

BTO 2019-29 | Mei 2019

BTO rapport

Nieuwe Chemische
Meetmethoden

BTO

Nieuwe Chemische Meetmethoden

BTO 2019-29 | Mei 2019

Opdrachtnummer

402045-051

Projectmanager

Patrick S. Bäuerlein

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Nieuwe stoffen

Kwaliteitsborger(s)

Pim de Voogt

Auteur(s)

Erik Emke, Ton van Leerdam, Dennis Vughs, Pim de Voogt, Andrea Brunner, Patrick S. Bäuerlein

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.
Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie
2019

Meer informatie

dr. Patrick Bauerlein
T 702
E patrick.bauerlein@kwrwater.nl

Keywords

NMR, IMS, non-target screening, ion mobility

Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO 2019-29 | Mei 2019 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

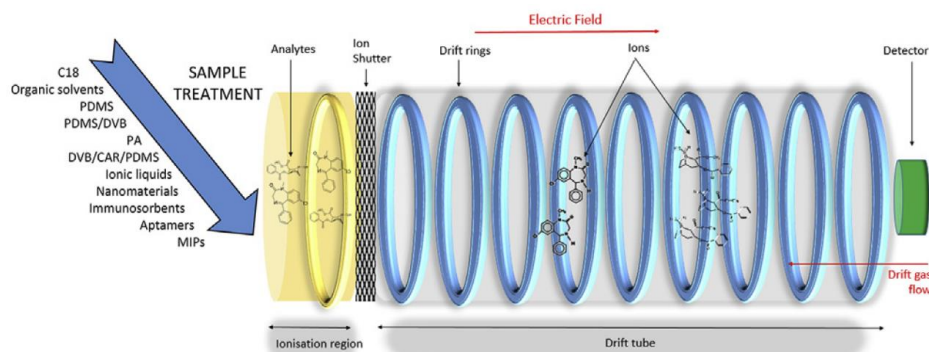
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

NMR heeft meerwaarde voor identificatie van stoffen; ion mobility spectroscopy heeft dat mogelijk in de toekomst ook

Auteur(s): Erik Emke, Ton van Leerdam, Dennis Vughs, Pim de Voogt, Andrea Brunner, Patrick S. Bäuerlein

Het BTO verkent voor de watersector de ontwikkelingen in instrumentele detectie- en identificatietechnieken om tijdig de mogelijk toegevoegde waarde in beeld te hebben. In dit kader zijn twee technieken onderzocht die in gebruik met hoge resolutie massaspectrometrie (HR-MS) aanvullende informatie geven m.b.t. de identificatie van onbekende chemische stoffen: (i) Ion Mobility Spectroscopy (IMS) en (ii) Nuclear Magnetic Resonance (NMR). De meerwaarde van de inzet van NMR is in dit onderzoek bevestigd: de techniek levert waardevolle aanvullende structuurinformatie op. Omdat NMR-apparatuur kostbaar en specialistisch is, wordt aanbevolen om in de toekomst de huidige samenwerking met de WUR verder uit te bouwen en de procedure van monsternamen tot analyse en interpretatie verder te optimaliseren. Zo kan een identificatie van een onbekende stof zo efficiënt en snel mogelijk worden uitgevoerd. De huidige stand van de IMS-techniek in combinatie met HR-MS levert slechts weinig aanvullende informatie, maar verdere ontwikkeling van de techniek en databases kan in de toekomst wel zinvolle aanvulling opleveren. Het onderzoek is uitgevoerd met monsters Maaswater, waarin gepoogd is vijf onbekende stoffen te identificeren.



Ion mobility spectroscopy biedt nu nog geen zinvolle aanvulling voor identificatie van onbekende stoffen in oppervlaktewater

Belang: op de hoogte blijven van (instrumentele) ontwikkelingen

De wereld om ons heen is sterk in beweging en er worden regelmatig nieuwe technieken geïntroduceerd. Door (instrumentele) detectietechnieken te blijven verkennen, kan hun mogelijke toegevoegde waarde voor de watersector tijdig in beeld worden gebracht. Daarom volgen

BTO-onderzoekers sinds 2015 de ontwikkelingen op het gebied van analytische chemie.

Aanpak: scouten nieuwe technieken

Binnen dit project zijn twee analytische technieken verkend die in combinatie met hoge resolutie massaspectrometrie (HR-MS) aanvullende informatie kunnen geven voor de identificatie van onbekende chemische stoffen: (i) Ion Mobility Spectroscopy (IMS) en (ii) Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Deze technieken zijn voor de

start van het project in overleg met vertegenwoordigers van de watersector gekozen voor een nadere verkenning. Voor het onderzoek zijn twee Maaswatermonsters gebruikt. Gepoogd is met de nieuwe en gebruikelijke technieken de identiteit van 5 onbekende stoffen te achterhalen.

Resultaten: NMR heeft meerwaarde, IMS mogelijk in de toekomst

In dit onderzoek is geprobeerd om van in totaal vijf onbekende stoffen de identiteit vast te stellen door de verkregen gegevens van beide technieken te combineren. Eén onbekende stof kon met een hoge mate van waarschijnlijkheid worden geïdentificeerd als desamino-metamitron. Voor de vier andere stoffen kon een voorstel voor de chemische structuur worden gedaan.

Bij de huidige stand van de IMS-techniek levert deze in combinatie met HR-MS maar weinig aanvullende informatie. Het is wel te verwachten dat door verdere ontwikkeling van IMS en daarbij behorende databases in de komende jaren de techniek een nuttige aanvulling kan zijn op het instrumentarium en de workflows die gebruikt worden om de identiteit van onbekende stoffen op te helderen in de watersector. Van NMR is al jaren bekend dat de techniek aanvullende structuurinformatie oplevert, dit is ook in dit onderzoek bevestigd.

Implementatie: samenwerking op het gebied van NMR verder uitbouwen

NMR apparatuur is te duur en te specialistisch om binnen de watersector aan te schaffen. Daarom wordt aanbevolen om in de toekomst de huidige samenwerking met de WUR verder uit te bouwen en de procedure van monsternamen tot analyse en interpretatie verder te optimaliseren. Zo kan het identificatieproces van een onbekende stof met een zo kort mogelijke doorlooptijd worden uitgevoerd.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Nieuwe Chemische Meetmethoden* (BTO 2019-29).

Inhoud

1	Introductie	4
2	Monsterkeuze en isolatie	6
2.1	Monsterkeuze	6
2.2	Extractie van de monsters	6
3	Analyse met LC-HRMS	8
3.1	Opzet en analysecondities	8
3.2	Resultaten LC-HRMS: Identificatie referentie en onbekende stoffen	9
3.3	Conclusie	13
4	Ion Mobility Spectrometry	14
4.1	Inleiding	14
4.2	Toepassingen IMS relevant voor KWR en/of Waterbedrijven	16
4.3	Opzet experimenten	17
4.4	Uitvoering van de metingen	17
4.5	Resultaten	17
5	Nuclear Magnetic Resonance	25
5.1	Inleiding	25
5.2	Uitvoering NMR analyse	26
5.3	Identificatie onbekende stoffen met NMR	27
5.4	Conclusie	29
6	Toegevoegde waarde van de twee onderzochte technieken	30
6.1	Inleiding	30
6.2	Onbekende stof 1	30
6.3	Onbekende stof 2	30
6.4	Onbekende stof 3	31
6.5	Onbekende stof 4	31
6.6	Onbekende stof 5 (LC-Aqua 440)	32
7	Conclusie en aanbevelingen	33
8	Literatuur	34
	Bijlage I met LC-UV gemeten stoffen in de Maas bij Keizersveer en Heel in 2017.	36
	Bijlage II Opwerking Maaswater voor LC-HRMS en NMR analyse	39
	Bijlage III Analyse condities extract maaswater	40

Bijlage IV : MS2-spectra van de onbekende stoffen in monster 1	41
Bijlage V rapportage identificatie van onbekende stof in monster 2 door Aqualab Zuid	46
Bijlage VI Resultaten IMS monster 1	51
Bijlage VII verslag EMCOM 2018 congres	56
Bijlage VIII NMR-meetgegevens	57

1 Introductie

In 2015 is voor de eerste keer het project Scouten Nieuwe Analytische Technieken uitgevoerd. Doel van dit project was het verkennen van de (instrumentele) ontwikkelingen op het gebied van analytische chemie. Tijdens de workshop waarmee het project werd afgesloten is benadrukt dat het verkennen van nieuwe meetmethodes cruciaal is voor de waterbedrijven. Om deze reden is vervolgens besloten om in de periode 2016-2017 binnen het BTO project Massa Spectrometrie (MS) de nieuwste MS-technieken te verkennen. Omdat naast MS nog andere analytische technieken bestaan en ook de MS technieken steeds verder worden ontwikkeld, is de beslissing genomen om ook in 2018 weer de ontwikkelingen op het gebied van analytische chemie in de gaten te houden.

Binnen dit project zijn twee technieken verkend: (i) Ion Mobility Spectrometry (IMS) en Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Beide technieken zijn complementaire methoden m.b.t. massaspectrometrie en kunnen nuttig zijn om onbekende verbindingen te identificeren. Twee andere veelbelovende MS-ionisatietechnieken, SAWN en DART, zijn reeds uitgezocht in het project MSII (400554/179/002).

IMS [1] is een analytische techniek om chemische componenten te scheiden en te identificeren op basis van hun migratiesnelheid als ionen in gasfase. In 2011 heeft KWR een eerste verkenning van de IMS-technologie onderzocht [2]. De conclusie van deze verkenning was dat met de IMS apparatuur meestal een "schoner" spectrum werd gevonden (i.e., met een duidelijker base piek en minder ruis) maar dat leverde voor de identificatie van een onbekende stof toen geen extra informatie op. Inmiddels kan zo'n schoner spectrum helpen bij verdere identificatie van onbekende stoffen, omdat het signaal van een onbekende stof goed van de matrixsignalen kan worden gescheiden. Verder geeft deze techniek inzicht in fragmentatieprocessen en laat het zien of er in een molecuul meerdere protoneringsplaatsen bestaan. Deze informatie kan worden gebruikt om de structuur van een molecuul op te helderen. IMS kan in sommige gevallen aan bestaande massaspectrometers worden gekoppeld. Het is dus niet altijd nodig om een heel nieuw systeem (IMS + MS) te kopen.

Uit voorgaand BTO onderzoek [2] is gebleken dat NMR naast massaspectrometrie één van de krachtigste identificatie technieken is voor de ondubbelzinnige identificatie van onbekende organische verbindingen. NMR is ook gekozen omdat één van de concrete aanbevelingen van de eerdergenoemde BTO-workshop was de potentiële betekenis van NMR voor identificatiedoelinden verder te onderzoeken. De combinatie van HRMS en NMR in een samenwerking van KWR en WUR op dit gebied heeft bv. geleid tot de ondubbelzinnige identificatie van componenten van onbekende industriële mengsels in de Maas [3]. NMR is succesvol toegepast bij de karakterisering van NOM in drinkwater [4] en bij non target analyse van grondwater [5]. Om deze reden is besloten om deze techniek verder te verkennen.

Zowel IMS als NMR zijn veelbelovende technieken voor de structuuropheldering/identificatie van onbekende verbindingen in water. Om de identificatiemogelijkheden van deze technieken zo goed mogelijk te kunnen onderzoeken is ervoor gekozen om deze te vergelijken met de identificatiemogelijkheden van LC-HRMS, waarmee in eerdere onderzoeken al veel onbekende verbindingen in water zijn geïdentificeerd [6-8]. De experimenten met IMS zijn uitgevoerd op het laboratorium van de *Universitat Jaume I* in

Castellon de la Plana in Spanje, de NMR analyses zijn uitgevoerd door Wageningen University & Research (WUR).

Om de drie technieken goed met elkaar te kunnen vergelijken en de mogelijkheden alsook de meerwaarde van NMR en IMS vast te stellen, is een selectie gemaakt van onbekende verbindingen in praktijkwater. Hiervoor zijn twee monsters Maaswater gebruikt, omdat van dit water bekend is dat er onbekende verbindingen in aanwezig zijn. Monster één is afkomstig van Roosteren d.d. 11 juni 2018: een willekeurig monster oppervlaktewater met onbekende stoffen. Op verzoek van WML is er op een later tijdstip in het onderzoek ook een tweede monster in bewerking genomen (combinatie van Maaswater Roosteren en afvalwater nabij Roosteren) voor de identificatie van LCAqua-440, een onbekende verbinding gedetecteerd met LC-UV fingerprint van Aqualab Zuid, die tot op heden nog steeds niet geïdentificeerd is.

In hoofdstuk 2 wordt zowel de selectie van de twee monsters alsook de opwerking van de monsters en de selectie van de onbekende verbindingen beschreven. In hoofdstuk 3 wordt de analyse en identificatie met behulp van LC-HRMS beschreven. In hoofdstuk 4 en 5 wordt de toegevoegde waarde bij de identificatie van deze verbindingen met respectievelijk IMS en NMR besproken. In hoofdstuk 6 worden de toegevoegde waarde van de twee onderzochte technieken t.o.v. LC-HRMS summier beschreven. Het rapport sluit af met conclusies en aanbevelingen (hoofdstuk 7).

In de bijlage is verder nog een kort verslag van het EMCOM congres 2018 in Oslo te vinden. Deze conferentie werd bezocht om actuele ontwikkelingen op het gebied van de analytische chemie bij te houden, met andere wetenschappers te praten en om BTO werk te presenteren.

2 Monsterkeuze en isolatie

2.1 Monsterkeuze

Om de twee technieken (IMS en NMR) te testen met praktijkmonsters zijn twee monsters Maaswater gebruikt, omdat van dit water bekend is dat er verschillende nog onbekende verbindingen in aanwezig zijn. Zo is in Bijlage I een overzicht opgenomen van met LC-UV gemeten stoffen in de Maas bij Keizersveer en Heel in 2017. Hieruit blijkt dat de hoogst gemeten gemiddelde concentratie van een onbekende stof over het gehele jaar 1,53 µg/L is (LCAqua-299). Monster één is afkomstig van Roosteren dd. 11 juni 2018, dit is een willekeurig monster van oppervlaktewater met daarin onbekende stoffen. Op verzoek van WML is er op een later tijdstip in het onderzoek ook een tweede monster in bewerking genomen (combinatie van Maaswater Roosteren en afvalwater nabij Roosteren) voor de identificatie van LCAqua-440.

Voor de identificatie van een onbekende verbinding met NMR is een forse concentreringsstap vaak een vereiste. Voor de identificatie met LC-HRMS en IMS is vaak 10 – 100 pg absoluut van de onbekende stof al ruim voldoende om goede MS¹ en MS² spectra te verkrijgen. Wageningen University & Research (WUR) waar de NMR analyses zijn uitgevoerd, heeft echter aangegeven dat 2 – 10 µg (absoluut) van een onbekende verbinding nodig is om een goed NMR spectrum te verkrijgen. Daarom is voorafgaande aan de analyse met IMS en NMR een forse concentreringsstap uitgevoerd, zie hiervoor de volgende paragraaf.

2.2 Extractie van de monsters

Om aan de absolute hoeveelheden voor de NMR analyse te voldoen, is er 50 liter Maaswater met solid phase extractie (SPE) in bewerking genomen voor monster 1.

2.2.1 Monster 1

Een uitgebreide beschrijving van de opwerking van het monster Maaswater Roosteren (monster 1) is opgenomen in Bijlage II. In het kort: 50 liter Maaswater Roosteren dd. 11 juni 2018 is in porties van 2 L over SPE kolommetjes van Oasis-HLB geleid. De cartridges zijn vervolgens geëluëerd met acetonitril en samengevoegd tot één extract. Dit extract is ingedampt tot 3 mL zodat een concentreringsfactor van 16.666x is verkregen. Van dit extract is 2 mL verstuurd naar de WUR voor NMR-onderzoek. Het overgebleven 1 mL extract is gebruikt voor de LC-HRMS en IMS analyse. Voor de LC-HR-MS analyse is het extract 50, 500 en 5000x verdund voor de analyse.

2.2.2 Monster 2

Al in de zomer van 2015, gelijktijdig met het vinden van pyrazool in het effluent van Sitech, werd ook LCAqua-440 in dit effluent en in het Maaswater aangetroffen. Destijds is door KWR en RWS de exacte massa van 205,13316 voor het geprotoneerde molecuul gevonden. De meest waarschijnlijke brutoformule is destijds ook berekend, namelijk als C₁₂H₁₆N₂O. Verdere identificatie is niet gelukt vanwege de grote hoeveelheid mogelijkheden voor deze bruto formule. In de periode december 2016 - januari 2017 werd LCAqua-440 opnieuw geregeld gevonden in het Maaswater bij Roosteren en Heel. De vraag naar identificatie nam hierdoor toe.

Monster 2 is samengesteld uit 5 deelmonsters met een afzonderlijke volume van 400-500 mL. Het betreft 2 monsters Maaswater die op verschillende punten nabij Roosteren zijn

genomen en 3 monsters afvalwater afkomstig van een industriële afvalwaterzuiveringsinstallatie (IAZI). Het totale volume van het samengestelde monster is 2,3 liter. Er is bewust gekozen voor IAZI effluent omdat hierin de concentratie van LCAqua-440 relatief hoog is. Dit monster is alleen gemeten met NMR, de LC-HRMS analyse is al eerder uitgevoerd door Aqualab Zuid.

3 Analyse met LC-HRMS

3.1 Opzet en analysecondities

De LC-HRMS analyse van monster 1 is uitgevoerd bij KWR volgens de non-target screeningsmethode (LOA-600) met de Orbitrap Fusion. De analyse is in de positieve mode uitgevoerd en opgenomen met een resolutie van 120.000 en 240.000 FWHM (m/z 200). Hierbij is bewust ervoor gekozen om het monster ook op een zeer hoge resolutie van 240.000 FWHM te op nemen, om zo ook de isotope fijnstructuur (^{15}N , ^{33}S , ^{18}O en $^{13}\text{C}_2$) optimaal te kunnen gebruiken bij het bepalen van de brutoformule. Bij een resolutie van 120.000 FWHM worden bij iedere full scan de acht meest intense ionen (m.u.v. achtergrond ionen) gebruikt voor MS^2 fragmentatie (HCD 35). Een samenvatting van deze methode is opgenomen in Bijlage III.

In de oorspronkelijke opzet van dit onderzoek was het de bedoeling om twee onbekende stoffen te identificeren die zijn gemeten met de LC-fingerprint methode van Aqualab Zuid (de zogenaamde LCAqua stoffen), bijvoorbeeld LCAqua-057 ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$) en LCAqua-469 (geen bruto formule). In Bijlage I zijn de gemeten stoffen in de Maas bij Keizersveer en Heel in 2017 opgenomen. Echter na analyse door Aqualab Zuid met de reguliere LC-UV fingerprint methode die dagelijks wordt uitgevoerd, bleken er geen stoffen (zoals LCAqua-057 en LCAqua-469) aanwezig te zijn met een concentratie van 0,5 $\mu\text{g/L}$ of hoger. In voorgaande weken waren er wel diverse stoffen aanwezig met een concentratie hoger dan 0,5 $\mu\text{g/L}$, maar door een lange regenperiode met als gevolg een hoge afvoer zijn de stoffen zeer waarschijnlijk verdund tot een concentratie onder de 0,5 $\mu\text{g/L}$. Hierop is besloten om vier onbekende stoffen met de hoogste intensiteit die niet in de blanco aanwezig waren, die niet eerder in blanco monsters zijn aangetoond, en die niet in de KWR bibliotheek vermeld staan, te selecteren voor nadere identificatie. In Tabel 1 zijn de accurate massa en de retentietijd van het geprotoneerde molecuul van de vier stoffen opgenomen. Daarnaast zijn er ook nog twee bekende stoffen die in het Maaswater aanwezig waren geselecteerd (1-H-benzotriazool en terbutylazin). Deze worden als controle meegenomen voor de identificatieprocedure met massaspectrometrie, IMS en NMR.

<i>Stoffen</i>	<i>[M+H]⁺</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Stofnaam</i>	<i>Cas nr</i>
Referentiestoffen				
Referentiestof 1	120,0554	7,92	1-H-benzotriazool	95-14-7
Referentiestof 2	230,1163	16,86	Terbutylazin	5915-41-3
Onbekende stoffen				
Onbekende stof 1	188,0817	8,69	onbekende stof	nvt
Onbekende stof 2	274,2008	10,81	onbekende stof	nvt
Onbekende stof 3	209,1534	16,47	onbekende stof	nvt
Onbekende stof 4	372,1861	7,22	onbekende stof	nvt

TABEL 1: TE IDENTIFICEREN ONBEKENDE STOFFEN IN MONSTER 1 (MAASWATER ROOSTEREN DD 11-6-2018) INCLUSIEF 2 REFERENTIESTOFFEN

3.2 Resultaten LC-HRMS: Identificatie referentie en onbekende stoffen

De identificatie van de vier onbekende verbindingen is uitgevoerd aan de hand van de identificatieworkflow die ontwikkeld is in voorgaand BTO onderzoek [6]. Hierbij is eerst gezocht in online MS² bibliotheken zoals mzCloud [7] en MassBank [8]. Wanneer hierbij geen goede match/kandidaat werd gevonden is vervolgens de brutoformule vastgesteld aan de hand van het isotopenpatroon, de isotoop fijnstructuur, en aanwezige fragmenten in het MS² spectrum. Vervolgens is er gezocht in suspect lijsten zoals de Norman SusDat suspectlijst, waarin veel milieurelevante verbindingen staan. Aansluitend is gezocht in online stoffenbanken zoals Chemspider [9], PubChem [10] en EPA CompTox Chemicals Dashboard [11]. Wanneer dit niet tot een potentiële kandidaat leidde, is er vervolgens gebruikt gemaakt van in silico fragmentatie tools zoals, MetFrag [12], MS-Finder [13] en Sirius [14]. Met behulp van in silico fragmentatie wordt het MS² spectrum van de onbekende verbinding vergeleken met het theoretische fragmentatiespectrum van een groot aantal referentiestoffen (deze worden vaak uit PubChem of ChemSpider gehaald, dat gebaseerd is op bestaande fragmentatiepatronen en op regels gebaseerde voorspellingen. Wanneer dit leidt tot een goede match kan de betreffende stof worden aangeschaft voor ondubbelzinnige identificatie. Wanneer er na deze stappen geen goede kandidaat werd gevonden, werd de identificatiepoging gestaakt.

