



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

(Ausgabe 2.0 2025)

Wasserchemische Gesellschaft

Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker

Impressum

Ausgabe 2.0 2025

Erschienen in Koblenz, Oktober 2025

Verantwortlich für den Inhalt:

Dr. Wolfgang Schulz
Hochschule Aalen - Technik, Wirtschaft und Gesundheit
Beethovenstraße 1
73430 Aalen
Wolfgang.Schulz@hs-aalen.de

Herausgeber:

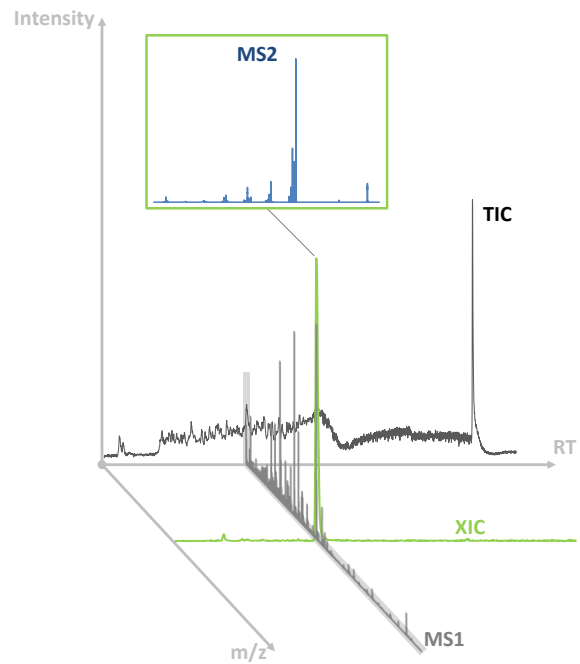
Fachausschuss "Non-Target-Screening" der
Wasserchemischen Gesellschaft
Bundesanstalt für Gewässerkunde
Am Mainzer Tor 1
56068 Koblenz
T +49 69 7917-368
E: wasserchemische-gesellschaft@go.gdch.de
Web: <https://www.gdch.de/netzwerk-strukturen/fachstrukturen/wasserchemische-gesellschaft.html>

©Wasserchemische Gesellschaft

Das Urheberrecht für dieses Dokument liegt bei den mitwirkenden Autoren. Alle Anfragen zur Wiedergabe und Reproduktion in jedem Medium, einschließlich Übersetzungen, sollten direkt an das Sekretariat der Wasserchemischen Gesellschaft gerichtet werden. Der Text darf zwecks Weiterverkaufs nicht kopiert werden.

Leitfaden

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



Ausgabe 2.0 2025



Non-Target-Screening in der Wasseranalytik

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

Ausgabe 2.0 2025

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

Mitglieder des Fachausschusses

**Leitung: Bader, Tobias
Jewell, Kevin**

Armbruster, Dominic
Brüggen, Susanne
Cunha, Ricardo
Götz, Sven
Härtel, Christoph
Käberich, Merle
Kronsbein, Anna Lena
Kunkel, Uwe
Letzel, Thomas
Liebmann, Diana
Liesener, André
Logemann, Jörn
Lucke, Thomas
Macherius, André
Merkus, Valentina
Petri, Michael
Reineke, Anna
Renner, Gerrit
Ruppe, Steffen
Scheurer, Marco
Schlüsener, Michael
Schulz, Wolfgang
Singer, Heinz
Türk, Jochen
Zahn, Daniel
Zwiener, Christian

Zweckverband Landeswasserversorgung

Bundesanstalt für Gewässerkunde

DVGW-Technologiezentrum Wasser
Landesamt für Natur, Umwelt und Klima Nordrhein-Westfalen
Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V. (IUTA)
Hessenwasser GmbH & Co. KG
Ruhrverband
DVGW-Technologiezentrum Wasser
Umweltbundesamt
Bayerisches Landesamt für Umwelt
Analytisches Forschungsinstitut für Non-Target Screening GmbH (AFIN-TS)
Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB)
Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH
Freie und Hansestadt Hamburg
Zweckverband Landeswasserversorgung
Bayerisches Landesamt für Umwelt
Hamburger Wasserwerke GmbH
Zweckverband Bodensee-Wasserversorgung
Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH
Universität Duisburg-Essen
Amt für Umwelt und Energie Basel
LUBW Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg
Bundesanstalt für Gewässerkunde
Hochschule Aalen - Technik, Wirtschaft und Gesundheit
Eawag-Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology
Kooperationslabor Ruhrverband und Emschergerossenschaft/Lippeverband
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
Universität Tübingen

Zitierempfehlung

Zitation des Leitfadens wie folgt: „W. Schulz *et al.*, Leitfaden: Anwendung des Non-Target-Screenings mittels LC-ESI-HRMS in der Wasseranalytik (2025). ISBN 978-3-947197-25-5, Download unter <https://www.gdch.de/netzwerk-strukturen/fachstrukturen/wasserchemische-gesellschaft/publikationen/wchg-ausschuesse.html>”

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung	7
2 Anwendungsbereich.....	9
3 Begriffe und Abkürzungen	9
4 Grundlage des Verfahrens	13
4.1 Non-Target-Screening.....	13
4.2 Suspect-Target-Screening.....	14
5 Blindwert-Signale	14
5.1 Blindwerte-Signale durch die Probenahme.....	14
5.2 Blindwertsignale durch die Analyse	15
5.3 Messung von Blindwert-Proben.....	15
6 Probenahme.....	15
6.1 Allgemein	15
6.2 Qualitätssicherung bei der Probenahme.....	16
6.3 Probenbezeichnung/Probenbeschreibung.....	16
7 Reagenzien.....	17
7.1 Allgemeines.....	17
7.2 Eluenten.....	17
7.3 Betriebsgase für Massenspektrometer	17
7.4 Referenzsubstanzen	17
7.5 Interne Standardsubstanzen (IS).....	17
7.6 Herstellung der Lösungen	17
7.6.1 Stammlösung (Referenzsubstanzen)	17
7.6.2 Dotierlösungen (IS)	18
7.6.3 QS-Standard (Kontrollstandard)	18
8 Geräte.....	18
8.1 Allgemeines.....	18
8.2 Probengläser.....	18
8.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	19
8.3.1 Allgemein	19
8.3.2 HPLC-Säule	19
8.4 Massenspektrometer.....	19
8.4.1 Allgemein	19
8.4.2 Ionenquelle	20
9 Durchführung	21
9.1 Probenvorbereitung.....	21

9.2	Chromatographie.....	22
9.3	Massenspektrometrie	22
9.3.1	Ionenquelle/Ionisationstechnik	22
9.3.2	Messtechnik	23
9.3.3	Massenkalibration und Massengenauigkeit	24
9.3.4	QS der LC-HRMS-Messung	25
10	Auswertung	25
10.1	Prozessierung der Messdaten	25
10.1.1	Schwerpunktsbildung (Centroiding)	26
10.1.2	Peakfinding	27
10.1.3	Alignment	29
10.1.4	Blindwertkorrektur	30
10.1.5	Komponentisierung	30
10.1.6	Summenformelgenerierung	30
10.2	Interpretation	31
10.2.1	Identifizierung.....	32
10.2.1.1	Datenbanken.....	33
10.2.1.2	Metadaten.....	34
10.2.2	Statistische Methoden	34
11	Bewertung und Angaben der Ergebnisse - Analysenbericht	37
11.1	Bewertung des Peakfindings	37
11.2	Bewertung des Alignments.....	38
11.3	Bewertung der statistischen Datenanalyse	38
11.4	Bewertung der Datenbanksuche	39
12	Validierung	39
12.1	Validierungsparameter - Validierungsplan	40
12.2	Qualitative NTS-Analysenergebnisse (Klassifizierung von Proben)	41
13	Qualitätssicherungskonzept	46
13.1	Einleitung	46
13.2	QS-Parameter	46
13.2.1	Allgemein	46
13.2.2	Stabilität der Chromatographie	48
13.2.3	Intensität/Empfindlichkeit.....	48
13.2.4	m/z -Genauigkeit und spektrale Auflösung	48
13.2.5	Vergleichbarkeit	48
13.3	Probenahme.....	50
13.4	Probenvorbereitung.....	51
14	Vergleichsuntersuchungen	52
14.1	Teilnehmer	52
14.2	Durchführung	53
14.2.1	Vergleichsmessung A.....	53
14.2.2	Vergleichsmessung B.....	53
14.3	Ergebnisse	54
14.3.1	Eingesetzte Methoden.....	54
14.3.2	Sensitivität.....	54

14.3.3	Massengenauigkeit MS	54
14.3.4	Massengenauigkeit der Fragmentmassen (MS/MS)	56
14.3.5	Datenauswertung und Substanzidentifizierung	59
14.3.6	Workflowvergleich am Beispiel eines Labors	61
15	Literaturverzeichnis	63
Anhang A.	Fachausschuss „Non-Target-Screening“	I
A.1	Hintergrund und Aufgaben	I
A.2	Mitglieder des FA (Stand 2025)	I
Anhang B.	Massen- und RT-Kontrolle	IV
B.1	Isotopenmarkierte interne Standards	IV
B.2	Standard zur Retentionszeitnormierung und Anwendung	VII
Anhang C.	Methodisches	IX
C.1	Beispiele von LC-Methoden	IX
C.2	Beispiele von MS-Methoden	XI
C.3	Blindwertmessungen	XIII
C.4	Retentionszeit-Masse-Plot von Blindwerten	XV
Anhang D.	Messtechnik	XVI
D.1	HRMS Massenspektrometer	XVI
Anhang E.	Systemstabilität	XVIII
E.1	Chromatographie	XVIII
E.2	Massenspektrometrie	XVIII
Anhang F.	Datenauswertung	XX
F.1	Anpassung von intensitätsabhängigen Parametern für die Peak-Extraktion am Beispiel des „Noise Threshold“ der MarkerView™-Software (SCIEX)	XX
Anhang G.	Adduktbildung beim Einsatz einer ESI-Quelle	XXII
G.1	Addukte und <i>in-source</i> -Fragmente	XXII
Anhang H.	Statistische Methoden	XXV
Anhang I.	Workflow	XXVII
I.1	Beispiel für einen typischen Screening-Workflow	XXVII
Anhang J.	Validierung	XXVIII
J.1	Probenvergleich	XXVIII
J.2	Klassifizierung	XXIX
Anhang K.	Beispiele von Qualitätskontrollen	XXXIV
K.1	Beispiel Qualitätsregelkarten für ein Flugzeit-Massenspektrometer	XXXIV
K.2	Beispiel Qualitätskontrolle für eine Orbitrap	XXXV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 9-1:	Schematische Darstellung verschiedener möglicher MS ² -Messmodi	24
Abbildung 10-1:	Auszug von drei aufeinanderfolgenden hochauflösenden Massenspektren im Bereich $m/z = 751,48$	27
Abbildung 10-2:	Beispiele für richtig (oben) und fälschlich (unten) erkannte Peaks in chromatographischen Profilen.....	29
Abbildung 11-1:	Schematische Darstellung der verschiedenen Ergebnis-Klassifizierungen bei der Feature-Erkennung im Non-Target-Screening.	38
Abbildung 12-1:	Auswahl an Einflussgrößen auf das Analysenziel (Ursache-Wirkungs-Diagramm)	40
Abbildung 13-1:	Beispiele für zeitlichen Verlauf einiger QS-Parameter.....	47
Abbildung 14-1:	Vergleich der Detektionsgrenzen als Konzentration mit mindestens zwei detektierbaren Fragmentationen	54
Abbildung 14-2:	Massenabweichungen im MS-Modus.....	55
Abbildung 14-3:	Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (TOF-Geräte)	57
Abbildung 14-4:	Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (Orbitrap-Geräte).....	58
Abbildung 14-5:	Vergleich der identifizierten gesuchten Standardsubstanzen der teilnehmenden Laboratorien nach den Identifizierungskategorien 1 bis 4..	60
Abbildung 14-6:	Aufbau drei unterschiedlicher Workflows zur Detektion und Identifizierung von Substanzen	61
Abbildung 14-7:	Vergleich Identifizierungsergebnisse eines Datensatzes mit drei unterschiedlichen Auswerteworkflows	62
Abbildung C-1:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A, Elektrospray positiv	XIII
Abbildung C-2:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A, Elektrospray negativ ...	XIII
Abbildung C-3:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B, Elektrospray positiv	XIV
Abbildung C-4:	Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B, Elektrospray negativ ...	XIV
Abbildung C-5:	Masse-RT-Scatterplots („Punktewolken“) der beiden Beispielmethoden A und B, jeweils im ESI positiven und negativen Modus.....	XV
Abbildung D-1:	Schematischer Aufbau der Massenspektrometer Orbitrap (links) und Flugzeit-Massenspektrometer (rechts) mit deren Auflösungsvermögen in Abhängigkeit des Massenbereichs (unten).....	XVII
Abbildung E-1:	Retentionszeitstabilität über N = 134 Messungen.....	XVIII
Abbildung E-2:	Stabilität der Gerätesensitivität über einen Zeitraum von 10 Monaten (N = 134) ohne (grau) und mit (grün) interner Standardisierung (*Phenazon als IS).....	XVIII

Abbildung E-3	Dokumentationsmöglichkeit zur Kontrolle der MS-Performance über Massengenauigkeit, Auflösungsvermögen und SensitivitätXIX
Abbildung F-1:	Korrelation zwischen „Noise“ und dem berechneten „Noise Threshold“ ...XX
Abbildung F-2:	Änderung der Anzahl an Features, echten Peaks und falsch-positiv-Ergebnissen (FPs) auf Grund des verwendeten „Noise Threshold“ (100 cps und berechneter Wert aus der Anpassungsgleichung) für die Messungen (positive Ionisation) einer aufdotierten Kläranlagenablaufprobe für drei verschiedene Empfindlichkeitsniveaus des Messgerätes.XXI
Abbildung I-1:	Beispielworkflow für Suspect- und Non-Target-Screening inkl. der Kategorisierung zur Identifizierung von Substanzen..... XXVII
Abbildung J-1:	Auswertung des Probenvergleichs anhand des Verhältnisses der Peakintensitäten XXVIII
Abbildung J-2:	Beispielhaftes Ergebnis des Vergleichs einer Wiederholmessung mit einer sehr guten Reproduzierbarkeit XXIX
Abbildung J-3:	Beispielhaftes Ergebnis des Vergleichs einer Wiederholmessung mit einer sehr schlechten Reproduzierbarkeit XXIX
Abbildung J-4:	Konfusionsmatrix (Wahrheitsmatrix)..... XXX
Abbildung J-5:	Konfusionsmatrix der Beispieldaten XXXI
Abbildung J-6:	Konfusionsmatrix der Beispieldaten für den Methodenvergleich..... XXXII
Abbildung K-1:	Screenshot einer interaktiven Qualitätsregelkarte. XXXIV
Abbildung K-2:	Screenshot der Tune Page einer Orbitrap, auf der die relevanten Parameter zur Qualitätskontrolle sichtbar sind (rot markierte Werte)... XXXV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Übersicht über typische Aufgabenstellungen in der Wasseranalytik.....	8
Tabelle 3-1:	Zusammenstellung von Abkürzungen und Begriffen der Massenspektrometrie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [8] ..	9
Tabelle 6-1:	Beispielhafte Zusammenstellung von Probenbegleitinformationen.....	16
Tabelle 9-1:	Vor- und Nachteile einzelner Schritte bei Probenvorbereitung und Probenaufgabe	21
Tabelle 9-2:	Addukt- und Fragmentbildung in der Quelle bei der Elektrospray- Ionisierung	23
Tabelle 9-3:	Zusammenstellung der unterschiedlichen MS-Messtechniken mit Kurzbeschreibung	24
Tabelle 10-1:	Schematische Darstellung des Vergleichs von Features zwischen Proben	32
Tabelle 10-2:	Klassifizierung der Features aus dem HRMS Screening (in Anlehnung an Schymanski et al. 2014)	33
Tabelle 12-1:	Zusammenstellung von Leistungsmerkmalen für die Validierung	42
Tabelle 13-1:	Aus Erfahrung der Mitglieder des FA NTS zusammengestellter Mix an Isotopenmarkierten internen Standards.....	49
Tabelle A-1:	Mitglieder des Fachausschusses „Non-Target-Screening“	I
Tabelle B-1:	Aus Erfahrung der Mitglieder des FA NTS zusammengestellter Mix an Isotopen-markierten internen Standards	IV
Tabelle B-2:	Liste isotopenmarkierter interner Standards, eawag.....	V
Tabelle B-3:	Liste möglicher Referenzstandards zur RT-Kontrolle und Normierung	VII
Tabelle B-4:	Liste von in Ringversuch B gefundenen Substanzen,.....	VIII
Tabelle C-1:	Beispiel einer MS Methode (TOF-System)	XI
Tabelle C-2:	Beispiel einer MS Methode (Orbitrap-System)	XII
Tabelle G-1:	Beispiele für detektierte Addukte und in-source-Fragmente bekannter Substanzen.....	XXII
Tabelle H-1:	Übersicht beispielhafter statistischer Methoden zur Analyse von NTS- Daten.	XXV
Tabelle J-1:	Kenndaten der Validierung für die Beispieldaten.....	XXXI
Tabelle J-2:	Bewertung der Übereinstimmung anhand des Kappa-Wertes	XXXIII

1 Einleitung

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

Dieser Leitfaden soll neuen Nutzern den Einstieg in die Wasseranalytik mittels LC-HRMS erleichtern und als Orientierungshilfe dienen. In die einzelnen Kapitel sind zahlreiche praktische Erfahrungen der Autoren eingeflossen. So werden aus erster Hand die Voraussetzungen und die Anforderungen an die Messtechnik, die Auswertung und die Interpretation der Daten beschrieben. Das Dokument wurde von Anwendern für Anwender geschrieben, zeigt Fallstricke und die vielfältigen Einflüsse auf das Ergebnis des NTS auf und gibt Hinweise für mögliche Lösungsansätze. Der Leitfaden beschreibt viele allgemeingültige Ansätze von der Probenahme bis zur Bewertung von NTS-Ergebnissen, legt seinen Fokus aber auf die Durchführung einer qualitätsgesicherten, praxisorientierten Analytik von Wasserproben. Somit grenzt er sich vom Leitfaden des NORMAN-Netzwerks [6] ab, der auch andere Probenmatrizes behandelt und technische sowie instrumentelle Aspekte des NTS in den Vordergrund stellt.

Gegenüber der ersten Ausgabe dieses Leitfadens aus dem Jahr 2019 wird in der vorliegenden zweiten Ausgabe zusätzlich die Validierung und Qualitätssicherung in jeweils separaten Kapiteln behandelt. Zudem wurde das Kapitel zur statistischen Auswertung erheblich erweitert. Hier werden konkrete Vorschläge zur Qualitätssicherung aufgezeigt, die bei allen typischen quantitativen und qualitativen Fragestellungen bei der Analytik von Trink-, Grund-, Oberflächenwasser- und Abwasserproben (Tabelle 1-1) Anwendung finden sollten.

Tabelle 1-1: Übersicht über typische Aufgabenstellungen in der Wasseranalytik¹

Target-Analytik	Suspect-Target-Screening	Non-Target-Screening
• Monitoring organischer Spurenstoffe zur Kontrolle von Grenzwerten • Monitoring organischer Spurenstoffe zur Trendermittlung • Monitoring organischer Spurenstoffe nach Kontaminationen (Havarie, Brand, etc.) • Überwachung von einzelnen Prozessschritten bei der Abwasser- und Trinkwasseraufbereitung (z. B. Durchbruch eines Adsorptionsfilters, Eliminationsleistung einzelner Prozessstufen)	• Suche nach zu erwartenden Substanzen ohne verfügbare Referenzsubstanzen (z. B. Industriechemikalien, Transformationsprodukte, etc.) • Suche nach Substanzen mit bestimmten Struktureigenschaften (Elemente im Molekül wie S, Cl, Br oder funktionelle Gruppen wie z. B. -COOH) • Vergleich von Positivfinden aus Untersuchungen anderer Labore oder aus Literaturdaten • Retrospektive Betrachtung von archivierten HRMS-Messungen bei Informationen zu neuen Substanzen • schnelle Einschätzung zum Vorkommen der Komponente an der betrachteten Messstelle • Entscheidungsgrundlage zur Erweiterung von Monitoringprogrammen	• Suche und Charakterisierung zusätzlicher (über das Monitoring hinaus) vorhandenen Substanzen • Ermittlung von Unterschieden (hinsichtlich organischer Spurenstoffe) zwischen mehreren Proben (Hydrogeologie, zeitlicher Verlauf, Prozessbetrachtung hinsichtlich Entfernung oder Bildung von unbekannten Substanzen); Anwendung statistischer Methoden • Beschreibung von Prozessen hinsichtlich des Verhaltens organischer Spurenstoffe • Detektion und Charakterisierung von Transformationsprodukten (z. B. bekannter Ausgangsverbindungen) • Nachweis/Auftreten von Substanzen als Folge eines Ereignisses (Ursachenermittlung: z. B. Toxizität – Fischsterben, Geruch – Geschmack; Starkregen, Havarie, Brand, etc.) • Erweiterung/Anpassung von Monitoringprogrammen (dynamisches Monitoring) • Identifizierung von unbekannten Substanzen unter Zuhilfenahme weiterer Informationen (Datenbankabgleich, Vergleich von MS/MS-Spektren aus Literaturdaten oder <i>in-silico</i>-Fragmentierungen) und Messungen (Referenzsubstanzen, Einsatz orthogonaler Techniken wie NMR oder Raman-Spektroskopie) • Zuordnung von Proben zu einer bestimmten Gruppe (Klasse) z. B. Herkunft

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

2 Anwendungsbereich

Der vorliegende Leitfaden soll grundlegende Aspekte bei der Anwendung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie aufzeigen. Hierzu gehören neben den gerätetechnischen Aspekten und den möglichen Verunreinigungen bei Probenahme und Messung auch die Datenauswertung, Validierungs- sowie Qualitätssicherungsmaßnahmen. Der Leitfaden soll dem Anwender bei der Methodenentwicklung und Interpretation der Ergebnisse eine Hilfestellung geben [7].

3 Begriffe und Abkürzungen

Die wichtigsten Begriffe der Massenspektrometrie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit ihren Definitionen sind in der folgenden Tabelle 3-1 zusammengestellt.

Tabelle 3-1: Zusammenstellung von Abkürzungen und Begriffen der Massenspektrometrie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [8]

AIF, MSMS^{all}, MS^E	<i>All Ion Fragmentation</i>
Akkurate Masse	Die akkurate Masse eines Ions ist die mittels eines hochauflösenden Massenspektrometers experimentell bestimmte (und ggfs. mittels Referenzmassenstandard rekali-brierte) Masse.
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
Auflösung Auflösungsvermögen	Die Massenauflösung ist der Quotient aus der im Massenspektrometer bestimmten Masse m und der Differenz Δm zweier benachbarter Massen an der Stelle m , die voneinander noch getrennt werden können ($m/\Delta m$).
Beide Begriffe werden in der Praxis synonym verwendet.	Die Massendifferenz Δm kann von Peakspitze zu Peakspitze (gleiche Intensität bei einer Überlagerung von 10% Talhöhe) oder durch die Peakbreite üblicherweise bei 50% der Peakhöhe (full width at half maximum, FWHM) gemessen werden [8]. Das Auflösungsvermögen ist die Fähigkeit eines Instruments, zwischen zwei Peaks zu unterscheiden, die sich um einen kleinen m/z -Wert unterscheiden, und wird als Peakbreite Δm definiert.
DDA IDA	<i>Data-Dependent Acquisition, Information-Dependent Acquisition</i> datenabhängige Akquisition Eine vorgegebene Anzahl von Vorläuferionen, deren m/z -Werte in einem Übersichtsscan aufgezeichnet wurden, werden anhand vorgegebener Regeln ausgewählt und in einer MS/MS-Analyse einer zweiten Stufe der Massenauswahl unterzogen [8].
DIA	<i>Data-Independent Acquisition</i> datenunabhängigen Acquisition Hierbei werden in jedem Analysenzyklus alle Vorläuferionen, die das Massenspektrometer erreichen, fragmentiert [9].
ESI	<i>Elektrospray-Ionisation</i>

Exakte Masse	Die exakte Masse eines Ions oder Moleküls ist die berechnete Masse unter Berücksichtigung der vorgegebenen Isotopenzusammensetzung.
Feature	Features sind peakförmige Signale, welche durch ihre akkurate Masse (m/z) und Retentionszeit (RT) definiert sind und die gewählten Kriterien zum Peakfinding (z. B. Intensitätsthreshold) erfüllen.
FT-ICR-MS	<i>Fourier-Transformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer</i>
Full-Scan (FS)	Aufnahme eines Massenspektrums über den kompletten Massenbereich mit positiver, negativer oder alternierender Ionisierung (<i>switch</i>)
Gezieltes MS² ddMS²	Gezielt gerichtete (<i>engl. dedicated</i>) Fragmentierung einzelner Ionen zur Erfassung möglichst reiner Fragmentionenspektren Die Auswahl der Ionen zur Fragmentierung kann über eine vorgegebene Liste oder automatisch anhand eines survey Scans nach festgelegten Kriterien erfolgen.
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> MS-koppelbare Alternative zur Normalphasenchromatographie zur Trennung von stark polaren Verbindungen bestehend aus einer polaren stationären Phase (ähnlich der Normalphasenchromatographie; z. T. in Verbindung mit Kationen-/Anionenaustauscher-Funktionen) unter Verwendung herkömmlicher RP-Eluenten (bevorzugt Wasser und Acetonitril)
(HP)LC	<i>(High Performance) Liquid Chromatography</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> hochauflösende Massenspektrometrie Hochauflösung liegt dann vor, wenn die Auflösung > 10.000 nach der Taldefinition bzw. > 20.000 nach der Definition über die Peakhalbwidthsbreite beträgt.
Isotopenmuster, Isotopie	Das sich ausbildende Muster im Massenspektrum durch die massenspektrometrische Trennung der unterschiedlichen Isotope der Atome im Molekül. Das Isotopenmuster ist abhängig von der Häufigkeit der einzelnen Atome im Molekül sowie vom Auflösungsvermögen des Massenspektrometers.
LC-HRMS	<i>Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry</i> Flüssigkeitschromatographie in Kopplung mit hochauflösender Massenspektrometrie
LIMS	<i>Labor Informations- und Management System</i>
m/z	Abkürzung für Masse-zu-Ladungsverhältnis Massenzahl dividiert durch Ladungszahl (dimensionslos)
Massendefekt	Der Massendefekt eines Atoms, Moleküls bzw. Ions ist die Differenz zwischen der nominellen und monoisotopischen Masse.

Die meisten organischen Moleküle besitzen einen positiven Massendefekt, da sie sehr häufig aus Atomen mit beinahe vernachlässigbaren negativen (z. B. O, F) oder aber kleinen positiven Massendefekten (z. B. H, N) zusammengesetzt sind. Einige Elemente, wie Chlor und Brom, besitzen relativ große negative Massendefekte. Beim häufigsten Kohlenstoffisotop (^{12}C) ist der Massendefekt per Definition gleich null.

Mixed Mode	LC-Säulenmaterial (stationäre Phase) mit einer Kombination verschiedener Funktionalitäten zur Ausbildung hydrophober und ionischer (Ionenaustausch) Wechselwirkungen
Monoisotopische Masse	Exakte Masse eines Ions oder Moleküls, die sich aus den am häufigsten auftretenden natürlichen Isotopen der Elemente berechnet. Die monoisotopische Masse von Molekülen oder Ionen wird in diesem Kontext auch als exakte Masse bezeichnet.
MRM	<i>Multiple-Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Massenspektrum (engl. mass spectrum)</i> Zweidimensionale Darstellung der Signalintensität (y-Achse) aufgetragen gegen das m/z Verhältnis (x-Achse)
MS² (MS/MS)	Aufnahme von Produktionenspektren (Fragmentationenspektren) durch Molekülfragmentierung
Nominelle Masse	Die nominelle Masse eines Elements ist die ganze Zahl der Masse seines häufigsten Isotops, beispielsweise 12 u für Kohlenstoff, 35 u für Chlor. Zur Berechnung der nominellen Masse eines Moleküls oder Ions werden die nominellen Massen der Elemente mit der Anzahl der Atome von jedem Element im Molekül oder Ion multipliziert.
NTS	<i>Non-Target-Screening</i> Nicht-zielgerichtetes Analysenverfahren ohne Begrenzung auf vorgegebene Substanzen. Detektiert werden alle Substanzen, die mit der eingesetzten Analysenmethode chromatographisch und massenspektrometrisch erfassbar sind.
Precursor Ionen	Vorläuferionen Ion, das unter Bildung bestimmter Produkt-Ionen reagiert oder bestimmte neutrale Verluste erleidet
QS	<i>Qualitätssicherung</i>
RP	<i>Reversed Phase</i> Umkehrphase in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
SRM	<i>Selected-Reaction Monitoring</i>
SWATH-MS	<i>Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra</i> serielle Fenstererfassung aller theoretischer Ionen
TOF-MS	<i>Time of Flight Mass Spectrometer</i> Flugzeitmassenspektrometer

u

Atomare Masseneinheit definiert als der zwölfte Teil der Masse von einem Kohlenstoffatom in seinem Grundzustand:

$$1 \text{ u} = 1,660\,539\,040\,10^{-27} \text{ kg}$$

Gleichwertig bzw. äquivalent zu Da (Dalton)

U(H)PLC

Ultra (High) Performance Liquid Chromatography

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit sehr hoher chromatographischer Trennleistung auf Säulen mit kleinen Partikelgrößen ($< 2 \mu\text{m}$) und bei Säulendrücken von bis zu 1500 bar

4 Grundlage des Verfahrens

Die Grundlage des Verfahrens liegt in der Anwendung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der hochauflösenden Massenspektrometrie (LC-HRMS). Diese ermöglicht es, zu jedem Zeitpunkt des Chromatogramms die in der Ionenquelle gebildeten Ionen im gewählten Massenbereich zu detektieren und deren akkurate Masse zu bestimmen [1, 10]. Die Massendetektion kann mit einem Time-of-Flight Massenanalysator (TOF), einer Orbitrap oder einem anderen hochauflösenden Massenspektrometer (FT-ICR, Sektorfeld-MS) erfolgen (vgl. Abschnitt 8.4).

Zur Identifizierung von Substanzen ist die Messung von MS²-Spektren mit akkurater Masse für einzeln ausgewählte (MS/MS bzw. ddMS²) oder, wenn möglich, gleichzeitig aller Precursoren (MS/MS^{all} bzw. AIF oder DIA) erforderlich. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt abhängig von der Fragestellung und wird in das Suspect-Target und Non-Target-Screening gegliedert (Tabelle 1-1).

4.1 Non-Target-Screening

Beim NTS werden LC-HRMS-Daten mittels geeigneter Peakfinding-Software nach sog. Features durchsucht. Aufgrund von Isotopenpeaks sowie der Bildung unterschiedlicher Adduktionen eines Moleküls in der Ionenquelle und einer möglichen *in-source*-Fragmentierung ist eine Komponentisierung erforderlich, d. h. eine Zusammenfassung aller Signale, welche ursprünglich von einer Komponente herrühren (vgl. Abschnitt 10.1.5). Zur Entfernung von falsch-positiven Features ist außerdem eine Blindwertkorrektur notwendig (vgl. Abschnitt 10.1.4). Für den Vergleich unterschiedlicher Proben ist darüber hinaus ein Alignment erforderlich (vgl. Abschnitt 10.1.3). Anschließend erfolgt meist die Generierung möglicher Summenformeln unter Verwendung der akkuraten Massen der Features und, wenn diese bei ausreichender Konzentration bzw. Empfindlichkeit erfasst werden können, auch der entsprechenden Isotope (vgl. Abschnitt 10.1.6). Dabei spielt neben der Massengenauigkeit das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers eine wichtige Rolle, um die Anzahl möglicher Summenformelvorschläge zu reduzieren. Des Weiteren sei an dieser Stelle auf die „Seven Golden Rules“ für die Reduktion der Summenformeln auf chemisch sinnvolle Vorschläge verwiesen [11]. Für die Identifizierung und Interpretation der Features stehen verschiedene Hilfsmittel zur Verfügung. Zur Ermittlung von Strukturen sind die zu den Features erfassten MS²-Informationen essentiell. Diese können mit MS²-Spektraldatenbanken (in-house, Massbank [12], mzcloud [13]) abgeglichen werden. Darüber hinaus lassen sich auch Stoffdatenbanken wie PubChem [14], ChemSpider [15] etc. abfragen und mögliche Treffer weiter mit *in-silico*-Tools priorisieren. Als Beispiel hierfür kann die Plattform FOR-IDENT genannt werden, welche das *in-silico*-Tool Metfrag [16] mit der Stoffdatenbank STOFF-IDENT [17] verknüpft (vgl. Abschnitt 10.2.1.1). Die Anzahl von möglichen Strukturvorschlägen zu einzelnen Features sinkt dabei sukzessive, je mehr Informationen in die Abfragen einfließen. Da eine eindeutige Identifizierung eines Features nur unter Zuhilfenahme eines Referenzstandards möglich ist, hat sich die Einordnung von möglichen Formel-, Struktur- und Substanzvorschlägen in unterschiedliche Kategorien anhand des Erfüllungsgrades verschiedener Kriterien bewährt (vgl. Abschnitt 10.2.1). Außerdem können Metadaten, statistische Methoden und der Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Proben (auch ohne Identifizierung) wesentliche Hilfestellungen bei der Beantwortung der analytischen Fragestellung geben (z. B. bei der Priorisierung relevanter Features).

