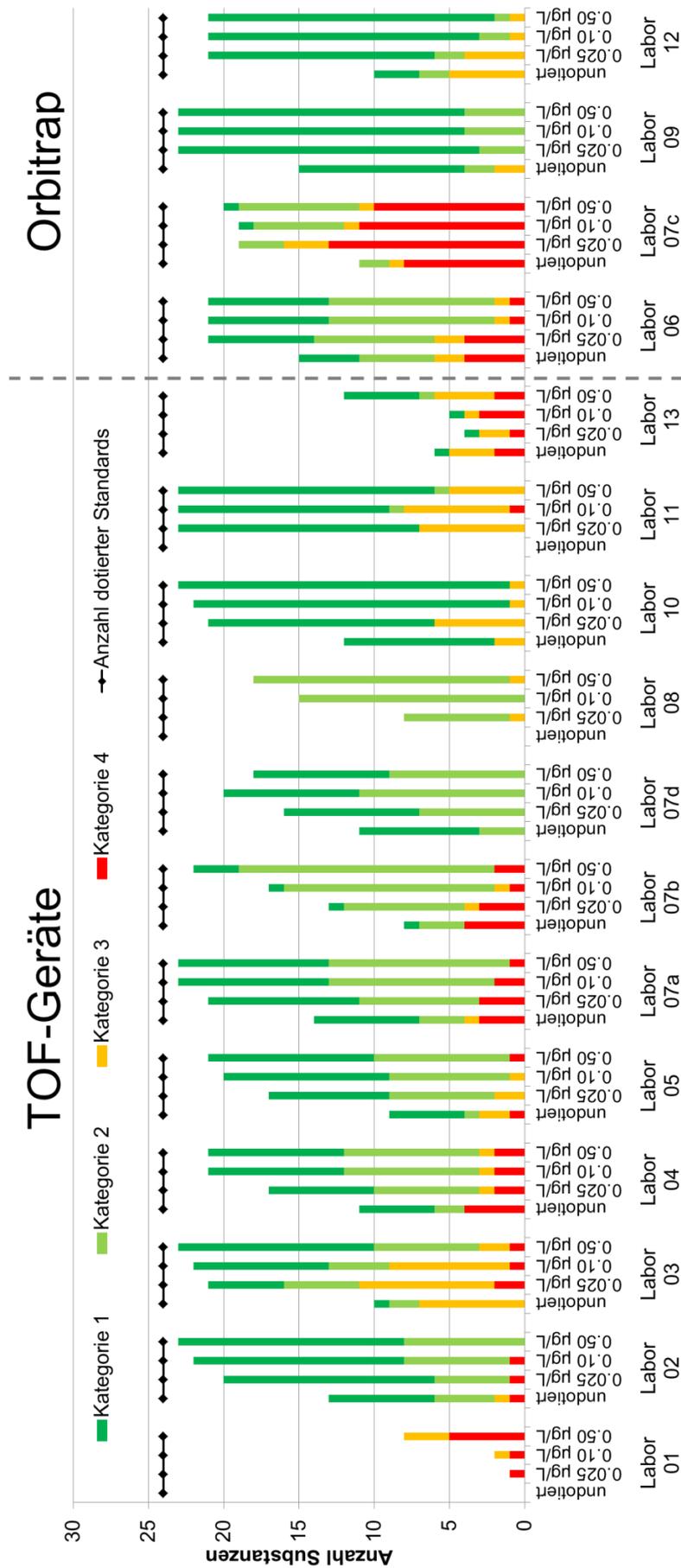


12.3.5 Datenauswertung und Substanzidentifizierung

In Abbildung 12.5 sind die Anzahlen der richtig identifizierten Standardsubstanzen in den teilnehmenden Laboratorien dargestellt. Die Kategorisierung der detektierten Signale erfolgte nach den in Kapitel 10.2.1 dargestellten Kriterien. Der Anstieg des Anteils der Vertreter in Kategorie 1 (sichere Substanzidentifizierung) und Kategorie 2 (Treffer mit hoher Wahrscheinlichkeit) mit zunehmendem Dotierniveau ist deutlich zu erkennen. Dies liegt in der Regel an der besseren Erfassbarkeit eines aussagekräftigen MS/MS-Spektrums.

Ein Sonderfall ist bei Labor 7 zu erkennen. Die Teilnahme eines Labors mit insgesamt vier LC-HRMS-Systemen (a bis d mit jeweils einem spezifischen Bediener) macht deutlich, dass das eingesetzte System (insbesondere die Möglichkeiten der Software) sowie die vorhandene Datenbasis (gemessene Referenzstandards und MS²-Spektren) einen großen Einfluss auf die Anzahl der Identifikationen haben. Besonders bei Labor 7c zeigt sich eine deutlich geringere Anzahl an richtig identifizierten Substanzen. Die Anzahl der qualitativen Nachweise war dabei vergleichbar zu anderen Systemen. Dies kann an einer geringen Anzahl an vorliegenden Referenzspektren oder einer aufwändigen Softwarelösung für den Schritt der Identifizierung liegen. Nicht zuletzt spielen auch die Erfahrung des Anwenders und der zu vertretende Zeitaufwand für die Datenauswertung eine entscheidende Rolle.

Abbildung 12.5: Vergleich der identifizierten gesuchten Standardsubstanzen der teilnehmenden Laboratorien nach den Identifizierungskategorien 1 bis 4



12.3.6 Workflowvergleich am Beispiel eines Labors

Ergänzend zur Vergleichsmessung wurde einer der Datensätze der zweiten Vergleichsmessung mittels 3 unterschiedlicher Workflows ausgewertet, um zu prüfen, welchen Einfluss die Herangehensweise auf den Umfang richtig identifizierter Substanzen hat (Abbildung 12.6).

Die drei angewandten Workflows waren wie folgt strukturiert:

1. Suspect-Screening auf die gesamte Suspect-Liste (200 Verbindungen) und deren manuelle Auswertung hinsichtlich der Identität mit Abgleich von MS² Spektrenbibliotheken
2. Non-Target Ansatz mit Peakfinding durch *open-source*-Tool envipy [31] und anschließende manuelle Auswertung der Identifizierung gegen Referenzspektren
3. Non-Target Ansatz (laborintern) mit Datenevaluation und anschließender FOR-IDENT-Abfrage zur Priorisierung der möglichen Substanzvorschläge zu den Signalen. Identifizierung mittels Referenz-MS²-Spektrendatenbank.

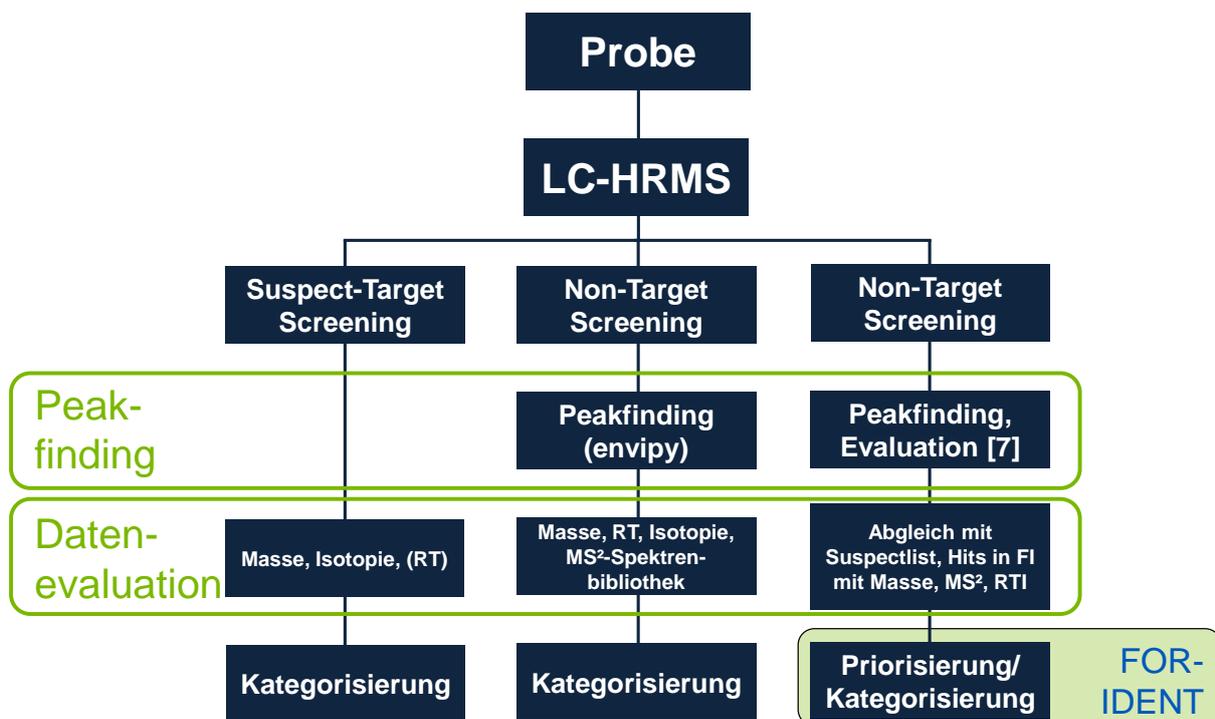


Abbildung 12.6: Aufbau dreier unterschiedlicher Workflows zur Detektion und Identifizierung von Substanzen

Werden die Ergebnisse der drei unterschiedlichen Workflows (Abbildung 12.7) verglichen, zeigt sich eine gute Detektierbarkeit der dotierten Verbindungen. Im Fall 2 (Abbildung 12.7, Mitte) liegt die Anzahl der detektierten Verbindungen (Kategorien 1 bis 4) leicht unter den beiden anderen Workflows. Grund könnte hier eine nicht ausreichende Optimierung der Peakfinding-Parameter sein. Das Peakfinding im dritten Workflow wurde auf dem zur Messung eingesetzten LC-HRMS-System entwickelt und ist somit für dieses System sicher am besten geeignet. Dies spiegelt sich in den höchsten Zahlen für die Detektion wider. Die Möglichkeit der Identifizierung (MS²-Spektren, Datenbanken) war in allen Fällen dieselben, was sich in einer kaum unterschiedlichen Anzahl an Substanzen in den Kategorien 1 und 2 zeigt. Die Vorteile der Automatisierung zeigen sich somit am ehesten im benötigten Zeitaufwand. Die Detektion der gesuchten Verbindungen war kaum durch die Wahl des Workflows beeinflusst.

Der erste angewandte Workflow (Suspect-Target-Screening) war am zeitintensivsten, da hier eine Prozessierung und manuelle Durchsicht der 200 Substanzen zur Identifizierung nötig war. Darüber hinaus musste für alle nicht in der vorhandenen Spektrenbibliothek enthaltenen Referenzspektren in Internet-Datenbanken recherchiert und verglichen werden.

Der manuelle Aufwand der drei Workflows sinkt jedoch von 1) bis 3) deutlich. Dies ist zum einen im automatisierten Peakfinding in den Fällen 2) und 3), insbesondere aber auch der automatisierten Priorisierung der Substanzvorschläge durch FOR-IDENT in Fall 3) begründet. Die Anzahl der erfassten dotierten Verbindungen steigt auch hier erwartungsgemäß mit der Konzentration der Stoffe.