3.2.1 Identificatie monster 1

Eerst is de workflow getoetst door de identificatie van de referentiestoffen. Aansluitend is getracht de vier onbekende verbindingen te identificeren. In de onderstaande tabel staan de globale massaspectrometrische identificatiegegevens weergegeven.

Stof no.	[M+H] ⁺	Meest waarschijnlijke brutoformule	Massa afwijking (ppm)	Aantal DBE	Productionen (2 meest intense)
Onbekende stof 1	188,0817	C ₁₀ H ₁₉ N ₃ O	-0,7	7,5	160,0867 (100%) 119,0602 (35%)
Onbekende stof 2	274,2008	C ₁₄ H ₂₇ NO ₄	-1,8	1,5	116,0704 (100%) 102,0548 (50%)
Onbekende stof 3	209,1534	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	-1,0	3,5	125,0959 (100%) 151,1115 (75%)
Onbekende stof 4	355,1596	C ₁₄ H ₂₆ O ₁₀	-0,9	1,5	103,0389 (100%) 87,04396 (15%)
Referentie stof 1 (1-H-benzotriazool)	120,0554	C ₆ H ₅ N ₃	-0,2	5,5	120,0554 (100%) 65,0385 (85%)
Referentie stof 2 (Terbutylazine)	230,1163	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	-1,7	3,5	174,0538 (100%) 132,0321 (15%)

TABEL 2: MS IDENTIFICATIEGEGEVENS INCLUSIEF MEEST WAARSCHIJNLIJKE BRUTOFORMULE VAN DE 4 ONBEKENDE EN 2 BEKENDE STOFFEN IN MONSTER 1. DBE = DUBBLE BINDINGEN BEREKEND MET XCALIBUR (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

3.2.1.1 Identificatie referentiestof 1

Referentiestof 1 is direct geïdentificeerd doormiddel van een match van het MS² spectrum met de mzCloud en de Massbank bibliotheek. Het MS² spectrum van referentiestof 1 komt voor 99,4% overeen met het MS² Spectrum van 1H-benzotriazool. Hiermee is referentiestof 1 geïdentificeerd als 1H-benzotriazool. Zie Bijlage IV, voor het chromatogram, massaspectrum en mzCloud match van 1H-benzotriazool.

3.2.1.2 Identificatie referentiestof 2

Referentiestof 2 is ook direct geïdentificeerd doormiddel van een match van het MS² spectrum met de mzCloud en de Massbank bibliotheek. Het MS² spectrum van referentiestof 2 komt voor 99.7% overeen met het MS² Spectrum van terbutylazine. Hiermee is referentiestof 1 geïdentificeerd als terbutylazine. Zie Bijlage IV, voor het chromatogram, massaspectrum en mzCloud match van terbutylazine.

3.2.1.3 Onbekende stof 1

De accurate massa van onbekende stof 1 stond niet in de in-house KWR database, maar werd direct geïdentificeerd door middel van een match van het MS² spectrum met de mzCloud en de Massbank bibliotheek. Het MS² spectrum van onbekende stof 1 komt voor 96.5% overeen met het MS² Spectrum van desaminometamitron. Hiermee is referentiestof 1 geïdentificeerd als desaminometamitron. Zie Bijlage IV, voor het chromatogram, massaspectrum en mzCloud match van desaminometamitron.

3.2.1.4 Onbekende stof 2

Voor onbekende stof 2 werd er geen match gevonden in de mzCloud en MassBank bibliotheek. Vervolgens is de brutoformule aan de hand van het isotopenpatroon en de isotopenfijnstructuur vastgesteld op C₁₄H₂₇NO₄. In PubChem en ChemSpider zijn respectievelijk 2508 en 1604 mogelijke kandidaatstoffen gevonden voor deze brutoformule. Bij deze lijst van stoffen zaten geen bekende stoffen met veel referenties (bijv. Pubmed). De logP van de verbinding is geschat op basis van de retentietijd en is circa 1,4. Het aantal dubbele bindingen is 1,5 (DBE). Gezien het massaspectrum (C₄H₈ en C₅H₁₀ fragmenten) en de DBE van 1,5 gaat het hier om een alifatische structuur met waarschijnlijk een alkaandeel.

Vervolgens zijn er twee in silico fragmentatietools (MetFrag en Sirius) gebruikt voor mogelijke kandidaatselectie. De resultaten van de in silico fragmentatie staan weergegeven in Tabel 3.

Ranking	Score*	Stofnaam	Cas nr	logP
Metfrag				
1	1.64	9-((tert-Butoxycarbonyl)amino)nonanoic acid	173435-78-4	3,26
2	1.37	3-(((tert-butoxy)carbonyl)amino)nonanoic acid	1335042-20-0	3,93
3	1.34	2,2'-(Decylimino)diacetic acid	-	3,87
Sirius				
1	-132.8	(2~(S))-2-amino-4-decoxy-4-oxobutanoic acid	-	1,38
2	-133.7	2-amino-5-nonan-5-yloxy-5-oxopentanoic acid	-	0,85
3	-145.0	2-amino-5-nonoxy-5-oxopentanoic acid	-	1.17

* Elke tool hanteert een eigen score systematiek.

TABEL 3: RESULTATEN IN SILICO FRAGMENTATIE METFRAG EN SIRIUS VOOR ONBEKENDE STOF 2

De met de in silico fragmentatietools gevonden kandidaten bieden weinig mogelijkheden op een succesvolle identificatie. Van de nr 1 kandidaat van MetFrag komt het theoretische MS² spectrum goed overeen met dat van de onbekende verbinding en de stof is daarbij ook verkrijgbaar als standaard. Echter komt de logP (3,26) van deze verbinding maar matig overeen met de geschatte logP waarde (1,4) van de onbekende verbinding. De top 3 kandidaten met Sirius hebben relatief lage scores en zijn daarbij niet verkrijgbaar als standaard. De in silico fragmentatie heeft niet geleid tot goede kandidaten voor een mogelijke identificatie.

3.2.1.5 Onbekende stof 3

Voor onbekende stof 3 werd er geen match gevonden in de mzCloud en MassBank bibliotheek. De brutoformule voor onbekende stof 3 is vastgesteld op $C_{13}H_{20}O_2$. Dit is een veel voorkomende brutoformule met 7056 en 3169 mogelijke kandidaatstoffen in Pubchem en ChemSpider. De logP van de verbinding is circa 2,9 en de stof heeft een DBE van 3,5. Zeer waarschijnlijk is er ook een structuurisomeer van de stof aanwezig in het Maas monster. Op retentietijd 15,34 min is ook een stof aanwezig met dezelfde accurate massa en overeenkomend MS^2 spectrum.

Om het aantal kandidaten te reduceren is er in silico fragmentatie toegepast. De resultaten hiervan staan weergegeven in Tabel 4.

Ranking	Score*	Stofnaam	Cas nr	logP
Metfrag				
1	1,56	Carvyl propionaat	97-45-0	4,05
2	1,51	nopyl acetaat	128-51-8	3,99
3	1,44	3-(2-(3,3-Dimethyloxiranyl)ethyl)cyclohex-3-ene-1-carbaldehyde	4365-31-5	2,25
Sirius				
1	-100,7	3,5,5-Trimethyl-4-(3-oxobutyl)cyclohex-2-en-1-one	74233-41-3	2,00
2	-103,2	5,5-dimethyl-3-(4-oxopentyl)cyclohex-2-en-1-one	-	1,99
3	-108,5	(2~(S),5~(R))-2,6,6,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-9-en-8-one	-	1,55

* Elke tool hanteert een eigen score systematiek.

TABEL 4: RESULTATEN IN SILICO FRAGMENTATIE METFRAG EN SIRIUS VOOR ONBEKENDE STOF 3

De top twee kandidaten met Metfrag zijn beide amide verbindingen welke in de positieve mode kunnen ioniseren. Beide zijn verkrijgbaar als standaard. De met Sirius gevonden kandidaten zijn vrij onbekende stoffen. De beschikbare gegevens van deze stoffen zijn vrij summier en de stoffen zijn daarnaast ook niet te verkrijgen.

Gezien het grote aantal kandidaatstoffen in de diverse bibliotheken is de kans op een succesvolle identificatie gering. Van de 50 hoogst scorende kandidaatstoffen met Metfrag, kunnen minimaal 18 van de 21 aanwezige fragment ionen in het MS^2 spectrum van onbekende stof 3 verklaard worden. Hierdoor liggen de scores van de top 50 stoffen erg dicht bij elkaar en dat maakt de kans dat de juiste stof in Tabel 4 staat gering.

3.2.1.6 Onbekende stof 4

Voor onbekende stof 4 werd er geen match gevonden in de mzCloud en MassBank bibliotheek. De brutoformule voor onbekende stof 3 is vastgesteld op $C_{14}H_{26}O_{10}$. In PubChem en ChemSpider zijn respectievelijk 40 en 32 mogelijke kandidaatstoffen gevonden voor deze brutoformule. Bij deze lijst van stoffen zaten geen bekende stoffen met veel referenties (bijv. Pubmed). De logP van de verbinding is circa 0,51 en de stof heeft een DBE van 1,5. Vervolgens zijn in silico fragmentatie tools gebruikt om het theoretische MS^2 spectrum van de kandidaatstoffen te matchen met die van de onbekende stof. De resultaten hiervan staan in Tabel 5.

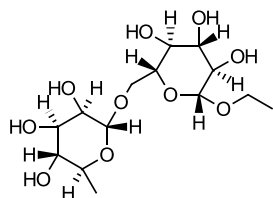
Ranking	Score*	Stofnaam	Cas nr	logP
Metfrag				
1	2,77	4,7,10,13-Tetraoxahexadecane-1,16-diyl bis(waterstof carbonaat)	31127-85-2	-1,00
2	2,76	Propyl 2-O-beta-D-xylopyranosyl-beta-D-glucopyranoside	-	1,02
3	2,59	Ethyl rutinoside	187539-57-7	0,21
Sirius				
1	-101,2	(2~(S),3~(R),4~(S),5~(S),6~(R))-2-[(2~(S),3~(S),4~(R),5~(R))-6-hydroxy-4,5-dimethoxy-2-methyloxan-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	-	-2,35
2	-102,9	2-[2-ethoxy-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	-	-2,12
3	-104,5	Ethyl rutinoside	187539-57-7	0,21

* Elke tool hanteert een eigen score systematiek.

TABEL 5: RESULTATEN IN SILICO FRAGMENTATIE METFRAG EN SIRIUS VOOR ONBEKENDE STOF 4

De best scorende kandidaten met in silico fragmentatie zijn hoofdzakelijk disachariden en/of glycoside-achtige verbindingen. Alleen 4,7,10,13-Tetraoxahexadecaan-1,16-diyl bis(waterstof carbonaat) is een wezenlijk andere type verbinding (di-zuur met meerdere ether groepen). Het is zeer waarschijnlijk dat het om een dissacharide- en/of glycoside-achtige verbinding gaat gezien het MS² spectrum, de hoeveelheid aanwezige zuurstof atomen en het voorkomen van deze verbindingen in natuurlijk organisch materiaal.

Omdat er veel structuurisomeren bij deze verbinding mogelijk zijn, is de kans op een succesvolle identificatie gering. Een mogelijke kandidaat, die met beide in silico fragmentatie tools hoog scoort, is ethyl rutinoside (zie Figuur 1).



FIGUUR 1: STRUCTUUR VAN ETHYL RUTINOSIDE; MOGELIJKE KANDIDAAT VOOR ONBEKENDE STOF 4

3.2.2 Identificatie LCAqua-440 in monster 2

De identificatie van LC-Aqua-440 in Maaswater met behulp van massaspectrometrie is uitgevoerd door Aqualab Zuid (zie Bijlage V). Op basis van de accurate massa is door Aqualab Zuid de meest waarschijnlijke brutoformule vastgesteld als C₁₂H₁₆N₂O; deze brutoformule wordt ook bevestigd door de brutoformules van de productionen (150,0788 (100%) en 163,0864 (25%)). Het aantal DBE is 5,5 wat wijst op een aromatische structuur.

De identiteit van LCAqua-440 is tot op heden nog niet achterhaald met behulp van massaspectrometrie. Deze onbekende stof is hierdoor een prima kandidaat voor structuuropheldering met behulp van NMR. Zie hiervoor Hoofdstuk 5.

3.3 Conclusie

Met LC-HRMS zijn de twee referentiestoffen in het Maaswater eenvoudig geïdentificeerd doormiddel van de mzCloud bibliotheek als 1-H-benzotriazool en terbutylazine. Van de vier onbekende verbindingen in het Maaswater is alleen onbekende stof 1 geïdentificeerd. De identiteit van onbekende stof 1 is desamino metamitron. De onbekende stoffen 2 en 3 konden niet worden geïdentificeerd met behulp van bibliotheken noch met in silico fragmentatietools. Voor de vastgestelde brutoformules van beide stoffen zijn veel verschillende structuurformules mogelijk, waardoor er te veel goed scorende kandidaten zijn met in silico fragmentatie. Onbekende stof 4 is hoogstwaarschijnlijk een dissacharide en/of glycoside achtige verbinding (zoals ethyl rutinoside). Omdat er veel verschillende structuurisomeren mogelijk zijn, is kans op een definitieve identificatie gering.

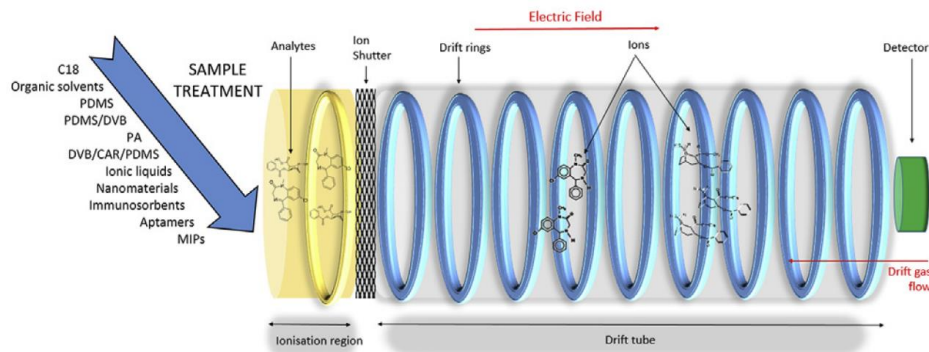
Met behulp van LC-HRMS is het mogelijk gebleken om één van de vier onbekende stoffen in Maaswater te identificeren. Van één stof zijn sterke aanwijzingen om wat voor type verbinding gaat, en is er ook een mogelijke kandidaat vastgesteld. De identificatie voor de overige twee onbekende stoffen is niet gelukt. Echter, het identificatieonderzoek met LC-HRMS zou eventueel nog verder kunnen worden voortgezet, door middel van het opnemen van een "ion-tree" en van additionele MS² spectra bij verschillende botsingsenergieën. Dit zou mogelijk nieuwe aanknopingspunten kunnen geven voor verdere identificatie.

4 Ion Mobility Spectrometry

4.1 Inleiding

IMS technieken zijn opnieuw in de belangstelling gekomen omdat er nieuwe instrumentatie voor beschikbaar is, waardoor de techniek in combinatie met MS kan worden gebruikt. Het belangrijkste voordeel van de koppeling IM-MS is dat IMS isomeren van dezelfde chemische structuur kan scheiden, die vervolgens door de massaspectrometer geïdentificeerd kunnen worden.

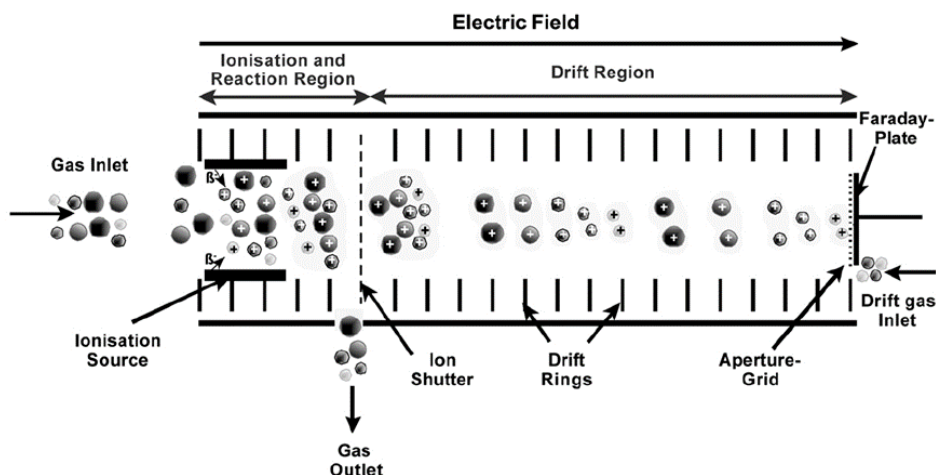
Oorspronkelijk was de bepaling via IMS beperkt tot die van kleine ionen en moleculen, Tegenwoordig kan de methode gezien worden als een meer algemeen toepasbare methodiek waarvan het succes vooral afhangt van de methoden waarmee monstercomponenten geïoniseerd worden.



Figuur 2: Schematische weergave drift cell

Ion Mobility spectrometry (IMS) is een techniek die in staat is onder atmosferische druk ionen in de gasfase te scheiden. Ionen stromen hiervoor door een zo genoemde *drift cell* (zie Figuur 2) waarin ionen op basis van lading, ruimtelijke structuur en grootte worden gescheiden. De scheiding is hiermee afhankelijk van een aangebracht elektrisch veld en de hoeveelheid botsingen van het ion met de neutrale drift gas moleculen (zie Figuur 3). De tijd die een ion nodig heeft om zich door een IM drift cell te bewegen verschaft informatie over de structuur van het ion.

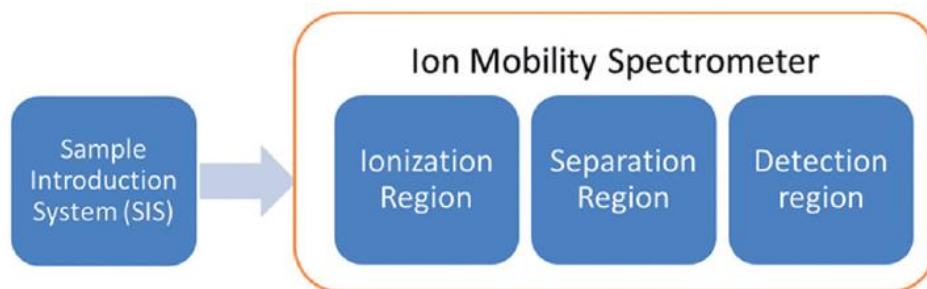
Na de scheiding in de drift cell worden de ionen gedetecteerd (Figuur 4). Er bestaan acht typen IMS instrumenten (voor een overzicht, zie Cumeras et al. [15]), die alle gebruik maken van hetzelfde principe: gas-fase ionen worden van elkaar gescheiden door een elektrisch veld in de aanwezigheid van een driftgas. De meest gebruikte driftgassen zijn helium en stikstof.



FIGUUR 3: SCHEMATISCH DIAGRAM VAN HET SCHEIDINGSMECHANISME IN IMS (BRON: [16])

IM-technieken kunnen onderverdeeld worden in dispersieve selectieve technieken afhankelijk van of deze alle 'mobilities' doorlaten voor verdere analyse via MS, dan wel voorafgaande aan analyse ionen selecteren op grond van mobiliteit of een daaraan rechtstreeks gerelateerde eigenschap [1]. De meest gebruikte eigenschap is de collision cross section (CCS). De CCS is kleiner voor meer compacte (meer bolvormige) dan voor langgerekte moleculen (bv. planaire moleculen, lange ketens, helices, enz.) en verschaft dus inzicht in de vorm van het molecuul. Naast informatie over de vorm van een bepaald molecuul kan IMS mengsels van isobare (en dus isomere) ionen scheiden op basis van molecuulvorm. Een van de meest krachtige eigenschappen van deze technologie is dat deze informatie over de drie-dimensionale structuur van ionen oplevert. CCS-waarden hangen af van de aard van zowel het gebruikte driftgas als het draaggas (in GC) of de loopvloeistof (in LC).

De koppelingstechnieken waarbij IMS wordt gebruikt zijn onder te verdelen ([17]) in: (1) scheiding van monstercomponenten direct vóór de ingang van de massaspectrometer die als detector wordt gebruikt, en (2) bevestiging van de identiteit van de ionen waarbij IMS fungeert als een voorfilter voor MS systemen.



FIGUUR 4: SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DE COMPONENTEN VAN IMS

IMS kent een aantal nadelen, zoals niet-lineaire responsies, beperkte selectiviteit, en het voorkomen van potentiële interacties van de reactant-ionen met componenten uit het monster [16]. Meestal wordt de selectiviteit in IMS verhoogd door het monster voor te behandelen met bv. SPE of SPME maar een verbetering kan ook worden bereikt door koppeling met GC of LC voorafgaand aan de monsterintroductie of door introductie van een 'dopant gas' in de ionisatiekamer [10]. Het gebruik van zo'n dopant levert een aantal

voordelen zoals: i) verwijdering van achtergrondinterferenties; ii) het ladingsreservoir bestaat uit niet meer dan één reactant ion, en iii) de interpretatie van het IMS spectrum wordt eenvoudiger. De toename van de selectiviteit wordt bereikt doordat alleen ionisatie optreedt in moleculen met een protonaffiniteit (in positieve mode) of electronegativiteit (in negatieve mode) groter dan die van het dopant gas.

Structuurkarakterisatie m.b.v. IM-MS geschiedt op basis van meting van experimentele CCS-waarden, moleculaire modellering, en theoretische CCS berekeningen als resultaat van zulke modellen. In een typische procedure voor het afleiden van de CCS wordt eerst door moleculaire modellering een groot aantal kandidaat ionstructuren gegenereerd. De overeenkomst (match) tussen theoretische CCS-waarden van de kandidaatstructuren en de experimentele CCS is een belangrijk criterium voor het selecteren van plausible structuren [18]. Op dit moment is er nog geen berekeningsmethode die als de gouden standaard wordt beschouwd voor het betrouwbaar toepassen op de omvangrijke range van ionen die met IM-MS wordt onderzocht, en er is een grote variatie van methoden die in de literatuur gebruikt zijn voor het afleiden van CCS-waarden. Er wordt momenteel veel gewerkt aan verdere ontwikkeling en verbetering van de berekeningsmethoden voor CCS-waarden [19], evenals aan de ontwikkeling van de MS workflows zoals bv. aan betere deconvolutiemethodieken [20].