Der Schwerpunkt der hier beschriebenen Verfahren liegt auf der Detektion von hydrophoben bis moderat polaren Substanzen, die mittels RP-LC getrennt und mittels ESI ionisiert werden

können. Dies deckt somit einen großen Teil der geläufigen Pharmaka, Pestizide, Industriechemikalien sowie deren Transformationsprodukte ab. Durch den Einsatz von HILIC oder Mixed-Mode Materialien als stationäre Phase kann der Bereich auf (sehr) polare Substanzen erweitert werden. Kritische Stoffe können jedoch von ionischen (sehr polaren) Verbindungen (z. B. TFA) bis hin zu sehr hydrophoben und schlecht ionisierbaren Verbindungen (z. B. Benzol) reichen. Darüber hinaus können kritische Stoffe einen weiten Massenbereich umfassen, von z. B. Cyanid (26 Da) bis hin zu Oligopeptiden (kDa-Bereich). Gegenwärtig ist es nicht möglich, mit einer einzigen Analysenmethode die Gesamtheit aller potentiell kritischen Verbindungen zu erfassen. Daher ist es erforderlich, die Methode entsprechend der Fragestellung auszuwählen. Auch Trenntechniken wie die Gaschromatographie, die Ionenchromatographie, die Kapillarelektrophorese und die superkritische Fluidchromatographie finden im Zusammenhang mit NTS zunehmend Einsatz.

4.2 Suspect-Target-Screening

Beim Suspect-Target-Screening liegt eine Liste relevanter Substanzen bzw. Substanzgruppen für die Beantwortung der Fragestellung vor. Diese Liste kann auch aus entsprechenden Stoffdatenbanken oder über geeignete Plattformen (z. B. FOR-IDENT [18], CompTox Chemicals Dashboard [19]) anhand aufgabenspezifischer Kriterien (z. B. Arzneimittel, neurotoxische Substanzen) generiert werden. In den LC-HRMS-Daten der Probe(n) wird mittels geeigneter Software nach Hinweisen zum Vorhandensein dieser Suspects gesucht. Hierfür können unterschiedliche Strategien, beispielsweise die Verwendung von exakten Massen oder die Eingabe der Summenformeln, zum Einsatz kommen. Die Verifizierung positiver Hinweise (Identifizierung) erfordert im Allgemeinen ein MS²-Spektrum von Probe und Referenzsubstanz bzw. entsprechende Angaben aus der Literatur.

5 Blindwert-Signale

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

5.1 Blindwerte-Signale durch die Probenahme

Blindwert-Signale durch die Probenahme sind so gering wie möglich zu halten. Zur Vermeidung von Querkontaminationen sollten Probenahmegefäße beispielsweise nur für die Probenahme von Trink-, Oberflächen- oder Abwasser klassifiziert werden. So wird der spätere Einsatz einer zuvor mit Abwasser befüllten Glasflasche zur Trinkwasserprobenahme vermieden. Alle verwendeten Probengefäße bzw. eingesetzten Glasgeräte sollten zur Minimierung der Blindwerte in einem Ausheizofen für mindestens 4 h oder über Nacht bei mindestens 450 °C ausgeheizt werden. Es sollten möglichst inerte Behälter aus Glas oder Edelstahl verwendet werden. Ist dies z. B. aus technischer Sicht (Mischproben über automatische Probennehmer, Temperaturbeständigkeit) nicht möglich, sollten Gefäße aus weichmacherfreien Kunststoffen oder gut gespülte bzw. alte, kontaminationsfreie Kunststoffgebinde eingesetzt werden. Wichtig ist für die Datenauswertung eine repräsentative Blindwert-Probe zu generieren, also z. B. Reinwasser über den automatischen Probennehmer in das Probengefäß abzufüllen.

Jede Handhabung der Probe, wie beispielsweise Umfüllen, Pipettieren oder Anreichern, kann zu Kontaminationen mit organischen Spurenstoffen führen (auch durch das Laborpersonal, z. B. durch Hautschutz- oder -pflegeprodukte sowie Zigarettenrauch-Rückstände).

5.2 Blindwertsignale durch die Analyse

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

5.3 Messung von Blindwert-Proben

Anhand regelmäßiger Blindwertmessungen ist der einwandfreie Zustand der Geräte und Chemikalien zu kontrollieren. Zur Blindwertkontrolle kann beispielsweise ein Probenblindwert und/oder ein Systemblindwert herangezogen werden. Als Probenblindwert dient i. d. R. eine Laborreinstwasserprobe oder ein synthetisches gepuffertes Wasser mit identischer Vorgehensweise bei Probenahme, -lagerung, -transport und -vorbereitung wie bei der Originalprobe. Der Systemblindwert ist definiert als das Chromatogramm ohne Probeninjektion (Nullinjektion). Die erhaltenen Totalionenstromchromatogramme können durch Vergleich der Signalintensität beurteilt werden (Beispiele siehe Anhang C.3). Zur Beurteilung des Blindwertes ist zusätzlich eine Auswertung entsprechend 10.1.2 durchzuführen. Eine Blindwertkontrolle ist in jeder Messsequenz durchzuführen. Bei der Messung von Proben mit unbekannter Belastung ist zwischen den Injektionen eine Blindwertmessung empfehlenswert, um Verschleppungen zu vermeiden bzw. zu erkennen.

6 Probenahme

6.1 Allgemein

Die Entnahme von Wasserproben ist in unterschiedlichen Normen für die verschiedensten Parameter bzw. Parametergruppen beschrieben [20]. Eine Kontrolle hinsichtlich Kontaminationen oder Verlusten (beispielsweise durch Adsorption oder Instabilität der Probe während des Probentransports ins Labor) kann anhand einzelner Komponenten überprüft werden; nicht jedoch beim NTS für die Gesamtheit aller bekannten und unbekannten Substanzen in der Probe. Deshalb sind grundlegende Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenahme einzuhalten [21].

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

6.2 Qualitätssicherung bei der Probenahme

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

6.3 Probenbezeichnung/Probenbeschreibung

Die Probenbezeichnung ist so zu wählen, dass eine Zuordnung aller Daten (Rohdaten, Auswertung) zur Probe zweifelsfrei erfolgen kann. Die Verwendung einer eindeutigen Labornummer, die lückenlos in allen Dateibezeichnungen und Dokumenten auftritt, ist sinnvoll. In Tabelle 6-1 sind beispielhaft Probenbegleitinformationen zusammengestellt. Zur weiteren Information wird auf die einschlägigen Normen zu den unterschiedlichen Varianten der Probenahme verwiesen [20, 22, 23].

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

Tabelle 6-1: *Beispielhafte Zusammenstellung von Probenbegleitinformationen*

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

7 Reagenzien

7.1 Allgemeines

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

7.2 Eluenten

Lösemittel (z. B. Methanol, Acetonitril) und Wasser müssen für die HPLC und Massenspektrometrie geeignet sein. Spezielle Qualitäten sind kommerziell erhältlich. Sind notwendige Glasgeräte nicht ausheizbar (siehe Kapitel 8.1), sollten diese gut zu reinigen und zur Vermeidung von Querkontaminationen ausschließlich für den Einsatz im Screening reserviert sein.

7.3 Betriebsgase für Massenspektrometer

Die Betriebsgase für das Massenspektrometer müssen den Mindestanforderungen des Geräteherstellers entsprechen. Hierzu gehören auch die Materialien der Gasleitungen und Gasreinigungskartuschen vor dem Eingang des entsprechenden Massenspektrometers.

7.4 Referenzsubstanzen

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

7.5 Interne Standardsubstanzen (IS)

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

7.6 Herstellung der Lösungen

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

7.6.1 Stammlösung (Referenzsubstanzen)

Stammlösungen sollten bei maximal -18 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt werden. Unter diesen Bedingungen ist in der Regel eine Haltbarkeit von mindestens 6 Monaten zu erwarten.

7.6.2 Dotierlösungen (IS)

Ein Ansetzen der Dotierlösung in einer Konzentration, die der Detektionsempfindlichkeit der jeweiligen Substanz angepasst ist, ist sinnvoll. So kann die Detektion der internen Standards sichergestellt, eine Überdosierung hingegen vermieden werden. Eine Überdosierung kann bei der Ionisation zu Signalsuppression in der Probe enthaltener Komponenten führen.

7.6.3 QS-Standard (Kontrollstandard)

Hierfür sollte ein Multikomponentenstandard eingesetzt werden, dessen enthaltene Substanzen sowohl den massenspektrometrischen als auch den chromatographischen Bereich der LC-HRMS-Methode möglichst umfassend abdecken. Insbesondere für die Überprüfung des generischen (allgemeingültigen) Peakfindings sollte auch ein Multikomponentenstandard in einer Realmatrix mit analysiert werden. Diese Referenzmatrix sollte im besten Falle ein Aliquot einer repräsentativen, in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden (ggfs. dotierten) Umweltprobe sein. Dadurch erweitert sich zudem das Substanzspektrum um unbekannte Substanzen in unterschiedlichsten Konzentrationsniveaus. Neben der Überprüfung der Wiederfindung und Signalintensität der dotierten Targets können dadurch zusätzlich die verwendeten intensitätsabhängigen Peakfinding-Parameter (siehe Kapitel 10.1.2) zur Optimierung von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen überwacht werden.

8 Geräte

8.1 Allgemeines

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

8.2 Probengläser

Entsprechend des Probenaufgabesystems können z. B. Rollrandflaschen mit Nennvolumen 1,5 mL und Bördekkappen mit Septum verwendet werden. Das Ausheizen der Flaschen für mindestens 4 h bei 450 °C hat sich bewährt. Die gereinigten Probengläser sind bis zur Verwendung geschützt vor Kontamination aufzubewahren. Dies gilt auch für die Probenahmegefäße. Da ein Ausheizen von Bördekkappen und Septen nicht möglich ist, sollten Septen aus Materialien mit möglichst geringen Blindwerteinträgen verwendet werden. So sind beispielsweise PTFE-beschichtete Septen bevorzugt gegenüber Kautschuk-Septen einzusetzen.

8.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

8.3.1 Allgemein

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

8.3.2 HPLC-Säule

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

Neben Umkehrphasen (reversed phase (RP)), typischerweise C18- oder polar modifizierte C18-Materialien, können auch Säulen mit anderen Trennmechanismen (wie beispielsweise HILIC oder Mixed Mode Materialien) eingesetzt werden. Die HILIC stellt eine MS-koppelbare Alternative zur Normalphasenchromatographie zur Trennung von stark polaren Verbindungen dar. Sie besteht aus einer polaren stationären Phase (ähnlich der Normalphasenchromatographie; z. T. in Verbindung mit Kationen-/Anionenaustauscher-Funktionen) unter Verwendung herkömmlicher RP-Eluenten (Wasser, Methanol, Acetonitril). Die notwendigen Anforderungen, beispielsweise Reinheit sowie Eignung von Eluenten und Ionisationshilfsmitteln, müssen für das hochauflösende Massenspektrometer erfüllt werden, um eine hohe Datenqualität zu gewährleisten. Beispiele für angewandte Messmethoden sind in Anhang C.1 aufgeführt.

Zur Überprüfung der Robustheit sollten regelmäßig Referenzmaterialien (z. B. die im IS enthaltenen Substanzen) gemessen werden, die den gesamten Trennbereich abdecken. Ebenso können Referenzsubstanzen zur Normierung, d. h. dem Erstellen des sogenannten Retentionszeitindex RTI, benutzt werden (Tabelle B-3) und somit einen Ver- bzw. Abgleich der Retentionszeiten zwischen Laboratorien zulassen [24].

8.4 Massenspektrometer

8.4.1 Allgemein

Die heute am häufigsten in der Routine eingesetzten HRMS-Massenanalysatoren sind Flugzeitmassenspektrometer ((Q)TOF) und Orbitrap-Systeme (siehe Anhang D). In vereinzelt Fällen finden auch Fourier-Transform Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometer (FTICR-MS) in der Wasseranalytik Anwendung. Die Massenspektrometer werden für das NTS typischerweise in einer Kombination aus Full-Scan Messung mit anschließenden Messungen im MS²-Modus mit automatisierter Aufnahme von Fragmentationenspektren (DDA, DIA) betrieben. Da Zykluszeiten im ms-Bereich liegen, lassen sich je Zyklus ein Full-Scan-MS-Spektrum sowie mehrere MS²-Spektren aufnehmen. Bei der MS-Methodenerstellung ist darauf zu achten, dass die Zykluszeiten in Relation zu den chromatographischen Peakbreiten sinnvoll gewählt werden, um eine ausreichende Abtastrate sicher zu stellen. Normalerweise werden die Messungen jeweils in einem spezifischen Messmodus durchgeführt (positiver oder negativer Messmodus), so dass zur vollständigen Erfassung sämtlicher Ionenspezies zwei Messungen notwendig sind. Neuere HRMS-Geräte erlauben auch eine simultane Akquisition (sog. Polarity

switching), ohne zu hohe Zeitverluste durch Schaltzeiten zwischen beiden Messmodi. Schemata und Erläuterungen zu QTOF- und Orbitrap-Systemen sind in Anhang D aufgeführt. Beispiele für MS-Methoden sind in Anhang C.2 aufgeführt.

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

- Das **Auflösungsvermögen** sollte mindestens 10.000 [25, 26] betragen (bei 10%iger Talhöhe). Dies ist in etwa vergleichbar mit 20.000 bei Berechnung der Auflösung über die Halbwertsbreite des Massenpeaks.
- Der **Massenbereich** sollte je nach Fragestellung an die Proben gewählt werden. Im Bereich der Umweltanalytik liegen die meisten Moleküle von Interesse im Bereich von m/z 100 bis m/z 1200.
- Die **Massengenauigkeit** sollte bei m/z 200 bei mindestens 5 ppm [26, 27] liegen, um die Anzahl möglicher Summenformeln zu beschränken. Auch bedingt durch ältere HRMS-Systeme, liegt ein praktischer Wert in der Routine bei < 10 ppm. Durch weitere technische Verbesserungen ist eine Massengenauigkeit von < 5 ppm auch in der Routine erreichbar. Die Massengenauigkeit sollte durch regelmäßige Kalibration überprüft werden.
- Verschiedene in Tabelle 9-3 beschriebene Aufnahme-Modi für **Fragmentationenspektren (MS^2)** sind möglich. Auch in den MS^2 -Spektren sollten die grundlegenden Definitionen von HRMS erfüllt sein.
- Die erforderliche **Sensitivität** richtet sich nach der Aufgabenstellung und der eingesetzten Chromatographie und sollte eine Detektion von Substanzen im Bereich von etwa 10 pg absolut erlauben. Bei einem Injektionsvolumen von 100 μ L entspricht dies einem Gehalt von 0,1 μ g/L in der Probe. Bei der Untersuchung von Wasserproben sind Detektionsgrenzen im unteren ng/L-Bereich erforderlich.
- Die **Systemstabilität** hinsichtlich Sensitivität und Massengenauigkeit muss stets gegeben sein (Beispiel siehe Abbildung E-3).

8.4.2 Ionenquelle

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

9 Durchführung

9.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung richtet sich zum einen nach der Aufgabenstellung, der Art der Wasserprobe (z. B. Sickerwasser, Abwasser, Oberflächenwasser, Grundwasser, Trinkwasser) und zum anderen nach der Empfindlichkeit des zur Verfügung stehenden LC-HRMS-Systems bzw. den notwendigen Detektionsgrenzen. Um Blindwerte durch Verunreinigungen zu vermeiden (siehe Kapitel 5) sollte das Ziel der Probenvorbereitung sein, nur zwingend erforderliche Schritte durchzuführen und sich dabei jeder Kontaminationsquelle bewusst zu sein [28]. In Tabelle 9-1 sind beispielhaft verschiedene Probenvorbereitungen und Probenaufgaben zusammengestellt.

Tabelle 9-1: Vor- und Nachteile einzelner Schritte bei Probenvorbereitung und Probenaufgabe

Bezeichnung	Vorgehensweise/Parameter (Beispiel)	Vorteile	Nachteile
<u>Probenvorbereitung</u>			
Filtration	Vorsatzfilter mit Membranfilter aus regenerierter Cellulose, Celluloseacetat, PTFE oder Glasfaser	homogene Probe	Kontamination, Sorption, arbeits- und materialintensiv, Verstopfung
Konservierung	Kühlung (4 °C, -18 °C), Stabilisator	Wirkt auf unterschiedliche Analyten unterschiedlich (ist evtl. in Langzeitstudien zu überprüfen)	
Festphasenextraktion (SPE)	Sorbensmaterial und -menge, pH-Wert, Lösemittel	ggf. hoher Anreicherungsfaktor, Matrixabtrennung	Kontamination, Sorption, Substanzgruppen spezifisch, arbeits- und materialintensiv
Zentrifugation	mind. 2500 x g, 10 min	einfache und schnelle Durchführung	Bruchgefahr, Kontamination und Absorption bei evtl. Umfüllen
<u>Probenaufgabe</u>			
Direktinjektion, ohne SPE	üblicherweise 10 - 100 µL	unveränderte Probe, benötigtes Probenvolumen gering, Automatisierung, geringer Platzbedarf für Rückstellproben	schlechte Bestimmungsgrenze
Koinjektion von internem Standard (IS)	z. B. 95 µL Probe und 5 µL IS	Zeit- und kostensparend, hohe Reproduzierbarkeit	nicht mit jedem Autosampler möglich
Offline/Online SPE	Sorbensmaterial und -menge, pH-Wert, Lösemittel	Vollständige Automatisierung möglich, gute Bestimmungsgrenze	Kontamination, Sorption, Substanzgruppen spezifisch, materialintensiv

9.2 Chromatographie

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

An die Chromatographie ergeben sich durch die Aufgabenstellung zusätzliche Anforderungen. Zur Trennung müssen MS-kompatible, flüchtige und verdampfbare Puffer bzw. Ionisationshilfsmittel eingesetzt werden. Die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Trennung ist hierbei sehr wichtig, um Vergleiche innerhalb und zwischen verschiedenen Datensätzen sinnvoll vornehmen zu können. Der Vergleich von Chromatogrammen, beispielsweise einer Zeitreihe über mehrere Monate, erfordert eine hohe Langzeitstabilität (siehe Anhang E und E.2). Eine RT-Toleranz von 0,15 Minuten (analog [27]) kann als Mindestanforderung an die RT-Stabilität definiert werden. Die Kontrolle der Retentionszeiten kann mit Referenzmaterialien erfolgen. Zum einen ermöglicht dies die Erfassung der Robustheit der Trennung, zum anderen die Normierung des abgedeckten Trennbereichs (in Bezug auf Polarität). Diese Retentionszeitnormierung über einen RT-Index (RTI) kann die Übertragbarkeit von Ergebnissen zwischen Laboren mit unterschiedlichen LC-Methoden im Screening ermöglichen (Beispiel für einen RT-Standard siehe Tabelle B-3). Für das sogenannte ‚Alignment‘ von Ergebnissen aus Langzeitstudien können diese RT-Standards als Bezugsgrößen verwendet werden.

9.3 Massenspektrometrie

9.3.1 Ionenquelle/Ionisationstechnik

Für die Anwendung des NTS in der Wasseranalytik hat sich die Verwendung einer Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) als bevorzugte Ionisierungstechnik herausgestellt. Für ein NTS ist eine Ionenquelle erforderlich, die einen weiten Polaritätsbereich an Analyten mit ausreichender Sensitivität erfasst. Dafür ist es zielführend, dass die Quellenparameter (z. B. Temperatur, Gasflüsse, Spannungen) bei der Ionisierung so gewählt werden, dass möglichst wenig Fragmentierungsreaktionen (*in-source*-Fragmentierung) oder Adduktbildungen in der Quelle stattfinden. Trotz der eher sanften Ionisierung bei der ESI sind Fragmentbildungen in der Quelle selten komplett zu vermeiden. Alternativ können je nach Fragestellung bzw. Proben auch andere Ionisierungstechniken, wie beispielsweise APCI, sinnvoll sein. In der Tabelle 9-2 sind typische Addukte und Fragmente, die bei der Elektrospray-Ionisierung entstehen können, aufgelistet. Für eine detailliertere Zusammenstellung typischer Addukte und Fragmente inkl. Substanzbeispiele wird auf Anhang G verwiesen.

Tabelle 9-2: Addukt- und Fragmentbildung in der Quelle bei der Elektrospray-Ionisierung

	ESI+	ESI-
Substanzeigenschaften	Ausreichend basische Verbindungen, die Protonen oder andere Kationen (in der Gasphase) anlagern	Ausreichend azide Verbindungen, die ein Proton (in der Gasphase) abgeben
Ionisation	Addition von Kationen	Abgabe eines Protons oder Anlagerung eines Anions
typische Addukte	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+nH]^{n+}$	$[M-H]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+Cl]^-$, Dimere
Fragmentierung	Sanfte Ionisation und dadurch relativ wenige Fragmente (<i>in-source</i> -Fragmentierung nicht immer einfach zu erkennen)	
Typische Fragmente	$[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-CO_2]^+$, $[M+H-C_2H_6O]^+$	$[M-H-CO_2]^-$, $[M-H-HF]^-$

9.3.2 Messtechnik

Das Ziel beim Suspect-Target- und NTS besteht darin, möglichst viel analytische Information über die Probe bei der LC-HRMS Messung zu gewinnen. Hierfür können je nach Aufgabenstellung unterschiedliche Messmodi eingesetzt werden. Die Messtechniken sind in Tabelle 9-3 zusammengestellt. Neben der Aufnahme von hochaufgelösten Massenspektren kann je nach Scangeschwindigkeit des eingesetzten Gerätes eine vorgegebene oder auch eine vom System automatisch getriggerte MS²-Spektren-Aufnahme erfolgen (siehe Abbildung 9-1). Die massenspektrometrische Datenerfassung (je Zyklus ein Full-Scan-Spektrum inkl. MS²-Spektren) muss so gewählt werden, dass stets eine ausreichend gute Abbildung der chromatographischen Peaks gewährleistet ist. Die Gesamtdauer eines massenspektrometrischen Messzyklus (cycle-time) muss an die chromatographische Methode angepasst werden. Dabei soll eine Abtastung von Peaks für robuste Auswertungen mindestens 12 Datenpunkte betragen [27]. Zur Erfassung von mehr Informationen bei qualitativen Screening-Messungen kann eine geringere Abtastrate akzeptiert werden. Mindestens sechs Datenpunkte sind jedoch auch hier erforderlich, da ansonsten die Zunahme der Messschwankungen eine reproduzierbare Auswertung schwierig bzw. unmöglich macht.

Tabelle 9-3: Zusammenstellung der unterschiedlichen MS-Messtechniken mit Kurzbeschreibung [29]

Messmodus	Beschreibung
Full scan HRMS	Detektion der akkuraten Massen aller in der Ionenquelle gebildeten Ionen in einem vorgegebenen Massenbereich über die gesamte chromatographische Laufzeit.
MS/MS	Selektion und Fragmentierung eines Ions (Vorläuferion) und Detektion der akkuraten Massen der gebildeten Fragmente. Die Auswahl des Vorläuferions erfolgt nach unterschiedlichen Kriterien:
<i>MS/MS Target</i>	Vorgabe spezifischer Massen, von welchen ein MS/MS gemessen wird.
<i>DDA bzw. IDA [29]</i>	Gerät scannt über die gesamte Messzeit nach Vorläuferionen und sobald ein Schwellenwert an Signalintensität überschritten wird, setzt MS/MS Fragmentierung ein (Beispiel in Anhang D).
<i>DIA [29]</i>	Permanente/Alternierende Fragmentierung aller Molekülionen Option zum schnellen Scannen sukzessiver Massenfenster (MS^E , SWATH®), oder Fragmentierung aller Ionen (MS/MS^{all} bzw. AIF). Herstellerspezifisch, nicht bei allen Geräten möglich. Deutlich komplexere Datenauswertung (Beispiel in Anhang D).

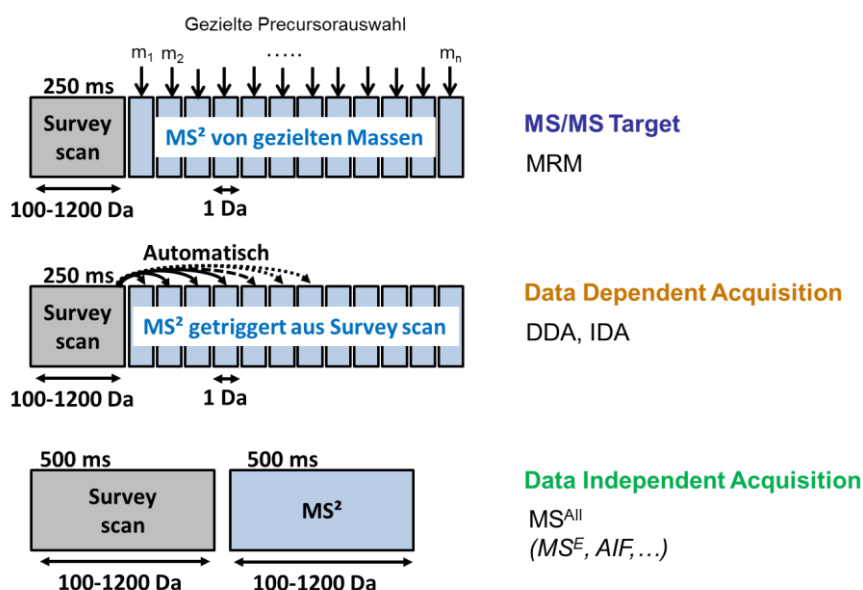


Abbildung 9-1: Schematische Darstellung verschiedener möglicher MS²-Messmodi

9.3.3 Massenkalkulation und Massengenauigkeit

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

9.3.4 QS der LC-HRMS-Messung

Die Verwendung von isotopenmarkierten Substanzen (siehe Kapitel 7.5) als interne Standards, möglichst über den gesamten Retentionszeit- und Massenbereich verteilt, ist zur Kontrolle der Systemstabilität bezüglich der Retentionszeit, Massengenauigkeit sowie der Empfindlichkeit (u. U. Berücksichtigung der Ionisationseffizienz) und Erkennung von Matrixeffekten erforderlich [21]. Zur QS gehört zudem die Kontrolle von Verschleppungen, z. B. durch regelmäßige Systemblindwerte, und die Sicherstellung der Probenidentität (Probenreihenfolge im Autosampler).

10 Auswertung

Eine LC-HRMS Messung führt in der Regel zu großen Messdatensätzen von oft mehreren Millionen Datenpunkten. Dabei ist für jeden Datenpunkt eine Retentionszeit (RT), ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und eine Signalintensität (I) gespeichert. Die Auswertung solcher komplexen, mehrdimensionalen Daten lässt sich in zwei grundsätzliche Schritte unterteilen:

- Zunächst erfolgt die Zusammenfassung der zu einem Feature gehörigen Datenpunkte (chromatographische und massenspektrometrische Peaks). Diese Features werden in sogenannten Feature-Listen zusammengestellt.
- Im Anschluss werden die erhaltenen Feature-Listen analysiert bzw. interpretiert, z. B. durch die Identifikation einzelner Features mit Hilfe einer Referenz-Datenbank oder dem Vergleich verschiedener Feature-Listen auf Basis einer Ähnlichkeitsanalyse.

Im Allgemeinen stehen für die Prozessierung und Analyse der NTS-Daten eine Vielzahl von verschiedenen Methoden zur Verfügung. Aus Gründen der Nachvollziehbarkeit und Transparenz wird daher eine umfassende Dokumentation der jeweiligen Herangehensweise dringend empfohlen. So können z. B. die verwendete Auswertungsplattform oder die eingestellten Nutzereingabe-Parameter, wie z. B. Intensitätsfilterschwellenwerte etc., aufgenommen werden, um eine Reproduktion der Ergebnisse aus den Messdaten zu gewährleisten. Veränderungen an der Prozessierungs- und Datenanalysestrategie können die Vergleichbarkeit von Ergebnissen erschweren und sollten daher stets auf Richtigkeit und Plausibilität, z. B. durch Referenzstandards, überprüft werden.

10.1 Prozessierung der Messdaten

Zur Auswertung der LC-HRMS-Rohdaten wird in der Regel die Software des Geräteherstellers eingesetzt. Diese kann durch Software anderer Hersteller oder eigene Entwicklungen problembezogen ergänzt oder ersetzt werden. Daneben wurden bereits zahlreiche Algorithmen entwickelt, welche ebenfalls Vorteile gegenüber den jeweiligen Einzellösungen darstellen können. Als Beispiele für größere Plattformen und Projekte können hier patRoon [30], MZmine [31], EnviMass [32] und XCMS [33] genannt werden. Ein wesentlicher Vorteil hierbei ist die Vergleichbarkeit der Auswertung trotz verschiedener Gerätetechnik. Nach Konvertierung der Akquisitionsdaten in freie Formate, beispielsweise *.mzML oder *.mzXML, können verschiedenste Datenformate mit demselben Workflow prozessiert werden.

Die ersten Schritte der Datenprozessierung sind entscheidend für das Ergebnis des NTS [34] und sollen im Folgenden einzeln und näher erläutert werden.

10.1.1 Schwerpunktsbildung (Centroiding)

Die hochauflösende Massenspektrometrie ist in der Lage die m/z der meisten Ionen sehr präzise zu bestimmen. Das bedingt jedoch, dass jedes m/z in einem sehr schmalen Wertebereich über eine Vielzahl von Messpunkten aufgezeichnet wird. Bei Anwesenheit eines entsprechenden Ions wird dann für das jeweilige m/z in der Regel ein normalverteiltes Peakprofil detektiert. Diese Profildaten werden meist im Anschluss durch Schwerpunktsbildung (Centroiding) zu den eigentlichen m/z Linien überführt. Wichtig ist hier die Unterscheidung der Bezeichnung „Peak“, welche sowohl bei Profildaten des hochauflösenden Massenspektrums als auch in den später erläuterten chromatographischen Profildaten verwendet wird. Eine entsprechende Einordnung in den jeweiligen Kontext ist daher essenziell, um Verwechslung zu vermeiden.

Aufgrund technischer Schwankungen, z. B. der Signalintensitäten, variieren die ermittelten m/z Linien (Centroids) innerhalb einer Gesamtmessung leicht und sollten daher immer im Verbund betrachtet werden. Zur Ermittlung der Schwerpunkte gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Verfahren, deren Ergebnisse sich unterscheiden können.

- Lokales Maximum: Hier wird der Centroid dem Datenpunkt mit der maximalen Intensität in einem gemessenen Peakprofil gleichgesetzt, d. h. m/z und Intensität werden direkt aus einem Messpunkt übernommen.
- Interpolation unter Zuhilfenahme eines Verteilungsmodells: Hier wird eine theoretische Verteilungskurve (meist Normalverteilung) auf Basis des gemessenen Peakprofils angepasst und der Schwerpunkt aus dieser theoretischen Kurve ermittelt.

Zur Veranschaulichung sind beide Varianten in Abbildung 10-1: dargestellt. Für die Verwendung des lokalen Maximums spricht die Einfachheit und Schnelligkeit der Methode, während die Genauigkeit bei überlappenden Peaks und Rauschen leiden kann. Die Centroidisation über ein Peakmodell bietet eine höhere Genauigkeit insbesondere bei komplexeren Spektren, erfordert jedoch mehr Rechenleistung und eine geeignete Modellparametrisierung. Es gibt jedoch keine Garantie für die Fehlerfreiheit dieser Methoden, daher ist der Abgleich der Ergebnisse durch Referenzsubstanzen von großer Bedeutung, um eine zuverlässige und genaue Analyse der Massenspektren zu gewährleisten.

