

# Analyseprotokol

## Non-Target Screening (NTS) af vand med lave koncentrationer af organiske stoffer

Peter Christensen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KU PLEN, Københavns Universitet, Miljøanalytisk Kemi, Afdeling for Miljøkemi og fysik

Denne analyseprotokol er udarbejdet som en del af VUDP-projektet: *Bedre vandkvalitet til forbrugerne* (ID 3404.2018). Projektet er udført i perioden november 2018 til december 2021 med støtte fra VUDP (Vandsektorens Udviklings- og Demonstrationsprogram). Projektet er et samarbejde mellem 3Vands partnere: HOFOR A/S, Aarhus Vand og VandCenter Syd, samt forskningsinstitutionerne: GEUS (De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland), KU PLEN, Institut for Plante og Miljøvidenskab på Københavns Universitet og DTU Sustain, Institut for Miljø- og Ressourceteknologi på Danmarks Tekniske Universitet.



## ANALYSEPROTOKOL

30. AUGUST 2023

### Non-Target Screening (NTS) af vand med lave koncentrationer af organiske stoffer

MILJØANALYTISK KEMI  
AFDELING FOR MILJØKEMI OG FYSIK

Protokol for analyse af vand med lave koncentrationer af organiske stoffer med en molekylvægt under 1000. Ved at følge protokollen ender man op med et metanolekstrakt på 20-100 µL, der kan analyseres med GC-MS og LC-MS. I det efterfølgende, er der fokuseret på analyse med GC-MS. Protokollen kan anvendes som et screeningværktøj i den danske vandforsyningen (fra grundvanden til forbrugeren) og af vand med en lignende kvalitet.

THORVALDSENSVEJ 40  
FREDERIKSBERG C

DIR 35 33 35 23

pech@plen.ku.dk

[www.plen.ku.dk/english/research/env\\_ch](http://www.plen.ku.dk/english/research/env_ch)

em\_phys

Glasudstyr der anvendes til prøveforberedelsen rengøres i opvaskemaskine inden brug. Syrevask er ikke nødvendigt, men kan godt anvendes. Efter tørring tildækkes udstyret med aluminiumsfolie og opvarmes til 550 °C i 4 timer. Udstyr der ikke tåler varmebehandlingen vaskes i stedet 3 gange med metanol (HPLC kvalitet) og lufttørres. Det tilstræbes, at rengøringen med metanol sker på dagen, hvor udstyret skal bruges, eller dagen før. Der kan anvendes prøveflasker (borosilikatglas 3.3) på 1 liter med rødt skruelåg (PBT) GL 45 med PTFE-coated indlæg eller lignende til opbevaring af vandprøver. Vandprøver udtages i 1-liters flasker i tre eksemplarer (triplikater) fra hvert sted der undersøges. Der skal fremstilles mindst 3 blindprøver i 1-liters flasker hver dag der tages prøver. Det er bedst, at fremstille blindprøverne der hvor prøverne tages. Dette gøres ved at medbringe rent vand (LC-MS kvalitet eller Milli-Q vand) og overføre det til prøveflaskerne. Alternativt kan blindprøverne fremstilles ved at åbne 1-liters flasker på prøvetagningsstedet i et tidsrum der svarer til den tid det tager at udtage en prøve. Når de tomme flasker ankommer til laboratoriet, fyldes de med rent vand (LC-MS kvalitet eller Milli-Q vand). Vand med LC-MS kvalitet kan anvendes i op til en uge efter åbning, hvis det opbevares i

køleskab ved 4 °C. Hvis man følger forskrifterne for brug og vedligeholdelse af et vandanlæg til fremstilling af ultrarent vand, så plejer kvaliteten også være i orden. Det skal dog bemærkes, at vi har fundet rester af rodalon i vandet fra vores vandanlæg. Set over tid, så er kvalitet af LC-MS vand mere stabilt end Milli-Q vand produceret på vores vandanlæg – men til dagligt ser vi næsten ingen forskel.

Vandprøver og blindprøver opbevares mørkt ved 4 °C i køletaske, køleskab eller lignende. Alle prøvetyper bør ekstraheres hurtigst muligt - gerne inden for 24 timer efter prøvetagningen.

Det anbefales at bruge den samme type hansker under rengøring, prøvetagning og prøveforberedelse, så det er nemmere at spore en evt. afsmitning.

Til fastfase ekstraktionen (solid phase extraction, SPE) af vandprøverne anvendes en SPE kolonne fra Waters (Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 500 mg, 186000115). Kolonnen klargøres ved først at lade 10 mL metanol passere igennem og dernæst 10 mL rent vand (LC-MS kvalitet eller Milli-Q vand). Vandprøven påføres og løber igennem kolonnen og efterfølges af 10 mL rent vand. Begge med et flow på ca. 20 mL/min. Kolonnen suges tør og dråber fjernes med et flow af nitrogen. Prøveflasken vaskes 2 gange med 10 mL metanol, der efterfølgende påføres kolonnen med et flow på 2 mL/min. De organiske stoffer der var fanget i kolonnen og på den indre overfladen af prøveflasken forlader nu kolonnen sammen med metanolen. I langt de fleste tilfælde er det nødvendigt at koncentrere metanolekstraktet.

