

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut

Gunnar Printsman

**Eesti põhjavee analüüsimine tundmatute ja kahtlusaluste
ühendite meetodil**

Magistritöö keemia õppekaval (30 EAP)

Juhendajad: Jaanus Liigand, MSc

Anneli Kruve, PhD

Tartu 2017

INFOLEHT / SHEET OF INFORMATION

Eesti põhjavee analüüs tundmatute ja kahtlusaluste ühendite meetodil

85% Eesti joogiveest saadakse põhjaveest, seetõttu on äärmiselt oluline, et põhjavee kvaliteet oleks teada. Kuna potentsiaalseid saasteained on palju, siis on üldise olukorra iseloomustamiseks vajalik uurida kõiki võimalikke saasteaineid. Üheks võimaluseks on kasutada tundmatute ja kahtlusaluste ühendite analüüsi meetodeid, mis põhinevad kõrge massilahutusega massispektromeetri kasutamisel. Antud töö üheks eesmärgiks oli välja töötada optimaalseim proovi eeltöötlusmeetod, mis võimaldaks määrata korraga palju erinevate omadustega saasteaineid. Parimad tulemused saavutati SPE Strata-X meetodiga. Eesti põhjavee analüüsimiseks valiti välja 16 seirekaevu. Pärast eeltöötlemist analüüsiti proove kõrge massitäpsuse ja kõrglahutusega massispektromeetriga (ESI FT-ICR MS). Saadud massispektrile viidi läbi kahtlusaluste ühendite analüüs kasutades autori koostatud saasteainete andmebaasi, mis sisaldas üle 1700 pestitsiidi, 1100 ravimi toimeaine ja üle 200 tööstusliku saasteaine. Selle tulemusena leiti ühest Ida-Viru proovist tööstuslik saasteaine dibutüülftaalat kontsentratsiooniga 3,9 ng/l. Dibutüülftaaladi esinemine proovis kinnitati standardainega. Tundmatute ühendite analüüsil avastati Saku vallast võetud põhjavee proovist tümool, mis on looduslikult esinev fenool. Selle esinemine proovis kinnitati standardaine analüüsiga. Lisaks kinnitatud ühenditele leiti üks võimalik ühend, karvakrool, mille esinemist ei olnud käesolevas töös võimalik kinnitada standardaine puudumise tõttu.

Märksõnad: Tundmatute ühendite analüüs; Kahtlusaluste ühendite analüüs; Põhjavesi; Saasteained; Dibutüülftaalat; Tümool; Karvakrool.

CERCS kood: P300 Analüütiline keemia

Screening of Estonian groundwater with non-target and suspect screening

85% of Estonian drinking water comes from the groundwater, therefore it is extremely important to ensure its high quality. As there are many potential contaminants, analysing as many as possible is necessary to obtain a realistic overview of the water quality. One option is to apply suspect and non-target screening with high-resolution mass spectrometry. One of the aims of this work was to find the most optimal sample preparation method, which would allow to determine various contaminants at once. The best results were obtained using Strata-X solid phase extraction method. 16 Estonian groundwater wells were chosen for the analysis. After sample preparation, samples were measured using ESI FT-ICR MS. Firstly, obtained mass spectrum was analysed using suspect screening technique, based on self-made contaminant database. The database contains over 1700 pesticides, 1100 pharmaceutical residues and 200 industrial pollutants. 52 potential contaminants were found, however, only one of them was later confirmed with reference standard. The confirmed contaminant was dibutyl phthalate (with approximate concentration level of 3.9 ng/l), found from the groundwater sample taken from the East-Viru county. Secondly, non-target screening was carried out. As a result, natural compound called thymol was discovered from the groundwater well in the Saku parish. Presence of thymol in the sample was confirmed with the reference standard. From the same sample, carvacrol was detected, however, it was not confirmed due to the reference standard being unavailable.

Keywords: Non-target screening; Suspect screening; Groundwater; Contaminants; Dibutyl phthalate; Thymol; Carvacrol.

CERCS code: P300 Analytical chemistry

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Põhjavee saastumine ja selle monitoorimine	6
1.1.1. Analüüsitüübid	7
1.2. Massispektromeetria	8
1.2.1. Massianalüsaatorid	8
1.2.2. Tandem-massispektromeetria	9
1.3. Massispektri piikide identifitseerimise usaldusväärsus	10
1.4. Töövoog	12
1.4.1. Veeproovi eeltöötlus	12
1.4.2. Proovide analüüsimine	12
1.4.3. Massispektri piikide töötlus	12
1.4.4. Teadaolevate ühendite analüüs	13
1.4.5. Kahtlusaluste ühendite analüüs	14
1.4.6. Tundmatute ühendite analüüs	15
2. MATERJALID, APARATUUR JA MEETODID	15
2.1. Kasutatud reaktiivid	16
2.2. Aparatuur	16
2.3. Lahuste valmistamine	16
2.4. Proovi eeltöötlus SPE meetodil	17
2.5. ESI FT-ICR MS parameetrid, mõõtmiste läbiviimine ja spektrite töötlus	17
2.6. Saasteainete andmebaas ja kahtlusaluste ühendite analüüs	18
2.7. Tundmatute ühendite analüüsi töövoog	18
2.8. Analüüsitavad põhjaveekogumid	18
3. TULEMUSED JA TULEMUSTE ARUTELU	19
3.1. Proovi eeltötluse optimeerimine	19
3.1. Kahtlusaluste ühendite analüüsi tulemused	23
3.1.1. Heksoprenaliin ja molindoon	23
3.1.2. Tilidiin ja selle metaboliidid	24
3.1.3. Dibutüülftalaat	25
3.2. Tundmatute ühendite analüüsi tulemused	28
3.2.1. C ₁₀ H ₁₄ O	29
3.2.2. C ₆ H ₁₂ N ₆ O	31
3.2.3. C ₆ H ₄ O ₂ S	32
3.3. Põhjavee elementanalüüs ICP-MS instrumendiga	33
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY	35
KASUTATUD KIRJANDUS	36
LISAD	41
Käesolevas töös seiratavate põhjaveekogumite asukohad	41
Proovide rikastamisel kasutatud pestitsiidide struktuurid	42
Massispektrid	47
Elementanalüüsi tulemused	49
Analüüsitüüpide skeem	50

KASUTATUD LÜHENDID

MS	massispektromeetria
ESI	elektropihustusionisatsioon
m/z	massi-laengu suhe
FT-ICR	Fourier` teisendusega ioontsüklotronresonants
ToF	lennuaja massianalüsaator (<i>Time of Flight</i>)
FWHM	piigi laius poolel piigi kõrgusel (<i>Full Width at Half Maximum</i>)
ppm	miljondikosa (<i>parts per million</i>)
ppb	miljardikosa (<i>parts per billion</i>)
MS/MS	tandem-massispektromeetria
HRMS	kõrglahutusega massispektromeetria (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
3Q	kolmekordne kvadрупool massianalüsaator
MeOH	metanool
MeCN	atsetonitril
ICP-MS	induktiivseotud plasma massispektromeetria
$\log P_{ov}$	oktanool/vesi jaotuskoefitsient
pK_a	negatiivne kümnendlogaritmiline happe dissotsiatsioonikonstant

SISSEJUHATUS

Eesti joogiveest 85% saadakse põhjaveest. Seetõttu on ülimalt oluline, et põhjavesi oleks kõrge kvaliteediga. Erinevate saasteainete sattumine põhjavette on kogu maailmas muutumas aina tõsisemaks probleemiks. Pidev kokkupuude saastatud põhjaveega võib kahjustada inimese tervist, näiteks mitmesugused raskmetallid võivad põhjustada vähki juba madalate kontsentratsioonide juures. Samuti on paljud saasteained (dioksiinid, pestitsiidid) elusorganismides akumulieruvad ja võivad pikaajalisel kokkupuutel põhjustada vähki, sünnidefekte, kahjustada närvi- ja immuunsussüsteemi.

Kuigi Eestis on turule lubatud 150 erinevat taimekaitsevahendit ja kasvuregulaatorit (seisuga 23.03.2016) [1], teostatakse regulaarset põhjaveest monitoorimist neist ainult 20-le ühendile. Ravimijääkide monitoorimine Eestis puudub. Seega, rutiinselt Eesti põhjavees monitooritavaid saasteaineid on vähe, mistõttu puudub ammendav informatsioon vee kvaliteedi kohta. Rutiinselt monitooritavate saasteainete hulga tõstmine on väga töömahukas ja kulukas, mistõttu tuleks otsida alternatiivseid võimalusi vee kvaliteedi hindamiseks. Tundmatute ja kahtlusaluste ühendite analüüsi meetodid on üheks potentsiaalseteks võimaluseks. Nimetatud meetoditega on võimalik proovides leiduvaid ühendeid identifitseerida ilma standardainete olemasoluta. Mõlema meetodi puhul kasutatakse kõrglahutusega massispektrometrilist analüüsi. Kahtlusaluste ühendite analüüsil lähtutakse võimalikust saasteainete nimekirjast, kuid tundmatute ühendite analüüsil uuritakse kõiki massispektris leiduvaid piike ja proovitakse neid identifitseerida.

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

1. leida optimaalseim veeproovi eeltöötamise meetod tundmatute ühendite analüüsimiseks;
2. välja töötada kahtlusaluste ühendite analüüsimeetod põhjavees leiduvate saasteainete määramiseks (andmebaas, töövoog);
3. välja töötada tundmatute ühendite analüüsimeetod määramaks põhjavees leiduvaid saasteaineid;
4. viia läbi Eesti põhjavee analüüs nimetatud meetoditel;
5. viia läbi andmetöötlus ja ühendite tuvastamine.

Töö eesmärgiks oleva tundmatute ühendite analüüsi läbiviimine on võimalik vaid kasutades kõrglahutusega massispektrometrit. Seetõttu on töö teostamine ainuvõimalik kasutades TÜ keemia instituudis olevat ioonsüklotronresonants massispektrometrit. Kahtlusaluste ühendite analüüsi teostamiseks koostatakse võimalike saasteainete andmebaas, kuhu lisatakse pestitsiidid, tööstuslikud saasteained (k.a elustiili ained) ja ravimid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Põhjavee saastumine ja selle monitoorimine

Põhjavesi on maailmas joogiveeks ligikaudu pooltele inimestele. Põhjavee ressursid on aga aina enam ohustatud erineva keemilise ja bioloogilise saastumise poolt [2,3]. Üha enam luuakse uusi sünteetilisi orgaanilisi ühendeid erinevate eesmärkide täitmiseks, olgu see siis uut sorti taimekaitsevahend, ravimipreparaat või detergent. Kuna saasteaineid kasutatakse väga laialdaselt, võivad mitmed püsivamad ühendid sattuda pinna- ja põhjavette. Põhilisteks reostuse põhjustajateks on tööstuslikud saasteained (erinevad lahendid, vaheproduktid, raskmetallid jpm), mitmed tarbekaubad (ravimijäägid, hormoonid, detergentid), biotsiidid (sh pestitsiidid) ning kõigi eelmainitud ühendite lagunemise produktid [3]. Maailma eri paigus läbi viidud uuringute tulemusena on põhjaveest leitud nii erinevaid ravimijääke [4], hormone [5], hulgaliselt pestitsiide [6–9] kui ka tööstuslikke saasteaineid [9].

Aastal 2014 OÜ Hartal Projekt poolt läbi viidud töö "Põhjaveekogumite seisundi hindamine" tulemusena leiti, et 40st Eesti põhjaveekogumist on halvas keemilises seisukorras 7 põhjaveekogumit Ida-Eestis, üks Lääne-Eestis, ohustatud seisukorras vastavalt kaks ja üks põhjaveekogumit. Põhiliseks halva keemilise seisundi põhjustajaks on naftasaadustest põhjustatud reostus, mis ületasid läviväärtust viies põhjaveekogumis, neljas põhjaveekogumis ületati läviväärtusi ühealuseliste fenoolidega, pestitsiidide piirväärtusi ületati kahes põhjaveekogumis. Rutiinselt seiratakse Eestis nitraaditundlikul alal sõltuvalt aastast umbes 50 kaevu kuni neli korda aastas, mille käigus määratakse 12ne pestitsiidi sisaldused. Nitraaditundliku ala aruandlusperioodil 2012-2015 on pestitsiide analüüsitud kokku 109 lävendist, pestitsiidide jääke leiti 38 seirepunktist, neist 24s ületas kontsentratsioon joogiveele kehtestatud piirväärtuse 0,1 µg/l [10].

Eesti Keskkonnauuringute Keskuse poolt 2015. a läbiviidud seire käigus avastati 33 põhjavee seirejaamast 28s herbitsiidi kloridasoon-desfenüül, neist 15 korral oli ühendi sisaldus üle lubatud piirnormi [11]. Ametlikel andmetel seda ainet Eestis ei kasutata¹ [1]. Põllumajandusuuringute Keskuse andmetel on hakanud suurenema mullas leiduvate fungitsiidide sisaldus, kusjuures jätkuvalt tuvastatakse selliseid pestitsiide, mida ammu enam ei kasutata. Näiteks avastatakse siamaani insektsiidi diklorotrifenüültrikloroetaani ning

¹ Kloridasoon-desfenüüli sisaldav preparaat on eriluba nõudvate taimekaitsevahendite loetelus, kuid ühelgi ettevõttel pole luba selle turustamiseks.

umbrõhutõrjevahendit trifluraliini, kusjuures mõlemad on Eestis keelatud juba aastast 1968 [11].

Võrreldes kasutatavate ohtlike ainete hulgaga on Eestis seiratavate ühendite hulk madal. Samas leitakse Euroopas pidevalt uusi saasteaineid. Näiteks leiti Saksamaal 2013. aastal läbiviidud uuringus põhjavee proovidest 12 ühendit (11 ravimit ja üks hügieenitarvete koostisosa), mida ei ole varem põhjaveest leitud [12].

