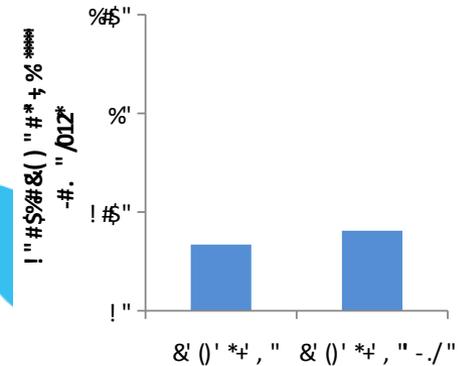
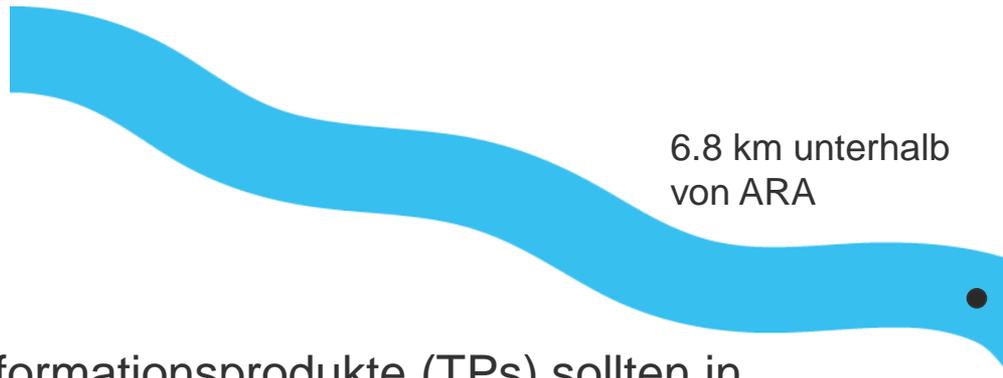
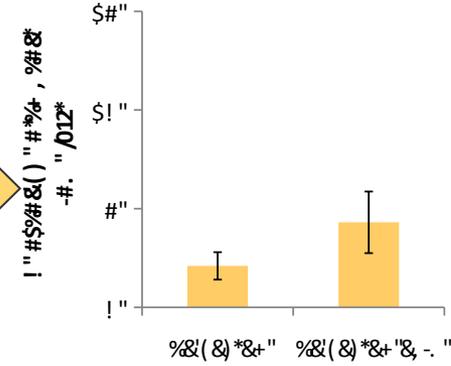
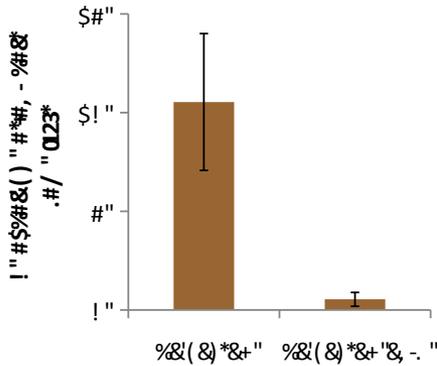
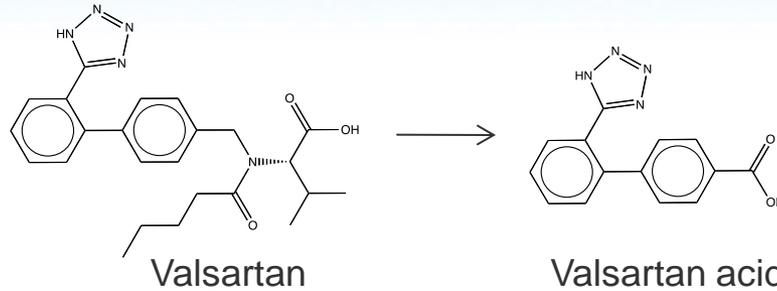


# Vorhersage von Umwandlungsprodukten und ihre Messung in Gewässern mittels hochauflösender Massenspektrometrie

Kathrin Fenner, Heinz Singer, Abteilung Umweltchemie, Eawag



# Beobachtung von Transformationsprodukten in der Umwelt



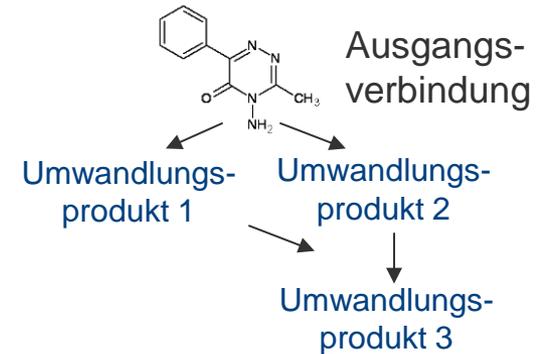
➔ Welche Transformationsprodukte (TPs) sollten in Monitoringprogrammen und Chemikalienrisikobewertung berücksichtigt werden?

# Transformationsprodukt-Screening

## Generelles Vorgehen

### Verdächtigenliste erstellen

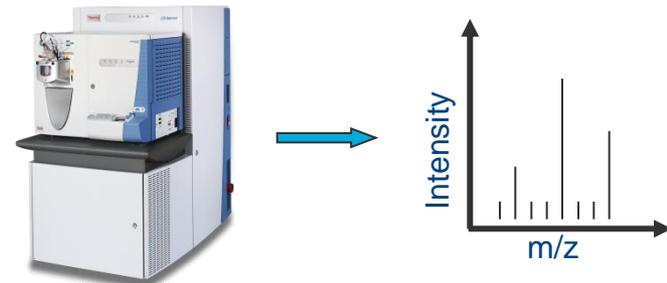
Vorhersage möglicher Transformationsprodukte mittels Struktur-Bioabbaubarkeits-Beziehungen und Literaturrecherche



Liste von Zielverbindungen (ca. 30 TPs/Verbindung)

### Messung

Bestätigung der Identität in Umweltproben mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS & MS/MS)



**Identifizierte Transformationsprodukte**

# Vorhersagesysteme für Transformationsprodukte

- ▶ Globale Modelle: Eawag-PPS<sup>1</sup>, CATALOGIC<sup>2</sup>, PathPred<sup>3</sup>, etc.
  - ▶ Auf Vielfalt von Substraten anwendbar
  - ▶ Basieren auf experimentell bestimmten Abbaupfaden
  - ▶ Abgeleitete Biotransformationsregeln /-muster



<sup>1</sup> <http://eawag-bbd.ethz.ch/predict>; Fenner et al. (2008) *Bioinformatics* 24: 2079-2085

<sup>2</sup> Kommerziell; teilweise integriert in OECD QSAR toolbox, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>;

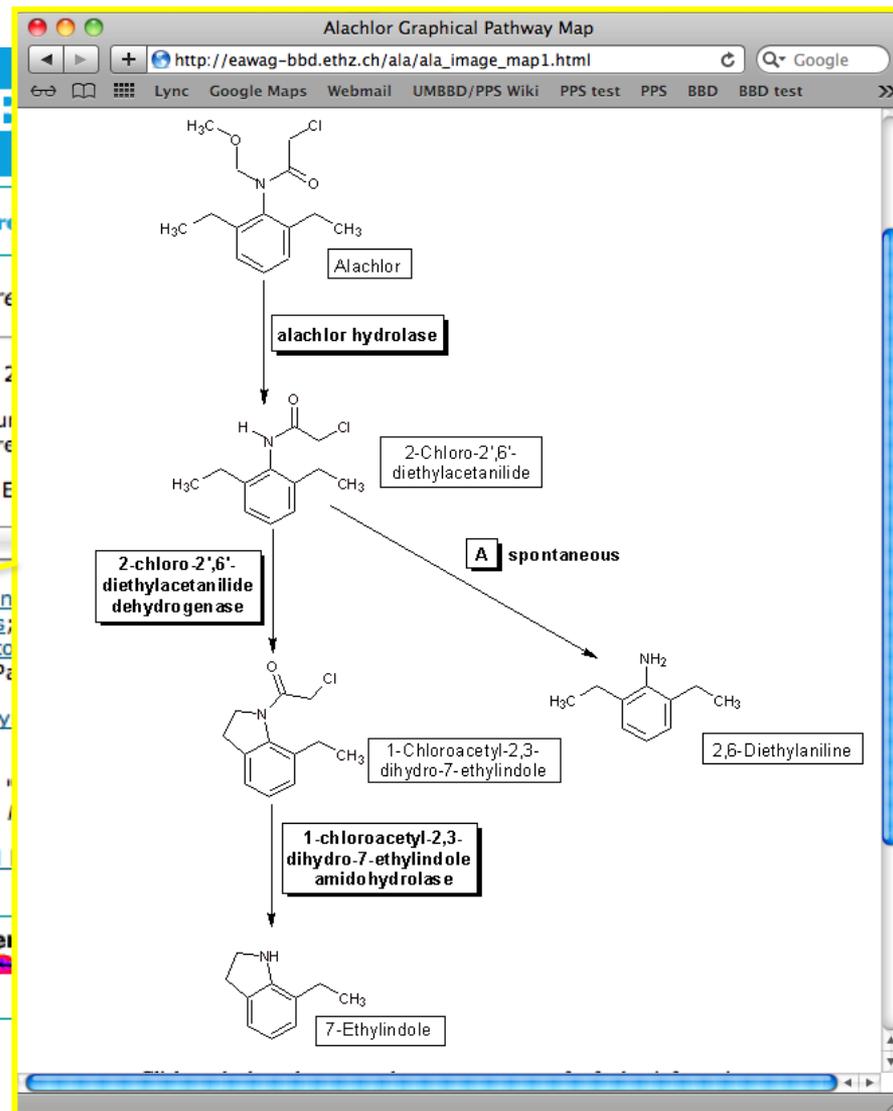
Dimitrov et al. (2011) *SAR QSAR Environ Res* 22: 719-755