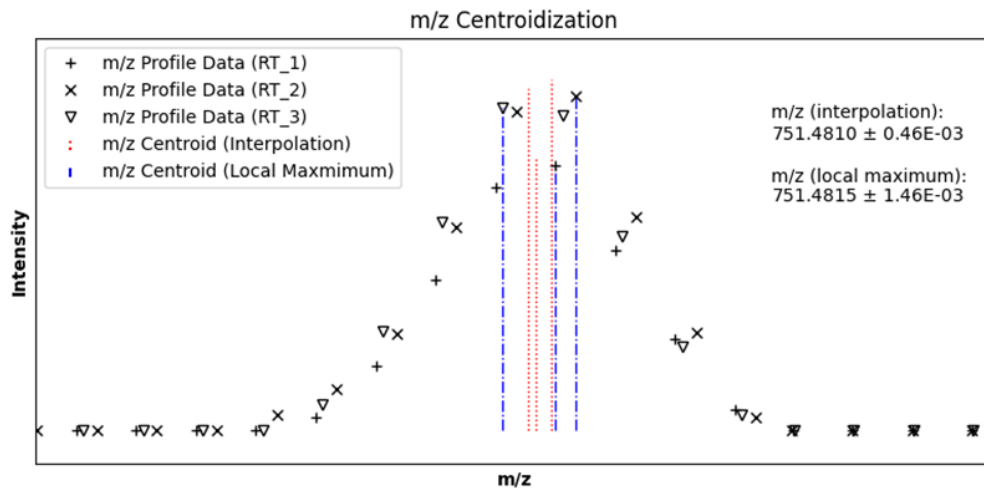


Abbildung 10-1: Auszug von drei aufeinanderfolgenden hochauflösenden Massenspektren im Bereich $m/z = 751,48$. Die drei Datensätze lassen jeweils ein typisches Messsignal mit Glockenkurven-Verlauf erkennen. Bei der Schwerpunktsbildung wird das Maximum dieses Peakprofils abgeschätzt. Im Vergleich zweier Schätzmethoden (Interpolation und Lokales Maximum) zeigen sich feine Unterschiede.

Bei der Schwerpunktsbildung kann bereits die erste Reduktion der Dateigröße vorgenommen werden. Abhängig von zuvor festgelegten Kriterien wie z. B. Intensitäts- oder Signal-Rausch-Verhältnis-Schwellenwert wird nicht jedes Peakprofil in eine entsprechende m/z Linie überführt. Bei einigen Messinstrumenten erfolgt die Schwerpunktsbildung bereits vor der Speicherung der Rohdaten, sodass in diesen Fällen nur die bereits komprimierten bzw. errechneten Datensätze für die Auswertung zur Verfügung stehen.

10.1.2 Peakfinding

Die Ermittlung von Features ist bei der Aufbereitung der Messdaten ein bedeutsamer Schritt, von dessen Ergebnis alle weiteren Auswertungen abhängen. Allgemein handelt es sich bei einem Feature um einen chromatographischen Peak einer m/z Massenspur, welcher ein vorher definiertes Kriterium, z. B. Intensitätsschwellenwert am Peakmaximum, erfüllt. Typischerweise wird ein Feature durch die bereits beschriebenen Eigenschaften RT , m/z und $Intensität$ zusammengefasst und kann durch zusätzliche Informationen wie ein MS^2 -Spektrum ergänzt werden. Bei der Bestimmung der m/z Werte eines Features muss die Streuung der Datenpunkte in dieser Domäne berücksichtigt werden. Dafür gibt es auch hier verschiedene Methoden, wie Durchschnittswert oder das gewichtete Mittel.

Abhängig von der Aufgabenstellung kann das Peakfinding bzw. die Featuredetektion manuell erfolgen, beispielsweise mit einer Suspect-Target Liste. Beim NTS erfolgt das Peakfinding mittels spezieller Peakfinding-Algorithmen. Hierbei gibt es unterschiedliche Strategien, von denen exemplarisch drei genannt sind:

- Die erste Strategie betrachtet die beiden Koordinaten RT und m/z unabhängig voneinander. Über die m/z -Achse wird die Schwankung einer Masse betrachtet und über die Retentionszeitachse der Verlauf der Intensität. Die Festlegung eines Intensitätsschwellenwertes (Threshold) ist hierbei ein entscheidendes Kriterium für die Feature-Erkennung.
- Die zweite Strategie besteht in der Analyse von extrahierten Ionen-Chromatogrammen innerhalb eines engen m/z -Bereichs. Diese Chromatogramme können dann unabhängig voneinander mit einem geeigneten Filter (z. B. Gaußfilter zweiter Ordnung) auf

chromatographische Peaks untersucht werden. Bei dieser Strategie wird die Suche nach Peaks im kompletten m/z -Bereich umgangen.

- Die dritte Strategie zur Extraktion von Merkmalen aus einem LC-HRMS Datensatz besteht in der Anwendung von Modellierung auf die Rohdaten. In diesem Ansatz wird ein dreidimensionales Modell verwendet, bei RT und Intensität das Peakprofil (z. B. ein Gauß-Modell) und m/z das Isotopenmuster (z. B. das ^{13}C -Isotop) darstellen. Die Anpassung beginnt beim intensivsten Peak des gesamten Datensatzes und wird dann subtrahiert. Dieser Prozess wird wiederholt durchgeführt, bis nur noch Hintergrundrauschen übrigbleibt.

Für weitere Details wird auf [35] verwiesen.

Unabhängig von der angewandten Peakfinding-Strategie werden in der Regel Eingangsparameter für die entsprechenden Algorithmen benötigt, wie z. B. ein Intensitäts- oder Signal-Rausch-Verhältnis-Schwellenwert oder die Breite des zu betrachtenden m/z -Bereiches.

Als Ergebnis des Peakfindings wird eine Feature-Liste generiert, die nachfolgend analysiert bzw. interpretiert wird. Es gilt jedoch zu beachten, dass eine akkurate und robuste Feature-Detektion eine der großen Herausforderungen der Datenprozessierung von NTS-Messdaten darstellt. In diesem Kontext können beispielsweise falsch-positive Einträge in die Feature-Liste gelangen oder tatsächliche Features nicht erkannt werden (falsch-negativ). Diese Problematik sollte bei der Optimierung aller Peakfinding-Parameter berücksichtigt werden. Zu strenge Kriterien führen vermehrt zu falsch-negativ-Befunden, d. h. reale Signale werden nicht mehr automatisiert erkannt. Zu großzügige Einstellungen hingegen erhöhen die falsch-positiv-Rate durch das Erfassen von Rauschen, welches fälschlicherweise als Peak erkannt wird. Dieses gegenläufige Verhalten von falsch-positiv- bzw. falsch-negativ-Befunden erschwert die Optimierung des Peakfindings und erfordert Kompromisse abhängig von der Fragestellung. So kann es sinnvoll sein, die Anzahl an falsch-negativ-Befunden zu minimieren und zunächst eine erhöhte falsch-positiv-Rate zu akzeptieren. Diese kann durch zusätzliche Filterkriterien (nach dem eigentlichen Peakfinding) reduziert werden. Für die Bestimmung der falsch-negativ-Rate können beispielsweise bekannte Standardsubstanzen zugegeben werden, um nachfolgend zu überprüfen, ob diese in der Feature-Liste wiedergefunden werden können. Für die Bestimmung der falsch-positiv-Rate können die chromatographischen Profile zufällig ausgesuchter Features visuell, z. B. in Hinblick auf die Peakform, bewertet werden. Es ist hierbei allerdings anzumerken, dass das Bewerten von Peakprofilen viel Erfahrung bedarf und immer auch subjektive Eindrücke enthält. Eine Bewertung durch mehrere Fachpersonen ist u. U. sinnvoll [36]. Ein Beispiel für falsch-positive chromatographische Profile ist in Abbildung 10-2 zu sehen. Automatisierte Filter, z. B. maximale Intensitäts-, Massen- und/oder Zeitabweichung der Features zwischen den Replikatproben und minimale Peakqualitätsparameter wie Signal-Rausch-Verhältnis, Peakzeit und Massenbreite usw. [37], können angewandt werden, um die Anzahl der falsch-positiven Features weiter zu reduzieren. Die meisten Peakfinding-Algorithmen wenden bereits einige der erwähnten Filter an, aber oft werden immer noch Features von geringer Qualität erzeugt, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Daher kann die Anwendung dieser Filter auf den extrahierten chromatographischen Peak eines bestimmten Features und auf die Korrespondenz von Features zwischen Replikatproben die Einbeziehung dieser falsch-negativen Features verhindern.

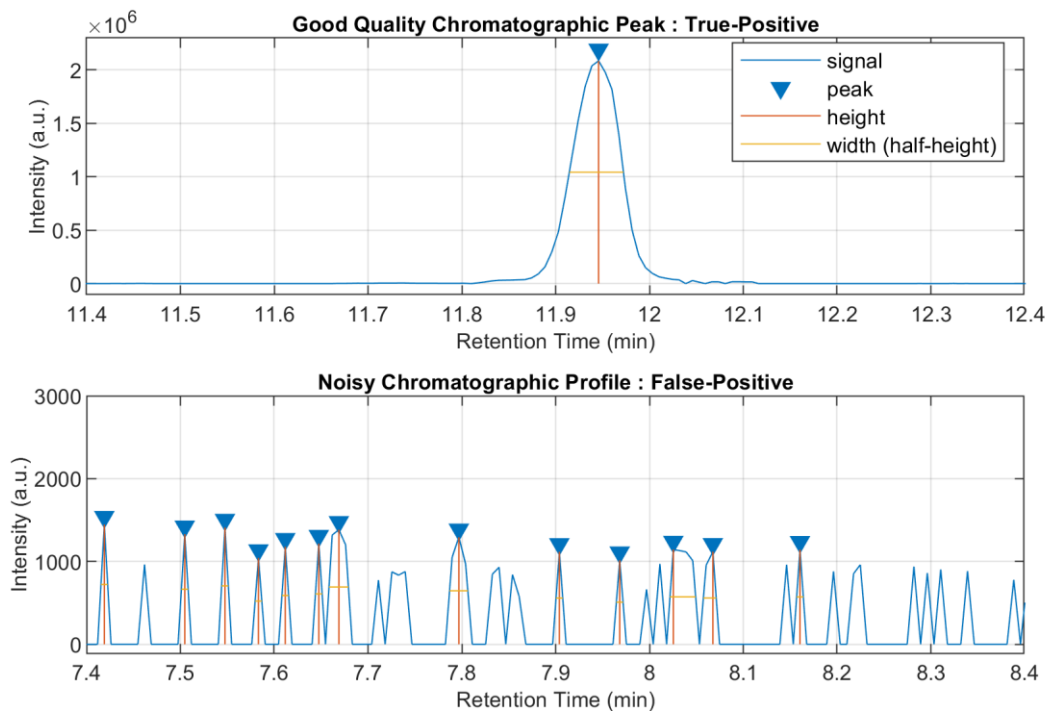


Abbildung 10-2: Beispiele für richtig (oben) und fälschlich (unten) erkannte Peaks in chromatographischen Profilen. Durch geeignete Einstellungen des jeweiligen Peakdetektionsalgorithmus können viele der unten gezeigten fälschlicherweise erkannten Peaks herausgefiltert werden.

Einen sehr großen Einfluss auf das Ergebnis hat der sog. Intensitätsschwellenwert (Threshold), welcher definiert, bis zu welcher Signalthöhe nach Features gesucht bzw. welche Datenpunkte für die Ermittlung der Features berücksichtigt werden sollen. Da ein Feature aus einer Reihe von Datenpunkten ermittelt wird und nicht auf einzelnen Messpunkten basiert, kann der Intensitätsschwellenwert die Eigenschaften RT, m/z und Intensität beeinflussen, besonders wenn diese auf der Peakfläche basieren. Der Intensitätsschwellenwert sollte so optimiert werden, dass der Großteil bekannter Komponenten im relevanten Konzentrationsbereich noch erfasst werden kann. Die Überprüfung bzw. Validierung des Peakfindings wird in Kapitel 11.1 beschrieben.

10.1.3 Alignment

Detektierte Features können in ihren Eigenschaften wie RT und m/z leicht schwanken, so dass sich die Features gleicher Substanzen über mehrere Messungen hinweg leicht voneinander unterscheiden können. Beim sog. Feature-Alignment werden durch zuvor definierte Toleranzen diese Schwankungen berücksichtigt, um eine Vergleichbarkeit mehrerer Proben (z. B. einer Zeitreihe) gewährleisten zu können. Für diesen Schritt der Probenzusammenführung werden von verschiedenen Softwarepaketen unterschiedliche Begrifflichkeiten verwendet.

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

10.1.4 Blindwertkorrektur

Bei der Datenprozessierung ist die Berücksichtigung des Blindwertes besonders hervorzuheben. In erster Linie soll dieser die falsch-positiven Befunde minimieren. Dazu muss der Blindwert zu den Proben passend gewählt werden. Wird der falsche Blindwert in die Auswertung mit einbezogen, besteht die Gefahr der Elimination von realen Features (Generierung falsch-negativer Befunde). Als Beispiel ist bei der Direktmessung von Proben ein System- bzw. Feld- oder Transportblindwert sinnvoll. Bei Messungen aufbereiteter Proben, wie z. B. SPE-Extrakten, werden falsch-positive Befunde durch die Wahl eines Extraktionsblindwertes minimiert. Nähere Erläuterungen zu möglichen Blindwerten und deren Berücksichtigung sind in Kapitel 5 genannt. Bei der Handhabung der Blindwertkorrektur gibt es verschiedene Herangehensweisen. So können entweder alle Features, die in einer Blindwertprobe gefunden wurden, gelöscht oder deren Intensitäten/Peakflächen von den Intensitäten/Peakflächen in den Proben subtrahiert werden. Ein Beispiel ist der Matrixkorrekturansatz von [37], der die Unterdrückung durch die Matrix in der Probe im Vergleich zum zugehörigen Blindwert berücksichtigt. Die Korrektur der Matrixunterdrückung verbessert den Vergleich zwischen den Proben. In den meisten Auswerteprogrammen gibt es auch die Möglichkeit nur Signale zu selektieren, die ein bestimmtes Intensitätsverhältnis im Vergleich zum Blindwert überschreiten. Typische Werte sind hier z. B. 3-fach oder 10-fach höhere Intensität im Vergleich zum Blindwert.

10.1.5 Komponentisierung

Ein Molekül kann bei der Ionisation unterschiedliche Addukte erzeugen (siehe Anhang G). Zu jedem dieser Addukte liegt zudem das Isotopenmuster vor. Zusätzlich können in der Ionenquelle Fragmentierungen auftreten, die weitere Features zu dem Molekül erzeugen (siehe auch Abschnitt 9.3.1). So können einem Molekül unter Umständen zahlreiche Features zugeordnet werden. Durch die Komponentisierung sind diese Features zu erkennen und zu einer Komponente zu vereinen. Die verwendeten Begriffe für diese zusammengefassten Komponenten sind unterschiedlich je nach Softwarepaket und Gerätehersteller (z. B. Molecular Feature (Agilent), Bucket (Bruker), Feature (Sciex), Compound (Thermo)).

Für die Komponentisierung werden typischerweise Algorithmen eingesetzt, die auf vordefinierten Regeln und Logiken basieren. Diese Algorithmen sind oft integraler Bestandteil der Gerätesoftware und unterstützen die Identifikation und Gruppierung der Features. Alternativ können auch hier frei verfügbare Software verwendet werden. Beispielsweise nutzt das CAMERA Paket [38] für die Programmiersprache R chemische Informationen wie Isotopenverteilungen und Fragmentierungen, um Komponenten zu definieren. Ein weiteres Verfahren ist die Multivariate Curve Resolution (MCR), die sich auf statistische Kriterien stützt und gemeinsame Elutionsprofile verschiedener Massen ermittelt. Solche Ansätze ermöglichen eine differenzierte und präzise Analyse der Daten, die im NTS besonders wichtig ist (weitere Details siehe Abschnitt 10.2.1 und Anhang H).

10.1.6 Summenformelgenerierung

Anhand der ermittelten akkuraten Masse und des Isotopenmusters können mögliche Summenformeln angegeben werden. Zusätzliche Informationen aus ggf. vorhandenen MS²-Spektren können darüber hinaus die Ergebnissicherheit der Summenformel erhöhen. Die „Seven Golden Rules“ zur Ermittlung von Summenformeln aus Messdaten sind in [11] beschrieben. Je genauer die ermittelte Masse, desto weniger Möglichkeiten an Summenformeln ergeben sich. Das Spektrum der Summenformelvorschläge ist in Art und Umfang zudem abhängig von den für die Berechnung der Summenformel verwendeten Elementen. Eine eindeutige

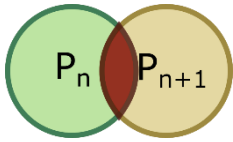
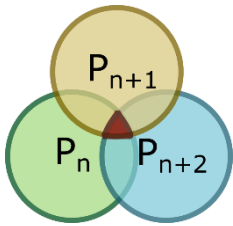
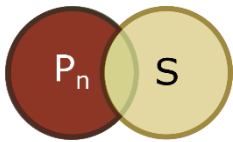
Summenformel kann aus den Messdaten nur selten erhalten werden [11]. Es gilt jedoch zu beachten, dass die „Seven Golden Rules“ Methode bei der Analyse von ungewöhnlichen und komplexen Verbindungen, wie zum Beispiel PFAS, Schwächen aufweisen kann, da solche Verbindungen atypische Isotopenmuster, ungewöhnliche Bindungen, Valenzen und abweichende Elementarverhältnisse besitzen können.

Bei der Identifizierung unbekannter Features gilt es zu beachten, dass manche Substanzen keine einfachen $[M+H]^+$ - bzw. $[M-H]^-$ -Addukte bilden oder diese nur einen geringen Teil der detektierten Ionen ausmachen. Ferner existieren Substanzen, die bei der Ionisation Umlagerungen und/oder Zerfallsreaktion erleiden, was die Identifizierung zusätzlich erschweren kann.

10.2 Interpretation

Voraussetzung für die Beantwortung der Fragestellung (Tabelle 1-1) sind validierte Daten der Auswertung (siehe Kapitel 10.1). Die Ergebnisse können beispielsweise in einem Masse-Retentionszeit-Plot dargestellt werden. Die Gesamtheit der Features kann als Menge P_n (im mathematischen Sinn) betrachtet werden. Die Features (Komponenten) sind charakterisiert durch die akkurate Masse und die Retentionszeit. Die Mengen können entsprechend der Fragestellung vergleichend ausgewertet werden. Beispielhaft sind einige Fragestellungen an eine zeitliche Probenserie in Tabelle 10-1 mit der symbolischen Darstellung und der Formulierung in der Mengenschreibweise zusammengestellt.

Tabelle 10-1: Schematische Darstellung des Vergleichs von Features zwischen Proben

Fragestellung	Symbolische Darstellung	Mengentheoretische Beschreibung
Feature ist in zwei aufeinanderfolgenden Proben enthalten		$P_n \cap P_{n+1}$
Feature ist in drei aufeinanderfolgenden Proben enthalten		$P_n \cap P_{n+1} \cap P_{n+2}$
Feature ist in allen beispielsweise 14 Proben der Serie enthalten	$S = P_1 \cap P_2 \cap \dots \cap P_{14} = \bigcap_{i=1}^{14} P_i$	
Feature ist ausschließlich in einer Probe der Serie enthalten		$P_n \setminus S$

10.2.1 Identifizierung

Abhängig von den vorliegenden Informationen ist es sinnvoll, den Grad der Identifizierung in Kategorien bzw. Level einzuteilen [39]. Eine einheitliche Kategorisierung ist Voraussetzung für den Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Laboratorien. Hierbei ist es zweckmäßig, bei der Kommunikation der Ergebnisse aus dem NTS zwei Gruppen von Adressaten zu unterscheiden. Die eine Gruppe stellt Adressaten ohne Detailkenntnisse der Messtechnik und Auswertung dar, während die andere Gruppe dieses Detailwissen hat. Sinn dieser Differenzierung in der Ergebniskommunikation ist eine Fokussierung auf die für den Adressaten wesentliche Information. Tabelle 10-2 zeigt die Klassifizierung mit den entsprechenden Voraussetzungen.

Die Kategorisierung beruht auf den mittels LC-HRMS erzeugbaren Informationen: Retentionszeit, akkurate Masse und die gemessenen MS²-Spektren. Weitere Messdaten, wie beispielsweise der Ionisationsmodus und CCS-Werte (Collision Cross Section) aus Ionenmobilitätsmessungen, können einen weiteren Beitrag zur Eingrenzung von Datenbanktreffern und einer eindeutigen Substanzidentifizierung leisten [40].

Tabelle 10-2: Klassifizierung der Features aus dem HRMS Screening (in Anlehnung an Schymanski et al. 2014 [39])

Protokoll Auftraggeber		Protokoll Bearbeiter		Referenzdaten				
				akku- rate Masse	RT (RTI)	MS2 Datenbank	MS2 Referenz	MS2 <i>in-silico</i>
Klasse	Aussage	Signal*	Aussage					
Kat. 1	Identifizierte Substanz	Kat. 1	Bestätigte Substanz/Struktur	✓	✓	✓	✓	!
Kat. 2	Wahrscheinliche Substanz	Kat. 2***	Wahrscheinliche Substanz/Struktur	✓	!	✓	✗	!
Kat. 3	Substanzvorschläge aus Summenformel	Kat. 3a	Mögliche Struktur, Angabe von Metadaten	✓	!	✗	✗	✓
		Kat. 3b	Mögliche Substanz	✓	✓	✗	✗	✗
Kat. 4	Signal einer Substanz	Kat. 4a**	Summenformel	✓	✗	✗	✗	✗
		Kat. 4b	Feature (Signal)	✗	✗	✗	✗	✗

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

**Eine Summenformel kann angegeben werden, wenn mind. zwei Isotope und/oder Addukte in den Signalen zugeordnet werden können. Problembedingt kann auch ein Isotop ausreichen.

***Die Bestätigung durch eine Referenz steht aus.

Legende:

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

10.2.1.1 Datenbanken

Die Nutzung von Datenbanken zur Unterstützung der Identifizierung von Features ist eine schnelle und effiziente Vorgehensweise. Hierfür stehen u. U. kostenpflichtige MS-Spektren-Datenbanken als auch Stoff-Datenbanken zur Verfügung. Beispiele für MS-Spektren-Datenbanken sind MassBank [12, 41, 42] und mzCloud [13, 43]. Der Erfolg ist von den Suchkriterien und dem Umfang der Datenbankeinträge abhängig. Im Internet steht eine Vielzahl von unterschiedlichen Stoff-Datenbanken zur Verfügung. Für allgemeine chemische Datenbanken mit mehreren Millionen Einträgen, wie beispielsweise PubChem [14] und ChemSpider [15], ergeben sich u. U. Hunderte bis Tausende von Treffern zu einer abgefragten Masse oder Summenformel. Teilweise erlauben die Datenbanken die Priorisierung von Mehrfachtreffern durch Metainformationen. Beispielsweise kann eine Retentionszeit-Abschätzung mittels quantitativer Struktur-Retentionsmodelle helfen, zum gemessenen Retentionsverhalten passende Strukturvorschläge zu priorisieren [44]. Weitere zur Priorisierung von Treffern anwendbare Metainformationen sind z. B. Literaturreferenzen, Toxizitätsdaten oder Einsatzzweck und -menge. Die Arbeitsplattform FOR-IDENT [18] mit der hinterlegten Stoffdatenbank STOFF-IDENT [17] und weitere umweltrelevante Stoff-Datenbanken wie Chemistry Dashboard [19] und Norman Network Databases [45] stellen eine Unterstützung bei der Identifizierung speziell von gewässerrelevanten Substanzen dar, bei der die Datenbank nicht nur nach akkurater Masse oder Summenformel abgefragt wird, sondern zusätzliche Informationen (Metadaten siehe 10.2.1.2) mit einbezogen werden können. Zur Priorisierung eines einzelnen Vorschlags bei Mehrfachtreffern zu einer abgefragten Masse oder Summenformel werden bei der FOR-IDENT-Plattform beispielsweise die normierte Retentionszeit, Summenformel und/oder Produktionspektren (Abgleich mit *in-silico*-Fragmentationenspektren) verwendet.

10.2.1.2 Metadaten

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

10.2.2 Statistische Methoden

Im Rahmen der Auswertung von NTS-Daten erfolgt in vielen Fällen eine Einordnung der Befunde in einen übergeordneten Kontext. Dabei spielt zumeist der Vergleich verschiedener Proben oder mit entsprechenden Referenzen eine wichtige Rolle. Hier stehen verschiedene Ansätze zur Datenanalyse zur Verfügung, darunter univariate oder multivariate statistische Methoden (siehe Anhang H) [34, 46]. Diese Methoden können entweder überwachte Ansätze sein, bei denen bekannte Annotationen als Referenz verwendet werden, oder unüberwacht, in diesem Fall sind keine vorherigen Informationen über die Annotationen vorhanden. Beide Ansätze dienen dazu, die Datenstruktur zu untersuchen sowie relevante Variablen (Features) auszuwählen.

Beispielmethoden: Beim Vergleich zweier Gruppen (z. B. Effekt/kein Effekt oder verschiedene Prozessstufen einer Kläranlage) können relative Intensitätsänderungen, auch „*Fold Changes*“ (f_c) genannt, bestimmt werden. Diese werden üblicherweise als Logarithmus zur Basis zwei angegeben, um eine symmetrische Darstellung von Up- und Down-Regulation zu ermöglichen. So bedeutet eine Zu- oder Abnahme des $\log_2$ Fold Changes um 1 eine Verdopplung oder Halbierung der Intensität des jeweiligen Features.

$$\log_2 f_c = \log_2 \frac{\text{Feature Intensität in Probe A}}{\text{Feature Intensität in Probe B}}$$

Ein besonders aussagekräftiges Instrument zur Visualisierung und Priorisierung von individuellen Features unter Anwendung der Fold Changes ist der *Volcano-Plot*. In einem Volcano-Plot wird der $\log_2(f_c)$ auf der x-Achse gegen den negativen Logarithmus des p-Wertes ($-\log_{10}(p)$) auf der y-Achse aufgetragen. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, inwieweit die untersuchten Unterschiede zweier Gruppen allein auf Zufall beruhen. Diese Darstellung ermöglicht es, Features mit signifikanten Intensitätsänderungen schnell zu identifizieren und hervorzuheben. Features, die weit rechts oder links vom Zentrum (hohe $\log_2(f_c)$) und gleichzeitig weit oben (niedriger $-\log_{10}(p)$ -Wert) im Plot liegen, sind besonders auffällig, da sie sowohl eine signifikante Änderung in der Intensität als auch eine hohe statistische Signifikanz aufweisen. Dies macht den Volcano-Plot zu einem effizienten Werkzeug für die Priorisierung von Features im Rahmen des NTS, insbesondere wenn es darum geht, potenziell relevante Verbindungen in komplexen Datensätzen hervorzuheben.

Zur Datenexploration oder um Zusammenhänge zwischen Proben aufzuzeigen, können unüberwachte Methoden, wie beispielsweise die *Hauptkomponentenanalyse* (PCA), eingesetzt werden. Diese Technik ermöglicht es, die wesentlichen Variablen (Features) zu identifizieren, die einen großen Anteil an der Gesamtvarianz über alle Proben hinweg haben, wie im Loading-Plot durch große Amplituden ersichtlich ist. Darüber hinaus können korrelierende Features mittels PCA identifiziert und gruppiert werden, da diese ähnliche Loading-Profile aufweisen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der PCA ist die Bewertung der Reproduzierbarkeit von Messungen, insbesondere durch die Berücksichtigung von Mehrfachmessungen einer Probe. Im Scores-Plot der PCA sollten Mehrfachmessungen ähnliche Eigenschaften aufweisen und da-

her in der grafischen Darstellung nahe zusammen liegen. Dies ist ein Indikator für die Konsistenz und Zuverlässigkeit der Messungen. Sollten Mehrfachmessungen nicht eng zusammen liegen, kann dies auf mögliche Ausreißer, Messfehler oder andere Extrema hinweisen, die einer weiteren Untersuchung bedürfen. Die räumliche Nähe von Mehrfachmessungen im Scores-Plot kann somit als ein Kriterium zur Beurteilung der Qualität und Reproduzierbarkeit der analytischen Daten im NTS herangezogen werden.

Viele Clusteranalysen, z. B. *hierarchical clustering analysis* (HCA), fallen ebenfalls in die Kategorie der unüberwachten Methoden und können ebenfalls auf Feature-Listen angewendet werden. Die Ähnlichkeit von Proben und eine Gruppierung wird auf Basis ähnlicher Intensitätsprofile entlang der Feature-Liste ermittelt und in einem Dendrogramm visualisiert. Hierbei können verschiedene Methoden eingesetzt werden, um die Ähnlichkeit der Proben zu berechnen (Distanzmetrik) und Gruppen zu bilden (Fusionalgorithmen).

Generell werden bei unüberwachten Methoden im Vorfeld keine Gruppen definiert. Gruppierungen können sich daher nur herausbilden, wenn diese im betrachteten Gesamtdatensatz dominierende Eigenschaften sind. Um zu überprüfen, ob und welche Feature für eine vorher definierte Gruppierung charakteristisch sind, kann auf überwachte Methoden zurückgegriffen werden. Die „*Partial least squares discriminant analysis*“ (PLS-DA) ist eine dabei etablierte Klassifizierungsmethode. Ähnlich wie bei der PCA wird der Datensatz auch bei der PLS-DA in Scores und Loadings überführt. Der Unterschied besteht allerdings darin, dass nicht die Maximierung der Varianz aller Proben, sondern die Maximierung der Varianz von vorher definierten Probengruppen als Zielgröße gesetzt wird. Mit der PLS-DA können dann „Variable importance in projection“ (VIP) bestimmt werden, auf deren Basis relevante Variablen selektiert werden können. Neben der konventionellen PLS-DA gibt es eine Vielzahl erweiterter PLS-DA Ansätze, wie z. B. OPLS-DA (Orthogonal partial least squares discriminant analysis) oder MOCA (Multi-block Orthogonal Component Analysis), die unterschiedlichste Zusatzkriterien berücksichtigen, um die Interpretierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern.

Mit der „*ANOVA-simultaneous component analysis*“ (ASCA) kann der Einfluss mehrere Faktoren eines experimentellen Designs auf den Datensatz in einem Modell analysiert werden und der Einfluss jedes Faktors allein sowie deren Zusammenwirken abgeschätzt werden [47].

Parallel Factor Analysis 2 (PARAFAC2) ist speziell für die Analyse von Drei-Wege-Daten konzipiert, bei denen eine der Dimensionen variieren kann. Dies macht sie ideal für komplexe Datensätze, bei denen die Anzahl der Features für verschiedene Proben variieren kann. Durch die Zerlegung der Daten in Faktoren, die jeweils einer der drei Dimensionen entsprechen, ermöglicht PARAFAC2 die Identifikation und Isolierung von Mustern und Beziehungen, die über verschiedene Datensätze hinweg konsistent sind. Diese Methode wird insbesondere zur Aufdeckung von verborgenen Strukturen und zur Erleichterung der Interpretation komplexer Daten verwendet. Ihre Anwendung reicht von der Identifikation unbekannter Kontaminanten in Wasserproben bis hin zur Untersuchung der zeitlichen Veränderungen der Wasserqualität.

MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*) betrachtet die Rohdatenmatrix als *m/z*-basierte Elutionsprofile, die durch bilineare Regression in einzelne Komponenten zerlegt werden. Jede Komponente repräsentiert ein errechnetes Massenspektrum, das mit einem spezifischen Elutionsprofil verknüpft ist. Die MCR-ALS benötigt keine vorherige Feature-Erkennung und kann als alternative Auswertungsmethode angesehen werden.

Allgemeine Herausforderungen: Die Intensitäten der verschiedenen Features und deren Schwankungen über verschiedene Proben können stark variieren (Heteroskedastizität), was zu einer überproportionalen Betonung hoher Signale mit großer Varianz führen kann. Vor einer

chemometrischen vergleichenden Auswertung sollten die NTS-Daten daher skaliert, transformiert oder normiert werden. Eine weitere Herausforderung besteht darin, dass nicht alle Analyten bzw. Features in allen Proben, die verglichen werden sollen, vorhanden sind. Werden nun mehrere Proben durch Alignment zusammengeführt, führt dies zu Nullstellen bzw. Lücken in der Datenmatrix. Diese können je nach Software mit kleinen Intensitätswerten bzw. Rauschen gefüllt werden (Gapfilling, Noise filling) oder als Leerstellen verbleiben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der NTS-Datenanalyse betrifft die erforderliche Anzahl von Proben. Um statistisch signifikante und repräsentative Ergebnisse zu erzielen, ist es entscheidend, eine ausreichende Anzahl von Proben zu analysieren. Die genaue Anzahl hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter die Variabilität der Proben, die Komplexität des untersuchten Systems und die spezifischen Ziele der Studie. Eine zu geringe Probenanzahl kann zu unzureichender statistischer Aussagekraft führen und somit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Dies gilt insbesondere für Methoden, die auf dem Vergleich von Gruppen basieren oder die auf die Identifikation von Mustern in großen Datensätzen abzielen. In der Praxis bedeutet dies, dass sorgfältige Überlegungen und Voruntersuchungen nötig sind, um die optimale Anzahl von Proben zu bestimmen, die erforderlich sind, um valide und aussagekräftige Ergebnisse im Rahmen des NTS zu erzielen.