Aastal 2012 Prantsusmaal läbiviidud ulatusliku põhjavee teadaolevate ühendite monitoorimise (411 saasteainet) käigus avastati, et seiratavast 494 kaevust ainult 13 ei sisaldanud ühtegi monitooritavat saasteainet. Valdav enamus detekteeritud saasteainetest olid herbitsiidid, retseptita kättesaadavad ravimid ja tööstuslikud saasteained (polüklooritud bifenüülid, dioksiinid, furaanid) [9].

1.1.1. Analüüsitüübid

Enimkasutatud analüüsitüübiks on teadaolevate ühendite analüüs (ingl k *target screening*), mis on mõeldud ühe või mitme kindla ühendi määramiseks teatud maatriksist. Seda meetodit kasutavad enamasti rutiinanalüüsilaborid, teostades selle abil regulaarseid monitooringuid erinevatele proovidele. Taolised meetodikad on enamasti valideeritud ja akrediteeritud ning nende läbiviimiseks on vajalik standardaine olemasolu. Sellest tulenevalt on määratavate ühendite hulk piiratud ning uutele ühenditele analüüsimetoodika väljatöötamine ajamahukas ja kallis. [13]

Kahtlusaliste ühendite analüüs (ingl k *suspect screening*) on meetod, kus kasutatakse kõrglahutusega massispektromeetrit ning saasteainete andmebaasi. Selle analüüsi korral monitooritakse proovist korraga kõiki saasteainete andmebaasis olevaid ühendeid, võimaldades saada informatsiooni seal leiduvate ühendite kohta. Analüüsi läbiviimiseks ei ole vajalik standardaine olemasolu (välja arvatud ühendi hilisemaks kinnitamiseks). Meetod on kiire ja kergesti läbiviidav, piiravaks asjaoluks on enamasti kõrglahutusega massispektromeetri olemasolu, mis võimaldaks saavutada piisava täpsusega m/z suhetega massispektreid. [13,14]

Tundmatute ühendite analüüsi (ingl k *non-target screening*) korral kasutatakse samuti kõrglahutusega massispektromeetrit. Erinevalt kahtlusaliste ühendite analüüsist, kus kasutati saasteainete andmebaasi, puuduvad siin kitsendused ühendite kohta, mida proovist otsitakse. Igat massispektri piiki analüüsitakse identifitseerimise eesmärgil individuaalselt. Standardaine olemasolu on vajalik hilisemaks ühendi kinnitamiseks. Taoline meetod on töömahukas, kuid samas annab põhjaliku ülevaate proovis leiduvatest ühenditest ilma igasuguse eelneva

informatsioonita. Piiravaks faktoriks on väheste ühendite fragmenteerimisspektrite olemasolu kirjanduses, mistõttu ei ole tihtipeale võimalik saavutada kõrgeid identifitseerimise usaldusväärsusi. [13] Analüüsitüüpide skeem on toodud lisas, joonisel S7.

1.2. Massispektromeetria

Massispektromeetria on analüütilise keemia meetod, mille käigus ioonid eraldatakse nende massi-laengu suhete alusel (m/z) elektri- ja/või magnetväljas. Massi (m) väljendatakse aatommassi ühikutes ehk Daltonites ning laengutiooni elementaarlaengute arvuna (z) [15]. Massispektromeetria protseduur koosneb kolmest põhietapist [16]:

- 1) proov kas aurustatakse või pihustatakse aerosooliks ning seejärel ioniseeritakse ioonallikas (näiteks elektropihustusionisatsiooniga (ESI), maatriks assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsiooniga (MALDI) vms);
- 2) ioniseeritud osakesed juhitakseioonoptika abil massianalüsaatorisse (näiteks ICR-MS, QToF), kus toimubioonide eraldamine nende m/z suhte alusel;
- 3) massianalüsaatorist juhitakse eraldatud ioonid edasi detektorisse, kus toimub osakeste arvu registreerimine, ning saadud tulemuste alusel genereerib arvuti massispektri.²

1.2.1. Massianalüsaatorid

Massianalüsaatoreid on erinevaid, kuid kõik kasutavad ioonide juhtimiseks ja eraldamiseks magnet- ja/või elektrivälja. Kaks tähtsamat massianalüsaatorite töö kvaliteeti kirjeldavat parameetrit on lahutusvõime ja massitäpsus.

- 1) Resolutsioon ehk lahutusvõime näitab, kui hästi on analüsaator võimeline eraldama lähedaste massidega ühendeid. Lahutusvõime järgi liigitatakse massianalüsaatoreid kaheks: madala (FWHM $<10^3$) ja kõrge (FWHM $>10^3$) lahutusvõimega massianalüsaatorid [17,18].
- 2) Massitäpsus iseloomustab ühendi m/z mõõtmise vea ja tõelise m/z suhet (mõõtmisviga / tõeline m/z). Headel massianalüsaatoritel on massitäpsus ppm skaalas [19].

Tabelis 1 on toodud erinevate massianalüsaatorite tähtsamate parameetrite ja võimaluste võrdlused.

² ICR-MS instrumendil puudub eraldiseisev detektor, massianalüsaator käitub ka detektorina.

Lihtsaks madala lahutusega massianalüsaatoriks on kvadрупool-massianalüsaator, mis koosneb neljast ringikujuliselt paigutatud elektroodivardast, millest kaks on positiivselt ja kaks negatiivselt laetud. Varraste vahele on rakendatud vahelduvvool. Teatud voolutugevuste juures pääseb varraste vahelt läbi ainult kindla m/z suhtega osake. Taoline analüsaator on suhteliselt madala massitäpsusega. [16]

Üheks populaarseimaks massianalüsaatoriks on lennuajamassianalüsaator (ToF), kus analüüsi alguses on ioonid tihedalt koos väikeses ruumalas ning ionide taga olevasse elektroodi tekitatakse ionidega samamärgiline laeng. Tõukumise printsiibi tõttu hakkavad ioonid elektroodist eemalduma – mida kergem ioon, seda kiiremini see liigub ning seda kiiremini jõuab detektorisse. Taolistel analüsaatoritel on kõrge massitäpsus ning lahutusvõime³. [16]

Ioonsüklotronresonants-massianalüsaator on üks kõrgeima lahutusvõimega massianalüsaatoreid. Ioonid suletakse tugeva magnetvälja mõjualasse (kuni 21 Teslat), kus nad tiirlevad tänu magnet- ja elektriväljale nende m/z suhtele omase sagedusega. Koherentselt liikuvad ioonid tekitavad kahe detektorplaadi vahele sinusoidselt muutuva potentsiaalide erinevuse, mida registreeritakse. Mida suurem on muutuse amplituud, seda rohkem on sellele vastava m/z suhtega ioone grupis. [20] Kuna igat iooni poolt tekitatud elektrilist signaali registreeritakse rohkem kui korra, on sellise massianalüsaatori lahutusvõime kõrge ja massitäpsus hea. [21]

Tabel 1. Erinevate massianalüsaatorite võrdlus. [16,22–24]

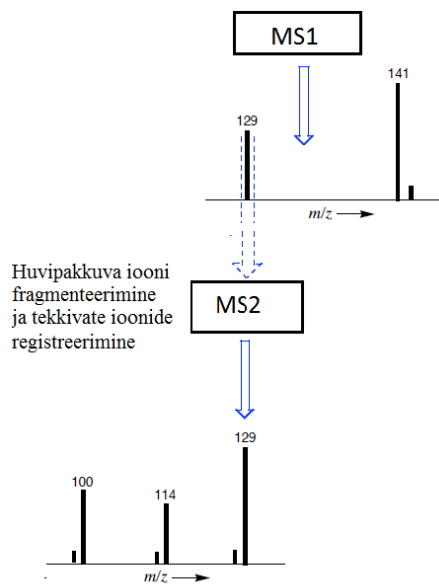
Massianalüsaator	Lahutusvõime (FWHM)·10 ³	Massitäpsus (ppm)	Detekteeritav massivahemik (m/z)	MS ⁿ võimalus?
Kvadрупool	1-10	100	50...4000	3Q korral jah
ToF	10-20	2-40	50...100 000	Ainult hübriidsüsteemidel
Orbitrap	100-200	2-5	40...5000	Ainult hübriidsüsteemidel
ICR	≤1000	<1	50...5000	Jah

1.2.2. Tandem-massispektromeetria

Tandem-massispektromeetria ehk MS/MS on massispektromeetria eriliik, kus on mitu massianalüsaatorit omavahel kombineeritud (ioonlõksu ja ICR korral pole mitut analüsaatorit vaja). Esimeses etapis eraldatakse ionisatsioonil tekkivad ioonid nende m/z suhete järgi (MS¹).

³ Massitäpsus sõltub kõigi instrumentide puhul lisaks massianalüsaatorile ka massitelje kalibreerimisest.

Seejärel valitakse välja huvipakkuvad ioonid, mida hakatakse fragmenteerima. Fragmenteerimiseks kasutatakse näiteks ionide kokkupõrgatamist neutraalse gaasiga (enamasti heelium, lämmastik, argoon), mille tulemusel ionides nõrgemad sidemed katkevad ning tekivad karakteristikud fragmendid. Mida suurem on põrkeenergia, mis iseloomustab ionidele antavat kineetilist energiat, seda rohkem erinevaid fragmente tekib. Saadud fragmendid eraldatakse m/z suhete järgi ning nende detekteerimisel saadakse MS² ehk MS/MS spekter. Taolist ionide selekteerimist ja fragmenteerimist saab ionide piisava intensiivsuse korral korrata mitu korda (MSⁿ). [25]



Joonis 1. Tandem-massispektromeetria põhimõtteskeem.

1.3. Massispektri piikide identifitseerimise usaldusväärsus

Kõrglahutusega massispektromeetri (edaspidi HRMS) osatähtsus keemilisel analüüsil kasvab pidevalt. HRMS võimaldab läbi viia erinevate looduslike proovide keemilist analüüsi ja komponentide identifitseerimist. HRMS-ga on võimalik tuvastada looduses esinevaid saasteaineid ja nende laguprodukte. [26]

Probleemiks on identifitseerimisel saadud tulemuste usaldusväärsus, sest alati ei ole võimalik saadud tulemusi standardainega kontrollida. Seetõttu on vaja ühtset süsteemi, millega määratleda identifitseerimise usaldusväärsust, et kõigile aruannete ja artiklite lugejatele oleks ühiselt mõistetav, kui usaldusväärsed on esitatud tulemused. Kõige enam kasutatakse usaldusväärsuse mõõdupuuna Schymanski tasemeid, mille korral on identifitseerimisel sõltuvalt olemasolevast infost erinev usaldusväärsuse tase (tabel 2). Kokku klassifitseeritakse viis erinevat taset [27]:

Tase 5 – on teada molekuli m/z suhe, kuid vähese informatsiooni tõttu pole võimalik sellele molekulvalemit omistada. On võimalik läbi viia ka MS/MS ionide fragmenteerimine, aga ka sealt saadud piigid jäävad tundmatuks.

Tase 4 – kasutades spektritest saadavat informatsiooni (täpne m/z suhe, isotoopjooned, aduktid), on võimalik m/z suhtele omistada molekuli brutovalem. Siiski puudub piisav informatsioon, et omistada brutovalemile kindel struktuur.

Tase 3 – olukord, kus olemasolevate andmete põhjal (MS, MS/MS, eksperimentaalsed andmed) on võimalik brutovalemile omistada potentsiaalsed struktuurid. Siiski pole võimalik ühte kindlat struktuuri välja valida, sest võivad eksisteerida erinevad struktuuriisomeerid, seega tulemuseks on nn esialgne struktuur.

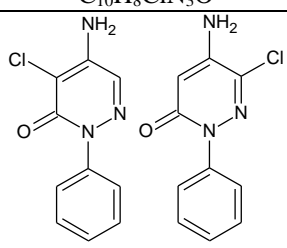
Tase 2 – ehk molekuli brutovalemile omistatakse nõ võimalik struktuur. See tase jagatakse omakorda kaheks:

2a) andmebaasil põhinev, kus kasutatakse kirjanduse ja andmebaaside spektrite kogumeid. Taseme 2a jaoks peab mõõdetud massispekter sobima mõõtmiste usaldusväärsuse piires kirjandusest saadud spektriga. Seejuures tuleb jälgida ka mõõtmisparameetrite sarnasust, sest näiteks erinevad fragmenteerimisel kasutatavad pörkeenergiad võivad anda erinevaid laguprodukte.

2b) olukord, kus ainult üks struktuur sobib väga hästi eksperimentaalsete tulemustega, kuid puudub võimalus seda kontrollida standardainega.

Tase 1 – ehk tegemist on kinnitatud struktuuriga. Ideaalne olukord, kus nn võimalik struktuur on tõestatud standardaine ja proovist saadud spektrite võrdlemisel. Võimalusel kontrollitakse saadud tulemusi ka mõne alternatiivse meetodiga (tuumamagnetresonants, UV-spektroskoopia vms). Piikide analüüsil on enamasti eesmärgiks saavutada identifitseerimise usaldusväärsuse tase 1.

Tabel 2. Identifitseerimise usaldusväärsused koos minimaalse vajaliku info ja näidetega [27].

Identifitseerimise usaldusväärsus	Minimaalne vajalik info	Näide
Tase 5	Täpne massilaengu suhe (MS)	221,03559
Tase 4	MS, isotoopjooned	$C_{10}H_8ClN_3O$
Tase 3	MS, MS/MS, eksperimentaalsed andmed	
Tase 2	a) MS, MS/MS, kirjanduse andmed b) MS, MS/MS, eksperimentaalsed andmed	Üks kindel struktuur
Tase 1	MS, MS/MS, referentsaine olemasolu ja selle massispektri piigid	

1.4. Töövoog

1.4.1. Veeproovi eeltöötlus

Saasteainete kontsentratsioonid põhja- ja pinnavees on tihti nii madalad, et neid ei ole võimalik otse analüütiliste meetoditega määrata. Seetõttu on vajalik proovi eeltöötlemine, mille eesmärgiks on proovis leiduvate saasteainete kontsentreerimine ja mittesooitud ühenditest puhastamine (anorgaanilised soolad, huumushapped jpm). Veeproovide korral kasutatakse enim tahke faasi ekstraktsiooni. [28–33] See on proovi eeltöötamise meetod, kus vedelikus lahustunud ained eraldatakse üksteisest lähtuvalt nende füüsikalistest ja keemilistest omadustest (polaarsus, hüdrofoobsus, suurus). [34] Veeproov juhitakse läbi tahke sorbendi, mille külge seostuvad olenevalt sorbendi tüübist kindlate omadustega ühendid ning ülejäänud proovis leiduvad ühendid lähevad sorbendist läbi. Peamisteks seostumise mehhanismideks on van der Waalsi jõud (mitte-polaarsed interaktsioonid), vesiniksidemete teke, dipool-dipool jõud (polaarsed interaktsioonid) ja katioon-anioon vastastikmõju. Hiljem on võimalik tahke faasiga interakteerunud molekulid eraldada elueerimise teel. [35] Tundmatute ühendite analüüsi seisukohalt on äärmiselt vajalik leida universaalne sorbent, millega saaks ekstraheerida võimalikult palju erinevaid saasteaineid. Seega peaks sorbent olema sobilik võimalikult erinevate omadustega ühendite jaoks (polaarne, mittepolaarne, happelisus jm).