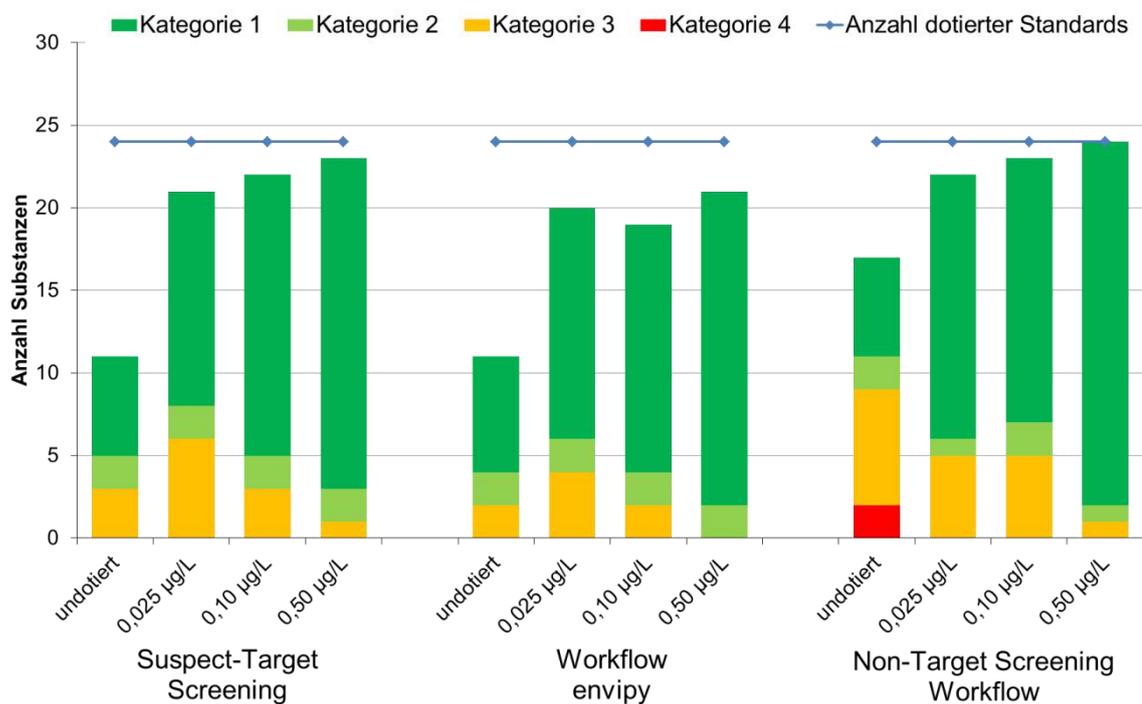


Abbildung 12.7: Vergleich Identifizierungsergebnisse eines Datensatzes mit drei unterschiedlichen Auswerteworkflows

13 Literaturverzeichnis

- [1] J. Hollender, E. Schymanski, H. Singer und P. Ferguson, „Nontarget Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go?“, *Environmental Science & Technology*, Nr. 51, pp. 11505-11512, 2017.
- [2] G. Nürenberg, M. Schulz, U. Kunkel und T. Ternes, „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.“, *J Chromatogr A*, Nr. 1426, pp. 77-90, 2015.
- [3] T. Bader, W. Schulz, T. Lucke, W. Seitz und R. Winzenbacher, „Application of Non-Target Analysis with LC-HRMS for the Monitoring of Raw and Potable Water: Strategy and results,“ in *Assessing Transformation Product by Non-Target and Suspect Screening - Strategies and Workflows Volume 2*, ACS Symposium Series, 2016, pp. 49-70.
- [4] N. Alygizakis, S. Samanipour, J. Hollender, M. Ibanez, S. Kaserzon, V. Kokkali, J. van Leerdam, J. Mueller, M. Pijnappels, M. Reid, E. Schymanski, J. Slobodnik, N. Thomaidis und K. Thomas, „Exploring the Potential of a Global Emerging Contaminant Early Warning Network through the Use of Retrospective Suspect Screening with High-Resolution Mass Spectrometry,“ *Environmental Science & Technology*, Nr. 52, pp. 5135-5144, 2018.
- [5] T. Bader, W. Schulz, K. Kümmerer und R. Winzenbacher, „LC-HRMS Data Processing Strategy for Reliable Sample Comparison Exemplified by the Assessment of Water Treatment Processes,“ *Analytical Chemistry*, Nr. 89, pp. 13219-13226, 2017.
- [6] K. K. Murray, R. K. Boyd, M. N. Eberlin, G. J. Langley, L. Li und Y. Naito, „Definitions of terms relating to massspectrometry (IUPAC Recommendations 2013),“ *Pure Appl. Chem.*, Nr. 85, pp. 1515-1609, 2019.
- [7] T. Bader, W. Schulz, K. Kümmerer und R. Winzenbacher, „General strategies to increase the repeatability in non-target screening by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry,“ *Analytical Chimica Acta*, Nr. 935, pp. 173-186, 2016.
- [8] European Commission , 2002/657/EG: *Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*, 2002.
- [9] ISO (International Organization for Standardization) - Technical Committee ISO/TC 147, *ISO/DIS 21253-1:2018(E) / Water quality Multi-compound class methods - Part 1: Criteria for the identification of target compounds by gas and liquid chromatography and mass spectrometry*, 2018.

- [10] DIN, *DIN38407-47:2017-07 Teil 47: Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und weiterer organischer Stoffe in Wasser und Abwasser- Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion nach Direktinjektion(F47)*, Beuth, 2017.
- [11] T. Kind und O. Fiehn, „Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry.“ *BMC Bioinformatics*, Nr. 8, p. 105ff, 2007.
- [12] National Institutes of Health (NIH), „PubChem,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [13] Royal Society of Chemistry, „chemspider.com,“ Royal Society of Chemistry, [Online]. Available: <http://www.chemspider.com/>.
- [14] LfU Bayern, HSWT, TUM, LW, BWB, „STOFF-Ident (BMBF-Forschungsvorhaben),“ 2018. [Online]. Available: <https://www.lfu.bayern.de/stoffident>.
- [15] European MassBank (NORMAN MassBank), „MassBank,“ Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, [Online]. Available: <https://massbank.eu/MassBank/>.
- [16] HighChem LLC, Slovakia, „mzCloud,“ HighChem LLC, Slovakia, [Online]. Available: <https://www.mzcloud.org/>.
- [17] S. Wolf, S. Schmidt, M. Müller-Hannemann und S. Neumann, „In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra,“ *BMC Bioinformatics*, Nr. 11, p. 148ff, 2010.
- [18] *DIN ISO 5667-5:2011-02 - Anleitung zur Probenahme von Trinkwasser aus Aufbereitungsanlagen und Rohrnetzen*, Beuth, 2011.
- [19] *DIN 38402-11:2009-02 - Teil 11 Probenahme von Abwasser*, Beuth, 2009.
- [20] *DIN EN ISO 5667-6:2016-12 - Anleitung zur Probenahme aus Fließgewässern*, Beuth, 2016.
- [21] Water Research Foundation, „Evaluation of Analytical Methods for EDCs and PPCPs via Inter-Laboratory Comparison,“ 2012.
- [22] J. Schollée, E. Schymanski und J. Hollender, „Statistical Approaches for LC-HRMS Data To Characterize, Prioritize, and Identify Transformation Products from Water Treatment Processes,“ in *Assessing Transformation Product by Non-Target and Suspect Screening - Strategies and Workflows Volume 1*, ACS Symposium Series, 2016.
- [23] M. Katajamaa und M. Oresic, „Data processing for mass spectrometry-based metabolomics,“ *Journal of Chromatography A*, Nr. 1158, pp. 318-328, 2007.

- [24] E. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H. Singer und J. Hollender, „Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence,“ *Environ. Sci. Technol.*, Nr. 48, pp. 2097-2098, 2014.
- [25] C. Tejada-Casado, M. Hernandez-Mesa, F. Monteau, F. Lara, M. del Olmo-Iruela, A. Garcia-Campana, B. Le Bizec und G. Dervilly-Pinel, „Collision cross section (CCS) as a complementary parameter to characterize human and veterinary drugs,“ *Analytical Chimica Acta*, p. in press, 2018.
- [26] R. Aalizadeh, M.-C. Nika und N. S. Thomaidis, „Development and application of retention time prediction models in the suspect and non-target screening of emerging contaminants,“ *Journal of Hazardous Materials*, Nr. 363, pp. 277-285, 2019.
- [27] LfU Bayern, HSWT, TUM, LW, BWB, „FOR-IDENT,“ [Online]. Available: <https://www.for-ident.org/>.
- [28] United States Environmental Protection Agency (EPA), „Chemistry Dashboard,“ United States Environmental Protection Agency (EPA), [Online]. Available: <https://comptox.epa.gov/dashboard>.
- [29] NORMAN Network, „Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances,“ [Online]. Available: <https://www.norman-network.net/?q=node/24>.
- [30] S. Samanipour, M. Reid und K. Thomas, „Statistical Variable Selection: An Alternative Prioritization Strategy during the Nontarget Analysis of LC-HR-MS Data,“ *Analytical Chemistry*, Nr. 89, pp. 5585-5591, 2017.
- [31] Eawag - Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, „envipy,“ [Online]. Available: <https://www.eawag.ch/en/department/uchem/projects/envipy/>.
- [32] B. Keller, J. Sui, A. Young und R. Whittall, „Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry,“ *Analytica Chimica Acta*, Bd. 627, Nr. 1, pp. 71-81, Oktober 2008.
- [33] M. Loos, *Mining of High-Resolution Mass Spectrometry Data to Monitor Organic Pollutant Dynamics in Aquatic Systems (Diss. ETH No. 23098)*, 2015.

Anhang A. Fachausschuss „Non-Target Screening“

A.1 Hintergrund und Aufgaben

In der Wasserchemischen Gesellschaft (eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.) wurde 2009 der Fachausschuss Non-Target Screening gegründet. Der Ausgangspunkt war die Unterstützung der Identifizierung von Spurenstoffen in der Analytik mittels LC-MS durch Aufbau einer geeigneten Datenbank (nutzbar auch bei Verwendung niedrigauflösender Systeme). Durch die Entwicklung von hochauflösenden Massenspektrometern für die Routine hat sich die Aufgabenstellung in Richtung Target-Analytik, Suspect-Target und Non-Target Screening verschoben. Die zu bearbeitenden Themen sind: Erarbeitung von Strategien für das Non-Target Screening, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Basis verschiedener Analysensysteme, die Normung des Suspect-Target Screenings und die Qualitätssicherung.

A.2 Mitglieder des FA

Tabelle A.1 Mitglieder des Fachausschusses „Non-Target Screening“

Name	Institution/Adresse
Leitung: Schulz, Wolfgang¹	Zweckverband Landeswasserversorgung Betriebs- und Forschungslabor Am Spitzigen Berg 1 D-89129 Langenau
Achten, Christine Oberleitner, Daniela	Universität Münster Institut für Geologie und Paläontologie Angewandte Geologie Correnstr. 24 D-48149 Münster
Balsaa, Peter Hinnenkamp, Vanessa	IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH Moritzstr. 8 D-45476 Mülheim a.d.R.
Brüggen, Susanne	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW Dienststelle Duisburg Wuhanstraße 6 D-47051 Duisburg
Dünnbier, Uwe ¹ Liebmann, Diana	Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB) Motardstr. 35 D-13629 Berlin
Fink, Angelika Götz, Sven	Hessenwasser GmbH & Co. KG Gräfenhäuser Straße 118 D-64293 Darmstadt
Geiß, Sabine	Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie Umweltanalytik/Umweltradioaktivität Göschwitzer Str. 41 D-07745 Jena
Hohrenk Lotta	Universität Duisburg-Essen Instrumental Analytical Chemistry (IAC) Universitätsstr. 5 D-45141 Essen
Härtel, Christoph	Ruhrverband Kronprinzenstr. 37 D-45128 Essen