Uit de vele studies die vooral in de laatste tien jaar zijn gepubliceerd blijkt dat CCS-waarden een welkome toevoeging vormen aan de bestaande fysisch-chemische stoffeigenschappen en dat ze naast de traditionele moleculaire karakteristieke eigenschappen van precursorionen, zoals accurate massa, fragmentionen, isotooppatronen, en retentietijden, gebruikt kunnen worden voor een betrouwbaardere identificatie van verbindingen. Helaas bestaan er momenteel nog geen empirische database of bibliotheek van CCS-waarden, zodat het nu nog niet mogelijk is om de identiteit van onbekende verbindingen in suspect of nontarget analyse uitsluitend op basis van CCS te achterhalen [21].

4.2 Toepassingen IMS relevant voor KWR en/of Waterbedrijven

Diverse toepassingen van IMS zonder massadetector zijn in de literatuur te vinden, waaronder die in combinatie met GC [22]. Toch is de combinatie met MS, of die met chromatografie en MS samen, de meest veelbelovende methodologie voor toekomstige identificatiedoelinden.

IMS is onder meer gebruikt voor milieuanalyse [10] en voor de analyse van geneesmiddelen, explosieven, verdovende middelen, en chemische wapens [23]. IMS is ook recent met succes ingezet om voeding te analyseren op schadelijke stoffen [24], meer specifiek op pesticiden, veterinaire geneesmiddelen en natuurlijke toxines, waaronder mycotoxines [25]. IMS is ook gebruikt voor de bepaling van tramadol in biologische monsters als een snel alternatief voor LC-MS [26]. IM-MS is voorts gebruikt om de structuur van biomoleculen op te helderen [27]. In een IMS onderzoek van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs), polychloor bifenylen (PCBs), gebromeerde difenylethers en hun metabolieten bleek dat de PAKs de kleinste CCS hadden relatief t.o.v. hun m/z waarden, terwijl PCBs het grootst waren [28].

De betrouwbaarheid van de identificatie van suspect- en nontarget-bestrijdingsmiddelen in spinazie werd aanzienlijk verhoogd door IM-MS te combineren met voorspelling van de structuren m.b.v. artificiële neurale netwerken [21].

Chirale herkenning kan eveneens met IM-MS worden bewerkstelligd en is gebaseerd op het verschil in CCS tussen diastereomeren die bestaan uit de enantiomere analiet geassocieerd met een zogenaamde chirale selectorstof, of het verschil in CCS tussen enantiomeren in

aanwezigheid van een chirale modifier in het driftgas [29]. Dwivedi et al. [30] waren de eersten die erin slaagden om met drift-tube IM-MS een enantiomere scheiding van drugs, aminozuren en koolhydraten te bewerkstelligen door het gebruik van 2-butanol als chirale modifier.

4.3 Opzet experimenten

Om de toegevoegde waarde van Ion Mobility als extra selectiviteit naast de accurate massa en retentietijd te onderzoeken is ervoor gekozen om een monster van de Maas te analyseren.

4.3.1 Monster Maas Roosteren

Het monster van de Maas bij Roosteren was een 50 L monster dat door middel van een SPE extractie werd teruggebracht naar een volume van 3 mL (concentratiefactor: 16.667). Voor de uitgebreide beschrijving van extractie en verdere behandelingen zie Bijlage I.

4.4 Uitvoering van de metingen

De metingen werden uitgevoerd op een HPLC-MS systeem bestaande uit een Waters Acquity I-Class UPLC systeem (Waters, Milford, MA, U.S.A.) in combinatie met VION IMS-quadropool time of flight (QTOF) massa spectrometer, met electrospray ionisatie, beschikbaar gesteld door de Universiteit van Castellon de la Plana in Spanje. Voorafgaand aan de metingen werd de TOF uitgebreid gekalibreerd. Voor de analyse van het monster van de Maas bij Roosteren werd gebruik gemaakt van de LC condities zoals gebruikt bij KWR tijdens de analyse met de Orbitrap-Fusion (zie Bijlage III). Van elk monster werd 3 μ L geïnjecteerd.

4.5 Resultaten

Alle resultaten van de analyses werden opgeslagen in het software pakket van Waters UNIFI (v 1.9). Dit pakket maakt gebruik van een Oracle database waarin alle data kunnen worden geraadpleegd. Nadeel van dit systeem is dat er geen uitvoer van ruwe data mogelijk is met behoud van de CCS¹ waarden (die voor alle ionen worden opgeslagen in de tijd). Hierdoor is het niet mogelijk zonder een UNIFI licentie de data (accurate MS, retentietijd en CCS) te raadplegen.

4.5.1 Monster Maaswater

Het Maaswater monster is verdund in ultrazuiver water volgens onderstaand schema (zie Tabel 6). Van elke monster werd vervolgens 3 μ L geïnjecteerd.

Verdunning	Equivalent met mL Maaswater
0 v/v	50
10 v/v	5
100 v/v	0,5
1000 v/v	0,05

TABEL 6: OVERZICHT VERDUNNINGEN MAASWATER EXTRACT EN EQUIVALENTE HOEVEELHEID MAASWATER

Tijdens de interpretatie van de analyses is uitgegaan van de resultaten zoals deze zijn verkregen tijdens de LC-HRMS analyse uitgevoerd op de Orbitrap Fusion (zie hoofdstuk 2). Op basis van de accurate massa zijn vervolgens de CCS waarden van alle verdunningen opgezocht in de data.

¹ CCS= collision cross section

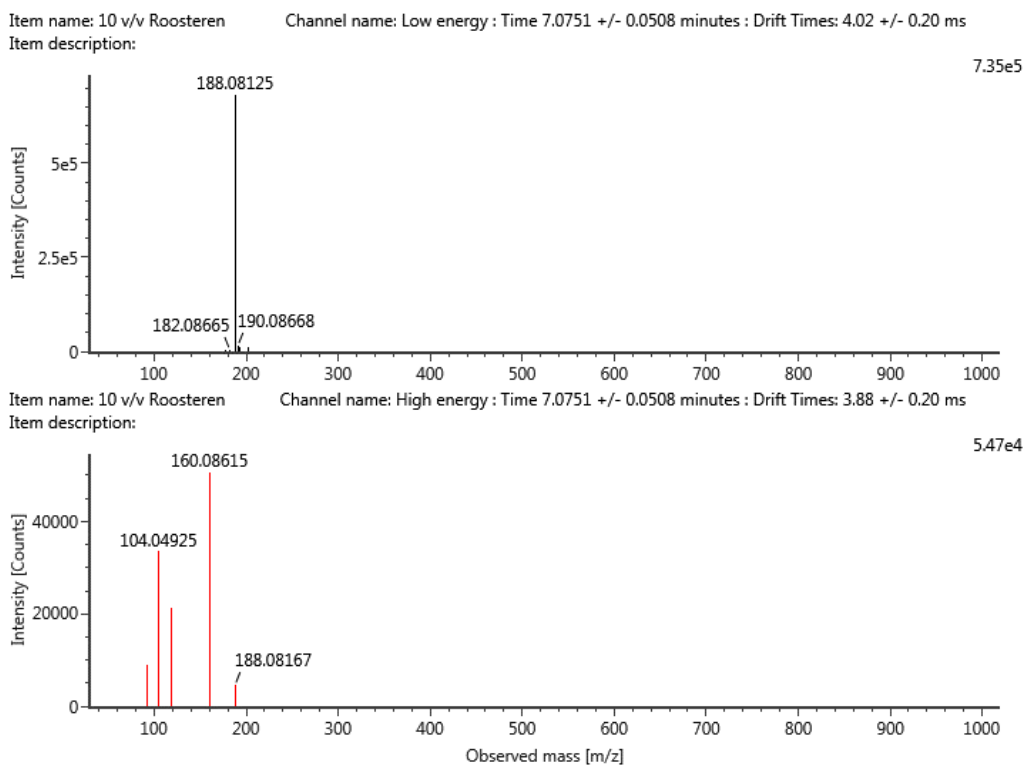
Stof #	[M+H] ⁺	gemiddelde CCS	N=	Standaard deviatie CCS
1	188,0817	137,42	4	0,2%
2	274,,2008	165,10	4	0,2%
3	209,1534	144,82	4	0,2%
4	355,1596	171,15	3	0,3%
5	276,0818	152,92	4	0,3%
1H-benzotriazool	120,0554	119,68	4	0,2%
Terbutylazin	230,1163	152,82	4	0,4%

TABEL 7: RESULTATEN VAN DE CCS WAARDEN IN VIER VERSCHILLENDE VERDUNNINGEN (ZIE TABEL 6) VAN HET MONSTER UIT DE MAAS. [M+H]⁺ OP BASIS VAN DE RESULTATEN UIT PARAGRAAF 4.5.1 (N = CCS GEMETEN IN AANTAL VERDUNNINGEN)

Zoals Tabel 7 laat zien is voor bijna alle stoffen de CCS waarde goed terug te vinden in alle verdunningen behalve voor stof 4. De stof werd niet teruggevonden in de 1000 v/v verdunning van het extract Maaswater. In paragraaf 3.2.1.6 is al aangegeven dat het LC-HRMS signaal, van onbekende 4 gering is. De resulterende gemiddelde CCS waarden laten de meerwaarde van IMS zien. De matrix van een dergelijk geconcentreerd monster lijkt geen invloed te hebben op de juistheid van de CCS waarde.

4.5.2 Identificatie onbekende stoffen in het Maaswater monster.

Na de instrumentele analyse op de QTOF kunnen de spectra uitgelijnd worden door gebruik te maken van de drifttijden in de IMS cel, welke karakteristiek zijn voor de CCS waarden. Hiermee zal de "all ion" fragmentatie (MS^e), welke in het algemeen voor een ingewikkeld massaspectrum zorgt, in complexiteit worden gereduceerd, en zijn alleen de fragmenten die bij het molecuul-ion horen zichtbaar. (zie Figuur 5). Vervolgens kan op basis van de accurate massa een suspect lijst worden opgehaald in een vooraf gedefinieerde database (bv ChemSpider).(zie Figuur 6)



FIGUUR 5: MASSASPECTRUM $[M+H]^+$ EN MS^E FRAGMENTATIE SPECTRUM OPGESCHOOND DOOR UIT TE LIJNEN OP BASIS VAN DRIFT TIMES, ONBEKENDE STOF 1



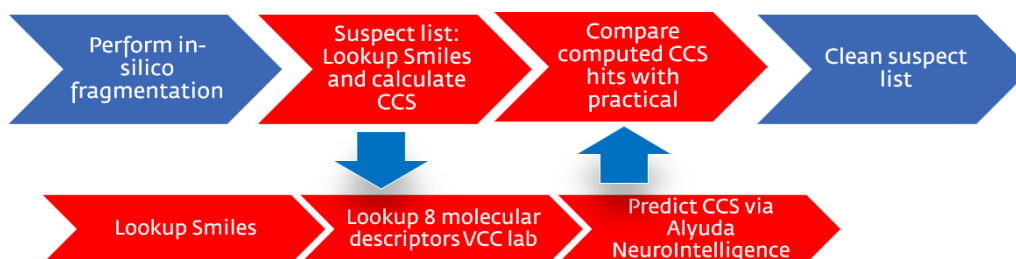
FIGUUR 6: DE EERSTE STAPPEN IN DE WORKFLOW EN HET VERWERKEN VAN DE GEACQUIREERDE DATA MET UNIFI

De volgende stap naar een identificatie vindt plaats binnen het software pakket UNIFI. Van de potentiële kandidaten die naar voren komen uit de externe database wordt door middel van in silico fragmentatie het fragmentatiespectrum bepaald. Hierdoor wordt het mogelijk om het aantal fragmenten dat volgt uit de in silico fragmentatie te vergelijken met het aantal experimentele fragmenten alsmede de intensiteit van elk fragment (zie Bijlage VI). Door nu van de potentiële kandidaten de SMILES-notatie [31] op te zoeken via ChemSpider is het mogelijk om via VCC lab [32] de meest belangrijke kenmerken van het molecuul op te zoeken die bepalend zijn voor de ruimtelijke structuur, en van invloed op de drifttijden in de IMS cel (zie Tabel 8) [21].

Molecular descriptor(code)	Explanation
nC	The number of carbon atoms
VEm2	matrix weighted distance matrix
VEv2	Van der Waals weighted distance matrix
VRD2	average Randic-type eigenvector-based index from distance matrix
Sv	sum of atomic van der Waals forces
nR = Cp	number of R = primary carbon bonds
nR09	number of nine membered rings
E1e	first component accessibility directional WHIM index/weighted by atomic Sanderson electronegativity, and the average Randic-type eigenvector-based index from distance matrix

TABEL 8: MOLECULAIRE DESCRIPTOREN GEBRUIKT VOOR DE BEREKENING VAN DE CCS-WAARDE (BIJLSMA ET AL.[21])

Door gebruik te maken van een dataset van 141 stoffen met praktisch bepaalde CCS-waarden werden vervolgens met behulp van een geavanceerd computermodel (een zogenaamd "artificial neural network" [9]) de CCS-waarden voor alle potentiële kandidaten bepaald. Voor een weergave van de workflow zie Figuur 7.



FIGUUR 7: DE VOLGENDE STAPPEN ZOALS DEZE GEHANTEERD ZIJN VOOR HET VERWERKEN VAN DE DATA. (IN ROOD STAPPEN UITGEVOERD BUITEN UNIFI)

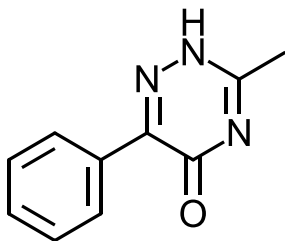
De validatie uitgevoerd in de studie van Bijlsma et al. [21] heeft laten zien dat voor meer dan 50% van de stoffen de berekende CCS waarde maximaal 2% afwijkt van de praktische waarde. Met 90% betrouwbaarheid is die afwijking maximaal 6%.

4.5.2.1 Onbekende stof 1

Voor alle stoffen zoals bepaald door analyse met LC-HRMS (zie 3.2.1) werd het geprotoneerde molecuul ($[M+H]^+$) opgezocht in de ruwe datafiles van de QTOF nadat de eerste stap van de workflow was uitgevoerd. Dat leverde een $[M+H]^+$ op met een m/z van 188,08125 op retentietijd 7,08 min. De meest waarschijnlijke bijbehorende brutoformule is $C_{10}H_9N_3O$. Het fragmentatiespectrum heeft zes fragmenten die overeenkomen met de voorspelde fragmenten uit de in silico fragmentatie.

Bij hantering van een maximaal toegestane afwijking van 2% van de berekende CCS-waarde ten opzichte van de praktische CCS waarden blijven er nog vier mogelijkheden over. Deze structuren zijn positionele isomeren van elkaar en verschillen daardoor nauwelijks in CCS waarde. wat een logisch gevolg is van de eigenschappen van de structuur welke de drifttijden in de IMS cel bepalen.

De meest waarschijnlijke structuur is desamino metamitron (IUPAC 3-Methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(2H)-one), [36993-94-9] (zie Structuur 1)

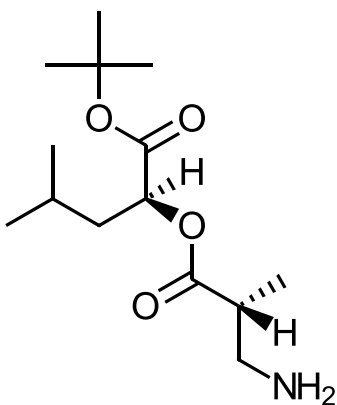


STRUCTUUR 1: MEEST WAARSCHIJNLIJKE KANDIDAAT VOOR ONBEKENDE STOF 1 - METAMITRON-DESAMINO

4.5.2.2 Onbekende stof 2

Voor het geprotoneerde molecuul ion met m/z 274,20012 op retentietijd 9,91 min is de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{14}H_{27}NO_4$. De eerste potentiële kandidaat heeft een fragmentatiespectrum met zes fragmenten die ook volgen uit de in silico fragmentatie. De daaropvolgende kandidaten hebben maar 5 fragmenten die overeenkomen.

De meest waarschijnlijke kandidaat kent een afwijking in de berekende CCS van -3,3% t.o. v. de praktische waarde. De meest waarschijnlijke structuur is 2-Methyl-2-propanyl (2S)-2-[(2R)-3-amino-2-methylpropanoyl]oxy-4-methylpentanoaat [geen CAS nummer beschikbaar] zie Structuur 2). Hiervoor bestaan meerdere stereoisomeren.



STRUCTUUR 2: MEEST WAARSCHIJNLIJKE KANDIDAAT VOOR ONBEKENDE STOF 2: -METHYL-2-PROPANYL (2S)-2-[(2R)-3-AMINO-2-METHYLPROPANOYL]OXY-4-METHYLPENTANOAAAT

4.5.2.3 Onbekende stof 3

Voor het geprotoneerde molecuul ion van m/z 209,15287 op retentietijd 9,56 min is de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{13}H_{20}O_2$. Voor de eerste potentiële kandidaat zijn er 22 fragmenten aanwezig in het fragmentatiespectrum, die ook voorspeld worden met de in silico fragmentatie. Maar de afwijking van de praktische CCS waarde is 6.9% (Bijlage VI, Tabel 12) en derhalve is deze kandidaat daarmee als het 95 % betrouwbaarheids criterium wordt gehanteerd niet de juiste component. De overgebleven drie kandidaatstructuren staan hieronder weergegeven (zie Structuur 3.1-3).

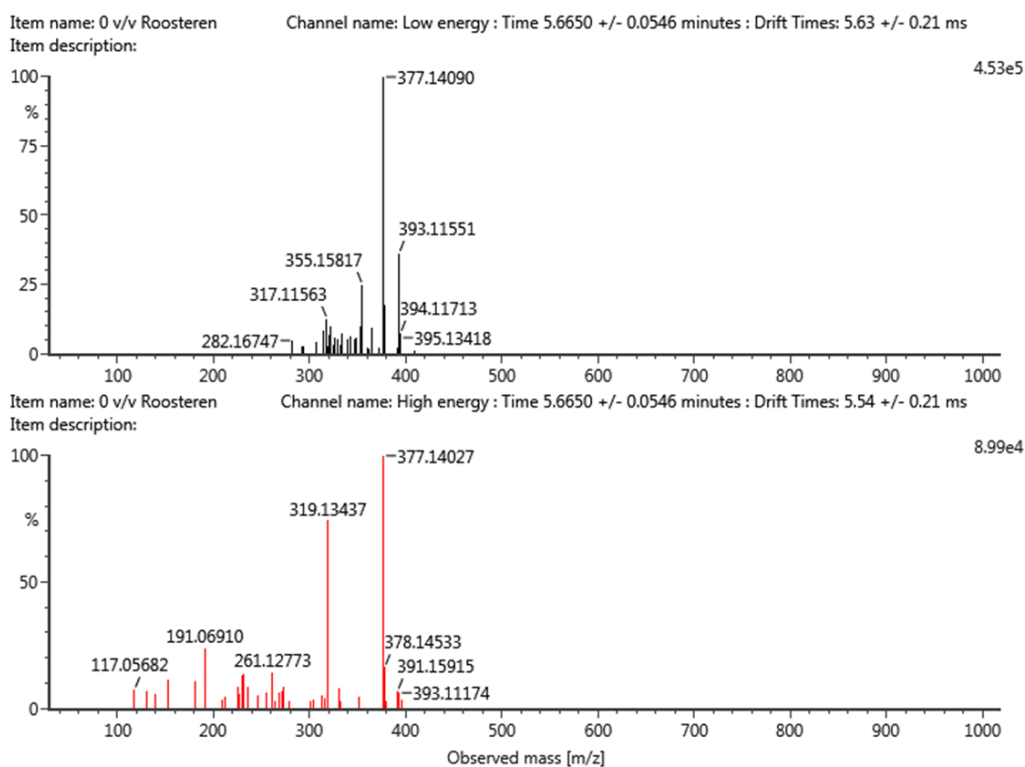
Kandidaat structuur	1	2	3
Naam	2-[4-(Pentyloxy) phenyl]ethanol	4-(3-Hydroxy-1-butyn-1-yl)-3,5,5-trimethyl-3-cyclohexen-1-ol	(3E)-4-(4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one
Afwijking CCS waarde t.o.v. praktische	-3.2 %	-0.6%	-0.1 %
Fragment matches	16	14	14

STRUCTUUR 3: MEEST WAARSCHIJNLIJKE KANDIDATEN VOOR ONBEKENDE STOF 3

De meest waarschijnlijke kandidaat is, als het aantal fragmenten dat overeenkomt met de in silico fragmentatie als extra criterium wordt gehanteerd, de stof 2-[4-(Pentyloxy) phenyl]ethanol [500548-00-5] (zie Structuur 3-1) met een afwijking in berekende CCS van -3,2% t.o. v. de praktische waarde.

4.5.2.4 Onbekende stof 4

Voor het geprotoneerde molecuul ion van m/z 355,15817 op retentietijd 5,66 mint volgt uit de software van UNIFI, de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{16}H_{20}F_6N_2$ op basis van de $[M+Na]^+$. Omdat de "Elemental composition" generator van UNIFI het geprotoneerde molecuul ion niet goed weet te herkennen. De meest intense piek in het full scan massaspectrum en fragmentatiespectrum is die van het natrium adduct (377,14090). Bovendien zijn in het full scan spectrum ook het kaliumadduct (393,11511) en het pseudo-moleculair ion de $[M+H]^+$ (zie Figuur 8) aangetroffen. Deze brutoformule is niet waarschijnlijk omdat er geen zuurstofatomen aanwezig zijn, en, zoals aangegeven door Sugimura et al. [11], geven over het algemeen structuren waar geen zuurstofatomen in voorkomen maar wel stikstofatomen louter geprotoneerde adducten. Wel is het interessant om te zien dat de adducten een verschillende CCS waarde hebben, doordat de feitelijke structurele ruimte wijzigt door de adductvorming en daarmee dus voor een andere drifttijd zorgt in de IMS cel (zie Tabel 9).