Anmerkung zur Verwendung von maschinellem Lernen und künstlicher Intelligenz im Non-Target-Screening: *Maschinelles Lernen (ML) und künstliche Intelligenz (KI)* sind vielversprechende Technologien, die in vielen Teilbereichen der Datenauswertung beim NTS eingesetzt werden können. Obwohl die Entwicklung geeigneter Methoden in diesem Bereich noch in den Kinderschuhen steckt, bieten sie großes Potenzial zur Verbesserung der Datenerfassung, -verarbeitung und -interpretation. Ein wesentliches Hindernis bei der Anwendung von ML und KI im NTS ist die Akquisition von geeigneten Trainingsdatensätzen, die eine ausreichende Anzahl von qualitativ hochwertigen Referenzdaten enthalten müssen, um effektiv zu sein. Eine besondere Stärke von ML- und KI-Methoden liegt in der Mustererkennung. Dies macht sie besonders nützlich für Anwendungen wie Frühwarnsysteme und die Erkennung von Anomalien in komplexen Datensätzen. Solche Systeme können beispielsweise dazu beitragen, unbekannte Kontaminanten zu identifizieren oder Veränderungen in der Wasserqualität frühzeitig zu erkennen. Aus mathematischer Sicht stehen den sehr großen Feature-Anzahlen (Tausende Features) meist nur verhältnismäßig wenig Proben gegenüber, was zur Überbestimmung führt und den Einsatz von KI-Methoden erschwert.

Angesichts der schnellen Entwicklungen in diesem Bereich empfiehlt es sich, die Fortschritte und neuen Methoden innerhalb der NTS-Community regelmäßig zu verfolgen. Die Integration von ML und KI in das NTS hat das Potenzial, die Effizienz und Genauigkeit der Analysen erheblich zu verbessern und neue Einsichten in komplexe umweltchemische Fragestellungen zu ermöglichen.

11 Bewertung und Angaben der Ergebnisse - Analysenbericht

Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu generieren, ist Transparenz und eine Minimierung von Subjektivität in der Datenauswertung erforderlich. Für jeden Schritt der Datenauswertung (Setzen von Grenzwerten, Bestimmung von falsch-positiv-Raten, Identifizierung etc.) müssen Entscheidungen getroffen werden. Um die Subjektivität dieser zu verringern, sollten klare Entscheidungskriterien definiert werden und wenn möglich Auswerteschritte automatisiert werden. Außerdem sollte eine transparente Dokumentation aller gewählten Parameter, Kriterien etc. des gesamten Workflows erfolgen.

11.1 Bewertung des Peakfindings

Da die Ergebnisse des Peakfindings maßgeblich von den einzustellenden Parametern abhängen, ist eine Optimierung für die jeweiligen NTS-Datensätze essenziell und sollte regelmäßig überprüft werden.

Zur Überprüfung des Peakfinding-Schrittes wird für jede neue Messkampagne das Dotieren bekannter (isotopenmarkierter) Substanzen im relevanten Konzentrationsbereich (z. B. 0,1 µg/L) in Realmatrices empfohlen (QS-Probe, siehe Kapitel 7.6.3). Die Intensitätsabhängigkeit dieses Schrittes erfordert eine gute Langzeitstabilität der Empfindlichkeit des Messgerätes (siehe Anhang E.2), welche somit auch überprüft werden kann. Bei der generischen Peak-Extraktion sind die intensitätsabhängigen Parameter (z. B. Schwellenwert für das Rauschen („Noise threshold“)) besonders entscheidend und beeinflussen deutlich die Anzahl an gefundenen Features.

Aus technischen Gründen (z. B. Anpassung der Detektorspannung, Austausch des Detektors oder der ESI-Nadel) kann die Grundempfindlichkeit des Messgerätes zwischen zwei Messreihen stark voneinander abweichen. Die während der Methodenentwicklung bzw. --validierung ermittelten Werte für die intensitätsabhängigen Parameter müssen daher regelmäßig überprüft und angepasst werden. Auch bei der Übertragung bestehender Auswertemethoden auf ein neues Messsystem ist es wahrscheinlich, dass sich die Empfindlichkeiten der Messgeräte unterscheiden. In diesen Fällen ist eine Anpassung der Methodik erforderlich, in Anhang F wird eine solche Strategie beispielhaft dargestellt.

Durch eine Validierung, basierend auf der QS-Probe, kann die „Leistungsfähigkeit“ der Auswertemethode beurteilt werden. Gängige Größen, wie beispielsweise die falsch-positiv-Rate (Anteil der Fälle, bei denen Hintergrundrauschen oder Artefakte fälschlicherweise als positive Features identifiziert werden), Recall (Anteil der korrekt identifizierten positiven Features unter allen tatsächlichen positiven Features) oder Precision (Anteil der korrekt identifizierten positiven Features unter allen als positiv identifizierten Features) erlauben eine umfassende Bewertung dieses Schrittes. Recall und Precision können nach folgenden Formeln berechnet werden.

$$\text{Recall} = \frac{TP}{TP + FN} = \frac{\text{korrekt erkannte Features}}{\text{Gesamtanzahl aller tatsächlichen Features}}$$
$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP + FP} = \frac{\text{korrekt erkannte Features}}{\text{Gesamtanzahl aller erkannten Features}}$$

TP steht für True Positives und beschreibt die Anzahl der detektierten Features, die tatsächlich von Analytsignalen der QS-Kontrollprobe stammt. FN steht für False Negatives und beschreibt alle fälschlicherweise nicht detektierten Features, beispielsweise in der Kontrollprobe. Dem-

nach bildet die Summe aus TP und FN die Gesamtzahl der tatsächlich in der QS Probe befindlichen Features. Die Summe aus TP und False Positives (FP) stellt hingegen die Gesamtzahl der detektierten Features dar. Zur besseren Veranschaulichung dient in diesem Zusammenhang Abbildung 11-1:

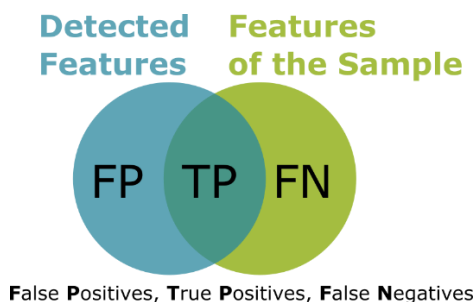


Abbildung 11-1: Schematische Darstellung der verschiedenen Ergebnis-Klassifizierungen bei der Feature-Erkennung im Non-Target-Screening. Ausgehend von einer unbekannten Gesamtheit an tatsächlichen Features in einer Probe, können erkannte Features entweder richtig (True Positive) oder falsch (False Positive) sein. Nicht erkannte Features werden ebenfalls als falsch (False Negative) klassifiziert.

Aus den geschilderten Formeln wird ersichtlich, dass falsch-positiv detektierte Features zu geringeren Werten der Precision führen und falsch-negativ detektierte Feature den Recall-Wert senken [48]. Die Hauptschwierigkeit bei der Ermittlung dieser Leistungsparameter liegt in der Bestimmung von FN, also allen Features, die im Datensatz der QS Probe enthalten, aber nicht detektiert worden sind. Dies setzt voraus, dass alle Signale der QS Probe exakt bekannt sind. Näherungsweise wird daher angenommen, dass jede Substanz der QS Probe zumindest ein hauptsächliches und plausibles Signal im NTS-Datensatz aufweist. Je genauer die Anzahl der tatsächlichen Substanz-Signale der QS Probe bekannt ist, desto genauer lässt sich demnach auch die FN Rate abschätzen [49]. Die Qualität aller Folgeschritte, und somit auch der Endergebnisse, werden maßgeblich durch das Peakfinding beeinflusst und unterstreichen damit dessen Wichtigkeit.

11.2 Bewertung des Alignments

Aus statistischer Perspektive prüft das Alignment, ob Features mit ähnlichen Eigenschaften wie m/z und/oder RT zu derselben Grundgesamtheit von Features gehören und daher vergleichend betrachtet werden dürfen. Auch für diesen Schritt werden verschiedene Algorithmen eingesetzt und Grenzwerte für Massen- und Retentionszeiten-Fenster festgelegt, die zu falsch-positiv oder falsch-negativ Zuordnungen führen können und daher validiert werden sollten. Hierfür wird empfohlen auf interne Referenzstandards oder eine QS-Probe zurückzugreifen. Falsch-positives Alignment liegt dann vor, wenn Features von zwei oder mehr ähnlichen Substanzen fälschlicherweise zu einem Feature zusammengefasst werden. Falsch-negatives Alignment liegt hingegen vor, wenn Features einer Substanz nicht zusammengefasst werden.

11.3 Bewertung der statistischen Datenanalyse

Da NTS-Datensätze meist auch nach umfassender Datenprozessierung tausende Features (Variablen) enthalten, übersteigt deren Anzahl in der Regel die Anzahl der Proben bei weitem.

Aufgrund dieser auch als „undersampling“ bekannten Problematik sollte eine statistische Validierung der chemometrischen Ergebnisse, z. B. durch Kreuzvalidierung oder Permutationstests, erfolgen [50].

11.4 Bewertung der Datenbanksuche

Insbesondere bei der Einbindung von Datenbanken bietet sich die Möglichkeit, durch die richtige Wahl und die Dokumentation der Parametrierung der Abfrage eine vergleichende Betrachtung der Datenbanktreffer durchzuführen. Des Weiteren bildet die einheitliche Beschreibung der analytischen Sicherheit (Kategorisierung) von Identifizierungsergebnissen unbekannter Features eine Basis für den Vergleich von LC-HRMS-Screening-Ergebnissen (siehe 10.2.1).

12 Validierung

Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziell beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden [51]. Aus dieser Beschreibung ergeben sich folgende zentralen Punkte:

- Verwendungszweck (speziell beabsichtigten Gebrauch)
- (Besondere) Anforderungen
- Nachweis (objektiv)

Mit diesen Punkten ist auch ein Risiko verbunden, dass der Verwendungszweck der NTS-Methode den Anforderungen und der Zuverlässigkeit nicht gerecht wird. Dieses Risiko ist bei der Erbringung des objektiven Nachweises zu berücksichtigen.

Bei der Validierung einer NTS-Methode müssen Komponenten der Target-Validierung für die NTS angepasst werden und ist um den Aspekt der Messparameter und Datenauswertung (z. B. Peakerkennung, Peakalignment) sowie der eingesetzten Software zur Dateninterpretation (z. B. multivariate statistische Methoden s. Anhang H) zu ergänzen. Die Herausforderung der NTS-Analytik ist die Betrachtung nicht nur einer singulären Probe, sondern mehrerer korrelierter Proben. Dadurch sind unterschiedliche statistische Auswertemethoden in die Analysenmethode mit integriert und in die Validierung zu integrieren.

Die Probenahme, der Probentransport und die Lagerung der Proben bis zur Analytik sind Bestandteil des Analysenverfahrens und bei der Validierung zu berücksichtigen. Hierbei ist ein zentraler Punkt die Untersuchung und Einbeziehung von geeigneten Blindwerten bei Probenahme, Probentransport und Probenlagerung.

Unter Umständen ist es erforderlich, eine Validierung der Aufgabenstellung anzupassen, um die Leistungsfähigkeit der Methode für diese Fragestellung aufzuzeigen. Das bedeutet, dass eine NTS-Methode nur in Grundzügen generell validiert werden kann (Basisvalidierung). Durch Abstimmung der Methode auf die Fragestellung, beispielsweise Probenahme, Chromatographie, Massenspektrometrie, Auswertung, sind u. U. ergänzende Validierungsschritte erforderlich. Hierbei geht Validierung und Qualitätssicherung fließend ineinander über [52, 53]

Bei der Validierung sind beispielsweise auch folgende Punkte zu beachten:

- Verfügbarkeit von einer ausreichenden Anzahl von Proben (statistische Auswertung)
- Statistische Sicherheit des Ergebnisses
- Anwendung geeigneter Versuchsdesigns (DoE) hinsichtlich des Aufwands und statistischer Aussagen
- Abhängigkeit des Ergebnisses (Aussagekraft) vom Labor-Equipment

Voraussetzung für eine Validierung ist das Vorliegen einer Arbeitsanweisung (Standard Operating Procedure SOP). Diese Arbeitsanweisung ist so zu verfassen, dass sie von verschiedenen Mitarbeitern verstanden und umgesetzt werden kann. Dies trifft bei einer NTS-Methode besonders auf die Messung, Datenaufbereitung und Dateninterpretation zu.

Es gibt zwei grundlegende Herangehensweisen für eine Validierung: den Ansatz im Einzellabor und den laborübergreifenden Ansatz (Ringversuch). Eine laborübergreifende Validierung einer NTS Methode ist anzustreben, wenn diese eine breite Anwendung beispielsweise in der bundesweiten Gewässerüberwachung zum Ziel hat. Die Durchführung von Ringversuchen ist derzeit (Stand 04/2025) aufgrund der Variabilität beispielsweise in der Messtechnik und Auswertung für NTS derzeit noch im Aufbau. Methoden (die im Einzellabor validiert werden) können für regulatorische Zwecke, abhängig von Leitlinien oder Rechtsvorschriften, durch die Aufsichtsbehörde akzeptiert werden.

12.1 Validierungsparameter - Validierungsplan

Die Abbildung 12-1 verdeutlicht die Vielzahl der Einflussgrößen auf das Analysenergebnis. Bei der Validierung einer NTS Methode sind diese zu berücksichtigen. Dabei stellt der Einfluss der Probenahme und des Probenverkehrs auf die NTS Analytik einen zentralen Punkt dar, der in eine Validierung aufgrund der Variabilität nur mit viel Aufwand integriert werden kann. In die Validierung sind deshalb entsprechende Blindproben zur Charakterisierung und Berücksichtigung von Probenveränderungen durch Probenahme und Probenverkehr zu berücksichtigen.

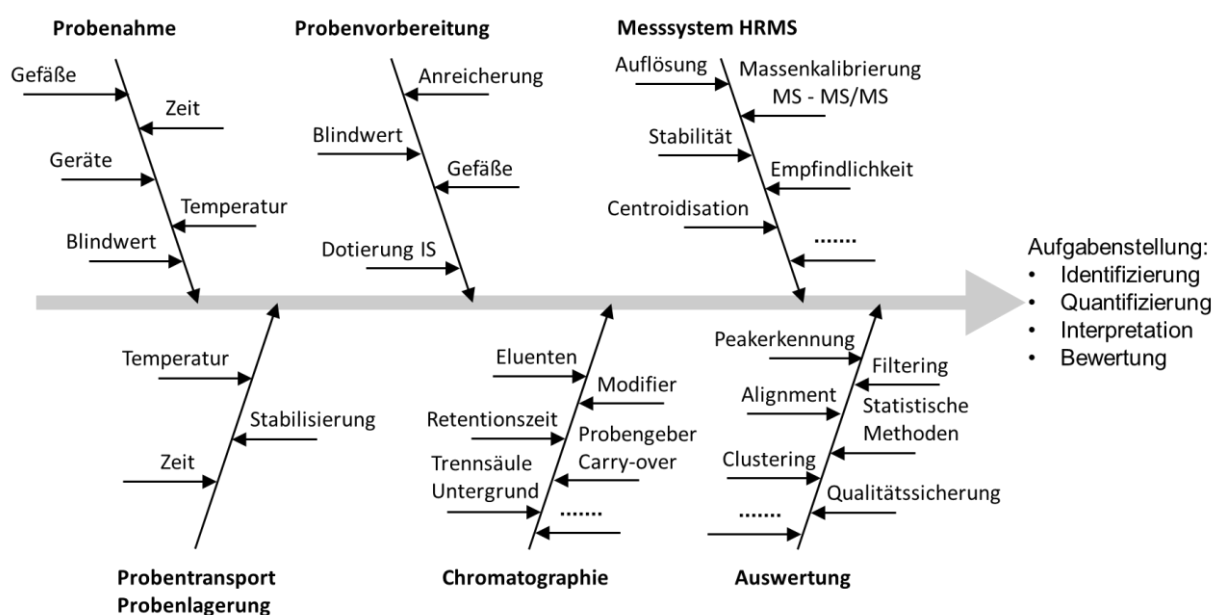


Abbildung 12-1: Auswahl an Einflussgrößen auf das Analysenziel (Ursache-Wirkungs-Diagramm)

Zu Beginn der Validierung ist ein Validierungsplan zu erstellen. Dieser legt die Leistungsmerkmale mit den Leistungskriterien (soweit möglich) fest. In Tabelle 12-1 sind Leistungsmerkmale und deren Beschreibung exemplarisch zusammengestellt. Je nach Aufgabenstellung sind aus der Tabelle 12.1 die Leistungsmerkmale vor Beginn der Validierung auszuwählen und zu dokumentieren sofern sie für eine Aufgabenstellung relevant sind.

12.2 Qualitative NTS-Analysenergebnisse (Klassifizierung von Proben)

Eine Aufgabenstellung des NTS kann die Zuordnung der Probe zu einer bestimmten Gruppe (Klasse), beispielsweise einer behandelten oder nicht behandelten Abwasserprobe sein. Eine Zuordnung erfolgt über einen Mustervergleich (Peakmuster, Featureliste) der Proben und nicht ausschließlich anhand einzelner identifizierter Features. Die Validierung einer Klassifizierung erfordert eine entsprechende Anzahl von Referenzproben. Als Grundlage für die Validierung kann eine Konfusionsmatrix [53] herangezogen werden. Diese ist nicht nur auf zwei Klassen (binär) beschränkt, sondern kann auf mehrere Klassen erweitert werden. Hierbei können nicht nur zwei- oder mehrstufige Ergebnisse der NTS Methode (z. B. behandelte – nichtbehandelte Probe, qualitatives Ergebnis) herangezogen werden. Auch quantitative Ergebnisse die über einen gewählten Schwellenwert (Entscheidungswert, Cut-off) auf zwei Gruppen aufgeteilt werden (dichotomisiert) können mittels einer Konfusionsmatrix validiert werden. Der Aufbau und die Auswertung einer Konfusionsmatrix ist im Anhang J mit zwei Anwendungsbeispielen dargestellt.

Tabelle 12-1: Zusammenstellung von Leistungsmerkmalen für die Validierung

Leistungsmerkmal	Beschreibung	Leistungskriterien Beispiel	Durchführung / Auswertung
Analytische Anforderungen	Beschreibung der Aufgabenstellung und des Anwendungsbereichs der NTS-Methode	s. Tabelle 1-1	
	Festlegung der Randbedingungen - Vollständige Validierung - Validierung infolge Änderung des Anwendungsbereichs - Validierung nach Änderung der Verfahrensparameter (Auswertemethode)	Zusammenstellung der Leistungsanforderungen und Begründung für deren Festlegung	
Selektivität Spezifität	Selektivität ist die Fähigkeit eines Verfahrens verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten einer Mischung ohne gegenseitige Störung zu erfassen. Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, den Analyten in komplexer Mischung in Gegenwart weiterer Mischungskomponenten (z.B. andere Analyten, Matrixbestandteile) ohne Interferenzen zu messen. Im NTS gilt es die relevanten (definierten) Substanzen (Substanzgruppen) in den Proben (Matrices) trotz möglicher Störsubstanzen zu detektieren	Nachweis, dass die Matrix (Störkomponenten) die Detektion der Substanzen nicht verhindern. Bei der Prüfung des Leistungsmerkmals muss der gesamte Workflow (inkl. Peakfinding usw.) betrachtet werden. Die Validierung schließt die Auswertalgorithmen mit ein.	Untersuchung von mit unterschiedlichen Konzentrationen aufgestockten Matrixproben. Ermittlung der Wiederfindung durch Vergleich mit Standardlösung. Die ausgewählten relevanten Substanzen sollten den genutzten Masse- und Retentionszeitbereich abdecken. Voraussetzung ist eine sichere Identifizierung der Features (s. Punkt Richtigkeit).
Nachweisgrenze (NG) Bestimmungsgrenze (Im NTS steht meist der sichere Nachweis von Verbindungen im Vordergrund.) In Ermangelung geeigneter Referenzsubstanzen ist nur	Niedrigste Konzentration des Analyten die noch detektiert werden kann. Niedrigste Konzentration des Analyten die mit akzeptabler Messunsicherheit quantifiziert werden kann.	Anforderung richtet sich nach der Aufgabenstellung z. B.: - Toxizität der Substanzen - Umweltkonzentration - Prozessverhalten - Transformation der Substanzen Beurteilungskriterium: Signal-Rausch-Verhältnis S/N	Untersuchung von mit unterschiedlichen Konzentrationen aufgestockten Matrixproben unter Berücksichtigung der Aufgabenstellung. Mehrfachmessung (mind. 3 Wiederholungen) an der NG und Ermittlung von S/N ($S/N > 3$ bei allen Wiederholungen)

Leistungsmerkmal	Beschreibung	Leistungskriterien Beispiel	Durchführung / Auswertung
eine Semi-Quantifizierung möglich [54].		Bei der Prüfung des Leistungsmerkmals soll der gesamte Workflow (inkl. Peakfinding usw.) betrachtet werden, da die Validierung die Auswertealgorithmen miteinschließt.	Wenn kein Rauschen messbar, kann die NG über die Standardabweichung des Messsignals einer Probe mit einer Konzentration an der NG ermittelt werden. Voraussetzung ist eine sichere Identifizierung der Features. Ein Fragmentation im MS/MS (unabhängig von DDA oder DIA) sollte vorhanden sein (s. Leistungsmerkmal Richtigkeit).
Arbeitsbereich	Der Konzentrationsbereich in dem eine signifikante Abhängigkeit von Konzentration und Messsignal besteht.	Die in der Methode definierten Parameter (z. B. RT, m/Δm, Massengenauigkeit) sollen über den Arbeitsbereich gewährleistet sein.	Untersuchung von mit unterschiedlichen Konzentrationen im angestrebten Arbeitsbereich aufgestockten Matrixproben. Die Auswertung kann über die Betrachtung der Punkt zu Punkt Steigung erfolgen. Neben TIC-Intensitäten sollten auch die Ionentransmission bzw. die Füllzeiten berücksichtigt werden, um über etwaige Verdünnungen wieder in den dynamischen Bereich zu gelangen.
Richtigkeit Messunsicherheit	- Korrekte Identifizierung von Features - Korrekte Klassifizierung von Proben	Bestätigung durch Referenzmaterial Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Masse (MS und MS/MS) sowie der Retentionszeit Richtige Klassifizierung einer Probe anhand der Analysenmethode und	Vorgaben zur Ermittlung der akkuraten Massen von Molekül- und Fragmentationen (z. B. aus EIC Peakmaximum, MS/MS u. U. separate Messung). Nutzung von Datenbanken. Die Herangehensweise am besten in einer separaten SOP festlegen s. Anhang J.2

Leistungsmerkmal	Beschreibung	Leistungskriterien Beispiel	Durchführung / Auswertung
	- Vergleich von Proben anhand der detektierten Features (z. B. Venn-Diagramm). - Quantifizierung (Differenz zwischen Messwert und Referenzwert)	der verwendeten Auswertalgorithmen und Bewertung. (siehe 11) Reproduzierbarkeit der Feature (Anzahl, Identität, Signalintensität) bei Mehrfachmessung der Probe. Eine Quantifizierung identifizierter Substanzen ist nur nach Kalibration mit Referenzstandards möglich.	Durchführung des Featurevergleichs von Wiederholmessungen und Ermittlung der Übereinstimmung anhand von RT, Masse und Intensität (s. Anhang J J.1) Für die Quantifizierung müssen gezielte separate Messungen (z. B. durch Aufstockung der Probe mit den identifizierten Substanzen, externe Kalibration, Normalisierung über interne Standards) durchgeführt werden. Die Herangehensweise am besten in einer separaten SOP festlegen.
Präzision Wiederholpräzision Laborpräzision	Ausmaß der Übereinstimmung zwischen unabhängigen Messergebnissen die unter festgelegten Randbedingungen erzielt werden. Wiederholbedingungen: 1 Labor, 1 Probe, 1 Prüfer, 1 Gerät, identische Chemikalien, kurze Zeitabstände 1 Labor, 1 Probe, mehrere Prüfer, 1 Gerät, Messung an verschiedenen Tagen Anmerkung: die Messung an unterschiedlichen Geräten beim NTS innerhalb einer Aufgabenstellung ist aufgrund der geräte-technischen Variabilität nicht sinnvoll.	Reproduzierbarkeit der Feature (Anzahl, Identität, Signalintensität) bei Mehrfachmessung der Probe unter den jeweiligen Randbedingungen. Vergleichbarkeit der Chromatographie (Langzeitstabilität) Bei der Prüfung des Leistungsmerkmals soll der gesamte Workflow (inkl. Peakfinding usw.) betrachtet werden, da die Validierung die Auswertalgorithmen miteinschließt.	Durchführung des Featurevergleichs von Wiederholmessungen und Ermittlung der Streuung RT, Masse und Intensität (s. Anhang J) Einsatz von internen Standards bei jeder Probe (siehe 7.5)
Robustheit Systemstabilität	Fähigkeit der Methode von geringen Schwankungen der Methodenparameter unabhängig zu sein. - Chromatographie - Massenspektrometer	Stärke des Einflusses auf das jeweilige Ergebnis entsprechend der Aufgabenstellung. Systemstabilität des Massenspektrometers: Massenstabilität	Bewusste Variation von einzelnen Methodenparameter. Chromatographie z. B. Temperatur, Gradient, Modifizierkonzentration Massenspektrometer: z. B.: Quellen-, Interfacetemperatur, Gasflüsse

Leistungsmerkmal	Beschreibung	Leistungskriterien Beispiel	Durchführung / Auswertung
		- Auflösungsvermögen - Empfindlichkeit Diese Größen können z. B. über Kontrollkarten ermittelt und beispielsweise mit den Gerätespezifikationen bewertet werden. Die Kontrollkarten können Methodenübergreifend eingesetzt werden. In der Routine können diese als Qualitätsregelkarten eingesetzt werden (siehe 13.2)	Bewusste Variation mehrerer Methodenparameter gleichzeitig: Design of Experiment (DoE) und Analytical Quality by Design (AQbD) Ansätze Auswertung z. B. durch Featurevergleich (s. Anhang J).

13 Qualitätssicherungskonzept

13.1 Einleitung

Für den Einsatz von LC-ESI-HRMS(/MS) für das NTS liegt der Fokus der Qualitätssicherung (QS) auf i) der chromatographischen Trennleistung, ii) der Ionisation und iii) der massenspektrometrischen Detektion. Die Größe der Datensätze und hohe Informationsdichte von NTS-Daten sind, im Vergleich zu analytischen Methoden der Target-Analytik, eine Herausforderung für die Qualitätssicherung. Durch die Nutzung der Daten als Archiv für die Zustandsbeschreibung der Untersuchungsprobe ist die Qualitätssicherung und Dokumentation unverzichtbar für Langzeitauswertungen.

QS ist besonders wichtig für NTS, denn:

- Die Größe und Informationsdichte von NTS-Daten machen eine manuelle Plausibilitätsprüfung anhand von „erwarteten“ Ergebnissen schwierig.
- NTS benötigt sehr stabile Messungen, denn oft werden „nur“ Retentionszeit, Signalintensität und korrelierende m/z -Werte zur Charakterisierung einer Substanz herangezogen. Entsprechend müssen diese Werte möglichst richtig und präzise erfasst werden und überprüfbar sein.
- Die Stärke von NTS-Messungen in der Umweltanalytik liegt oft im Vergleich von mehreren Proben (z. B. Zeitreihen, vor und nach Aufbereitungsprozessen oder Vergleiche in der Fläche) und im Aufbau von digitalen Probenarchiven zur retrospektiven Datenanalyse. Diese Anwendungen benötigen eine möglichst kleine interday-Varianz oder ausgeklügelte Korrekturmethode. Zum Beispiel benötigen Massen, Retentionszeiten und Response eine ausreichende Präzision, um Intensitäts-Veränderungen von NT-Features in großen Datensätzen abbilden zu können und damit statistische Analysen durchführen zu können.

Eine QS-Strategie sollte auf mehreren Standbeinen aufbauen, die möglichst alle einzelnen Bereiche des Messsystems abdecken. Mehrere, teilweise auch duplizierte, Kontrollpunkte/Kontrollparameter sind notwendig, um a) eine Redundanz/Zuverlässigkeit zu gewährleisten, b) einen möglichst großen Bereich in der RT (Polarität) und m/z Domäne abzudecken und c) die Fehlersuche zu vereinfachen, insbesondere, wenn nur ein Teil des Systems (ein Kontrollpunkt) fehlerhaft ist.

13.2 QS-Parameter

13.2.1 Allgemein

Für die Dokumentation und Beurteilung der QS-Parameter in der Analytik haben sich Qualitätsregelkarten bewährt. Die Messstabilität wird am besten durch Qualitätsregelkarten kontrolliert, die beispielsweise anhand einer Injektion von (internen) Standards zum Anfang einer Messsequenz erstellt werden (LC+MS-Kontrolle), durch die direkte Infusion von Standards (nur MS-Kontrolle) oder beide Varianten kombiniert, um mehrere Kontrollpunkte zu erhalten (Abbildung 13-1.).

Mögliche Parameter für die Regelkarten sind:

- Chromatographische Retentionszeitstabilität (optional mit k -bzw. α -Faktor und Signal-Halbwertsbreite),
- Spektrale oder chromatographische Signalintensität bzw. entsprechende Peakfläche,
- Massen-Genauigkeit (Vergleich mit dem theoretischen m/z) in ppm oder mDa,
- Spektrometrische Auflösung oder spektrale Halbwertsbreite.

In der Regel werden mehr als fünf Standards (je MS-Level und Polarität) für die Berechnung der genannten Qualitätsparameter angewendet. Hierzu werden häufig werden isotoopenmarkierte interne Standards in einer Reinstwasserprobe gemessen. Idealerweise werden diese über den zu messenden RT- und m/z - Bereich verteilt. Qualitätsregelkarten erlauben die retrospektive Bewertung der Vergleichbarkeit von Messungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen wurden. Des Weiteren können die Qualitätsparameter im Verlauf einzelner Sequenzen betrachtet werden, um Drifts zu beobachten. Jeder Hersteller von LC-HRMS Systemen verfügt über eigene Steuerungs- und Analysesoftware. Die Anwendung von Qualitätsregelkarten für die Anforderungen von NTS ist allerdings meistens (noch) nicht integriert oder muss erweitert werden, sodass oftmals Einzellösungen auf Basis von z. B. Excel, R, Matlab etc. gefunden werden müssen (Beispiel in Anhang K).

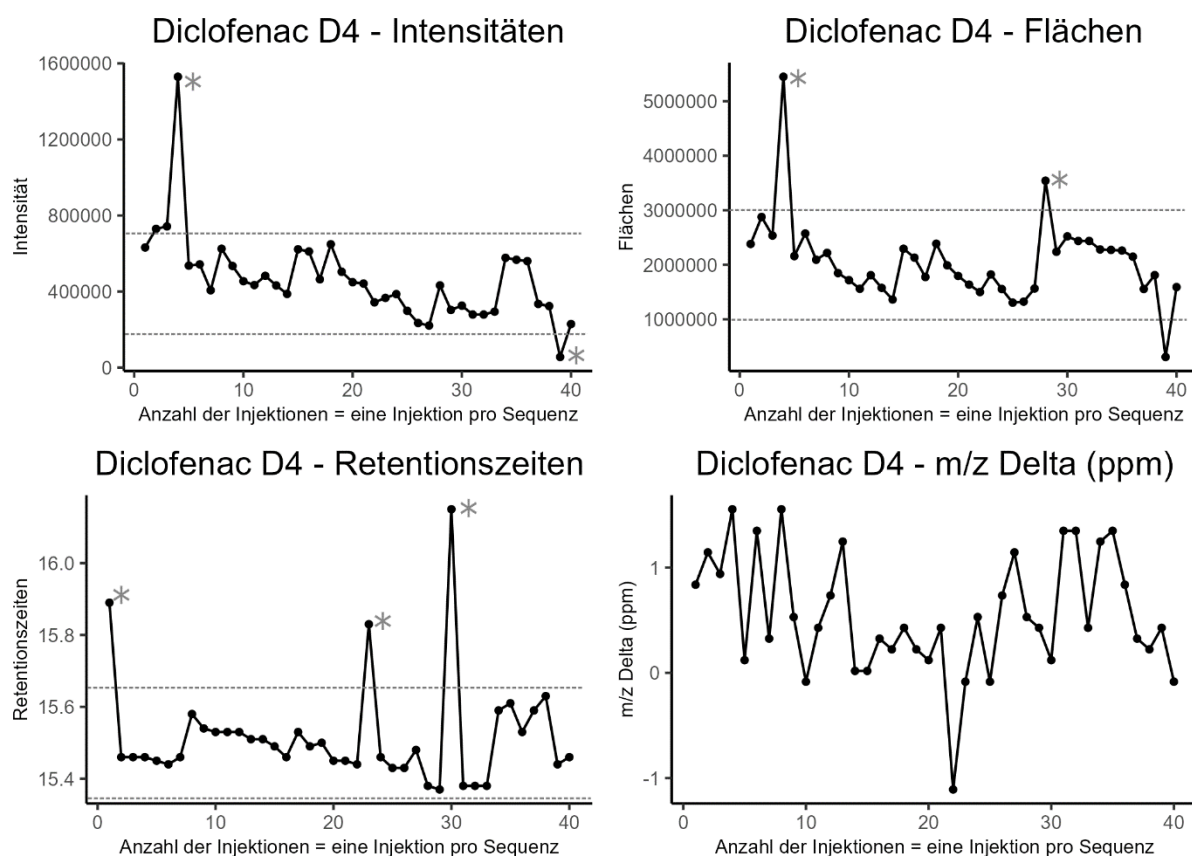


Abbildung 13-1: Beispiele für zeitlichen Verlauf einiger QS-Parameter. *: Außerkontrollsituation.