Name	Institution/Adresse
Letzel, Thomas ¹	Technische Universität München (TUM) AFG, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft Am Coulombwall 3 D-85748 Garching
Liesener, André Reineke, Anna	Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH Willy-Brandt-Allee 26 D-45891 Gelsenkirchen
Logemann, Jörn	Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Institut für Hygiene und Umwelt Marckmannstraße 129b D-20539 Hamburg
Lucke, Thomas ¹	Zweckverband Landeswasserversorgung Betriebs- und Forschungslabor Am Spitzigen Berg 1 D-89129 Langenau
Petri, Michael	ZV Bodensee-Wasserversorgung Betriebs- und Forschungslabor Süßenmühle 1 D-78354 Sipplingen
Sawal, George	Umweltbundesamt FG II 2.5 Labor für Wasseranalytik Bismarckplatz 1 D-14193 Berlin
Scheurer, Marco Nürnberg, Gudrun	DVGW-Technologiezentrum Wasser Karlsruher Str. 84 D-76139 Karlsruhe
Schlüsener, Michael	Bundesanstalt für Gewässerkunde Am Mainzer Tor 1 D-56068 Koblenz
Seiwert, Bettina	Department Analytik Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ Permoserstraße 15 D-04318 Leipzig
Sengl, Manfred ¹ Kunkel, Uwe	Bayerisches Landesamt für Umwelt Bürgermeister-Ulrich-Str. 160 D-86179 Augsburg
Singer, Heinz	Eawag Ueberlandstrasse 133 CH-8600 Dübendorf
Türk, Jochen	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) Bliersheimer Str. 58 - 60 D-47229 Duisburg
Zwiener, Christian	Universität Tübingen Umweltanalytik am ZAG Hölderlinstr. 121 D-72074 Tübingen

¹ Projektpartner im BMBF-Forschungsvorhaben FOR-IDENT (Förderkennzeichen 02WRS1354D)

Anhang B. Massen- und RT-Kontrolle

B.1 Isotopenmarkierte interne Standards

Tabelle B.1: Liste isotopenmarkierter interner Standards, eawag ($N_{ESI+} = 123$, $N_{ESI-} = 56$)¹

Nr.	Name	Summenformel	Retentionszeit [Min]
1	2,4-D d3 (-)	C ₈ H ₃ ² H ₃ Cl ₂ O ₃	9,7
2	2,6-Dichlorobenzamide-3,4,5 d3 (+)	C ₇ H ₂ ² H ₃ Cl ₂ NO	5,8
3	5-Methylbenzotriazole d6	C ₇ H ² H ₆ N ₃	6,5
4	Acetyl-sulfamethoxazole d5	C ₁₂ H ₈ ² H ₅ N ₃ O ₄ S	7,0
5	Alachlor d13 (+)	C ₁₄ H ₇ ² H ₁₃ ClNO ₂	12,8
6	Amisulpride d5	C ₁₇ H ₂₂ ² H ₅ N ₃ O ₄ S	5,1
7	Atazanavir d5	C ₃₈ H ₄₇ ² H ₅ N ₆ O ₇	10,2
8	Atenolol acid d5	C ₁₄ H ₁₆ ² H ₅ NO ₄	4,8
9	Atenolol d7 (+)	C ₁₄ H ₁₅ ² H ₇ N ₂ O ₃	4,5
10	Atomoxetine d3 (+)	C ₁₇ H ₁₈ ² H ₃ NO	7,7
11	Atorvastatin d5	C ₃₃ H ₃₀ ² H ₅ FN ₂ O ₅	11,8
12	Atrazine d5 (+)	C ₈ H ₉ ² H ₅ CIN ₅	9,7
13	Atrazine-2-hydroxy d5	C ₈ H ₁₀ ² H ₅ N ₅ O	4,9
14	Atrazine-desisopropyl d5 (+)	C ₅ H ₃ ² H ₅ CIN ₅	5,5
15	Azithromycin d3 (+)	C ₃₈ H ₆₉ ² H ₃ N ₂ O ₁₂	5,8
16	Azoxystrobin d4 (+)	C ₂₂ H ₁₃ ² H ₄ N ₃ O ₅	11,8
17	Bentazon d6	C ₁₀ H ₆ ² H ₆ N ₂ O ₃ S	9,4
18	Benzotriazole d4	C ₆ H ² H ₄ N ₃	5,5
19	Bezafibrate d4	C ₁₉ H ₁₆ ² H ₄ CINO ₄	10,4
20	Bicalutamide d4	C ₁₈ H ₁₀ ² H ₄ F ₄ N ₂ O ₄ S	11,0
21	Caffeine d9 (+)	C ₈ H ² H ₉ N ₄ O ₂	5,0
22	Candesartan d5	C ₂₄ H ₁₅ ² H ₅ N ₆ O ₃	9,3
23	Carbamazepine d8 (+)	C ₁₅ H ₄ ² H ₈ N ₂ O	8,4
24	Carbamazepine-10,11-epoxide C13,d2 (+)	C ₁₄ ¹³ CH ₁₀ ² H ₂ N ₂ O ₂	7,2
25	Carbendazim d4 (+)	C ₉ H ₅ ² H ₄ N ₃ O ₂	4,8
26	Cetirizine d8	C ₂₁ H ₁₇ ² H ₈ CIN ₂ O ₃	8,3
27	Chloridazon d5	C ₁₀ H ₃ ² H ₅ CIN ₃ O	6,4
28	Chloridazon-methyl-desphenyl d3	C ₅ H ₃ ² H ₃ CIN ₃ O	4,5
29	Chlorotoluron d6 (+)	C ₁₀ H ₇ ² H ₆ CIN ₂ O	9,3
30	Chlorpyrifos d10 (+)	C ₆ H ² H ₁₀ Cl ₃ NO ₃ PS	15,9
31	Chlorpyrifos-methyl d6 (+)	C ₇ H ² H ₆ Cl ₃ NO ₃ PS	14,4
32	Citalopram d6 (+)	C ₂₀ H ₁₅ ² H ₆ FN ₂ O	7,3
33	Clarithromycin-N-methyl d3 (+)	C ₃₈ H ₆₆ ² H ₃ NO ₁₃	8,4
34	Climbazole d4	C ₁₅ H ₁₃ ² H ₄ CIN ₂ O ₂	8,4
35	Clofibric acid d4 (-)	C ₁₀ H ₇ ² H ₄ ClO ₃	10,2
36	Clopidogrel carboxylic acid d4 (+)	C ₁₅ H ₁₀ ² H ₄ CINO ₂ S	6,1
37	Clothianidin d3	C ₆ H ₅ ² H ₃ CIN ₅ O ₂ S	6,3
38	Clotrimazole d5 (+)	C ₂₂ H ₁₂ ² H ₅ CIN ₂	8,7
39	Clozapine d8 (+)	C ₁₈ H ₁₁ ² H ₈ CIN ₄	6,5
40	Codeine 13C,d3 (+)	C ₁₇ ¹³ CH ₁₈ ² H ₃ NO ₃	4,7
41	Cyclophosphamide d4 (+)	C ₇ H ₁₁ ² H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂ P	7,0
42	Cyprodinil d5 (+)	C ₁₄ ² H ₅ H ₁₀ N ₃	10,7
43	Darunavir d9	C ₂₇ H ₂₈ ² H ₉ N ₃ O ₇ S	10,4
44	Desethylatrazine 15N3 (+)	C ₆ H ₁₀ CIN ₂ ¹⁵ N ₃	6,5
45	Desphenyl Chloridazon 15N2 (+)	C ₄ H ₄ CIN ¹⁵ N ₂ O	2,9
46	Diazepam d5 (+)	C ₁₆ H ₈ ² H ₅ N ₂ OCl	10,7
47	Diazinon d10 (+)	C ₁₂ H ₁₁ ² H ₁₀ N ₂ O ₃ PS	14,1
48	Dichlorprop d6 (-)	C ₆ H ₂ ² H ₆ Cl ₂ O ₃	10,7
49	Diclofenac d4	C ₁₄ H ₇ ² H ₄ Cl ₂ NO ₂	12,1
50	Diflufenican d3	C ₁₉ H ₈ ² H ₃ F ₅ N ₂ O ₂	14,7
51	Dimethenamid d3 (+)	C ₁₂ H ₁₅ ² H ₃ CINO ₂ S	11,7
52	Dimethoate d6 (+)	C ₅ H ₆ ² H ₆ NO ₃ PS ₂	6,7
53	Diuron d6	C ₉ H ₄ ² H ₆ Cl ₂ N ₂ O	9,8
54	Emtricitabine 13C,15N2 (+)	C ₇ ¹³ CH ₁₀ FN ¹⁵ N ₂ O ₃ S	4,5
55	Epoconazole d4 (+)	C ₁₇ H ₉ ² H ₄ CIFN ₃ O	11,9
56	Eprosartan d3	C ₂₃ H ₂₁ ² H ₃ N ₂ O ₄ S	6,6