1.4.2. Proovide analüüsimine

Veeproovide analüüsil kasutatakse kõige rohkem vedelikkromatograafiat, lenduvate ühendite korral ka gaasikromatograafiat, mis enamasti on ühendatud kvadrupool või ToF massianalüsaatoritega. [8,32,36] Harvematel juhtudel leiab massianalüsaatorina kasutust ka Orbitrap [37,38]. FT-ICR MS on võrreldes eelnevalt nimetatud massianalüsaatoritest haruldasem, mis võib olla üheks põhjuseks, miks pole kirjanduses teateid antud massianalüsaatoriga teostatud veeproovide analüüsides. Analüütide ioniseerimiseks kasutatakse peaaegu alati elektropihustusionisatsiooni. [7,8,34,35] Registreeritakse ühelaengulisi analüüdi ioone ning uuritav m/z vahemik jääb 100-600 Daltoni vahele, sest see katab suurema osa saasteainete molekulmassidest.

1.4.3. Massispektri piikide töötlus

Pärast proovi analüüsi kõrglahustusega massispektrometriga on vajalik saadud massispektri töötlemine. Esmalt viiakse läbi massitelje kalibreerimine. Selleks kasutatakse kalibrante, mis lisatakse enne analüüsi proovile. Kalibrantide teoreetilise m/z suhte järgi kalibreeritakse ülejäänud proovi piikide m/z suhted. [39] Seejärel võrreldakse proovi

massispektrit tühiproovi massispektriga. Kattuvad piigid on ebavajalikud ja need eemaldatakse uuritavate piikide hulgast⁴. [40] Järgnevalt eemaldatakse müra tingitud piigid. Üks võimalus müra piike tuvastada on proovi analüüsimisel läbi viia kolm korduskatset ning seejärel võrrelda saadud massispektri piike. Alles tuleks jätta ainult need piigid, mis esinevad vähemalt kahel mõõtmisel kolmest. [41] Keerukamate maatriksite korral võib pärast eelnevalt kirjeldatud etappe alles olla ikka üle 1000 piigi (näiteks pinnavee ja heitvee korral). Seetõttu jäetakse tihti alles ainult intensiivsemad piigid (näiteks need, mille signaal-müra suhe on üle 10ne), millele on võimalik läbi viia ka fragmenteerimine. [42]

1.4.4. Teadaolevate ühendite analüüs

Esimeses lähenduses kasutatakse spektrite analüüsimisel teadaolevate ühendite meetodit. Selle meetodi jaoks on vajalik standardainete ja nende põhjal loodud andmebaasi olemasolu, enamasti ka valideeritud meetodika olemasolu. Tihti on taoline mõõtmismeetod kasutusel rutiinanalüüsi meetodina ja seda on võimalik automatiseerida. [43] Andmebaas peaks sisaldama standardaine MS ja selle peamisi MS/MS piike. Standardaine piigid peaksid olema leitud sama instrumendiga, millega viiakse läbi proovide analüüsid, sest erinevate masinatega saadud massispektrite piigid ei pruugi olla omavahel identsed. Näiteks kasutades erinevaid põrkeenergiaid, tekib kõrgematel energiatel rohkem erinevaid fragmente. [44] Proovi massispektrist otsitakse ainult teadaolevate ühendite andmebaasis olevate ühendite m/z suhteid, nende isotoopmustreid, retentsiooniaegu (LC-MS ja GC-MS korral) ja MS/MS fragmente. Proovis leiduvate saasteainete kvantiseerimiseks kasutatakse maatriksvastavat kalibreerimisgraafiku meetodit. [45] Teiseks variandiks on pool-kvantitatiivne määramine, kus leitakse analüüdi kontsentratsioon kalibrandi suhtes. See meetod põhineb valemil:

$$RIE(K, A) = \frac{IE(K)}{IE(A)} = \frac{C_A R_K}{C_K R_A}, \text{ kust avaldub } C_A = \frac{IE(K) \times C_K \times R_A}{IE(A) \times R_K},$$

kus K on kalibrant, A analüüt, IE ionisatsiooniefektiivsus, C kontsentratsioon, R MS spektri piigi intensiivsus ning RIE kalibrandi ja analüüdi suhteline ionisatsiooniefektiivsus. Kui on teada, mis ainega on tegemist, on võimalik ennustada selle aine ionisatsiooniefektiivsus ja seejärel kasutada saadud ionisatsiooniefektiivsust analüüdi kontsentratsiooni arvutamisel. [46]

⁴ Käesolevas töös loetakse piigid kattuvateks kui nende m/z suhted erinevad vähem kui ± 2 ppm võrra.

1.4.5. Kahtlusaluste ühendite analüüs

Kahtlusaluste ühendite monitoorimise aluseks on nn kahtlusaluste saasteainete nimekiri, mis enamasti koostatakse tuginedes kirjandusele. Sinna nimekirja võetakse ühendid, mis leiavad kasutust või mida on eelnevalt looduslikest proovidest leitud. Nendele ühenditele arvutatakse $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ ja $[M + NH_4]^+$ vormidele vastavad isotopoloogilised massid. [42] Saadud andmebaasis olevate ühendite masse otsitakse proovide massispektritest. Lisaks andmebaasile on kahtlusaluste ühendite identifitseerimisel olulisel kohal laguproduktide ennustamise võimalus. Loodusesse sattunud saasteained sageli lagunevad erinevate väliste mõjude tõttu. Kui tihti arvatakse, et transformatsiooniproduktid pole enam nii ohtlikud, kui lähtemolekulid, siis vahel võivad tekkivad produktid olla isegi mürgisemad võrreldes algmolekuliga. [47–49] Esineb ka võimalus, et lähtemolekul pole stabiilne ning laguneb keskkonda sattudes koheselt. Seega on tähtis, et lisaks saasteainele oleks võimalik monitoorida ka laguprodukte. [50] Selleks kasutatakse erinevaid *in-silico* programme, mis tuginedes lähtemolekuli struktuurile ennustavad võimalikke tekkivaid laguprodukte. Taolisi programme on mitmeid (MetFrag [51], EAWAG Pathway Prediction System [52], MAGMa [53] jm). Olenevalt sellest, kas laguproduktideks on metabolismi käigus tekkivad metaboliidid, transformatsiooni- või fotodegradatsiooniproduktid, tuleb ennustamiseks valida sobiv programm. [40] Tihti pole kahtlusaluste ühendite analüüsi tulemusel leitud molekule võimalik standardainega kontrollida, sest mitmesugused laguproduktide standardained ei ole kommertsiaalselt saadaval. Molekuli reaalses esinemises proovis on võimalik toetada (või ümber lükata) mitmesuguste tõenditega [42]:

- 1) esineb kindla $\Delta m/z$ homoloogiline rida;
- 2) kromatograafiliste analüüside korral saab kasutada molekuli retentsiooniaja ennustamist ja kontrollida selle sobivust tegeliku olukorraga⁵;
- 3) isotooppiikide olemasolu;
- 4) lähtemolekuli ja selle isotooppiigi intensiivsuste suhte sobivus;
- 5) MS/MS spektrite kattumine.

Kriteeriumite täitmisest sõltub, mis usaldusväärsustaseme antud molekul saab. Kui kõik tingimused on täidetud ning ainult standardainega kontrollimine on puudu, on usaldusväärsus tasemeks tase 2 ehk võimalik molekuli struktuur. [27]

⁵ Retentsiooniaegade mittedobivus ei ole kindel tõend, et tegu pole õige ainega. Retentsiooniaeg sõltub paljudest teguritest (näiteks kolonni pikkus, voolukiirus, solvendi valik, pH).

1.4.6. Tundmatute ühendite analüüs

Tundmatute ühendite analüüs viiakse enamasti läbi kõige viimase etapina ning selle eesmärgiks on identifitseerida seni tuvastamata jäänud piike. Igasugune eelnev info komponentide kohta puudub ning saasteainete tuvastamiseks on ainult massispekter koos täpsete massi-laengu suhetega (usaldusväarsuse tase 5). Esimese asjana tuleks huvi pakkuva piigi m/z leida sellele vastav molekuli brutovalem. Selleks saab kasutada erinevaid programme ja reegleid. Üheks enimkasutatavaimaks heuristiliseks filtriiks on seitse kuldset reeglit (ingl *seven golden rules*). See on seitsmest reeglist tuletatud algoritm, millega on võimalik filtreerida välja kõige sobivamad brutovalemid (usaldusväarsuse tase 4). Algoritm võtab arvesse kasutaja poolt välja valitud elemente, mis võivad ühendis olla; okteti reeglit; isotoopmustreid; realistlike vesinik süsinik suhteid; lämmastiku, hapniku, fosfori ja väävli suhet võrreldes süsinikuga; elementide suhte tõenäosusest ja trimetüülsilüülühendite esinemist.

Reeglitele lähtuvalt omistatakse brutovalemitele skoorid ning tulemustest eemaldatakse ühendid, mida avalikes keemia andmebaasides (Chemspider, PubChem) ei leidu. [54] Kõige kõrgemate skooridega brutovalemitele otsitakse andmebaasist nende vastavad struktuurid. Viiakse läbi tundmatu ühendi fragmenteerimine ning saadud spektrit võrreldakse kirjandusest saadava spektriga. Lõpliku tuvastamise teeb sageli keeruliseks võimalike struktuuriisomeeride paljusus. Mida suurem on molekuli mass, seda rohkem on erinevaid struktuuriisomeeride variante (usaldusväarsuse tase 3). Näiteks on dekaanil ($C_{10}H_{22}$) 75 erinevat struktuuriisomeeri. [55] Et teha õige valik mitmete isomeeride hulgast, kasutatakse tihti kirjanduse andmeid – vaadeldakse, millised on kasutusala erinevatel isomeeridel ning kas eelnevalt on kuskilt loodusest neid avastatud (usaldusväarsuse tase 2). Standardaine olemasolul tehakse viimases etapis standardaine mõõtmine ning võrreldakse saadud piike proovist leitud piikidega. Kui need kattuvad, saavutatakse usaldusväarsuse tase 1. [27]

2. MATERJALID, APARATUUR JA MEETODID

2.1. Kasutatud reaktiivid

Proovi eeltöötlusteks kasutati ülipuhast vett (eritakistus 18,2 M Ω ·cm, summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus <6 mg/kg), atsetonitriili (MeCN) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 99,9\%$), metanooli (MeOH) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 99,9\%$), sipelghapet (HCOOH) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 98\%$), etüülatsetaati (C₄H₈O₂) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 99,9\%$), diklorometaani (CH₂Cl₂) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 99,9\%$), isopropanooli (C₃H₇OH) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 99,9\%$). Proovide kokkuaurutamiseks kasutati gaasilist lämmastiku (N₂, hapniku sisaldus <3 ppm).

Kasutatud kalibrantide ja pestitsiidide struktuurvalemid on toodud lisas, proovide rikastamisel kasutatud pestitsiidide struktuuride peatükis. Kõik pestitsiidide standardained pärinesid Dr. Ehrenstorfer GmbH-st (Saksamaa, puhtused vähemalt $\geq 95\%$). Kasutatavateks kalibrantideks olid tetrametüülammooniumkloriid (C₄H₁₂NCl) (Fluka, puhtus ≥ 98), kinoliin (C₉H₇N) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 99,9\%$), tetrabutüülammooniumjodiid (C₁₆H₃₇NI) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 98\%$), kiniin (C₂₀H₂₄N₂O₂) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 90\%$), N-bensüülkinkoniidiumkloriid (C₂₆H₂₉N₂OCl) (Sigma-Aldrich, puhtus ≥ 98), 4-(2-(4-nitrofenüül)diasenüül)-N-(trifenüülfosfanülideen)-benseenamiin (C₃₀H₂₃N₄PO₂) (sünteesinud ja puhastanud Sigrid Selberg), trifenüülamiin ((C₆H₅)₃N) (Sigma-Aldrich, puhtus $\geq 98\%$).

2.2. Aparatuur

Proovide analüüsimiseks kasutati hübriidinstrumenti Varian 910-FT-ICR-MS kombineerituna Varian J-320 3Q massispektromeetriga (Varian, Inc, USA). Kasutati ESI ionisatsiooniallikat. Proovide infuseerimiseks ionisatsiooniallikasse kasutati 1 ml süstalt firmalt Agilent. Proovide fragmenteerimiseks ja standardainega kinnitamiseks kasutati Agilent 6495 3Q LC-MS instrumenti (Agilent Technologies, USA).

2.3. Lahuste valmistamine

Pestitsiidide emalahused tehti standardainest kaalumise teel MeCN solvendis. Emalahustest valmistati pestitsiidide segulahus pipeteerimise teel. Lahuseid säilitati -20 °C juures. Pestitsiididega rikastatud veeproovid valmistati pestitsiidide segulahusest ja kraaniveest. Kalibreerimislahus valmistati kalibrantide standardainetest kaalumise teel. Proovid lahustati MeCN-s. Eeltöödeldud proovidele lisati 100 μ l kalibreerimislahust.

