



Herausforderungen bei der Entwicklung von Methoden zur Analyse hochpolarer Stoffe in Wasser mittels HILIC- und IC-HRMS-Kopplung

Joana Flottmann^{1,2} (Flottmann.J@lw-online.de), Ronja Schmidt³ (ronja.schmidt@studmail.htw-aalen.de), Tobias Schips³ (tobias.schips@studmail.htw-aalen.de), Vanessa Bauer (vanessa.bauer@studmail.htw-aalen.de), Wolfram Seitz¹ (Seitz.W@lw-online.de), Torsten C. Schmidt² (torsten.schmidt@uni-due.de), Rudi Winzenbacher¹ (Winzenbacher.R@lw-online.de)

¹ Zweckverband Landeswasserversorgung, Am Spitzigen Berg 1, 89275 Langenau

² Universität Duisburg-Essen, Universitätsstraße 5, 45141 Essen

³ Hochschule Aalen, Beethovenstraße 1, 73430 Aalen

Abstract

Hochpolare Stoffe stellen für die chromatographische Trennung nach wie vor eine große Herausforderung dar. HILIC (Hydrophile Interaktions-Flüssigkeitschromatographie)- und IC (Ionenchromatographie)-HRMS-Kopplungen sind dazu geeignet, den Polaritätsbereich der routinemäßigen Überwachung von Roh- und Trinkwässern mittels RPLC sinnvoll zu erweitern. Das IC-Verfahren wird hier für die Analyse von Anionen genutzt und ermöglicht die Direktinjektion von wässrigen Proben. Der instrumentelle Aufbau ist durch den Einsatz von externen Hilfspumpen aufwendiger, doch ist die IC-Methode in der Lage, auch Substanzen mit sehr hoher Polarität wie Glyphosat zu analysieren. Mittels HILIC lassen sich hingegen kationische oder weitere ungeladene Spezies, wie Metformin oder 1,2,4-Triazol bestimmen. Insgesamt betrachtet stellen beide Kopplungstechniken eine sinnvolle Erweiterung für die Roh- und Trinkwasserüberwachung dar.

Einleitung

Insbesondere (sehr) mobile und persistente Chemikalien stellen im Wasserkreislauf eine Herausforderung dar. Viele dieser Chemikalien haben eine geringe Masse von unter 400 Dalton [1,2]. Sie gelangen durch verschiedene Quellen wie Landwirtschaft, Industrie, Verkehr und Haushalte in die Umwelt [1,3]. Das Umweltbundesamt hat kürzlich einen Priorisierungsrahmen veröffentlicht, in dem persistente und mobile Stoffe, die das Trinkwasser verunreinigen können, aufgelistet sind [4].

Mittels gängiger Analysetechniken, wie der Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (RPLC), können hochpolare Substanzen nicht bzw. kaum analysiert werden. Diese Substanzen wechselwirken nicht mit stationären RP-Phasen, wie dem weit verbreiteten C18-modifizierten Kieselgel [1,3,5]. Obwohl es viele Ansätze gibt, diese so genannte „analytische Lücke“ zu schließen, wurde bis heute keine einheitliche Analysetechnik für polare Substanzen eingeführt [3,5]. Die Analyse hochpolarer Substanzen ist von grundlegender Bedeutung, um die hohe Qualität des Trinkwassers zu sichern [3]. Es ist davon auszugehen, dass es noch viele weitere hochpolare Spurenstoffe bzw. Abbauprodukte in der Umwelt gibt, die derzeit noch

unbekannt sind und nicht überwacht werden [3,6]. Zusätzliche Methoden sind deshalb für eine umfassende Roh- und Trinkwasserüberwachung erforderlich.

Eine vielversprechende Analysenmethode für (hoch)polare Spurenstoffe stellt die sogenannte Hydrophile Interaktions-Flüssigkeitschromatographie (HILIC) dar. Bei der stationären Phase wird zwischen reinem Kieselgel und neutralen, geladenen oder zwitterionischen Gruppen, die an Siliziumdioxid oder polymeren Partikeln gebunden sind, unterschieden [7].

