

Die einfache Extraktion und Quantifizierung von sprengstofftypischen Verbindungen in Bodenproben über LC-MS/MS

Liane Kober, Christian Hanschke, Rainer Macholz, Marcus Frohme*

Zusammenfassung

Die Kontamination von Flächen mit Rüstungsaltslasten durch sprengstofftypische Verbindungen (STV) wie 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) ist nach wie vor ein großes Risiko für Gesundheit und Umwelt. Die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) ist in Kombination mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ein besonders sensibles und exaktes Verfahren zur Konzentrationsbestimmung derartiger Umweltkontaminanten. Jedoch benötigen die derzeit eingesetzten Methoden zur Extraktion und Quantifizierung viel Zeit und Bodenmaterial. Wir haben daher eine 20-minütige LC-MS/MS-Methode entwickelt, die in einer Probe simultan acht STV qualitativ und quantitativ nachweisen kann. Im Vergleich zur EPA-Referenzmethode konnte bei der Extraktion die eingesetzte Bodenmenge von 10 g auf 2 g reduziert und die Extraktionsdauer von 18 h auf 30 min verkürzt werden. Die abschließende Validierung zeigte eine gute Reproduzierbarkeit und mit etablierten Protokollen vergleichbare Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimits (LOQ), so dass die optimierten Methoden für eine schnelle und zuverlässige Analyse von Realproben eingesetzt werden konnten.

Abstract

Soil contamination on former military sites with explosives-related compounds (STV) such as 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) is still a major health and environmental threat. High pressure liquid chromatography (HPLC) combined with tandem mass spectrometry (MS/MS) is a very sensitive and precise method to detect such environmental contaminants. However, currently used extraction and quantification methods often need a long time and a high sample amount. Thus, we developed an LC-MS/MS method that detects and quantifies eight explosives simultaneously in only 20 min. Compared to the EPA reference method, the amount of soil was reduced from 10 g to 2 g and the extraction time shortened from 18 h to 30 min. The validation revealed a good reproducibility of the fast analysis process. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were comparable to established protocols. Hence, the optimized methods were used for a fast and reliable quantification of STV in soil samples of a former military site.

1. Einleitung

Auf Altlastenverdachtsflächen werden immer noch großflächige Kontaminationen mit Sprengstoffen gefunden. Allein im Land Brandenburg gelten 400.000 ha als belastet (Küchler 2011). Die Stoffe sind nicht nur durch ihre Explosivkraft, sondern auch durch ihre hohe Toxizität ein erhebliches Umweltproblem (Herrmann 2008). Insbesondere TNT wurde in den zurückliegenden zwei Weltkriegen in großen Mengen produziert. Durch Transformationsreaktionen entstehen verschiedene

TNT-Abbauprodukte, die neben dem Boden auch das Grundwasser belasten. Mit den Neben- und Zwischenprodukten sowie weiteren als Sprengstoff genutzten Nitroverbindungen wie z. B. 1,3,5-Trinitrobenzol (TNB) bilden sie eine Vielzahl an Verbindungen, die unter dem Begriff der sprengstofftypischen Verbindungen (STV) zusammengefasst werden (Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz Brandenburg 2015).

Die Verteilung der STV im Boden ist aufgrund ihres Ursprungs als hochkonzentrierte Aggregate nicht homogen. In Abhängigkeit von der Her-

kunft, der Bodenbeschaffenheit und den Umwelteinflüssen verändern sich ihre Abbauraten und lokalen Konzentrationen über die Zeit. Insbesondere humushaltiger Boden weist eine hohe Kapazität auf, große Mengen STV adsorptiv zu binden (Via & Zinnert 2016). Unter anaeroben Bedingungen wird nicht adsorbiertes TNT oft schnell in seine Abbauprodukte umgewandelt (Environmental Protection Agency 2017). Neben abiotischen Transformationen durch Licht, Metallionen oder ein alkalisches Milieu können die STV auch durch Mikroorganismen transformiert werden. Unter an-

* korrespondierender Autor

aeroben Bedingungen findet häufig eine Reduktion der Nitrogruppen zu Aminogruppen statt, die nicht weiter abgebaut werden können und in der Umwelt verbleiben (Monteil-Rivera et al. 2009). Beim Abbau von TNT werden so unter anderem Aminodinitrotoluole (ADNT) gebildet, die nach TNT als zweithäufigste Kontamination auf Altlastenverdachtsflächen gefunden werden können.

Die Intoxikation mit TNT durch Inhalation oder Hautkontakt wurde insbesondere für die an der Herstellung von Explosivstoffen beteiligten Arbeiter beschrieben, sie kann aber auch durch den Kontakt mit kontaminierten Böden oder hoch belastetem Grundwasser erfolgen. Studien legen nahe, dass die Toxizität von TNT und seinen Abbauprodukten auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen zurückzuführen ist, die die Leber, das Blut, das Immunsystem und die Reproduktionsfähigkeit schädigen können (Environmental Protection Agency 2017).

Um das Ausmaß der STV-Ausbreitung und das damit verbundene Gefährdungspotential einschätzen zu können, werden daher genaue und schnelle Analysemethoden benötigt, die die Probenaufarbeitung des Bodens, die Extraktion der STV aus dem Boden und die Ermittlung der STV-Konzentration mit geeigneten Methoden einschließt. Letzteres kann im einfachsten Fall über eine chromatographische Auftrennung und UV/Vis-Detektion bei 254 nm durchgeführt werden. Zur Erhöhung der Sensitivität und Selektivität kann die Chromatographie mit einem Massenspektrometer gekoppelt werden, wobei Ionen der STV gemäß ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) detektiert werden (Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz Brandenburg 2015). Bei der Triple-Quadrupol-Technologie können zudem zunächst Produkt-Ionen selektiert, in einer Kollisionszelle fragmentiert und schließlich spezifische Fragment-Ionen der STV nachgewiesen werden. Dadurch wird die Spezifität und Sensitivität der Methode weiter erhöht und eine sehr genaue Quantifizierung der im Boden enthaltenen STV ermöglicht.

Neben der Analysemethode kommt der Probenvorbereitung eine besondere Bedeutung zu. Aufgrund der inhomogenen Verteilung der STV im Boden ist die Homogenisierung der Proben ein wichtiger Bestandteil, um reproduzierbare und richtige Ergebnisse zu erhalten. Im Anschluss daran kann in einem einfachen Extraktionsverfahren die Bodenprobe mit Lösungsmittel versetzt und über einen längeren Zeitraum (ca. 18 h) geschüttelt werden (Deutsches Institut für Normung 2014; Environmental Protection Agency 2006). Die im Boden enthaltenen STV lösen sich dabei im organischen Lösungsmittel und können nach Filtration am LC-MS/MS quantifiziert werden.