2.4. Proovi eeltöötlus SPE meetodil

Veeproovide eeltöötluks kasutati Strata-X polümeerset 220 mg/3 ml (Phenomenex, USA) SPE kolonni. Töödeldava veeproovi algruumala oli 1 l. Ekstraktsioonil kasutatava vaakumkollektori rõhk hoiti 15 mbari juures. Kolonni konditsioneerimiseks lasti sellest läbi 5 ml MeOH ja 5 ml MilliQ vett. Seejärel juhiti kolonnist läbi veeproov kiirusel 5 ml/min. Elueerimiseks juhiti kolonnist läbi 3x2,5 ml MeCN ning eluent koguti 15 ml tsentrifuugituubi. Eluendi kokkuaurutamine viidi läbi vesivannil 50 °C juures lämmastikuvoolus. Kokkuaurutatud proov lahustati 0,9 ml 80/20 MeCN/H₂O (0,1% sipelghape) ning 0,1 ml kalibreerimislahuses.

2.5. ESI FT-ICR MS parameetrid, mõõtmiste läbiviimine ja spektrite töötlus

ESI allika kuivatusgaasiks kasutati lämmastikku temperatuuril 300 °C ja rõhul 18 psi (124 kPa). Pihusti (ingl k *needle*) otsale rakendatud pinge hoiti 5 kV juures, nõela ümber olevale raamile (ingl k *shield*) rakendatud pinge oli 600 V. Pihustusgaasi rõhk hoiti 40 psi (276 kPa) juures. Töötati positiivses režiimis. Proovi pihustati ionisatsiooniallikasse kiirusel 10 µl/min. Massispektromeetri parameetreid optimeeriti vastavalt mõõdetavatele m/z vahemikele (100-200; 190-400; 300-550) ja proovis sisalduvate ühendite hulga, reguleeriti: ionide kogumise aega heksapooli rakku: 800-2500 ms (ingl k *Hexapole Exit*); aega, mille jooksul ionid pääsevad heksapoolist ICR mõõterakku: 2,9 – 3,1 ms; m/z ergastamisvahemikku vastavalt mõõdetavatele m/z vahemikele (ingl k *Arb waveform*); ICR raku löksustusrõngaste pinget 0,2 – 0,8 V (ingl k *Inner Rings*).

ICR instrumendi juhtimiseks ja spektrite skaneerimiseks kasutati Varian Omega ver 9.0 (beta) tarkvara. Massitelje kalibreerimiseks kasutati sisekalibrante, mida enne mõõtmist oli proovile lisatud. Proovi spekter saadi 20 skaneerimise keskmistamisel. Kalibreeritud massiteljega spektrid salvestati. Iga m/z vahemiku jaoks tehti kolm kordusmõõtmist.

Saadud proovi massispektri piikidest jäeti alles ainult need piigid, mis esinesid vähemalt kahel korral kolmest. Lisaks eemaldati kõik piigid, mille signaal-müra suhe oli alla 10ne. Viimase etapina eemaldati proovi piikidest need piigid, mis esinesid ka tühiproovi massispektris.

Pärast piikide töötlust allesjäänud huvipakkuvate piikidega viidi läbi MS/MS analüüs. Algselt plaanitud ICR-MS instrumendiga fragmenteerimist ei olnud võimalik kasutada, sest veeproovides leiduvate ühendite kontsentratsioonid olid selleks liiga madalad. Seetõttu kasutati fragmenteerimiseks Agilent 6495 3Q instrumenti, millega saadi ainult nominaalmassi täpsusega informatsiooni. Fragmenteerimisel varieeriti põrgatusenergia vahemikku (5...45V).

2.6. Saasteainete andmebaas ja kahtlusaluste ühendite analüüs

Massispektrite efektiivsemaks ja kiiremaks analüüsiks koostati saasteainete andmebaas, mis sisaldas 1700 erinevat pestitsiidi, 200 tööstusliku saasteainet ning 1150 ravimi toimeainet. Andmebaas on koostatud lähtudes varem kirjanduses analüüsitud ühenditest [9,12,56], EU ja USA saasteainete nimekirjast [57,58] ning erinevatest nimekirjadest [59,60]. Kasutati andmetöötlusprogrammi Excel 2016. Andmebaas sisaldas ühendite nimetusi, brutovalemeid ja täpseid molekulmasse. Andmebaas on leitav leheküljelt <http://analytical.chem.ut.ee/databases/contaminants/>.

Kahtlusaluste ühendite analüüsil kopeeritakse saasteainete andmebaasi proovi analüüsil saadud massispektri piikide m/z väärtused. Kopeeritud m/z väärtustele otsib andmebaas saasteainete hulgast kõige ligilähedasemad vasted, võttes arvesse nii $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ kui ka $[M + NH_4]^+$ aduktioonide esinemise võimalust. Leitud vastetele arvutab andmebaas, kui palju erineb reaalse saasteaine molekulmass massispektrist saadud massist. Kui erinevus on vähem kui ± 2 ppm-i, värvub saadud lahter punaseks ning taoline piik muutub kahtlusaluseks saasteaineks. Seejärel viiakse läbi isotoopmustrite kontroll ning ühendi fragmenteerimine. Kahtlusalusele ühendile otsitakse kirjandusest MS/MS spektrid, mida võrreldakse fragmenteerimisel saadud spektriga. Võimalusel kontrollitakse saadud saasteainete reaalses proovis esinemist standardainega LC-MS instrumendil.

2.7. Tundmatute ühendite analüüsi töövoog

Pärast andmebaasiga töötamist jäi suur hulk massispektri piike endiselt tuvastamata. Kasutades seitsme kuldse reegli algoritmi, leiti tundmatutele piikidele potentsiaalsed brutovaleimid, võttes arvesse isotoopmustrite kattuvust. Seejärel vaadeldi Chemspiderist vastavatele brutovaleemitele sobivaid struktuurvalemeid. Sarnaselt kahtlusaluste ühendite analüüsile otsiti ka siin kirjandusest struktuurvaleemitele MS/MS spektreid ning võrreldi neid mõõtmisel saadud MS/MS spektriga. Standardainega potentsiaalsete saasteainete esinemist kontrollides oli võimalik saavutada usaldusväärsustase 1.

2.8. Analüüsitavad põhjaveekogumid

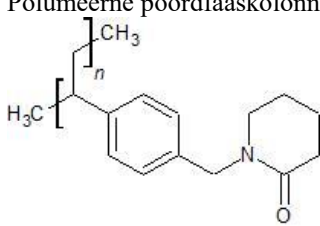
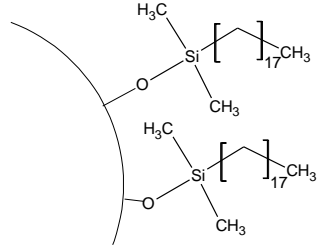
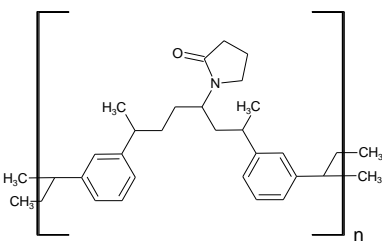
Kõik põhjavee proovid (16) võeti Eesti Geoloogiakeskuse poolt vahemikus oktoober – november 2016. Proovid võeti 2 l polüpropüleenist plastpudelitesse (Sigma-Aldrich) ning hoiustati -20 °C juures kuni analüüsamiseni. Analüüsitavate põhjaveekogumite asukohad on toodud lisas, joonisel S1 ja tabelis S1.

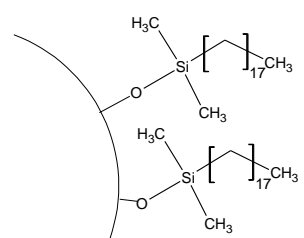
3. TULEMUSED JA TULEMUSTE ARUTELU

3.1. Proovi eeltötluse optimeerimine

Veeproovi puhastamiseks ja saasteainete kontsentreerimiseks on vajalik selle eeltötlumine. Töötlemiseks kasutati tahke faasi ekstraktsiooni meetodit. Et ekstraktsiooni käigus kõrvaldada proovist segavad ained nii, et samal ajal jääks alles võimalikult palju saasteaineid, on vajalik leida optimaalsed tahke faasi ekstraktsiooni tingimused (SPE sorbendi tüüp, ekstraheeriv solvent, töödeldava proovi ruumala). Kasutatav tahke faas peab olema võimalikult universaalne ehk peaks interakteeruma nii polaarsete kui ka vähepolaarsete ühenditega. Kirjandusele tuginedes katsetati nelja erinevat SPE meetodit, mis on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Proovi eeltötluseks kasutatud SPE meetodite kirjeldused.

SPE kolonni nimi (sorbendi mass)	SPE kolonni tüüp	Meetodi kirjeldus
Strata-X (200 mg) [61]	Polümeerne pöördfaaskolonn 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Kolonni konditsioneerimine 5 ml MeOH, 5 ml MilliQ vesi; 2) veeproovi viimine SPE kolonni 5 ml/min; 3) elueerimine 3x2,5 ml MeCN; 4) ekstrakti kokkuaurutamine 35 °C juures; 5) proovi lahustamine 0,9 ml 80/20 MeCN/H₂O (0,1% HCOOH).
ZORBAX C-18 (I) (200 mg) [62]	Oktadetsüülsilaanil põhinev pöördfaaskolonn 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Kolonni konditsioneerimine 2 ml etüülatsetaati, 2 ml MeOH, 7 ml MilliQ vett; 2) veeproovi viimine SPE kolonni 5 ml/min; 3) kuivatamine vaakumiga 20 min; 4) elueerimine 0,9 ml etüülatsetaadiga.
Oasis HLB (200 mg) [8]	Polümeerne hüdrofiilse-lipofiilse tasakaaluga pöördfaaskolonn 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Konditsioneerimine 5 ml diklorometaan-metanool seguga (50/50), 10 ml MilliQ; 2) veeproovi viimine SPE kolonni 5 ml/min; 3) kuivatamine vaakumiga 10 min; 4) elueerimine 10 ml diklorometaan-metanooli seguga (50/50); 5) ekstrakti kokkuaurutamine lämmastikuga 45 °C juures; 6) proovi lahustamine 0,9 ml MeOH.

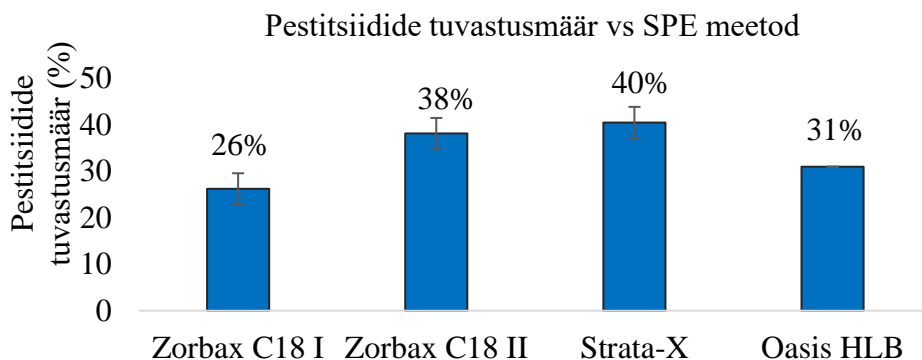
<p>ZORBAX C-18 (II) (200 mg) [63]</p>	<p>Oktadetsüülsilaanil põhinev pöördfaaskolonn</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Konditsioneerimine 2,5 ml MeOH, 2,5 ml MilliQ 2) veeproovi viimine läbi SPE kolonni 5 ml/min; 3) kolonni pesemine 2,5 ml MilliQ; 4) elueerimine 5 ml MeOH, 2,5 ml isopropanooliga; 5) ekstrakti kokkuaurutamine lämmastikuga 45 °C; 6) proovi lahustamine 0,9 ml MeCN/0,1% HCOOH.
---	--	---

Sobivaima SPE meetodi leidmiseks valmistati neli 50 ml vesilahust, mis sisaldasid 41 erinevat pestitsiidi. Pestitsiidid valiti selliselt, et esindatud oleksid võimalikult erinevate polaarsuste ($\log P_{ov}$) ja happe-aluseliste omadustega (pK_a) ühendid. Iga pestitsiidi kontsentratsioon valmistatud vesilahustes oli 1 ppb. Saadud lahustega viidi läbi eelnevalt kirjeldatud SPE töötused. Pärast proovide eeltötlust analüüsiti saadud lahuseid ESI FT-ICR MS-ga. Iga SPE meetodi jaoks leiti tuvastusmäär ehk mitu protsenti algsest pestitsiidide hulgast oli hiljem võimalik detekteerida. Tuvastusmäär on leitav valemist:

$$Tuvastusmäär (\%) = \frac{N_{detekteeritud}}{N (41)},$$

kus $N_{detekteeritud}$ on eeltöödeldud pestitsiidisegu analüüsimisel detekteeritud pestitsiidide hulk, N on enne eeltöötlemist lahuses olnud pestitsiidide hulk (41). Tuvastusmäära kasutati eelkõige seetõttu, et antud töös ei olnud oluline kvantitatiivne saagis, vaid palju erinevaid saasteaineid on võimalik pärast ühekordset töötlust analüüsida.

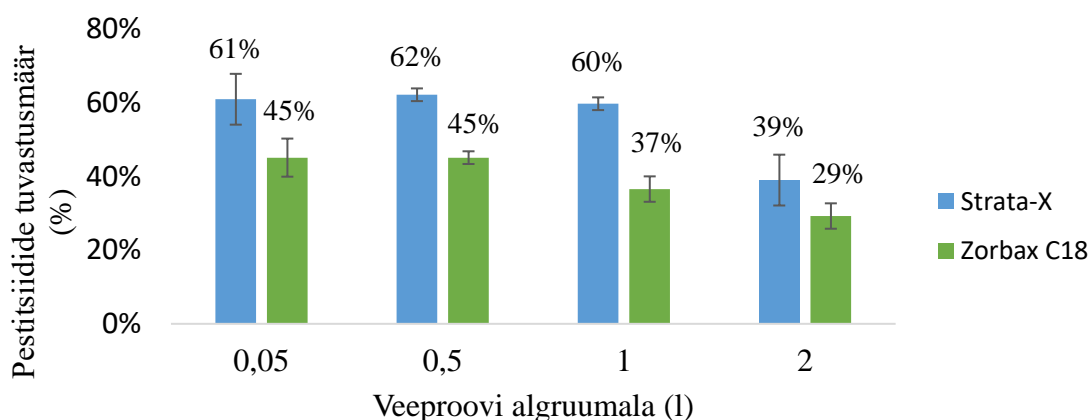
Analüüsiti nelja erinevat SPE meetodit (tabel 3) 0,05 l 1 ppb pestitsiidi segulahusega. Kõikide meetodite korral tehti kaks korduskatset. Tulemused on toodud graafikul 1.