Aber auch die Ionenchromatographie ist geeignet, hochpolare Substanzen in Wasser zu trennen, sofern diese als Ionen vorliegen [8]. Da Anionen im Wasserkreislauf mobiler sind, als Kationen – diese adsorbieren eher an Sedimenten – liegt der Fokus hier bei der Anionenchromatographie [9].

Diese Studie thematisiert die Entwicklung von Methoden zur Analyse hochpolarer Substanzen in Wasser mit HILIC- und IC-HRMS-Kopplungstechniken, die jeweils unterschiedliche Herausforderungen mit sich bringen.

Methodik

Hydrophile Interaktions-Flüssigkeitschromatographie (HILIC)

Für die Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Methode mittels HILIC wurden 22 verschiedene polare Substanzen als Testsubstanzen ausgewählt (siehe Tab. 1). Die ausgewählten Modellverbindungen sind für Wasserversorger relevant, kommen im Wasserkreislauf vor und unterscheiden sich in Molekulargewicht, Polarität, Ladungszustand und funktionellen Gruppen. Ein Gemisch dieser Modellsubstanzen wurde mittels vier unterschiedlichen HILIC-Säulen (siehe Tab. 1) bei einer Temperatur von 40 °C voneinander getrennt. Als mobile Phase dienten Reinstwasser und Acetonitril (ACN), mit einer Zugabe von je 5 mmol/L Puffersalz. Es wurden zwei Puffersalze, Ammoniumformiat (pH 3,2) und Ammoniumacetat (pH 5,8), getestet. Das verwendete LC-System ist eine Vanquish Flex von Thermo-Fisher Scientific.

Tabelle 1: Auswahl hochpolarer Stoffe zur Entwicklung einer geeigneten Trennmethode.

Substanz	Molmasse [g/mol]	Min log D-Wert (pH 4 – 9)	HILIC	IC
1,2,4-Triazol	69,07	-0,46	x	
AMPA	111,04	-4,72		x
Acrylamid	71,08	-2,74	x	
Carboxy-Acyclovir	239,19	-1,58	x	x
Chlorothalonil M4 R471811	347,56	-1,71	x	x
Chlorothalonil M8 R419492	577,54	-4,50	x	x
Clopyralid	192,00	-1,30		x
Cyanursäure	129,07	0,98	x	x
Desphenyl-Chlordiazon (Metabolit B)	145,55	-1,01	x	
Dibromessigsäure	217,84	-2,89		x
Dichloressigsäure	128,94	-2,47		x
Difluoressigsäure	96,03	-3,34		x
Dimethenamid M31	347,45	-2,58		x
Ethephon	144,49	-3,66		x
Glufosinat	181,13	-6,78		x
Glyphosat	169,07	-8,57	x	x
Guanylharnstoff	102,10	-4,05	x	
Hexafluorphosphat	144,96	0,96	x	x
Metformin	129,17	-5,75	x	
Monobromessigsäure	138,95	-3,03		x
Monochloressigsäure	94,50	-3,21		x
Naphthalindisulfonat	288,23	-3,43	x	
N,N-Dimethylsulfamid	124,16	-1,54	x	
Oxamidsäure	89,05	-4,60	x	x
Oxypurinol	152,11	-3,64	x	x
Paraquat	186,26	-4,22 (pH 7,4)	x	
PFBA	214,04	-1,22	x	x
PFBS	300,10	0,86	x	x
Sulfamidsäure	97,09	-3,79	x	x
Tetrafluorborat	87,00	-1,13	x	
Trichloressigsäure	163,39	-2,00		x
Trifluoressigsäure	114,02	-2,62	x	x
Trifluormethansulfonsäure	150,08	-1,23	x	x

Tabelle 2: Auswahl der HILIC-Säulen zur Trennung hochpolarer Stoffe in Wasser.

