

Organische screening: Leidraad voor de identificatie van organische verbindingen in water met behulp UHPLC-HRMS

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Apparatuur en materiaal	3
4	Reagentia en standaarden	3
5	Monsterbewaring	4
6	Meting	4
7	Data-processing en data-evaluatie	4
8	Rapportering	5
9	Veiligheid	6
10	Referenties	6
BIJLAGE 1	LC-MS retentietijdmerkers en relatie tussen retentietijdsindex en logD	7

1 TOEPASSINGSGEBIED

Dit document beschrijft de werkwijze die gevolgd kan worden bij de detectie en identificatie van onbekende semi-polaire en polaire verbindingen in water (*suspect* en *unknown screening*) met behulp van een ultrahoge druk vloeistofchromatograaf gekoppeld aan een hoge resolutie massa spectrometer (UHPLC-HRMS). De methode is toepasbaar op grondwater, oppervlaktewater en drinkwater en op effluenten van bedrijven en rioolwaterzuiveringsinstallaties.

Opn.: De methode is zuiver kwalitatief en beoogt geenszins een kwantitatieve, noch semi-kwantitatieve bepaling.

2 PRINCIPE

Waterstalen worden rechtstreeks geïnjecteerd in een UHPLC-HRMS systeem. De aanwezige verbindingen worden gescheiden op een omgekeerde fase kolom en vervolgens geïoniseerd en massaspectrometrisch gedetecteerd gebruikmakend van een toestel met hoge massaspectrometrische resolutie. De gegenereerde data worden vervolgens met de beschikbare toestelsoftware verwerkt, resulterend in een lijst van accurate mono-isotopische moleculaire massa's en bijhorende retentietijden. Gebruikmakend van bestaande *compound databases* en a.d.h.v exacte massa, isotooppatroon, retentietijd en fragmentatiepatroon kan vervolgens de identiteit van de verbinding achterhaald worden.

3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- LC-MS bestaande uit:
 - o een UHPLC-systeem (ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
 - o een hoge resolutie massa spectrometer (time-of-flight (TOF) of Orbitrap Fourier Transform) met electrospray en ev. APCI interface, een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse; de aanbevolen resolutie bedraagt minstens 30.000.
- UHPLC-kolom: een reversed phase kolom, bv. *Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 µm, 2.1 x 150 mm* of gelijkwaardig

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Methanol: LC-grade
- Acetonitrile (ACN): LC-grade
- Water: LC-grade
- Gradiëntbuffer: ammoniumacetaat, ammoniumformiaat, mierzuur of ander, p.a.
- Retentietijdsreferentiemengsel (stockoplossing): dit is een oplossing van volgende retentietijdmerkers, in een concentratie van bv. 100 µg/mL in methanol:
 - metformin
 - chloridazon

- carbetamide
- monuron
- metobromuron
- chlorbromuron
- metconazole
- diuron
- quinoxifen
- fenofibrate

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

6 METING

- Breng indien nodig de watermonsters op een pH van 7, centrifugeer en breng over in injectievials
- Injecteer de watermonsters in een UHPLC-HRMS; het injectievolume bedraagt bv. 50 µL.
- Voer de LC-scheiding uit op een C18-kolom, bv. met volgende gradiënt:
 - A: water + 5 mM ammonium acetaat
 - B: methanol + 5 mM ammonium acetaat
 - Programma: 5% B -> 90% B
- Voer de ionisatie uit met electrospray, in zowel positieve (ESI+) als negatieve modus (ESI-), en registreer de gevormde ionen; stel het toestel in op maximale massaspectrometrische resolutie
- Voer de analyses minstens in triplicate uit
- Analyseer blankowater (LC-grade) eveneens minstens in triplicate
- Analyseer het retentietijdsreferentiemengsel, bv. in een concentratie van 100 µg/L in methanol/water 10/90, in triplicate

7 DATA-PROCESSING EN DATA-EVALUATIE

- Verwerk de ESI+ en ESI- full scan data: deconvolveer de spectra, aligneer de retentietijden, identificeer adducten, isotopen, in-source fragmenten en stel de *peak list* op van gedetecteerde moleculaire ionen i.f.v. de retentietijd; maak hiertoe gebruik van de *peak picking* algoritmes van de toestelsoftware of maak gebruik van *open source* software (bv. MZmine 2, XCMS).
- Selecteer de in het watermonster gedetecteerde moleculaire ionen voor zover het signaal hiervan minstens 20 maal de blankowaarde bedraagt en minstens 10⁵ counts; de RSD van de triplicate bepaling dient <15%
- Bepaal de mogelijke brutoformule(s); de toegestane afwijking tussen gemeten mono-isotopische massa en deze van de kandidaat brutoformule(s) dient <5 ppm; de overeenkomst tussen waargenomen isotooppatroon en deze van de kandidaat brutoformule(s) dient >70 (*isotope fit score*). Ga ook na of de voorgestelde brutoformules

realistisch zijn (bepaal het dubbele binding equivalent (onverzadigheidsgraad) en toets af aan de *Seven Golden Rules*).

