



Rheinmessprogramm Chemie

HPLC MS/MS Sonderuntersuchung

2013

Internationale
Kommission zum
Schutz des Rheins

Commission
Internationale
pour la Protection
du Rhin

Internationale
Commissie ter
Bescherming
van de Rijn

Bericht Nr. 221



Impressum

Herausgeberin:

Internationale Kommission zum Schutz des Rheins (IKSR)
Kaiserin-Augusta-Anlagen 15, D 56068 Koblenz
Postfach 20 02 53, D 56002 Koblenz
Telefon +49-(0)261-94252-0, Fax +49-(0)261-94252-52
E-mail: sekretariat@iksr.de
www.iksr.org

© IKSr-CIPR-ICBR 2015

ISBN-Nr.: 3-941994-66-2

1. Einleitung

Im Rahmen des Rheinmessprogramms Chemie 2013 wurde ein Sondermessprogramm durchgeführt, um mit Hilfe der in der Schweiz entwickelten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Massenspektroskopie-Analysenmethode (HPLC MS/MS) neue Stoffe im Rheinwasser zu erfassen. Die Probenahme erfolgte im Messjahr 2013, 4-mal, an folgenden Messstellen:

- Weil am Rhein (siehe Foto 1)
- Karlsruhe/Lauterbourg
- Koblenz-Rhein (siehe Foto 2)
- Koblenz-Mosel
- Bad Honnef
- Bimmen-Lobith (siehe Foto 3)
- Bischofsheim-Mainmündung
- Mannheim-Neckar
- Maassluis

Foto 1: Messstation Weil am Rhein (Rechte AUE-BS)



Foto 2: Messstelle Koblenz Rhein (Fotograf: Schwandt, Rechte BfG)



Foto 3: Messstation Bimmen (Rechte LANUV-NRW)



2. Aktueller Stand der HPLC-MS/MS-Analytik

Die Umweltanalytik ist ein wichtiges Instrument, um unerwünschte Spurenstoffe wie Haushalts-, Agro- und Industriechemikalien, Pestizide oder Arzneimittel, in Abwasser, Oberflächengewässern und Grundwasser nachweisen zu können. Die größte Herausforderung stellen die tiefen Konzentrationen und die Vielfalt der Substanzen, die zudem empfindlich bestimmt werden müssen. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, dass Neu- und Weiterentwicklung von spezifischen und sensitiven Nachweismethoden stetig vorangetrieben wird.

Der Wunsch möglichst viele Substanzen in Multimethoden zu analysieren und gleichzeitig auch unbekannte Verbindungen zu erfassen, hat zum Einsatz neuer hochauflösender

Massenspektrometer, wie zum Beispiel der Orbitrap, in der Umweltanalytik geführt. Solch ein System kam in diesem Sondermessprogramm zur Anwendung.

Seit drei Jahren wird an der internationalen Messstation Weil am Rhein täglich diese neue Analysemethode angewendet. Es werden täglich Wasserproben gemessen, um langfristige Trends in der Gewässerqualität sowie zeitnah Fehleinleitungen und Havarien erfassen zu können. Dazu entwickelte die Eawag (Wasserforschungs-Institut des ETH-Bereichs) zusammen mit dem Amt für Umwelt und Energie Basel-Stadt eine mehrstufige Analysestrategie:

Target Bereich

Innerhalb eines Tages werden die Proben auf bekannte Substanzen untersucht. Die Stoffliste der bekannten Substanzen umfasst derzeit 300 Chemikalien (Stand September 2014) und deren Umwandlungsprodukte aus der Gruppe der Pestizide, Biozide, Arzneimittel, Betäubungsmittel, Industriechemikalien (IKSR-Fachbericht 202), Korrosionsschutzmittel (IKSR-Fachbericht 183) und Süßstoffe. Die Liste wird laufend aktualisiert (Messresultaten aus nationalen und internationalen Monitoring-Programmen).