¹ Eawag - Environmental Chemistry

Nr.	Name	Summenformel	Retentionszeit [Min]
57	Erythromycin 13C2 (+)	C ₃₅ ¹³ C ₂ H ₆₇ NO ₁₃	7,4
58	Fenofibrate d6 (+)	C ₂₀ H ₁₅ ² H ₆ ClO ₄	15,9
59	Fipronil 13C2,15N2	C ₁₀ ¹³ C ₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₂ ¹⁵ N ₂ OS	13,4
60	Fluconazole d4	C ₁₃ H ₈ ² H ₄ F ₂ N ₆ O	5,9
61	Fluoxetine d5 (+)	C ₁₇ H ₁₃ ² H ₅ F ₃ NO	8,4
62	Furosemid d5 (-)	C ₁₂ H ₆ ² H ₅ CIN ₂ O ₅ S	8,3
63	Gabapentin D4	C ₉ H ₁₃ ² H ₄ NO ₂	4,7
64	Hydrochlorothiazide 13C,d2	C ₆ ¹³ CH ₆ ² H ₂ CIN ₃ O ₄ S ₂	5,1
65	Ibuprofen d3 (+)	C ₁₃ H ₁₅ ² H ₃ O ₂	12,4
66	Imidacloprid d4	C ₉ H ₆ ² H ₄ CIN ₅ O ₂	6,5
67	Indomethacin d4	C ₁₉ H ₁₂ ² H ₄ CINO ₄	12,1
68	Irbesartan d3	C ₂₅ H ₂₅ ² H ₃ N ₆ O	8,8
69	Irgarol d9 (+)	C ₁₁ H ₁₀ ² H ₉ N ₅ S	9,8
70	Isoproturon d6 (+)	C ₁₂ H ₁₂ ² H ₆ N ₂ O	9,7
71	Lamotrigine 13C3,d3 (+)	C ₆ ¹³ C ₃ H ₄ ² H ₃ C ₁₂ N ₅	5,4
72	Levetiracetam d3 (+)	C ₈ H ₁₁ ² H ₃ N ₂ O ₂	4,8
73	Lidocaine d10 (+)	C ₁₄ H ₁₂ ² H ₁₀ N ₂ O	5,3
74	Linuron d6	C ₉ H ₄ ² H ₆ C ₁₂ N ₂ O ₂	11,4
75	MCPA d3 (-)	C ₉ H ₆ ² H ₃ ClO ₃	9,8
76	Mecoprop d6 (-)	C ₁₀ H ₅ ² H ₆ ClO ₃	10,6
77	Mefenamic acid d3	C ₁₅ H ₁₂ ² H ₃ NO ₂	13,2
78	Mesotrione d3	C ₁₄ H ₁₀ ² H ₃ NO ₇ S	8,8
79	Metalaxyl d6 (+)	C ₁₅ H ₁₅ ² H ₆ NO ₄	9,8
80	Methiocarb d3 (+)	C ₁₁ H ₁₂ ² H ₃ NO ₂ S	11,2
81	Methylprednisolone d3 (+)	C ₂₂ H ₂₇ ² H ₃ O ₅	8,4
82	Metolachlor d6 (+)	C ₁₅ H ₁₆ ² H ₆ CINO ₂	12,8
83	Metolachlor-ESA d11	C ₁₅ H ₁₂ ² H ₁₁ NO ₅ S	7,2
84	Metoprolol d7 (+)	C ₁₅ H ₁₈ ² H ₇ NO ₃	5,6
85	Metronidazole d4 (+)	C ₆ H ₅ ² H ₄ N ₃ O ₃	4,7
86	Metsulfuron-methyl d3	C ₁₄ H ₁₂ ² H ₃ N ₅ O ₆ S	8,8
87	Morphine d3 (+)	C ₁₇ H ₁₆ ² H ₃ NO ₃	4,3
88	N,N-Diethyl-3-methylbenzamide d10 (+)	C ₁₂ H ₇ ² H ₁₀ NO	9,8
89	N,O-Didesmethyl venlafaxine d3 (+)	C ₁₅ H ₂₀ ² H ₃ NO ₂	5,1
90	N4-Acetyl-sulfathiazole d4	C ₁₁ H ₇ ² H ₄ N ₃ O ₃ S ₂	5,4
91	Naproxen d3 (+)	C ₁₄ H ₁₁ ² H ₃ O ₃	10,3
92	Nelfinavir d3	C ₃₂ H ₄₂ ² H ₃ N ₃ O ₄ S	8,9
93	Nicosulfuron d6	C ₁₅ H ₁₂ ² H ₆ N ₆ O ₆ S	7,8
94	Octhilinone d17 (+)	C ₁₁ H ₂ ² H ₁₇ NOS	11,5
95	O-Desmethylvenlafaxine d6 (+)	C ₁₆ H ₁₉ ² H ₆ NO ₂	5,2
96	Oxazepam d5	C ₁₅ H ₆ ² H ₅ CIN ₂ O ₂	8,8
97	Oxcarbazepine d4 (+)	C ₁₅ H ₈ ² H ₄ N ₂ O ₂	7,5
98	Paracetamol d4 (+)	C ₈ H ₅ ² H ₄ NO ₂	4,7
99	Phenazone d3 (+)	C ₁₁ H ₉ ² H ₃ N ₂ O	5,8
100	Pirimicarb d6 (+)	C ₁₁ H ₁₂ ² H ₆ N ₄ O ₂	5,9
101	Pravastatin d3 (-)	C ₂₃ H ₃₃ ² H ₃ O ₇	8,1
102	Primidone d5 (+)	C ₁₂ H ₉ ² H ₅ N ₂ O ₂	5,8
103	Prochloraz d7 (+)	C ₁₅ H ₉ ² H ₇ Cl ₃ N ₃ O ₂	11,0
104	Propamocarb free base d7 (+)	C ₉ H ₁₃ ² H ₇ N ₂ O ₂	4,6
105	Propazine d6 (+)	C ₉ H ₁₀ ² H ₆ CIN ₅	11,0
106	Propiconazole d5 (+)	C ₁₅ H ₁₂ ² H ₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	13,0
107	Propranolol d7 (+)	C ₁₆ H ₁₄ ² H ₇ NO ₂	6,7
108	Pyrimethanil d5 (+)	C ₁₂ H ₈ ² H ₅ N ₃	9,1
109	Ranitidine d6	C ₁₃ H ₁₆ ² H ₆ N ₄ O ₃ S	4,5
110	Ritalinic acid d10 (+)	C ₁₃ H ₇ ² H ₁₀ NO ₂	5,2
111	Ritonavir d6 (+)	C ₃₇ H ₄₂ ² H ₆ N ₆ O ₅ S ₂	12,4
112	Simazine d5 (+)	C ₇ H ₇ ² H ₅ CIN ₅	8,3
113	Sotalol d6	C ₁₂ H ₁₄ ² H ₆ N ₂ O ₃ S	4,5
114	Sulcotrione d3	C ₁₄ H ₁₀ ² H ₃ CIO ₅ S	9,0
115	Sulfadiazine d4	C ₁₀ H ₆ ² H ₄ N ₄ O ₂ S	5,1
116	Sulfadimethoxine d4	C ₁₂ H ₁₀ ² H ₄ N ₄ O ₄ S	7,7
117	Sulfamethazine 13C6	C ₆ ¹³ C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	5,9
118	Sulfamethoxazole d4	C ₁₀ H ₇ ² H ₄ N ₃ O ₃ S	6,8
119	Sulfapyridine d4	C ₁₁ H ₇ ² H ₄ N ₃ O ₂ S	5,3
120	Sulfathiazole d4	C ₉ H ₅ ² H ₄ N ₃ O ₂ S ₂	5,1
121	Tebuconazole d6 (+)	C ₁₆ H ₁₆ ² H ₆ CIN ₃ O	12,2
122	Terbutylazine d5 (+)	C ₉ H ₁₁ ² H ₅ CIN ₅	11,3

Nr.	Name	Summenformel	Retentionszeit [Min]
123	Terbutryn d5 (+)	C ₁₀ H ₁₄ ² H ₅ N ₅ S	9,4
124	Thiamethoxam d3 (+)	C ₈ H ₇ ² H ₃ CIN ₅ O ₃ S	5,7
125	Tramadol d6 (+)	C ₁₆ H ₁₉ ² H ₆ NO ₂	5,6
126	Trimethoprim d9 (+)	C ₁₄ H ₉ ² H ₉ N ₄ O ₃	4,9
127	Valsartan 13C5,15N	C ₁₉ ¹³ C ₅ H ₂₉ N ₄ ¹⁵ NO ₃	10,8
128	Valsartan acid d4	C ₁₄ H ₆ ² H ₄ N ₄ O ₂	7,3
129	Venlafaxine d6 (+)	C ₁₇ H ₂₁ ² H ₆ NO ₂	6,3
130	Verapamil d6 (+)	C ₂₇ H ₃₂ ² H ₆ N ₂ O ₄	8,1

(+): ESI positiv Modus

(-): ESI negativ Modus

Tabelle B.2: Liste isotopenmarkierter interner Standards, LW¹

Name	Summenformel	Retentionszeit [Min]
Benzotriazole d4 (+/-)	C ₆ HN ₃ ² H ₄	5,4
Chloridazon d5 (+/-)	C ₁₀ H ₃ CIN ₃ O ² H ₅	6,3
Propazine d6 (+)	C ₉ H ₁₀ CIN ₅ ² H ₆	10,7
Diuron d6 (+/-)	C ₉ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ² H ₆	9,6
Lidocaine d10 (+)	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ² H ₁₀	5,2
Sotalol d6 (+/-)	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃ S ² H ₆	4,4
Hydrochlorothiazide 13C, d2 (-)	C ₆ H ₆ CIN ₃ O ₄ S ₂ ¹³ C ² H ₂	5,1
Diazinon d10 (+)	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃ PS ² H ₁₀	13,8
Sulfadimethoxine d6 (+/-)	C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₄ S ² H ₆	7,5
Azoxystrobin d4 (+)	C ₂₂ H ₁₃ N ₃ O ₅ ² H ₄	11,5
Irbesartan d4 (+/-)	C ₂₅ H ₂₄ N ₆ O ² H ₄	8,6
Bicalutamide d4 (+/-)	C ₁₈ H ₁₀ F ₄ N ₂ O ₄ S ² H ₄	10,7
Darunavir d9 (+/-)	C ₂₇ H ₂₈ N ₃ O ₇ S ² H ₉	10,1
Fipronil 13C2, 15N2 (+/-)	C ₁₀ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₂ OS ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂	13,1

(+): ESI positiv Modus

(-): ESI negativ Modus

B.2 Standard zur Retentionszeitnormierung und Anwendung

Tabelle B.3: Liste möglicher Referenzstandards zur RT-Kontrolle und Normierung (Verteilung über den mit RP-LC abdeckbaren Polaritätsbereich)

Name	Summenformel	logP (log K _{ow})
Metformin	C ₄ H ₁₁ N ₅	-1,36
Chloridazon	C ₁₀ H ₈ CIN ₃ O	1,11
Carbetamide	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	1,65
Monuron	C ₉ H ₁₁ CIN ₂ O	1,93
Metobromuron	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	2,24
Chlorbromuron	C ₉ H ₁₀ BrCIN ₂ O ₂	2,85
Metconazole	C ₁₇ H ₂₂ CIN ₃ O	3,59
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	4,19
Quinoxifen	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	4,98
Fenofibrate	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	5,28

¹ Liste Zweckverband Landeswasserversorgung

Tabelle B.4: Liste von in Ringversuch B gefundenen Substanzen mit der Anzahl RTI-Erfassungen aus 6 Laboren mit dem Mittelwert der logD-Abweichungen sowie Standardabweichung

Name	CAS-Nr.	Summenformel	logD (pH 3)	ESI Modus	N _{RTI} (aus insg. 6 Laboren)	\bar{x} Δ logD	s Δ logD
Gabapentin	60142-96-3	C ₉ H ₁₇ NO ₂	-2,00	pos	18	1,4	0,61
				neg	12	1,5	0,73
Metoprololsäure	56392-14-4	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	-1,69	pos	15	1,1	0,62
				neg	4	1,0	0,01
Propranolol	525-66-6	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	-0,66	pos	15	1,1	0,31
				neg	-	-	-
Hydrochlorothiazid	58-93-5	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	-0,58	pos	10	-0,5	0,18
				neg	14	-0,3	0,27
Coffein	58-08-2	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	-0,55	pos	17	0,0	0,24
				neg	-	-	-
Clarithromycin	81103-11-9	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	-0,26	pos	16	1,6	0,45
				neg	4	2,1	0,45
Atrazine-2-hydroxy	2163-68-0	C ₈ H ₁₅ N ₅ O	0,00	pos	14	-0,4	0,41
				neg	10	-0,6	0,08
Metamitron	41394-05-2	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	0,24	pos	14	-0,3	0,14
				neg	7	-0,2	0,02
Sulfathiazol	72-14-0	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	0,93	pos	13	-0,7	0,24
				neg	9	-0,8	0,12
Desethylatrazin	6190-65-4	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	1,02	pos	15	-0,8	0,08
				neg	-	-	-
1,2,3-Benzotriazol	95-14-7	C ₆ H ₅ N ₃	1,30	pos	15	-0,6	0,06
				neg	11	-0,6	0,07
2,4-Dinitrophenol	51-28-5	C ₆ H ₄ N ₂ O ₅	1,53	pos	15	-0,2	0,55
				neg	18	-0,1	0,55
4-Methyl-1H-benzotriazol	29878-31-7	C ₇ H ₇ N ₃	1,78	pos	13	-0,5	0,09
				neg	6	-0,6	0,10
5-Methyl-1H-benzotriazol	136-85-6	C ₇ H ₇ N ₃	1,81	pos	16	-0,6	0,11
				neg	11	-0,6	0,11
4-Chlorbenzoesäure	74-11-3	C ₇ H ₅ ClO ₂	2,20	pos	3	-0,5	0,66
				neg	6	-0,3	0,47
N,N-Diethyltoluamid	134-62-3	C ₁₂ H ₁₇ NO	2,50	pos	15	-0,6	0,86
				neg	-	-	-
Isoproturon	34123-59-6	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	2,57	pos	14	-0,3	0,11
				neg	-	-	-
Mecoprop	7085-19-0	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	2,85	pos	13	-0,2	0,35
				neg	13	-0,2	0,35
Dimethenamid	87674-68-8	C ₁₂ H ₁₈ ClNO ₂ S	2,92	pos	14	-0,1	0,07
				neg	-	-	-
Dinoterb	1420-07-1	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₅	3,09	pos	12	0,0	0,53
				neg	15	0,5	0,59
Valsartansäure	164265-78-5	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₂	3,14	pos	18	-1,5	0,44
				neg	18	-1,5	0,44
Metolachlor	51218-45-2	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	3,45	pos	16	0,0	0,16
				neg	-	-	-
Bezafibrat	41859-67-0	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	3,93	pos	16	-1,4	0,28
				neg	16	-1,4	0,28
Gemfibrozil	25812-30-0	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	4,37	pos	4	0,1	0,57
				neg	5	0,2	0,52

Anhang C. Methodisches

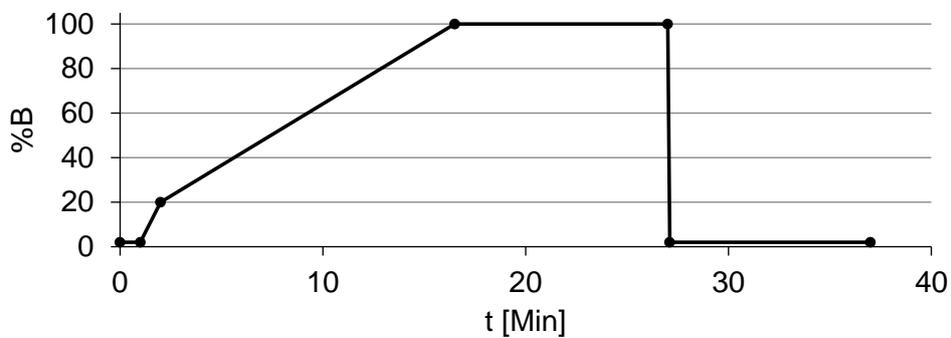
C.1 Beispiele von LC-Methoden

Im Folgenden sind zwei Beispielmethoden für mögliche chromatographische Trennmethode angegeben.