FIGUUR 8: SPECTRA VAN ONBEKENDE STOF 4 (IN ZWART FULL SCAN SPECTRUM EN IN ROOD FRAGMENTATIE SPECTRUM)

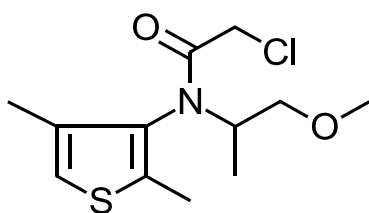
gemeten CCS van	CCS waarde
[M+H] ⁺	171.17
[M+Na] ⁺	168.53
[M+K] ⁺	174.24

TABEL 9: GEMETEN CCS WAARDEN VAN ONBEKENDE STOF 4 EN ADDUCTEN

De UNIFI software “Elemental composition” generator maakt geen gebruik van de informatie dat natriumadducten niet voorkomen bij een verbinding waar geen zuurstofatomen en wel stikstofatomen aanwezig zijn.

4.5.2.5 Onbekende stof 5

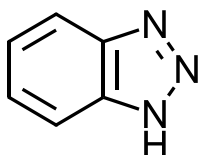
Voor het geprotoneerde molecuul van m/z 276,08102 op retentietijd 15,25 min is de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{12}H_{18}ClNO_2S$. De aanwezigheid van een chloorisotoop en een zwavelisotoop laat hier geen twijfel over bestaan. De kandidaatstoffen die dan overblijven uit ChemSpider zijn weergegeven in Bijlage VI. Omdat de analyse geen onderscheid kan maken tussen de enantiomeren van dimethamid, is de voorgestelde structuur dimethamid [87674-68-8] (zie Structuur 4) welke een afwijking in berekende CCS-waarde heeft van -1,6% ten opzichte van de praktische CCS-waarde.



STRUCTUUR 4: MEEST WAARSCHIJNLIJKE KANDIDAAT VOOR ONBEKENDE STOF 5: DIMETHAMID

4.5.2.6 Bekende stof 1- 1,2,3-benzotriazole

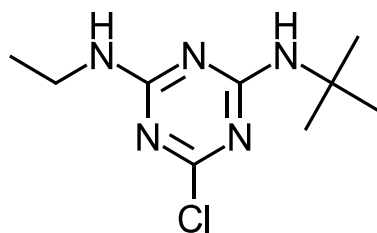
Als positieve controle is ook onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van bevestigde verontreinigingen in monster 1. Voor het geprotoneerde molecuul van m/z 120,05492 op retentietijd 6,49 min is de meest waarschijnlijke brutoformule $C_6H_5N_3$. De meest waarschijnlijke kandidaat is 1,2,3-benzotriazool (Structuur 5). Met name doordat er meer referenties voor deze component aanwezig zijn, krijgt deze een hogere score in UNIFI. De afwijking van de experimentele CCS ten opzichte van de berekende CCS waarde is -0,2%.



STRUCTUUR 5: BEKENDE 1- 1,2,3-BENZOTRIAZOOL

4.5.2.7 Bekende stof 2 - terbutylazine

Voor het geprotoneerde molecuul-ion van m/z 230,11605 op retentietijd 14,75 min is de meest waarschijnlijke brutoformule $C_9H_{16}ClN_5$. De meest waarschijnlijke kandidaten hebben allemaal een 1,3,5-triazine-2,4-diamine basis en verschillen alleen in de plaats van de alifatische groepen en het chlooratoom. In het onverdunde monster komt de kandidaat 6-(2-chloroethyl)-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine als meest waarschijnlijke naar voren. De in silico fragmentatie matcht met 6 fragmenten. In de verdunde monsters van monster 1 komt terbutylazine (zie Structuur 6), met 4 fragmenten die matchen en een CCS waarde die 1,9% afwijkt van de berekende, als meest waarschijnlijke kandidaat naar voren. Het hoge aantal citaties in de geraadpleegde databases speelt hierbij een belangrijke rol.



STRUCTUUR 6: BEKENDE 2 - TERBUTYLAZINE

5 Nuclear Magnetic Resonance

5.1 Inleiding

^1H -NMR is een spectroscopische techniek die gebruik maakt van de spieeigenschappen van de kern van waterstofatomen. De kernen van waterstofatomen gedragen zich als kleine magneetjes. In een sterk magneetveld kunnen deze magneetjes met het magneetveld mee (energetisch gunstiger), of juist tegen het magneetveld in (energetisch ongunstiger) "staan". De magneetjes "tegen het veld in" zetten kost energie, deze energie komt weer vrij als ze weer "met het veld mee" gaan staan. Het energieverschil tussen de twee toestanden komt overeen met de energie in radiostraling tussen de 300 en 900 MHz. Door radiostraling met de juiste frequentie (of golflengte) in het monster te sturen, kunnen conclusies over de structuur van de stof getrokken worden. De frequentie, of golflengte, waarbij de waterstofkernen van energie absorberen om van de ene magnetische toestand naar de andere te gaan is, in tegenstelling tot de absorptie van zichtbaar licht door stoffen, niet aan een vaste frequentie gekoppeld. De frequentie is afhankelijk van het gebruikte magneetveld. Hoe sterker dit veld, hoe meer moeite het kost om de waterstofmagneetjes in "de andere stand" te zetten. Het gevolg is dat bij een sterkere magneet ook een hogere frequentie van de gebruikte radiostraling hoort.

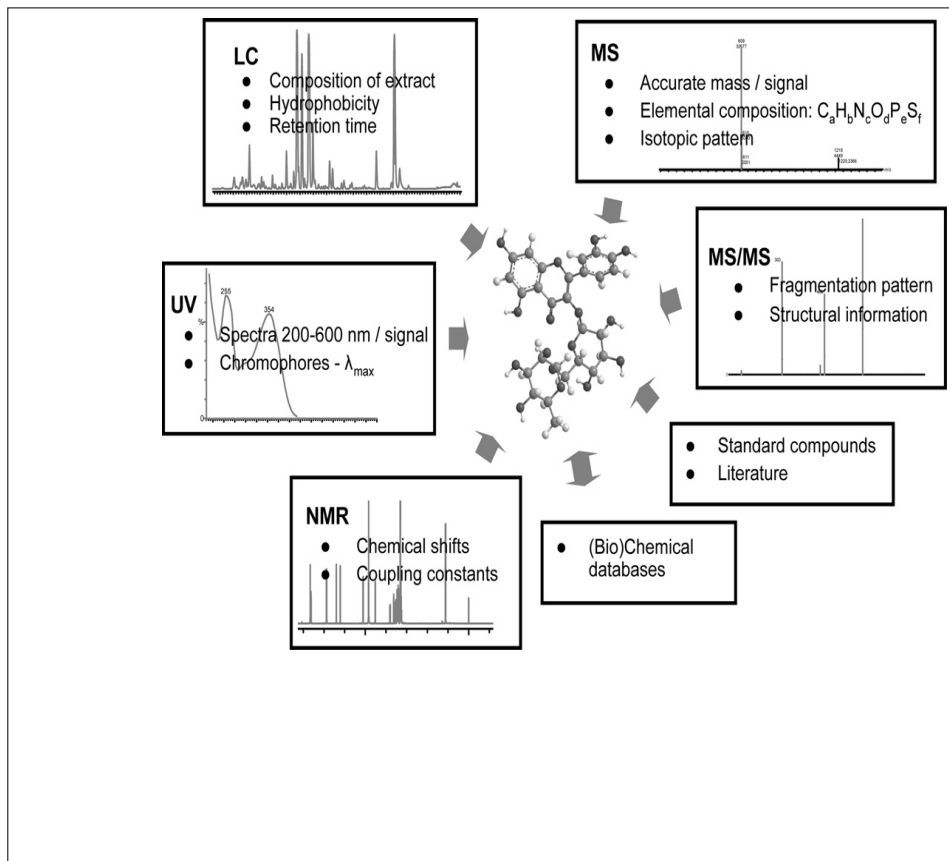
De magnetische resonantie van een kern aanwezig in een stof wordt weergegeven als een signaal met een bepaalde frequentie, weergegeven door een chemische verschuivingswaarde ("chemical shift") in een NMR-spectrum. De analyse van een NMR-spectrum kan complex zijn als gevolg van overlappende signalen en veelvoudigen binnen de signalen. Het NMR-spectrum van elke stof is uniek: daarmee is het één van de meest selectieve identificatietechnieken. Bovendien is NMR een kwantitatieve techniek, omdat het aantal kernspins direct verband houdt met de intensiteit van het signaal [33]. De signaal-ruisverhouding (S/N) in NMR is afhankelijk van veel parameters (bijv. magnetische veldsterkte van het instrument, concentratie van het monster, acquisitietijd, lijnbreedte van de signalen en de temperatuur tijdens de meting). Omdat de nucleaire overgangsenergie veel lager is (meestal in de orde van 10^4) dan een elektronische overgang, is NMR niet zo gevoelig als andere technieken, zoals infrarood (IR) of UV/Vis-spectroscopie [34, 35]. Wel is de gevoeligheid van NMR in de loop der jaren verbeterd, waardoor de toepasbaarheid van deze techniek voor analytische toepassingen is toegenomen. Tegenwoordig ligt de detectielimiet in een 14.1 Tesla (600 MHz voor ^1H NMR) instrument in op het 1 μg -niveau (^1H NMR).

Een aspect dat zowel zeer informatief als moeilijk te interpreteren kan zijn, is het grote aantal signalen. Signaalsplitsing of de veelheid van de signalen wordt veroorzaakt door de spin-spinkoppeling tussen het proton en nabijgelegen atomen. De interpretatie van NMR-spectra kan behoorlijk veeleisend zijn, vooral voor sterk gerelateerde structuren of stoffen met een hoge molecuulmassa. Er zijn verschillende softwaretools (ACD / Labs, ChemOffice en PERCH Solutions) die kunnen helpen bij ^1H -NMR spectrale analyse door NMR spectrale voorspellingen te geven.

De identificatie van onbekende stoffen kan worden uitgevoerd door middel van specifieke identificatietechnieken zoals hoge resolutie massaspectrometrie of NMR.

Massaspectrometrie kan niet alleen de molecuulmassa van een verbinding en mogelijke brutoformules aangeven, maar ook de aanwezigheid van bepaalde functionele groepen of substitutiepatronen. Om de substitutieposities van functionele groepen en isomeren te

onderscheiden, is NMR in de meeste gevallen onvermijdelijk. Voor een volledige identificatie van een onbekende stof is het meestal nodig om informatie uit verschillende identificatietechnieken te integreren. De combinatie van MS met NMR voor het ontrafelen van de identiteit van een stof is daarbij een van de krachtigste strategieën (figuur 10).



FIGUUR 10: MOGELIJKE DATA AFKOMSTIG VAN DIVERSE ANALYTISCHE TECHNIKEN EN DATABASES DIE GEBRUIKT KUNNEN WORDEN BIJ DE IDENTIFICATIE VAN EEN ONBEKENDE STOF [36].

De verwachting is dat de gevoeligheid van NMR de komende jaren niet significant zal verbeteren. Het is daarom belangrijk dat de NMR-analyse van een onbekende stof wordt uitgevoerd in een zo schoon mogelijk extract, zonder storing van andere stoffen. De fractionering van een waterextract op basis van de accurate massa van de onbekende stof is daarom essentieel.

5.2 Uitvoering NMR analyse

De interpretatie van de NMR-spectra is volledig door de WUR uitgevoerd en wordt in dit rapport niet uitvoerig beschreven, alleen het eindresultaat is opgenomen. Meer detailinformatie is opgenomen in bijlage VIII.

Beide monster extracten zijn in eerste instantie zonder verdere bewerking met NMR geanalyseerd. De verkregen NMR-spectra van beide monsters zijn opgenomen in Figuur 1 van Bijlage VIII.

Voorafgaande aan de volgende NMR-analyse is een fractionering van de in totaal vijf onbekende stoffen uitgevoerd met een grote preparatieve kolom (Alltech C18, 22 mm x 150 mm). Hierbij is bij de WUR een LC-HRMS analyse uitgevoerd waar op de retentietijd van de

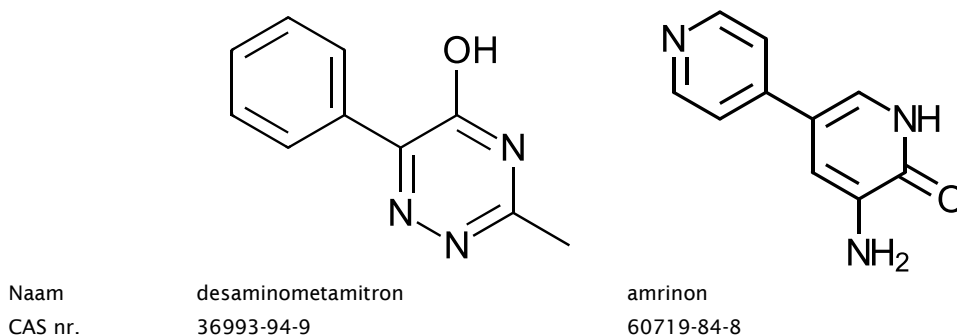
onbekende piek (herkenning op basis van accurate massa) een fractie is verzameld gedurende een retentietijd venster van 1 minuut rondom de te verwachte retentietijd. Vervolgens is het eluaat ingevroren (-80°C) en daarna gevriesdroogd. Na vriesdrogen zijn de fracties weer opgelost en nogmaals gezuiverd met een kleinere analytische kolom. De opgevangen stoffen zijn vervolgens weer gevriesdroogd, opgelost in gedeutereerd dimethylsulfoxide en gemeten met de NMR. De verkregen LC-MS chromatogrammen, MS-spectra en NMR-spectra van monster 1 zijn opgenomen in Figuur 2, 3 en 4 van Bijlage VIII.

5.3 Identificatie onbekende stoffen met NMR

5.3.1 Monster 1

Onbekende stof 1

Op basis van de accurate massa is de brutoformule $C_{10}H_{19}N_3O$ het meest waarschijnlijk. Het aantal double bounds equivalent (DBE) is 7,5 wat wijst op een aromatische structuur. Op basis van de MS-gegevens is de stof desamino-metamitron (Figuur 11) het meest waarschijnlijk: dit wordt bevestigd door de NMR-analyse. Op basis van de NMR-gegevens is naast desaminometamitron de stof amrinon ook nog een optie.

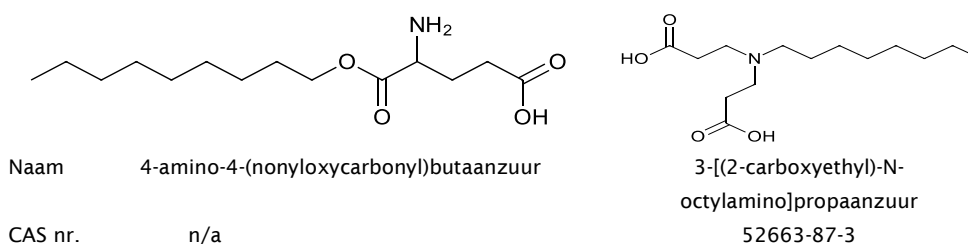


FIGUUR 11: DE TWEE MEEST WAARSCHIJNLIJKE STRUCTUREN VOOR ONBEKENDE STOF 1 (LINKS DESAMINOMETAMITRON, RECHTS AMRINON).

Onbekende stof 2

Op basis van de accurate massa is de brutoformule $C_{14}H_{27}NO_4$ het meest waarschijnlijk. Het aantal DBE is 1,5 wat wijst op een alifatische structuur. Op basis van de NMR-analyse kan geconcludeerd worden dat het een stikstofverbinding is met een alifatische staart. Mogelijk gaat het om Ampholak of een aanverwante stof. Ampholak wordt geproduceerd door Akzo Nobel voor de productie van cosmetica, zie: <https://cosmetics.specialchem.com/product/i-akzonobel-ampholak-7tx>.

De twee meest waarschijnlijke structuren op basis van NMR zijn weergegeven in figuur 12.

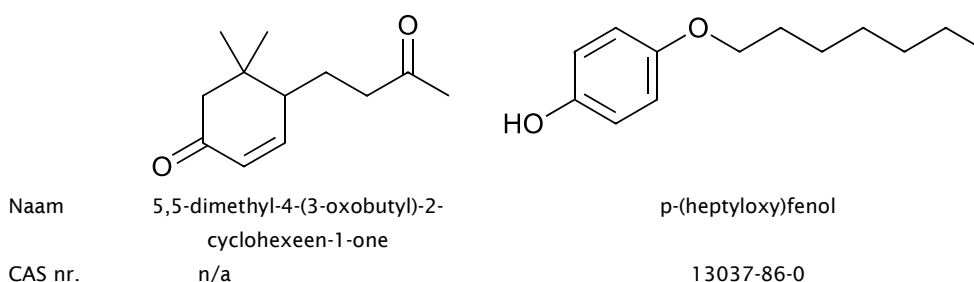


FIGUUR 12: DE TWEE MEEST WAARSCHIJNLIJKE STRUCTUREN VOOR ONBEKENDE STOF 2

Onbekende stof 3

Op basis van de accurate massa is de brutoformule $C_{13}H_{20}O_2$ het meest waarschijnlijk. Het aantal DBE is 3,5 wat wijst op een aromatische structuur. Waarschijnlijk is er op een retentietijd van 15,34 min een isomere stof aanwezig, omdat de accurate massa en het MS^2 spectrum met elkaar overeenkomen.

Op basis van de NMR gegevens zijn er 2 mogelijkheden voor de chemische structuur, deze zijn beide weergegeven in figuur 13.



FIGUUR 13: DE 2 MEEST WAARSCHIJNLIJKE STRUCTUREN VOOR ONBEKENDE STOF 3

Onbekende stof 4

Deze stof heeft bij de LC-HRMS analyse een gering meetsignaal. Op basis van de accurate massa is de brutoformule $C_{14}H_{26}O_{10}$ het meest waarschijnlijk. Het aantal DBE is 1,5 wat wijst op een alifatische structuur. Op basis van de NMR gegevens zijn er veel (mogelijkheden voor de chemische structuur, waarschijnlijk gerelateerd aan suikers (zie figuur 1), een voorbeeld hiervan is ethyl-rutinoside. Bij suikers zijn er veel stereochemische isomeren zodat een eenduidige identificatie lastig is.

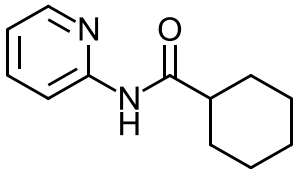
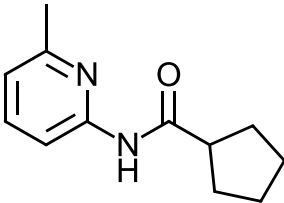
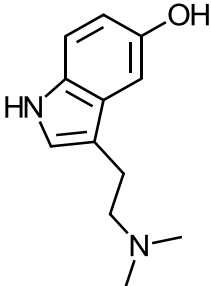
5.3.2 Monster 2

Door de geringe concentratiefactor (ca. 1.000 maal) is in dit monster minder achtergrond aanwezig dan in monster 1 (dat ruim 16.000 maal was geconcentreerd). Op basis van het NMR spectrum kan geconcludeerd worden dat de achtergrond bij beide monsters veroorzaakt wordt door vergelijkbare stoffen met veel koolstof-waterstof bindingen, zoals humuszuren.

Op basis van de accurate massa is door Aqualab Zuid de meest waarschijnlijke brutoformule voor de onbekende stof LCAqua-440 vastgesteld als $C_{12}H_{16}N_2O$. Deze brutoformule wordt ook bevestigd door de brutoformules van de productionen (150,0788 (100%) en 163,0864 (25%)). Op basis van de NMR gegevens gaat het om bufotenine of een vergelijkbare

verbinding. De exacte chemische structuur kon niet worden vastgesteld omdat het NMR-meetsignaal te zwak was voor een betrouwbare identificatie. Bovendien blijven er diverse mogelijkheden over voor de chemische structuur.

De drie meest waarschijnlijke structuren zijn weergegeven in figuur 14.

			
Naam	cyclohexyl(2-pyridylamino)formaldehyde	cyclopentyl(6-methyl-2-pyridylamino)formaldehyde	3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1H-indol-5-ol
CAS nr.	niet beschikbaar	niet beschikbaar	niet beschikbaar

FIGUUR 14: DE 3 MEEST WAARSCHIJNLIJKE STRUCTUREN VOOR DE ONBEKENDE STOF LCAQUA-440 IN MONSTER 2 (RECHTS BUFOTENINE)

5.4 Conclusie

Op basis van enkel LC-HRMS data is de kans op een volledige identificatie van een onbekende stof gering indien deze niet in stofbibliotheken is opgenomen. Met behulp van NMR kan aanvullende informatie over specifieke functionele groepen worden verkregen. De gevoeligheid van NMR is echter aanzienlijk minder in vergelijking met massaspectrometrie, en daarom is de opwerking van een groot watervolume (50-100 liter), gevolgd door fractionering en zuivering per stof nodig. Deze opwerking en fractionering kan in de toekomst bij KWR verder worden ontwikkeld zodat bij de WUR enkel de NMR-analyse van schone fracties uitgevoerd hoeft te worden.

De samenwerking met de WUR is verder uitgebouwd en binnen dit project zijn de eerste ervaringen opgedaan om met de combinatie van hoge resolutie massaspectrometrie en NMR onbekende stoffen in een regulier oppervlaktewater monster te identificeren. De doorlooptijd vanaf monsternamen tot aan een eerste identificatie ligt tussen de 2 en 3 weken. Bij vervolprojecten kan de onderlinge expertise verder worden uitgebouwd en de doorlooptijd verder worden verkort.

6 Toegevoegde waarde van de twee onderzochte technieken

6.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt summier per onbekende stof de toegevoegde waarde van de twee onderzochte technieken bij identificatie vergeleken met LC-HRMS.