13.2.2 Stabilität der Chromatographie

Die Retentionszeitstabilität kann mit entsprechenden Referenzsubstanzen erfasst werden. Typischerweise sind Abweichungen von kleiner 0,1 min innerhalb einer Sequenz und kleiner 0,3 min zwischen Sequenzen zu erwarten (Abbildung 13-1.; unten links). Auch Änderungen der Peakhalbwertsbreite und Peaksymmetrie (Tailing, Fronting) geben einen Hinweis auf den Zustand der Säule bzw. auf einen möglichen Matrixeinfluss.

13.2.3 Intensität/Empfindlichkeit

Die Stabilität der Intensität/Empfindlichkeit ist ein Zusammenspiel von Stabilität der Chromatographie, der Ionisation und des Massenspektrometers. Die Intensität ist somit ein Kriterium für die Robustheit der Messung und damit wichtig für eine vergleichende Auswertung von NTS-Daten. Für eine QS der Intensität (bzw. Peakfläche) in der Routine können die zu den Proben dotierten IS herangezogen werden (vgl. Abbildung 13-1.; obere Reihe). Trends innerhalb einer Sequenz können ein Indiz für eine zunehmende Verunreinigung der Ionenquelle sein. Eine untere und obere gerätespezifische Warngrenze für die Intensität wird empfohlen. Diese Grenzen sollten aus einer längeren Vorperiode bzw. größeren Anzahl von Messungen ermittelt werden. Dieser Zeitraum sollte auch mehrere Kalibrierungen des Massenspektrometers und Reinigungen der Ionenquelle einschließen. Eine Schwankung der Intensität oder Fläche um mehr als einen Faktor 2 bis 3 (Erfahrungswert der FA-Mitglieder) sollte eine Ursachensuche nach sich ziehen.

Erfahrung von Mitgliedern des FA zeigen, dass beispielsweise außergewöhnlich hohe Intensitäten nach einer Reinigung und Kalibrierung des Massenspektrometers in relativ kurzer Zeit auf stabile „Standardwerte“ zurückfallen. Deshalb ist zur Einschätzung von „außergewöhnlich hoch“ und „Standardwerte“ eine längere Betrachtungszeit sinnvoll, die zudem unter Einbezug aktueller Messungen regelmäßig angepasst wird.

13.2.4 m/z -Genauigkeit und spektrale Auflösung

Für die m/z -Genauigkeit und Auflösung reicht jeweils eine obere bzw. eine untere Warngrenze. Je nach instrumentellem Aufbau können geeignete Warngrenzen stark variieren. Erfahrungsgemäß ist eine m/z -Genauigkeit größer 5 ppm bzw. über 5 mDa und eine Auflösung kleiner 20.000 außergewöhnlich. Gegebenenfalls müssen Warngrenzen jeweils für beide Polaritäten und für MS- und MS²-Experimente einzeln definiert werden.

13.2.5 Vergleichbarkeit

Die Zuhilfenahme von isotoopenmarkierten internen Standards dient nicht nur der Überwachung der QS-Parameter und der Stabilität des Messsystems, sie können auch beim Vergleich unterschiedlicher Datensätze genutzt werden. Dies gilt sowohl für eine laborinterne Vergleichbarkeit über längere Zeiträume oder mit verschiedenen Messsystemen erfassten Messreihen, als auch für Datensätze unterschiedlicher Labore mit verschiedenen Methoden oder Geräten. Einheitliche interne Standards ermöglichen und verbessern das Alignment diverser Datensätze (siehe 10.1.3) durch Retentionszeitkorrektur und Massenrekalibration. Für diese Zwecke sollte ein umfangreicher Mix isotoopenmarkierter interner Standards einen breiten Massen- und Polaritätsbereich abdecken, sowie eine möglichst große Vielfalt an chemisch-funktionellen Gruppen enthalten.

Aus den vorliegenden Erfahrungen der Mitglieder des Fachausschusses Non-Target Screening sowie anwendungsspezifischen Kriterien heraus wird die in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellte Zusammenstellung von insgesamt 22 Substanzen als besonders geeignet empfohlen. Um den Effekt der besseren Vergleichbarkeit insbesondere bei Inter-Labor-Vergleichen maximal ausnutzen zu können, ist es erstrebenswert, eine möglichst große Zahl der genannten Substanzen in den NTS-Messungen zu erfassen.

Zur Minimierung von Aufwand und Kosten für Anwender und zur Sicherstellung einer guten Verfügbarkeit konnten die Mitglieder des FA NTS einen gewerblichen Anbieter gewinnen, einen vorgefertigten Mix herzustellen und anzubieten. Der Mix kann als gebrauchsfertige Stammlösung als „Pharma-Dx - Mix 22“ unter der Artikelnummer „R01243-WaaAN5“ bei der Neochema GmbH (Uwe-Zeidler-Ring 10, 55294 Bodenheim) bezogen werden.

Spezifikation („Pharma-Dx - Mix 22“):

Konzentration: meist 10 µg/ml, für einige Stoffe unterschiedlich

Lösungsmittel: Acetonitril

Haltbarkeit: min. 12 Monate

Stammlösungen mit gleichartiger Zusammensetzung anderer Hersteller oder selbst hergestellte Mischungen aus Einzelstandards können gleichwertig eingesetzt werden.

Tabelle 13-1: Aus Erfahrung der Mitglieder des FA NTS zusammengestellter Mix an Isotopenmarkierten internen Standards

Substanzname	Summenformel	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	LogD (pH=5)	CAS-Nr.
Metformin-D6	C ₄ H ₅ D ₆ N ₅	J	N	-3.66	1185166-01-1
Sotalol-D7	C ₁₂ D ₇ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	J	J	-3.18	1398065-65-0
Metoprolol-D7	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	J	N	-1.47	959787-96-3
Acesulfam-D4	C ₄ HD ₄ NO ₄ S	N	J	-1.46	1623054-53-4
Hydrochlorothiazide- ¹³ C,D2	¹³ C ₁ C ₆ H ₆ D ₂ ClN ₃ O ₄ S ₂	N	J	-0.58	1190006-03-1
Saccharin-D4	C ₇ HD ₄ NO ₃ S	N	J	-0.49	1189466-17-8
Iopromid-D3	C ₁₈ H ₂₁ D ₃ I ₃ N ₃ O ₈	J	J	-0.44	1189947-73-6
Bentazon-D6	C ₁₀ H ₆ D ₆ N ₂ O ₃ S	N	J	-0.04	2733969-39-4
Sulfamethoxazol-D4	C ₁₀ H ₇ D ₄ N ₃ O ₃ S	J	J	0.76	1020719-86-1
Chloridazon-D5	C ₁₀ H ₃ D ₅ ClN ₃ O	J	J	1.11	1246818-99-4
Benzotriazole-D4	C ₆ HN ₃ D ₄	J	J	1.30	1185072-03-0
Bromacil-D3	C ₉ H ₁₀ D ₃ BrN ₂ O ₂	J	J	1.69	2714436-92-5
Simazine-D10	C ₇ H ₂ D ₁₀ ClN ₅	J	N	1.77	220621-39-6
Diuron-D6	C ₉ H ₄ D ₆ Cl ₂ N ₂ O	J	J	1.93	1007536-67-5
DEET-D7	C ₁₂ H ₁₀ D ₇ NO	J	N	2.50	1219799-37-7
Carbamazepin-D10	C ₁₅ H ₂ D ₁₀ N ₂ O	J	N	2.77	132183-78-9
Bezafibrat-D6	C ₁₉ H ₁₄ ClNO ₄ D ₆	J	J	2.79	1219802-74-0
Darunavir-D9	C ₂₇ H ₂₈ D ₉ N ₃ O ₇ S	J	J	2.82	1133378-37-6
Fipronil- ¹³ C4	C ₈ ¹³ C ₄ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	J	J	4.49	2140327-54-2
Diflufenican-D3	C ₁₉ H ₈ D ₃ F ₅ N ₂ O ₂	J	N	5.11	1185009-29-3
Irbesartan-D4	C ₂₅ H ₂₄ D ₄ N ₆ O	J	J	5.44	1216883-23-6
Telmisartan-D3	C ₃₃ D ₃ H ₂₇ N ₄ O ₂	J	N	6.04	1189889-44-8

13.3 Probenahme

Da Fehler bei der Probenahme einen wesentlichen Beitrag zum Gesamtfehler des analytischen Prozesses liefern, kommt der Qualitätssicherung während Probenahme und –transport eine besondere Bedeutung zu. Einzelheiten sind aus der DIN EN ISO 5667-14 „Wasserbeschaffenheit – Probenahme – Anleitung zur Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle bei der Entnahme und Handhabung von Wasserproben“ ersichtlich. Die Norm enthält sowohl präventive Qualitätssicherungsmaßnahmen als auch Verfahren zur Kontrolle der Qualität der Probenahme von Wasser.

Besondere Schwierigkeiten beim NTS ergeben sich aus der Tatsache, dass generell die Anzahl und Identität der Analyten und damit auch deren physikalisch-chemische Eigenschaften a priori nicht bekannt sind. Trotz dieser Schwierigkeiten muss auch beim NTS besonders auf die Prüfung, Minimierung und Vermeidung von möglichen Kontaminationen (Stichwort: Blindwerte) und möglichen Verlusten von Analyten während Probenahme, -transport und -lagerung geachtet werden.

In der DIN EN ISO 5667-14 werden verschiedene Maßnahmen zur Qualitätskontrolle vorgeschlagen, die auch beim NTS anwendbar und von fundamentaler Bedeutung sind:

- Verschiedene Blindproben zur Prüfung auf Kontamination (Umgebungsblindprobe, Feldblindprobe, Transportblindprobe, Blindprobe der Ausrüstung, Filterblindprobe)
- Doppelproben zur Berechnung der Präzision der Probenahme
- Dotierung mit Standards zur Prüfung der Stabilität der Probe

Beispielhaft soll eine mögliche Vorgehensweise bei Entnahme einer Grundwasserprobe mit Tauchpumpe aufgezeigt werden. Zur Gewinnung von Blindwerten sollte die Probenahme mit Reinstwasser möglichst im Feld „simuliert“ werden. Dazu wird die gesamte Probenahmeausrüstung (Tauchpumpe, Schläuche, Gefäße mit Deckel), die mit dem Probenwasser in Kontakt kommen, einbezogen und damit eine Probe erzeugt, welche die Blindwerte der Probenahme ermitteln lässt.

Zur Überprüfung etwaiger Verluste während der Probenahme kann dotiertes Reinstwasser als Probe verwendet werden. Die Auswahl der Substanzen sollte im Idealfall den kompletten Bereich der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Non-Target-Analyten abdecken (z. B. Molmasse, K_{ow} , logD, funktionelle Gruppen, Ladung) und damit repräsentativ für das im NTS erfasste Analytspektrum sein. Die Substanzauswahl kann auch abhängig von der Aufgabenstellung erfolgen (z. B. Suche nach Arznei- oder Pflanzenschutzmitteln).

Potentielle zusätzliche Kontamination und Verluste von Analyten während Probentransport und -lagerung können mit Feldblindproben kontrolliert werden. Dabei handelt es sich um dotierte Reinstwasserproben, die in den Probenahmegefäßen mit ins Feld genommen und dort in gleicher Weise wie reale Proben behandelt werden. Dabei kann zum Beispiel eine Feldblindprobe verschlossen bleiben und beschreibt damit etwaige Veränderungen der Probe durch den Transport im Vergleich mit einer dotierten Teilprobe, die im Labor verblieb. In ähnlicher Weise können einzelne Schritte der Manipulation von Proben, wie z. B. Filtration, Umfüllen und Aufteilen, beschrieben werden.

Ein weiterer Baustein der QS ist die Dotierung einer Umweltprobe mit isotonenmarkierten Standards, womit sich beispielsweise probenspezifische Veränderungen durch Ausfällung, biologischen Abbau, Sorption an oder Desorption von Partikeln etc. erkennen lassen.

13.4 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung kann einen signifikanten Beitrag zum Gesamtfehler des analytischen Prozesses liefern. Bezüglich der Qualitätssicherung bei der Probenvorbereitung sollten folgende Aspekte berücksichtigt werden:

- Überprüfung der Probenvorbereitung auf Verluste oder Kontamination
 - durch Zugabe von Standards zu Beginn der Probenvorbereitung sowie vergleichsweise in messfertige undotierte Proben unmittelbar vor der Messung.
 - Vergleich des NTS-Ergebnisses einer Probe vor und nach Probenvorbereitung [5]
- Messung von Feldblindwerten (Berücksichtigung von Blindwerten aus den Probenahmematerialien)
- Messung der Methodenblindwerte über das Gesamtverfahren: Aufbereitung von Extraktionsblanks, die alle Aufbereitungsschritte durchlaufen (Filtration, SPE, etc.) inklusive Verwendung derselben Gefäße und Kontakt mit denselben Materialien.

14 Vergleichsuntersuchungen

14.1 Teilnehmer

Name	Institution / Firma (zum Versuchszeitraum in den Jahren 2014/2015)
Brüggen, Susanne	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW D - 47051 Duisburg
Dünnbier, Uwe	Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB) D - 13629 Berlin
Fink, Angelika	Hessenwasser GmbH & Co. KG
Götz, Sven	D - 64293 Darmstadt
Geiß, Sabine	Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie Umweltanalytik/Umweltradioaktivität D-07745 Jena
Letzel, Thomas	Technische Universität München (TUM)
Grosse, Sylvia	AFG, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft D - 80333 München
Petri, Michael	ZV Bodensee-Wasserversorgung Betriebs- und Forschungslabor D - 78354 Sipplingen
Scheurer, Marco	DVGW-Technologiezentrum Wasser D - 76139 Karlsruhe
Schlüsener, Michael	Bundesanstalt für Gewässerkunde
Kunkel, Uwe	D - 56068 Koblenz
Schulz, Wolfgang	Zweckverband Landeswasserversorgung
Lucke, Thomas	D - 89129 Langenau
Singer, Heinz	Eawag CH - 8600 Dübendorf
Stötzer, Sebastian	Bachema AG CH - 8952 Schlieren
Schlett, Claus	Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH D - 45891 Gelsenkirchen
Seiwert, Bettina	Department Analytik Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ D - 04318 Leipzig
Sengl, Manfred	Bayerisches Landesamt für Umwelt D - 86179 Augsburg
Türk, Jochen	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) D - 47229 Duisburg
Zwiener, Christian	Universität Tübingen Umweltanalytik am ZAG D - 72074 Tübingen

Die Vergleichsuntersuchungen wurden teilweise im Rahmen des BMBF Projektes FOR-IDENT durchgeführt



14.2 Durchführung

Im Rahmen des Fachausschusses „Non-Target-Screening“ der Wasserchemischen Gesellschaft (siehe Kapitel 14.1) wurden zwei Vergleichsmessungen 2014 und 2015 durchgeführt.

14.2.1 Vergleichsmessung A

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

14.2.2 Vergleichsmessung B

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

14.3 Ergebnisse

14.3.1 Eingesetzte Methoden

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

14.3.2 Sensitivität

Die Bewertung der Sensitivität der Systeme erfolgte durch Verdünnung der methanolischen Lösungen von 10 mg/L je Substanz in 10er Schritten mit Wasser. Als Detektionsgrenze definiert war die Verdünnung, bei der noch zwei der angegebenen Fragmentionen bei 10 µL Injektionsvolumen detektiert werden konnten (Abbildung 14-1).

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

TOF-Geräte

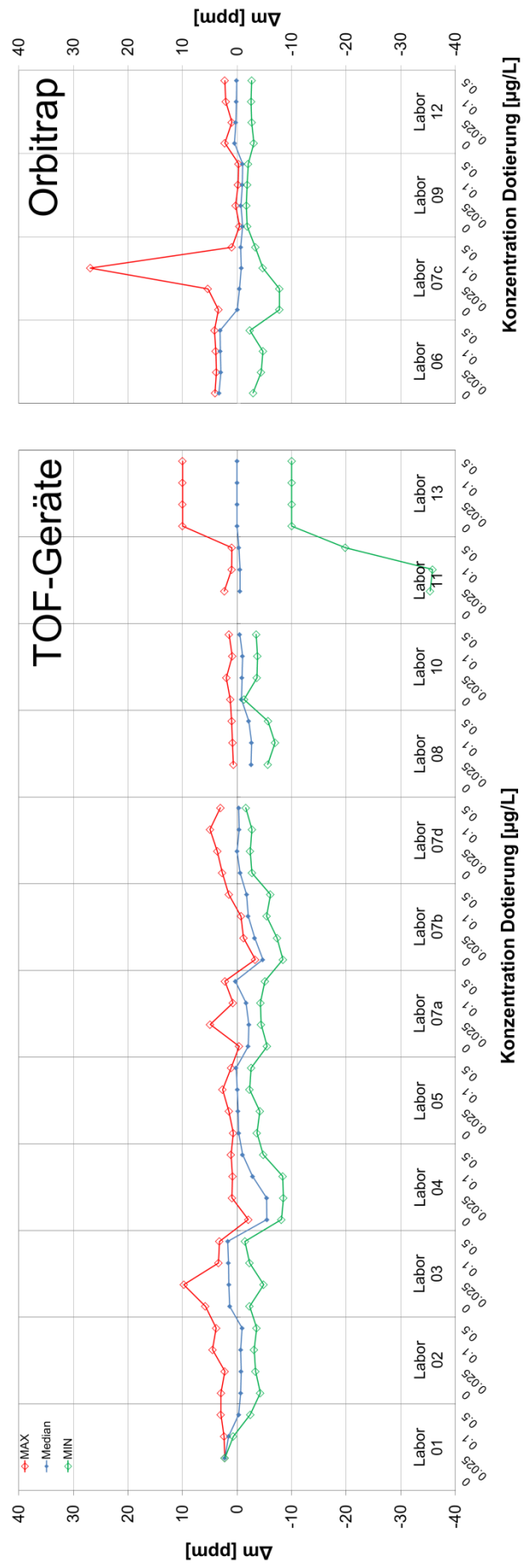
OrbiTrap

Abbildung 14-1: Vergleich der Detektionsgrenzen als Konzentration mit mindestens zwei detektierbaren Fragmentationen (Labore 6 und 3 Ausreißer), PFNA: Perfluorononansäure, HCT: Hydrochlorothiazid

14.3.3 Massengenauigkeit MS

Der Median der Massenabweichungen der Molekülionen der dotierten Verbindungen lag unter 5 ppm. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Massengenauigkeit der unterschiedlichen Systeme TOF und Orbitrap. Ebenso waren die Massenabweichungen unabhängig von der dotierten Konzentration (Abbildung 14-2).

Abbildung 14-2: Massenabweichungen im MS-Modus (Labore 8 und 11: undotierte Probe nicht gemessen)



14.3.4 Massengenauigkeit der Fragmentmassen (MS/MS)

Qualitative Unterschiede in den Fragmentationenspektren waren hauptsächlich durch die Kollisionsenergie bedingt. Wird die Massengenauigkeit der Fragmente betrachtet, so zeigt sich ein Unterschied zwischen den TOF- und den Orbitrap-Geräten. Flugzeitmassenspektrometer (Abbildung 14-3) weisen eine etwas größere Massenabweichung bei MS/MS-Experimenten gegenüber Orbitrap-Geräten (Abbildung 14-4) auf. Die Abweichungen liegen für TOF-Geräte meist im Bereich von unter 5 mDa, entsprechend einer relativen Abweichung von 5 bis 50 ppm. Bei den Orbitrap-Geräten liegen die absoluten Massenabweichungen meist unter 2 mDa, entsprechend einer relativen Abweichung von 2 bis 40 ppm (Massenbereich m/z 50 - 1000).

Abbildung 14-3: Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (TOF-Geräte)geordnet nach Fragmentmasse und getrennt nach Ionisationsmodus

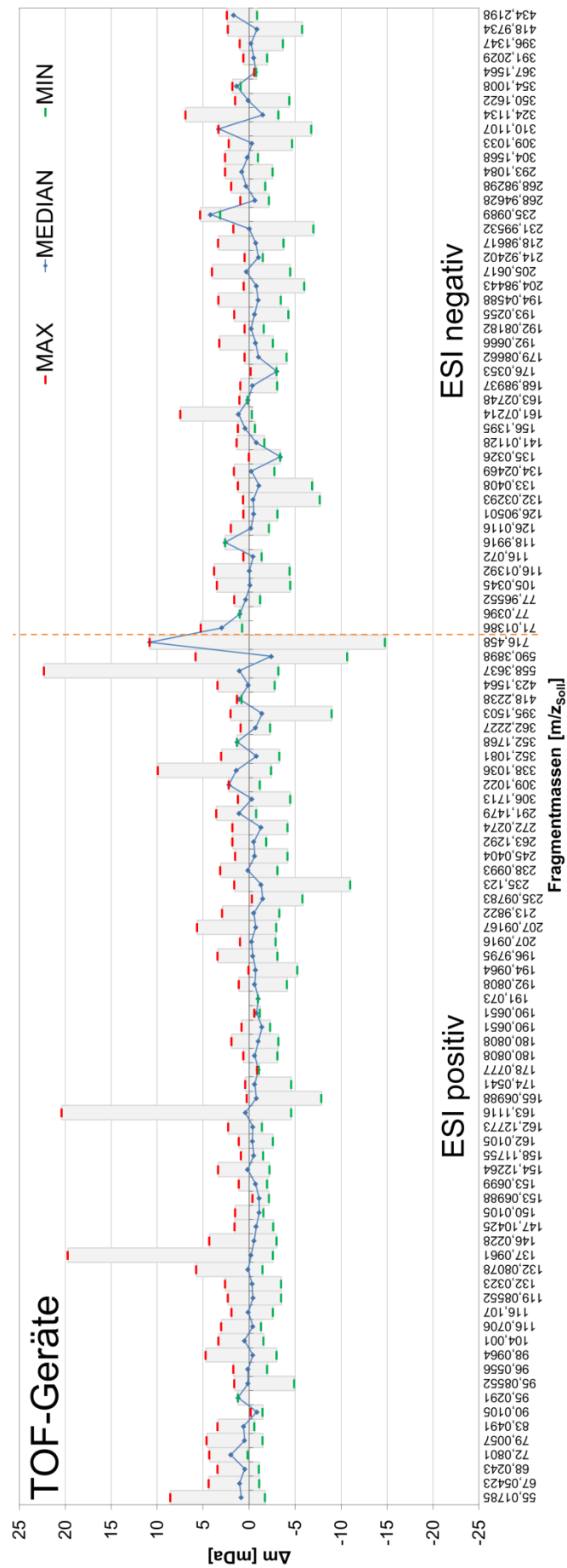
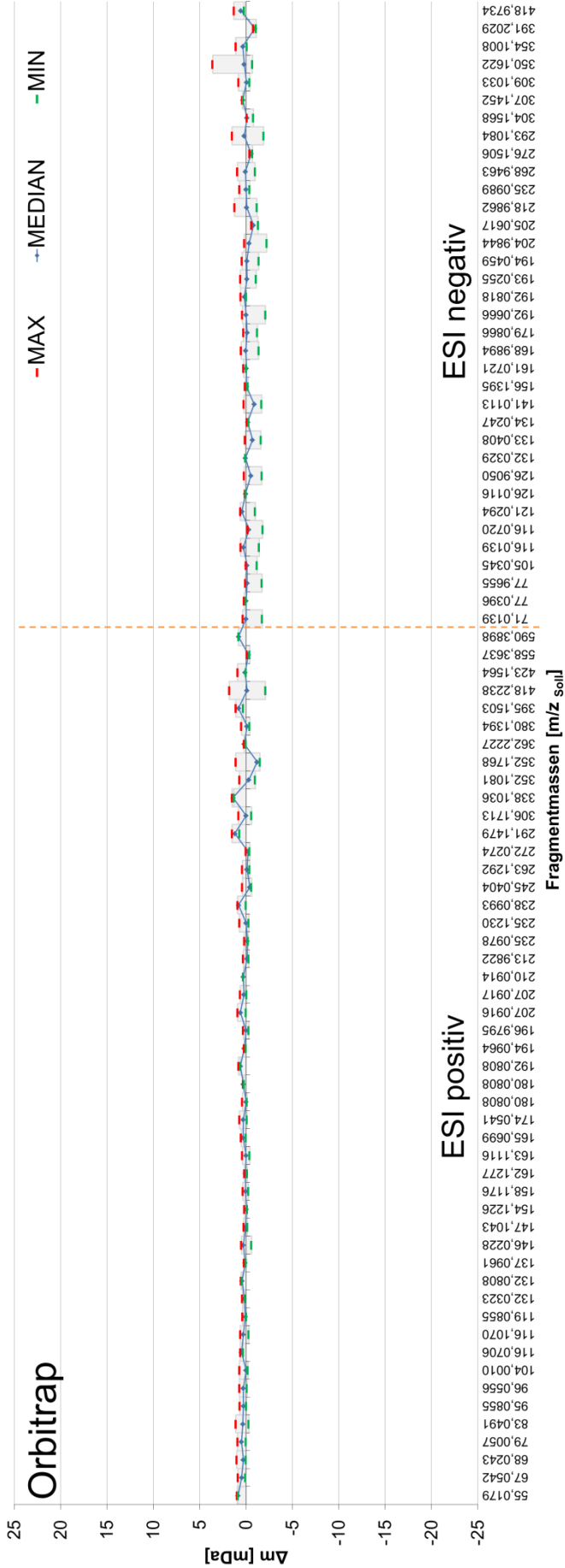


Abbildung 14-4: Massenabweichungen der MS/MS-Fragmente der dotierten Verbindungen (Orbitrap-Geräte)geordnet nach Fragmentmasse und getrennt nach Ionisationsmodus

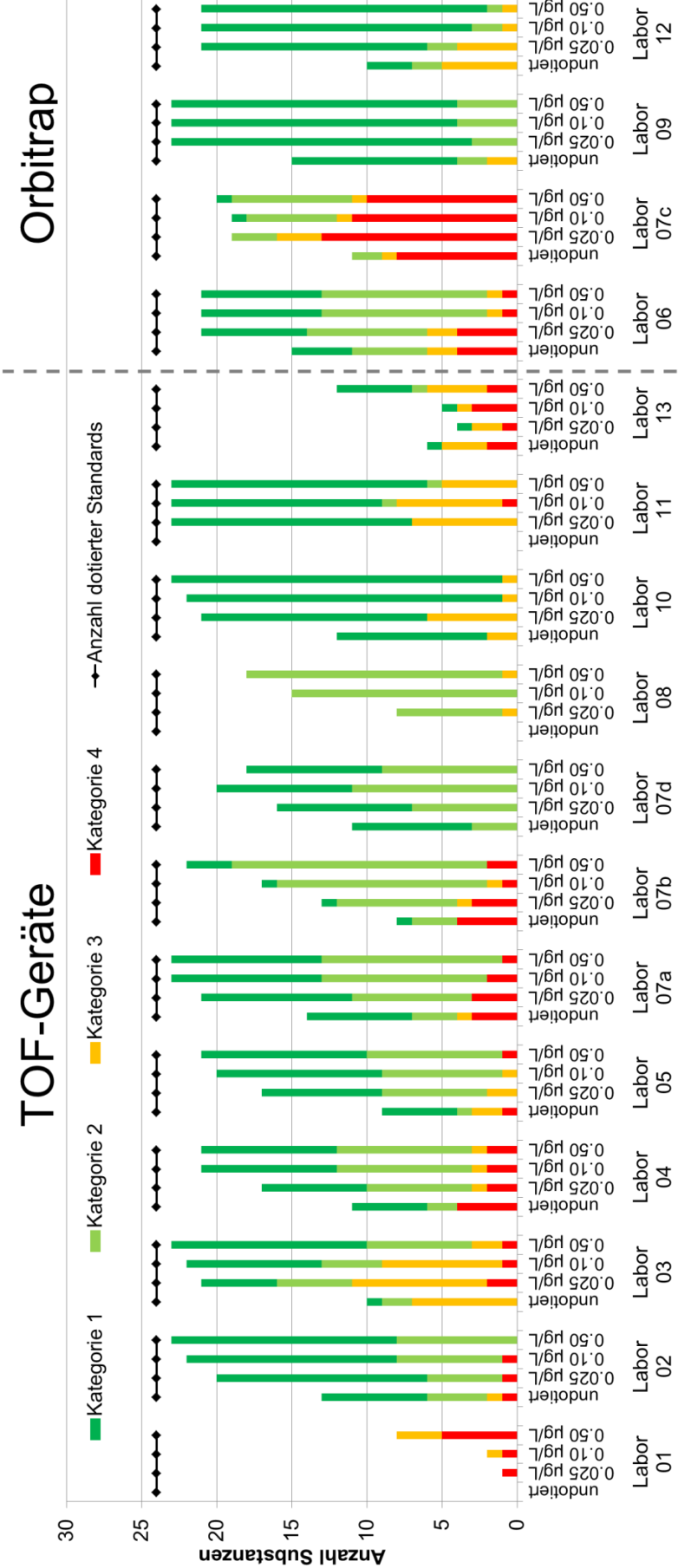


14.3.5 Datenauswertung und Substanzidentifizierung

In Abbildung 14-5 sind die Anzahlen der richtig identifizierten Standardsubstanzen in den teilnehmenden Laboratorien dargestellt. Die Kategorisierung der detektierten Signale erfolgte nach den in Kapitel 10.2.1 dargestellten Kriterien. Der Anstieg des Anteils der Vertreter in Kategorie 1 (sichere Substanzidentifizierung) und Kategorie 2 (Treffer mit hoher Wahrscheinlichkeit) mit zunehmendem Dotierniveau ist deutlich zu erkennen. Dies liegt in der Regel an der besseren Erfassbarkeit eines aussagekräftigen MS/MS-Spektrums.

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

Abbildung 14-5: Vergleich der identifizierten gesuchten Standardsubstanzen der teilnehmenden Laboratorien nach den Identifizierungskategorien 1 bis 4



14.3.6 Workflowvergleich am Beispiel eines Labors

Ergänzend zur Vergleichsmessung wurde einer der Datensätze der zweiten Vergleichsmessung mittels drei unterschiedlicher Workflows ausgewertet, um zu prüfen, welchen Einfluss die Herangehensweise auf den Umfang richtig identifizierter Substanzen hat (Abbildung 14-6).

Die drei angewandten Workflows waren wie folgt strukturiert:

- (1) Suspect-Screening auf die gesamte Suspect-Liste (200 Verbindungen) und deren manuelle Auswertung hinsichtlich der Identität mit Abgleich von MS²-Spektrenbibliotheken
- (2) Non-Target-Ansatz mit Peakfinding durch *open-source*-Tool envipy¹ und anschließende manuelle Auswertung der Identifizierung gegen Referenzspektren (das Tool envipy ist nicht mehr verfügbar. Das Nachfolgetool enviMass ist nicht mehr *open-source*.)
- (3) Non-Target-Ansatz (laborintern) mit Datenevaluation und anschließender FOR-IDENT-Abfrage zur Priorisierung der möglichen Substanzvorschläge zu den Signalen. Identifizierung mittels Referenz-MS²-Spektrendatenbank.