<sup>3</sup> <http://www.genome.jp/tools-bin/pathpred/pathpred.cgi>; Moriya et al. (2010) *Nucleic Acids Res* 38: W138-W143

# Das Eawag Pathway Prediction System

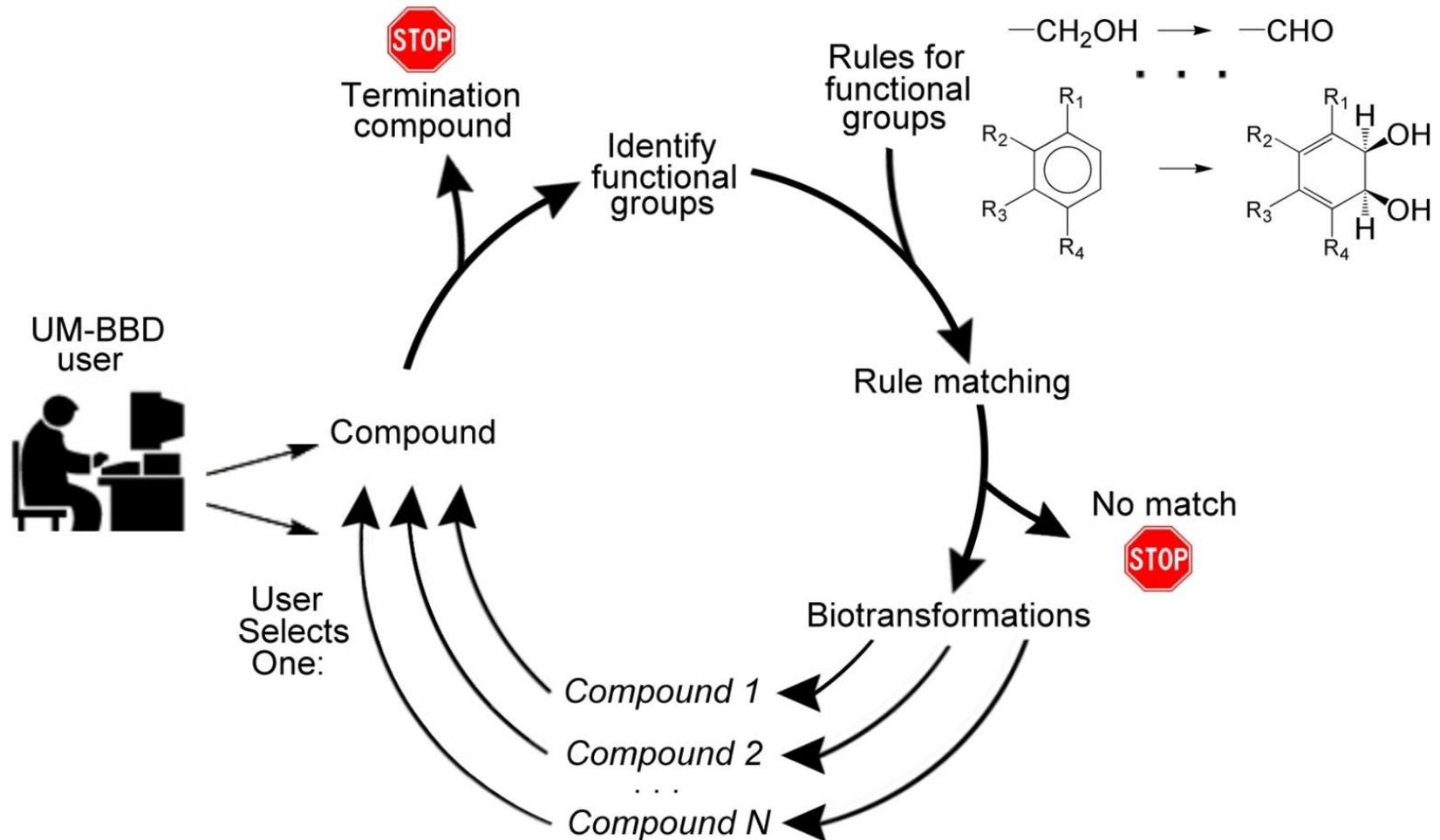
## Eawag-BBD: Zugrundeliegende Biotransformationsdatenbank

The screenshot shows the EAWAG Biocatalysis/BBD website. The header includes the EAWAG logo and the text "Biocatalysis/BBD". A navigation menu on the left lists: Home, Search, About (EAWAG-BBD | PPS | BPT), What's New, FAQs, Join E-mail List, Contributors, Publications, Links, Acknowledgements, and Contact Us. The main content area is titled "Pathway Prediction System | Preview" and "Microbial biocatalytic reactions". It features a list of statistics: "Lists of 219 pathways; 1503 reaction entries; 249 biotransformation rules; 1,2-dioxygenase; 109 reactions of to Other Graphics (Metapathway and Pathway)". A search bar is present with the text "- Select a Pathway -". At the bottom, it says "Powered by ChemAxon".



# Das Eawag Pathway Prediction System

## Funktionsprinzip



# Das Eawag Pathway Prediction System

## Benutzeroberfläche für Vorhersage

Choose to see all predicted biotransformations, or only those more likely to occur exposed to air (aerobic likelihood "neutral" or above). Biotransformations are assigned aerobic likelihood by two or more biodegradation experts. Standard conditions assumed for aerobic biotransformations are: exposed to air, in moist soil or water, at neutral pH, 25°C, with no competing or toxic other compounds.

Show Biotransformations:  Aerobic  All

File Edit View Insert Ator Bond Structure Calculation Tool Help

Chemical structure editor showing the structure of DEET (Diethyltoluamide) and the text "DEET" in red.

Write SMILES  
SMILES string:

Continue Clear Demo

Powered by ChemAxon Apache MySQL

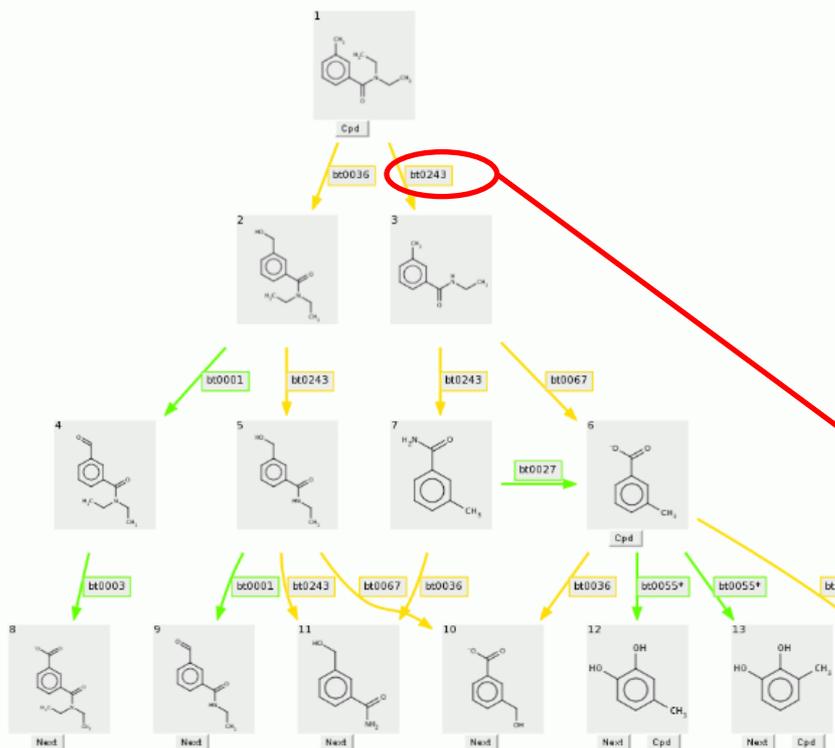
© 2014 Regents of the EAWAG. All rights reserved. [Contact Us](#) | [Privacy](#)  
Last modified on June 30, 2014