Dieser Multikomponenten-Methode kam auch im Rahmen der Sonderuntersuchung zum Einsatz.

non Target Bereich

Trotz dieser großen Substanzpalette des Target Screening bleibt es unklar, welcher Anteil der im Rhein vorhandenen Substanzen tatsächlich erfasst wird. Um auch die unbekanntesten Stoffe nachzuweisen, hat die Eawag ein Programm entwickelt, welches aus den Massenspektrometriedaten alle vorhandenen Substanzsignale extrahiert. Nach Eliminierung von Hintergrund und Blindwertsignalen bleiben bis zu 8.000 unbekannte Substanzen übrig. Anhand der exakten Masse und des Isotopenmusters kann einer Substanz in einem ersten Schritt die wahrscheinliche Summenformel zugewiesen werden. Danach sucht man in spezialisierten Datenbanken nach passenden Substanzstrukturen. Diese einzelnen Schritte sind bisher nicht automatisierbar und erfordern dementsprechend viel Zeit. Dennoch gelingt es immer wieder, neue Substanzen zu erkennen und zu identifizieren. Als Beispiel sei hier der Nachweis von Methadon aufgeführt. Das Auftreten einer bestimmten Masse an drei nacheinander folgenden Tagen führte zu weiteren Abklärungen. Nach Bestimmen der Summenformel und Datenbankabgleichen in öffentlichen Spektrenbibliotheken konnte dem unbekanntesten Stoff eine Struktur zugeordnet werden. Die letztendliche Identifizierung erfolgte durch Abgleich mit einem Referenzmaterial. Der Stoff erwies sich als Methadon und nach der Identifizierung konnte auch der Einleiter ermittelt werden.

Aktuell wird ein neues Software-Tool für den Non-Target-Bereich implementiert. Dieses Tool soll zu einer besseren Priorisierung der Daten und damit besseren Erkennung von "interessanten" Massen führen.

Neue Stoffe für das erweiterte Rheinmessprogramm Chemie 2015-2020 stammen ausschließlich aus der „Target-Liste“. Die non Target Analytik wird an Bedeutung gewinnen, wenn die Methode längs des Rheins in mehreren Laboratorien etabliert ist.

3. Sonderuntersuchung der Proben im Längsverlauf des Rheins und der Nebenflüsse mittels HPLC-MS/MS

Die Resultate der vier durchgeführten Probennahmen sind im Kapitel 3 zusammenfassend dargestellt.

3.1 Auswertung nach Häufigkeit des Vorkommens

Die detaillierten validierten Messdaten der Sonderuntersuchung inklusive einer statistischen Auswertung finden sich in einer Exceltabelle, welche im Sekretariat angefordert werden kann.

Die Auswertung der Sonderuntersuchung, für die Stoffe welche an allen Messstellen über der Bestimmungsgrenze gefunden werden, ist Tabelle 1 zu entnehmen, wobei die Arzneimittel die Stoffgruppe mit den meisten nachgewiesenen Einzelstoffen ist.

Tabelle 1: Stoffe, welche an allen Messstellen vorkommen (> BG)

Arzneimittel	Einzelstoffe
Candesartan	5-Methylbenzotriazol
Metoprolol	Benzotriazol
Sitagliptin	2-Naphthalinsulfonsäure
Carbamazepin	Tetraglyme
Lamotrigin	
Sulfamethoxazol	Metaboliten
Levetiracetam	Valsartansäure
Telmisartan	4-Formylaminoantipyrin
Oxazepam	N-Acetyl-4-aminoantipyrin
Amisulprid	Atenololsäure
Venlafaxin	Carbamazepin-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy
Phenazon	Metolachlor-ESA
Clarithromycin	Clopidogrelsäure
Lidocain	2-Hydroxyatrazin
Metformin	
Gabapentin	Süßstoffe
Valsartan	Acesulfam
O-Desvenlafaxin ¹	Cyclohexylsulfamidsäure
Tramadol ¹	Sucralose
	Saccharin
Pflanzenschutzmittel	
DEET	Röntgenkontrastmittel
Carbendazim	Iomeprol ²
Metolachlor	Iopamidol ²

3.2. Auswertung nach Konzentration

Für die Auswertung nach Konzentration hat man den Wert 0,3 µg/L gewählt, was dem Orientierungswert des internationalen Warn- und Alarmplans Rhein für Biozide (Einzelstoffe), Pflanzenschutzmittel (Einzelstoffe) und Pharmaka (Einzelstoffe) entspricht.