6.2 Onbekende stof 1

De accurate massa van het geprotoneerde molecuul is 188,0817 en de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{10}H_{19}N_3O$.

LC-HRMS: 96.5% overeen met het MS² Spectrum van desaminometamitron. Hiermee is referentiestof 1 geïdentificeerd als desaminometamitron.

IMS-QTOF: 6 in silico fragmentatie matches laten vier mogelijkheden over. Al deze structuren zijn positionele isomeren van elkaar, wat een logisch gevolg is van de eigenschappen van de structuur die de drifttijden in de IMS cel bepalen. De IM-MS analyse wijst er eveneens op dat de meest waarschijnlijke structuur desaminometamitron is [3-Methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(2H)-one, [36993-94-9]

NMR: op basis van de NMR-data zijn er 2 mogelijkheden voor de chemische structuur, nl. desaminometamitron en amrinon. Door het combineren van de MS en NMR gegevens kon deze stof ondubbelzinnig geïdentificeerd worden als desaminometamitron.

Conclusie

Onbekende stof 1 is door de LC-HRMS, IMS-QTOF en NMR geïdentificeerd als desaminometamitron.

6.3 Onbekende stof 2

De accurate massa van het geprotoneerde molecuul is 274,2008 en de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{14}H_{27}NO_4$.

LC-HRMS: de in silico fragmentatie heeft niet geleid tot goede kandidaten voor een mogelijke identificatie.

IMS-QTOF: De eerste potentiële kandidaat heeft een fragmentatiespectrum met zes fragmenten die ook volgen uit de in silico fragmentatie. De meest waarschijnlijke kandidaat kent een afwijking in de berekende CCS van -3,3% t.o.v. de experimentele waarde (zie hiervoor 4.5.2.). De meest waarschijnlijke structuur is 2-Methyl-2-propanyl (2S)-2-[(2R)-3-amino-2-methylpropanoyl]oxy-4-methylpentanoaat. Hiervoor bestaan meerdere stereoisomeren.

NMR: Op basis van de NMR-analyse kan geconcludeerd worden dat het een stikstofverbinding is met een alifatische staart. Mogelijk gaat het om Ampholak of een aanverwante stof. Ampholak wordt geproduceerd door Akzo voor de productie van cosmetica, zie <https://cosmetics.specialchem.com/product/i-akzonobel-ampholak-7tx>.

Conclusie

Onbekende stof 2 is niet geïdentificeerd met behulp van de 3 toegepaste technieken. Wel is er met behulp van IMS-QTOF een mogelijke kandidaatverbinding gevonden en is er met NMR vastgesteld dat de verbinding een stikstofatoom en een alifatische staart bevat. Een mogelijke vervolgstap voor de identificatie van deze verbinding is de aanschaf en analyse van de IMS-QTOF kandidaatverbinding, of het verder opzuiveren van het Maas extract en dit nogmaals met NMR te analyseren.

6.4 Onbekende stof 3

De accurate massa van het geprotoneerde molecuul is 209,1534 en de meest waarschijnlijke brutoformule is $C_{13}H_{20}O_2$.

LC-HRMS: Van de 50 hoogst scorende kandidaatstoffen met Metfrag, kunnen minimaal 18 van de 21 aanwezige fragment ionen in het MS^2 spectrum van onbekende stof 3 verklaard worden. Hierdoor liggen de scores van de top 50 stoffen erg dicht bij elkaar en dat maakt de kans op identificatie klein.

IMS-QTOF De meest waarschijnlijke kandidaat is, als het aantal fragmenten dat overeenkomt met de in silico fragmentatie als belangrijkste criterium wordt gehanteerd, de stof 2-[4-(Pentyloxy) fenyl]ethanol [500548-00-5], met een afwijking in berekende CCS van -3,2% t.o.v. de experimentele waarde.

NMR: Op basis van de NMR gegevens zijn er twee mogelijkheden voor de chemische structuur, namelijk 5,5-dimethyl-4-(3-oxobutyl)-2-cyclohexen-1-one en p-(heptyloxy)fenol.

Conclusie

De identiteit van onbekende stof 3 is nog niet achterhaald. Wel is er met IMS-QTOF een meest waarschijnlijke kandidaat vastgesteld. Tevens zijn er 2 mogelijke structuren met behulp van NMR bepaald. De gevonden verbindingen met NMR en IMS-QTOF komen niet overeen met elkaar. Een mogelijke vervolgstap voor de identificatie van deze verbinding is de aanschaf en analyse van de IMS-QTOF en NMR kandidaatverbindingen, of het verder opzuiveren van het Maas extract en deze nogmaals met NMR te analyseren

6.5 Onbekende stof 4

De accurate massa van het geprotoneerde molecuul is 355,1596 en de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{14}H_{26}O_{10}$

LC-HRMS: Gezien het MS^2 spectrum, de hoeveelheid aanwezige zuurstof atomen en het voorkomen van de deze verbinding in natuurlijk organisch materiaal, gaat het zeer waarschijnlijk om een disaccharide- en/of glycoside-achtige verbinding. Een mogelijke kandidaat is ethylrutinoside.

IMS-QTOF: De brutoformule die wordt voorspeld is niet waarschijnlijk, omdat er geen zuurstofatomen aanwezig zijn maar wel stikstofatomen, en deze geven louter geprotoneerde adducten. Dat is in tegenspraak met wanneer er wel natrium en kaliumadducten aanwezig zijn in het full scan spectrum. Het gaat dus mis met de softwarematige elemental composition generator.

NMR: Op basis van de NMR gegevens zijn er veel (mogelijkheden voor de chemische structuur, waarschijnlijk gerelateerd aan suikers, een voorbeeld hiervan is ethylrutinoside. Bij suikers zijn er veel stereochemische isomeren zodat een eenduidige identificatie lastig is.

Conclusie

Onbekende stof 4 is nog niet geïdentificeerd, maar zowel de analyse met LC-HRMS als NMR wijzen op een disaccharide-achtige structuur, mogelijk ethylrutinoside. Met IMS-QTOF was het niet mogelijk om inzicht te krijgen in de aan of afwezig zijn van stikstofatomen, wat wordt veroorzaakt door de lagere resolutie van de IMS-QTOF in vergelijking met de Orbitrap Fusion, waardoor een onjuiste brutoformule is berekend. Een mogelijke vervolgstap voor de identificatie van deze verbinding is de aanschaf en analyse van ethylrutinoside, of het verder opzuiveren van het Maas extract en dit nogmaals met NMR te analyseren.

6.6 Onbekende stof 5 (LC-Aqua 440)

De accurate massa van het geprotoneerde molecuul ion is 205,13316 en de meest waarschijnlijke brutoformule $C_{12}H_{16}N_2O$.

LC-HRMS: Onderzoek naar onbekende stof is alleen uitgevoerd door Aqualab zuid. Er zijn diverse mogelijkheden voor de chemische structuur.

IMS-QTOF: analyse niet uitgevoerd omdat deze verbinding niet in het monster aanwezig was.

NMR: Op basis van de NMR gegevens gaat het om bufotenine of een vergelijkbare verbinding. De exacte chemische structuur kon niet worden vastgesteld omdat het NMR-meetsignaal te zwak was voor een betrouwbare identificatie.

Conclusie

Onbekende stof 5 is niet geïdentificeerd met behulp van NMR. Het signaal was te zwak voor een betrouwbare identificatie. Voor een verdere identificatie met NMR dient het Maas extract verder opgezuiverd te worden.

7 Conclusie en aanbevelingen

In dit onderzoek zijn twee analytische technieken verkend die in combinatie met hoge resolutie massaspectrometrie aanvullende informatie kunnen geven m.b.t. de identificatie van onbekende chemische stoffen, nl. (i) Ion Mobility (IMS) en (ii) Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Voor het testen van de technieken zijn in totaal 5 onbekende stoffen geselecteerd die in 2 monsters Maaswater aangetroffen zijn. Met IMS-QTOF zijn 4 van de 5 onbekende stoffen onderzocht en leverde IMS voor één daarvan (desaminometamitron) een identiteit, en voor 2 onbekende stoffen mogelijke kandidaten. Terwijl de NMR analyse van de 5 onbekende stoffen dezelfde stof identificeerde, en voor 3 andere onbekende stoffen kandidaat structuren kon aanwijzen.

Alhoewel IMS in dit onderzoek nog geen duidelijke meerwaarde heeft gebracht, is te verwachten dat door verdere ontwikkeling van IMS en daarbij behorende databases met de CCS van stoffen in de komende jaren de techniek een nuttige aanvulling kan zijn op het instrumentarium en de workflow,s die gebruikt worden om de identiteit van onbekende stoffen op te helderen in de watersector. Daarentegen leverde NMR vaak meer aanvullende informatie op, maar kon vanwege de hoge matrix achtergrond vaak niet tot eenduidige structuur komen. Door extracten in de toekomst beter op te zuiveren (bijv. via een extra fractioneringsstap) biedt NMR de meeste potentie om onbekende stoffen in de watercyclus ondubbelzinnig te identificeren.

NMR apparatuur is echter duur en er is specialistische kennis nodig om de spectra te interpreteren. Daarom wordt aanbevolen om de huidige samenwerking met de WUR verder uit te bouwen en de procedure van monsternamen tot analyse en interpretatie verder te optimaliseren. Zo kan een identificatie van een onbekende stof zo efficiënt en snel mogelijk worden uitgevoerd.

Het verdient aanbeveling om binnen BTO-onderzoek nieuwe analytische ontwikkelingen en tools te blijven volgen op de meerwaarde en toepasbaarheid voor de (drink)watersector.

8 Literatuur

1. Ewing, M.A., M.S. Glover, and D.E. Clemmer, *Hybrid ion mobility and mass spectrometry as a separation tool*. Journal of Chromatography A, 2016. **1439**: p. 3-25.
2. Van Leerdam JA, Vughs D, and S. F., *Onderzoek naar de toepasbaarheid van Ion Mobility voor het screeningsonderzoek met LTQ-Orbitrap-MS*. 2011, KWR, B111741.
3. van Leerdam, J.A., et al., *Identification of Unknown Microcontaminants in Dutch River Water by Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Environmental Science & Technology, 2014. **48**(21): p. 12791-12799.
4. Matilainen, A., et al., *An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment*. Chemosphere, 2011. **83**(11): p. 1431-1442.
5. Godejohann, M., et al., *Comprehensive Non-Targeted Analysis of Contaminated Groundwater of a Former Ammunition Destruction Site using 1H-NMR and HPLC-SPE-NMR/TOF-MS*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(18): p. 7055-7061.
6. Vughs, D., et al., *Tools voor de identificatie van onbekenden verbindingen met hoge resolutie massaspectrometrie data* 2017, KWR: Nieuwegein. p. 40.
7. Bisceglia, K.J., et al., *Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(4): p. 558-564.
8. Horai, H., et al., *MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(7): p. 703-714.
9. Alyuda. [cited 2019 2019-01-23]; Available from: <http://www.alyuda.com/>.
10. Márquez-Sillero, I., et al., *Ion-mobility spectrometry for environmental analysis*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(5): p. 677-690.
11. Sugimura, N., et al., *Prediction of Adducts on Positive Mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Proton/Sodium Selectivity in Methanol Solutions*. European Journal of Mass Spectrometry, 2015. **21**(5): p. 725-731.
12. Ruttkies, C., et al., *MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation*. Journal of Cheminformatics, 2016. **8**(1): p. 3.
13. Lai, Z., et al., *Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics*. Nature Methods, 2017. **15**: p. 53.
14. Rasche, F., et al., *Computing Fragmentation Trees from Tandem Mass Spectrometry Data*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(4): p. 1243-1251.
15. Cumeras, R., et al., *Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: Current instrumentation*. Analyst, 2015. **140**(5): p. 1376-1390.
16. Li, F., et al., *Ion mobility spectrometer for online monitoring of trace compounds*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2002. **57**(10): p. 1563-1574.
17. Cumeras, R., et al., *Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 2: Hyphenated methods and effects of experimental parameters*. Analyst, 2015. **140**(5): p. 1391-1410.
18. Lee, J.W., et al., *Collision cross sections and ion structures: Development of a general calculation method via high-quality ion mobility measurements and theoretical modeling*. Analyst, 2017. **142**(22): p. 4289-4298.
19. Lee, J.W., et al., *Structural characterization of small molecular ions by ion mobility mass spectrometry in nitrogen drift gas: improving the accuracy of trajectory method calculations*. Analyst, 2018. **143**(8): p. 1786-1796.
20. Pettit, M.E., et al., *Broadband ion mobility deconvolution for rapid analysis of complex mixtures*. Analyst, 2018. **143**(11): p. 2574-2586.

21. Bijlsma, L., et al., *Prediction of Collision Cross-Section Values for Small molecules: Application to Pesticide Residue Analysis*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(12): p. 6583-6589.
22. Vautz, W., et al., *On the potential of ion mobility spectrometry coupled to GC pre-separation – A tutorial*. Analytica Chimica Acta, 2018. **1024**: p. 52-64.
23. Sorribes-Soriano, A., et al., *Trace analysis by ion mobility spectrometry: From conventional to smart sample preconcentration methods. A review*. Analytica Chimica Acta, 2018. **1026**: p. 37-50.
24. Hernández-Mesa, M., et al., *Current applications and perspectives of ion mobility spectrometry to answer chemical food safety issues*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2017. **94**: p. 39-53.
25. Righetti, L., et al., *Ion mobility-derived collision cross section database: Application to mycotoxin analysis*. Analytica Chimica Acta, 2018. **1014**: p. 50-57.
26. Sheibani, A. and N. Haghpaizir, *Application of ion mobility spectrometry for the determination of tramadol in biological samples*. Journal of Food and Drug Analysis, 2014. **22**(4): p. 500-504.
27. López, A., et al., *Applications and future of ion mobility mass spectrometry in structural biology*. New Journal of Chemistry, 2013. **37**(5): p. 1283-1289.
28. Zheng, X., et al., *Utilizing ion mobility spectrometry and mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers and their metabolites*. Analytica Chimica Acta, 2018.
29. Yu, X. and Z.P. Yao, *Chiral recognition and determination of enantiomeric excess by mass spectrometry: A review*. Analytica Chimica Acta, 2017. **968**: p. 1-20.
30. Dwivedi, P., et al., *Gas-Phase Chiral Separations by Ion Mobility Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(24): p. 8200-8206.
31. E.P.A. [cited 2019-01-23]; Available from: https://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/smiles.html.
32. VCC. [cited 2019-01-23]; Available from: <http://vcclab.org/>.
33. Pauli, G.F., *Phytochem. Anal.*, 2001. **12**: p. 28.
34. Claridge, T., *High-resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 1999.
35. Nave, C.R., *HyperPhysics*. 2005.
36. Moco, S., et al., *Metabolomics technologies and metabolite identification*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(9): p. 855-866.

Bijlage I met LC-UV gemeten stoffen in de Maas bij Keizersveer en Heel in 2017.

Concentraties in µg/L.

Locatie Keizersveer- meetstation clientsamplepoint_id: RKEI00MEET.

Component	KRetI	n (77)	Minimum	Maximum	Gemiddelde
Cafeïne	14.63	47	0.04	0.40	0.19
Carbamazepine	28.28	18	0.03	0.15	0.07
Chloortoluron	31.64	1	0.03	0.03	0.03
Metobromuron	35.17	2	0.04	0.05	0.04
1H-Benzotriazool (LCAqua-005)	17.94	72	0.13	1.10	0.71
4-Methyl-1H- benzotriazool (LCAqua-083)	21.82	76	0.07	1.30	0.59
5-Methyl-1H- benzotriazool	22.12	65	0.05	0.68	0.21
LCAqua-056	15.25	1	0.45	0.45	0.45
LCAqua-057	16.09	1	0.54	0.54	0.54
LCAqua-093	23.29	1	0.70	0.70	0.70
LCAqua-110	23.39	8	0.41	1.10	0.71
LCAqua-114	26.71	2	1.10	1.89	1.49
LCAqua-157	9.52	1	0.67	0.67	0.67
LCAqua-160	27.07	2	0.52	0.68	0.60

LCAqua-167	16.93	2	0.43	0.77	0.60
LCAqua-187	19.72	15	0.42	1.63	0.79
LCAqua-189	15.01	4	0.44	0.72	0.56
LCAqua-196	41.83	13	0.40	0.71	0.51
LCAqua-275	15.70	1	0.41	0.41	0.41
LCAqua-281	20.50	1	1.30	1.30	1.30
LCAqua-297	18.00	1	0.40	0.40	0.40
LCAqua-298	14.87	1	0.45	0.45	0.45
LCAqua-299	17.04	7	0.49	5.30	1.53
LCAqua-314	14.99	21	0.41	0.63	0.50
LCAqua-395	22.63	1	0.41	0.41	0.41
LCAqua-421	19.79	1	1.20	1.20	1.20
LCAqua-446	25.99	1	0.65	0.65	0.65
LCAqua-469	25.27	44	0.41	1.00	0.71
LCAqua-473	12.67	5	0.46	0.71	0.56
LCAqua-477	35.82	5	0.41	0.59	0.49
LCAqua-478	41.82	1	0.63	0.63	0.63
LCAqua-488	47.82	1	0.50	0.50	0.50
LCAqua-489	49.02	1	1.05	1.05	1.05
LCAqua-491	45.49	1	0.47	0.47	0.47
LCAqua-493	41.83	2	0.46	0.60	0.53

Locatie Heel, ruw.inwrk Lat.kan clientsamplepoint_id: 0045RUO0100:

Component	KRetI	n (172)	Minimum	Maximum	Gemiddeld e
Cafeïne	14.6	62	0.09	0.98	0.42
1H-Benzotriazool (LCAqua-005)	17.9	121	0.30	1.10	0.68
4-Methyl-1H- benzotriazool (LCAqua- 083)	21.8	139	0.26	1.30	0.58
5-Methyl-1H- benzotriazool	22.1	28	0.30	0.79	0.48
LCAqua-057	16.1	47	0.50	1.70	0.88
LCAqua-155	12.9	1	0.88	0.88	0.88
LCAqua-160	27.1	6	0.70	1.60	1.09
LCAqua-187	19.8	10	0.50	0.69	0.60
LCAqua-196	18.0	20	0.50	1.02	0.72
LCAqua-297	18.0	15	0.50	0.78	0.64
LCAqua-469	25.3	4	0.51	0.66	0.57
LCAqua-473	12.8	15	0.53	1.50	0.70

Bijlage II Opwerking Maaswater voor LC-HRMS en NMR analyse

Sampling

Teflon, stainless steel or glass materials to prevent contamination from leachates.

- Ensure there can be no contamination from hands, cigarette smoke, etc.

Preparation of extraction column

- Take one 200 mg OASIS[®] HLB 5cc LP Glass cartridge. Lot 111A170591.
- Condition column with 2 volumes acetonitrile (99.9%), incubate for 1 minute and empty completely afterwards.
- Condition with one volume of methanol (99.9%), incubate for 1 minute and empty/dry completely afterwards at room temperature.
- Condition column with 2 volumes acetonitrile (99.9%) lot 1705508008, incubate for 1 minute and empty completely afterwards.
- Condition with two volumes of ultrapure water at pH 2.3 .In the first round fill under low vacuum, incubate 1 minute and empty to just above OASIS[®] level. In the second round fill, incubate 1 minute and empty to just above OASIS[®] level.
- Fill column with ultrapure water water at pH 2.3.

Isolation and elution

- No blanc procedure.
- Put water sample to pH 2.3 with 15 % suprapure HCl.
- Measure out 2000 ml of sample in 25 clean extraction bottles.
- Place Teflon tubing in the bottle.
- Run the water sample over the column at approx. 10 mL/min under low vacuum.
- Clean extraction column with two volumes of ultrapure water at pH 2.3 (discard eluate).
- Dry extraction columns for one hour under low vacuum (approx. 15 inch Hg).
- Elute extraction column three times with 2.5 mL acetonitrile (99.9%), incubating the acetonitrile for 1 minute each time.
- Collect the total of 7.5 mL eluate in test tube.
- Store at < -18°C.