Graafik 1. Pestitsiidide tuvastusmäär sõltuvalt SPE meetodist. Töödeldav proov (0,05 l) sisaldas kokku 41 pestitsiidi, kus iga pestitsiidi algkontsentratsioon oli 1 ppb, teoreetiline lõppkontsentratsioon 0,05 ppm.

Kaks SPE meetodit, Zorbax C18 (II) ja Strata-X, andsid parimad tulemused – keskmised tuvastusmäärad saadi vastavalt 38% ja 40%. Need meetodid valiti välja edasiseks uurimiseks, eesmärgiga leida optimaalsed proovide ruumalad, mida saab antud SPE kolonnide korral kasutada, sest lastes SPE kolonnist läbi liiga suur hulk proovi, võib kolonn ummistuda või toimuda analüütide liiga varajane elueerumine.

Selle uurimiseks tehti kolm erineva kontsentratsiooni ja ruumalaga pestitsiidilahust (sisaldas 41 erinevat pestitsiidi): 0,05 l (6 ppb); 0,5 l (0,6 ppb); 1 l (0,3 ppb); 2 l (0,15 ppb). Kontsentratsioonid valiti nii, et lõplik teoreetiline kontsentratsioon jääks erinevate lahuste korral võrdseks (0,3 ppm). Ruumalade valikul võeti arvesse SPE kolonnide infolehtedel olevaid soovituslike töödeldava veeproovi ruumalasisid ning teoreetilist eeltöötlusprotsessi aega, mis kulub kindla ruumalaga veeproovi töötlemiseks. Kokku tehti iga ruumala ja SPE meetodi jaoks kaks korduskatset. Saadud tulemused on toodud graafikul 2.



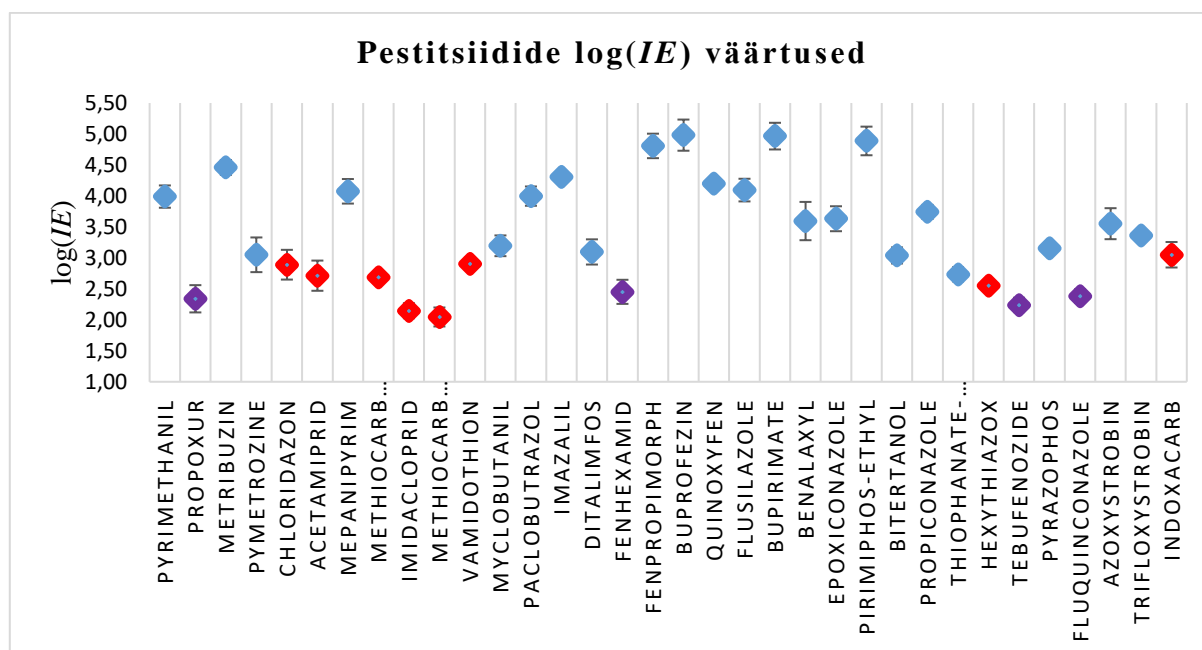
Graafik 2. Erinevate ruumalade ja kontsentratsioonidega pestitsiidilahuste SPE töötlemine Strata-X ja Zorbax C18 (II) meetoditega. Ruumaladele vastavad kontsentratsioonid olid 6 ppb; 0,6 ppb; 0,3 ppb ja 0,15 ppb. Kõikide ruumalade korral oli teoreetiline lõppkontsentratsioon 0,3 ppm. Y-teljel on toodud pestitsiidide tuvastusmäärad, x-teljel kasutatud SPE kolonnile vastav veeproovi ruumala.

Graafikult 2 on näha, et Strata-X kolonniga tehtud töötlemised andsid keskmiselt ~20% võrra parema tuvastusmäära võrreldes Zorbax C18 kolonniga. Kõikide töötluste korratavused olid head, varieerudes maksimaalselt $\pm 5\%$. 0,05 l, 0,5 l ja 1 l ruumalaga pestitsiidilahustega saadud tuvastusmäärad olid sarnased: Strata-X korral oli tuvastusmäärad vahemikus 56...66% ning C18 korral 34...49%. Tuvastusmäära järsku langust täheldati 2 l ruumaladega proovi eeltöötluste korral, kus Strata-X korral kahanes tuvastusmäär 21% võrra. Sellest saab järeldada, et antud SPE kolonni jaoks oli 2 l proovi ruumala liiga palju, mis tingis kolonni efektiivsuse languse.

Eelnevalt näidatud tulemuste põhjal leiti, et kõige optimaalsemaks SPE meetodiks on Strata-X polümeerse kolonniga eeltöötlus ja optimaalseks veeproovi ruumalaks 1 l.

Eesti põhjavees leiduvate pestitsiidide lubatud piirmääraks on 0,1 ppb⁶ [64]. Optimaalseima SPE meetodiga uuriti, milline on pestitsiidide tuvastusmäär olukorras, kus alglahuse kontsentratsiooniks on piirmäär. Tehti 0,1 ppb pestitsiidilahus 1 l kraanivette, viidi läbi SPE töötus ning analüüsiti saadud lahust ICR-ga. Eelnimetatud tingimustel saadi pestitsiidide tuvastusmääraks 59%. Sellest saab järeldada, et eeltöötlus on piisavalt efektiivne ning massispektromeetri avastamispiir madal, et saaks koheselt detekteerida mitmeid saasteaineid, mis on ületanud piirmäära. Samas on selge, et tundmatute ühendite analüüsi meetodiga ei ole kunagi võimalik kõiki ühendeid tuvastada.

Kontrolliti, kas esineb korrapära detekteeritavate pestitsiidide hulgas, mida suudeti alla 12,5% kordadest (5) või üldse mitte detekteerida (9). Üheks võimalikuks mittedetekteerimise põhjuseks võib olla ühendite halb ioniseeritavus. Selle kontrollimiseks koostati graafik 3:



Graafik 3. Pestitsiidide log IE väärtused ja nende detekteerimise sagedus. Punased punktid (7) tähistavad seda, et antud pestitsiidi ei suudetud kordagi detekteerida; lillad punktid (5) tähistavad, et pestitsiidi suudeti detekteerida <12,5% kordadel; sinised punktid (22) näitavad, et selle pestitsiidi detekteerimise sagedus oli >12,5%. 7 pestitsiidi log IE eksperimentaalsed väärtused puudusid. Mõõdetud proovide teoreetiline lõppkontsentratsioon oli 0,3 ppm.

Graafikult 3 on näha, et valdav enamik pestitsiide, mis omavad log IE väärtust alla kolme, on mõõtmistel kas väga halvasti või üldse mitte detekteeritavad. Seega võib SPE töötuseks

⁶ Aldriini, dieldriini, heptakloori ja heptakloorepoksiidi jaoks on piirmäär 0,03 ppb.

kasutatav kolonn siiski sobida kõikide pestitsiidide jaoks, kuid osad ühendid lihtsalt ioniseeruvad niivõrd kehvasti, et neid ei ole võimalik taolistes analüüsi tingimustes detekteerida. Seda teadmist on võimalik kasutada reaalseste proovide analüüsil. Näiteks kui leitakse reaalsest proovist potentsiaalne saasteaine, mille puhul võib eeldada väga madalat $\log IE$ väärtust (0...2) on antud saasteaine identifitseerimise tulemuse tõesuse väheusutav ning tuleks vaadata alternatiivseid ühendeid.

3.1. Kahtlusaste ühendite analüüsi tulemused

Kahtlusaste ühendite analüüs viidi läbi kasutades saasteainete andmebaasi (peatükk 2.6) ja selle tulemusel leiti kokku 52 potentsiaalset saasteainet, millest 28 kuulusid pestitsiidide, 18 ravimijääkide ja 6 tööstuslike saasteainete nimekirja. Saadud positiivsetest tulemustest oli koheselt võimalik välja jätta 46 valepositiivset vastet, seda eelkõige isotoopmusteri mittekattuvuse tõttu. Kahel korral oli leitud ühendid väga vähetõenäolised, sest neid pole ametlikel andmetel Eestis kasutatud (yishijing – Hiinas kasutusel olnud insektsiid; uredepa – antineoplastiline ravim). Järele jäi 6 potentsiaalset ühendit (tabel 4), mille isotoopmusteri kattuvus oli hea ning mida on Eestis reaalset kasutatud või kasutatakse praegu.

Tabel 4. Kahtlusaste ühendite analüüsil põhjalikumalt uuritud positiivsed vasted.

Ühend	Proovi number	Saasteaine liik	massitäpsus (ppm)	Brutovalem	Identifitseerimise usaldusväärsustase
Dibutüülfalaat	1	Tööstuslik saasteaine	0,3	$C_{16}H_{22}O_4$	1
Heksoprenaliin	8	Ravim	0,3	$C_{22}H_{32}N_2O_6$	4
Molindoon	8	Ravim	0,1	$C_{16}H_{24}N_2O_2$	4
Tilidiin	14	Ravim	0,24	$C_{17}H_{23}NO_2$	4
Nortilidiin	14	Tilidiini metaboliit	0,1	$C_{16}H_{21}NO_2$	4
Bisnortilidiin	14	Tilidiini metaboliit	1,9	$C_{15}H_{19}NO_2$	4

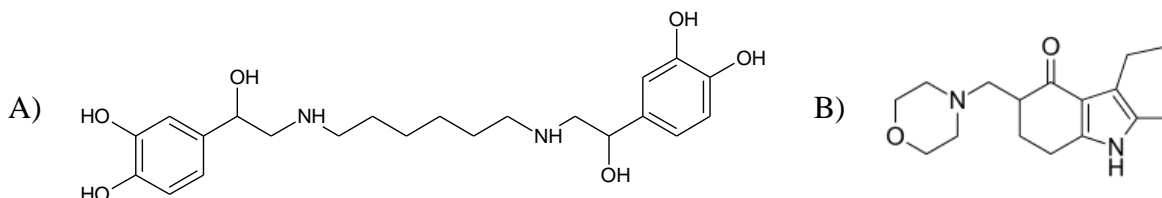
3.1.1. Heksoprenaliin ja molindoon

Proovist number 8 leitud heksoprenaliini kasutatakse astma raviks ja enneaegse sünnituse pärssimiseks, molindooni skisofreenia raviks (joonis 2). Tuvastamise hinnangulist usaldusväärsust suurendab asjaolu, et proovivõtukohta (Paldiski mnt 123, Tallinn) ümbruses on mitmeid haiglaid (Lääne-Tallinna Keskhaigla, Nakkuskliiniku polikliinik, Põhja-Eesti Regionaalhaigla, Põhja-Eesti Regionaalhaigla Psühhiaatrikliinik). Lisaks on antud proovivõtukohas veekihi sügavus maapinnast ainult 7 meetrit, mis tähendab, et põhjavesi võib kergesti reostuda.

Hinnangulist usaldusväärsust vähendab asjaolu, et antud toimeaineid sisaldavaid ravimeid kasutatakse Eestis väga vähe. Seda nendib fakt, et Raviameti poolt koostatud 2016 aasta

ravimistatistikas ei kajastu molindooni müüki üldse, heksoprenaliini toimeainet müüdi ainult 0,062 grammi.⁷ Samuti ei ole kirjandusele tuginedes antud ühendeid eelnevalt loodusest (põhjavesi, pinnavesi, pinnas) leitud.

Kahtlusaluste ühenditega viidi läbi fragmenteerimine, mille tulemusena tekkisid järgnevate m/z fragmendid: heksoprenaliin (421→339; 421→380) ja molindoon (277→193; 277→175).