Die Auswertung der Sonderuntersuchung aufgrund der Konzentration ist Tabelle 2 zu entnehmen.

¹ wurde als Summe O-Desvenlafaxin und Tramadol erfasst

² wurde als Summe Iomeprol und Iopamidol erfasst

Tabelle 2: Stoffe, deren Konzentration > 0,3 µg/L betrug

Arzneimittel	Einzelstoffe
Furosemid (4,37 µg/L)	Toluol-4-sulfonsäure (1,88 µg/L)
Metformin (1,87 µg/L)	5-Methylbenzotriazol (1,61 µg/L)
Hydrochlorothiazid (0,35 µg/L)	Benzotriazol (1,44 µg/L)
Gabapentin (0,87 µg/L)	2,7-Naphthalindisulfonsäure (0,68 µg/L)
Valsartan (0,31 µg/L)	2-Naphthalinsulfonsäure (0,44 µg/L)
Metaboliten	Röntgenkontrastmittel
Valsartansäure (0,55 µg/L)	Iopromid (0,54 µg/L)
Metazachlor-OXA (0,41 µg/L)	
Metazachlor-ESA (0,54 µg/L)	Süßstoffe
4-Formylaminoantipyrin (0,40 µg/L)	Acesulfam (3,17 µg/L)
N-Acetyl-4-aminoantipyrin (0,38 µg/L)	Cyclohexylsulfamidsäure (1,29 µg/L)
Atenololsäure (0,32 µg/L)	Sucralose (0,83 µg/L)
	Saccharin (0,41 µg/L)

3.3 Auswertung nach Konzentration und Häufigkeit

Es ist vorgesehen, in das erweiterte Messprogramm des Rheinmessprogramms Chemie 2015-2020 auch Stoffe aus dem in 2013 durchgeführten Sondermessprogramm, welche sich als besonders auffällig erwiesen haben, aufzunehmen. Dazu wurden die Ergebnisse des Sondermessprogramms auf zweierlei Weise ausgewertet (Tabelle 3):

1. Nach der maximalen Konzentration des Stoffes.
2. Nach der Häufigkeit des Vorkommens an den untersuchten Messstellen.

Tabelle 3: Punktesystem zur Bewertung des Auftretens der Stoffe

Anzahl der Punkte für			
Konzentrationen [µg/L]		Häufigkeit des Auftretens im Verhältnis zur Anzahl Messungen	
Wert	Punkte	Wert	Punkte
> 1	100	100 %	100
> 0,75	75	> 75 %	75
> 0,5	50	> 50 %	50
> 0,3	30	> 25 %	25
> 0,1	10	> 0 %	20
> 0,03	4		
> 0,01	1		

Je nach Resultat dieser Auswertung wurden für die Stoffe Punkte vergeben. Maximal konnten für einen Stoff somit 200 Punkte erreicht werden. In die Stoffliste des erweiterten Messprogramms wurden die Stoffe aufgenommen werden, die mehr als 100 Punkte erreicht haben. Ergänzt wurde die Liste neuer Stoffe durch aus den Staaten oder deutschen Bundesländern gemeldete zusätzliche Stoffe, die im Sondermessprogramm messtechnisch nicht erfasst werden konnten, z. B. saisonal auftretende Pflanzenschutzmittel).