Methode A:

Eluenten	A: MilliQ + 0,1% v/v Ameisensäure B: Acetonitril + 0,1% v/v Ameisensäure
Injektionsvolumen	95 µL Probe + 5 µL isotope markierter Standard-Mix
Säulentemperatur	40°C
Flussrate	0,3 mL/min
Säule	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Narrow Bore RR 2,1x150 mm 3,5 µm PN: 959763-902
Vorsäule	Phenomenex Cartridge Holder C18 4x2,0 mm ID PN: AJO-4286

Gradient							
%B	2	2	20	100	100	2	2
t [Min]	0	1	2	16,5	27	27,1	37



Methode B:

Eluenten

A: MilliQ + 0,1% v/v Ameisensäure
B: Acetonitril + 0,1% v/v Ameisensäure

Injektionsvolumen 95 µL Probe + 5 µL isotonenmarkierter Standard-Mix

Säulentemperatur 40°C

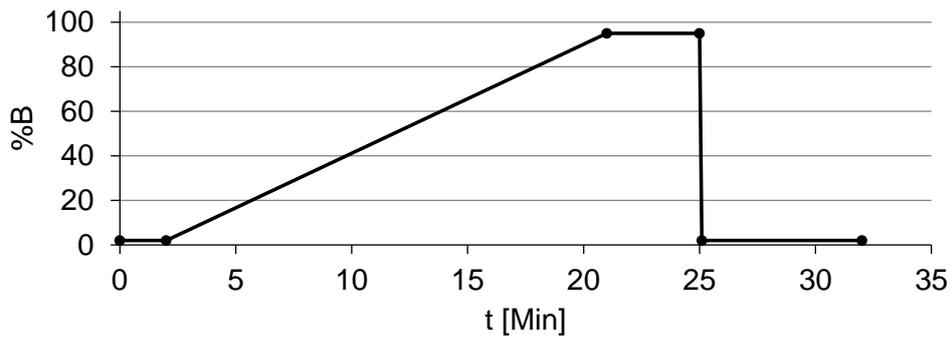
Flussrate 0,6 mL/min

Säule Restek Ultra Aqueous C18
250 x 4,6 mm 5 µm
Cat: 9178575

Vorsäule Restek Ultra AQ C18
10 x 4 mm
Cat: 917850210

Gradient

%B	2	2	95	95	2	2
t [Min]	0	2	21	25	25,1	32



C.2 Beispiele von MS-Methoden

Im Folgenden sind zwei Beispielmethoden für mögliche massenspektrometrische Detektionsmethoden mit Flugzeitmassenspektrometern bzw. Orbitrap-Systemen angegeben.

Tabelle C.1: Beispiel einer MS Methode (TOF-System)

Quellenparameter

Gas Flows	Gas 1: 35 psi Gas 2: 45 psi Curtain Gas: 40 psi Collision Gas: 6/medium
Temperature	550 °C
ISVF	5500 V (+) -4500 V (-)
Declustering Potential	60 V (+) -100 (-)

TOF-MS Scan Parameter

Mass Range	MS: 100 – 1200 Da TOF-MS: 250 ms
------------	-------------------------------------

MS² Parameter

Mass Range	30 – 1200 Da
Collision Energy	40 eV (+) -40 eV (-)
Collision Energy Spread	20 eV

MS² Acquisition in IDA or SWATH mode

IDA Triggering

Accumulation Time	65 ms
Max number of MS ² per cycle	12
Minimum intensity	100 cps
Exclude Isotopes	Within 4 Da
Mass Tolerance	5 ppm
Include/Exclude List	None
Dynamic Background subtract	On

SWATH

Accumulation Time	50 ms
Mass range	100 – 1200 Da
Number of SWATH windows	16

Tabelle C.2: Beispiel einer MS Methode (Orbitrap-System)

Quellenparameter	
Gas Flows	Sheat Gas: 40 Aux gas flow: 15 Sweep Gas: 50
Temperature	Capillary: 350 °C Aux Gas: 400 °C
Spray Voltage	3500 V
MS Scan Parameter	
Mass Range	Full MS: 120 – 1200 m/z
Resolution	30,000
Microscans	1
Maximum inject time	50 ms
Full MS / dd-MS² (TopN)	
Full MS	
Resolution	120,000
AGC Target	3e ⁶
Maximum IT	100 ms
Scan Range	120 – 1200 m/z
dd-MS²	
Resolution	15,000
AGC Target	1e ⁵
Maximum IT	50 ms
Loop count	5
Isolation window	1.3 m/z
Fixed first mass	50.0 m/z
(N)CE / stepped N(CE)	Nce: 80
dd Settings	
Minimum AGC target	8.00e ³
Apex trigger	3 to 10 s
Charge Exclusion	-
Peptide Match	Preferred
Exclude isotopes	On
Dynamic exclusion	15.0 s

C.3 Blindwertmessungen

Für die beiden Beispielmethoden sind im Folgenden die Totalionenstromchromatogramme für die Elektrospray-Ionisation jeweils positiv und negativ dargestellt. Die Intensitätsachse ist bei allen Chromatogrammen gleich skaliert.

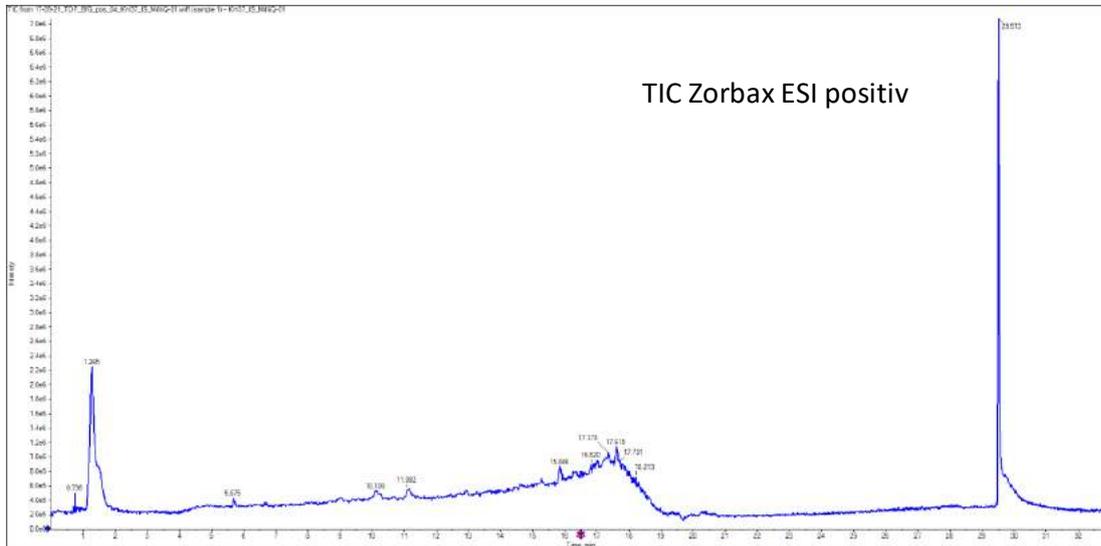


Abbildung C.1: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A; Elektrospray positiv

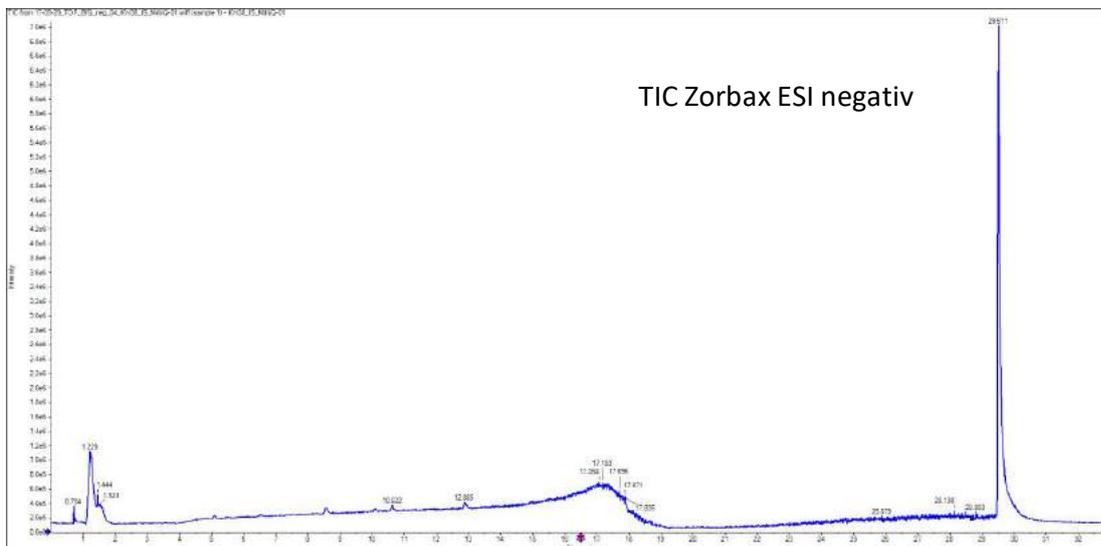


Abbildung C.2: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A; Elektrospray negativ

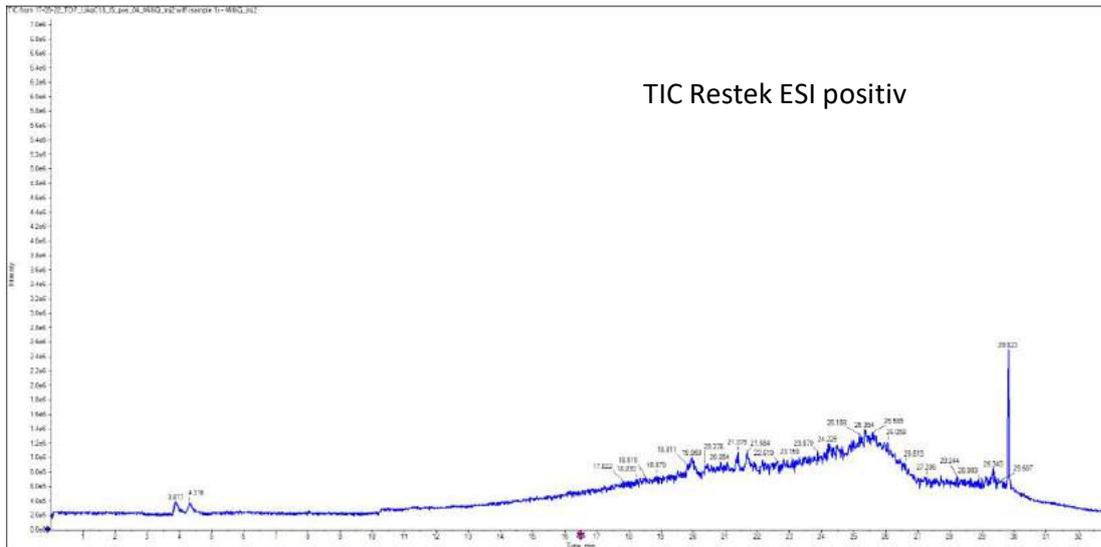


Abbildung C.3: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B; Elektrospray positiv