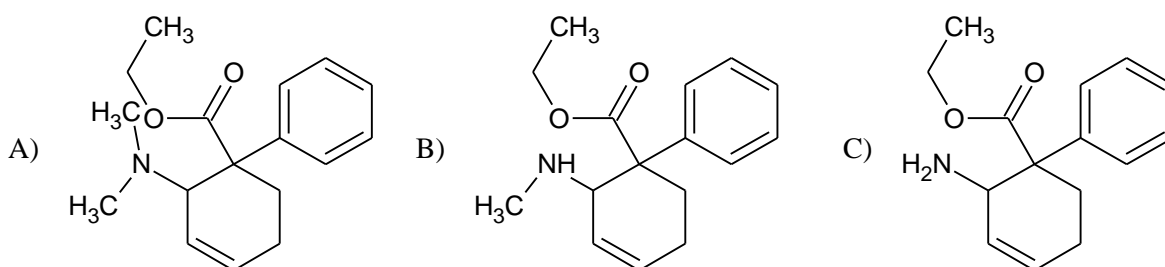
Joonis 2. A) Heksoprenaliin, $M=420,22607$ g/mol. B) Molindoon, $M=276,18379$ g/mol

Kirjandusest leiti, et molindooni fragmenteerimisel peaksid tekkima fragmendid m/z suhetega 277→100 ja 277→108 [65]. MS/MS spektrite mitteklaapimise tõttu saab väita, et molindooni positiivne vaste oli valepositiivne ning tegemist on mingi teise struktuuriisomeeriga (usaldusväärsustase 4 ehk molekuli brutovalemi identifitseerimine).

Heksoprenaliini MS/MS spektrit kirjandusest ei leitud. Võrreldes tekkivate fragmentide m/z heksoprenaliini molekuliga, on keeruline seletada, millises osas struktuurist toimus fragmenteerimine. Seetõttu on üsna tõenäoline, et heksoprenaliini puhul on tegemist samuti valepositiivse vastega ning saavutatud identifitseerimise usaldusväärsuseks jäi tase 4.

3.1.2. Tilidiin ja selle metaboliidid

Tilidiini puhul on tegemist opioidse valuvaigistiga, mis kuulub narkootiliste retseptiravimite kategooriasse. Nortilidiin ja bisonortilidiin on tilidiini metaboliidid, mis tekivad maksas demetüleerumise käigus (joonis 3).



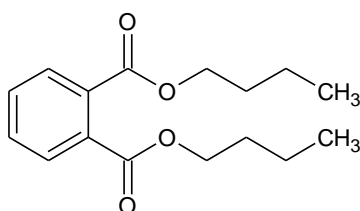
Joonis 3. A) Tilidiin, $M= 273,17287$ g/mol. B) Nortilidiin, $M= 259,15722$ g/mol. C) Bisonortilidiin, $M= 245,14157$.

⁷ Statistika põhineb ravimite hulгимүүjate aruannetel, mis ei anna täielikku ülevaadet tarbitud kogustest.

Hinnangulist usaldusväärsust suurendab asjaolu, et proovist number 14 tuvastati nii tilidiini kui ka selle peamiste metaboliitide m/z piigid. Viidi läbi ühendite fragmenteerimine, mille käigus detekteeriti järgnevad fragmendid: tilidiin (274→256; 274→228;), nortilidiin (260→242; 260→214;) ja bisnortilidiin (246→228; 246→200). Kõikide ühendite puhul tekkisid erineva m/z fragmendid, kuid massikaod olid võrdsed: vastavalt -46 ja -18. Kahtlusaluse ühendi ehk tilidiini MS/MS spektrit oli võimalik võrrelda kirjandusest saadud standardaine spektriga ning need omavahel ei klappinud. Lisaks viitavad massikaod nitrorühma ja vee eraldumisele, nitrorühma aga antud ühenditel ei olnud. Seega võib kindlalt väita, et tegemist oli valepositiivse tulemusega. Siiski esines antud proovis mingi ühend koos kahe demetüleeritud metaboliidiga, mida kahjuks tuvastada ei õnnestunud. Kõik kolm ühendit saavutasid identifitseerimise usaldusväärsustaseme 4.

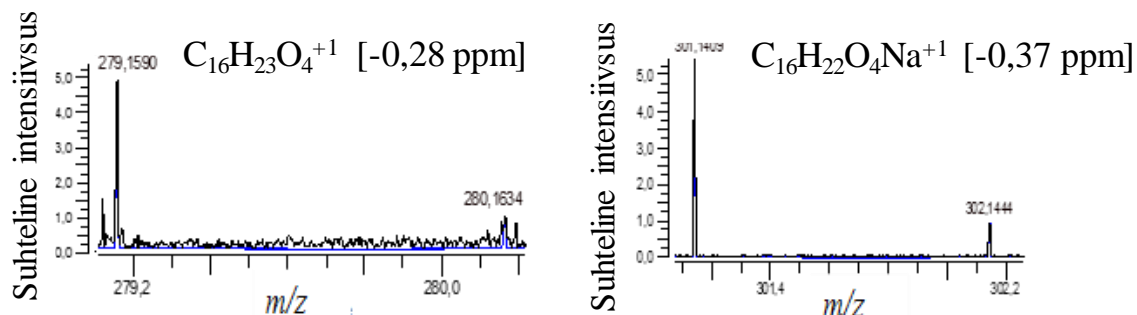
3.1.3. Dibutüülftaal

Ühest põhjaveeproovist leiti kahtlusaluste ühendite andmebaasi abil potentsiaalne saasteaine dibutüülftaal (joonis 4). Dibutüülftaali kasutatakse plastifikaatorina mitmesuguste plastide tootmisel, samuti lisaainena liimide ja trükivärvide koostises. [66] Euroopa Liit klassifitseerib dibütüülftaali endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide alla, mis tähendab, et see ühend võib muuta organismi hormoonsüsteemi talitlust ja sellel on kahjulik toime nii inimestele kui ka loomadele. Dibütüülftaali on avastatud Peipsi järve pinnaveest [67] ja Pärnu jõest [68]. Eesti põhjaveest pole dibütüülftaali eelnevalt leitud.



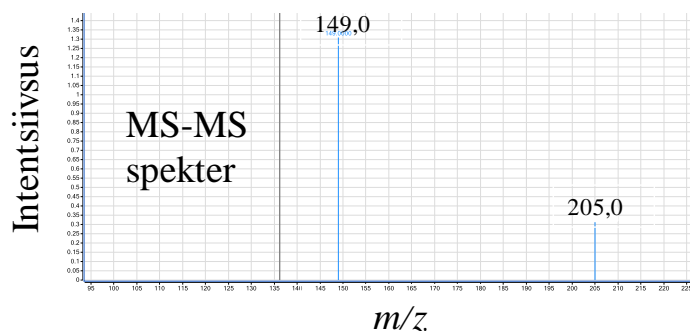
Joonis 4. Dibütüülftaal, $M=278,15183$ g/mol

Dibütüülftaal avastati proovist nr 1, mis on võetud Kurtna külast Ida-Viru maakonnast. Ühend esines kõigil kolmel kordusmõõtmisel nii $[M+H]^+$ kui ka $[M+Na]^+$ vormis, keskmine m/z erinevus 0,5 ppm. Mõõdetud massispekter koos isotoopmusteri kattuvusega on toodud joonisel 5. Sellega saavutati antud ühendi jaoks usaldusväärsustase 3 ehk esialgne ühend.



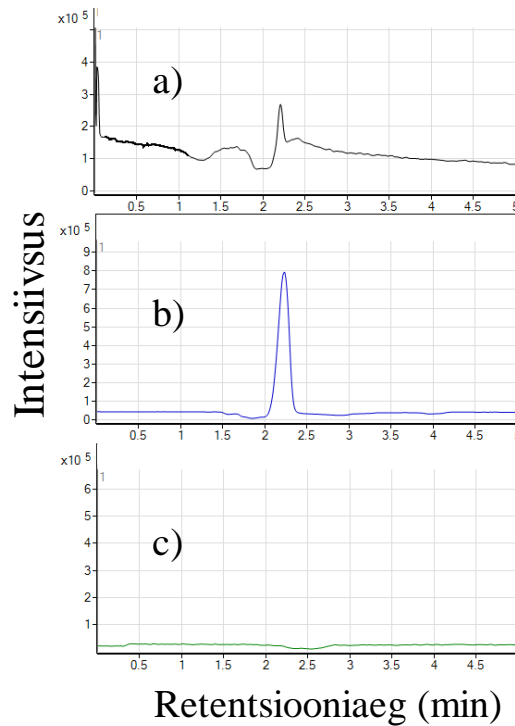
Joonis 5. Vasakul pool on dibutüülfalaadi protoneeritud molekuli $[M+H]^+$ massispekter, paremal $[M+Na]^+$ adukti massispekter. Vt kõrgema lahutusega spekreid lisast (joonised S2 ja S3).

Viidi läbi ühendi fragmenteerimine 3Q massianalüsaatoril, kus kõige intensiivsemateks fragmentide m/z suheteks saadi vastavalt 149 ja 205 (kasutatud pörkeenergia 8 V). Ka kirjandusest on leitav, et dibutüülfalaadist tekkivate fragmentide m/z suhted antud tingimustes on vastavalt 149 ja 205 [69]. Sellele tuginedes saavutati usaldusväärsuse tase 2 ehk võimalik struktuur.



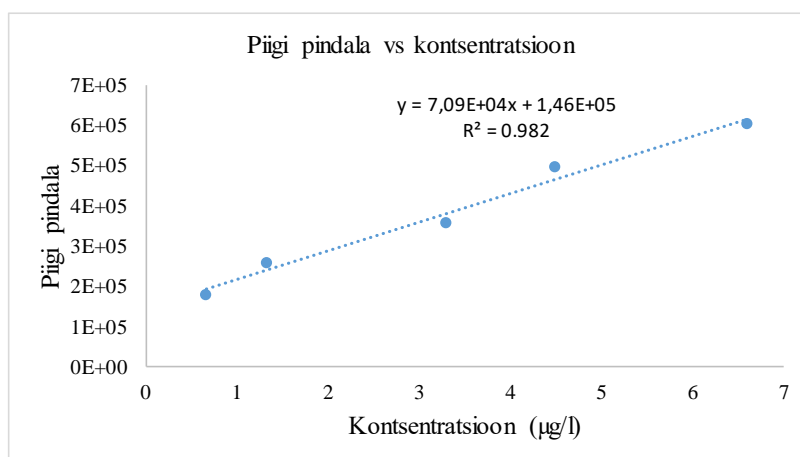
Joonis 6. Ühendi fragmenteerimisspekter (pörkeenergia 8 V).

Võimalik struktuur kinnitati dibutüülfalaadi standardainega kasutades LC-ESI-MS instrumenti. Kasutati MRM (ingl k *multi reaction monitoring*) ehk mitme reaktsiooni jälgimise meetodit, kus selektiivselt detekteeriti eellasiooni fragmenteerimisel tekkivaid 149 ja 205 m/z ioone. Joonisel 7 on toodud proovi, standardaine ja tühiproovi spektrid. Dibutüülfalaadi standardaine ja proovi retentsiooniaegadeks saadi mõlemal juhul 2,2 minutit. Kõigele eelnevale tuginedes saab öelda, et tegemist on usaldusväärsustase 1 ehk kinnitatud struktuuriga.



Joonis 7. Dibutüülfalaadi kinnitamine standardainega LC-ESI-MS meetodil. A) proov; B) standardaine; C) tühiproov. Kasutati kolonni Kinetex C18 (3 mm x 100 mm, 2,6 µm osakesed), mobiilseks faasiks oli 80/20 MeCN/H₂O 0,1% HCOOH. Voolukiiruseks oli 0,250 ml/min, massispektrometris kasutati tehase vaikeseadeid.

Proovis leidunud dibutüülfalaadi kvantiseerimiseks tehti kalibreerimislahused kontsentratsioonidega 0,65; 1,3; 3,3; 4,5 ja 6,6 µg/l. Valmistatud kalibreerimislahused ja tühiproov analüüsiti ning saadud tulemused kanti kalibreerimisgraafikule, mis on toodud graafikul 4.



Graafik 4. Dibutüülfalaadi kalibreerimisgraafik.

Proovis leidunud dibutüülfalaadi kontsentratsiooniks saadi 3,9 µg/l. Seega algse põhjaveeproovis oli dibutüülfalaadi kontsentratsioon vähemalt 3,9 ng/l. Dibutüülfalaadi

täheldatav kahjulikku toimet mitteavaldav kontsentratsioon rottidel on leitud olevat 104 mg 1 kg kehakaalu kohta [70]. Lisaks ei ole dibutüülftalaadi korral täheldatud selle pikaajalist bioakumuleerumist organismides. Ameerika Ühendriikide joogivee standardite ja kriteeriumite direktiivis on välja toodud, et dibutüülftalaadi referentsdoosiks⁸ on 100 µg 1 kg kehakaalu kohta päevas [71]. Sellest saab järeldada, et antud dibutüülftalaadi kontsentratsioon põhjavees ei ole inimese organismile kahjulik, küll aga on see ohumärk, et antud piirkonna põhjavesi on reostusele vastuvõtlik.

3.2. Tundmatute ühendite analüüsi tulemused

Pärast massispektri piikide töötlust jäi alles 1335 huvipakkuvat piiki, mida uuriti edasi tundmatute ühendite analüüsi meetodil. Nendest 1335 piigist 175le suudeti omistada brutovalem. Brutovalemi omistamisel lähtuti eelkõige isotoopmustrist kattumisest ning brutovalemi esinemisest Chemspideri andmebaasis. Keeruliseks tegi omistamise asjaolu, et ühele piigile võis sobida mitmeid erinevaid brutovalemeid ning ühte õiget oli paljude piikide jaoks võimatu välja valida. 175st brutovalemist kõige kindlama usaldusväärtusega olid tabelis 5 toodud 9 brutovalemit, sest antud m/z juures ei olnud 5 ppm täpsusega võimalik genereerida teisi potentsiaalseid valemeid.

Tabel 5. Tundmatute ühendite analüüsil leitud 9 kõige usaldusväärsemat brutovalemit.

Brutovalem	Proovi number	Massispektri m/z suhe (massitäpsus ppm)	MS/MS fragmendid	Identifitseerimise usaldusväärsustase
C ₁₀ H ₁₄ O	20	151,1117 (0,7)	149→133 ja 149→107 (negatiivne)	1 ja 2
C ₁₀ H ₁₆	20	137,1323 (1,3)	Ei fragmenteerunud	4
C ₆ H ₉ N ₃	20	124,0869 (0,4)	Ei fragmenteerunud	4
C ₈ H ₁₆ O ₂	13	145,1223 (0,1)	145→104	4
C ₇ H ₇ NO ₂	13	138,0549 (0,4)	138→92 ja 138→110	4
C ₆ H ₄ O ₂ S	13	141,0005 (0,2)	141→109	3
C ₁₃ H ₁₃ N ₃	12	212,1180 (1,15)	212→156	4
C ₆ H ₁₂ N ₆ O	12	185,1147 (0,7)	185→74	3

Lisaks eelnevalt välja toodud üheksale ühendile võeti edasiseks uurimiseks veel 11 tundmatut ühendit, sest antud piigid olid massispektris väga intensiivsed või ühendil oli Chemspideris alla 20ne struktuuriisomeeri vaste.