Metanolekstraktet inddampes til 20-100 µL (afhængigt af prøveglassene) ved 50 °C og et svagt nitrogen flow. Ekstraktet opbevares ved -20 °C indtil det skal analyseres. Før analysen, opvarmes ekstraktet til stue temperatur og omrystes (vortex).

Som en del af den daglige forebyggende vedligeholdelse skiftes liner og septum på GC-MS systemet. Dernæst analyseres to prøver med ren metanol for at undersøge om instrumentet er beskidt (kontamineret). Der foretages egnethedstest af injektionsporten og GC-kolonnen ved at analysere en særlig opløsning indeholdende 4 stoffer (EPA 8270 GC-MS Tuning Solution) på GC-MS systemet. Massespektrometeret (MS'en) kalibreres ved køre en autotune og det tjekkes om systemet er tæt (det undersøges om niveauet af luft højere en normalt). Når alt ser godt ud, er GC-MS systemet klart til at analysere prøverne.

Sekvensen af prøver, blindprøver og blanke prøver (rent metanol) skal analyseres i en rækkefølge, så systematiske fejl undgås. Ofte vil der også indgå andre typer prøver i sekvensen for at sikre kvaliteten og muligheden for at korrigere ændringer i retentionstider og følsomhed af instrumentet. For at minimere risikoen for systematiske fejl placeres triplikater i hver deres tredjedel af sekvensen. Desuden tilstræbes det at rækkefølgen af prøver/replikater inden for hver tredjedel af sekvensen er forskellige. Der skal analyseres en prøve med mineralolie i sekvensen, så retentionsindeks kan beregnes på baggrund af mønsteret af n-alkaner og retentionstider. Alle prøver i sekvensen analyseres med GC-MS i scan-mode.

Der bliver dannet et GC-MS kromatogram for hver prøve der er analyseret på GC-MS systemet. Første skridt i dataanalysen er at finde toppene i kromatogrammerne. Til dette arbejde bruges forskellige software programmer som f.eks. MassHunter, PARADISE og AMDIS. Nogle toppe indeholder massespekteret fra et stof, mens andre toppe indeholder spektre fra flere stoffer. Toppe indeholdende flere spektre vil blive opdelt, så en andel af toppen bliver parret med et spektrum. Ud fra toppenes og n-alkanernes retentionstider beregnes retentionsindeks for stofferne. Derudover søger man efter de fundne massespektre i databaser (f.eks. NIST20) med det formål at identificere stofferne.

Ved sammenligning af massespektre, retentionsindeks og evt. standarder (kendte stoffer) kan et stof identificeres med GC-MS. Kvaliteten af identifikationen kan inddeles i fire niveauer.

- Niveau 1 ID angiver, at stoffet er blevet bekræftet ved hjælp af en kommerciel eller anden verificeret standard.
- Niveau 2 ID svarer til en god formodning af stoffets identitet.
- Niveau 3 ID svarer til en formodning af stoffets identitet.
- Niveau 4 ID svarer til at stoffet betragtes som ukendt.

For yderligere detaljer se Tomas Diera et al., Water Research 229 (2023) 119480.

Dernæst findes arealerne af toppene i alle kromatogrammerne ved hjælp af software som MassHunter, PARADISE og Gavin. Toparealerne anvendes i den efterfølgende databehandling og validering.

Hvornår kan vi sige, at et stof kommer fra en vandprøve og ikke er del af baggrunden? Til dette formål har vi opsat en række kriterier:

1. Et stof skal forekomme i alle replikater af en vandprøve.

2. Toparealet af stoffet i de tre replikater skal være 10 gange større end toparealet i de blindprøver der blev taget samme dag.
3. Student's t-test skal give  $P < 0,05$  for toparealer af de replikate vandprøver i forhold til blindprøverne.

SIDE 4 AF 4

Hvis et stof opfylder alle tre kriterier antager vi, at stoffet stammer fra vandprøven. Kriterierne er sat højt for at minimere antallet af falske positive resultater. Omvendt betyder det også, at stoffer der ikke opfylder kriterierne kan stamme fra vandprøven.

Særligt kriterie 2 (10 fold større toppe af et stof i prøverne end i blindprøverne), er der ikke helt konsensus om, hvilken grænseværdier man skal bruge. Ofte anvendes 5 eller 10, i artiklen af Tomas Diera et al., *Water Research* 229 (2023) 119480, blev der brugt både 1,5 og 10 afhængigt af hvilket forsøg, der blev behandlet.