Concentration

- Afblazen bij 60°C tot ca 1 ml mbv stikstof.
- Pool 5 eluaten (1 ml eluaat + 2 maal ± 0.5 ml Acetonitril) → 1 buis.
- Afblazen 60°C tot ca 1 ml.
- Pool concentraten met 2 maal ± 0.5 ml ACN → 1 buis.
- Afblazen bij 60°C tot ± 2.5 ml (nog steeds helder)
- Aangevuld tot 3 ml obv gewicht.
- extract opgeslagen in de vriezer bij - 18 °C

Bijlage III Analyse condities extract maaswater

Analysecondities van extract monster Maaswater dd. 11 juni 2018

Instellingen UHPLC , autosampler en kolomoven (Vanquish; Thermo Fisher Scientific, Bremen)

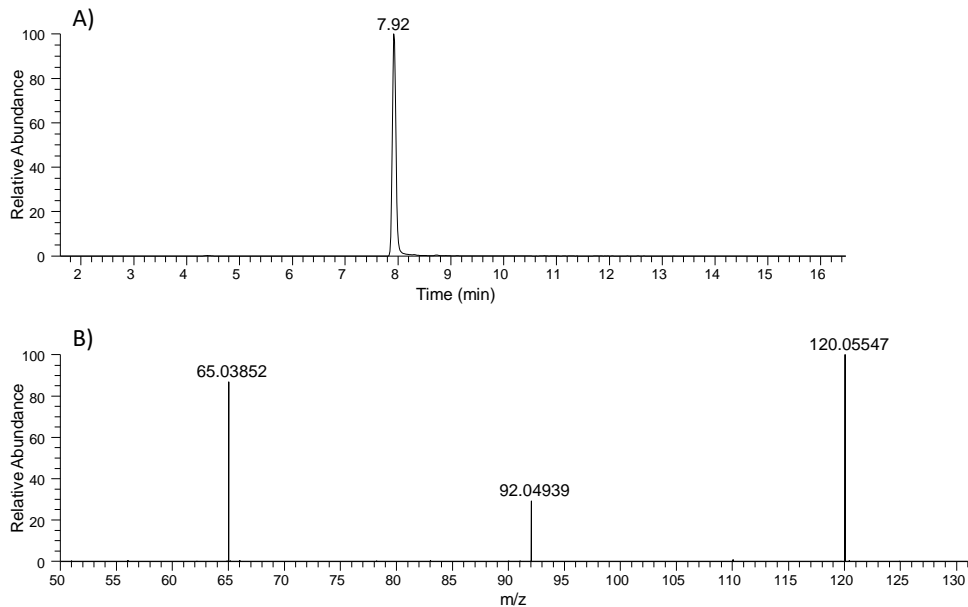
- Kolom: Xbridge C18 XP, 2.1 x 150 mm, 2.5 μ m (Waters, Etten-Leur, Netherlands)
- Mobiele fase A: ultrapuur water + 0,05% mierenzuur
- Mobiel fase B: Acetonitril + 0,05% mierenzuur
- Gradiënt: lineair van 5 % tot 100% B in 25 min. Vervolgens 100% B voor 4 min. Dan terug naar start condities in 0,5 min en 4,5 min constant bij start condities.
- Flow: 250 μ L/min
- Injectie volume: 100 μ L
- kolomoven: 25 °C

Instellingen massaspectrometer (Orbitrap Fusion; Thermo Fisher Scientific, Bremen):

- Resolutie MS¹: 120 000 & 240 000 FWHM
- Mass range full scan: 80-1300 *m/z*
- Mass accuracy < 2 ppm
- Source: electrospray (ESI)
- Ionisatie: positieve mode
- Vaporizer: 300°C
- Ion transfer tube: 300°C
- Spray voltage: 3000 volt
- Sheat gas: 40 arbitrary units
- Auxiliary gas: 10 arbitrary units
- Sweep gas: 5 arbitrary units
- RF lens: 50%
- Resolutie MS²: 15 000 FWHM
- HCD: 35%

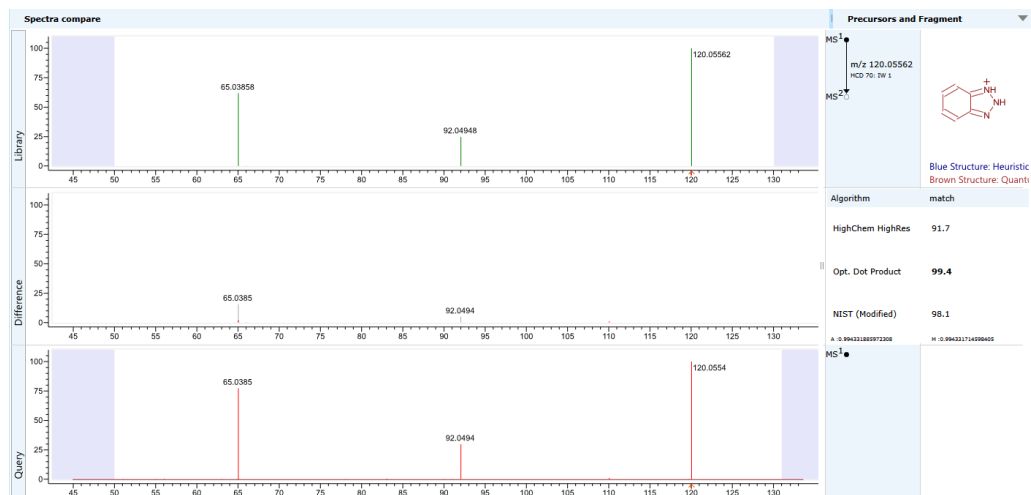
Bijlage IV : MS2-spectra van de onbekende stoffen in monster 1

MS1 EN MS2 SPECTRUM VAN REFERENTISTOF 1 (1-H-BENZOTRIAZOOL)

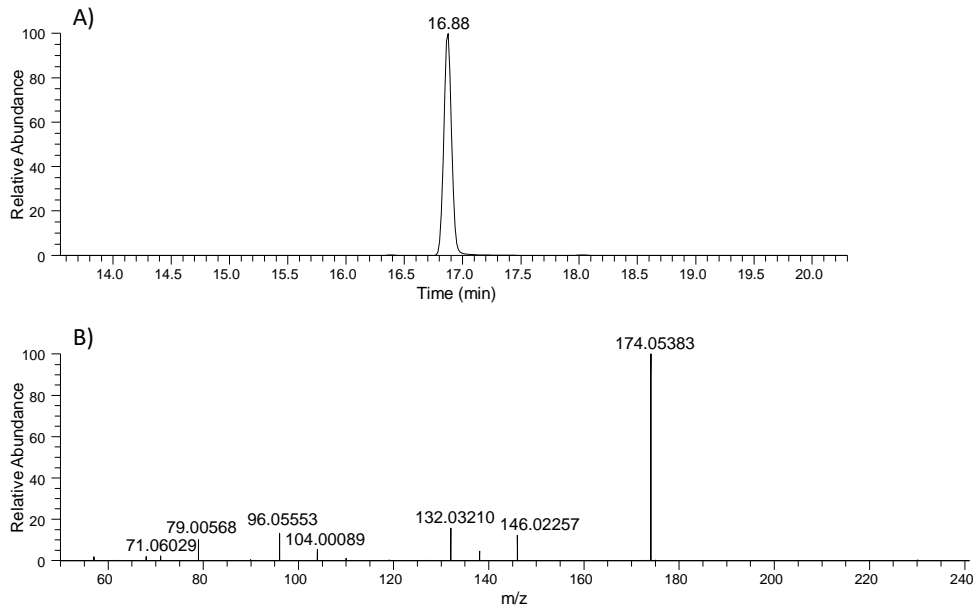


A) EIC van referentiestof 1 (m/z 120,0554) in monster 1 (50x verdund). B) MS² spectrum (HCD 35) van referentiestof 1 in monster 1.

MZCLOUD BIBLIOTHEEK MATCH VAN REFERENTIE STOF 1 (1-H-BENZOTRIAZOOL)

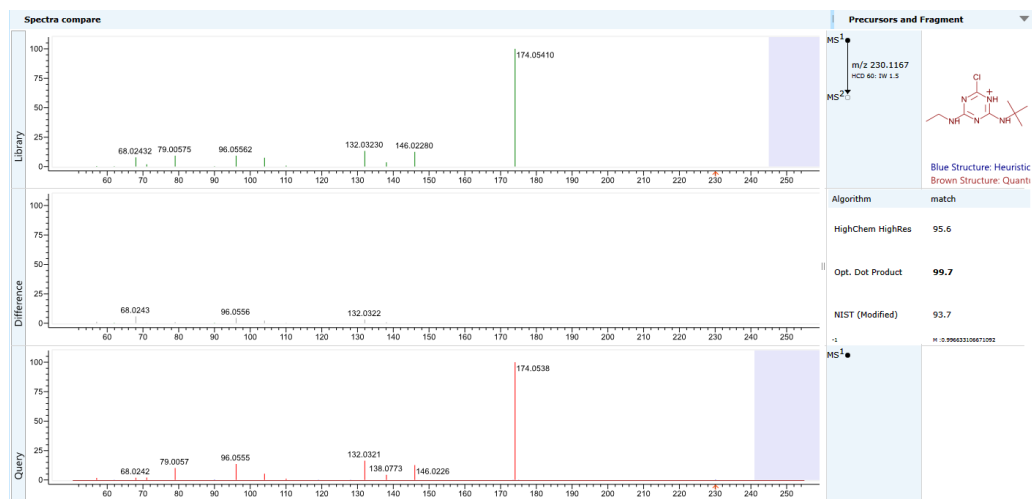


MS1 EN MS2 SPECTRUM VAN REFERENTISTOF 2 (TERBUTYLZINE)

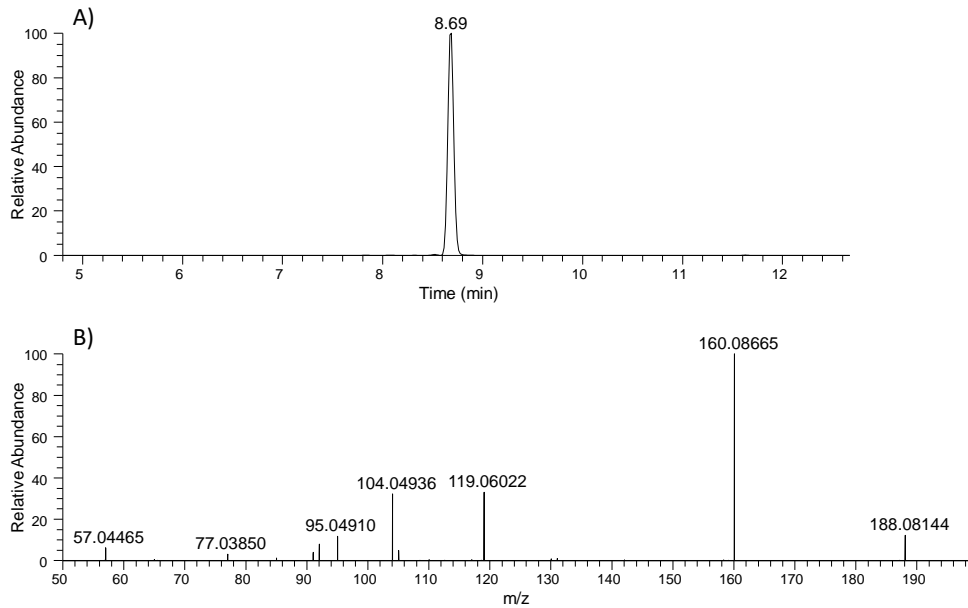


A) EIC van referentiestof 2 (m/z 230,1163) in monster 1 (50x verdund). B) MS^2 spectrum (HCD 35) van referentiestof 2 in monster 1.

MZCLOUD BIBLIOTHEEK MATCH VAN REFERENTIE STOF 2 (TERBUTYLZINE)

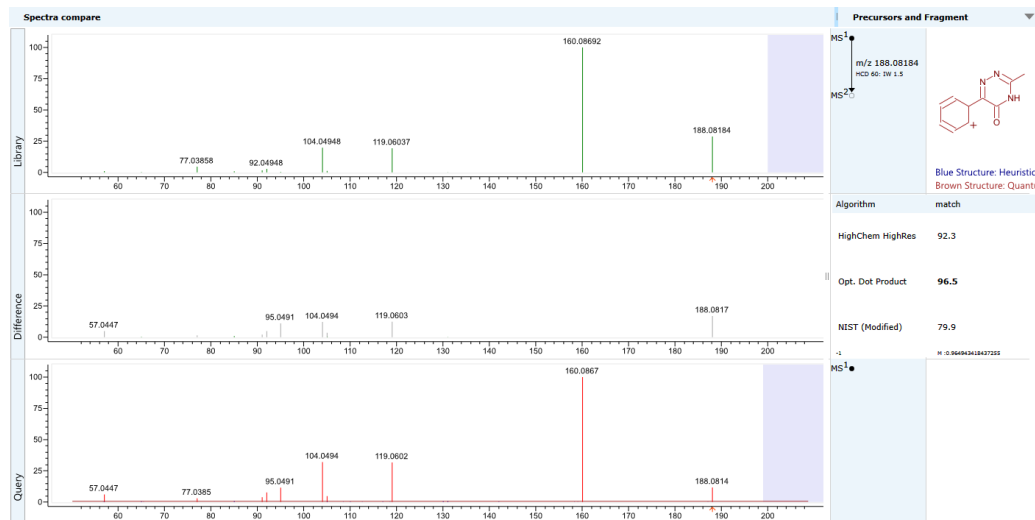


MS1 EN MS2 SPECTRUM VAN ONBEKENDE STOF 1 (DESAMINO METAMITRON)

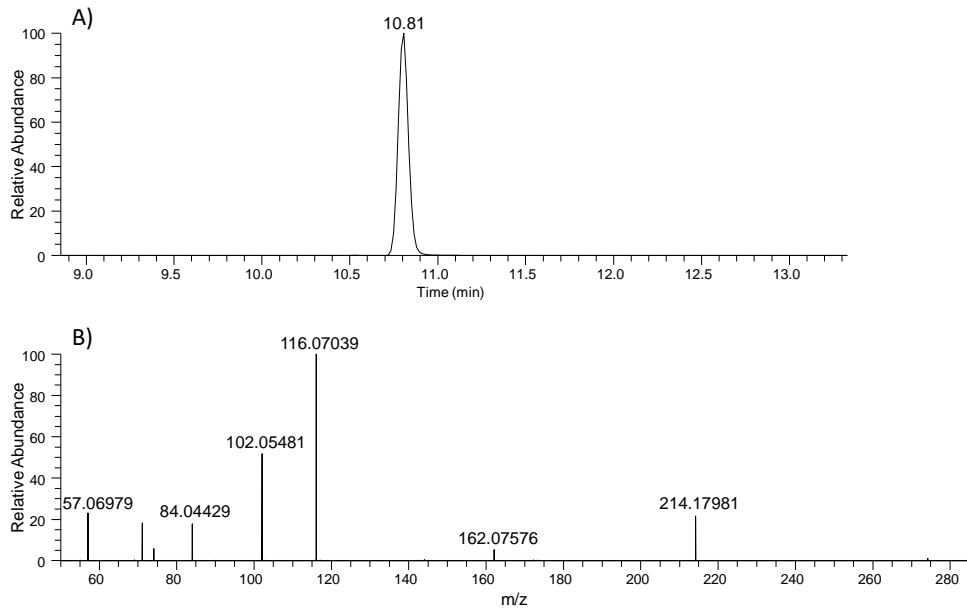


A) EIC van onbekende stof 1 (m/z 188,0817) in monster 1 (50x verdund). B) MS^2 spectrum (HCD 35) van onbekende stof 1 in monster 1.

MZCLOUD BIBLIOTHEEK MATCH VAN ONBEKENDE STOF 1 (DESAMINO METAMITRON)

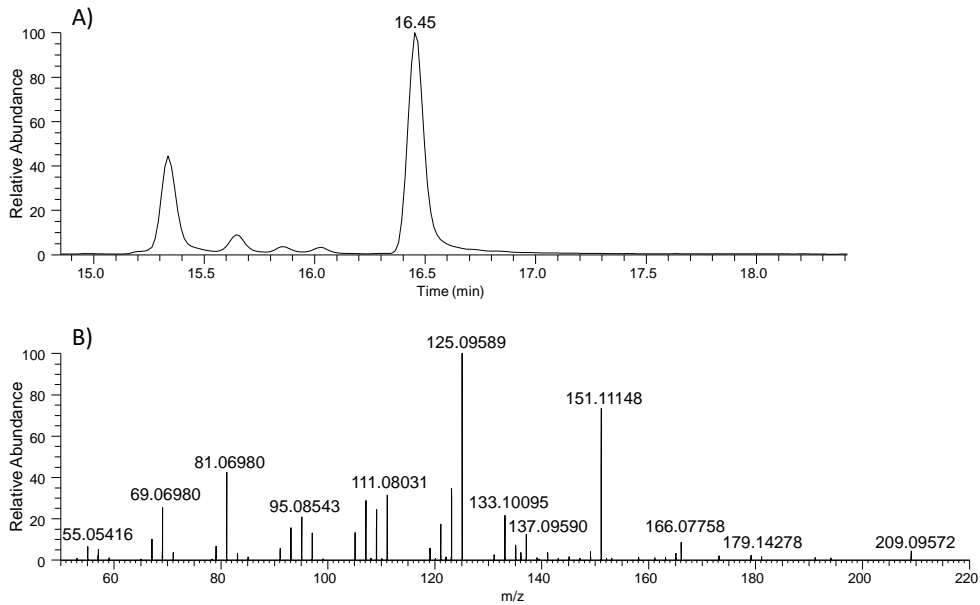


MS1 EN MS2 SPECTRUM VAN ONBEKENDE STOF 2



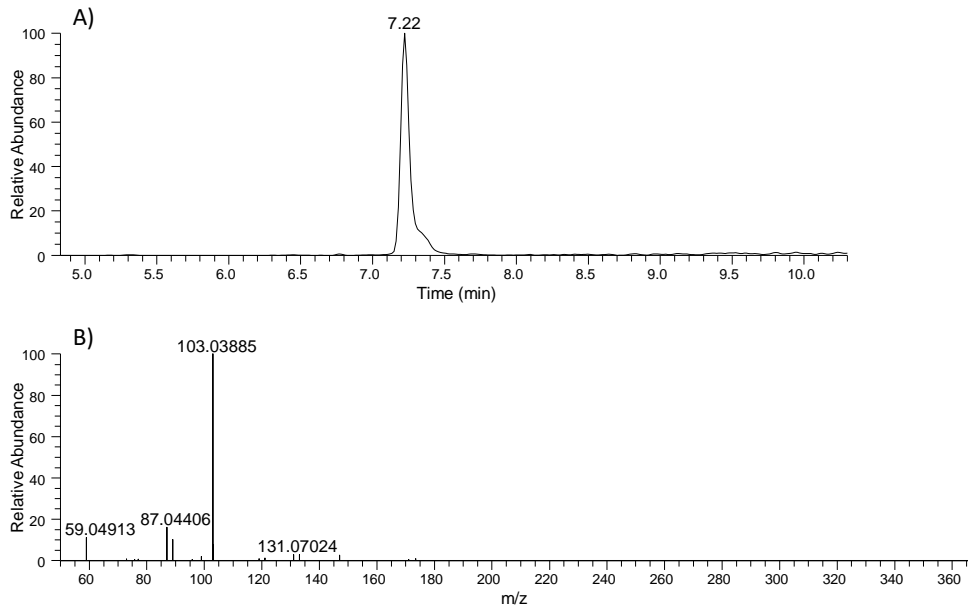
A) EIC van onbekende stof 2 (m/z 274.2008) in monster 1 (50x verdund). B) MS² spectrum (HCD 35) van onbekende stof 2 in monster 1.

MS1 EN MS2 SPECTRUM VAN ONBEKENDE STOF 3



A) EIC van onbekende stof 3 (m/z 209.1534) in monster 1 (50x verdund). B) MS² spectrum (HCD 35) van onbekende stof 3 in monster 1.

MS1 EN MS2 SPECTRUM VAN ONBEKENDE STOF 4



A) EIC van onbekende stof 4 (m/z 355,1596) in monster 1 (50x verdund). B) MS² spectrum (HCD 35) van onbekende stof 4 in monster 1.

Bijlage V rapportage identificatie van onbekende stof in monster 2 door Aqualab Zuid

Aan	Peter van Diepenbeek; WML	Datum	31-3-2017
Van	Gerdien van Genderen - de Kloet	Referentie	OR2017_LCscr_005

Identificatie LCAqua-440

Inleiding

Al in de zomer van 2015, gelijktijdig met het vinden van pyrazool in het effluent van Sitech, werd ook LCAqua-440 in dit effluent en in het Maaswater aangetroffen. Destijds is door KWR en RWS de exacte massa van 205,13316 voor het geprotoneerde molecuul gevonden. De meest waarschijnlijke brutoformule is destijds ook berekend, namelijk als $C_{12}H_{16}N_2O$. Verdere identificatie is niet gelukt vanwege de grote hoeveelheid hits voor deze bruto formule in Chemspider (1639 in 2015, inmiddels zijn het er ruim 7000) en Pubchem (15647 hits). In december 2016/januari 2017 werd LCAqua-440 opnieuw geregeld gevonden in het Maaswater bij Roosteren en Heel. De vraag om identificatie werd daardoor weer sterker. Vanuit de WML is gevraagd of Aqualab Zuid een identificatiepoging kan ondernemen.

Werkwijze

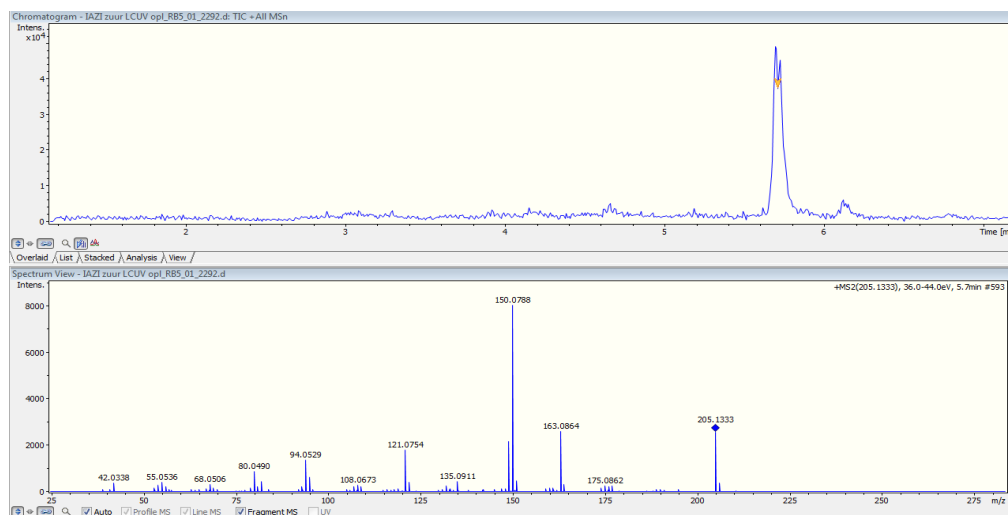
LCAqua-440 is aangetoond mbv LCUV screening. De retentietijd is ongeveer 8 minuten. Van het effluent monster van Sitech waarin LCAqua-440 in een hoge concentratie voor komt is een fractie opgevangen van 7-9 minuten. De meest intense massa na infusie op de QTOF is 205,1329; ook het natrium adduct is zichtbaar. De meest waarschijnlijke bruto formule is $C_{12}H_{16}N_2O$, dit bevestigt de berekening van KWR en RWS.

Vervolgens is een goed fragmentatiespectrum opgenomen (figuur 1). Hieruit zijn 21 fragmenten naar voren gekomen, met wisselende intensiteiten. Voor de fragmenten met de hoogste intensiteiten zijn ook bruto formules berekend. Hieruit wordt al een beeld verkregen van de mogelijke structuur.

Er is gebruik gemaakt van een web-based programma die alle hits voor de bruto formule in Pubchem of Chemspider *in silico* fragmenteert en vervolgens scoort en ranked tegen het gevonden fragmentatiespectrum. In dit geval is gezocht in de database van Pubchem, er werden 15647 hits gevonden voor de bruto formule $C_{12}H_{16}N_2O$. De top-100 geranke componenten is bekeken en geëvalueerd.