⁸ Referentsdoos näitab kemikaali hulka, mille igapäevasel tarbimisel kogu elu jooksul ei tekita antud kemikaal negatiivseid efekte inimese tervisele.

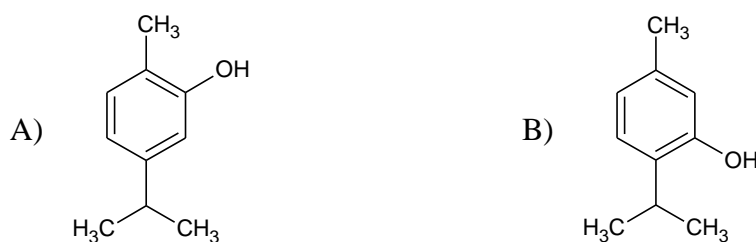
Tabel 6. Tundmatute ühendite analüüsi tulemuste kokkuvõte.

Usaldusväärsuse tase	Saavutatud väljund	Piikide arv	Nõuded
5	Täpne m/z suhe	1335	Tühiproov maha lahutatud ning piik esineb vähemalt kahel mõõtmisel kolmest
4	Brutovalemid	175	Struktuuride olemasolu Chemspideris ja isotoopmustris kattuvus
3	Esialgne struktuur	3	Puuduvad teised brutovalemid, Chemspideris <20 struktuuriisomeeri
2	Kindlam struktuur	1	MS/MS spektri kattumine
1	Kinnitatud struktuur	1	Standardainega kontroll

Nendest 20st brutovalemist neljale leiti struktuurid nii, et saadud MS/MS spektrid kas kattusid kirjanduses oleva MS/MS spektriga või suudeti genereerida hüpoteetiline fragmenteerumisprotsess, millega sai seletada tekkivaid fragmente. Tundmatute ühendite analüüsi tulemuste kokkuvõte on toodud tabelis 6.

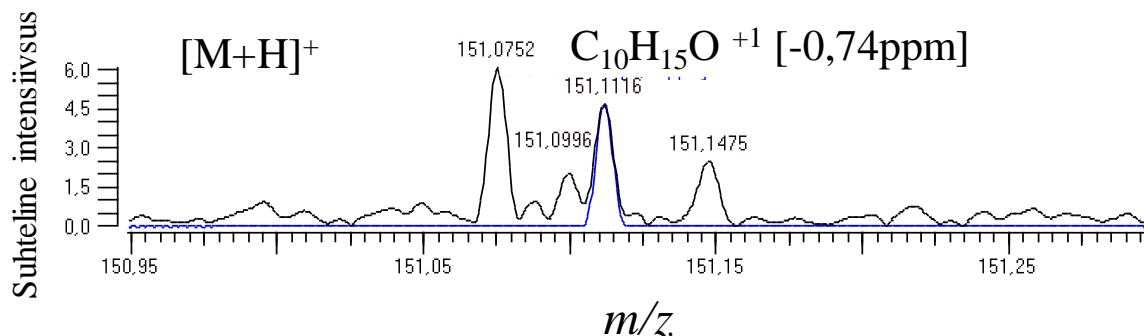
3.2.1. $C_{10}H_{14}O$

Proovist number 20, mis oli võetud Saku vallast, tuvastati piik brutovalemiga $C_{10}H_{14}O$. Selle brutovalemi potentsiaalseteks vasteteks on tümool ja karvakrool (joonis 8).



Joonis 8. A) Karvakrool, $M= 150,10447$ g/mol. B) Tümoole, $M= 150,10447$ g/mol

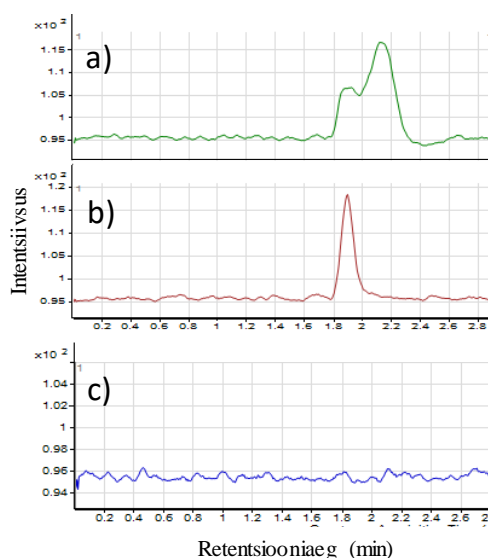
Tegemist on fenoolidega, mis esinevad peamiselt harilikus punes, kusjuures mõlemad on pune eeterliku õli põhikomponendid ning antud Saku valla piirkonnas on hariliku pune leviala. Massispektrist leiti ühendi protoneeritud vorm, mis on toodud joonisel 9.



Joonis 9. Massispektrist tuvastatud $C_{10}H_{15}O^+$ piik.

Potentsiaalsele ühendile viidi läbi fragmenteerimine negatiivses režiimis ning saadud fragmentide m/z suhted oli vastavalt $149 \rightarrow 133$ ja $149 \rightarrow 107$. Tümooli MS/MS spekter oli saadaval kirjanduses, kus samamoodi oli peamisteks fragmentideks saadud vastavalt 133 ja 107 [72]. Karvakrooli MS/MS spekter kirjandusest leitav ei olnud ning seetõttu selle informatsiooni põhjal ühte kindlat struktuuriisomeeri välja valida ei saanud, sest suure tõenäosusega on karvakrooli fragmendid identsed tümooli omadega.

Tänu tümooli standardaine olemasolule viidi läbi võimaliku struktuuri kinnitamine LC-ESI-MS instrumendil, kasutades mitme reaktsiooni jälgimise meetodit. Jooniselt 10 on näha, et tümooli standardaine retentsiooniaeg on 1,9 minutit ning samasuguse retentsiooniajaga piik saadi ka proovi analüüsimisel. Sellest saab järeldada, et proov sisaldas tõepoolest tümooli ühendit ning saavutati identifitseerimise usaldusväärsustase 1 ehk kinnitatud struktuur.



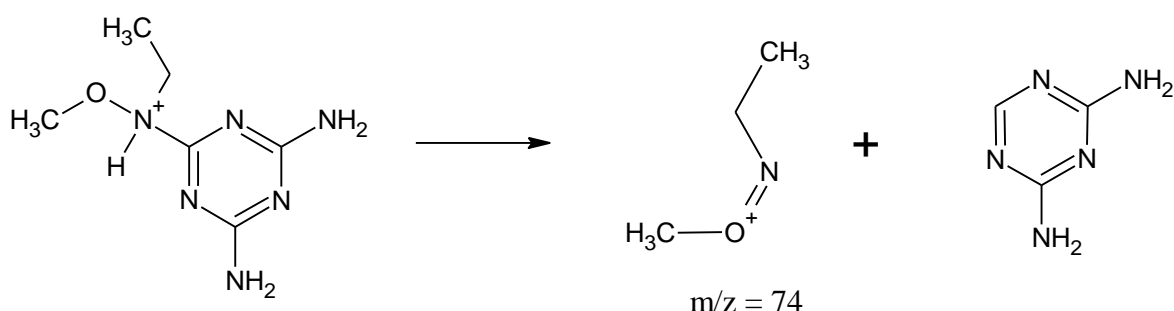
Joonis 10. Tümooli kinnitamine standardainega LC-ESI-MS instrumendil. A) proovi piik; b) standardaine piik; c) tühiproovi piik. Kasutati kolonni Kinetex C18 (3 mm x 100 mm, 2,6 μm osakesed), mobiilseks faasiks 80/20 MeCN/ H_2O 0,1% HCOOH. Voolukiiruseks oli 0,250 ml/min, massispektromeetris kasutati tehase vaikeseadeid.

Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseameti andmetel on tümooli kahjulik mõju keskkonnale minimaalne ning sellel on väga madalad toksilised omadused. [73]

Proovi analüüsimisel täheldati tümooli piigi osalist kattumist teise tundmatu piigiga, millel esinesid samad fragmendid. Pikema retentsiooniajaga piik võib olla tekitatud karvakrooli poolt. Nimelt on kirjanduses välja toodud asjaolu, et karvakrooli retentsiooniaeg pöördfaas-kolonnis on veidi pikem võrreldes tümooli retentsiooniajaga [74]. Karvakrooli standardaine puudumise tõttu ei olnud võimalik antud ühendi esinemist kinnitada ning seetõttu saavutati usaldusväärsustase 2 ehk võimalik struktuur.

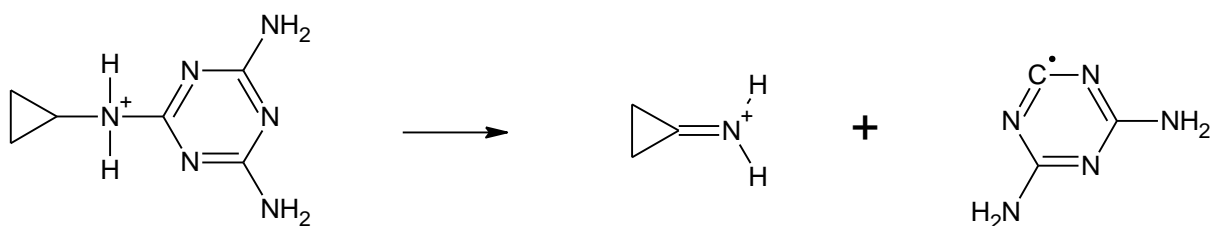
3.2.2. C₆H₁₂N₆O

Proovist number 12 detekteeriti massispektri piik m/z suhtega 185,1147, mille potentsiaalseks brutovalemi vasteks leiti olevat C₆H₁₃N₆O⁺ (massispekter on toodud lisas, joonis S5). Selle tundmatu ühendi fragmenteerimisel detekteeriti fragment m/z 74. Üheks potentsiaalseks struktuuriisomeeri vasteks on N-etiül-N-metoksü-1,3,5-triasiin-2,4,6-triamiin. Kirjanduses puudub selle ühendi MS/MS spekter, kuid üks hüpoteetiline fragmenteerumine on toodud joonisel 11, mille käigus tekib fragment m/z suhtega 74.



Joonis 11. N-etiül-N-metoksü-1,3,5-triasiin-2,4,6-triamiini hüpoteetiline fragmenteerimisprotsess.

Jooniselt on näha N-etiül-N-metoksüamiini ja triasiini vahelise sideme katkemine, mille tulemusena tekib N-etiül-N-metoksüamiin m/z 74. Sarnane fragmenteerimisprotsess toimub ka tsüromasiini korral, mis struktuurilt on üsna sarnane eelnevalt toodud triamiinile. Tsüromasiini fragmenteerimisel katkeb triasiini ja tsüklopropanamiini side (joonis 12) [72].

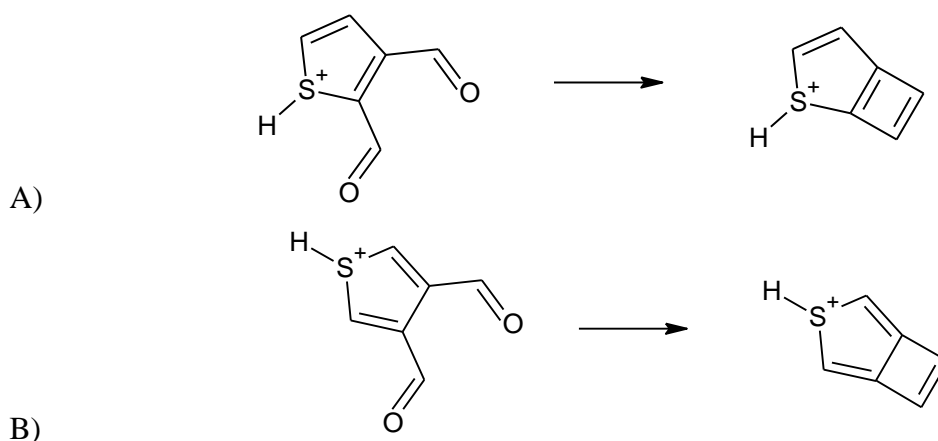


Joonis 12. Tsüromasiini fragmenteerimisprotsess.

N-etiül-N-metoksü-1,3,5-triasiin-2,4,6-triamiini tuvastamise usaldusväärsust vähendab asjaolu, et antud ühendi kasutusala kohta puudub kirjanduses igasugune informatsioon. Kontrolliti võimalust, et N-etiül-N-metoksü-1,3,5-triasiin-2,4,6-triamiini on tsüromasiini metaboliit, kuid see hüpotees lükati kirjanduse abil ümber [75]. Samas võib kõnealune molekul olla mõne teise mitte teada oleva ühendi metaboliit. Kõigele eelnevale tuginedes saavutati identifitseerimise usaldusväärsustase 3 ehk esialgne struktuur.

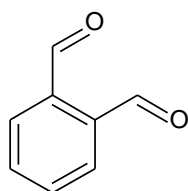
3.2.3. C₆H₄O₂S

Proovist number 13 detekteeriti piik m/z suhtega 141,0005, mille ainukeseks brutovalemile vasteks vahemikus ± 5 ppm oli C₆H₅O₂S⁺ (massispekter on toodud lisas, joonis S6). Chempideris leiti sellele brutovalemile 16 struktuuriisomeeri. Ühendi fragmenteerimisel detekteeriti m/z 109 fragmendi teke, mis tähendab, et eellasiooni massikadu oli -32, mis võib viidata kahe hapnikuaatomi kadumisele. Sellest hüpoteesist lähtudes leiti struktuuriisomeeride hulgast kaks potentsiaalset ühendit, mille fragmenteerumise käigus võiks kaks hapnikuaatomit eemalduda. (joonis 13).