Typ	Name	Hersteller	Länge	Durchmesser	Partikelgröße
Reines Silica	Kinetex-HILIC	Phenomenex	100 mm	3 mm	2,6 µm
Vernetzte Diol-Gruppen	Luna-HILIC	Phenomenex	100 mm	3 mm	3,0 µm
Amid	XBridge BEH Amide	Waters	100 mm	2,1 mm	3,5 µm
Zwitterionisch	ZICcHILIC	Merck	100 mm	2,1 mm	3,0 µm

Ionenchromatographie (IC)

Es wurde eine chromatographische Methode zur Trennung von 24 hochpolaren, anionischen Modellsubstanzen (siehe Tab.1) mit einem Dionex Integriert HPIC System entwickelt. Die Stoffe sind ebenfalls für Wasserversorger relevant und unterscheiden sich in ihren funktionellen Gruppen, dem Molekulargewicht und dem Ladungszustand. Es wurden eine Dionex IonPac AS24 Anionenaustauschersäule (2 mm x 250 mm, 7 µm) und eine IonPac AG24 Vorsäule (2 mm x 50 mm) verwendet. Aus der vergleichsweise geringen Anzahl an verfügbaren IC-Trennsäulen wurde auf Basis von Applikationsempfehlungen diese Säulenkombination ausgewählt. Das Injektionsvolumen betrug 50 µL. Basierend auf dem ansteigenden KOH-Gradienten wurde der Strom des Suppressors sukzessive im Bereich von 4 mA (bei c(KOH) = 5 mmol/L) bis 75 mA (bei c(KOH) = 100 mmol/L) und zurück zum Ausgangszustand über eine Gesamtlaufzeit von 20 Minuten eingestellt. Eine AXP-Hilfspumpe wurde verwendet, um den DRS 600-Suppressor mit Wasser mit einer Flussrate von 0,4 mL/min zu regenerieren. Die Infusion von Methanol nach der Säule verbesserte die Ionisierungseffizienz in der ESI-Quelle.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Der gewählte Messmodus des HRMS-Systems Orbitrap Exploris 120 zur Entwicklung einer Methode war Full MS/ddMS², bei dem eine Fragmentierung nur für die vier Ionen mit der höchsten Intensität durchgeführt wurde. Der Scanbereich für MS1 reichte von 65 m/z bis 650 m/z. Die Trennexperimente wurden jeweils in dreifacher Ausführung im negativen (für HILIC-Messungen auch im positiven) Modus durchgeführt. Für die IC-Messungen mit einem hohen Wasseranteil des Effluats waren eine Erhöhung der ESI-Quellenspannung im Vergleich zur HILIC-Messung von -2,2 kV auf -3,0 kV (im Positiven lag diese bei 3,4 kV), eine Temperaturerhöhung der Ionentransferröhre von 300 °C auf 320 °C und der Verdampfungstemperatur von 300 °C auf 340 °C notwendig.

Ergebnisse und Diskussion

Ionenchromatographie (IC)

Es wurde eine robuste IC-HRMS-Methode entwickelt, bei der die IC- und MS-Parameter sowie deren Kopplung optimiert und validiert wurden. Es wurden stabile Retentionszeiten (RT) mit relativen Standardabweichungen von < 0,5 % (n = 3) innerhalb einer Wassermatrix erreicht. Im Hinblick auf Viskosität und Präzision erwies sich MeOH als geeignetes Make-up-Lösungsmittel. Der Gegendruck der AXP-Hilfspumpe begrenzte die Flussrate von MeOH auf 0,08 mL/min. Die Bestimmungsgrenzen nach dem Eurachem Validation Guide in Donau- und Grundwasser mit direkter Injektion waren im Mittel < 100 ng/L (basierend auf der Integration des Peaks des Vorläuferions). Sie ist somit gut mit anderen IC-Methoden zu vergleichen. [4] Für etwa 50 % der Analyten wurden Wiederfindungsraten