# Das Eawag Pathway Prediction System

## Vorhersagebeispiel

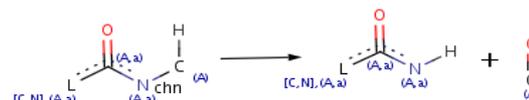
BBD UM-BBD: Pathway Prediction Results

The predicted pathway:



### Rule bt0243

[Pathway Prediction Engine] [All Rules List] [BBD Main Menu]



N-substituted Amide -> Amide + Aldehyde or Ketone  
 N, N-disubstituted Amide -> N-substituted Amide + Aldehyde or Ketone  
 N-substituted Urea derivative -> Urea derivative + Aldehyde or Ketone  
 N,N-disubstituted Urea derivative -> N-substituted Urea derivative + Aldehyde or Ketone

Aerobic Likelihood: Neutral

#### UM-BBD Reaction(s):

[Caffeine -----> Paraxanthine \(reactID# r1251\)](#)  
[Caffeine -----> Theobromine \(reactID# r1247\)](#)  
[Hydroxymonomethylisoproturon -----> Formaldehyde + 4'-\(2-Hydroxyisopropyl\)phenylurea \(reactID# r0894\)](#)  
[N-Isopropylacetanilide -----> Acetanilide + Acetone \(reactID# r0914\)](#)  
[Isoproturon -----> Formaldehyde + Monodemethylisoproturon \(reactID# r0892\)](#)  
[1-Methylxanthine -----> Xanthine \(reactID# r1331\)](#)  
[3-Methylxanthine -----> Xanthine \(reactID# r1329\)](#)  
[Monodemethylisoproturon -----> Formaldehyde + Didemethylisoproturon \(reactID# r0897\)](#)  
[Paraxanthine -----> 7-Methylxanthine \(reactID# r1257\)](#)  
[Theobromine -----> 7-Methylxanthine \(reactID# r1248\)](#)  
[Theophylline -----> 1-Methylxanthine \(reactID# r1327\)](#)  
[Theophylline -----> 3-Methylxanthine \(reactID# r1325\)](#)

\* Predicted products not shown at level 4 (15 products). No more than 10 products are allowed to continue

Aerobic Likelihood:

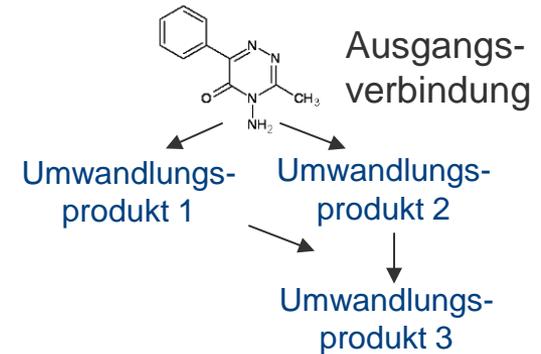
Very likely Likely Neutral

# Transformationsprodukt-Screening

## Generelles Vorgehen

### Verdächtigenliste erstellen

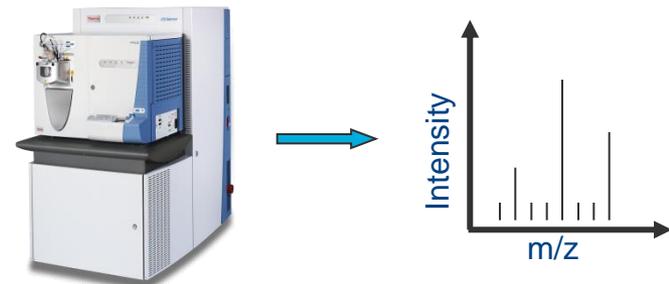
Vorhersage möglicher Transformationsprodukte mittels Struktur-Bioabbaubarkeits-Beziehungen und Literaturrecherche



Liste von Zielverbindungen (ca. 30 TPs/Verbindung)

### Messung

Bestätigung der Identität in Umweltproben mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS & MS/MS)



**Identifizierte Transformationsprodukte**

# Transformationsprodukt-Screening

Analytisches Vorgehen

Tiefe Konzentrationen

Verschiedenartige  
Verbindungen

Separierung

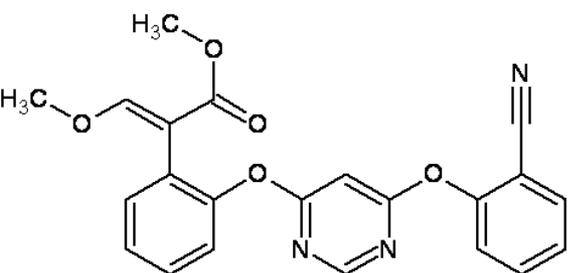
Positive und negative Ionisierung

- Exakte Masse
- Vergleich mit Blindprobe
- Ausreichende Intensität
- Plausible Retentionszeit
- Isotopenmuster
- Interpretation der MSMS-Spektren