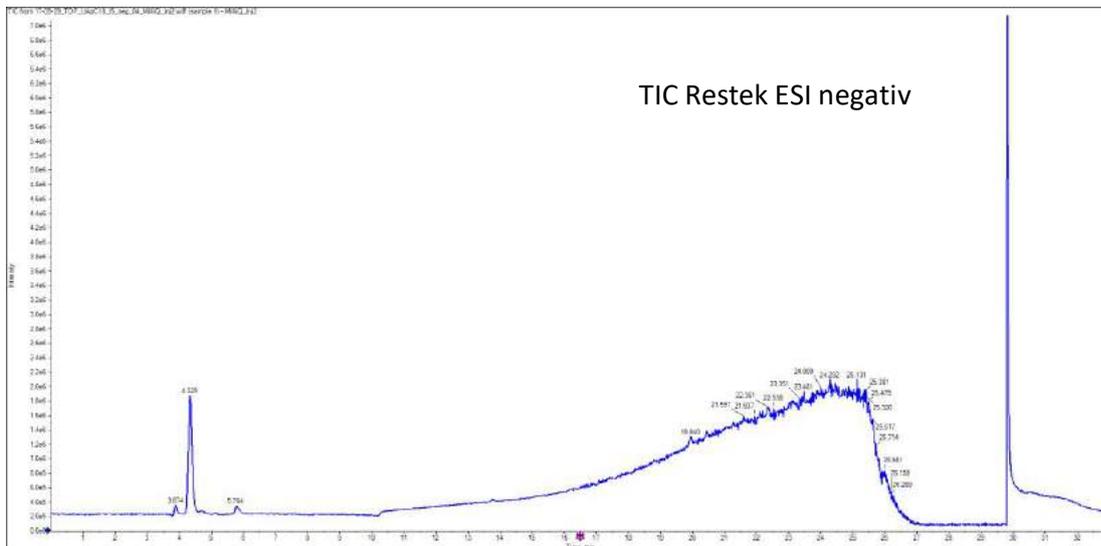


Abbildung C.4: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B; Elektrospray negativ

C.4 Retentionszeit-Masse Plot von Blindwerten

Die im jeweiligen Blindwert detektierten Features sind als Retentionszeit-Masse Plot für ESI+ und ESI- gegenübergestellt. Die roten Punkte sind die eingesetzten isotonen markierten internen Standards. Die internen Standards sollten eine möglichst gleichmäßige Verteilung auf den gemessenen Massen- und Polaritäts-Bereich zeigen.

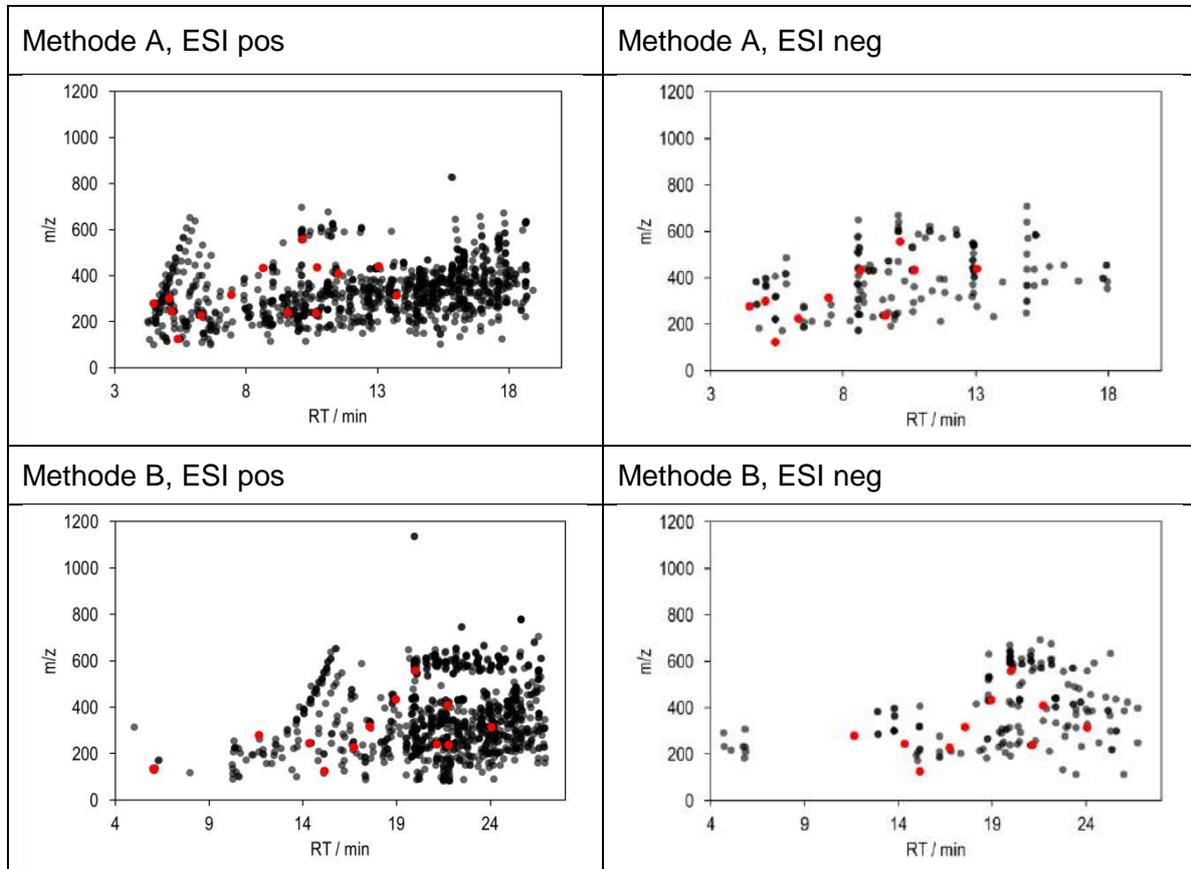


Abbildung C.5: Masse-RT-Scatterplots („Punktwolken“) der beiden Beispielmethoden A und B, jeweils im ESI positiven und negativen Modus

Die in Abbildung C.5 dargestellten Retentionszeit-Masse Plots zeigen für die Methoden A und B ein deutlich unterschiedliches Bild, das im Wesentlichen durch die unterschiedliche stationäre Phase der Trennsäule bedingt ist.

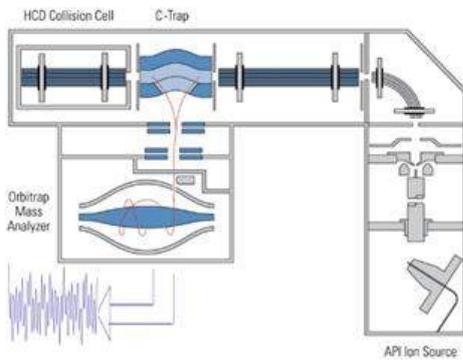
Anhang D. Messtechnik

D.1 HRMS Massenspektrometer

Die jüngste Entwicklung der Ionenfallen-Massenspektrometer ist die Orbitrap. In der Ionenfalle befindet sich eine zentrale, spindelförmige Elektrode. Die Ionen werden radial zu dieser Elektrode in die Orbitrap eingebracht und bewegen sich aufgrund der elektrostatischen Anziehung auf Kreisbahnen (Orbits) um die zentrale Elektrode. Da die Ionen nicht in der Mitte der Kammer, sondern dezentral eingebracht werden, schwingen sie gleichzeitig entlang der Achse der Zentralelektrode. Die Frequenz dieser Schwingung erzeugt in Detektorplatten Signale, die durch Fourier-Transformation in die entsprechenden m/z -Verhältnisse umgewandelt werden.

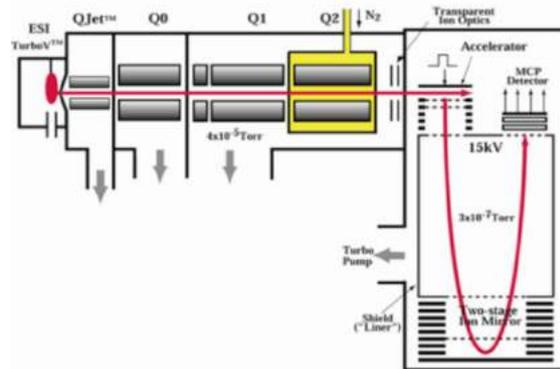
Ein Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS) besteht aus einem Rohr unter Vakuum mit einem sehr schnellen Detektor am Ende. Prinzipiell wird in TOF-Geräten ausgenutzt, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und beim Anlegen einer Beschleunigungsspannung leichtere Ionen schneller sind als schwerere. Daher erreichen leichte Ionen beim Flug durch einen feldfreien Raum (Flugrohr) den Detektor früher als schwere Ionen. In der Praxis haben sich Geräte mit Ionenspiegeln bzw. Reflektoren bewährt, bei denen die Flugstrecke durch ein zusätzliches elektrisches Feld am Ende der ursprünglichen Flugrichtung vergrößert wird. Zusätzlich ermöglicht diese Technik eine weitere Fokussierung, die die Varianz in der Geschwindigkeit der Ionen aufgrund des Doppler-Effekts minimiert. Die Länge der Flugstrecke ist entscheidend für das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers.

Orbitrap



Bildquelle:
Thermo Fischer Scientific

Flugzeitmassenspektrometer (TOF)



Bildquelle: Sciex®

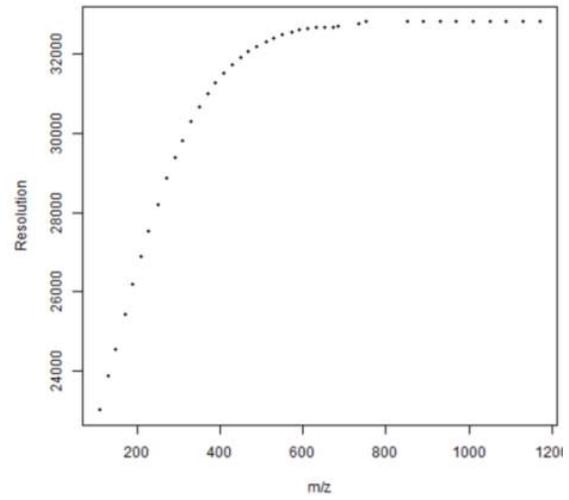
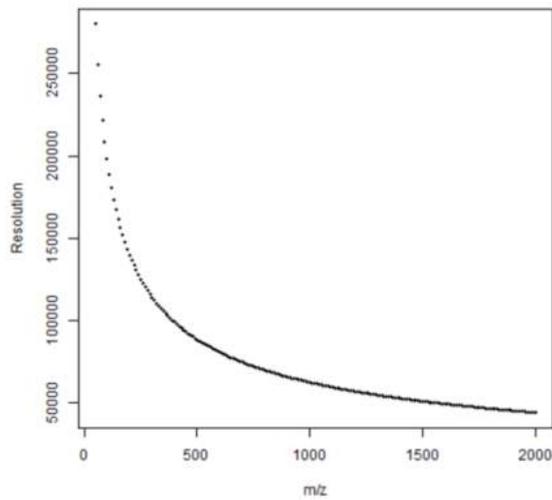


Abbildung D.1: Schematischer Aufbau der Massenspektrometer Orbitrap (links) und Flugzeit-Massenspektrometer (rechts) mit deren Auflösungsvermögen in Abhängigkeit des Massenbereichs (unten) [32]