zwischen 80 % und 120 % ermittelt (sowohl für Grundwasser als auch für Flusswasser). Die übrigen Analyten waren von stärkeren Matrixeffekten betroffen, die zu einer Signalunterdrückung führten. Es konnten jedoch keine Korrelationen zwischen niedrigen Wiederfindungsraten und koeluierten anorganischen Anionen wie Chlorid, Sulfat oder Nitrat festgestellt werden (siehe Abb. 1). Von den ausgewählten Modellsubstanzen konnten zwei (Carboxy-Acyclovir und Perfluorbutansulfonsäure) nicht ausreichend retardiert werden.

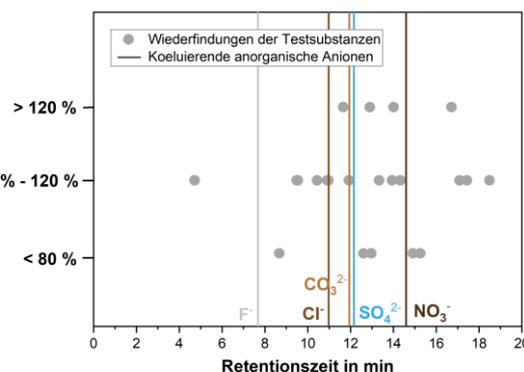


Abb.1: Wiederfindungsraten der Testsubstanzen (graue Punkte) nach Retentionszeit im Vergleich zu koeluierten anorganischen Anionen (senkrechte Linien).

Hydrophile Interaktions-Flüssigkeitschromatographie (HILIC)

Die vier ausgewählten Säulen repräsentieren verschiedene Typen von HILIC-Phasen. Die Equilibrierzeit ist ein Schlüsselfaktor bei HILIC, um stabile RT zu erhalten. Sie ist für die Identifizierung von unbekanntem Substanzen im Non-Target-Screening von entscheidender Bedeutung. Vorläufige Tests zeigen sehr stabile RT. Sowohl die Verschiebungen als auch die relativen Standardabweichungen der RT innerhalb einer Sequenz, gemessen in Triplikaten, lagen für alle getesteten Säulen bei maximal 5 %.

Die Zusammensetzung der Probe bzw. des Probelösemittels hat einen Einfluss auf die Chromatographie, was sich insbesondere in der Peakform widerspiegelt. Aufgrund des hohen Organikanteils während des analytischen Laufs ist die Zusammensetzung des Lösemittels der Probe von großer Bedeutung. In Abbildung 2 ist der Einfluss des Probelösemittels auf die Peakform dargestellt. Je größer der Anteil an ACN ist, desto schmaler der Peak und desto stabiler die Retentionszeit. Für alle folgenden Messungen wurde daher die Lösemittelzusammensetzung der Probe auf 10 % Wasser und 90 % ACN festgesetzt.

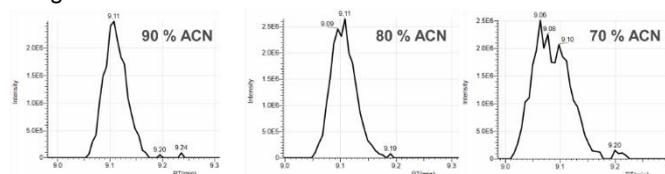


Abb. 2: Peakform von Carboxy-Acyclovir auf der Luna-HILIC mit 5 mmol/L Ammoniumacetat (pH 5,8) als Puffer in Abhängigkeit der Lösemittelzusammensetzung der Probe.