De log D is berekend (Chemaxon) voor een aantal van de getoonde structuren bij verschillende pH's. Een aantal componenten zullen geladen zijn bij pH = 2 waardoor er een

verschil in retentietijd op zal treden ten opzichte van pH = 4. Voor LCAqua-440 en een aantal bekende componenten is gekeken naar het verschil in retentietijd bij eluens met pH = 2 en eluens met pH = 4.



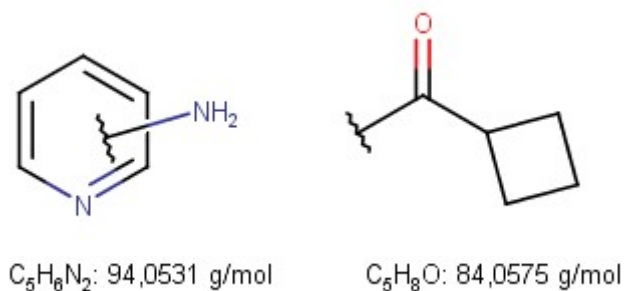
Figuur 1. UPLC chromatogram en fragmentatiespectrum van massa 205,1329.

Resultaten

In tabel 1 is een deel van de gevonden fragmenten weergegeven. Het fragment met massa 150,0793 heeft de hoogste intensiteit. De bruto formule van dit fragment is C₈H₁₀N₂O, het afgesplitste deel is C₄H₇, een onverzadigde of cyclische alkylgroep. In de gevonden hits komen een aantal varianten voor die deze groep goed kunnen verklaren, bijvoorbeeld een cyclobutylgroep of methylcyclopropylgroep. De afsplitsing van C₃H₆ wat de massa 163,0870 geeft, zal hoogst waarschijnlijk onderdeel zijn van C₄H₇, of C₄H₇ bestaat uit een fragment met drie koolstofatomen en een losse methylgroep. In figuur 2 worden twee fragmenten weergegeven die het fragment met massa 94,0531 en de afsplitsing met massa 84,0575 goed kunnen verklaren. Twee methylgroepen zouden dan de bruto formule C₁₂H₁₆N₂O geven.

Tabel 1: Fragmenten, bruto formules en het afgesplitste fragment

Exacte massa	Intensiteit	Afsplitsing (MW)	Afsplitsing (bruto formule)	Bruto formule volgens Keio en Riken
205,1339	257	-	-	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O
189,1026	26	16.013	CH ₄	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O
177,1399	21	27.994	CO	C ₁₁ H ₁₇ N ₂
163,0870	154	42.0469	C ₃ H ₆	C ₉ H ₁₁ N ₂ O
150,0793	599	55.0546	C ₄ H ₇	C ₈ H ₁₀ N ₂ O
149,0713	173			C ₈ H ₉ N ₂ O
121,0764	151	84.0575	C ₅ H ₈ O	C ₇ H ₉ N ₂
107,0609	38		121.0764 - methyl?	C ₆ H ₇ N ₂
94,0531	107	111.0808	C ₇ H ₁₁ O	C ₅ H ₆ N ₂
80,0499	73			C ₅ H ₆ N (pyridine?)

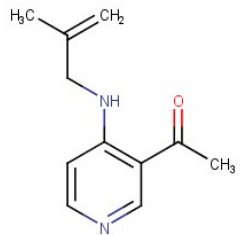
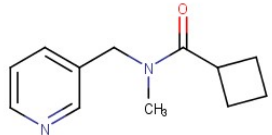
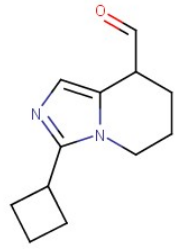
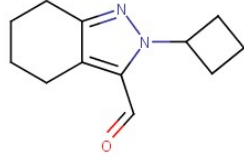


Figuur 2. Mogelijke structuren bij de gevonden fragmenten.

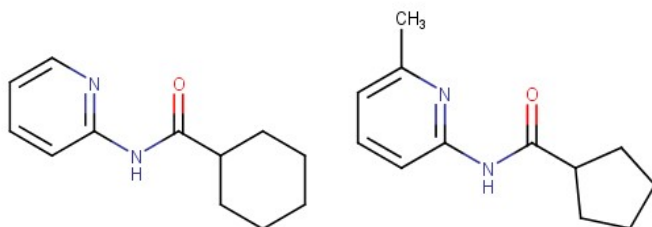
In tabel 2 worden een aantal hits weergegeven die gevonden zijn met het programma Metfrag. Ze zijn getoond in de volgorde zoals ze gerankt zijn door Metfrag, met de score er bij. Al deze hits verklaren 19 van de 21 fragmenten, het zijn steeds dezelfde twee fragmenten die niet verklaard worden. Deze twee fragmenten, met lage intensiteiten, horen wellicht niet bij het fragmentatiespectrum, maar zijn mogelijk achtergrondsignalen. De hits in tabel 2 geven een goed beeld van de top-100 lijst van hits die Metfrag heeft gegenereerd. Een aantal mogelijke componenten zijn niet getoond omdat deze minder dan 19 fragmenten verklaren. Er zijn steeds meerdere varianten van de getoonde structuren mogelijk.

Tabel 2. Zeven divers gekozen hits die in meerdere varianten voorkomen in de top-100 hitlijst van Metfrag.

Ranking in Metfrag	Structuur	Score in Metfrag	Opmerking
1		1.0 (19/21) (8 varianten)	Een afsplitsing van een ethylgroep zou verwacht worden maar is niet zichtbaar
9		0.9802 (19/21) (3 varianten)	
11		0.9798 (19/21) (meerdere varianten)	

13		0.9789 (19/21) 14 varianten	Afsplitsing van C ₂ H ₃ O is niet gevonden
29		0.946 (19/21) (meerdere varianten)	Kan fragment 94,0531 niet goed verklaren
75		0.9157 (19/21) (meerdere varianten)	Kan fragmenten 94,0531 en 80.0499 niet goed verklaren
78		0.9126 (19/21) (meerdere varianten)	Kan fragmenten 94,0531 en 80.0499 niet goed verklaren

Lang niet alle getoonde stoffen in tabel 2 zijn commercieel verkrijgbaar. Dit is niet gecontroleerd voor alle 100 hits, dat is handmatig nauwelijks te doen. Voor de meest waarschijnlijke structuur, nummer 11, zijn twee componenten te koop met dezelfde bruto formule. De verwachting is dat het fragmentatiespectrum op bepaalde punten zal afwijken van de gevonden component in het effluent van Sitech. Er zouden echter ook overeenkomsten moeten zijn, die het vermoeden van de meest waarschijnlijke component zouden bevestigen. Daarnaast zouden de componenten gebruikt kunnen worden voor een retentietijden experiment bij verschillende pH's. Ook dat zou aanvullende informatie kunnen geven.



Sigma Aldrich: 121 euro AKos: 180 euro incl verzendkosten

Figuur 3. Commercieel verkrijgbare componenten om de theorie te testen.

In onderstaande tabel worden de retentietijden weergegeven voor een aantal bekende componenten en LCAqua-440 bij twee verschillende pH's. Daarnaast is de log D berekend en weergegeven bij dezelfde twee pH's. De berekende log D waarden verklaren niet alle

veranderingen in retentietijd, maar laten wel zien dat LCAqua-440 een licht basische component moet zijn. De twee commercieel verkrijgbare componenten laten een verschil in log D zien waardoor het de verwachting is dat beide componenten ook sneller elueren bij een lagere pH.

Tabel 3. Log D in verhouding tot retentietijd.

	Brukermethode	0,1% mierenzuurmethode	delta T	logD	logD
	pH = 4	pH = 2		Bij pH = 4	Bij pH = 2
Caffeine	5,61	6,05	0,44	-0,6	-0,9
Atrazine	9,31	9,91	0,6	2,0	1,0
Isoproturon	9,45	10,05	0,6	2,6	2,6
TPPO	9,98	10,52	0,54	4,8	4,8
Carbendazim	6,68	5,31	-1,37	1,4	0,4
LCAqua-440	5,71	4,79	-0,92		
Hit #1 uit tabel 2				1,4	1,0
Hit #9 uit tabel 2				1,4	1,1
Hit #11 uit tabel 2				1,5	0,5
AKos component				1,6	0,5
Sigma Aldrich component				2,4	1,3

Conclusie

Met behulp van het fragmentatiespectrum voor C₁₂H₁₆N₂O is geprobeerd de chemische structuur te ontrafelen. Er is gebruik gemaakt van een web-based programma om mogelijke structuren te scoren en te ranken. De meest waarschijnlijke structuur, die het fragmentatiepatroon het beste verklaard, is de op plaats 11 gerankte structuur. Hiervan zijn meerdere varianten mogelijk, maar het is niet mogelijk om aan de hand van het fragmentatiespectrum meer te zeggen over de plaats van methylgroepen of over de positie van de substituenten op de pyridine ring.

In figuur 3 worden twee commercieel verkrijgbare componenten getoond die niet al te duur zijn. Het voorstel is om beide componenten aan te schaffen om hiermee een deel van het fragmentatiepatroon te bevestigen en onderzoek te doen naar de relatie tussen de pH en de retentietijd van LCAqua-440.

Mogelijk kan Sitech aan de hand van de getoonde structuren in tabel 2 meer informatie leveren over de identiteit van LCAqua-440.

Bijlage VI Resultaten IMS monster 1

TABEL 10: ONBEKENDE STOF 1 RESULTATEN IMS-QTOF (UNIFI)

<i>m/z</i>	Elemental Composition	i-FIT Confidence (%)	Common Name	Fragment Matches	Predicted Intensity (%)	Citations	Voorspelde CCS	Afwijking t.o.v. praktische CCS (137.13)
188.0810	C10H9N3O	18.76	Metamitron-desamino	6	44	113	135.8495	0.9%
188.0810	C10H9N3O	18.76	2-Methyl-6-(2-pyridinyl)-4(1H)-pyrimidinone	6	44	31	137.1178	0.0%
188.0810	C10H9N3O	18.76	6-Methyl-3-phenyl-1,2,4-triazin-5(2H)-one	6	44	20	137.2943	-0.1%
188.0810	C10H9N3O	18.76	4-Amino-1-phenyl-2(1H)-pyrimidinone	6	67	19	135.6320	1.1%
188.0810	C7H10FN3O2	51.06	4-Amino-1-(3-fluoro-2-hydroxypropyl)-2(1H)-pyrimidinone	5	36	3	133.9775	2.3%

TABEL 11: ONBEKENDE STOF 2 RESULTATEN IMS-QTOF (UNIFI)

<i>m/z</i>	Elemental Composition	i-FIT Confidence (%)	Common Name	Fragment Matches	Predicted Intensity (%)	Citations	Voorspelde CCS	Afwijking t.o.v. praktische (164.73)
274.2001	C14H27NO4	99.94	2-Methyl-2-propanyl (2S)-2-[(2R)-3-amino-2-methylpropanoyl]oxy-4-methylpentanoate	6	52	4	170.1222	-3.3%
274.2001	C14H27NO4	99.94	9-[(2-Methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl}amino)nonanoic acid	5	69	57	172.7216	-4.9%
274.2001	C14H27NO4	99.94	Bis(2-methyl-2-propanyl) 3,3'-iminodipropoate	5	51	22	172.8117	-4.9%
274.2001	C14H27NO4	99.94	Decyl N-(methoxycarbonyl)glycinate	5	71	4	171.1157	-3.9%
274.2001	C14H27NO4	99.94	Nonyl N-(methoxycarbonyl)alaninate	5	71	4	172.2658	-4.6%

TABEL 12: ONBEKENDE STOF 3 RESULTATEN IMS-QTOF (UNIFI)

<i>m/z</i>	Elemental Composition	i-FIT Confidence (%)	Common Name	Fragment Matches	Predicted Intensity (%)	Citations	Voorspelde CCS	Afwijking t.o.v. praktische (144.75)
209.1526	C13H20O2	99.98	Methyl (5E)-2-methylene-5,10-undecadienoate	22	65	11	154.6882	-6.9%
209.1526	C13H20O2	99.98	2-[4-(Pentyloxy)phenyl]ethanol	16	58	16	149.3721	-3.2%
209.1526	C13H20O2	99.98	(-)-Carvyl propionate	14	42	53	163.0325	-12.6%
209.1526	C13H20O2	99.98	4-(3-Hydroxy-1-butyn-1-yl)-3,5,5-trimethyl-3-cyclohexen-1-ol	14	43	15	145.5746	-0.6%
209.1526	C13H20O2	99.98	(3E)-4-(4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one	14	43	14	144.9448	-0.1%

TABEL 13: ONBEKENDE STOF 5 RESULTATEN IMS-QTOF (UNIFI)

<i>m/z</i>	Elemental Composition	i-FIT Confidence (%)	Common Name	Fragment Matches	Predicted Intensity (%)	Citations	Voorspelde CCS	Afwijking t.o.v. praktische CCS (152.50)
276.0810	C12H18ClNO2S	98.3	dimethenamid	5	76	118	154.8709	-1.6%
276.0810	C12H18ClNO2S	98.3	dimethenamid-P	5	76	36	154.8709	-1.6%
276.0810	C12H18ClNO2S	98.3	N-(3-Chloropropyl)-2,4,6-trimethylbenzenesulfonamide	2	3	22	157.6268	-3.4%

TABEL 14: BEKENDE STOF 1 RESULTATEN IMS-QTOF (UNIFI)

<i>m/z</i>	Elemental Composition	i-FIT Confidence (%)	Common Name	Fragment Matches	Predicted Intensity (%)	Citations	Voorspelde CCS	Afwijking t.o.v. praktische CCS (119.49)
120.0549	C6H5N3	48.9	1,2,3-Benzotriazole	1	100	688	119.7220	-0.2%

TABEL 15: BEKENDE STOF 2 RESULTATEN IMS-QTOF (UNIFI)

<i>m/z</i>	Elemental Composition	i-FIT Confidence (%)	Common Name	Fragment Matches	Predicted Intensity (%)	Citations	predicted	152.28
230.1161	C9H16ClN5	100	6-(2-Chloroethyl)-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	6	37	6	148.3024	2.6%
230.1161	C9H16ClN5	100	Terbutylazine	4	43	326	149.3285	1.9%
230.1161	C9H16ClN5	100	propazine	4	41	312	150.9119	0.9%
230.1161	C9H16ClN5	100	sebutylazine	4	43	74	149.4836	1.8%
230.1161	C9H16ClN5	100	6-Chloro-N,N'-dipropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	4	41	20	150.0483	1.5%

Bijlage VII verslag EMCOM 2018 congres

Van 25 tot en met 28 Juni 2018 werd het 6th International Conference on Emerging Contaminants gehouden in Oslo, Noorwegen. Er waren 140 deelnemers uit 26 landen. Patrick Bäuerlein, Erik Emke en Cheryl Bertelkamp presenteerden hun werk over respectievelijk analysetechnieken voor nano/microplastics, drugs en het onderzoek naar pyrazool.

Op maandagavond werd het congres geopend met presentaties van drie keynote speakers. Zo vertelde Katrin Vorkamp (Aarhus University) over het onderzoek naar de aanwezigheid van emerging contaminants (met name microplastics) in het arctisch ecosysteem (o.a. de aanwezigheid van deze stoffen in orka, ijsberen, zehonden, vogels). Niet alleen tijdens deze presentatie, maar eigenlijk gedurende het hele congres was er heel veel aandacht voor microplastics. Er is nog maar weinig bekend (aanwezigheid in bronnen en welke processen effectief zijn voor het verwijderen van deze componenten) en het is een zeer sterk groeiend veld.

Alistair Boxall (University of York, Engeland) verzorgde de tweede keynote en besprak het probleem van de sterke urbanisatie en het gebrek aan inzicht in hoe mensen die in de stad wonen, worden blootgesteld aan verschillende vervuilingbronnen (lucht, water). Zijn onderzoeksgroep kijkt naar mogelijkheden om een tool te ontwikkelen die kan helpen bij de besluitvorming. De tool kan de vervuilingbronnen in kaart brengen en er kan ook gekeken worden hoe deze te reduceren. Hiervoor wordt gebruikt gemaakt van sensoren en monitoring robots. Het gebruiken van mobiele meetapparatuur en het combineren van data afkomstig van verschillende bronnen zal in de toekomst een belangrijke en veelbelovende middel zijn om inzicht in de chemische waterkwaliteit te krijgen. De keynote van Edward Kolodziej hieronder liet ook goed zien hoe het combineren van data kan leiden tot informatie over de waterkwaliteit.

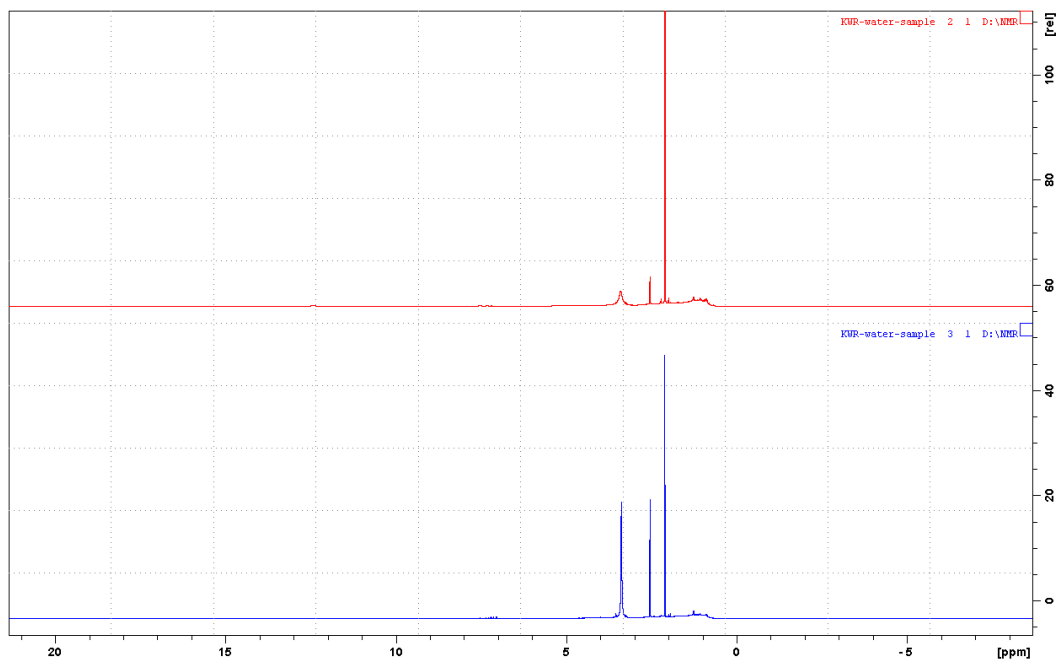
De keynote van Edward Kolodziej (Centre for Urban Waters, University of Washington) liet de relatie tussen chemicaliën uit regenwater en het ecosysteem presenteren. Er is nog maar weinig onderzoek gedaan naar het type chemicaliën dat aanwezig is in regenwater en wat voor impact deze hebben op het ecosysteem. Met het uitgevoerde onderzoek werd aangetoond dat er een relatie bestaat tussen deeltjes van rubber banden (aanwezig in het regenwater dat uitspoelt) en de sterfte van zalm in het onderzoeksgebied.

Verder werd tijdens deze conferentie nog eens duidelijk hoe belangrijk non-target screening wereldwijd is om de kwaliteit van water te monitoren en in kaart te brengen. Presentatie van verschillende instituten zoals het NIVA, KWR, de universiteit van Jerusalem, Hanyang University, University of Queensland en andere hebben dit duidelijk gemaakt. Voor non-target screening werden naast de inmiddels bekende technieken zoals LC ook SFC (supercritical fluid chromatography) toegepast. Voor SFC wordt voornamelijk CO₂ gebruikt. Hierdoor is het mogelijk organische extracten direct te injecteren. Verder wordt een verbeterde scheiding bereikt en de hoeveelheid organisch oplosmiddelen verminderd.

Bijlage VIII NMR-meetgegevens

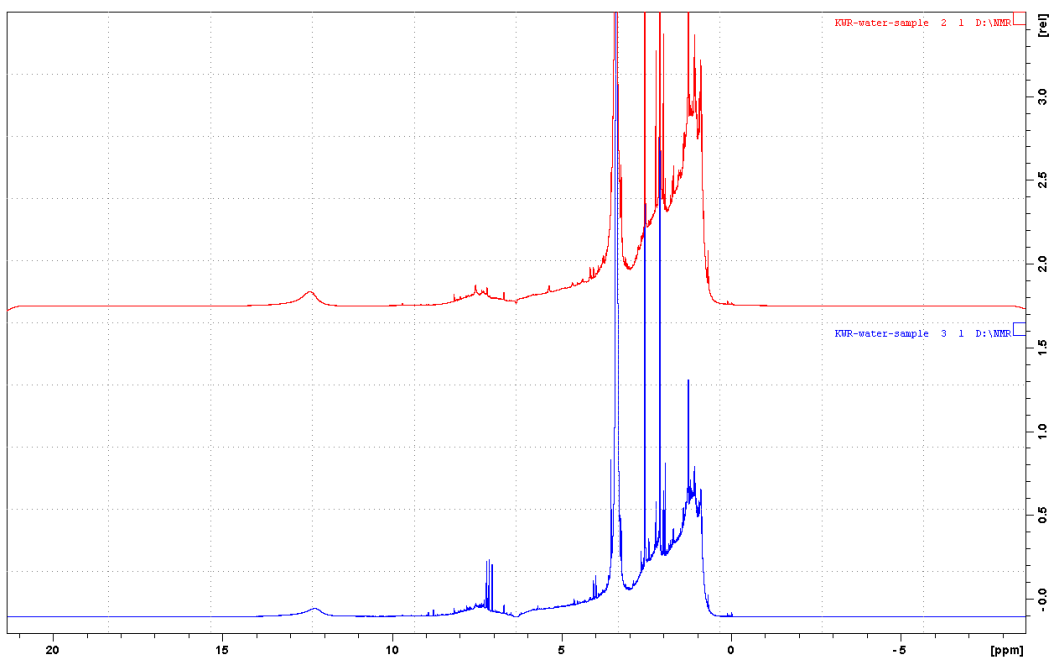
NMR-analyse van beide extracten zonder verdere bewerking

Beide door KWR aangeleverde monsterextracten zijn in eerste instantie door de WUR geanalyseerd zonder verdere bewerking.