Anhang E. Systemstabilität

E.1 Chromatographie

Reproduzierbarkeit der Retentionszeit

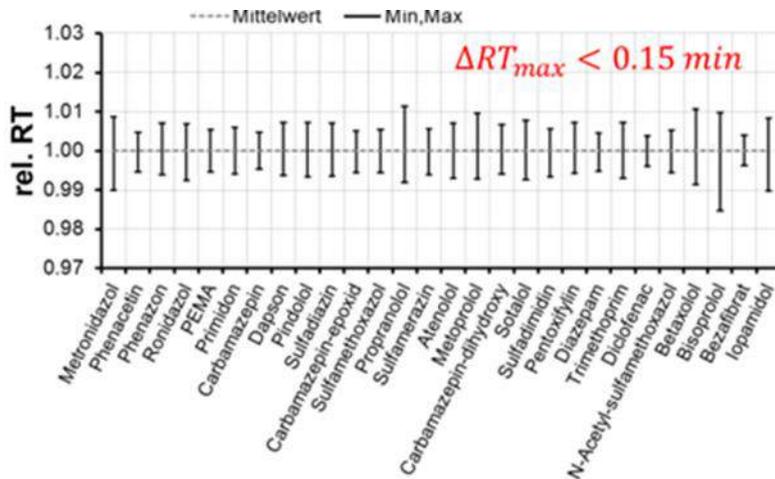


Abbildung E.1: Retentionszeitstabilität über $N = 134$ Messungen (über einen Zeitraum von 10 Monaten)

E.2 Massenspektrometrie

Langzeit Stabilität der Empfindlichkeit

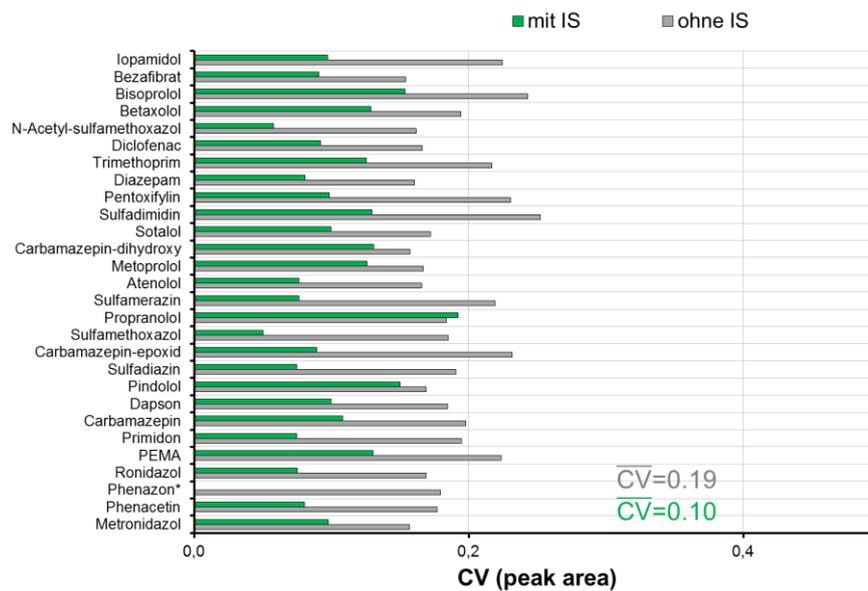


Abbildung E.2: Stabilität der Gerätesensitivität über einen Zeitraum von 10 Monate ($N=134$) ohne (grau) und mit (grün) interner Standardisierung (*Phenazon als IS)

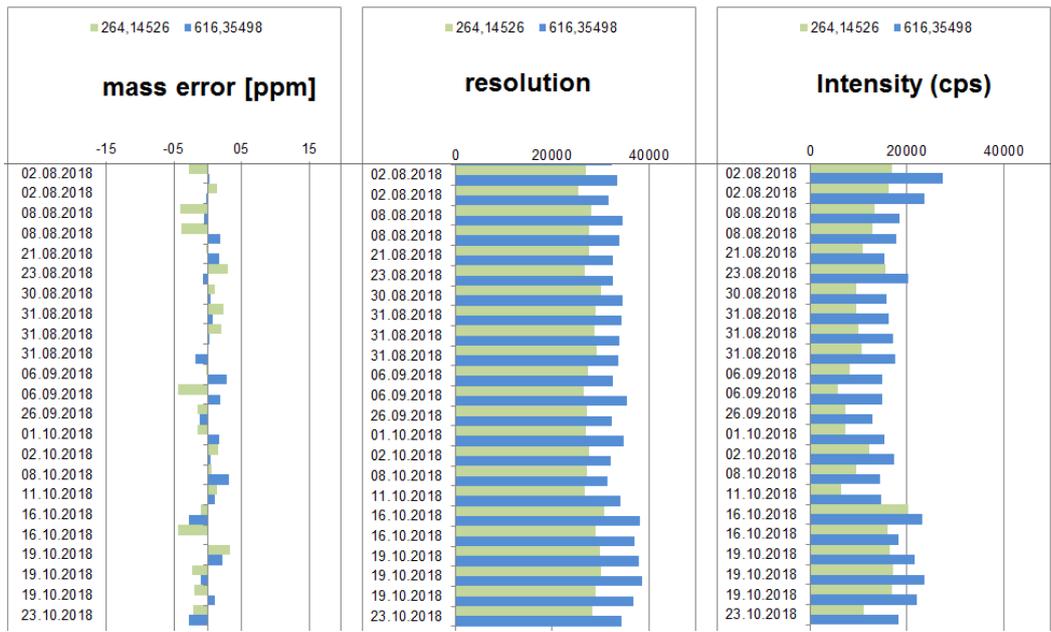


Abbildung E.3 Dokumentationsmöglichkeit zur Kontrolle der MS-Performance über Massegenauigkeit, Auflösungsvermögen und Sensitivität

Anhang F. Datenauswertung

F.1 Anpassung von intensitätsabhängigen Parametern für die Peak-Extraktion am Beispiel des „Noise Threshold“ der MarkerView™-Software (SCIEX)

Mehrfachbestimmungen eines Aliquots einer mit 64 Substanzen aufdotierten Kläranlagenablaufprobe (QS Kontrollprobe) an verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Jahres ergaben unterschiedliche Empfindlichkeitsniveaus des Messgerätes (LC-HRMS). Der vorher optimierte Wert für das „Noise Threshold“ von 100 (positive ion mode) oder 75 (negative ion mode) ergab somit keine zufriedenstellenden Ergebnisse für das Peakfinding (Abbildung F.2). Eine Verbesserung der Empfindlichkeit führt neben höheren Messsignalen für die echten Features auch zu einer Erhöhung des Rauschens. Um das „Noise Threshold“ anpassen zu können, wurde das mittlere Rauschen „Noise“ (Median) über alle dotierten Substanzen aus der Kontrollprobe für jede Messung ermittelt. Aus jedem dieser Werte wurde anhand der Werte der Optimierungsmessungen ein „Noise Threshold“ berechnet. Die Auftragung von „Noise“ gegen „Noise Threshold“ ergab einen linearen Zusammenhang, dessen Gleichung für weitere Anpassungen verwendet werden kann (Abbildung F.1).

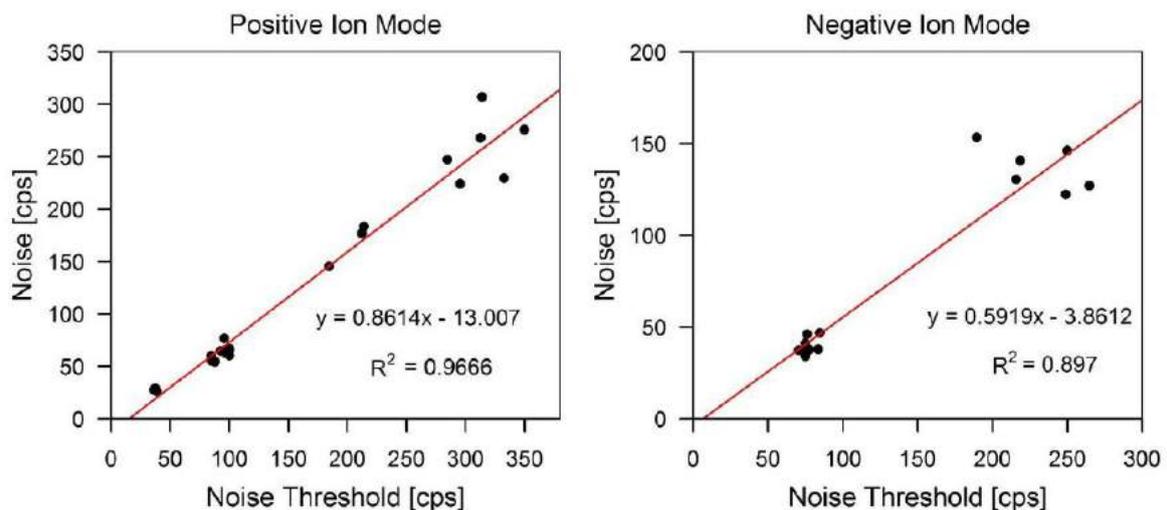


Abbildung F.1: Korrelation zwischen „Noise“ und dem berechneten „Noise Threshold“

Die Verwendung dieser angepassten Werte für das „Noise Threshold“ zeigte, dass somit der Anteil der falsch-positiv-Ergebnisse (FPs) der Features wieder dem der ursprünglichen Optimierung entsprach (Abbildung F.2). Die Anpassung über den Median des Rauschens funktioniert somit sehr gut, allerdings variierte die Gesamtanzahl an Features, wenn ein anderer Wert für „Noise Threshold“ verwendet werden musste. Bei einer höheren Empfindlichkeit können auch noch weitere Features mit niedriger Intensität erfasst werden, die bei einer niedrigeren Empfindlichkeit nicht detektierbar sind. Bei einem Auswertungsansatz, der nur auf der Feature-Anzahl basiert, ist die Vergleichbarkeit von Ergebnissen nur gegeben, wenn die Empfindlichkeitsunterschiede zwischen verschiedenen Messserien nicht zu hoch sind.

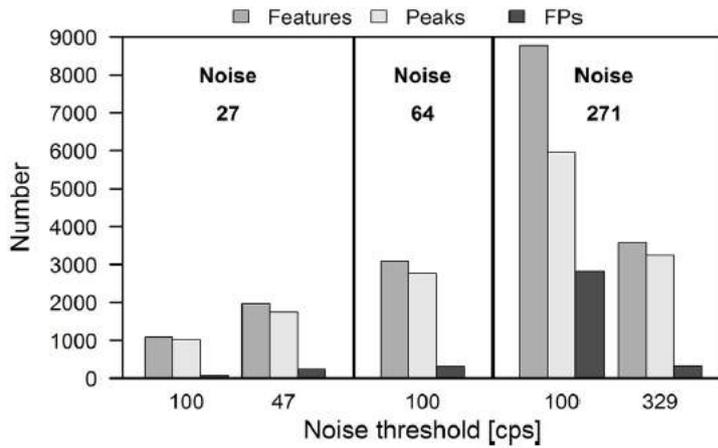


Abbildung F.2: Änderung der Anzahl an Features, echten Peaks und falsch-positiv-Ergebnissen (FPs) auf Grund des verwendeten „Noise Threshold“ (100 cps und berechneter Wert aus der Anpassungsgleichung) für die Messungen („positiv ion mode“) einer aufdotierten Kläranlagenablaufprobe für drei verschiedene Empfindlichkeitsniveaus des Messgerätes. Links: LC-HRMS mit niedriger Sensitivität, Mitte: LC-HRMS während der Optimierung, Rechts: LC-HRMS mit höherer Sensitivität. Für weitere Details siehe [2]

Anhang G. Adduktbildung beim Einsatz einer ESI-Quelle

G.1 Addukte und *in-source*-Fragmente

Tabelle G.1: Beispiele für detektierte Addukte und in-source-Fragmente bekannter Substanzen