Ein Aspekt zur Wahl einer geeigneten Trennsäule ist die Verteilung der Retentionszeiten über den gesamten analytischen Lauf. Die Verteilung der Retentionszeiten der Modellanalyten für verschiedene HILIC-Säulen bei denselben chromatographischen Bedingungen (pH 3,2) ist in Abbildung 3 dargestellt. Bei Verwendung der BEH-Amid-Säule ergibt sich eine sehr gute Verteilung der Retentionszeiten über den gesamten Lauf, allerdings werden einige Substanzen bereits in der Totzeit der Säule eluiert. Auf der Luna HILIC-Säule sind die Retentionszeiten deutlich höher als die Totzeit, allerdings ist die Verteilung über den gesamten Lauf unzureichend. Die Hälfte der Modellsubstanzen werden auf der Kinetex-HILIC innerhalb der ersten zwei Minuten des chromatographischen Laufs eluiert, wodurch eine breite Verteilung der RTs über den gesamten Lauf nicht gegeben ist. Insgesamt zeigt die ZICcHILIC die breiteste und damit beste Verteilung der Retentionszeiten über den gesamten Analyselauf.

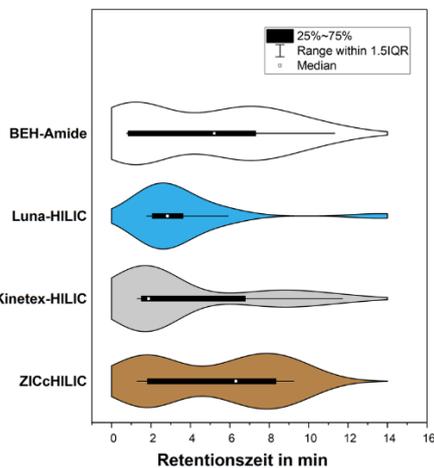


Abb. 3: Verteilung der Retentionszeiten auf den verschiedenen HILIC-Säulen unter gleichen chromatographischen Bedingungen (Zugabe von 5 mmol/L Ammoniumformiat, pH 3,2).

Nicht alle der 22 ausgewählten Modellverbindungen liefern ein zufriedenstellendes chromatographisches Signal. Glyphosat, Paraquat und Acrylamid konnten beispielsweise mit keiner der hier verwendeten Säulen analysiert werden.

Fazit und Ausblick

Eine robuste IC-HRMS-Methode zur Untersuchung hochpolarer und anionischer Substanzen in Roh- und Trinkwasser wurde entwickelt und steht zum Einsatz für ein Screening auf unbekannte Verbindungen bereit. Herausfordernd ist hier die Gewährleistung der verbesserten Verdampfung bei der Ionisation sowie der Regeneration des Suppressors, der dafür sorgt, dass die Kalilauge durch Ionentausch wieder zu Wasser wird und das Massenspektrometer vor ungewollter KOH-Kontamination schützt. Ebenfalls ist auffällig, dass die Matrix einen großen Einfluss auf die RT hat, was beim Non-Target-Screening zu berücksichtigen ist.

Die abschließende Validierung der HILIC-HRMS-Methode steht noch aus. Bisher wurden der Gradient, die Puffersalz-konzentration und der pH-Wert sowie das Injektionsvolumen optimiert. Als nächstes werden die ESI- und MS-Einstellungen überprüft und die Methode validiert. Wie erste Tests zeigen, könnte die Empfindlichkeit auch bei dieser Methode nicht ausreichen, um alle Komponenten bei niedrigen ng/L-Konzentrationen direkt nachzuweisen, was einen Anreicherungsschritt erforderlich machen würde.