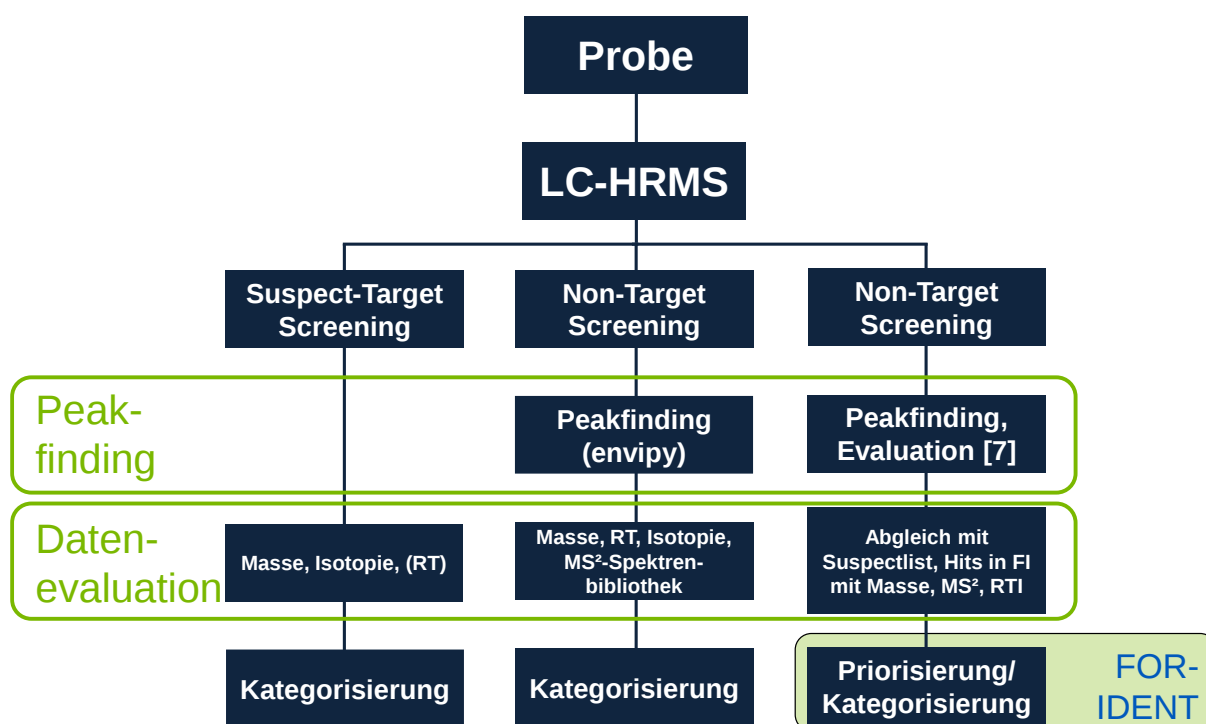


Abbildung 14-6: Aufbau drei unterschiedlicher Workflows (1), (2) und (3) zur Detektion und Identifizierung von Substanzen

¹ <https://www.envibee.ch/eng/projects.htm>

Werden die Ergebnisse der drei unterschiedlichen Workflows (1), (2) und (3) (Abbildung 14-7) verglichen, zeigt sich eine gute Detektierbarkeit der dotierten Verbindungen. Im Fall (2) (Abbildung 14-7, Mitte) liegt die Anzahl der detektierten Verbindungen (Kategorien 1 bis 4) leicht unter den beiden anderen Workflows. Grund könnte hier eine nicht ausreichende Optimierung der Peakfinding-Parameter sein. Das Peakfinding im dritten Workflow wurde auf dem zur Messung eingesetzten LC-HRMS-System entwickelt und ist somit für dieses System sicher am besten geeignet. Dies spiegelt sich in den höchsten Zahlen für die Detektion wider. Die Möglichkeit der Identifizierung (MS²-Spektren, Datenbanken) war in allen Fällen dieselbe, was sich in einer kaum unterschiedlichen Anzahl an Substanzen in den Kategorien 1 und 2 zeigt. Die Vorteile der Automatisierung zeigen sich somit am ehesten im benötigten Zeitaufwand. Die Detektion der gesuchten Verbindungen war kaum durch die Wahl des Workflows beeinflusst.

Der erste angewandte Workflow (Suspect-Target-Screening) war am zeitintensivsten, da hier eine Prozessierung und manuelle Durchsicht der 200 Substanzen zur Identifizierung nötig war. Darüber hinaus musste für alle nicht in der vorhandenen Spektrenbibliothek enthaltenen Referenzspektren in Internet-Datenbanken recherchiert und verglichen werden. Der manuelle Aufwand der drei Workflows sinkt jedoch von (1) bis (3) deutlich. Dies ist zum einen im automatisierten Peakfinding in den Fällen (2) und (3), insbesondere aber auch in der automatisierten Priorisierung der Substanzvorschläge durch FOR-IDENT in Fall 3) begründet. Die Anzahl der erfassten dotierten Verbindungen steigt auch hier erwartungsgemäß mit der Konzentration der Stoffe.

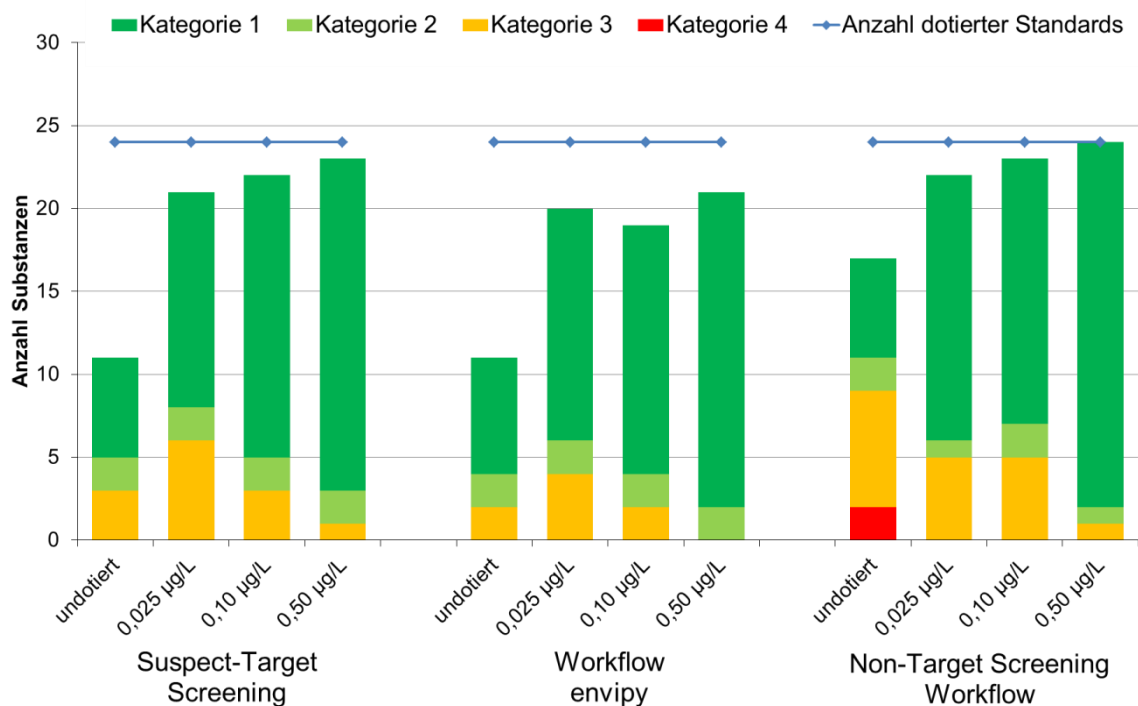


Abbildung 14-7: Vergleich Identifizierungsergebnisse eines Datensatzes mit drei unterschiedlichen Auswerteworkflows (1), (2), (3)

15 Literaturverzeichnis

1. Hollender J, Schymanski EL, Singer HP, Ferguson PL. Nontarget Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go? *Environ Sci Technol*. 2017;51(20):11505-12.
2. Nürenberg G, Schulz M, Kunkel U, Ternes TA. Development and validation of a generic nontarget method based on liquid chromatography – high resolution mass spectrometry analysis for the evaluation of different wastewater treatment options. *Journal of Chromatography A*. 2015;1426:77-90.
3. Bader T, Schulz W, Lucke T, Seitz W, Winzenbacher R. Application of Non-Target Analysis with LC-HRMS for the Monitoring of Raw and Potable Water: Strategy and Results. Assessing Transformation Products of Chemicals by Non-Target and Suspect Screening – Strategies and Workflows Volume 2. ACS Symposium Series. 1242: American Chemical Society; 2016. p. 49-70.
4. Alygizakis NA, Samanipour S, Hollender J, Ibáñez M, Kaserzon S, Kokkali V, et al. Exploring the Potential of a Global Emerging Contaminant Early Warning Network through the Use of Retrospective Suspect Screening with High-Resolution Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol*. 2018;52(9):5135-44.
5. Bader T, Schulz W, Kümmerer K, Winzenbacher R. LC-HRMS data processing strategy for reliable sample comparison exemplified by the assessment of water treatment processes. *Analytical chemistry*. 2017;89(24):13219-26.
6. Hollender J, Schymanski EL, Ahrens L, Alygizakis N, Béen F, Bijlsma L, et al. NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental monitoring. *Environmental Sciences Europe*. 2023;35(1):75.
7. Vosough M, Schmidt TC, Renner G. Non-target screening in water analysis: recent trends of data evaluation, quality assurance, and their future perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2024:1-12.
8. Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry*. 2013;85(7):1515-609.
9. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6).
10. Bader T, Schulz W, Kümmerer K, Winzenbacher R. General strategies to increase the repeatability in non-target screening by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2016;935:173-86.
11. Kind T, Fiehn O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC bioinformatics*. 2007;8(1):1-20.
12. MassBank Europe [Internet]. Available from: <https://massbank.eu/MassBank/>.
13. mzCloud [Internet]. Available from: <https://www.mzcloud.org/>.
14. PubChem [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
15. ChemSpider [Internet]. Available from: <http://www.chemspider.com/>.
16. Wolf S, Schmidt S, Müller-Hannemann M, Neumann S. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC bioinformatics*. 2010;11:1-12.
17. STOFF-IDENT Datensatz [Internet]. Available from: <https://water.for-ident.org/#!home>.
18. FOR-IDENT [Internet]. Available from: <http://www.chemspider.com/>.

19. CompTox Chemicals Dashboard [Internet]. Available from: <https://www.epa.gov/comptox-tools/comptox-chemicals-dashboard>.
20. DIN, ISO. DIN ISO 5667-5:2011-02 : Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 5: Anleitung zur Probenahme von Trinkwasser aus Aufbereitungsanlagen und Rohrnetzsystemen. 2011. p. 25.
21. Schulze B, Heffernan AL, Thomas KV, Kaserzon SL. Influence of Sample Stability on Non-target Analysis during Long Batch Acquisitions. ACS ES&T Water. 2023;3(9):2874-82.
22. DIN. DIN 38402-11:2009-02: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Allgemeine Angaben (Gruppe A) - Teil 11: Probenahme von Abwasser. In: A11; editor. 2009. p. 21.
23. DIN, ISO, EN. DIN EN ISO 5667-6:2016-12: Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 6: Anleitung zur Probenahme aus Fließgewässern. 2016:41.
24. Aalizadeh R, Alygizakis NA, Schymanski EL, Krauss M, Schulze T, Ibanez M, et al. Development and application of liquid chromatographic retention time indices in HRMS-based suspect and nontarget screening. Analytical chemistry. 2021;93(33):11601-11.
25. 2002/657/EG: Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, (2002).
26. ISO. 21253-1: 2019: Water quality - Multi-compound class methods – Part 1: Criteria for the identification of target compounds by gas and liquid chromatography and mass spectrometry. In: 2 ITS, editor. 1 ed. 21253-1: 20192019. p. 21.
27. DIN. DIN 38407-47:2017-07: Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und weiterer organischer Stoffe in Wasser und Abwasser - Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder -HRMS) nach Direktinjektion. In: 47; F, editor. 2017. p. 42.
28. Evaluation of Analytical Methods for EDCs and PPCPs via Inter-Laboratory Comparison [Internet]. 2012-2023. Available from: <https://www.waterrf.org/research/projects/evaluation-analytical-methods-edcs-and-ppcps-inter-laboratory-comparison>.
29. Raetz M, Bonner R, Hopfgartner G. SWATH-MS for metabolomics and lipidomics: critical aspects of qualitative and quantitative analysis. Metabolomics. 2020;16:1-14.
30. Helmus R, Ter Laak TL, van Wezel AP, de Voogt P, Schymanski EL. patRoön: open source software platform for environmental mass spectrometry based non-target screening. J Cheminform. 2021;13(1):1.
31. Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, Smirnov A, Myers O, Dyrland TS, et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. Nature biotechnology. 2023;41(4):447-9.
32. enviMass - mass spec analysis workflow [Internet]. Available from: <https://www.envibee.ch/eng/enviMass/overview.htm>.
33. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. Analytical chemistry. 2006;78(3):779-87.
34. Schollée JE, Schymanski EL, Hollender J. Statistical approaches for LC-HRMS data to characterize, prioritize, and identify transformation products from water treatment processes. Assessing Transformation Products of Chemicals by Non-Target and Suspect Screening– Strategies and Workflows Volume 1. 2016:45-65.
35. Katajamaa M, Orešič M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. Journal of chromatography A. 2007;1158(1-2):318-28.

36. Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X. Detailed investigation and comparison of the XCMS and MZmine 2 chromatogram construction and chromatographic peak detection methods for preprocessing mass spectrometry metabolomics data. *Analytical Chemistry*. 2017;89(17):8689-95.
37. Tisler S, Pattison DI, Christensen JH. Correction of matrix effects for reliable non-target screening LC–ESI–MS analysis of wastewater. *Analytical Chemistry*. 2021;93(24):8432-41.
38. Kuhl C, Tautenhahn R, Böttcher C, Larson TR, Neumann S. CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical chemistry*. 2012;84(1):283-9.
39. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. ACS Publications; 2014.
40. Tejada-Casado C, Hernández-Mesa M, Monteau F, Lara FJ, del Olmo-Irueña M, García-Campaña AM, et al. Collision cross section (CCS) as a complementary parameter to characterize human and veterinary drugs. *Analytica chimica acta*. 2018;1043:52-63.
41. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of mass spectrometry*. 2010;45(7):703-14.
42. Slobodnik J, Hollender J, Schulze T, Schymanski EL, Brack W. Establish data infrastructure to compile and exchange environmental screening data on a European scale. *Environmental Sciences Europe*. 2019;31:1-4.
43. Sheldon MT, Mistrik R, Croley TR. Determination of ion structures in structurally related compounds using precursor ion fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2011;20(3):370-6.
44. Aalizadeh R, Nika M-C, Thomaidis NS. Development and application of retention time prediction models in the suspect and non-target screening of emerging contaminants. *Journal of Hazardous materials*. 2019;363:277-85.
45. NORMAN Network [Internet]. Available from: <https://www.norman-network.net/>.
46. Samanipour S, Reid MJ, Thomas KV. Statistical variable selection: an alternative prioritization strategy during the nontarget analysis of LC-HR-MS data. *Analytical chemistry*. 2017;89(10):5585-91.
47. Bertinetto C, Engel J, Jansen J. ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*: X. 2020;6:100061.
48. Tautenhahn R, Böttcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC bioinformatics*. 2008;9(1):1-16.
49. Vergeynst L, Van Langenhove H, Demeestere K. Balancing the false negative and positive rates in suspect screening with high-resolution Orbitrap mass spectrometry using multivariate statistics. *Analytical chemistry*. 2015;87(4):2170-7.
50. Westad F, Marini F. Validation of chemometric models—a tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 2015;893:14-24.
51. DIN, ISO, EN. DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2017). 2018. p. 65.
52. Uhlig S, Nichani K, Stoyke M, Gowik P. Validation of binary non-targeted approaches: mathematical framework and experimental designs. *bioRxiv*. 2021:2021.01. 19.427235.
53. Fisher CM, Peter KT, Newton SR, Schaub AJ, Sobus JR. Approaches for assessing performance of high-resolution mass spectrometry–based non-targeted analysis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(22):6455-71.

54. Krue A. Strategies for Drawing Quantitative Conclusions from Nontargeted Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry Analysis. *Analytical Chemistry*. 2020;92(7):4691-9.
55. Keller BO, Sui J, Young AB, Whittal RM. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2008 Oktober:71-81.

Anhang A. Fachausschuss „Non-Target-Screening“

A.1 Hintergrund und Aufgaben

In der Wasserchemischen Gesellschaft (eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.) wurde 2009 der Fachausschuss Non-Target-Screening gegründet. Der Ausgangspunkt war die Unterstützung der Identifizierung von Spurenstoffen in der Analytik mittels LC-MS durch Aufbau einer geeigneten Datenbank (nutzbar auch bei Verwendung niedrigauflösender Systeme). Durch die Entwicklung von hochauflösenden Massenspektrometern für die Routine hat sich die Aufgabenstellung in Richtung Target-Analytik, Suspects- und Non-Target-Screening verschoben. In zukünftigen Arbeiten wird der Fokus der Gruppe auf folgende Themenfelder gelegt:

- Tools zur Identifizierung
- Laborübergreifendes NTS
- Qualitätssicherung bei der Datenprozessierung

A.2 Mitglieder des FA (Stand 2025)

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

Name	Institution/Adresse
Leitung:	
Bader, Tobias	Zweckverband Landeswasserversorgung Am Spitzigen Berg 1 D-89129 Langenau
und Jewell, Kevin	Bundesanstalt für Gewässerkunde Am Mainzer Tor 1 D-56068 Koblenz
Mitglieder:	
Armbruster, Dominic	DVGW-Technologiezentrum Wasser Karlsruher Str. 84 D-76139 Karlsruhe
Brüggen, Susanne	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW Dienststelle Duisburg Wuhanstraße 6 D-47051 Duisburg
Cunha, Ricardo	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) Bliersheimer Str. 58 - 60 D-47229 Duisburg
Götz, Sven	Hessenwasser GmbH & Co. KG Gräfenhäuser Straße 118 D-64293 Darmstadt
Härtel, Christoph	Ruhrverband Kronprinzenstr. 37 D-45128 Essen
Käberich, Merle	DVGW-Technologiezentrum Wasser Karlsruher Str. 84 D-76139 Karlsruhe

Kronsbein, Anna Lena	Umweltbundesamt Colditzstraße 34 D-12099 Berlin
Kunkel, Uwe	Bayerisches Landesamt für Umwelt Bürgermeister-Ulrich-Str. 160 D-86179 Augsburg
Letzel, Thomas	Analytisches Forschungsinstitut für Non-Target Screening GmbH Am Mittleren Moos 48 D-86167 Augsburg
Liebmann, Diana	Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB) Motardstr. 35 D-13629 Berlin
Liesener, André	Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH Willy-Brandt-Allee 26 D-45891 Gelsenkirchen
Logemann, Jörg	Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Institut für Hygiene und Umwelt Marckmannstraße 129b D-20539 Hamburg
Lucke, Thomas	Zweckverband Landeswasserversorgung Am Spitzigen Berg 1 D-89129 Langenau
Macherius, André	Bayerisches Landesamt für Umwelt Bürgermeister-Ulrich-Str. 160 D-86179 Augsburg
Merkus, Valentina	Hamburger Wasserwerke GmbH Billhorner Deich 2 D-20539 Hamburg
Petri, Michael	ZV Bodensee-Wasserversorgung Süßenmühle 1 D-78354 Sipplingen
Reineke, Anna	Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH Willy-Brandt-Allee 26 D-45891 Gelsenkirchen
Renner, Gerrit	Universität Duisburg-Essen Instrumental Analytical Chemistry (IAC) Universitätsstr. 5 D-45141 Essen
Ruppe, Steffen	Departement für Wirtschaft, Soziales und Umwelt des Kantons Basel-Stadt Amt für Umwelt und Energie Abteilung Umweltlabor Spiegelgasse 15 4001 Basel
Scheurer, Marco	LUBW Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg Griesbachstr. 1 D-76185 Karlsruhe
Schlüsener, Michael	Bundesanstalt für Gewässerkunde Am Mainzer Tor 1 D-56068 Koblenz
Schulz, Wolfgang	Hochschule Aalen - Technik und Wirtschaft Beethovenstraße 1 D-73430 Aalen
Singer, Heinz	Eawag Ueberlandstrasse 133 CH-8600 Dübendorf
Türk, Jochen	Kooperationslabor von Ruhrverband und Emschergenossenschaft/Lippeverband Kronprinzenstr. 37 D-45128 Essen

Zahn, Daniel	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Permoserstraße 15 D-04318 Leipzig
Zwiener, Christian	Universität Tübingen Umweltanalytik am ZAG Hölderlinstr. 121 D-72074 Tübingen

Anhang B. Massen- und RT-Kontrolle

B.1 Isotopenmarkierte interne Standards

Tabelle B-1: Aus Erfahrung der Mitglieder des FA NTS zusammengestellter Mix an Isotopenmarkierten internen Standards

Substanz	Summenformel	Neutrale Masse M	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	LogD (pH=5)	CAS
Metformin-D6	C ₄ H ₅ D ₆ N ₅	135,1391	J	N	-3,66	1185166-01-1
Sotalol D7	C ₁₂ D ₇ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	279,1634	J	J	-3,18	1398065-65-0
Metoprolol-d7	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	274,2274	J	N	-1,47	959787-96-3
Acesulfam-D4	C ₄ HD ₄ NO ₄ S	167,0190	N	J	-1,46	1623054-53-4
Hydrochlorothiazide 13C,D2	¹³ C ₁ C ₆ H ₆ D ₂ ClN ₃ O ₄ S ₂	299,9804	N	J	-0,58	1190006-03-1
Saccharin D4	C ₇ HD ₄ NO ₃ S	187,0241	N	J	-0,49	1189466-17-8
Iopromid-D3	C ₁₈ H ₂₁ D ₃ I ₃ N ₃ O ₈	793,8886	J	J	-0,44	1189947-73-6
Bentazon D6	C ₁₀ H ₆ D ₆ N ₂ O ₃ S	246,0945	N	J	-0,04	2733969-39-4
Sulfamethoxazol-D4	C ₁₀ H ₇ D ₄ N ₃ O ₃ S	257,0772	J	J	0,76	1020719-86-1
Chloridazon-D5	C ₁₀ H ₃ D ₅ ClN ₃ O	226,0670	J	J	1,11	1246818-99-4
Benzotriazole D4	C ₆ HN ₃ D ₄	123,0735	J	J	1,30	1185072-03-0
Bromacil-D3	C ₉ H ₁₀ D ₃ BrN ₂ O ₂	263,0349	J	J	1,69	2714436-92-5
Simazine-D10	C ₇ H ₂ D ₁₀ ClN ₅	211,1409	J	N	1,77	220621-39-6
Diuron-D6	C ₉ H ₄ D ₆ Cl ₂ N ₂ O	238,0547	J	J	1,93	1007536-67-5
DEET_D7	C ₁₂ H ₁₀ D ₇ NO	198,1750	J	N	2,50	1219799-37-7
Carbamazepin-D10	C ₁₅ H ₂ D ₁₀ N ₂ O	246,1577	J	N	2,77	132183-78-9
Bezafibrat D6	C ₁₉ H ₁₄ ClNO ₄ D ₆	367,1457	J	J	2,79	1219802-74-0
Darunavir D9	C ₂₇ H ₂₈ D ₉ N ₃ O ₇ S	556,2917	J	J	2,82	1133378-37-6
Fipronil 13C4	C ₈ ¹³ C ₄ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	439,9521	J	J	4,49	2140327-54-2
Diflufenican-D3	C ₁₉ H ₈ D ₃ F ₅ N ₂ O ₂	397,0929	J	N	5,11	1185009-29-3
Irbesartan D4	C ₂₅ H ₂₄ D ₄ N ₆ O	432,2576	J	J	5,44	1216883-23-6
Telmisartan-D3	C ₃₃ D ₃ H ₂₇ N ₄ O ₂	517,2557	J	N	6,04	1189889-44-8

Der Mix kann als gebrauchsfertige Stammlösung als „Pharma-Dx - Mix 22“ unter der Artikelnummer „R01243-WaaAN5“ bei der Neochema GmbH (Uwe-Zeidler-Ring 10, 55294 Bodenheim) bezogen werden.

Tabelle B-2: Liste isotoopenmarkierter interner Standards, eawag ($N_{ESI+} = 123$, $N_{ESI-} = 56$)¹

Nr.	Name	Summenformel	Reten- tionszeit [Min]
1	2,4-D d3 (-)	C ₈ H ₃ ² H ₃ Cl ₂ O ₃	9,7
2	2,6-Dichlorobenzamide-3,4,5 d3 (+)	C ₇ H ₂ ² H ₃ Cl ₂ NO	5,8
3	5-Methylbenzotriazole d6	C ₇ H ² H ₆ N ₃	6,5
4	Acetyl-sulfamethoxazole d5	C ₁₂ H ₈ ² H ₅ N ₃ O ₄ S	7,0
5	Alachlor d13 (+)	C ₁₄ H ₇ ² H ₁₃ ClNO ₂	12,8
6	Amisulpride d5	C ₁₇ H ₂₂ ² H ₅ N ₃ O ₄ S	5,1
7	Atazanavir d5	C ₃₈ H ₄₇ ² H ₅ N ₆ O ₇	10,2
8	Atenolol acid d5	C ₁₄ H ₁₆ ² H ₅ NO ₄	4,8
9	Atenolol d7 (+)	C ₁₄ H ₁₅ ² H ₇ N ₂ O ₃	4,5
10	Atomoxetine d3 (+)	C ₁₇ H ₁₈ ² H ₃ NO	7,7
11	Atorvastatin d5	C ₃₃ H ₃₀ ² H ₅ FN ₂ O ₅	11,8
12	Atrazine d5 (+)	C ₈ H ₉ ² H ₅ ClN ₅	9,7
13	Atrazine-2-hydroxy d5	C ₈ H ₁₀ ² H ₅ N ₅ O	4,9
14	Atrazine-desisopropyl d5 (+)	C ₅ H ₃ ² H ₅ ClN ₅	5,5
15	Azithromycin d3 (+)	C ₃₈ H ₆₉ ² H ₃ N ₂ O ₁₂	5,8
16	Azoxystrobin d4 (+)	C ₂₂ H ₁₃ ² H ₄ N ₃ O ₅	11,8
17	Bentazon d6	C ₁₀ H ₆ ² H ₆ N ₂ O ₃ S	9,4
18	Benztiazole d4	C ₆ H ² H ₄ N ₃	5,5
19	Bezafibrate d4	C ₁₉ H ₁₆ ² H ₄ ClNO ₄	10,4
20	Bicalutamide d4	C ₁₈ H ₁₀ ² H ₄ F ₄ N ₂ O ₄ S	11,0
21	Caffeine d9 (+)	C ₈ H ² H ₉ N ₄ O ₂	5,0
22	Candesartan d5	C ₂₄ H ₁₅ ² H ₅ N ₆ O ₃	9,3
23	Carbamazepine d8 (+)	C ₁₅ H ₄ ² H ₈ N ₂ O	8,4
24	Carbamazepine-10,11-epoxide C13,d2 (+)	C ₁₄ ¹³ CH ₁₀ ² H ₂ N ₂ O ₂	7,2
25	Carbendazim d4 (+)	C ₉ H ₅ ² H ₄ N ₃ O ₂	4,8
26	Cetirizine d8	C ₂₁ H ₁₇ ² H ₈ ClN ₂ O ₃	8,3
27	Chloridazon d5	C ₁₀ H ₃ ² H ₅ ClN ₃ O	6,4
28	Chloridazon-methyl-desphenyl d3	C ₅ H ₃ ² H ₃ ClN ₃ O	4,5
29	Chlorotoluron d6 (+)	C ₁₀ H ₇ ² H ₆ ClN ₂ O	9,3
30	Chlorpyrifos d10 (+)	C ₉ H ² H ₁₀ Cl ₃ NO ₃ PS	15,9
31	Chlorpyrifos-methyl d6 (+)	C ₇ H ² H ₆ Cl ₃ NO ₃ PS	14,4
32	Citalopram d6 (+)	C ₂₀ H ₁₅ ² H ₆ FN ₂ O	7,3
33	Clarithromycin-N-methyl d3 (+)	C ₃₈ H ₆₆ ² H ₃ NO ₁₃	8,4
34	Climbazole d4	C ₁₅ H ₁₃ ² H ₄ ClN ₂ O ₂	8,4
35	Clofibric acid d4 (-)	C ₁₀ H ₇ ² H ₄ ClO ₃	10,2
36	Clopidogrel carboxylic acid d4 (+)	C ₁₅ H ₁₀ ² H ₄ ClNO ₂ S	6,1
37	Clothianidin d3	C ₆ H ₅ ² H ₃ ClN ₅ O ₂ S	6,3
38	Clotrimazole d5 (+)	C ₂₂ H ₁₂ ² H ₅ ClN ₂	8,7
39	Clozapine d8 (+)	C ₁₈ H ₁₁ ² H ₈ ClN ₄	6,5
40	Codeine 13C,d3 (+)	C ₁₇ ¹³ CH ₁₈ ² H ₃ NO ₃	4,7
41	Cyclophosphamide d4 (+)	C ₇ H ₁₁ ² H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂ P	7,0
42	Cyprodinil d5 (+)	C ₁₄ ² H ₅ H ₁₀ N ₃	10,7
43	Darunavir d9	C ₂₇ H ₂₈ ² H ₉ N ₃ O ₇ S	10,4
44	Desethylatrazine 15N3 (+)	C ₆ H ₁₀ ClN ₂ ¹⁵ N ₃	6,5
45	Desphenyl Chloridazon 15N2 (+)	C ₄ H ₄ ClN ¹⁵ N ₂ O	2,9
46	Diazepam d5 (+)	C ₁₆ H ₈ ² H ₅ N ₂ OCl	10,7
47	Diazinon d10 (+)	C ₁₂ H ₁₁ ² H ₁₀ N ₂ O ₃ PS	14,1
48	Dichlorprop d6 (-)	C ₉ H ₂ ² H ₆ Cl ₂ O ₃	10,7
49	Diclofenac d4	C ₁₄ H ₇ ² H ₄ Cl ₂ NO ₂	12,1
50	Diflufenican d3	C ₁₉ H ₈ ² H ₃ F ₅ N ₂ O ₂	14,7
51	Dimethenamid d3 (+)	C ₁₂ H ₁₅ ² H ₃ ClNO ₂ S	11,7
52	Dimethoate d6 (+)	C ₅ H ₆ ² H ₆ NO ₃ PS ₂	6,7
53	Diuron d6	C ₉ H ₄ ² H ₆ Cl ₂ N ₂ O	9,8
54	Emtricitabine 13C,15N2 (+)	C ₇ ¹³ CH ₁₀ FN ¹⁵ N ₂ O ₃ S	4,5
55	Epoxiconazole d4 (+)	C ₁₇ H ₉ ² H ₄ ClFN ₃ O	11,9
56	Eprosartan d3	C ₂₃ H ₂₁ ² H ₃ N ₂ O ₄ S	6,6
57	Erythromycin 13C2 (+)	C ₃₅ ¹³ C ₂ H ₆₇ NO ₁₃	7,4
58	Fenofibrate d6 (+)	C ₂₀ H ₁₅ ² H ₆ ClO ₄	15,9
59	Fipronil 13C2,15N2	C ₁₀ ¹³ C ₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₂ ¹⁵ N ₂ OS	13,4
60	Fluconazole d4	C ₁₃ H ₈ ² H ₄ F ₂ N ₆ O	5,9

¹ Eawag - Environmental Chemistry

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

Nr.	Name	Summenformel	Reten- tionszeit [Min]
126	Trimethoprim d9 ⁽⁺⁾	C ₁₄ H ₉ ² H ₉ N ₄ O ₃	4,9
127	Valsartan 13C5,15N	C ₁₉ ¹³ C ₅ H ₂₉ N ₄ ¹⁵ NO ₃	10,8
128	Valsartan acid d4	C ₁₄ H ₆ ² H ₄ N ₄ O ₂	7,3
129	Venlafaxine d6 ⁽⁺⁾	C ₁₇ H ₂₁ ² H ₆ NO ₂	6,3
130	Verapamil d6 ⁽⁺⁾	C ₂₇ H ₃₂ ² H ₆ N ₂ O ₄	8,1

(⁺): ESI positiv Modus

(⁻): ESI negativ Modus

B.2 Standard zur Retentionszeitnormierung und Anwendung

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

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

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

Name	CAS-Nr.	Summenformel	logD (pH 3)	ESI Modus	N _{RTI} *)	$\bar{x}$ $\Delta \log D$	s $\Delta \log D$
Gabapentin	60142-96-3	$C_9H_{17}NO_2$	-2,00	pos	18	1,4	0,61
				neg	12	1,5	0,73
Metoprololsäure	56392-14-4	$C_{14}H_{21}NO_4$	-1,69	pos	15	1,1	0,62
				neg	4	1,0	0,01
Propranolol	525-66-6	$C_{16}H_{21}NO_2$	-0,66	pos	15	1,1	0,31
				neg	-	-	-
Hydrochlorothiazid	58-93-5	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$	-0,58	pos	10	-0,5	0,18
				neg	14	-0,3	0,27
Coffein	58-08-2	$C_8H_{10}N_4O_2$	-0,55	pos	17	0,0	0,24
				neg	-	-	-
Clarithromycin	81103-11-9	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	-0,26	pos	16	1,6	0,45
				neg	4	2,1	0,45
Atrazine-2-hydroxy	2163-68-0	$C_8H_{15}N_5O$	0,00	pos	14	-0,4	0,41
				neg	10	-0,6	0,08
Metamitron	41394-05-2	$C_{10}H_{10}N_4O$	0,24	pos	14	-0,3	0,14
				neg	7	-0,2	0,02
Sulfathiazol	72-14-0	$C_9H_9N_3O_2S_2$	0,93	pos	13	-0,7	0,24
				neg	9	-0,8	0,12
Desethylatrazin	6190-65-4	$C_6H_{10}ClN_5$	1,02	pos	15	-0,8	0,08
				neg	-	-	-
1,2,3-Benzotriazol	95-14-7	$C_6H_5N_3$	1,30	pos	15	-0,6	0,06
				neg	11	-0,6	0,07
2,4-Dinitrophenol	51-28-5	$C_6H_4N_2O_5$	1,53	pos	15	-0,2	0,55
				neg	18	-0,1	0,55
4-Methyl-1H-benzotriazol	29878-31-7	$C_7H_7N_3$	1,78	pos	13	-0,5	0,09
				neg	6	-0,6	0,10
5-Methyl-1H-benzotriazol	136-85-6	$C_7H_7N_3$	1,81	pos	16	-0,6	0,11
				neg	11	-0,6	0,11
4-Chlorbenzoesäure	74-11-3	$C_7H_5ClO_2$	2,20	pos	3	-0,5	0,66
				neg	6	-0,3	0,47
N,N-Diethyltoluamid	134-62-3	$C_{12}H_{17}NO$	2,50	pos	15	-0,6	0,86
				neg	-	-	-
Isoproturon	34123-59-6	$C_{12}H_{18}N_2O$	2,57	pos	14	-0,3	0,11
				neg	-	-	-
Mecoprop	7085-19-0	$C_{10}H_{11}ClO_3$	2,85	pos	13	-0,2	0,35
				neg	13	-0,2	0,35
Dimethenamid	87674-68-8	$C_{12}H_{18}ClNO_2S$	2,92	pos	14	-0,1	0,07
				neg	-	-	-
Dinoterb	1420-07-1	$C_{10}H_{12}N_2O_5$	3,09	pos	12	0,0	0,53
				neg	15	0,5	0,59
Valsartansäure	164265-78-5	$C_{14}H_{10}N_4O_2$	3,14	pos	18	-1,5	0,44
				neg	18	-1,5	0,44
Metolachlor	51218-45-2	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	3,45	pos	16	0,0	0,16
				neg	-	-	-
Bezafibrat	41859-67-0	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	3,93	pos	16	-1,4	0,28
				neg	16	-1,4	0,28
Gemfibrozil	25812-30-0	$C_{15}H_{22}O_3$	4,37	pos	4	0,1	0,57
				neg	5	0,2	0,52

*) Anzahl Werte von insgesamt 6 Laboratorien

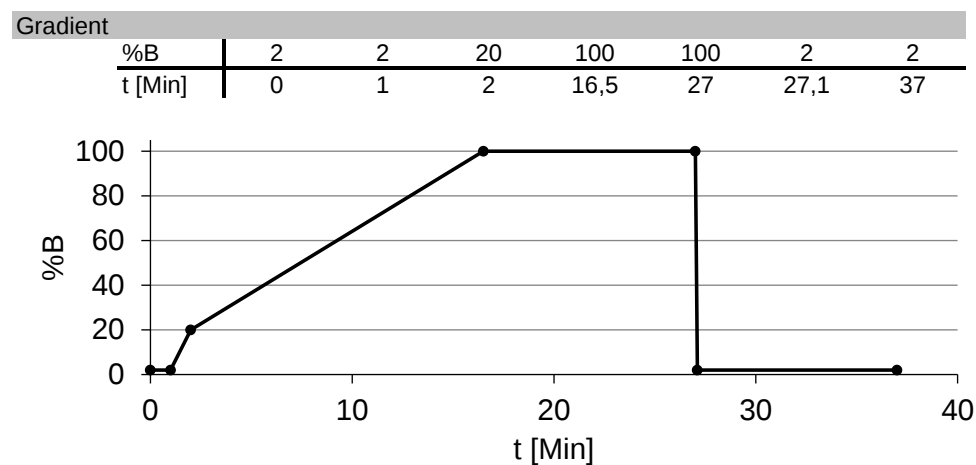
Anhang C. Methodisches

C.1 Beispiele von LC-Methoden

Im Folgenden sind zwei Beispielmethoden für mögliche chromatographische Trennmethoden angegeben.