Typ	Name (abgespaltene/addierte Elemente)	Polarität	Beschreibung	Massenunterschied im Vergleich zum [M+H] ⁺ bzw. [M-H] ⁻	Beispielverbindungen
Addukt	+O	beide	Addition eines Sauerstoffs	15,99491	2-Mercaptobenzoxazol, 2-Mercaptobenzothiazol
Addukt	+NH ₄	positiv	Addition von Ammonium	17,02654	Diatrizoat, Ethofumesat, Iopromid
Addukt	+Na	beide	Addition von Natrium	21,98194	pos: Carbamazepin, Metolachlor / neg: Valsartan, Olmesartan
Addukt	+HCl	negativ	Addition von HCl	35,97667	Ethidimuron, Dimefuron, Methoxyfenozid
Addukt	+K	positiv	Addition von Kalium	37,95588	Azoxystrobin, Dimoxystrobin, Praziquantel
Addukt	+C ₂ H ₈ N	positiv	Addition von Ethylamin	45,05784	Dimethoat, Tetraglym, Dimefuron, Metalaxyl
Addukt	+CH ₂ O ₂	negativ	Addition von Ameisensäure	46,00548	Flecainid, Aliskiren, Fluconazol
Addukt	+C ₂ H ₄ O ₂	negativ	Essigsäure/ Natrium-Cluster	60,02113	-
Addukt	+HNO ₃	negativ	Addition von Nitrat	62,99564	Clothianidin, Fluconazole
Addukt	+NaCH ₂ O ₂	negativ	Addition von Ameisensäure/ Natrium-Cluster	67,98743	Penoxsulam, Diphenylphosphinicacid, Haloxyfop,
Addukt	+NaC ₂ H ₄ O ₂	negativ	Addition von Essigsäure/ Natrium-Cluster	83,0109	-
Addukt	+NaNO ₃	negativ	Addition von Nitrat/ Natrium-Cluster	84,97814	Bromacil, Chlorthanonil R611965
Fragment	-C ₇ H ₈ N ₂ O ₄ S	positiv		- 216,02103	Metazachlor Metabolit BH 479 9
Fragment	-C ₁₀ H ₁₄ O ₄	positiv		-198,0905	Kresoxim-methyl
Fragment	-C ₅ H ₆ O ₄ N ₂ S	positiv		- 190,00483	Metazachlor Metabolit 479M008
Fragment	-C ₉ H ₁₁ O ₄	positiv		- 183,06554	Kresoxim-methyl
Fragment	-C ₆ H ₈ O ₂ N ₂ S	positiv		-172,0312	Metazachlor Metabolit BH 479 11
Fragment	-C ₈ H ₈ O ₃	positiv		- 152,04789	Dimoxystrobin Metaboliten 505M08 und 505M09
Fragment	-C ₆ H ₈ O ₃	positiv		-152,0472	Kresoxim-methyl
Fragment	-C ₅ H ₄ O ₃ N ₂	positiv		- 140,02274	Metazachlor Metabolit NOA409045
Fragment	-C ₄ H ₈ O ₅	positiv		- 136,03772	Metalaxyl Metabolit CGA 108906
Fragment	-C ₂ O ₂ F ₉	negativ		- 127,00069	ADONA
Fragment	-C ₇ H ₅ ON	negativ		- 119,03711	Carbetamid
Fragment	-C ₃ H ₂ O ₅	positiv		- 117,99077	Metolachlor Metabolit CGA 357704

Typ	Name (abgespaltene/addierte Elemente)	Polarität	Beschreibung	Massenunterschied im Vergleich zum [M+H] ⁺ bzw. [M-H] ⁻	Beispielverbindungen
Fragment	-C ₇ H ₈ O	positiv		- 108,05737	Kresoxim-methyl
Fragment	-C ₃ H ₉ O ₃ N	positiv		- 107,05879	Dimoxystrobin Metaboliten 505M08 und 505M09
Fragment	-C ₂ H ₂ O ₃ S	negativ		- 105,97301	Dimethenamid Metabolit M31, Metazachlor Metabolit CGA 368208
Fragment	-C ₃ H ₄ O ₄	negativ		- 104,01151	Dimethenamid Metabolit M23
Fragment	-C ₃ H ₈ O ₃	positiv		-92,04721	Kresoxim-methyl
Fragment	-C ₂ H ₆ O ₃	negativ		-90,03224	Metalaxyl Metabolit CGA 108906
Fragment	-C ₅ H ₁₁ ON	positiv		-89,08406	Diphenhydramin
Fragment	-C ₅ H ₁₂ O	positiv		-88,08882	Pendimethalin
Fragment	-C ₃ H ₅ O ₂	positiv		-88,05298	Metolachlor Metabolit CGA 50267
Fragment	-C ₂ O ₄	negativ		-87,98021	Quinmerac Metabolit BH 518-2
Fragment	-C ₂ H ₂ O ₂ N ₂	negativ		-86,01218	Thiaclopid Metabolit M30
Fragment	-C ₂ H ₃ ON ₃	negativ		-85,02816	Tritosulfuron Metabolit M635H003
Fragment	-SO ₃	positiv	Abspaltung von SO ₃	-79,95682	Sitagliptin-N-Sulfat
Fragment	-C ₂ H ₄ O ₃	positiv		-76,01596	Kresoxim-methyl, Metolachlor Metabolit CGA 37735
Fragment	-C ₃ H ₅ O ₂	positiv		-73,0295	Metolachlor Metabolit CGA 50267
Fragment	-C ₃ H ₄ O ₂	negativ		-72,02058	Mecoprop, Fenoprop, Fluziprop
Fragment	-C ₂ O ₃	negativ		-71,98419	Dimethenamid Metabolit M23
Fragment	-C ₅ H ₁₀	positiv		-70,07825	Pendimethalin
Fragment	-C ₃ H ₄ N ₂	positiv		-68,03745	Prochloraz, Metazachlor Metabolit 479M004, Metazachlor Metabolit 479M008
Fragment	-C ₅ H ₆	positiv		-66,04641	Propyzamid
Fragment	-CH ₄ O ₃	positiv		-64,01605	2-OH-Ibuprofen
Fragment	-C ₂ H ₄ O ₂	positiv		-60,02168	Metalaxyl Metabolit CGA 108906
Fragment	-C ₂ H ₂ O ₂	beide		-58,00493	Kresoxim-methyl, Metolachlor Metabolit CGA 37735
Fragment	-C ₂ H ₃ ON	beide		-57,02146	DCEMU, Carbofuran, Carbaryl
Fragment	-C ₄ H ₈	positiv		-56,0626	Bromacil, Terbutylazine, Bupropion, Methoxyfenozid
Fragment	-C ₃ H ₄ O	negativ		-56,0256	Ketoprofen
Fragment	-3*H ₂ O	positiv	3-fache Wasserabspaltung	-54,03168	Prednisolone
Fragment	-CH ₆ O ₂	positiv		-50,03733	Dimethachlor Metabolit SYN 530561
Fragment	-CH ₅ ON	positiv		-47,03711	Kresoxim-methyl
Fragment	-C ₂ H ₆ O	positiv		-46,04241	Mefenpyr-diethyl, Fenoxycarb, Ethofumesat, Pethoxamid
Fragment	-CH ₄ ON	positiv		-46,02929	Levetiracetam
Fragment	-CH ₂ O ₂	beide		-46,00548	Naproxen, Ibuprofen
Fragment	-CO ₂	negativ		-43,98986	Diatrizoat, N-Methyl-Pregabalin
Fragment	-CHON	negativ		-43,00581	DCEMU, Tritosulfuron Metabolit M635H001
Fragment	-C ₃ H ₆	positiv		-42,0475	Flufenacet Metabolit AZ14777

Typ	Name (abgespaltene/addierte Elemente)	Polarität	Beschreibung	Massenunterschied im Vergleich zum [M+H] ⁺ bzw. [M-H] ⁻	Beispielverbindungen
Fragment	-2*H ₂ O	positiv	2-fache Wasserabspaltung	-36,02112	Prednisolone
Fragment	-Cl	positiv	Abspaltung von Chlor	-34,9683	3,4-Dichloraniline
Fragment	-CH ₄ O	beide		-32,02622	Dimethenamid, Metolachlor, Oxfendazol
Fragment	-CH ₅ N	positiv		-31,04219	Sertralin
Fragment	-CH ₂ O	positiv		-30,01111	Topramezon Metabolit M670H05
Fragment	-HF	negativ	Abspaltung von Fluor	-20,00623	Diflubenzuron
Fragment	-H ₂ O	beide	Wasserabspaltung	-18,01056	pos: 10,11-Dihydroxy-10,11- dihydrocarbamazepin, Gabapentin / neg: Diclofenac, PFBA, Diatrizoat
Fragment	-NH ₄	positiv		-17,02654	Levetiracetam, Amoxicillin
Fragment	-CH ₄	positiv		-16,0313	1,2-Dihydro-2,2,4-trimethylquinolin
Fragment	-O	positiv	Abspaltung eines Sauerstoffs	-15,99491	Ranitidin-N-Oxid, 5-Chloro-2-Mercaptobenzoxazol

Weitere Addukte, *in-source*-Fragmente bzw. typische Blindwerte und Verunreinigungen in der LC-(HR)MS sind in der Literatur beschrieben. [32]

Anhang H. Workflow

H.1 Beispiel für einen typischen Screening-Workflow

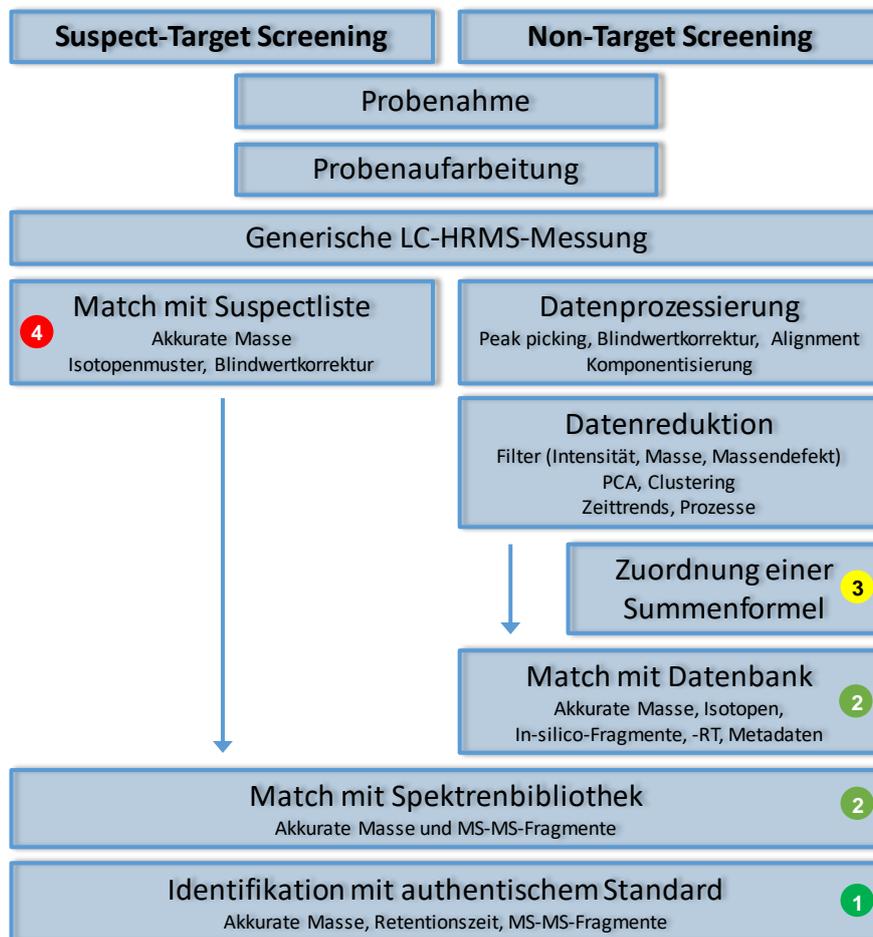


Abbildung H.1: Beispielworkflow für Suspect- und Non-Target Screening inkl. der Kategorisierung zur Identifizierung von Substanzen (siehe auch 10.2.1)

Weitere Beispielworkflows finden sich in der Literatur. [1]