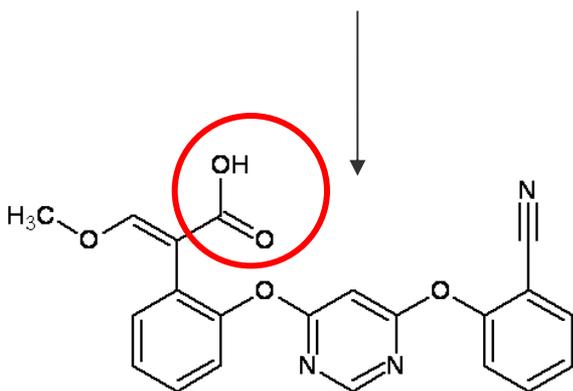


# Beispiel Azoxystrobin

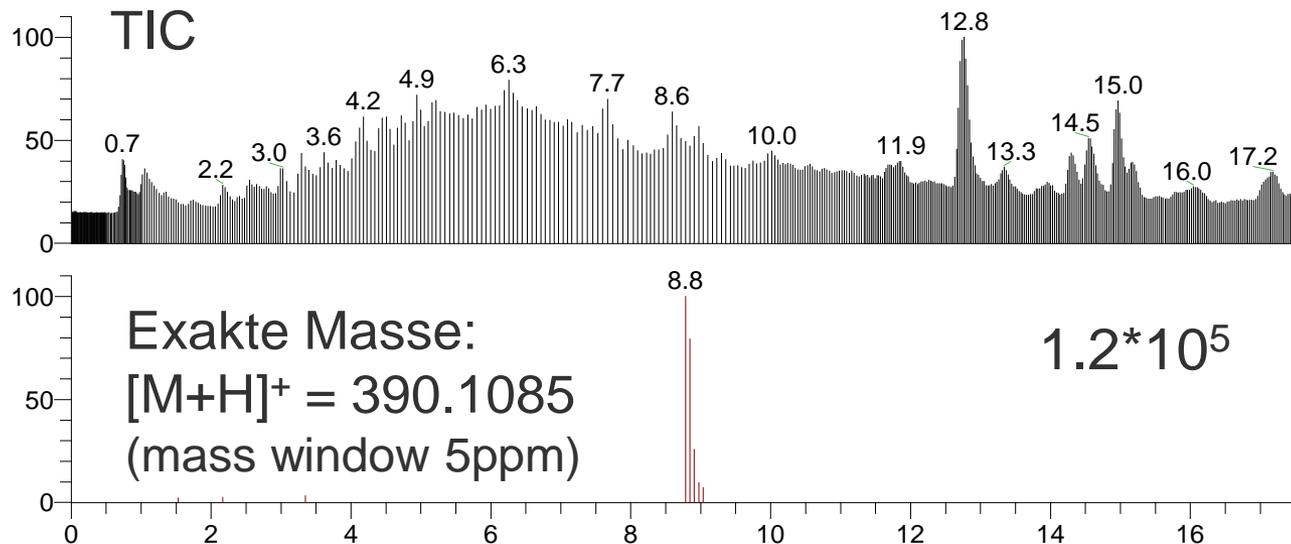
Exakte Masse, Isotopenmuster



Azoxystrobin  
Fungizid

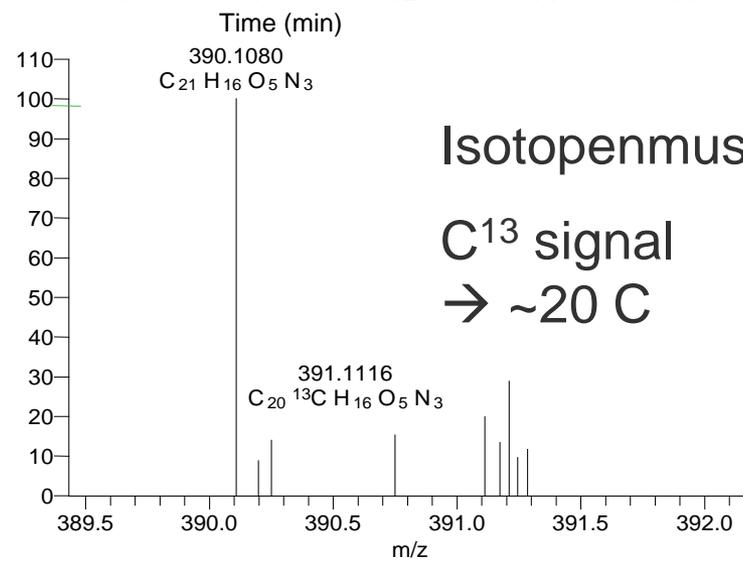


Azoxystrobinsäure



Exakte Masse:  
[M+H]<sup>+</sup> = 390.1085  
(mass window 5ppm)