Um eine gute Auftrennung der strukturell sehr ähnlichen STV zu erreichen und gleichzeitig eine zeitsparende Analyse zu etablieren, soll eine LC-MS/MS-Methode zum simultanen Nachweis von acht relevanten STV entwickelt werden. Für die untersuchten STV wird zudem überprüft, ob die Extraktion in Anbetracht bestehender Referenzmethoden vereinfacht und beschleunigt werden kann. Eine abschließende Validierung der Methoden und Testung an Realproben soll schließlich für die Bewertung herangezogen werden, ob diese in Zukunft für eine schnellere und flächendeckende Analyse belasteter Altlastenverdachtsflächen genutzt werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wiesen den Reinheitsgrad p.A., HPLC oder LC-MS auf und wurden von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) erworben. Folgende STV-Standards wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen: 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol (2-ADNT), 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol (4-ADNT), 1,3-Dinitrobenzol (DNB), 2-Nitrotoluol (2-NT) und 1,3,5-Trinitrobenzol (TNB). 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), 2,4-Dinitrotoluol (2,4-DNT) und 2,6-Dinitrotoluol (2,6-DNT) sowie die belasteten Bodenproben wurden von der terracon GmbH (Jüterbog) zur Verfügung gestellt.

2.2 Herstellung von Standardlösungen

Für die Methodenentwicklung wurden Stammlösungen der acht STV-Standards (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, TNB, DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT) sowie ein Gemisch mit allen STV mit Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ in Acetonitril erstellt. Für die Kalibration wurden Konzentrationen von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ bis 50 $\mu\text{g/ml}$ des STV-Gemischs (0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 $\mu\text{g/ml}$) verwendet.

2.3 Vorbereitung der Bodenproben

Zur Bereitstellung einer definierten Bodenbelastung wurden Sand- und Humusboden mit TNT dotiert. Hierzu wurden unbelasteter Sand bzw. Humus getrocknet, auf 2 mm Partikelgröße gesiebt, mit TNT versetzt, 10 min gemischt, um dann erneut gesiebt und für 10 min gemischt zu werden. Die Endkonzentrationen betragen für beide Bodenarten 1 g TNT/kg Boden. Die von der terracon GmbH zur Verfügung gestellten Bodenproben wurden vor der Entnahme der Stichproben gemischt und der Wassergehalt der Proben wurde zur Berücksichtigung in der Konzentrationsberechnung bestimmt.

2.4 STV-Extraktion aus Bodenproben

Die Extraktion wurde gemäß der von der EPA beschriebenen Methode 8330b durchgeführt (Environmental Protection Agency 2006). Kurz zusammengefasst wurden die Bodenproben im Dunkeln getrocknet, auf 2 mm Partikelgröße gesiebt, 10 g abgewogen und in 20 ml Acetonitril auf dem Schüttler (Intelli Mixer RM-21, Elmi) für 18 h extrahiert. Zur Vereinfachung der Extraktion wurden verschiedene Experimente mit den dotierten Bodenproben durchgeführt. Hierzu wurden die Verkürzung der Extraktionszeit (1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 18 h) sowie die Verringerung des Bodenmaterials (1 g, 2 g, 5 g, 10 g) bei gleichbleibendem Verhältnis zum Lösungsmittel Acetonitril untersucht. Als Alternative wurde zudem eine Ultraschallextraktion mit den o. g. Zeiten betrachtet. Da zur Kalibration Standardlösungen verwendet wurden, erfolgte eine Va-

lidierung der Methoden mit dotierten Extrakten. Zu diesem Zweck wurden die Wiederfindungsrate (10 µg/ml STV-Gemisch) und die Präzision (n = 10) bei Anwendung der optimierten Methoden bestimmt sowie Realproben analysiert.

Vor der Messung an der LC-MS/MS wurden alle Extrakte zentrifugiert (2 min, 10.000xg), der Überstand filtriert (PTFE, 0,22 µm) und im Verhältnis 1:10 bzw. 1:100 mit Acetonitril verdünnt.

2.5 Chromatographie und MS-Optimierung

Die LC-MS/MS-Analysen wurden am LCMS-8040 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg), bestehend aus einer HPLC mit Photodiodenarray (PDA) und einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung (ESI), durchgeführt. Für die Gerätesteuerung und Auswertung der Ergebnisse wurde die Software LabSolutions (Shimadzu) verwendet. Die Auftrennung der STV erfolgte mithilfe der HPLC-Säule Nucleodur® C18 HTec, 3 µm, 2 x 150 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und dem zugehörigen Vorsäulensystem (Column Protection System, Macherey-Nagel). Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Wasser mit 5 mM Ammoniumacetat und 0,001 % Ammoniumhydroxid (A) sowie Methanol (B) verwendet. Eine optimale Auftrennung konnte bei einer Säulentemperatur von 28°C, einer Flussrate von 0,15 ml/min und dem in Tab. 1 dargestellten Gradienten erreicht werden. Die UV-Detektion und -Quantifizierung erfolgte bei 254 nm. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl.

Im Massenspektrometer konnten im negativen Ionenscan fünf der acht STV anhand spezifischer Produktionen identifiziert werden. Über das Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) wurden für diese fünf STV die häufigsten Fragmente bestimmt (Tab. 2). Mit Ausnahme der ADNT wurde bei allen STV das häufigste Fragment (*) zur Quantifizierung herangezogen. Die optimierten Bedingungen waren hierfür eine ESI-Kapillarspannung von -3,5 kV, eine Ionenquellentemperatur von 250°C und eine Heizblocktemperatur von 400°C. Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff

Tab. 1: Profil des Lösungsmittelgradienten zur STV-Separation

Zeit [min]	Lösungsmittel A [% v/v]	Lösungsmittel B [% v/v]
0,0	43	57
2,0	43	57
13,0	30	70
14,8	30	70
15,0	90	10
20,0	90	10

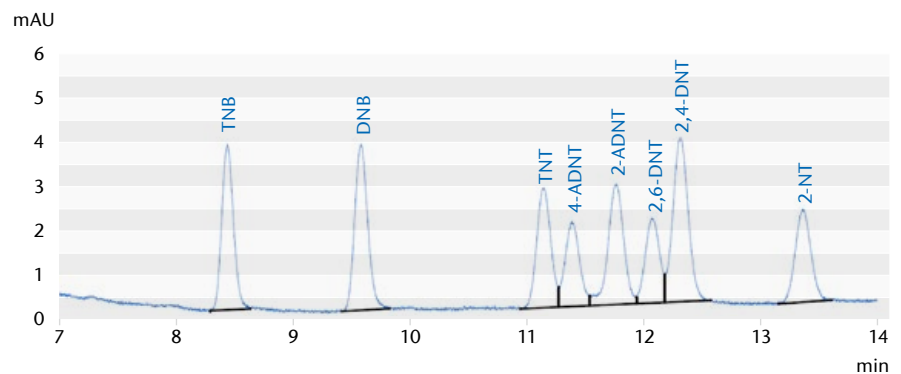


Abb. 1) Chromatographische Auftrennung und UV-Detektion (254 nm) eines 1-µg/ml-STV-Standardgemischs mit TNB, DNB, TNT, 4-ADNT, 2-ADNT, 2,6-DNT, 2,4-DNT und 2-NT.

eines Stickstoffgenerators (Infinity NM32L, Peak Scientific Instruments GmbH, Düren) mit einer Flussrate von 3 bzw. 15 l/min eingesetzt. Das Gas Argon wurde zur Fragmentierung der STV in der Kollisionszelle genutzt (230 kP).