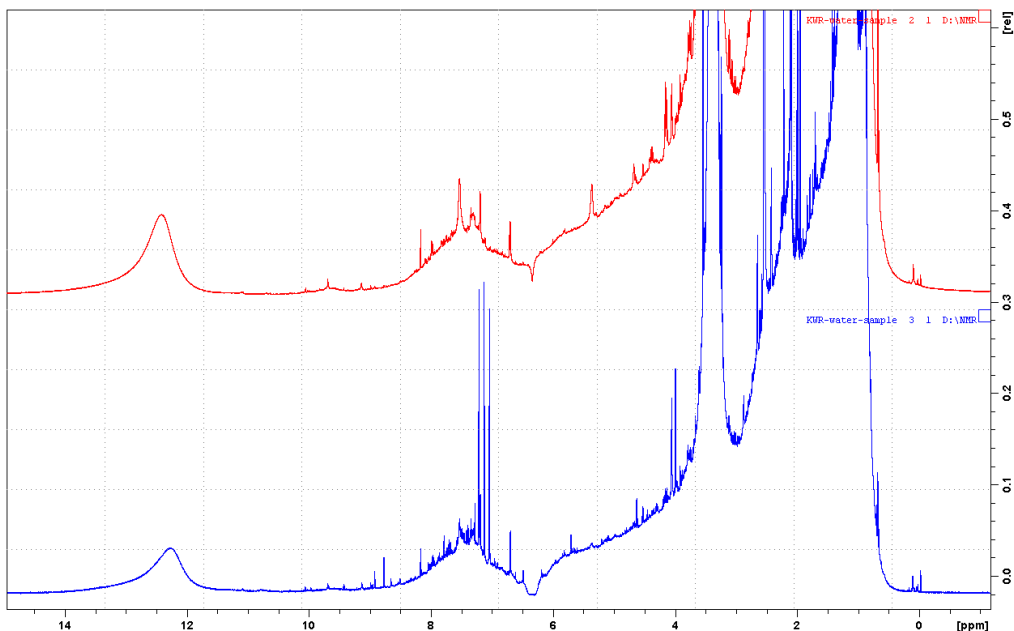
Figuur 1a: ¹H NMR spectra van monster 1 (rood) en monster 2 (blauw) zonder verdere voorbereiding.

Bij geringe vergroting van de spectra (NMR heeft een enorm lineair dynamische bereik dus spectra kunnen eenvoudig 1000X vergroot worden) vallen 3 pieken op, acetonitril (van de monstervoorbereiding), dimethylsulfoxide (toegevoegd voor de NMR-analyse) en water.



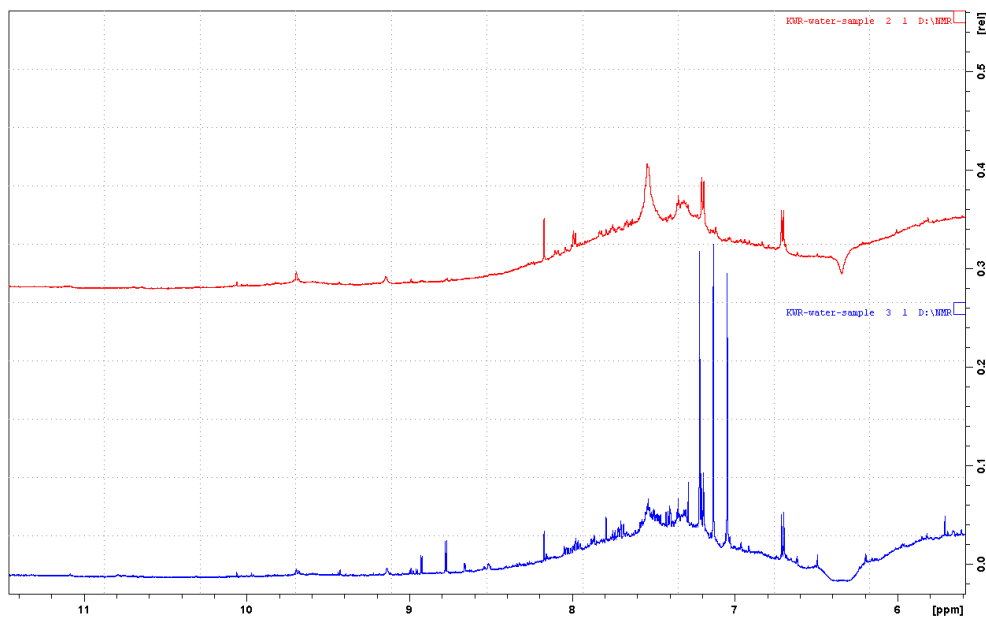
Figuur 1b: Uitvergroting (i) van ^1H NMR spectra van monster 1 (rood) en monster 2 (blauw) zonder verdere voorbereiding.

Bij vergroting van de spectra is er duidelijk meer intensiteit van veel componenten te zien. Ervaring met zuiveringen leert dat de grote piekenberg rechts in het spectrum, materiaal is afkomstig van de concentrering van het sample (heel veel CH_2 - en CHOH - groepen). Dit is nog duidelijker te zien bij een verdere vergroting van de spectra hieronder.



Figuur 1c: Uitvergroting (ii) van ^1H NMR spectra van monster 1 (rood) en monster 2 (blauw) zonder verdere voorbereiding.

Het achtergrond signaal valt in drie gebieden uiteen, van 13-12 ppm (links) COOH groepen, van 8-6 ppm (midden) aromatische CH groepen, en van 5-0 ppm (CHOH en CH₂ groepen).

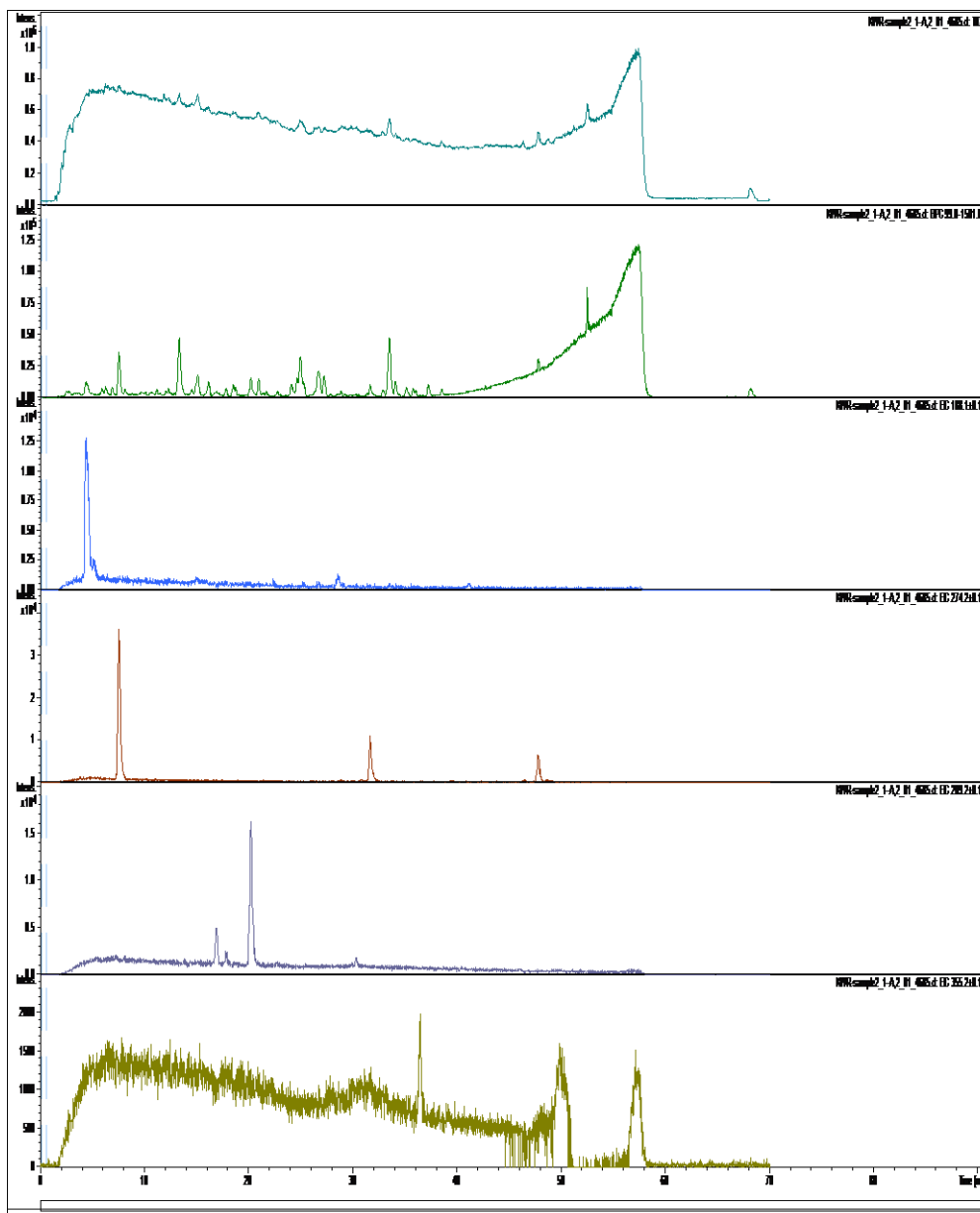


Figuur 1d: Uitvergroting (iii) van ¹H NMR spectra van monster 1 (rood) en monster 2 (blauw) zonder verdere voorbewerking.

Omdat op basis van MS gegevens verwacht werd dat er aromatische verbindingen aanwezig zouden moeten zijn, is in het spectrum hierover het aromatische gebied nog verder vergroot. Duidelijk is dat er vele kleine en scherpe pieken tegen een brede achtergrond te zien zijn. Dit wijst op een enorme mix aan verbindingen in het monster en zuivering van de interessante verbindingen zal een uitdaging zijn.

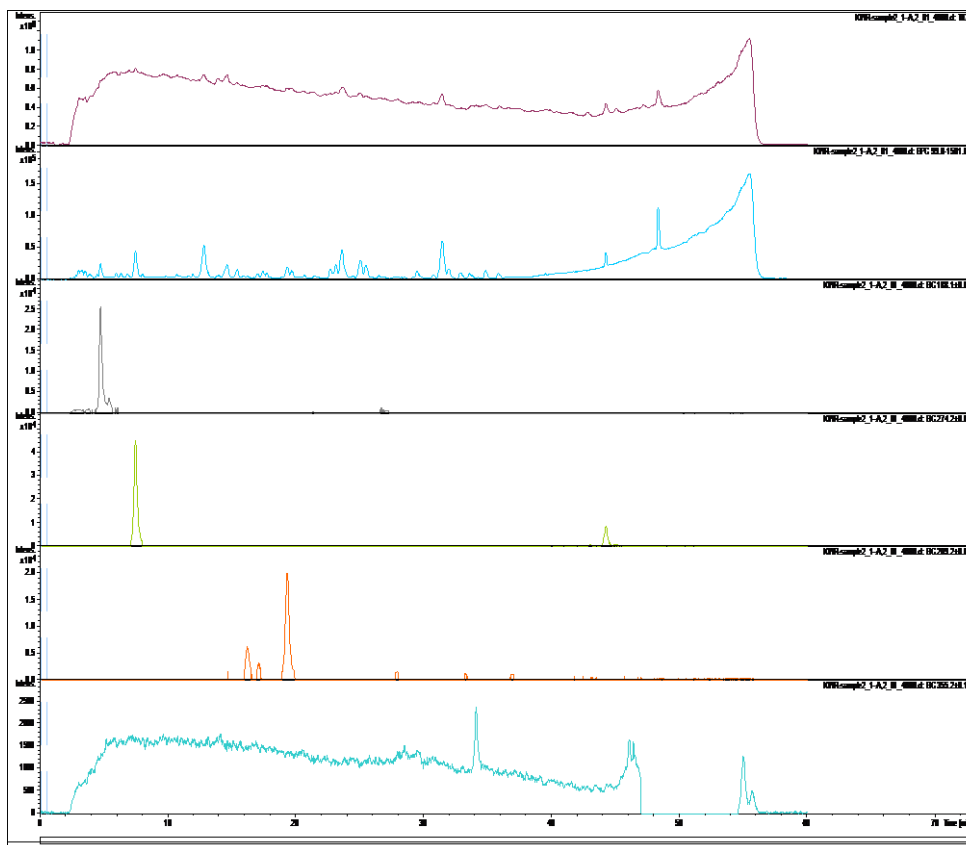
NMR-analyse van beide extracten ná fractionering en zuivering

Hieronder is een LC-MS chromatogram te zien met in bovenste chromatogram de Total Ion Count (TIC) in de positieve ionisatie modus, daaronder (in groen) het basepeak chromatogram (BPI) en de massa pieken van interesse (m/z 188,0817; 274,2008; 209,1534 en 355,1596). Te zien is dat er naast de stof met massa 274,2008 er diverse pieken zijn die bijna dezelfde massa hebben.



Figuur 2a: LC-MS chromatogram (positieve ionen) van monster 1. Van boven naar beneden: TIC, BPI, BPI van de 4 onbekende stoffen in monster 1 (m/z 188,0817; 274,2008; 209,1534 en 355,1596).

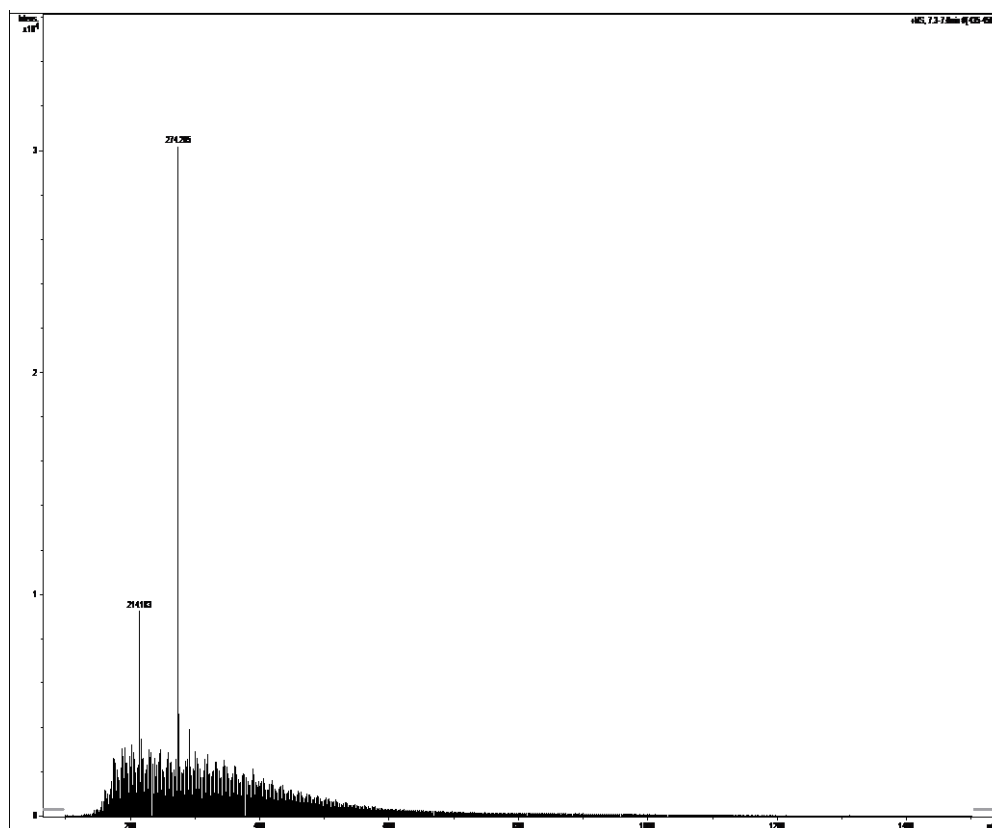
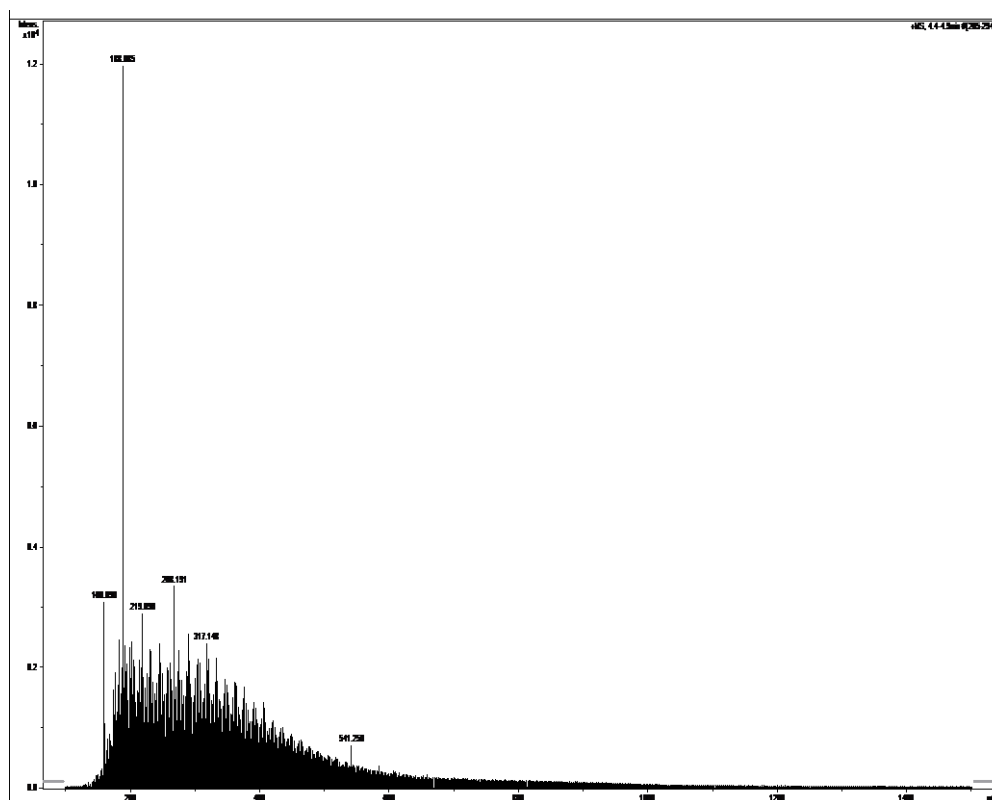
Na opnieuw zuiveren is nogmaals een LC-MS analyse uitgevoerd. Het chromatogram is hieronder weergegeven en vrijwel identiek aan he vorige chromatogram, de massapieken van interesse zijn op dezelfde retentietijden te zien als een eerder injectie. De onderste component, met massa 355,1596, is erg ruzig en mogelijk erg laag in concentratie.



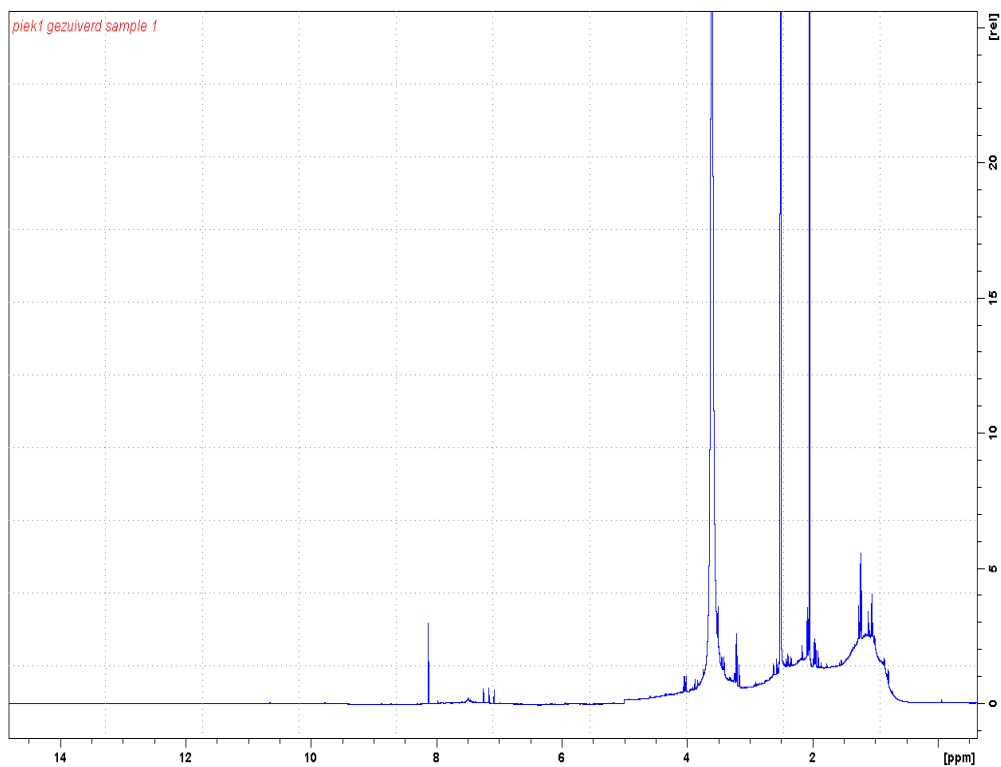
Figuur 2b: LC-MS chromatogram (positieve ionen) van monster 1 na een extra zuiveringsstap.

Alhoewel de pieken op het eerste oog schoon lijken is dit niet het geval wanneer de componenten die tegelijk bv met de eerste piek (188,0817) of de tweede piek (274,2008) van de kolom komen.

Zie onderstaande massa spectra. De verontreinigingen die mee gezuiverd worden zijn bijna zeker alifatische componenten met meer of minder CHOH en COOH groepen. Bij iedere retentietijd zijn er veel steeds weer iets andere componenten die van de kolom komen.



Figuur 3: Full scan massspectra van onbekende stof 1 en 2.



Figuur 4: NMR-spectrum van stof 1 na een extra zuiveringsstap.

Het NMR spectra geeft aan dat er nog steeds veel verontreiniging aanwezig is maar minder dan bij het minder gezuiverde monster.