$1.2 \cdot 10^5$



Isotopenmuster

C<sup>13</sup> signal  
→ ~20 C

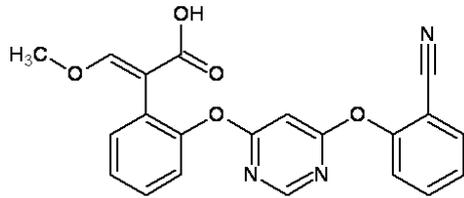


# Beispiel Azoxystrobin

Retentionszeit

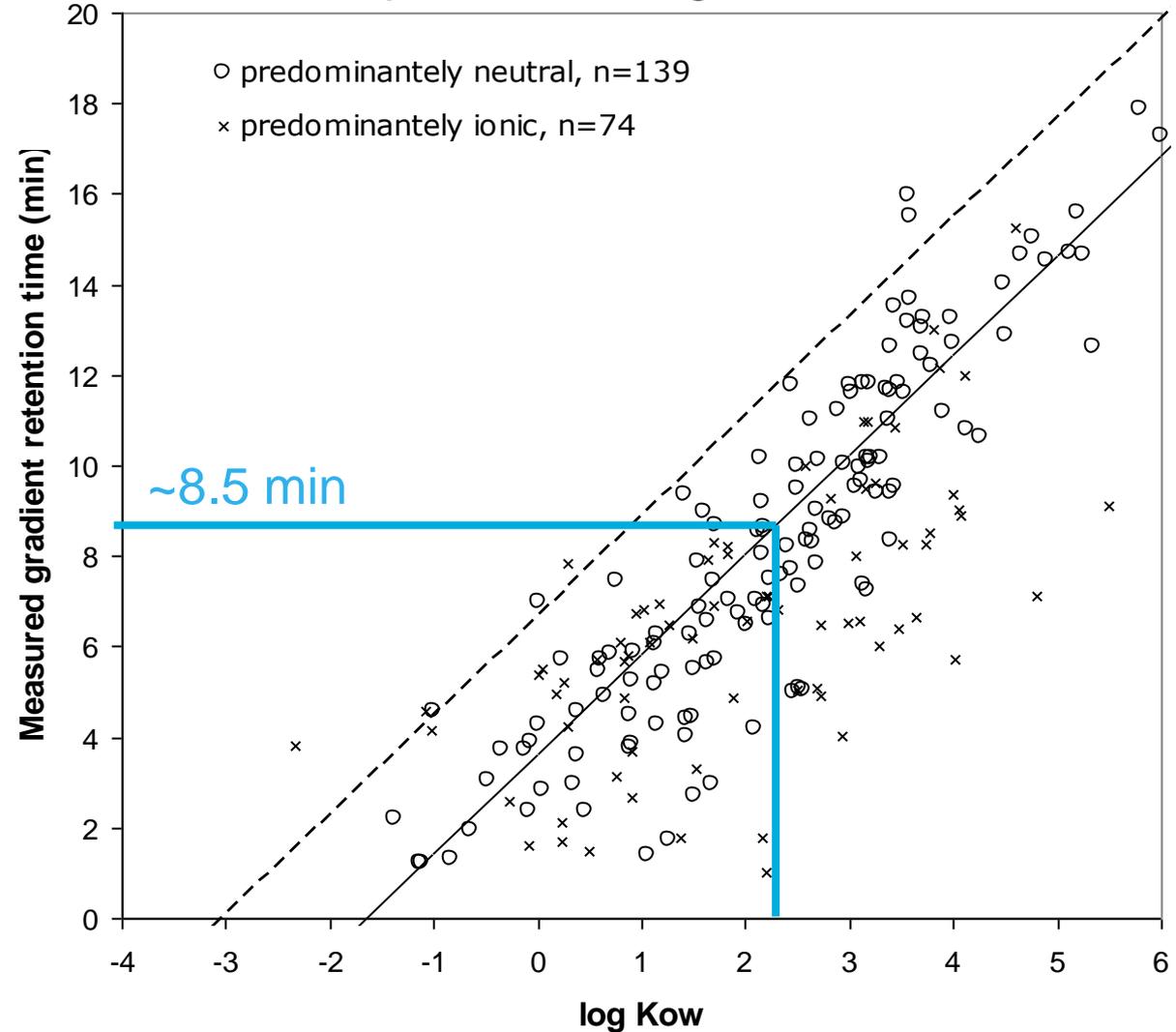
Retentionszeitmessungen  
für 213

Referenzstandards →  
Plausibilitätsprüfung  
basierend auf  $\log K_{ow}$



Azoxystrobinsäure  
e  $\log K_{ow}$  2.3,  
anionisch

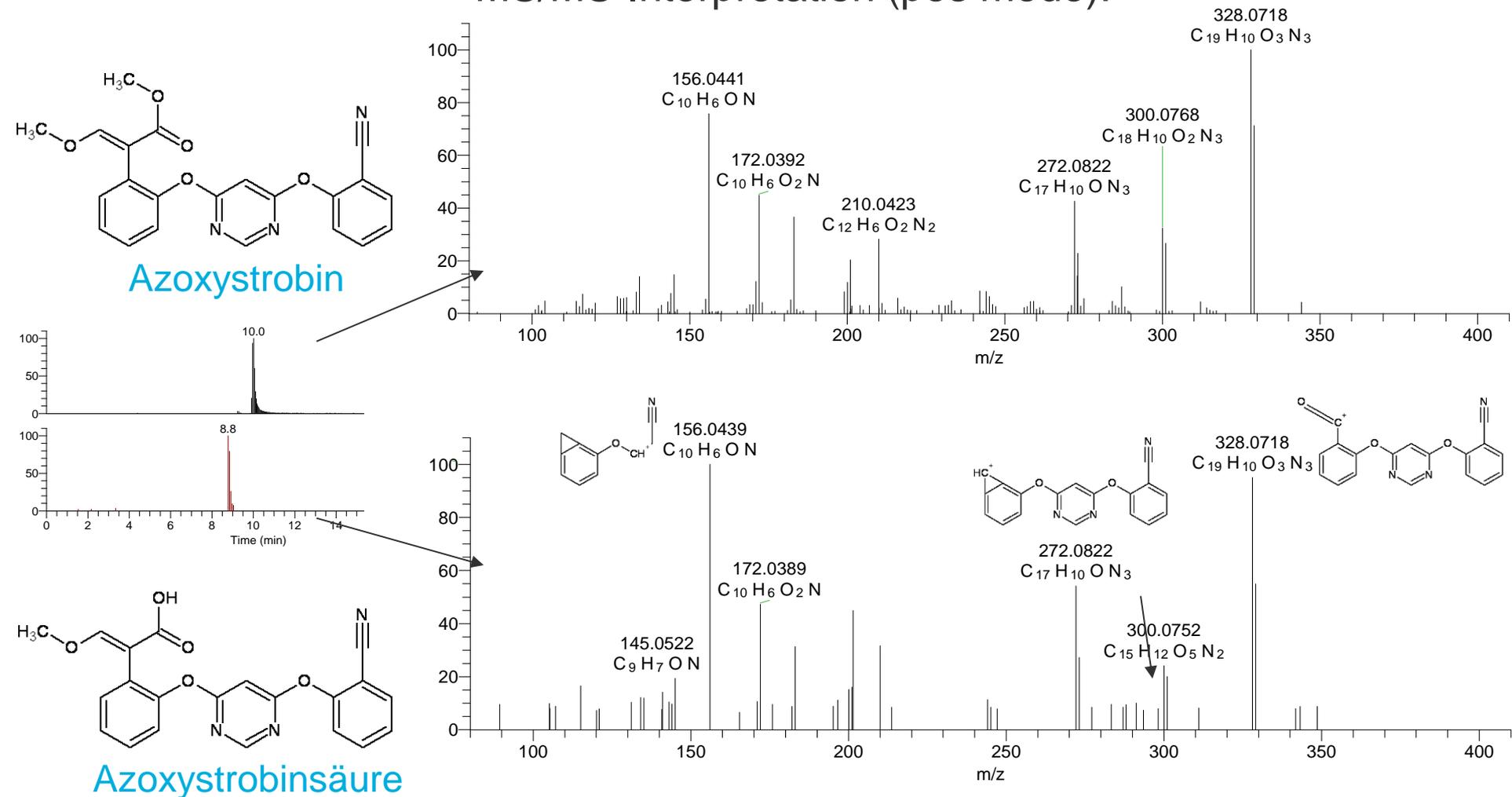
## Reversed phase X-Bridge



# Beispiel Azoxystrobin

## Ionisierung, MS/MS-Interpretation

### MS/MS-Interpretation (pos mode):



# Das „KoMet“-Projekt als Anwendungsbeispiel

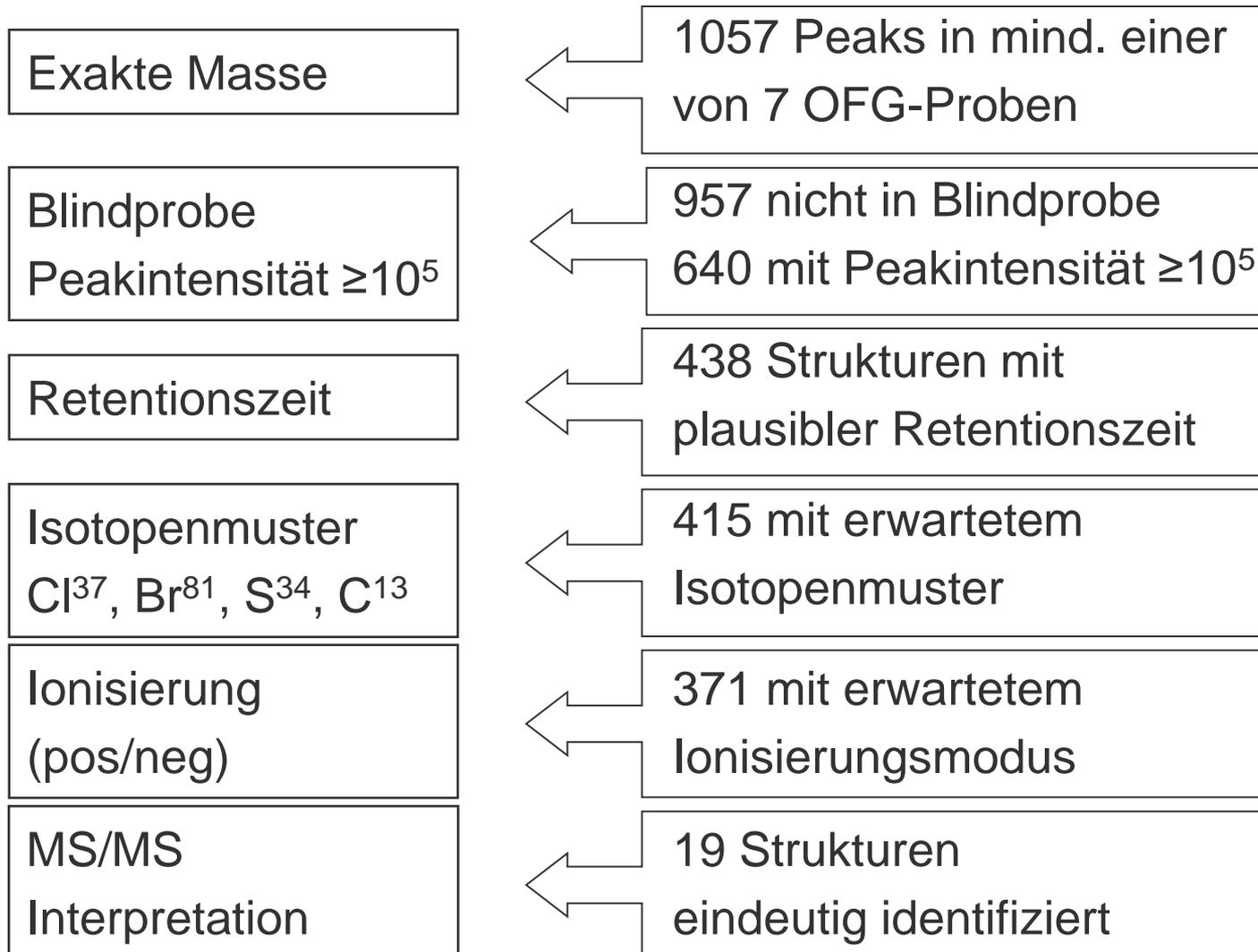
- ▶ Ziel von KoMet:

Modell- und messbasiertes Vorgehen entwickeln, um den Beitrag von Transformationsprodukten (TPs) zur Belastung von Gewässern zu untersuchen

- ▶ 2006-2010, finanziert durch d. schweizerische Bundesamt für Umwelt (BAFU)
- ▶ 65 Mikroschadstoffe (Pflanzenschutzmittel, Biozide, Arzneimittel)
- ▶ Beprobte Gewässer
- ▶ 7 Oberflächengewässer (davon 6 mit geklärtem Abwasser)
- ▶ Abläufe von 6 (+2) Kläranlagen
- ▶ Grundwasser von 22 unterschiedlichen Fassungen

# Ergebnisse für 7 Oberflächengewässer

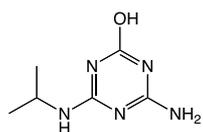
Startpunkt: Verdächtigenliste mit 1794 TPs für 52 Mikroschadstoffe



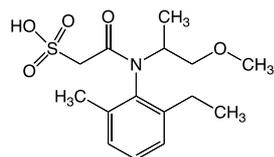
# Auswahl identifizierter Umwandlungsprodukte

## Pestizide

Schon bekannt...



Hydroxy-desethyl-atrazine

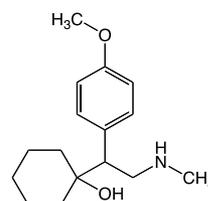


Metolachlor ethane-sulfonic acid

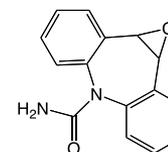
...

## Arzneimittel

Alle erstmals detektiert in Gewässern... Metabolite...

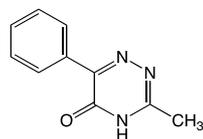


N-desmethyl-venlafaxin

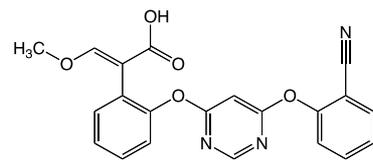


Carbamazepine-10,11-epoxide

Erstmals in Gewässern detektiert...