Insgesamt betrachtet werden mehrere Methoden zur Erfassung einer möglichst breiten Palette hochpolarer Stoffe erforderlich sein. Bei den HILIC-Säulen werden jeweils einzelne Substanzen nicht retardiert und einige Substanzen, wie beispielsweise Glyphosat, konnten mit keiner der ausgewählten HILIC-Säulen analysiert werden. Anders sieht es bei der IC-HRMS-Kopplung aus, bei der Glyphosat gut chromatographiert werden kann. Vorteilhaft hierbei ist, dass die Wasserproben direkt injiziert werden können. Nachteilig ist die Beschränkung auf den negativen Ionisationsmodus, da Stoffe wie beispielsweise 1,2,4-Triazol, nicht mittels Anionenchromatographie analysiert werden können. Nachteilig bei der HILIC-Methode ist das sehr begrenzte Injektionsvolumen für wässrige Proben und das Erfordernis einer Probenaufbereitung mit Lösungsmittelwechsel. Bei einer Probenanreicherung werden die Analyten zwar angereichert und die Detektions-/Bestimmungsgrenzen können dadurch gesenkt werden, doch wird gleichzeitig auch die Matrix angereichert und könnte negativen Einfluss, beispielsweise durch Suppression in der ESI-Quelle, auf die Analyse nehmen.

Projektförderung

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) fördert das Verbundprojekt „gwTriade (Ökologisches und ökotoxikologisches Grundwasserqualitätsmonitoring auf Basis eines integrativen Triade-Ansatzes)“ zur Fördermaßnahme „LURCH (Nachhaltige Grundwasserbewirtschaftung)“ im Rahmen des Bundesprogramms „Wasser: N“. Wasser: N ist Teil der BMBF-Strategie „Forschung für Nachhaltigkeit (FONA)“. BMBF-Fördernummer: 02WGW1668D

Literatur

- [1] D. Zahn, I.J. Neuwald, T.P. Knepper, (2020): Analysis of mobile chemicals in the aquatic environment – current capabilities, limitations and future perspectives, *Anal. Bioanal. Chem.*, 412, 4763-4784.
- [2] Umweltbundesamt, (2019): Protecting the sources of our drinking water: The criteria for identifying persistent, mobile and toxic (PMT) substances and very persistent and very mobile (vPvM) substances under EU Regulation, REACH (EC) No 1907/2006, Texte 127/2019.
- [3] T. Reemtsma, U. Berger, H.P.H. Arp, H. Gallard, T.P. Knepper, M. Neumann, J.B. Quintana, P. de Voogt, (2016): Mind the gap: Persistent and mobile organic compounds – water contaminants that slip through, *Environ. Sci. Technol.*, 50, 10308-10315.

- [4] Umweltbundesamt (2023): A prioritization framework for PMT/vPvM Substances under REACH for registrants, regulators, researchers and the water sector.
- [5] S. Knoll, T. Rösch, C. Huhn, (2020): Trends in sample preparation and separation methods for the analysis of very polar and ionic compounds in environmental water and biota samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, 412, 6149–6165.
- [6] Boxall, A. B. A., Sinclair, C. J., Fenner, K., Kolpin, D., Maund, S. J. (2004): When synthetic chemicals degrade in the environment, *Environ. Sci. Technol.*, 38, 19, 368A-375A.
- [7] G. Greco, T. Letzel, (2014): HILIC Stationary Phases - HILIC Tip #3, aufgerufen unter www.researchgate.net/publication/297232427 , zuletzt am 25. Juli 2024.
- [8] Schorr, J., Therampilly, S., Jiao, L., Longree, P., Singer, H., Hollender, J. (2023): Closing the gap: Ion chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to trace highly polar anionic substances in groundwater, *Sci. Tot. Environ.*, 889, 164170.
- [9] DVGW, (2018): Selektion von für die Wasserversorgung relevanten prioritären Stoffen und Erarbeitung eigener Stoffliste, Abschlussbericht, DVGW-Förderkennzeichen W 201515 (W 3/01/14).

Korrespondenzadresse

M.Sc. Joana Flottmann
Zweckverband Landeswasserversorgung
Betriebs- und Forschungslabor
Am Spitzigen Berg 1
89129 Langenau
Tel.: +49 (7345) 9638-2291
E-Mail: Flottmann.J@lw-online.de
Internet: www.lw-online.de