3. Ergebnisse

3.1 LC-MS/MS-Methodenentwicklung

Im Zuge der chromatographischen Methodenentwicklung konnten die acht strukturell sehr ähnlichen STV erfolgreich separiert werden (Abb. 1). Insbesondere für die Trennung der Isomere 4- und 2-ADNT bzw. 2,4- und 2,6-DNT spielten eine genaue Einstellung des Gradienten (Tab. 1) sowie die Säulentemperatur (28°C) eine wichtige Rolle.

Im negativen Ionenscan des Massenspektrometers konnten für fünf der acht Verbindungen spezifische Ionen detektiert werden. Für TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 2,4-DNT wurde das de-

protonierte Anion $[M-H]^-$ nachgewiesen. Bei TNB zeigte sich dagegen eine größere Abweichung zum Molekulargewicht (s. Tab. 2). Für die ionisierbaren STV wurden in der automatisierten MRM-Optimierung die zwei bis fünf häufigsten Fragmente bestimmt, von denen in den meisten Fällen das häufigste zur Quantifizierung genutzt wurde. Die weiteren Fragmente dienen zur Qualitätssicherung. Bei 2-ADNT und 4-ADNT wurde bei der Auswahl des Fragments zur Quantifizierung berücksichtigt, dass das Fragment beim jeweils anderen Isomer ein möglichst geringes Signal hervorruft. Aufgrund der sehr ähnlichen Struktur und des daraus resultierenden Fragmentierungsverhaltens ist in den MRM-Chromatogrammen zu den Elutionszeiten jeweils trotzdem ein Doppelpeak zu erkennen (Abb. 2). Daher ist insbesondere für die ADNT nicht nur die Auswahl spezifischer Fragmente, sondern auch der Elutionszeitpunkt ein wichtiger Faktor, um den korrekten Peak zur Quantifizierung heranzuzie-

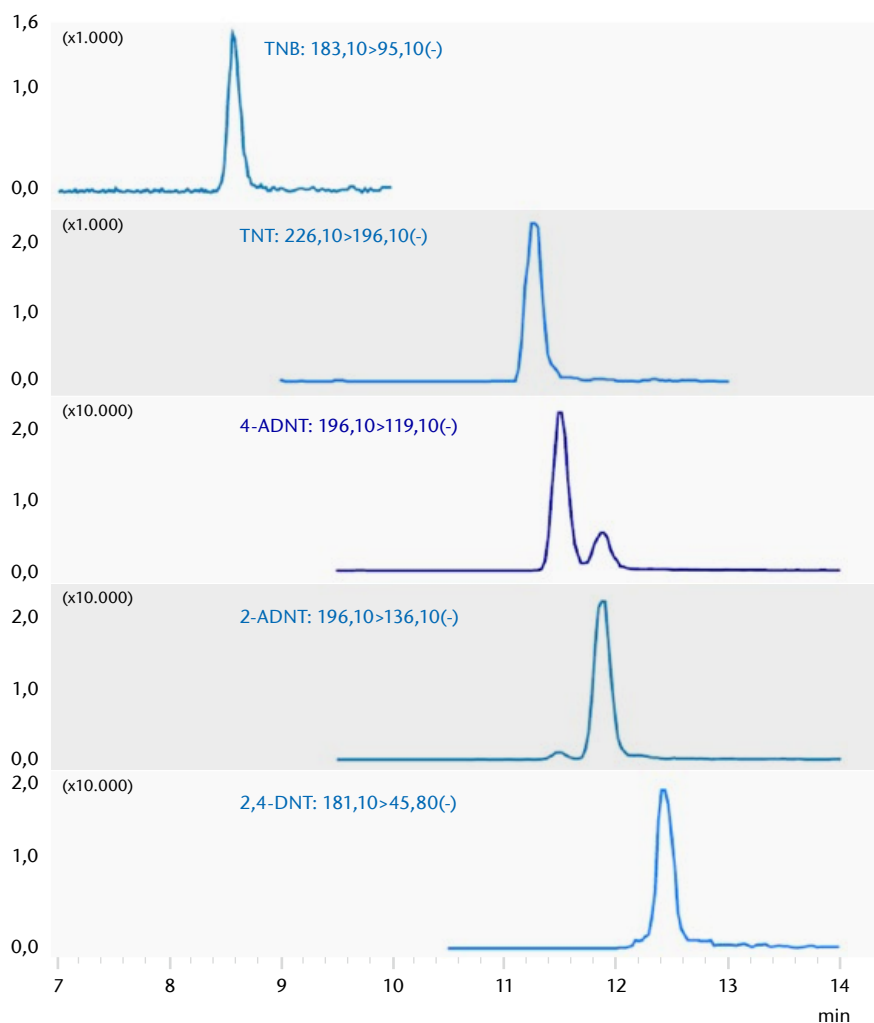


Abb. 2) MRM-Chromatogramme der fünf über ESI ionisierbaren STV TNT, TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 2,4-DNT eines 1- μ g/ml-STV-Standardgemischs mit Kennzeichnung und Benennung der zur Quantifizierung genutzten Fragmente.

hen. Im Vergleich zu den anderen drei STV ist der Nachweis der Aminodinitrotoluole um den Faktor 10 sensitiver.

3.2 Validierung der LC-MS/MS-Methoden

Zur Konzentrationsbestimmung in Bodenproben wurden Kalibrationsgeraden für die STV mithilfe der UV-Chromatogramme und der MRM-Chromatogramme erstellt. In beiden Detektionsverfahren zeigt die Mehrfachbestimmung nur eine geringe Standardabweichung von durchschnittlich 5 % (0,17 – 16,6 %) mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,999 bis 1. Die massenspektrometrische Quantifizierung weist gegenüber der UV-Quantifizierung eine größere Sensitivität auf (vgl. Abb. 3 für 4-ADNT). Daher erstreckt sich auch der lineare Bereich in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als die UV-Kalibration (Tab. 3).

Zur Bestimmung der Nachweis- (LOD) und Quantifizierungslimits (LOQ) wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) der Peaks herangezogen. Ein $S/N > 3$ wurde als untere Nachweis-, ein $S/N > 10$ als Quantifizierungsgrenze festgelegt (DeArmond & DiGoregorio 2013; Leito et al. 2017). Die massenspektrometrische Detektion ist auch hier bis zu 25-mal sensitiver (Tab. 3).

Tab. 2: Molekulargewicht der untersuchten STV, Elutionszeitpunkte im UV-Chromatogramm (254 nm), Nachweisbarkeit im MS (ESI) sowie spezifische Produkt-Ionen und Fragment-Ionen mit Kennzeichnung des für die Quantifizierung genutzten Fragments (*).