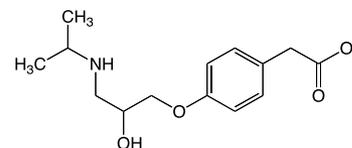
Metamitron-desamino



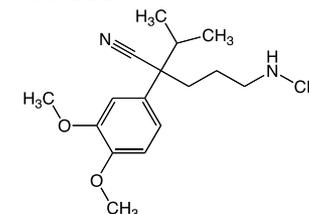
Azoxystrobin acid

...

Bioabbauprodukte...



Atenolol acid

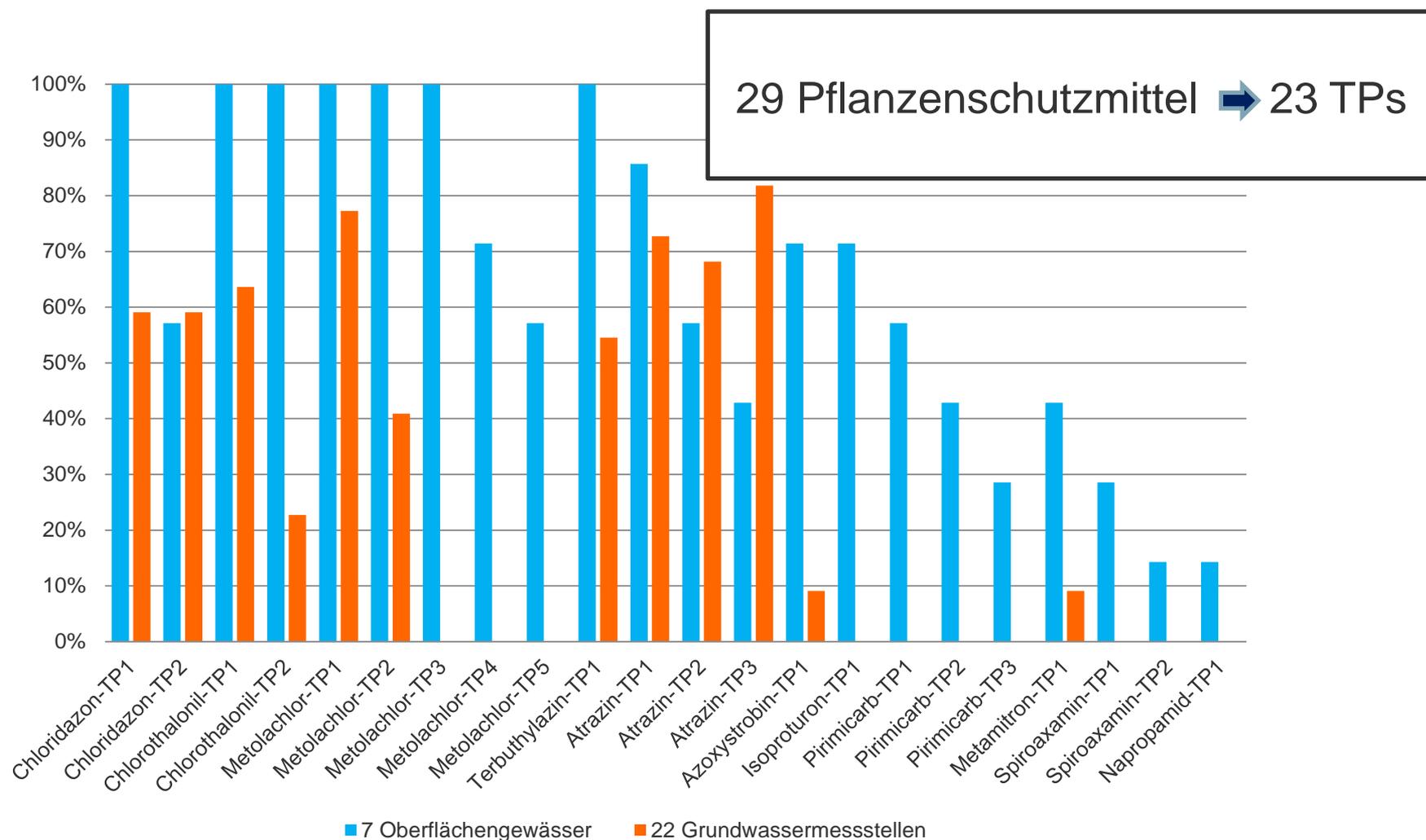


D617 (Verapamil TP)

...

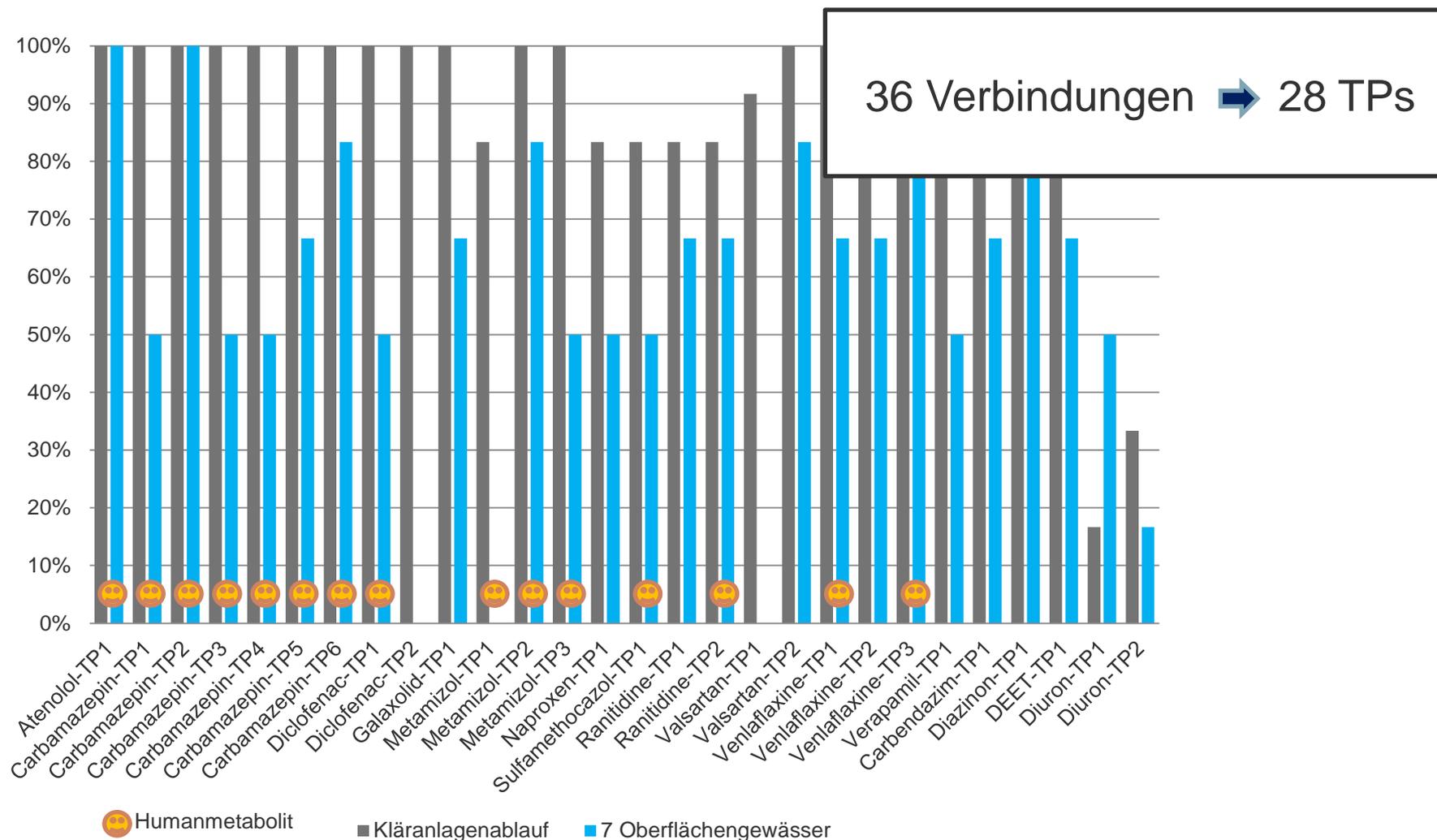
# Transformationsprodukt-Screening

## Detektionshäufigkeit der TPs von Pflanzenschutzmitteln



# Transformationsprodukt-Screening

Detektionshäufigkeit der TPs von abwasserrelevanten Verbindungen



# Zusammenfassung

- ▶ Transformationsprodukte weisen vergleichbare Auftretenshäufigkeit auf wie Ausgangsverbindungen
- ▶ Transformationsprodukte von abwasserrelevanten Verbindungen (Arzneimittel, Biozide) sind neben Pestizid-TPs ebenfalls wichtig
- ▶ Zahl der expositionsrelevanten TP's ist überschaubar
- ▶ Expositionsrelevante TP's sollten in Routinemonitoring berücksichtigt werden

Aber:

- ▶ Grosser Mangel an guten Toxizitätsdaten für TP's → Risikobewertung schwierig
- ▶ Analytische Lücken wahrscheinlich

# Vielen Dank!

▶ Eawag-BBD/PPS Team:



Emanuel  
Schmid



Lynda Ellis



Larry Wackett



Susanne Kern



Heinz Singer



Juliane Hollender

▶ Finanzierung:



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

▶ Ihnen für ihre Aufmerksamkeit!