Tabelle 4: Stoffe aus der Sonderuntersuchung, deren Punktzahl > 100 beträgt

200 Punkte	> 100 Punkte
Metformin	Metazachlor-ESA
5-Methylbenzotriazol	O-Desvenlafaxin ¹
Benzotriazol	Candesartan
Iomeprol ²	Metoprolol
Iopamidol ²	Sitagliptin
Acesulfam	Carbamazepin
Cyclohexylsulfamidsäure	Lamotrigin
	Sulfamethoxazol
> 175 Punkte	Levetiracetam
Gabapentin	Carbamazepin-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy
Toluol-4-sulfonsäure	Metolachlor-ESA
Coffein	Hydrochlorothiazid
Sucralose	Telmisartan
	Oxazepam
> 130 Punkte	Amisulprid
Valsartansäure	Venlafaxin
Valsartan	Phenazon
2-Naphthalinsulfonsäure	Clarithromycin
4-Formylaminoantipyrin	Clopidogrelsäure
N-Acetyl-4-aminoantipyrin	DEET
Atenololsäure	Carbendazim
Saccharin	Lidocain
	Tramadol ¹
	2-Hydroxyatrazin

4. Wichtigste Erkenntnisse der Sonderuntersuchung

Beschränkte sich das Analysefenster der Rheinüberwachungsstation in Weil am Rhein bis vor wenigen Jahren primär auf den Bereich der flüchtigen und unpolaren Substanzen (Analyse mittels GC-MS-Technologie), konnte dank der Einführung der hochauflösenden HPLC-MS/MS-Methode das Analysenfenster auf die polaren Spurenstoffe erweitert und somit diese analytische „Lücke“ geschlossen werden. Die angewendete HPLC-MS/MS-Methode hat jedoch entsprechend der Methodenvorbereitung und des Trenn- und Messprinzips analytische Grenzen. So können mit dieser Methode nur diejenigen organischen Verbindungen erfasst werden, welche weder sehr flüchtig noch sehr unpolar bzw. extrem polar sind. Darüber hinaus werden nur Substanzen mit einer Molmasse größer 114 erfasst und sich ionisieren lassen. Die verwendete Multimethode kann somit eine Vielzahl von Lösungsmitteln oder auch mehrheitlich die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe nicht erfassen. Sie ist nichtsdestotrotz eine wertvolle Ergänzung, welche jedoch die weiterhin durchgeführte GC-MS-Technologie vorerst nicht vollständig ersetzen kann.

Mit der Sonderuntersuchung im Rheinlängsprofil, an ausgewählten Nebenflüssen und durch Anwendung der etablierten HPLC-MS/MS Analytik konnten zahlreiche Stoffe an allen untersuchten Messstellen in Konzentrationen über 0,1 µg/l nachgewiesen werden. Die meisten dieser Stoffe waren bisher nicht Bestandteil des Messprogramms. Aufgrund der Resultate ist ersichtlich, dass die größten Dauerbelastungen über die Kläranlagen eingeleitet werden. Hierzu gehören insbesondere Arzneimittelwirkstoffe und deren Metabolite (wie auch im IKSR-Fachbericht 182 festgestellt). Pestizide gehören nicht zu den Verbindungen mit den größten permanenten Frachten (Ausnahme: Pestizidmetabolite Metazachlor-ESA und -OXA). Sie treten jedoch saisonal/lokal immer wieder in höherer Konzentration auf.

Mit den Ergebnissen der Sonderuntersuchung liegen nun für rund 300 Stoffe vergleichbare Ergebnisse im Rheinlängsprofil vor. Gemäß der beschriebenen Auswertung können relevante Stoffe in das erweiterte Wassermessprogramm aufgenommen werden.

Empfehlungen

Die Ergebnisse dieses Sondermessprogrammes sollten auch als erweiterte Entscheidungsgrundlage für eine von den anderen IKSR-Mitgliedstaaten durchzuführende Ergänzung der Analytik auf (hochauflösende) Flüssigchromatographie/Massenspektroskopie-Analytik (LC-MS/MS) dienen.

Die aufzunehmende Methode/Messtechnik sollte dabei folgende Kriterien erfüllen:

- Die Auswertung der Target-Substanzen muss innerhalb von 6 Stunden nach dem Probeneingang möglich sein.
- Die Erfassung und Aufklärung von non-Targets bedingt eine hochauflösende LC-MS, die im relevanten Massenbereich von 150-400 m/z eine Auflösung von 60.000 (im Routinebetrieb) generieren kann (Singer, H.W. et al., 2009, Multikomponenten-Screening für den Rhein bei Basel – Abschlussbericht).