STV [-]	M_w [g/mol]	UV: 254 nm [min]	MS: ESI- [-]	Produkt-Ion [m/z]	Fragment-Ionen [m/z]
TNT	227,1	10,9	✓	226,1	196,10*; 46,00; 64,05
4-ADNT	197,1	11,2	✓	196,1	166,30; 149,15; 136,10; 119,15*; 46,00
2-ADNT	197,1	11,6	✓	196,1	166,10; 150,10; 136,10*; 119,15; 45,85
2,6-DNT	182,1	11,9	-	-	-
2,4-DNT	182,1	12,2	✓	181,1	135,25; 116,05; 105,20; 45,80*
2-NT	137,1	13,1	-	-	-
TNB	213,1	8,3	✓	183,1	125,10; 95,10*
DNB	168,1	9,4	-	-	-

Um die Selektivität der chromatographischen Auftrennung zu bewerten, wird die Peakauflösung R_s genutzt. Sie ist ein Maß dafür, wie weit benachbarte Peaks (A und B) im Chromatogramm auseinanderliegen. Für die Berechnung werden die Retentionszeiten t_R und die Halbwertsbreiten $w_{1/2}$ der Peaks benötigt.

$$R_s = \frac{t_R(B) - t_R(A)}{0,85(w_{1/2}(B) + w_{1/2}(A))}$$

Als Richtwert kann hier eine Auflösung von mindestens 1,5 herangezogen werden (Leito et al. 2017). Dieser Wert wurde für die meisten STV erreicht (Tab. 3). Lediglich TNT und 4-ADNT (1,13), 2-ADNT und 2,4-DNT (0,98) sowie 2,4-DNT und 2,6-DNT (0,96) zei-

gen eine schlechtere Peakauflösung. Beim MRM-basierten Nachweis wird dieser Parameter durch die spezifische Produkt- und Fragment-Ion-Selektion nicht benötigt. Neben der hohen Sensitivität ist diese Selektivität ein weiterer Grund, zur Bestimmung der STV-Konzentrationen die MRM-Quantifizierung der UV-Quantifizierung vorzuziehen.

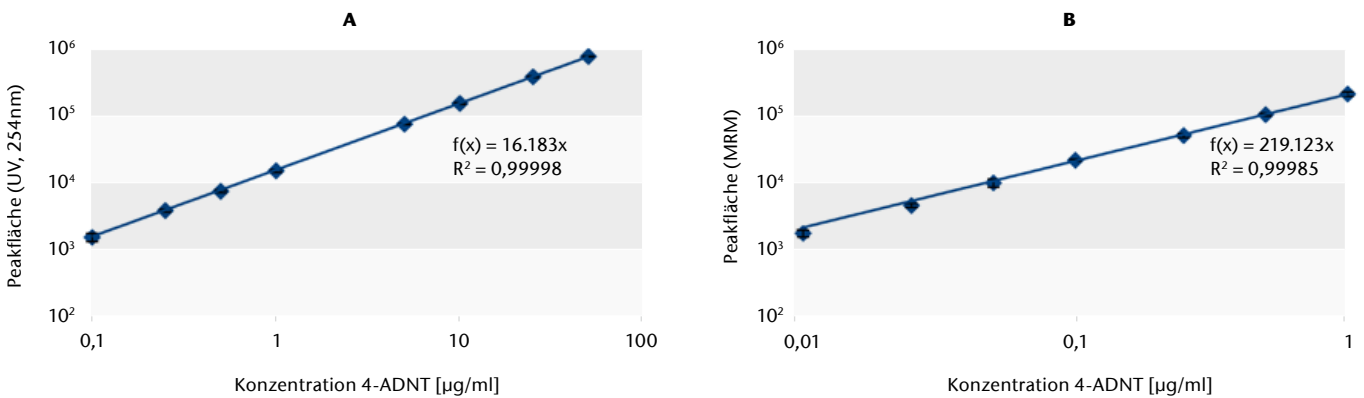


Abb. 3) Kalibrationsgeraden zur Bestimmung von 4-ADNT in Bodenproben (n = 3); UV-Quantifizierung bei 254 nm (A) und MRM-Quantifizierung des spezifischen Fragments (hier: 196,1 > 119,15(-)) (B) in doppelt logarithmischer Darstellung.

Tab.3: Methodenvalidierung der UV- und MS-Quantifizierung hinsichtlich des linearen Bereichs, der unteren Nachweis- (LOD) und Quantifizierungsgrenze (LOQ) sowie der Selektivität der chromatographischen Auftrennung zur nachfolgend eluierten STV (Peakauflösung R_s)

Methode	STV	Linearer Bereich [µg/ml]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	Peakauflösung (UV)
UV	TNB	0,1 - 50	0,25	0,50	5,52
	DNB	0,1 - 50	0,10	0,25	6,77
	TNT	0,1 - 50	0,25	0,50	1,13
	4-ADNT	0,1 - 50	0,25	0,50	1,61
	2-ADNT	0,1 - 50	0,25	0,50	0,98
	2,4-DNT	0,1 - 50	0,10	0,25	0,96
	2,6-DNT	0,1 - 50	0,25	0,50	3,90
	2-NT	0,1 - 50	0,25	0,50	-
MS	TNB	0,1 - 10	0,10	0,25	-
	TNT	0,1 - 25	0,05	0,10	-
	4-ADNT	0,01 - 1	0,01	0,025	-
	2-ADNT	0,01 - 1	0,01	0,025	-
	2,4-DNT	0,1 - 10	0,10	0,25	-

3.3 Optimierung der STV-Extraktion aus Bodenproben

Aktuelle Referenzmethoden zur Extraktion von STV aus Bodenproben benötigen große Probenmengen von 10 bis 20 g und sind mit langwierigen Extraktionen bis zu 24 h verbunden (Environmental Protection Agency 2006; Deutsches Institut für Normung 2014). Um eine schnellere und trotzdem effektive Extraktion der hier betrachteten STV zu erreichen, wurden verschiedene Parameter optimiert. Zunächst wurde die Verringerung der eingesetzten Bodenmenge für zwei mit 1 g TNT/kg dotierte Böden untersucht. Sowohl für den humushaltigen als auch für den sandigen Boden konnte kein großer Einfluss durch die Verringerung der eingesetzten Bodenmenge festgestellt werden (Abb. 4 A und B). Bei 1 g Boden fällt im Vergleich zu den anderen Proben lediglich die Standardabweichung höher aus. Für den sandigen Boden wurden etwas höhere Werte als 1 g TNT/kg Boden bestimmt. Beim humushaltigen Boden liegen die bestimmten Konzentrationen von ca. 700 mg TNT/kg Boden deutlich unter der vormals dotierten Konzentration.

Durch diese Ergebnisse wurden 2 g Boden als ausreichend erachtet und in nachfolgenden Experimenten zur Ermittlung einer verkürzten Extraktionszeit eingesetzt. Für beide dotierte Böden wurden Extraktionszeiten von 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min sowie 18 h als Referenzwert untersucht. Bereits nach 1 min konnten in allen Proben bis zu 75 % der nach 18 h ermittelten TNT-, 2-ADNT- und 4-ADNT-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 4 C und D). Bis zur Extraktionszeit von 30 min kann eine weitere Zunahme festgestellt werden, die mit Ausnahme von 2-ADNT bis zur Maximalzeit von 18 h keine großen Veränderungen zeigt. Im TNT-dotierten Humusboden fielen die TNT-Konzentrationen noch einmal niedriger als im Vorexperiment aus. Dafür konnten erhöhte Konzentrationen der Aminodinitrotoluole nachgewiesen werden, die im Sandboden nicht vorhanden waren.