Methode A:

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



Methode B:

Eluenten

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

Injektionsvolumen 95 µL Probe + 5 µL isotopenmarkierter Standard-Mix

Säulentemperatur 40°C

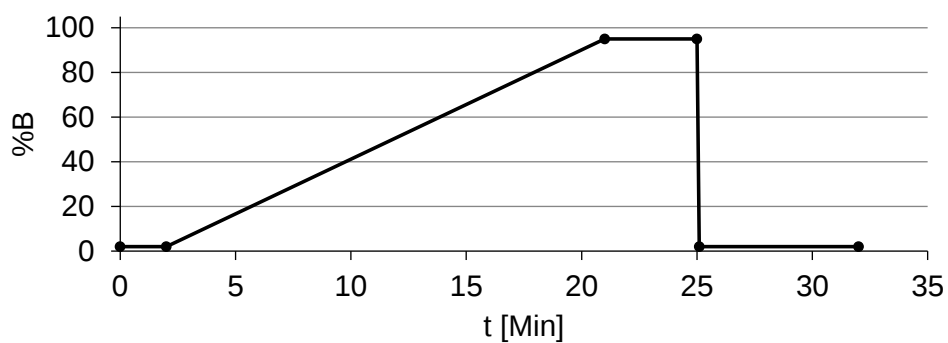
Flussrate 0,6 mL/min

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

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

Gradient

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



C.2 Beispiele von MS-Methoden

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

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

Quellenparameter	
Gas Flows	Gas 1: 35 psi Gas 2: 45 psi Curtain Gas: 40 psi Collision Gas: 6/medium
Temperature	550 °C
ISVF	5500 V (+) -4500 V (-)
Declustering Potential	60 V (+) -100 (-)
TOF-MS Scan Parameter	
Mass Range	MS: 100 – 1200 Da TOF-MS: 250 ms
MS ² Parameter	
Mass Range	30 – 1200 Da
Collision Energy	40 eV (+) -40 eV (-)
Collision Energy Spread	20 eV
MS ² Acquisition in IDA or SWATH mode	
<i>IDA Triggering</i>	
Accumulation Time	65 ms
Max number of MS ² per cycle	12
Minimum intensity	100 cps
Exclude Isotopes	Within 4 Da
Mass Tolerance	5 ppm
Include/Exclude List	None
Dynamic Background subtract	On
<i>SWATH</i>	
Accumulation Time	50 ms
Mass range	100 – 1200 Da
Number of SWATH windows	16

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

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

C.3 Blindwertmessungen

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

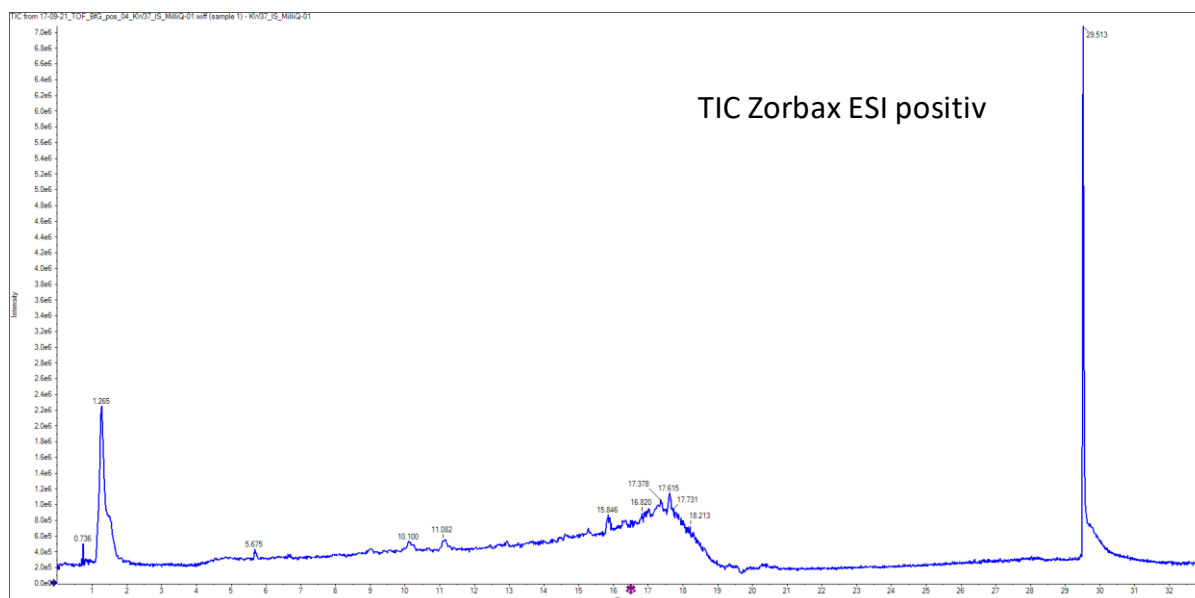


Abbildung C-1: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A, Elektrospray positiv

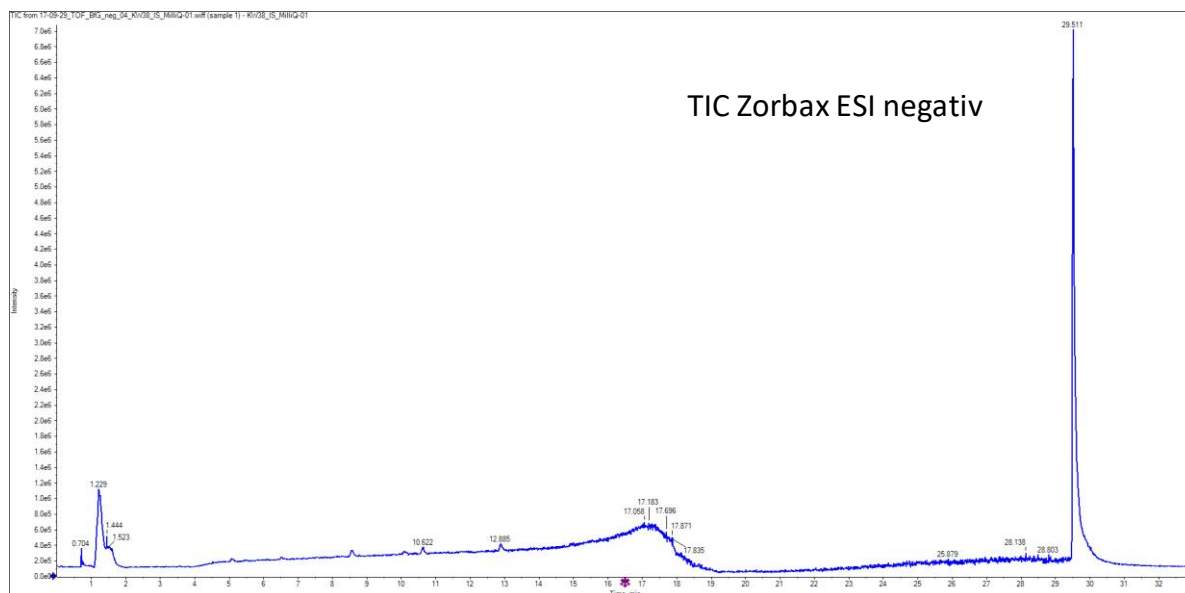


Abbildung C-2: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode A, Elektrospray negativ

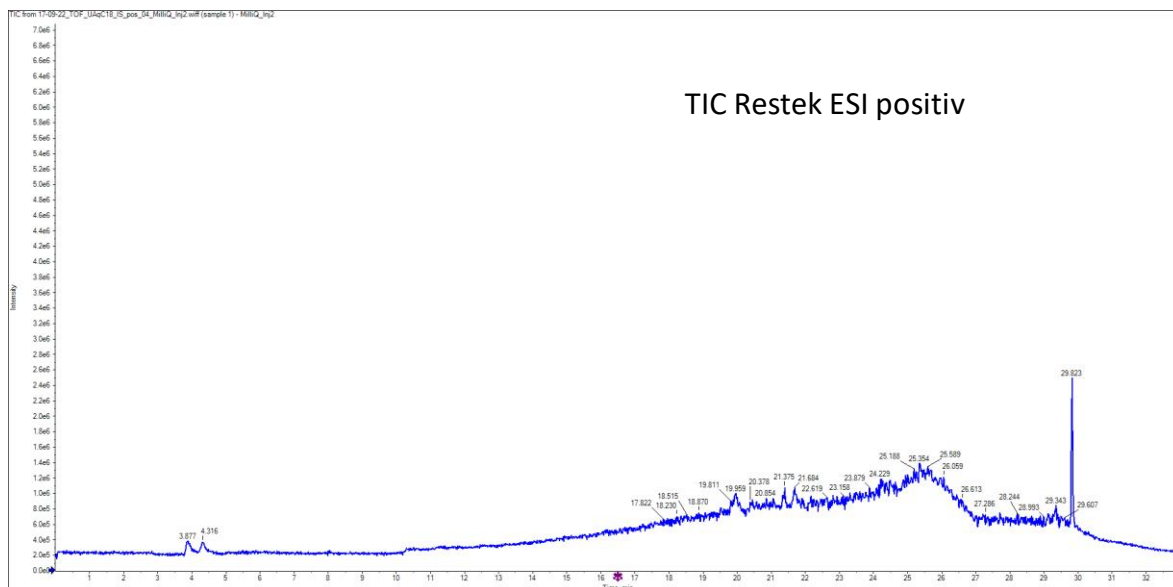


Abbildung C-3: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B, Elektrospray positiv

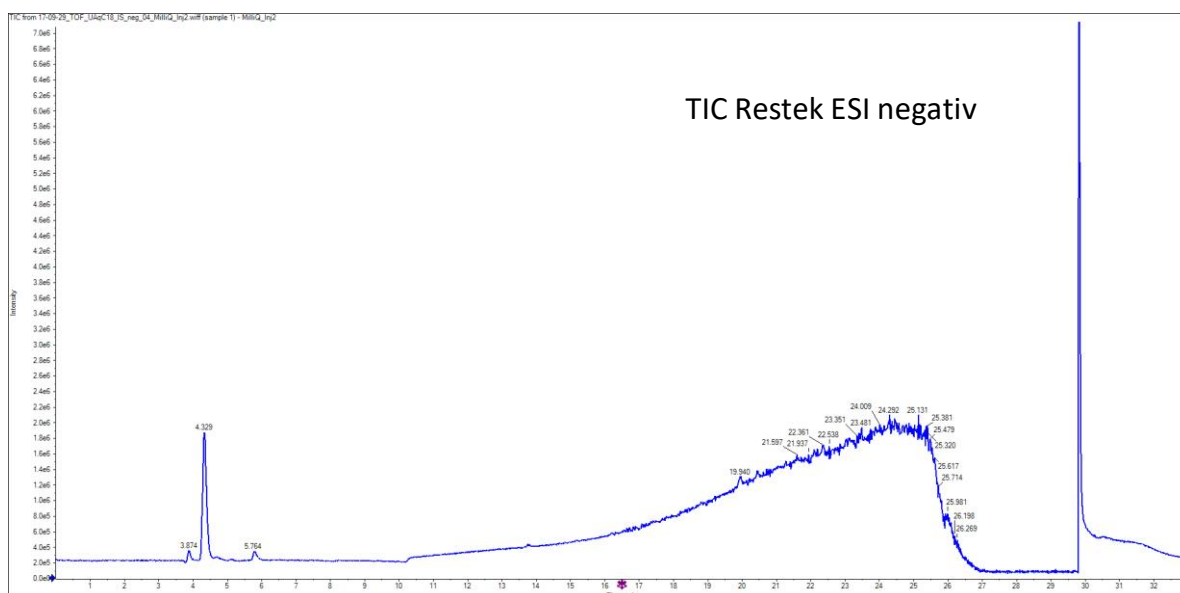


Abbildung C-4: Totalionenstromchromatogramm LC-Methode B, Elektrospray negativ

C.4 Retentionszeit-Masse-Plot von Blindwerten

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

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

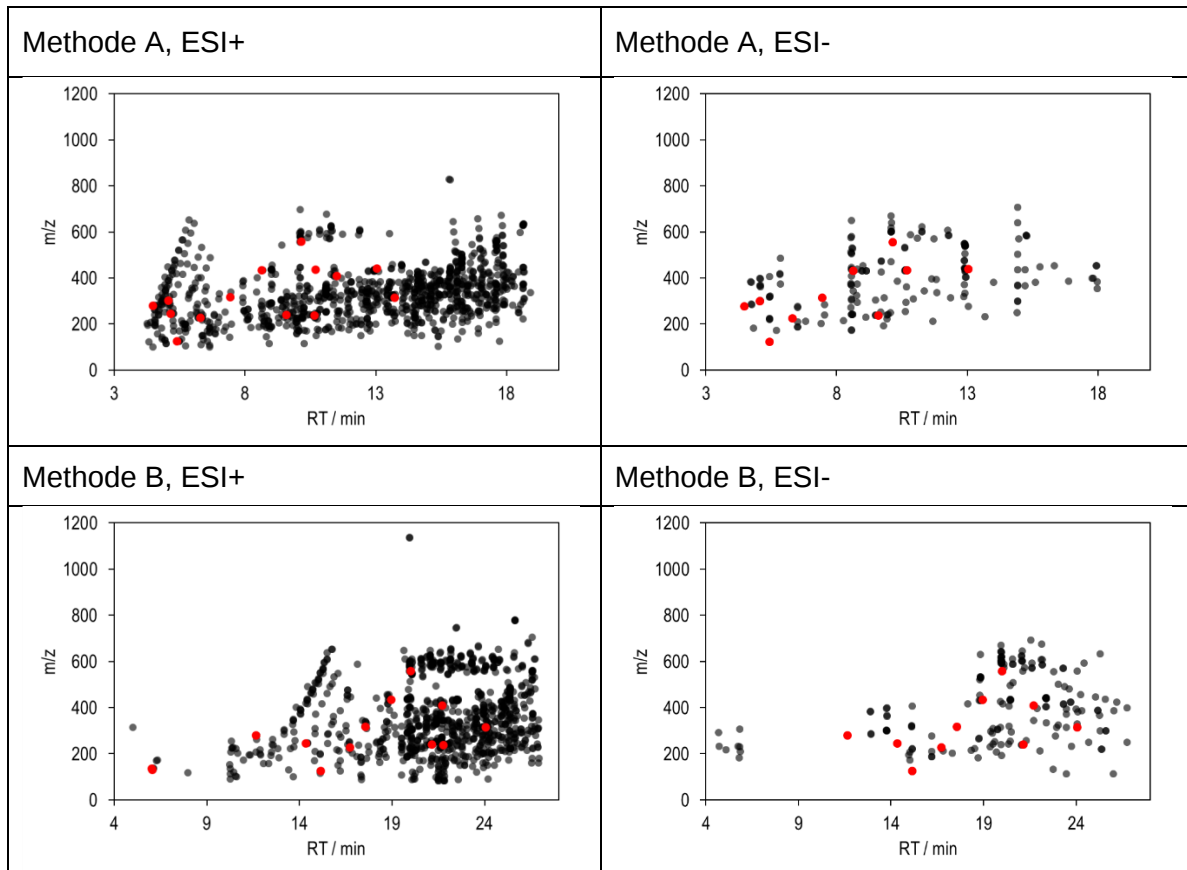


Abbildung C-5: Masse-RT-Scatterplots („Punktwolken“) der beiden Beispielmethoden A und B, jeweils im ESI positiven und negativen Modus

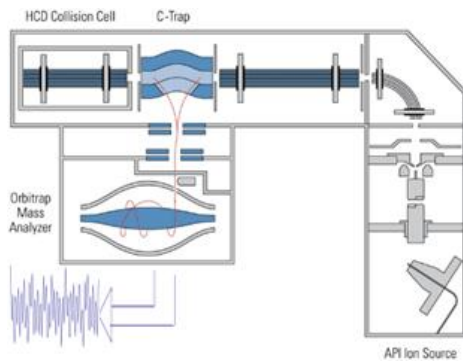
Anhang D. Messtechnik

D.1 HRMS Massenspektrometer

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

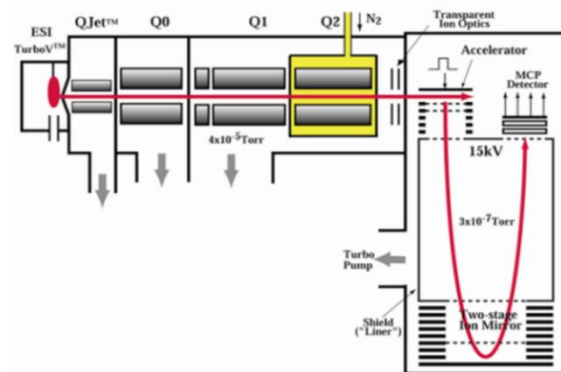
Ein Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS) besteht aus einem Rohr unter Vakuum mit einem sehr schnellen Detektor am Ende. Prinzipiell wird in TOF-Geräten ausgenutzt, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und beim Anlegen einer Beschleunigungsspannung leichtere Ionen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

Orbitrap



Bildquelle:
Thermo Fischer Scientific

Flugzeitmassenspektrometer (TOF)



Bildquelle: Sciex®

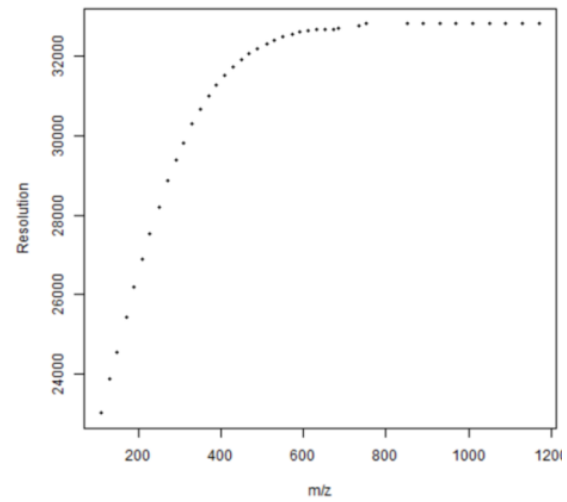
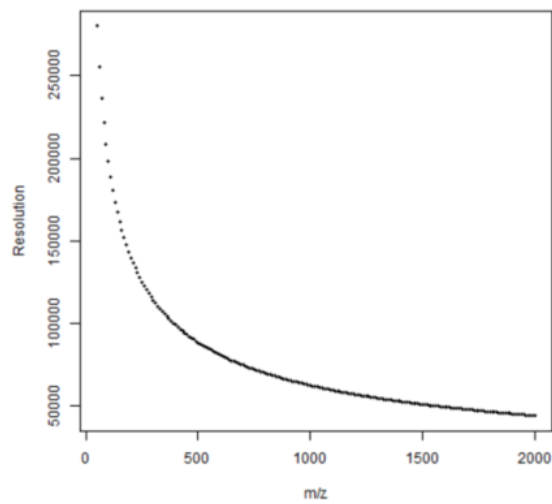


Abbildung D-1: Schematischer Aufbau der Massenspektrometer Orbitrap (links) und Flugzeit-Massenspektrometer (rechts) mit deren Auflösungsvermögen in Abhängigkeit des Massenbereichs (unten)

Anhang E. Systemstabilität

E.1 Chromatographie

Reproduzierbarkeit der Retentionszeit

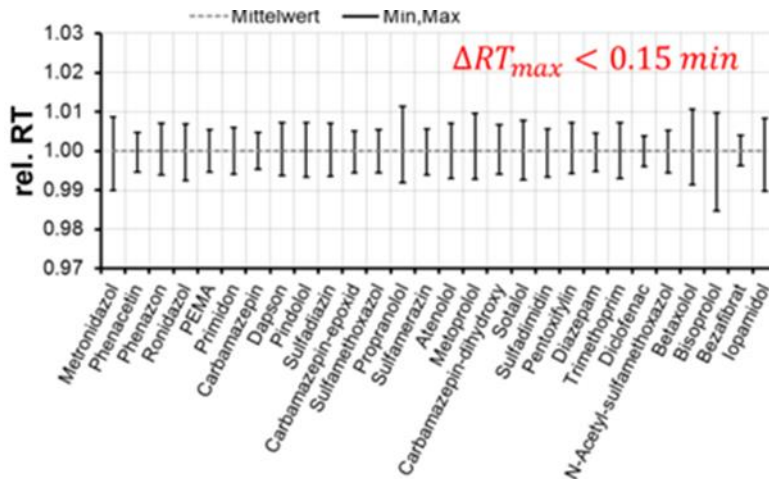


Abbildung E-1: Retentionszeitstabilität über $N = 134$ Messungen (über einen Zeitraum von 10 Monaten)

E.2 Massenspektrometrie

Langzeitstabilität der Empfindlichkeit

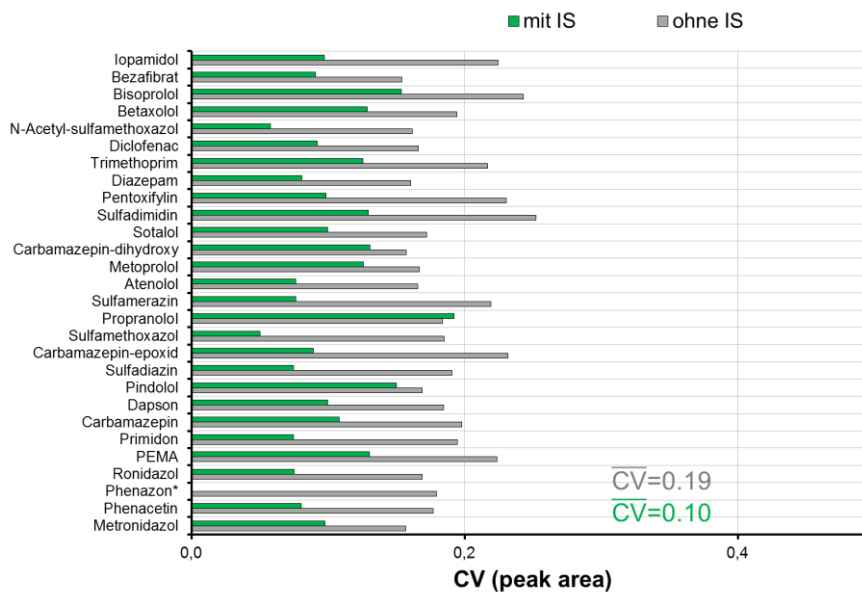


Abbildung E-2: Stabilität der Gerätesensitivität über einen Zeitraum von 10 Monaten ($N = 134$) ohne (grau) und mit (grün) interner Standardisierung (*Phenazon als IS)

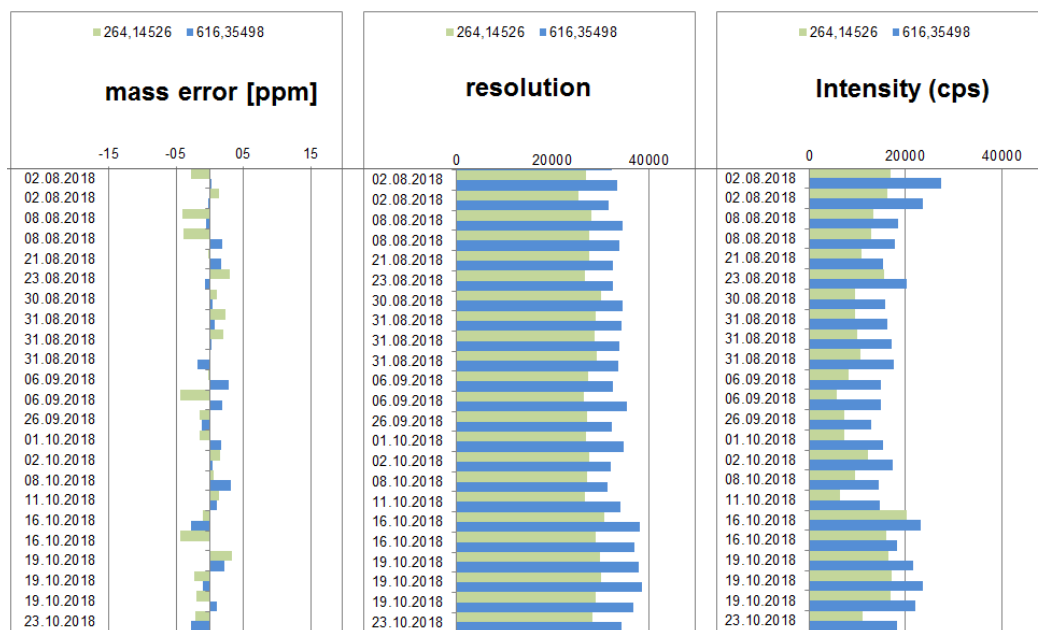


Abbildung E-3

Dokumentationsmöglichkeit zur Kontrolle der MS-Performance über Massengenauigkeit, Auflösungsvermögen und Sensitivität

Anhang F. Datenauswertung

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

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

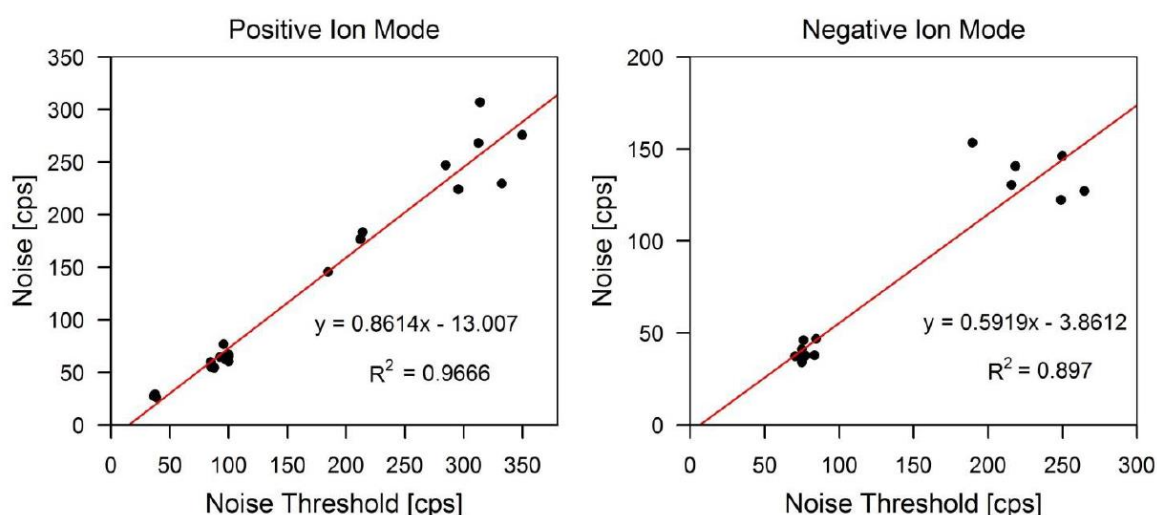


Abbildung F-1: Korrelation zwischen „Noise“ und dem berechneten „Noise Threshold“

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

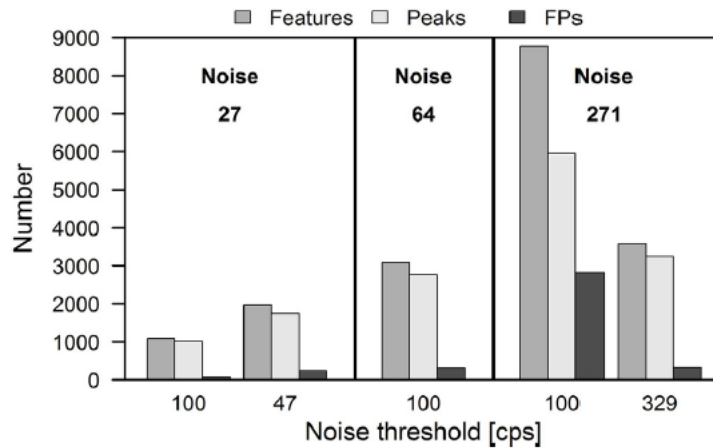


Abbildung F-2: Änderung der Anzahl an Features, echten Peaks und falsch-positiv-Ergebnissen (FPs) auf Grund des verwendeten „Noise Threshold“ (100 cps und berechneter Wert aus der Anpassungsgleichung) für die Messungen (positive Ionisation) einer aufdotierten Kläranlagenablaufprobe für drei verschiedene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

Anhang G. Adduktbildung beim Einsatz einer ESI-Quelle

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

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

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

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

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

Weitere Addukte, *in-source*-Fragmente bzw. typische Blindwerte und Verunreinigungen in der LC-(HR)MS sind in der Literatur beschrieben [55].