## Limpach

73 km<sup>2</sup>



## Surb

66 km<sup>2</sup>



## Salmsacher Aach

47 km<sup>2</sup>



## Furtbach

38 km<sup>2</sup>



## Mentue

105 km<sup>2</sup>



OR25 © swisstopo (DV002232.1)  
004, swisstopo

### Landnutzung:

- Getreide
- Raps
- Kartoffeln
- Obst
- Gemüse
- Siedlungsflächen



**Wasserproben:** Anreicherung mit Festphasenextraktion (layered SPE)



**Flüssigchromatographie gekoppelt mit der hoch auflösenden Massenspektrometrie** (QExactive; MS R=140,000; DD-MS2 R=17,500)



## Target screening

(potentiell relevante Substanzen)

Referenzstandard im Voraus verfügbar  
MS+RT Vergleich

## 249 Pestizide

(=86% aller registrierten)

+ 134 Transformations-Produkte (TPs)

## Suspect screening

(restliche Substanzen)

Keine Referenzstandard im Voraus verfügbar  
Massen-Vergleich

**91 Pestizide**

+ 54 TPs

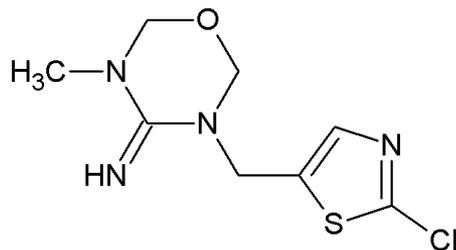
**158 Pestizide**

+ 80 TPs

**Quantifizierung**

## TP von Thiamethoxam

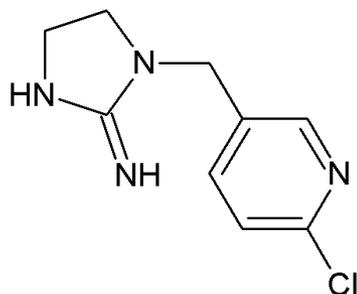
- Detektiert in 14% der Proben



NOA 407475

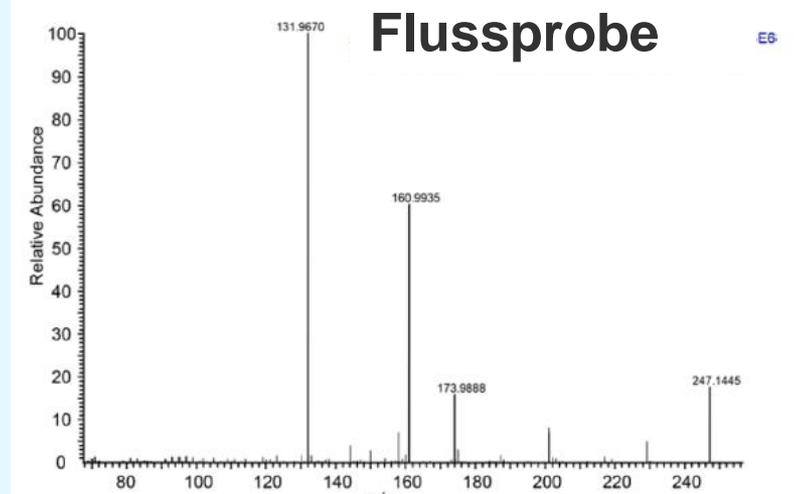
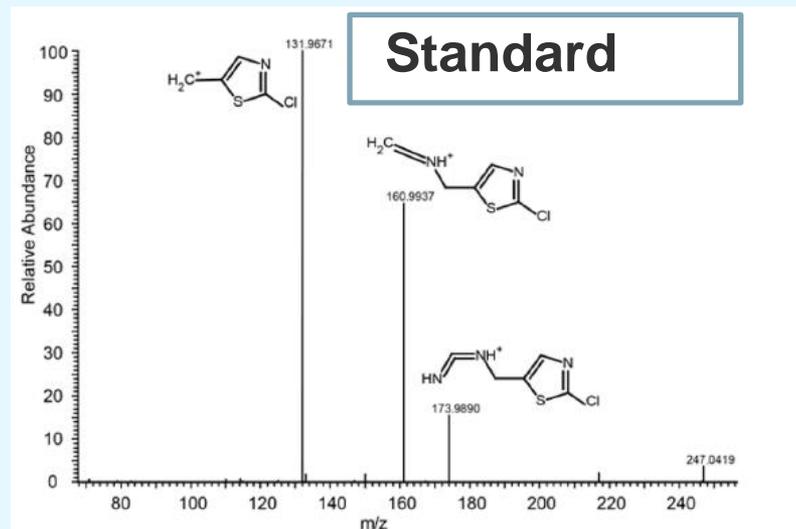
## TP von Imidacloprid