Im letzten Optimierungsexperiment wurde überprüft, ob die STV-Extraktion aus dem dotierten Humusboden

durch die Anwendung von Ultraschall verbessert werden kann. Nach 1 min Extraktionszeit wurden durch den Ultraschall ca. 5–10 % mehr TNT extrahiert, allerdings gleicht sich die Konzentration der beiden Verfahren nach 5 min wieder an und fällt bei der einfachen Extraktion nach 30 min und 60 min sogar höher aus (Abb. 4 E). Nach 18 h zeigt sich wiederum ein leichter Vorteil des Ultraschallverfahrens.

Aufgrund der Ergebnisse zur Optimierung der Extraktion wurde ein verkürztes Verfahren etabliert, das für TNT und die Aminodinitrotoluole vergleichbare Ergebnisse zum Referenzverfahren lieferte. Dieses optimierte Verfahren nutzt eine geringe Bodenmenge (2 g) und eine einfache Lösungsmittelextraktion mit Acetonitril bei einer deutlich verkürzten Extraktionszeit von 30 min.

Abschließend wurden zur Validierung der gesamten Messmethodik inklusive des verkürzten Extraktionsverfahrens die Wiederfindungsrate und die Präzision bestimmt. Die Wiederfindungsrate wird zur Bewertung der Probenvorbereitung herangezogen. Hierfür wurde unbelasteter, humushaltiger Boden gezielt mit 10 µg/ml STV-Mix versetzt, im Anschluss mit dem optimierten Verfahren extrahiert und am LC-MS/MS analysiert. Mit Ausnahme von 2,4-DNT ist die Wiederfindungsrate der MS-Quantifizierung höher als bei der Verwendung der UV-Quantifizierung (Abb. 5 A). Alle anderen Wiederfindungsraten liegen mindestens bei 85 %, bei 2-ADNT sogar bei 95 % (MS-Quantifizierung).

Zur Bestimmung der Präzision wurden für die dotierten Böden zehn Extraktionen durchgeführt und über LC-MS/MS quantifiziert. Die massenspektrometrische Quantifizierung lieferte etwas höhere TNT-Werte als der UV-Nachweis (Abb. 5 B). Die für die Präzision relevante Standardabweichung der TNT-Konzentrationen fällt bei dem dotierten Humusboden etwas höher als beim Sandboden aus. Die im Humusboden nachgewiesenen 2- und 4-ADNT zeigen dagegen nur eine geringe Standardabweichung.

Die optimierten Extraktions- und Messmethoden wurden an Realproben (H0–H4) getestet, die einige Wochen zuvor als Referenz von einem pro-

fessionellen Anbieter (terracon GmbH Jüterbog) analysiert worden waren. In der Probe H0 konnten mit beiden Verfahren keine STV nachgewiesen werden. Die Proben H1 bis H4 zeigen Kontaminationen mit TNT, 2-ADNT und 4-ADNT (Abb. 6). Im Vergleich zu den Referenzwerten sind unsere Messwerte niedriger. Insbesondere bei der hoch kontaminierten Probe H1 werden größere Abweichungen deutlich. Allerdings musste bei dieser Bodenprobe eine Probe der Dreifachbestimmung ausgeschlossen werden, da sie im Vergleich zu den anderen beiden Extrakten eine zehnfach erhöhte TNT-Konzentration aufwies. Die Quantifizierungsergebnisse der niedriger belasteten Proben liegen dagegen deutlich näher an den Referenzwerten.

4. Diskussion

4.1 LC-MS/MS-Methodenentwicklung

Die untersuchten Sprengstoffe unterscheiden sich in ihrer Polarität, was für die Separation in der Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) genutzt werden kann. Eher polare Sprengstoffe, wie TNB oder DNB, eluieren zu Beginn des Gradienten, da der polare Anteil der mobilen Phase hier höher ist. Weniger polare Sprengstoffe wie 2-NT werden dagegen erst am Ende bei einem hohen organischen Anteil des Lösungsmittels eluiert. Mit der optimierten Methode konnten alle acht STV separiert werden. Aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Struktur der Sprengstoffe zeigten sich im Chromatogramm teilweise Überlagerungen der Peaks. Dies wirkte sich negativ auf die Peakauflösung aus, so dass der Grenzwert von 1,5 teilweise unterschritten wurde. Insbesondere strukturelle Isomere wie 2- und 4-ADNT oder 2,4- und 2,6-DNT neigen zur Co-Elution in der Chromatographie (Bečanová et al. 2010), was sich negativ auf die Quantifizierung auswirken kann. Bei Erstellung der Kalibrationsgeraden und Quantifizierung der STV in Bodenproben wurde jedoch keine Beeinträchtigung beobachtet. Die Kalibration zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit und ermittelte vergleichbare Ergebnisse zu der massenspektrometrischen Quantifizierung.

Zum massenspektrometrischen Nachweis müssen die STV über ESI ionisierbar sein. Durch den Einsatz von Additiven wie Ammoniumacetat und Ammoniumhydroxid kann die Ionisation der Analyten deutlich verbessert werden (Kostiainen & Kauppila 2009). So konnten TNT, 2-ADNT, 4-ADNT und 2,4-DNT als deprotonierte Anionen $[M-H]^-$ nachgewiesen werden.

Von TNB wurde statt des deprotonierten Anions bereits ein spezifisches Fragment als Vorläufer-Ion detektiert $[TNB-NO]^-$ (Song et al. 2005). Die drei weiteren STV (DNB, 2,6-DNT, 2-NT) konnten aufgrund der geringen Anzahl von Nitrogruppen bzw. ihrer Struktur nicht über ESI ionisiert werden. Mithilfe der APCI (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)

als alternative Ionisationsquelle wäre eine Ionisation von DNB und 2,6-DNT möglich (Thurman & Ferrer 2012). 2-NT kann dagegen nur über GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) nachgewiesen werden (Perr et al. 2005). Für die ionisierbaren STV wurden im Zuge des MRM spezifische Fragmente (Produkt-Ionen) ermittelt und damit