- Toets, met het oog op de toewijzing van kandidaat structuren, de mono-isotopische massa's en brutoformules aan deze aanwezig in eigen database(s), internet databases (Chempider, PubChem, METLIN ...) en/of STOFF-IDENT (zie www.for-ident.org); verifieer ook of de voorgestelde structuren in overeenkomst zijn met de ionisatiemodus waaronder ze werden geregistreerd.
Opm.: STOFF-IDENT is een database samengesteld o.b.v. van reeds in het watercompartiment gedetecteerde verbindingen (deze gegevens werden via het NORMAN netwerk verzameld), aangevuld met gekende metabolieten en verbindingen waarvoor binnen REACH restricties gedefinieerd werden; STOFF-IDENT is de database die binnen het FOR-IDENT platform gehanteerd wordt.
- Bevestig voor de kandidaat verbindingen de geldigheid van de structuur door verificatie van de retentietijd. Dit gebeurt door bepaling van de retentietijdindices a.d.h.v. de op een C18 kolom gemeten retentietijden voor de resp. verbindingen en de retentietijdmarkers, en hieruit de logD waarden (octanol-water distributiecoëfficiënten)(zie bijlage 1). Deze logD waarden worden bepaald gebruikmakend van de lineaire relatie tussen retentietijdsindex en log D. De bekomen logD waarden worden afgetoetst aan deze die in *compound databases* (bv. PubChem, STOFF-IDENT) kunnen teruggevonden worden. Deze waarden kunnen experimenteel bepaald zijn ofwel theoretisch berekend (bv. XlogP3). De aftoetsing aan logD waarden kan manueel gebeuren ofwel automatisch via het FOR-IDENT platform.
Opm.: Bemerk dat logD-waarden in geval van ioniseerbare verbindingen pH-afhankelijk zijn. Voor niet-ioniseerbare verbindingen geldt bij elke pH dat logD gelijk is aan logP (octanol-water partiticoëfficiënt).
- Bevestig voor de gerapporteerde verbindingen de voorgestelde structuren a.d.h.v. fragmentatie-experimenten (CID, *collision induced dissociation*, of HCD, *high energy collisional dissociation*). De fragmentaties kunnen data-independent gebeuren (DIA, *data-independent acquisition*) tijdens dezelfde of in een afzonderlijke meting, ofwel data-dependent (DDA, *data-dependent acquisition*) in een afzonderlijke meting, na selectie van de moleculaire ionen die men aan het fragmentatie-experiment wil onderwerpen. De fragmentaties gebeuren bij minstens 2 *collision* energieën. Vergelijk voor de kandidaat verbindingen de gemeten fragmentionen met deze opgenomen in MassBank, mzCloud, FOR-IDENT of andere experimentele MS/MS databases, ofwel met theoretisch voorspelde fragmenten, bv. gebruikmakend van MetFrag of Mass Frontier software.
- Bevestig finaal, indien dit noodzakelijk blijkt, de identiteit van de verbindingen door injectie van standaarden en verifieer de retentietijd.

8 RAPPORTERING

- Rapporteer voor de gedetecteerde verbindingen:
 - o de retentietijd R_t ,
 - o de mono-isotopische massa M van het neutrale molecule (dus niet van $[M+H]^+$ of $[M-H]^-$)
 - o de kandidaat brutoformule
 - o de mogelijke structuur

- het CAS nummer

Geef ook aan of de structuur geconfirmeerd werd door een goede retentietijd overeenkomst ($\Delta \log D < 1$) en/of fragmentatiespectrum

- Geef, indien de klant hierom vraagt, TIC chromatogrammen en m/z-Rt diagrammen (ESI+, ESI-) voor de onderzochte waters alsook voor de blanco's indien geen blancosubtractie is gebeurd
- Rapporteer ook de toegepaste LC-MS werkwijze

9 VEILIGHEID

De scheikundige producten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn ondergebracht bij de potentieel giftige en kankerverwekkende stoffen. Dit maakt het noodzakelijk de voorziene maatregelen in het laboratorium toe te passen om blootstelling aan of contact met deze producten tot een minimum te herleiden.

10 REFERENTIES

- Merle Plaßmann, Werner Brack, Martin Krauss; Human Biomonitoring of „new“ contaminants: Sub- Project 2 – Screening of target and non-target contaminants in human blood and urine; Umwelt & Gesundheit | 01/2016
- De Vijlder T., Valkenburg D., Lemièr F., Romijn P., Laukens ., Cuyckens F.; A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation; Mass Spec Rev., 2017, 1-23

BIJLAGE 1 LC-MS RETENTIETIJDMERKERS EN RELATIE TUSSEN
RETENTIETIJDINDEX EN LOGD

(bron: FOR-IDENT platform)

	Retentietijdsindex RTI	Log D
Metformin	50	-0.92
Chloridazon	87.2	1.11
Carbetamide	95.3	1.65
Monuron	99.5	1.93
Metobromuron	104	2.24
Chlorbromuron	113.4	2.85
Metconazole	124.5	3.59
Diuron	133.6	4.19
Quinoxifen	145.5	4.98
Fenofibrate	150	5.28