- Detektiert in 10 % der Proben



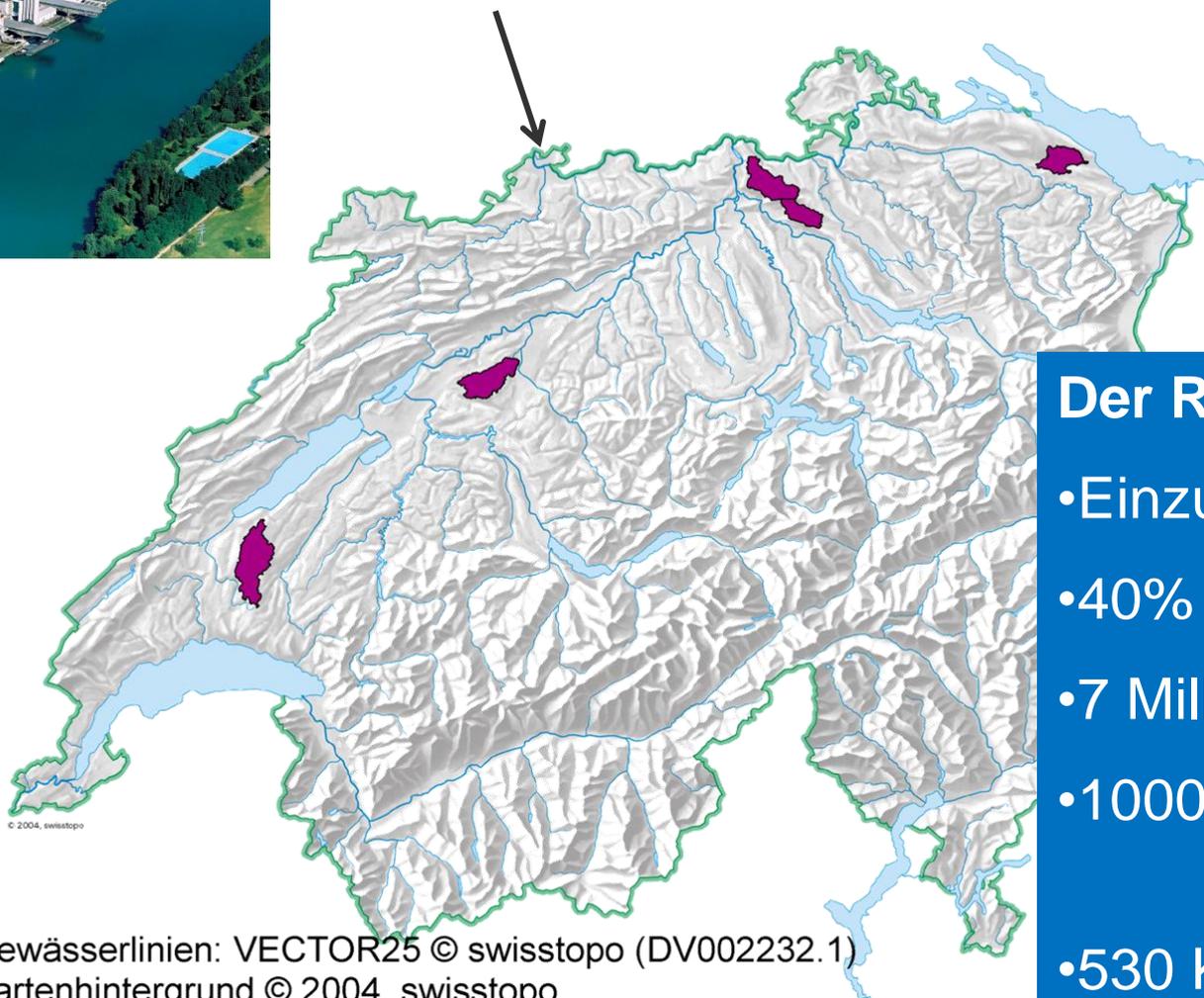
Imidacloprid-desnitro

## MSMS match von NOA 407475





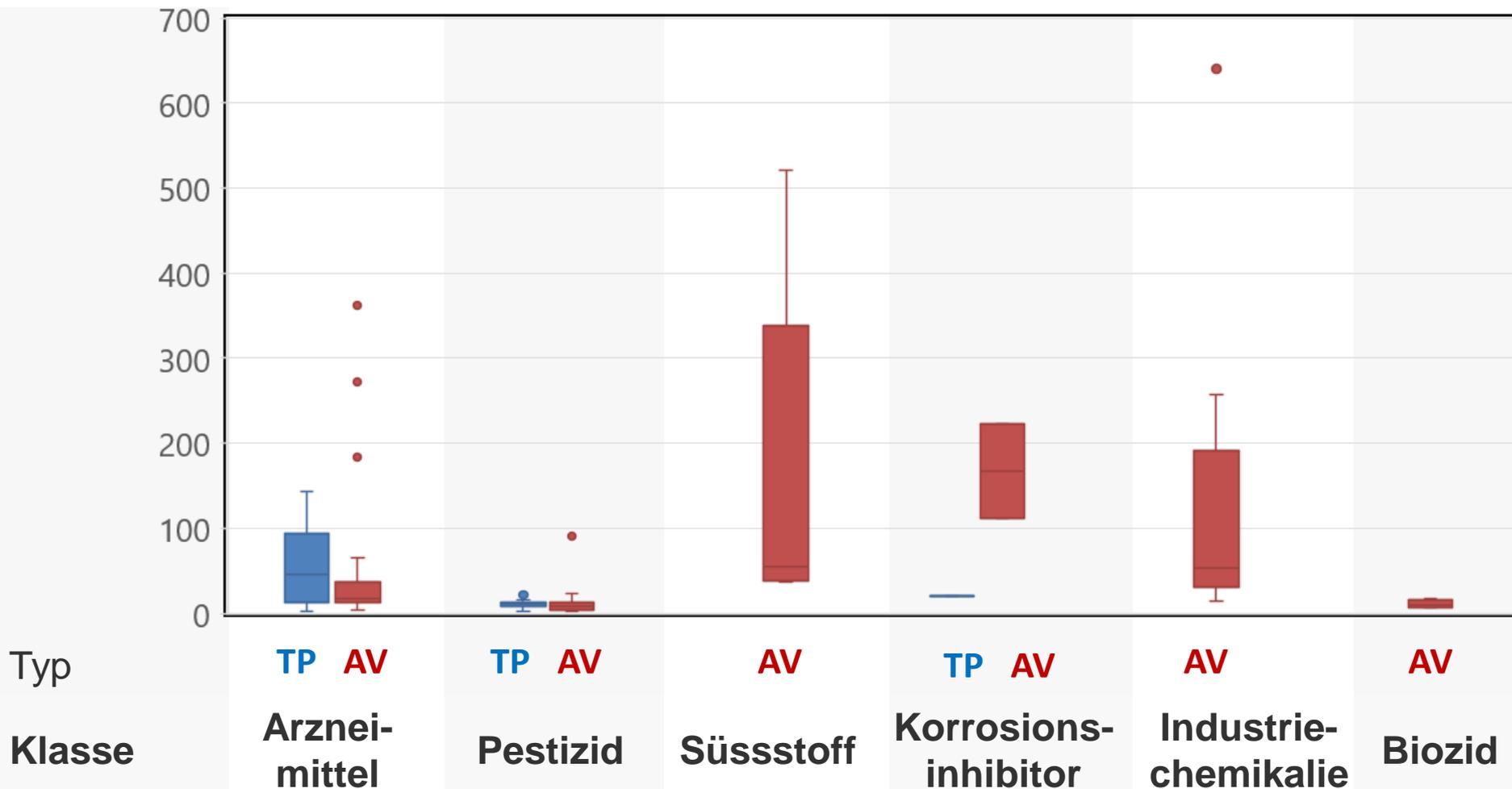
Rhein



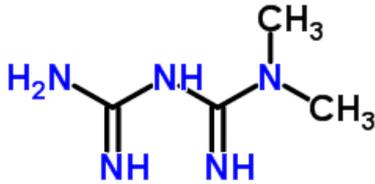
## Der Rhein:

- Einzugsgebiet 36'400 km<sup>2</sup>
- 40% Ackerfläche
- 7 Millionen Einwohner
- 1000 m<sup>3</sup>/s Abfluss mit 5% Abwasseranteil
- 530 Kläranlagen

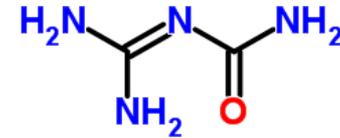
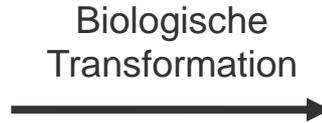
## Konzentration [ng/L]



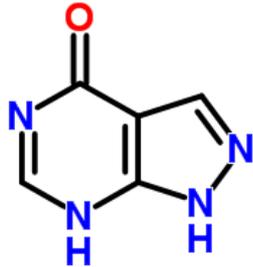
## Pharmazeutika mit hohem Verkaufsvolumen



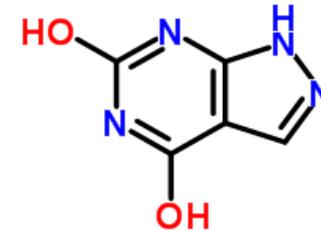
Metformin  
(Diabetes)



Guanylharnstoff



Allopurinol  
(Gicht)



Oxypurinol  
(aktiver Metabolit)

## Pro-Pestizide und Pro-Pharmazeutika

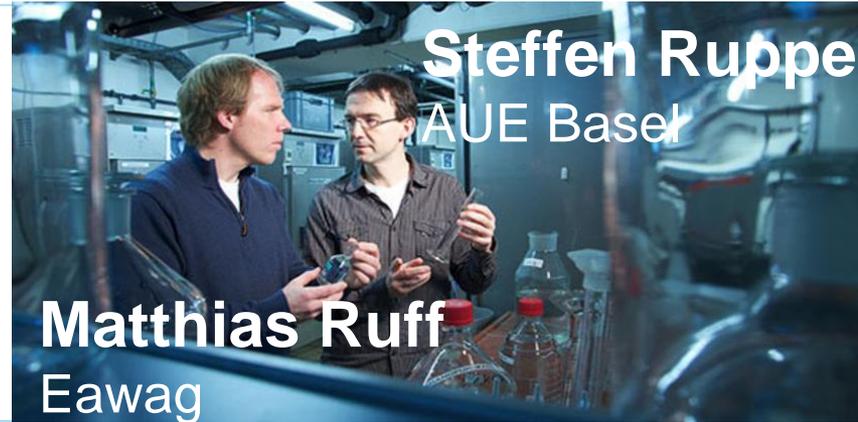
Der eigentliche Wirkstoff wird erst bei der Anwendung freigesetzt und ist damit ein TP

z.B. Pestizid: Bifenox – Bifenoxsäure, Pharmaka: Clopidogrel – Clopidogrelsäure

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



**Christoph Moschet**  
*PostDoc*



**Steffen Ruppe**  
AUE Basel

**Matthias Ruff**  
Eawag



**Juliane Hollender**  
*Head of department*  
Eawag



**Jan Mazacek**  
AUE Basel

**Vielen Dank an alle Beteiligte des AUE Basel Stadt, der Eawag, der Kantone und des Bundesamt für Umwelt BAFU**