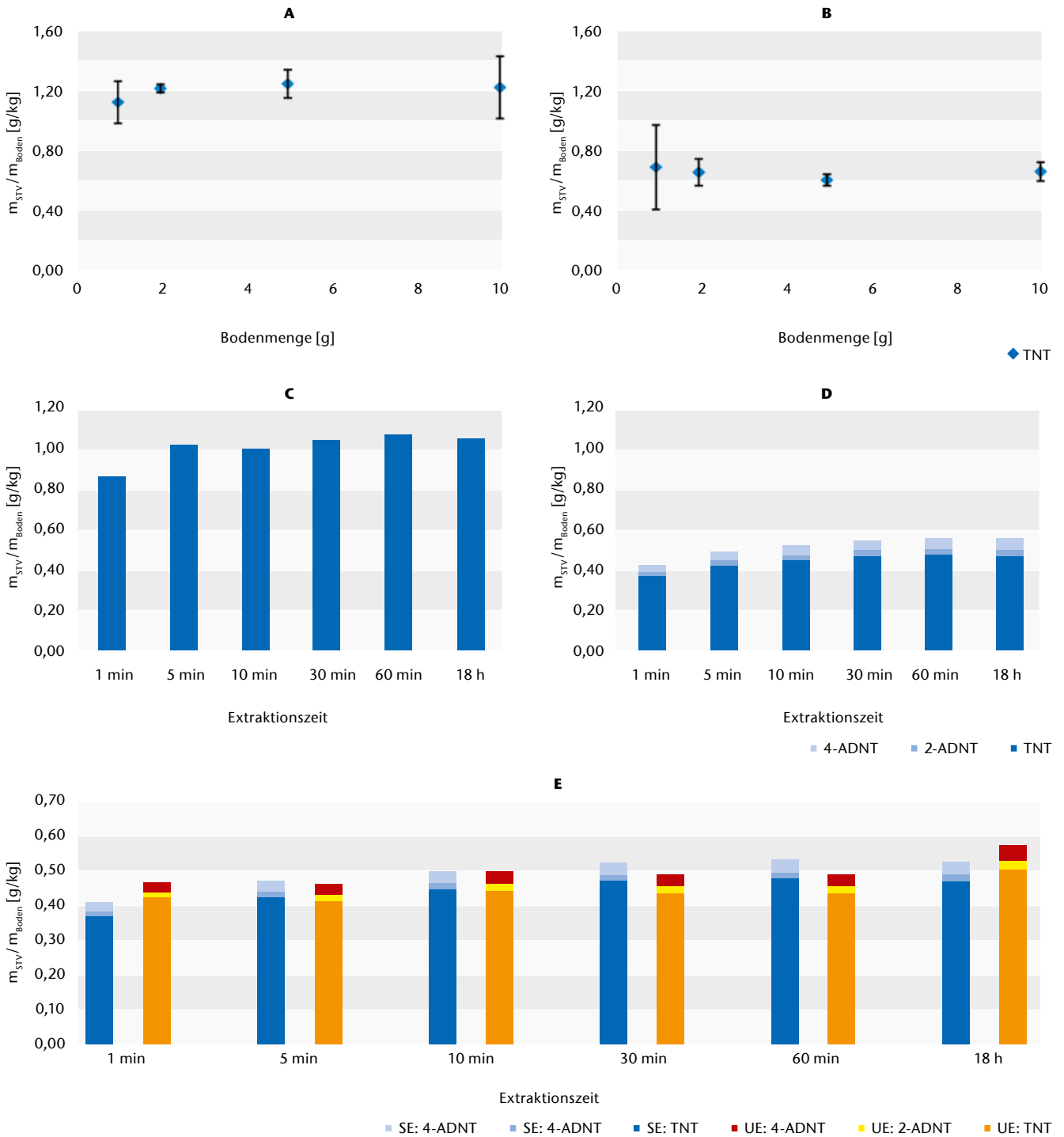


Abb. 4) Optimierung der STV-Extraktion aus dotierten Bodenproben: Nachgewiesene TNT-Konzentrationen bei Einsatz verschiedener Bodenmengen für sandigen (A) bzw. humushaltigen Boden (B); Einfluss der Extraktionsdauer auf die nachgewiesene STV-Konzentrationen in sandigem (C) und humushaltigem Boden (D); Vergleich der über Schüttel- (SE) und Ultraschall-Extraktion (UE) extrahierten STV in dotiertem Humusboden (E).

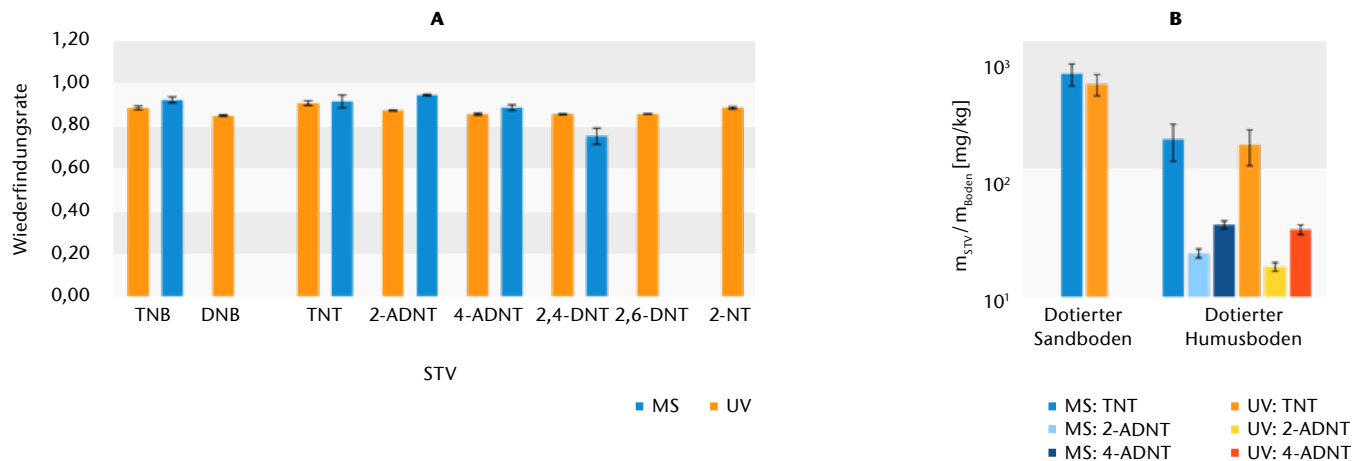


Abb. 5) Wiederfindungsrate von STV (10 µg/ml) in humushaltigen Bodenproben, die über die optimierten Methoden extrahiert und analysiert worden sind (n = 2) (A); Präzision der entwickelten Extraktions- und LC-MS/MS-Methoden für dotierten Sand- und Humusboden (n = 10) (B).

auch die Sensitivität für die Quantifizierung der STV deutlich erhöht. Selbst bei den Doppelpeaks der ausgewählten ADNT-Fragmente ist durch den jeweils spezifischen Zeitpunkt der Elution und die erhöhte Spezifität des Produkt-Ionen-Nachweises eine unabhängige Quantifizierung möglich. Bei der MS-Quantifizierung wurden für alle STV niedrigere LOD und LOQ im Vergleich zur UV-Quantifizierung ermittelt. Die Sprengstoffe mit der höchsten Sensitivität wiesen die niedrigste LOD (0,01 µg/ml) auf, was im besseren Ionisationsverhalten der ADNT-Isomere gegenüber TNT, TNB und 2,4-DNT begründet ist. Im Vergleich zur Ionisationsmethode der APCI (LOD – 0,002 bis 0,027 µg/ml), die häufiger für den massenspektrometrischen STV-Nachweis eingesetzt wird, konnten für die hier untersuchten STV mit der ESI ähnlich gute LOD erzielt werden (Jiang 2010).