Anhang H. Statistische Methoden

Bei der nachstehenden Tabelle H-1 handelt es sich um eine Auswahl von angewandten Methoden zur statistischen Auswertung von NTS-Daten. Dabei ist anzumerken, dass jede Methode spezifische Stärken und Schwächen besitzt und daher immer zu prüfen ist, welche Methode für die konkrete analytische Fragestellung zur Anwendung kommen könnte. Neben dieser Methodenauswahl gibt es eine Vielzahl weiterer bekannter Methoden, weshalb auch hier empfohlen wird, bei Bedarf eine umfassende Literaturrecherche durchzuführen.

Tabelle H-1: Übersicht beispielhafter statistischer Methoden zur Analyse von NTS-Daten.

Methoden	Studie (Referenz)	Grundlegendes Prinzip	Anwendbare Fragestellung
PCA (Principal Component Analysis)	1, 2	Reduktion der Dimensionalität bei Maximierung der Varianz	Exploration der Datenstruktur Gruppierung ähnlicher Proben und Features Identifikation von Extrema Feature-Priorisierung
HCA (Hierarchical Cluster Analysis)	3	Restrukturierung der Proben anhand einer Feature-basierten Ähnlichkeitsmetrik	Exploration der Datenstruktur Gruppierung ähnlicher Proben Identifikation von Extrema
PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis)	4	Klassifizierung und Maximierung der Varianz zwischen Gruppen	Identifikation von Features, die Gruppen am besten unterscheiden
OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminate Analysis)	5	Klassifizierung und Maximierung der Varianz zwischen Gruppen bei getrennter Betrachtung von Unterschieden zwischen und innerhalb der Gruppen	Identifikation von Features, die Gruppen am besten unterscheiden
ML-PLS-DA (Multi Level Partial Least Squares Discriminant Analysis)		Klassifizierung und Maximierung der Varianz zwischen Untergruppen unter Berücksichtigung übergeordneter Gruppen	Identifikation von Features, die (Unter)gruppen am besten unterscheiden, z. B. Gruppen

¹ Purschke, K., Zoell, C., Leonhardt, J., Weber, M., & Schmidt, T. C. (2020). Identification of unknowns in industrial wastewater using offline 2D chromatography and non-target screening. *Science of the Total Environment*, 706, 135835.

² López-Doval, J. C., Montagner, C. C., de Albuquerque, A. F., Moschini-Carlos, V., Umbuzeiro, G., & Pompêo, M. (2017). Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 575, 1307-1324.

³ Schollée, J. E., Bourgin, M., von Gunten, U., McArdell, C. S., & Hollender, J. (2018). Non-target screening to trace ozonation transformation products in a wastewater treatment train including different post-treatments. *Water Research*, 142, 267-278.

⁴ Samanipour, S., Kaserzon, S., Vijayasathya, S., Jiang, H., Choi, P., Reid, M. J., & Thomas, K. V. (2019). Machine learning combined with non-targeted LC-HRMS analysis for a risk warning system of chemical hazards in drinking water: A proof of concept. *Talanta*, 195, 426-432.

⁵ Vanryckeghem, F., Huysman, S., Van Langenhove, H., Vanhaecke, L., & Demeestere, K. (2019). Multi-residue quantification and screening of emerging organic micropollutants in the Belgian Part of the North Sea by use of Speedisk extraction and Q-Orbitrap HRMS. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 350-360.

Method	Studie (Referenz)	Grundlegendes Prinzip	Anwendbare Fragestellung
			regionale oder saisonale Vergleiche
MOCA (Multi-block Orthogonal Component Analysis)		Klassifizierung und Maximierung der Varianz zwischen Gruppen über mehrere Datensätze hinweg bei getrennter Betrachtung von Unterschieden zwischen und innerhalb der Datensätze	Identifikation von Features, die Gruppen am besten unterscheiden
ASCA (ANOVA-Simultaneous Component Analysis)	¹	Analyse des Einflusses mehrerer Faktoren auf den Datensatz	Bewertung des Einflusses von experimentellen Faktoren
PARAFAC2 (Parallel Factor Analysis 2)	²	Mustererkennung in Drei-Wege-Daten (z. B. Zeit, Region, Feature-Intensität), wobei eine Dimension variieren darf	Zeitreihenanalyse hinsichtlich Feature-Intensitätsprofile, z. B. zum Erkennen von Trends für Vorhersage oder Frühwarnsysteme
FBMN (Feature-Based Molecular Networking)	³	Netzwerkerstellung basierend auf MS und MS ² Spektrenähnlichkeit	Identifizierung unbekannter Stoffe
MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares)	^{4, 5}	Bi-lineare Regression basierend auf <i>m/z</i> bezogenen Elutionsprofilen	Komponentisierung, Alternative zur Erstellung von komponentisierten Features, die keine Featureerkennung benötigt

¹ Hohrenk-Danzouma, L. L., Vosough, M., Merkus, V. I., Drees, F., & Schmidt, T. C. (2022). Non-target analysis and chemometric evaluation of a passive sampler monitoring of small streams. *Environmental Science & Technology*, 56(9), 5466-5477.

² Nielsen, N. J., Christensen, P., Poulsen, K. G., & Christensen, J. H. (2023). Investigation of micropollutants in household waste fractions processed by anaerobic digestion: target analysis, suspect-and non-target screening. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(16), 48491-48507.

³ Oberleitner, D., Schmid, R., Schulz, W., Bergmann, A., & Achten, C. (2021). Feature-based molecular networking for identification of organic micropollutants including metabolites by non-target analysis applied to riverbank filtration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 5291-5300.

⁴ Hohrenk, L. L., Vosough, M., & Schmidt, T. C. (2019). Implementation of chemometric tools to improve data mining and prioritization in LC-HRMS for nontarget screening of organic micropollutants in complex water matrices. *Analytical Chemistry*, 91(14), 9213-9220.

⁵ Khatoonabadi, R. L., Vosough, M., Hohrenk, L. L., & Schmidt, T. C. (2021). Employing complementary multivariate methods for a designed nontarget LC-HRMS screening of a wastewater-influenced river. *Microchemical Journal*, 160, 105641.

Anhang I. Workflow

I.1 Beispiel für einen typischen Screening-Workflow

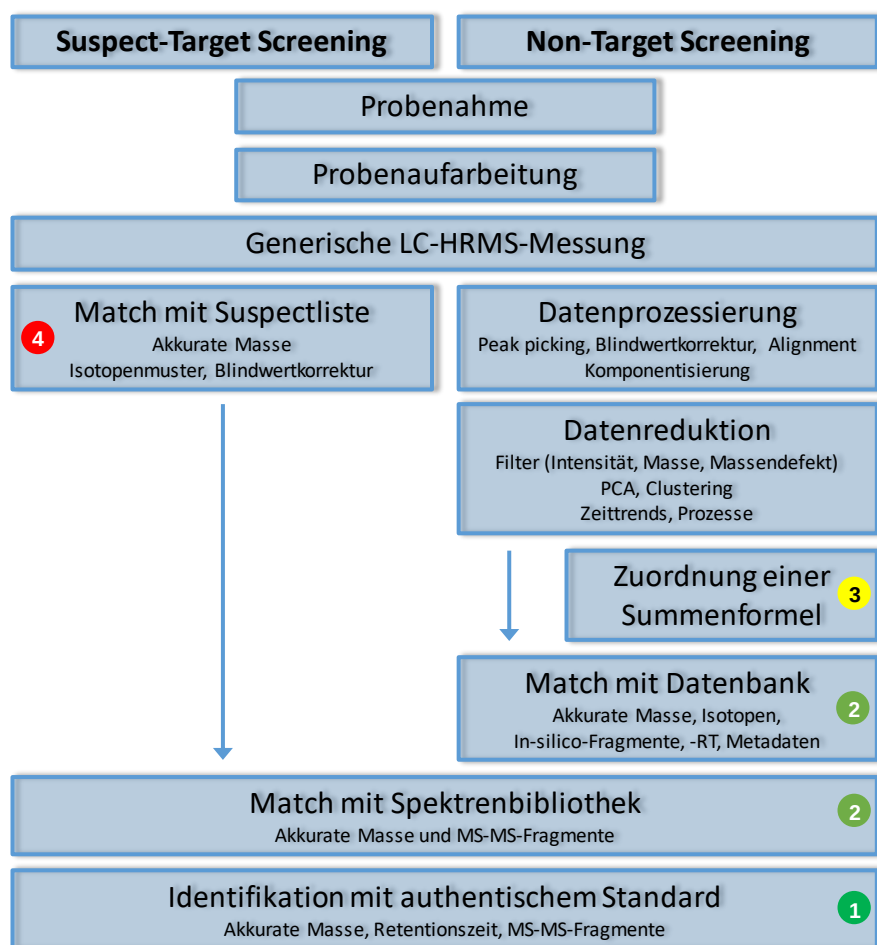


Abbildung I-1: Beispielworkflow für Suspect- und Non-Target-Screening inkl. der Kategorisierung zur Identifizierung von Substanzen (siehe auch 10.2.1)

Weitere Beispielworkflows finden sich in der Literatur [1].

Anhang J. Validierung

J.1 Probenvergleich

Für die Validierung der Parameter Präzision, Richtigkeit und Messunsicherheit kann ein Featurevergleich von beispielsweise Wiederholmessungen durchgeführt werden. Nach Peakfinding und Alignment werden die ermittelten Peak-Intensitäten ins Verhältnis gesetzt (fold-change fc). In Abbildung J-1 sind die prinzipiell möglichen Intensitätsverhältnisse dargestellt. Im „grünen Bereich“ wurden in beiden Proben die Feature detektiert und deren Intensitätsverhältnisse schwanken in einem festzulegenden Bereich beispielsweise $0,5 \leq fc \leq 2,0$. Im „roten Bereich“ liegen die extremen Verhältnisse bis zu nicht detektiert in der einen oder anderen Messung. Die größte Intensität des Peakvergleichs wird in einem Diagramm gegen den fold-change aufgetragen (siehe Abbildung J-2 und Abbildung J-3).

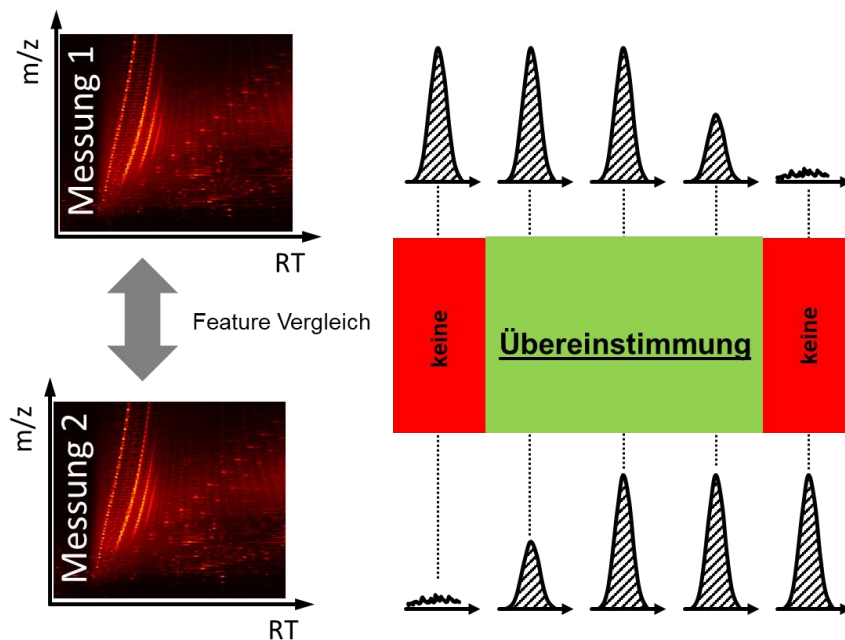


Abbildung J-1: Auswertung des Probenvergleichs anhand des Verhältnisses der Peakintensitäten

Die Abbildung J-2 und Abbildung J-3 zeigen beispielhaft zwei Ergebnisse eines Probenvergleichs. Der „Grüne Bereich“ kann aufgrund der Erfahrungen mit dem eingesetzten Messsystem fallspezifisch in der Methode festgelegt werden. Ein derartiger Vergleich zwischen den Messungen unterschiedlichster Proben kann über die der Probe zudosierten internen Standards erfolgen. Dadurch ist es möglich Matrixeinflüsse bei der Messung zu erkennen und in der Auswertung zu berücksichtigen.

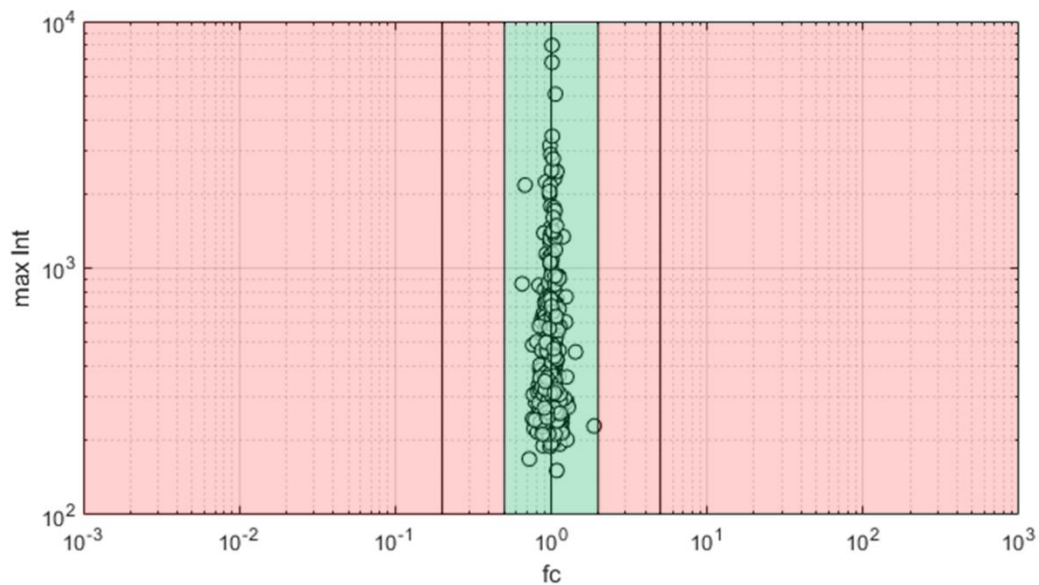


Abbildung J-2: Beispielhaftes Ergebnis des Vergleichs einer Wiederholmessung mit einer sehr guten Reproduzierbarkeit

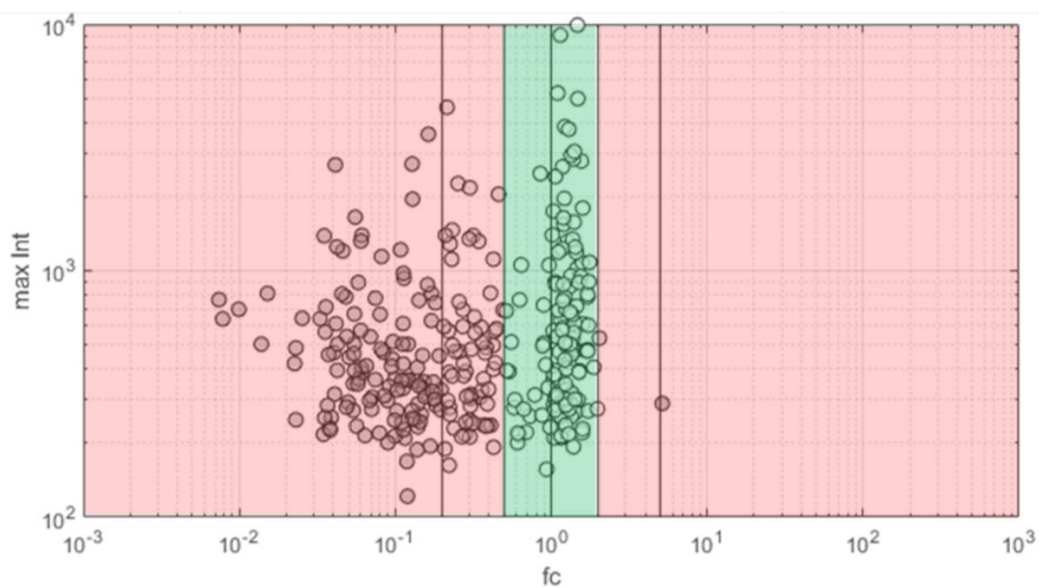


Abbildung J-3: Beispielhaftes Ergebnis des Vergleichs einer Wiederholmessung mit einer sehr schlechten Reproduzierbarkeit

J.2 Klassifizierung

Zur Klassifizierung von Proben ist die Anwendung des Non-Target-Screenings ein wichtiges Hilfsmittel. Es ist damit möglich über das Muster von Signalen eine Zuordnung der Proben in unterschiedliche Klassen durchzuführen, auch ohne die Identifizierung einzelner Substanzen. Bei der Validierung der Klassifikationsmethode kann die Konfusionsmatrix (Wahrheitsmatrix) Abbildung J-4 eingesetzt werden.

		Realität		Summe
		positiv (A+)	negativ (A-)	
Analyse	positiv (A+)	richtig-positiv (TP)	falsch-positiv (FP)	PP = TP + FP
	negativ (A-)	falsch-negativ (FN)	richtig-negativ (TN)	PN = FN + TN
Summe		RP = TP + FN	RN = FP + TN	N = PP + PN

Abbildung J-4: Konfusionsmatrix (Wahrheitsmatrix) PP: predicted positives; PN: predicted negatives; N: Gesamtzahl der Proben
RP: real positives; RN: real negatives

Aus der Konfusionsmatrix lassen sich folgende Kennzahlen berechnen:
(Zu beachten ist, dass diese Begriffe hier eine andere Interpretation haben als bei der Validierung in der Target Analytik.)

Sensitivität: Diese wird auch als True-Positive-Rate (Recall) bezeichnet und gibt den Anteil der positiv klassifizierten tatsächlich positiven Proben an.

$$TPR (Recall, Sensitivity) = \frac{TP}{TP + FN}$$

Die Sensitivität ist eine Kennzahl für das Erkennen der positiven Fälle.

Spezifität: Diese wird auch als True-Negative-Rate bezeichnet und gibt den Anteil der negativ klassifizierten tatsächlich negativen Proben an.

$$TNR (Spezifität, Selektivität) = \frac{TN}{TN + FP}$$

Präzision: Dies ist die relative Häufigkeit von richtig positiv klassifizierten Proben.

$$Präzision = \frac{TP}{TP + FP}$$

Genauigkeit, Korrektklassifikationsrate: Diese beschreibt die insgesamt richtig Klassifizierten im Verhältnis zu allen Klassifizierungen.

$$Genauigkeit = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN}$$

Fehlerrate, Falschklassifikationsrate: Diese beschreibt die insgesamt falsch Klassifizierten im Verhältnis zu allen Klassifizierungen und ist somit das Komplementäre zur Genauigkeit.

$$Fehlerrate = \frac{FP + FN}{TP + TN + FP + FN}$$

Anhand dieser Kennzahlen ist eine Validierung der gewählten NTS-Methode hinsichtlich der Anwendung auf die Fragestellung möglich.

Zur Verdeutlichung der Anwendung der Konfusionsmatrix soll folgendes Beispiel dienen. Es wurde eine Methode, basierend auf NTS-Daten, zur Feststellung der Belastung von Oberflächenwasser mit Abwasser erstellt. Anhand von NTS-Daten belasteter und nicht belasteter Proben könnte so über eine Hauptkomponentenanalyse eine Gruppierung der Proben erfolgen. Zur Validierung der Gruppierung kann die Konfusionsmatrix herangezogen werden. Hierzu wird beispielsweise ein Probensatz von 12 belasteter Proben (+) und 10 nicht belasteter Proben (-) analysiert und bewertet. Es wurden 10 von 12 belasteter Proben korrekt (+) zugeordnet und somit 2 falsch (-). 9 von 10 nicht belasteter Proben wurden korrekt (-) zugeordnet und somit 1 falsch (+). In *Abbildung J-5* sind die Ergebnisse in die Konfusionsmatrix eingetragen.

		Realität		
		positiv (A+)	negativ (A-)	Summe
Analyse	positiv (A+)	10 (TP)	1 (FP)	11 = TP + FP
	negativ (A-)	2 (FN)	9 (TN)	11 = FN + TN
Summe		12 = TP + FN	10 = FP + TN	22 = PP + PN

Abbildung J-5: Konfusionsmatrix der Beispieldaten

Anhand dieser Matrix können die Kennzahlen für die Validierung berechnet werden:

Tabelle J-1: Kennzahlen der Validierung für die Beispieldaten.

Sensitivität	0,83
Spezifität	0,90
Präzision	0,91
Genauigkeit	0,86
Fehlerrate	0,14

Mit einer Genauigkeit von 86 % ist die angewandte Klassifikationsmethode sehr gut geeignet, um die Differenzierung der Proben durchzuführen. Die Fehlerrate kann als Messunsicherheit für Klassifikationsmethoden angesehen werden.

Neben der Beurteilung der Richtigkeit und Bewertung einer Gruppierung von Proben (Klassifikation) kann die Konfusionsmatrix auch zur Beurteilung zweier (oder mehrerer) unterschiedlicher Methoden (Auswertung/Messung) oder Laboratorien zur Gruppierung von Proben genutzt werden. Die Konfusionsmatrix ist nicht auf eine binäre Klassifikation beschränkt, sondern kann auf mehrere Klassen erweitert werden.

Zur Verdeutlichung soll folgendes Zahlenbeispiel dienen. Basierend auf dem obigen Beispiel der Gruppierung von mit Abwasser belasteter und nichtbelasteter Proben, stehen zwei Methoden zur Verfügung die jeweils eine akzeptable Genauigkeit und Fehlerrate haben. Hierzu werden 20 Proben mit beiden Methoden untersucht. Die Anzahl der Übereinstimmungen und Unterschiede in der Klassifizierung durch die beiden Methoden werden in einer Konfusionsmatrix notiert (Abbildung J-6).

		Methode 2		Summe
		positiv (A+)	negativ (A-)	
Methode 1	positiv (A+)	9 (TP)	2 (FP)	11 (PP)
	negativ (A-)	1 (FN)	8 (TN)	9 (PN)
Summe		10 (RP)	10 (RN)	20 (N)

Abbildung J-6: Konfusionsmatrix der Beispieldaten für den Methodenvergleich

Somit werden 7 Proben mit Methode1 und Methode 2 als belastet und 6 Proben mit beiden Methoden als unbelastet eingestuft. 3 Proben werden mit Methode 1 belastet und mit Methode 2 als unbelastet bzw. 4 Proben mit Methode 1 unbelastet aber mit Methode 2 als belastet eingestuft.

Zur Beurteilung der Übereinstimmung der beiden Methoden bei der Klassifizierung wird der *Cohens Kappa* (κ) (Kappaindex) herangezogen. *Cohens Kappa* (κ) ist ein statistisches Maß zur Quantifizierung des Grades der Übereinstimmung zwischen zwei Bewertungen, die jeweils Objekte (Proben) in Kategorien einordnen.

Die Berechnung von κ erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\kappa = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

p_o : gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass beide Methoden (LC-HRMS Systeme) das gleiche Ergebnis liefern (o: observed).

$$p_o = \frac{TP + TN}{N}$$

p_e : gibt die thoretische Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung an (e: expected)

$$p_e = \frac{PP}{N} \cdot \frac{RP}{N} + \frac{PN}{N} \cdot \frac{RN}{N}$$

Die Bewertung von κ erfolgt anhand folgender Tabelle:

Tabelle J-2: *Bewertung der Übereinstimmung anhand des Kappa-Wertes*

κ (Kappa)	Übereinstimmung
0.8 – 1,0	fast vollständige
>0.6	starke
>0.4	deutliche
>0.1	schwache
0 - 0,1	keine

Für das obige Zahlenbeispiel ergibt sich ein $\kappa = 0,7$.

Würde es sich bei den Beispieldaten um einen Methodenvergleich handeln, beispielsweise zweier LC-HRMS Systeme, so läge eine starke Übereinstimmung vor.

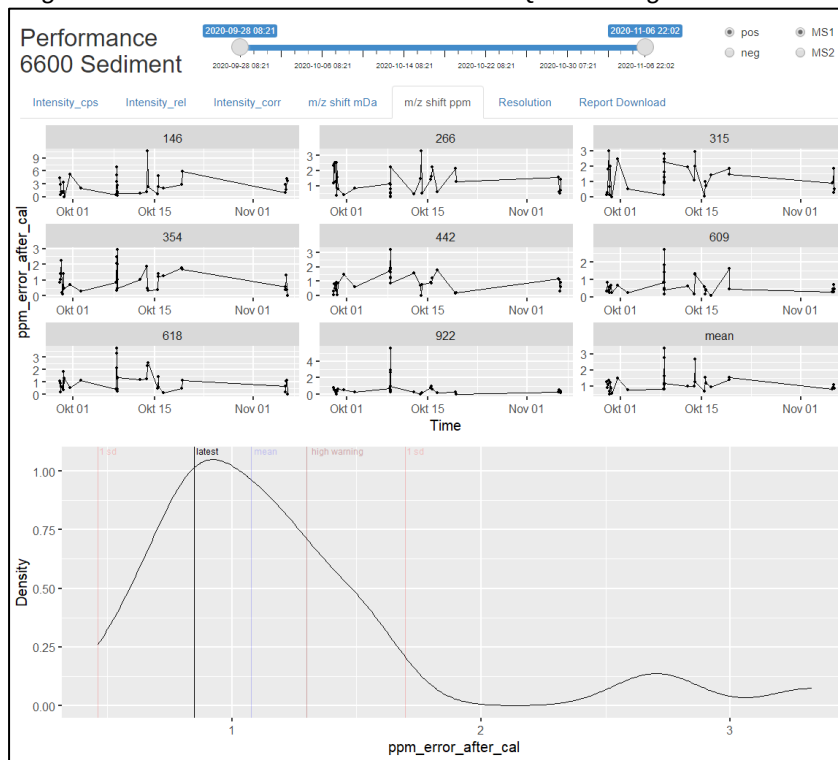
Anhang K. Beispiele von Qualitätskontrollen

K.1 Beispiel Qualitätsregelkarten für ein Flugzeit-Massenspektrometer

QTOF Messgeräte der Firma Sciex verfügen über ein automatisiertes Injektionssystem zur automatisierten Massenkabrierung (sog. CDS – calibrant delivery system). Die Messfiles und Ergebnisse dieser Kalibration, die je nach Einstellungen ca. alle 2 Stunden aufgenommen werden, werden automatisch abgelegt. Neben den spektrometrischen Rohdaten werden auch Ergebnisdaten in Form von Text-Dateien abgelegt, die sich für den Aufbau von Qualitätsregelkarten eignen.

Eine R-basierte Anwendung wurde erstellt, um die abgelegten Daten auszulesen und zu analysieren, um schlussendlich eine interaktive Qualitätsregelkarte zu generieren (Abbildung K-1). Mittelwerte und Verteilungen werden berechnet und die Ergebnisse werden zusammen mit definierbaren Warngrenzen dargestellt¹. Warngrenzen sind systemabhängig. In diesem Beispiel werden folgende Warngrenzen angewendet: Intensität (gewichtet², gemittelt): Obere Warngrenze, untere Warngrenze; m/z Abweichung (gemittelt, ppm, mDa): Obere Warngrenze; Auflösung (gemittelt): Untere Warngrenze.

Abbildung K-1: Screenshot einer interaktiven Qualitätsregelkarte. Oberste Zeile: Auswahl Zeit-



raum, Polarität und MS Level. Zweite Zeile (Reiter): Auswahl Parameter. Zeile 3-5: Trendlinien der einzelnen Standards (benannt über ihre Einheitsmasse) und des Mittelwerts aller Standards (mean). Sechste Zeile: Dichteverteilung des Mittelwerts (mean) über den gesamten ausgewählten Zeitraum. Vertikale Linien: Mittelwert der

¹ Der Quellcode für diese Anwendung ist offen verfügbar (GPL 3) [<https://github.com/bafg-bund/shewhart4cds>]

² Eine Wichtung ist notwendig, wenn einzelne Standards im Vergleich zu anderen eine hohe Intensität aufweisen und den Mittelwert zu stark beeinflussen. Die Intensitäten hiervon werden durch eine Konstante geteilt.

letzten Messung („latest“), Gesamtmittelwert, Standardabweichung und Warngrenzen, die durch den Anwender definiert werden.

K.2 Beispiel Qualitätskontrolle für eine Orbitrap

Hochauflösende Messgeräte der Firma Thermo Fisher Scientific werden regelmäßig manuell mit Hilfe der Spritzenpumpe und vom Gerätehersteller bereitgestellten Lösungen kalibriert. Da kommerzielle Kalibrierlösungen nicht notwendigerweise den gewünschten Massenbereich abdecken, könnten diese Lösungen auch selbst hergestellt werden.

Für eine erfolgreiche Kalibration sollten folgende Parameter erfüllt sein (LTQ Orbitrap, Classic): TIC variation < 5% (positiv) bzw. < 10% (negativ), Intensität der intensivsten Masse ca. $1E8$, AGC Target = 100% und Injection time < 2 ms (bei höherer Injection time sollte das Gerät gereinigt werden).

Die Massenkalkulation wird als PDF gespeichert, wobei nur die Massenabweichung in ppm dokumentiert wird. Sollen weitere Informationen (TIC variation, Intensität, Injection Time etc.) nachvollzogen werden, müssen diese notiert oder per Screenshot dokumentiert werden (Abbildung K-2). Eine automatisierte Dokumentation der Kalibrationsdaten in Form einer Regekkarte ist derzeit nicht bekannt.

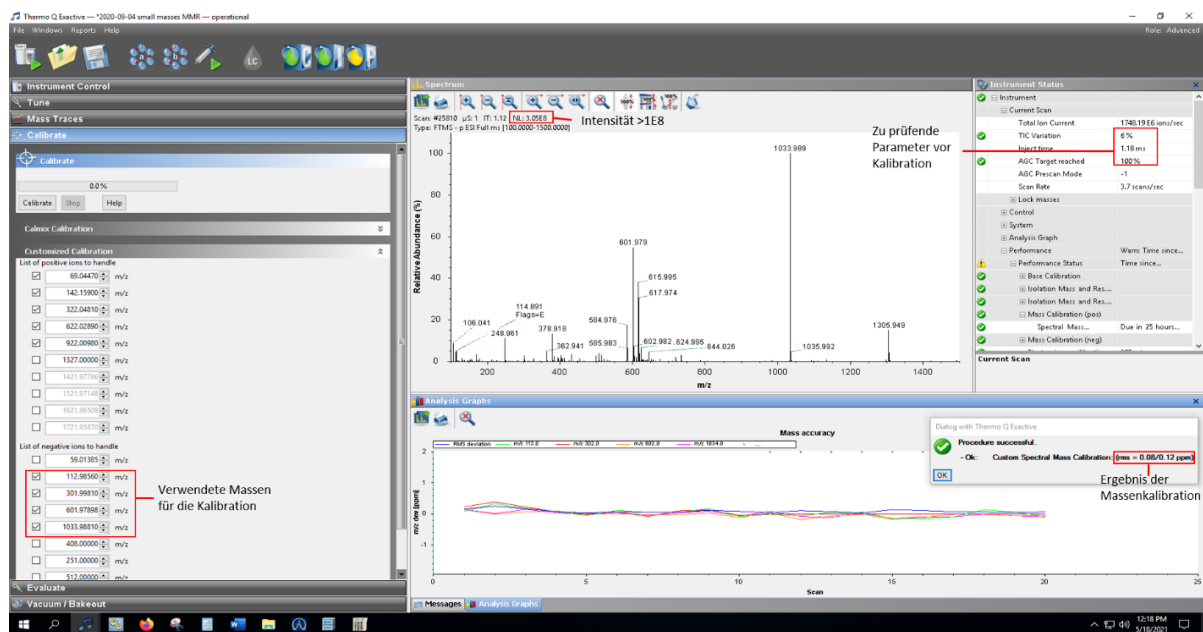


Abbildung K-2: Screenshot der Tune Page einer Orbitrap, auf der die relevanten Parameter zur Qualitätskontrolle sichtbar sind (rot markierte Werte).

Die Dauer, für die das Messgerät nach einer Kalibration verwendet werden kann, hängt von vielen Parametern ab (z. B. Verwendung von Lock-Massen, Temperaturstabilität im Labor) und kann über die Massenabweichung ($\Delta m/z$) innerhalb einer langen Sequenz ermittelt oder über die Funktion der Evaluation in der Steuerungssoftware des Gerätes bestätigt werden.

Systemseitig wird eine externe Kalibration mit Abweichung von bis zu 5 ppm akzeptiert, was der Spezifikation der Orbitrap Classic entspricht. Erfahrungsgemäß sind die Massenabweichungen nach einer Kalibration wesentlich kleiner (< 2 ppm).