4.2 STV-Extraktion aus Bodenproben

Ein wichtiger Parameter bei der Durchführung einer Bodenextraktion ist die Probenvorbehandlung, bei der der Boden homogenisiert und bei Bedarf getrocknet wird. Boden ist eine komplexe Probenmatrix, und die Verteilung der STV in belasteten Gebieten ist meistens inhomogen (Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz Brandenburg 2015). Dieses Verhalten konnte auch in den hier untersuchten Bodenproben beobachtet werden. So wurden im dotierten

Sandboden trotz einer 20-minütigen Homogenisation bis zu 10 % höhere TNT-Konzentrationen bestimmt, als ursprünglich dotiert wurden. Diese Vermutung wird auch durch die im Validierungsprozess überprüfte Methodenpräzision bestätigt, da größere Schwankungen der gemessenen TNT-Konzentrationen in der UV- und MS-Bestimmung aufgetreten sind. Beim dotierten Humusboden konnten noch andere Einflussfaktoren beobachtet werden. So wurde hier in allen Experimenten weniger TNT nachgewiesen, als dotiert wurde. Zudem nimmt die TNT-Konzentration von ca. 700 mg/kg Boden im ersten Experiment (Einfluss der eingesetzten Bodenmenge) auf ca. 250 mg/kg Boden im letzten Experiment zur Bewertung der Methodenpräzision ab. Aufgrund der Mehrfachbestimmung und der Untersuchung der weiteren Proben kann die Homogenisation hier nicht der einzige Grund für diese Abweichungen sein. Allerdings ist durch den hohen Humingehalt des Bodens ein erhöhtes Schadstoffrückhaltevermögen zu erwarten, d. h., es ist eine teilweise Bindung des TNT an Huminstoffe wahrscheinlich, das dann nicht mehr für Extraktionen zur Verfügung steht (Bayerisches Landesamt für Umwelt 2009). Zudem konnte neben der Abnahme der TNT-Konzentration eine Zunahme der ADNT in dem dotierten Humusboden festgestellt werden. So wurden im letzten Experiment reproduzierbar bis zu 100 mg ADNT/kg Boden nachgewiesen. Da sie nicht dem

Boden zugefügt worden waren, sind sie auf Transformationsprozesse im Boden zurückzuführen. Die Proben wurden dunkel, kühl und fest verschlossen gelagert, so dass photolytische Transformationsreaktionen unwahrscheinlich sind. Vielmehr könnten im Humusboden vorhandene Mikroorganismen das dotierte TNT zu 2-ADNT und 4-ADNT abgebaut haben. Ein weiteres Indiz hierfür ist die vermehrte Bildung von 4-ADNT gegenüber 2-ADNT, was für reduktive Mechanismen spricht (Monteil-Rivera et al. 2009). Die Ultraschallextraktion konnte im Vergleich zur einfachen Extraktion nur eine geringfügige Erhöhung der extrahierten STV nach 18 h erzielen. Da das Ziel in der Entwicklung einer einfachen und schnellen Methode lag, die möglichst auch im Feld angewendet werden kann, ist daher die einfache Lösungsmittelextraktion vorzuziehen. In den hier untersuchten Bodenproben waren nur die häufigsten STV TNT, 2-ADNT und 4-ADNT vertreten. Für andere STV, wie z. B. TNB, müsste im Einzelnen geprüft werden, ob die verkürzte Extraktion angewendet werden kann oder andere Verfahren (z. B. Beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE) oder Soxhlet-Extraktion) vorteilhafter sind.

Bei der Messung von Realproben wurden trotz geringer Standardabweichung deutliche Differenzen zu den vorliegenden Referenzwerten ermittelt. So fielen die meisten berechneten Konzentrationen niedriger aus und

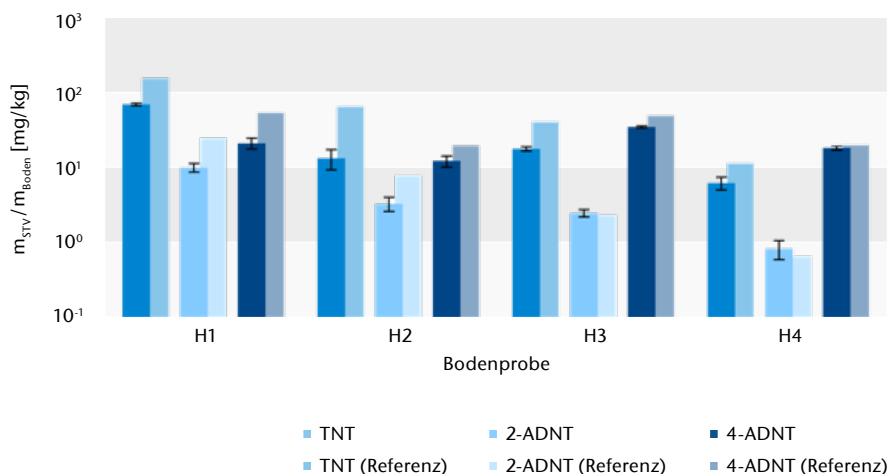


Abb. 6) LC-MS/MS-Bestimmung von TNT, 2-ADNT und 4-ADNT in kontaminierten Realproben mit den optimierten Methoden im Vergleich zu den Werten des Analytiklabors (terracon GmbH) als Referenz (H1: n = 2; H2–H4: n = 3).

lagen außerhalb des Vertrauensintervalls. Auch hier kommen zwei der bereits zuvor beobachteten Fakten zum Tragen. Zum einen lag vermutlich keine ausreichende Homogenisierung der entnommenen Gesamtprobe vor. Von den jeweils 10–20 kg entnommenen Bodenproben wurde nur ein sehr geringer Teil (insgesamt 6 g je Probe) in unserem Labor analysiert. Für die Probe H1 wurde in der Dreifachbestimmung trotz vorheriger Durchmischung sogar ein Wert mit zehnfach erhöhter TNT-Konzentration gegenüber den anderen beiden Extrakten ermittelt, der als Ausreißer nicht in die Auswertung einbezogen wurde. Eine unzureichende Durchmischung der Ausgangsmaterialien hat daher wahrscheinlich zu den großen Abweichungen zwischen unseren ermittelten Konzentrationen und den Werten des Referenzlabors geführt. Zum anderen lagen zwischen den Analysen mehrere Wochen, so dass insbesondere bei den huminhaltigen Proben (H2–H4) Transformations- und Bindungsprozesse stattgefunden haben könnten.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Laboranalyse sprengstofftypischer Verbindungen kann in drei größere Arbeitskomplexe unterteilt werden. Dazu zählen eine möglichst präzise Probenvorbereitung, die Extraktion der Sprengstoffe aus Bodenproben und die Analyse der Sprengstoffbelastung mittels geeigneter Quantifizierungsmethoden. Über die Proben-

vorbereitung wird dafür gesorgt, dass für die nachfolgenden Arbeitsschritte eine repräsentative Probe des Bodenmaterials zur Verfügung steht. Bestehende Extraktionsmethoden nutzen eine hohe Menge Bodenmaterial und benötigen für die Extraktion der STV hohe Lösungsmittelvolumina sowie lange Analysezeiten. Bei einer Vielzahl von Laboranalysen, wie sie für die Erfassung von kontaminierten Liegenschaften notwendig sind, kann so ein beträchtlicher Material- und Kostenaufwand entstehen. Bei der Optimierung einer bestehenden Extraktionsmethode für STV wurde die verwendete Bodenmenge von 10 auf 2 g und die Extraktionsdauer von 18 h auf 30 min reduziert. Durch die reduzierte Bodenmenge verringert sich gleichzeitig das benötigte Lösungsmittelvolumen für die Extraktion von 20 auf 4 ml Acetonitril. Die abschließende Validierung der Methode zeigte hohe Wiederfindungsraten und eine gute Präzision, aber auch die Notwendigkeit einer guten Probenvorbereitung. Insbesondere bei der Reduktion der Bodenmenge ist daher auf eine ausreichende Homogenisation der Bodenproben zu achten.

Zur Quantifizierung von Sprengstoffbelastungen erwies sich die LC-MS/MS als geeignete Methode. Die erfolgreiche Etablierung einer chromatographischen Methode zur Separation von acht STV (TNB, DNB, TNT, 4-ADNT, 2-ADNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT und 2-NT) in der HPLC ermöglichte eine zuverlässige UV-Quantifizierung bei 254 nm.

Eine sensitivere und selektivere Detektion konnte durch die Etablierung einer MS-Quantifizierungsmethode für fünf der acht STV erreicht werden. Für TNB, TNT, 2-ADNT, 4-ADNT und 2,4-DNT wurden geeignete Produkt- und Fragment-Ionen zum Quantifizieren ermittelt.

Mit neuen und gut homogenisierten Realproben sollte die Anwendbarkeit der Methode noch einmal überprüft werden. Dafür wäre am besten ein Bodenmaterial geeignet, das auch Kontaminationen durch die anderen STV aufweist. Eine Alternative für kontaminierte Realproben wäre die Verwendung eines zertifizierten Referenzmaterials, bei dem die STV-Konzentrationen bekannt sind. So könnte der verkürzte Extraktionsvorgang auch für die anderen STV überprüft werden. In dieser Arbeit wurden nur die STV TNT, 4-ADNT und 2-ADNT nachgewiesen, die allerdings auch die häufigsten und bedeutendsten Kontaminationen auf Altlastenflächen darstellen. Trotzdem wäre es insbesondere für Nitramin-Sprengstoffe wie Oktogen (HMX) oder Hexogen (RDX) von Interesse, die Methode auf zusätzliche STV auszuweiten und auch Transformationsprodukte, wie z. B. Benzoesäuren, zu betrachten. Die Analyse eines breiteren Schadstoffspektrums setzt allerdings auch eine Neubewertung und eventuelle Verbesserung der chromatographischen Auftrennung voraus. Schließlich konnte mit dieser Arbeit ein vereinfachtes und deutlich schnelleres Verfahren entwickelt werden, das für ein STV-Screening von Altlastenverdachtsflächen genutzt werden kann. Darauf aufbauend könnten an ausgewählten Kontaminationsherden Standardverfahren zur STV-Analyse eingesetzt werden, um eine ausreichende Gefährdungsabschätzung der betroffenen Liegenschaften zu treffen und Sanierungspläne zu erstellen.

LITERATUR

Bayerisches Landesamt für Umwelt (2009) Arbeitshilfe für die Untersuchung von Sprengplätzen. Praxisteil, Augsburg

Bečanová J, Friedl Z, Šimek Z (2010) Identification and determination of trinitrotoluenes and their degradation products using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 291(3):133–139. doi: 10.1016/j.ijms.2010.01.016

DeArmond PD, DiGoregorio AL (2013) Characterization of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in complex environmental samples. *Anal Bioanal Chem* 405(12):4159–4166. doi: 10.1007/s00216-013-6822-4

Deutsches Institut für Normung (2014) Bodenbeschaffenheit - Bestimmung von ausgewählten Explosivstoffen und verwandten Verbindungen - Teil 2: Verfahren mittels Gaschromatographie (GC) und Elektronen-Einfang-Detektion (ECD) oder massenspektrometrischer Detektion (MS). (DIN-ISO-11916-2). Accessed 13 Nov 2017

Environmental Protection Agency (2006) Method-8330B. Nitroaromatics, nitramines, and nitrate esters by high performance liquid chromatography (HPLC).

Environmental Protection Agency (2017) Technical Fact Sheet - 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT).

Herrmann B (2008) Untersuchungen der Transformationswege von 2,4,6-Trinitrotoluol in Oberflächengewässern und deren Nutzen als natürliche Schadstoffminderungsprozesse an einem ehemaligen Rüstungsstandort. Dissertation, Philipps-Universität

Jiang G (2010) Simultaneous UHPLC/MS Analyses of Explosive Compounds. Thermo Scientific

Kostiainen R, Kauppila TJ (2009) Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(4):685–699. doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.095

Küchler F (2011) Probennahme und Qualitätssicherungsmaßnahmen bei Bodenkontaminationen mit sprengstofftypischen Verbindungen. Dissertation, Freie Universität Berlin

Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz Brandenburg (2015) Arbeitshilfe Grundwasserkontaminationen mit sprengstofftypischen Verbindungen im Land Brandenburg. Behandlung, Aufnahmemechanismen, Abbauverhalten Stufe IB - Umsetzung der Literaturrecherche und Erarbeitung vertiefender Grundlagen -. Fachinformation des LUGV. Altlastenbearbeitung im Land Brandenburg, Potsdam

Leito I, Krueve A, Rebane R, Oldekop M-L, Evard H, Herodes K, Kipper K, Helm I (2017) LC-MS Method Validation. Online Course. https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/course-introduction. Accessed 13 Nov 2017

Monteil-Rivera F, Halasz A, Groom C, Zhao J-S, Thiboutot S (2009) Fate and Transport of Explosives in the Environment. In: Sunahara GI, Lotufo G, Hawari J, Kuperman RG (eds) *Ecotoxicology of explosives*. Taylor & Francis, Boca Raton, ISBN: 9781420004342, pp 5–33

Perr JM, Furton KG, Almirall JR (2005) Gas chromatography positive chemical ionization and tandem mass spectrometry for the analysis of organic high explosives. *Talanta* 67(2):430–436. doi: 10.1016/j.talanta.2005.01.035

Song Y, Chen H, Cooks RG (2005) Reactivity of acetonide anion with nitroaromatics. An atmospheric pressure chemical ionization study. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19(23):3493–3499. doi: 10.1002/rcm.2206

Thurman EM, Ferrer I (2012) Adapting EPA Method 8330B for Analysis of Explosives in Water to SPE and LC/MS/MS. Application Note 5991-0676EN, Colorado

Via SM, Zinnert JC (2016) Impacts of explosive compounds on vegetation. A need for community scale investigations. *Environ Pollut* 208(Pt B):495–505. doi: 10.1016/j.envpol.2015.10.020

AUTOREN

Prof. Dr. Marcus Frohme

Liane Kober, M. Sc.
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
Technische Hochschule Wildau

Christian Hanschke, M. Sc.
terracon – Laboratorium für Umwelt- und
Pestizidanalytik GmbH

Prof. Dr. Rainer Macholz
Prof. Dr. Rainer Macholz Umweltprojekte GmbH

E-Mail für Korrespondenz:
marcus.frohme@th-wildau.de