Joonis 13. A) 2,3-diformüültiofeeni ja B) 3,4-tiofeendikarbaldehüüdi hüpoteetilised fragmenteerumisprotsessid.

Nende ühendite MS/MS spektreid ning informatsiooni antud molekulide kasutusala kohta kirjandusest saadaval ei olnud. Et kontrollida, kas eelnevalt toodud fragmenteerumine võiks toimuda kõrvuti paiknevate dikarbaldehüüdidega, otsiti kirjandusest sarnase struktuuriga molekul, millel oleks MS/MS spekter saadaval. Sarnase struktuuriga molekuliks leiti olevat joonisel 14 toodud orto-ftaalaldehüüd.



Joonis 14. Orto-ftaalaldehüüd, $M = 134,03678$ g/mol.

Orto-ftaalaldehüüdi MS/MS spektrist oli näha, et eelnevalt pakutud fragmenteerumine kõrvuti paiknevate dikarbaldehüüdidega sellisel kujul ei toimu. See vähendab välja pakutud fragmenteerumise tõenäosust, kuid samas ei lükka seda täielikult ümber. Kokkuvõtteks võib öelda, et ühendid saavutasid usaldusväärsusastase 3 ehk tegemist on esialgsete struktuuridega.

3.3. Põhjavee elementanalüüs ICP-MS instrumendiga

Koostöös Ramboll Analytics ettevõttega viidi läbi põhjavee elementanalüüs kasutades ICP-MS instrumenti, mis võimaldas saavutada madalad avastamiskiirid ning määrata paljusid elemente korraga. Kokku määrati proovides 26 elementi ning saadud kontsentratsioonid koos piirmääradega on toodud lisas (tabel S2). Eestis on sätestatud joogivee piirmäärad üheksale elemendile (B, Cr, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Hg, Pb) ning indikaatorina kasutatakse nelja elementi (Na, Al, Mn, Fe). Piirmäära ületati proovi 12 korral, kus boori kontsentratsioon oli lubatust ~30% kõrgem (1,3 mg/l). Pikaajaline kokkupuude booririkka joogiveega võib põhjustada mao- ja sooletrakti häireid, kuid selliste ohtude jaoks peaks boori kontsentratsioon joogivees olema vähemalt 4-5 mg/l [76]. Järelikult pole taoline piirmäära ületus tervisele ohtlik.

Indikaatorite piirsisaldust ületati raua korral kahes proovis (7 – 750%; 8 – 40%). Kõrgenenud rauasisaldus joogivees ei kujuta tervisele ohtu ning eelkõige toob see kaasa vee ebameeldiva maitse ja hägususe. Küll aga on ohtlik juua vett, mille raua sisaldus on üle 6 mg/l, sest taoline kõrge raua sisaldus võib põhjustada oksüdatiivset stressi, mida peetakse mitmete haiguste põhjustajaks (põletikud, kasvaja jm). [77] Analüüsitud veeproovide korral jäi kõige rauarikkamas proovis kontsentratsioon ligikaudu 1,7 mg/l juurde.

Mangaani piirmäär ületati kolmes põhjaveeproovis (8 – 345%; 13 – 5%; 18 – 625%). Sarnaselt rauale ei kujuta mangaani sisaldus looduslikus vees ohtu inimese tervisele ning selle sisaldust kontrollitakse organoleptiliste ehk meeltajutavate omaduste tagamiseks. Seega proovid, mis ületasid mangaani piirmäärasid, ei ole tervisele ohtlikud.

KOKKUVÕTE

Magistritöö raames leiti kirjanduses väljatoodud neljast proovi eeltötlusmeetodist optimaalseim meetod, millega on võimalik põhjaveest korraga määrata väga erinevate füüsiko-keemiliste omadustega saasteaineid. Parimad tulemused saavutati Strata-X meetodiga, millega suudeti tuvastada 60% näidisühenditest. Optimaalseim töödeldava veeproovi ruumala oli 1 l.

Koostati saasteainete andmebaas, mis sisaldas 1700 pestitsiidi, 200 tööstusliku saasteaine ja 1150 ravimi toimeaine nimetust, brutovalemite ja molekuli täpset massi. Andmebaas on kõigile vabalt kättesaadav ning kasutatav. Samuti töötati välja kahtlusaluste ja tundmatute ühendite analüüsi töövood.

Viidi läbi Eesti põhjavee analüüs, kasutades eelnevalt välja töötatud kahtlusaluste ja tundmatute ühendite meetodit. Kahtlusaluste ühendite analüüsi tulemusena detekteeriti 16 põhjaveeproovist kokku 52 kahtlusalust ühendit, millest 51 olid valepositiivsed isotoopmusteri või fragmenteerimisspektrite mittekklappimise tõttu. Positiivseks jäänud vasteks oli dibutüülftalaat, mis tuvastati Ida-Viru maakonnast Kurtna külast võetud põhjavee proovist. Ühendi esinemist proovis kinnitati standardainega. Lisaks viidi läbi kvantiseerimine kalibreerimisgraafiku meetodil, mille tulemusena leiti dibutüülftalaadi kontsentratsiooniks 3,9 ng/l.

Tundmatute ühendite analüüsi tulemusena tuvastati veeproovidest 1335 piiki, mis saavutasid usaldusväärse taseme 5 (täpne m/z suhe). 175-le suudeti omistada brutovalemid, kolmele brutovalemile leiti esialgsed struktuurid. Saku vallast võetud põhjavee proovist tuvastati tümool ja karvakrool. Tümooli esinemist proovis kinnitati standardainega

Töö käigus analüüsiti esmakordselt Eesti põhjavett analüüsimeetoditega, mille korral pole monitooritavate ühendite hulk piiratud standardainete olemasoluga. Loodud meetodeid on võimalik kasutada ka edaspidi, viimaks läbi ulatuslikum Eesti põhjavee seire ning analüüsides põhjavee seirekaeve pikema aja vältel. Töötades välja optimaalsed eeltötlusmeetodid pinnase- ja pinnaveeproovidele, on võimalik antud meetodeid kasutada ka pinnase ja pinnavee proovide analüüsimiseks.

SUMMARY

Screening of Estonian groundwater with non-target and suspect screening

The aim of this work was to find the most suitable sample preparation method for groundwater samples; to develop workflows for suspect and non-target screening; to conduct the screening of Estonian groundwater; to analyse obtained data and to identify compounds presence in the groundwater.

In this work, four different solid phase extraction methods were tested to find the most optimal method, that would allow to determine various contaminants from water samples. Best results were obtained with Strata-X method, where 60% of added pesticides were later detected from the artificial water sample. Most optimal sample volume was found to be 1 L.

For suspect screening, a contaminant database was compiled. The database contained compound names, molecular compositions and exact masses for 1700 pesticides, 200 industrial pollutants and 1150 pharmaceutical residues. In addition, workflows for suspect and non-target screening were developed.

Using previously developed analysis methods, screening of 16 Estonian groundwater samples was conducted. As a result of suspect screening, 52 suspect contaminants were detected. However, 51 of them were identified as false positives. The only contaminant confirmed with standard substance was dibutyl phthalate, which was detected in a groundwater sample collected from the Kurtna village. Finally, quantification of dibutyl phthalate was conducted using calibration curve method. As a result, concentration of 3.9 ng/l was determined.

With non-target screening, 1335 peaks with exact m/z values were detected. For 175 peaks, the elemental composition was found, from which the tentative structures were assigned for 3. Thymol and carvacrol were detected in a groundwater sample collected from the Saku parish. Thymol presence in the groundwater was confirmed with the reference standard.

For the first time, Estonian groundwater was analysed using methods with no limit for compounds observed. Developed methods can be later used to conduct more extensive groundwater screening. With these methods, even soil and surface water samples can be analysed if suitable sample preparation methods are implemented.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Põllumajandusameti Avalikud Registrid. <http://jis.agri.ee:22001/jisweb/forms/mainframe.htm> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [2] Fogg, G.E.; LaBolle, E.M. Motivation of Synthesis, with an Example on Groundwater Quality Sustainability. *Water Resour. Res.* **2006**, *42*, W03S05.
- [3] Schwarzenbach, R.P.; Escher, B.I.; Fenner, K.; Hofstetter, T.B.; Johnson, C.A.; Gunten, U. von; Wehrli, B. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*. **2006**, *313*, 1072–1077.
- [4] Barnes, K.K.; Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Zaugg, S.D.; Meyer, M.T.; Barber, L.B. A National Reconnaissance of Pharmaceuticals and Other Organic Wastewater Contaminants in the United States — I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* **2008**, *402*, 192–200.
- [5] Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 1202–1211.
- [6] Leandro, C.; Souza, V.; Dores, E.F.G.C.; Ribeiro, M.L. Determination of Pesticides Multiresidues in Shallow Groundwater in a Cotton-Growing Region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1111–1117.
- [7] Masiá, A.; Ibáñez, M.; Blasco, C.; Sancho, J.V.; Picó, Y.; Hernández, F. Combined Use of Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry and Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry in Systematic Screening of Pesticides and Other Contaminants in Water Samples. *Anal. Chim. Acta.* **2013**, *761*, 117–127.
- [8] Masiá, A.; Campo, J.; Vázquez-Roig, P.; Blasco, C.; Picó, Y. Screening of Currently Used Pesticides in Water, Sediments and Biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *J. Hazard. Mater.* **2013**, *263*, 95–104.
- [9] Lopez, B.; Ollivier, P.; Togola, A.; Baran, N.; Ghestem, J.-P. Screening of French Groundwater for Regulated and Emerging Contaminants. *Sci. Total Environ.* **2015**, *518–519*, 562–573.
- [10] Keskkonnaministeerium. Veemajanduskavad 2015-2021. <http://www.envir.ee/et/eesmargid-tegevused/vesi/veemajanduskavad/veemajanduskavad-2015-2021> viimati uuendatud 18.08.2016.
- [11] Leisk, Ü. Nitraadid ja taimekaitsevahendite jäägid põhja- ja pinnavee uuringutes 2012-2016. Ettekanne seminaril "Elukeskkonna ja toidu kvaliteet", Tartu, 2016.
- [12] Wode, F.; van Baar, P.; Dünnebier, U.; Hecht, F.; Taute, T.; Jekel, M.; Reemtsma, T. Search for over 2000 Current and Legacy Micropollutants on a Wastewater Infiltration Site with a UPLC-High Resolution MS Target Screening Method. *Water Res.* **2015**, *69*, 274–283.
- [13] Schymanski, E.L.; Singer, H.P.; Slobodnik, J.; Ipolyi, I.M.; Oswald, P.; Krauss, M.; Schulze, T.; Haglund, P.; Letzel, T.; Grosse, S.; Thomaidis, N.S.; Bletsou, A.; Zwiener, C.; Ibáñez, M.; Portolés, T.; Boer, R. de; Reid, M.J.; Onghena, M.; Kunkel, U.; Schulz, W.; Guillon, A.; Noyon, N.; Leroy, G.; Bados, P.; Bogialli, S.; Stipanichev, D.; Rostkowski, P.; Hollender, J. Non-Target Screening with High-Resolution Mass Spectrometry: Critical Review Using a Collaborative Trial on Water Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 6237–6255.

- [14] Zedda, M.; Zwiener, C. Is Nontarget Screening of Emerging Contaminants by LC-HRMS Successful? A Plea for Compound Libraries and Computer Tools. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2493–2502.
- [15] Price, P. Standard Definitions of Terms Relating to Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, *2*, 336–348.
- [16] De Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; 3. ed., reprinted. Wiley: Chichester, **2011**.
- [17] Russell, D.H.; Edmondson, R.D. High-Resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 263–276.
- [18] Massachusetts Institute of Technology. MS: Resolution and Accuracy. http://web.mit.edu/speclab/www/Facility/MS/mass_res.html viimati alla laetud 18.05.2017.
- [19] Brenton, A.G.; Godfrey, A.R. Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1821–1835.
- [20] Marshall, A.G.; Hendrickson, C.L. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Detection: Principles and Experimental Configurations. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *215*, 59–75.
- [21] Scigelova, M.; Hornshaw, M.; Giannakopoulos, A.; Makarov, A. Fourier Transform Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP.* **2011**, *10*.
- [22] Metabolomics Fiehn Lab. Mass Resolution and Resolving Power. http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven_Golden_Rules/Mass_Resolution viimati alla laetud 18.05.2017.
- [23] Balogh, M. Debating Resolution and Mass Accuracy in Mass Spectrometry. *Spectrosc.-Springf. THEN EUGENE THEN DULUTH-*. **2004**, *19*, 34–34.
- [24] Hart-Smith, G.; Blanksby, S.J. Mass Analysis. *Mass Spectrom. Polym. Chem. 1st Edn Wiley-VCH Verl. GmbH Co Weinh. Ger.* **2012**, 5–32.
- [25] de Hoffmann, E. Tandem Mass Spectrometry: A Primer. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 129–137.
- [26] Pleil, J.D.; Isaacs, K.K. High-Resolution Mass Spectrometry: Basic Principles for Using Exact Mass and Mass Defect for Discovery Analysis of Organic Molecules in Blood, Breath, Urine and Environmental Media. *J. Breath Res.* **2016**, *10*, 012001.
- [27] Schymanski, E.L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H.P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2097–2098.
- [28] Maldaner, L.; Jardim, I.C.S.F. Determination of Some Organic Contaminants in Water Samples by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry. *Talanta.* **2012**, *100*, 38–44.
- [29] Ruiz-Gil, L.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L. Determination of Pesticides in Water Samples by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 151–161.
- [30] Faraji, H.; Husain, S.W.; Helalizadeh, M. Determination of Phenolic Compounds in Environmental Water Samples after Solid-Phase Extraction with β -Cyclodextrin-Bonded Silica Particles Coupled with a Novel Liquid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 107–113.
- [31] De Gerónimo, E.; Aparicio, V.C.; Bárbaro, S.; Portocarrero, R.; Jaime, S.; Costa, J.L. Presence of Pesticides in Surface Water from Four Sub-Basins in Argentina. *Chemosphere.* **2014**, *107*, 423–431.

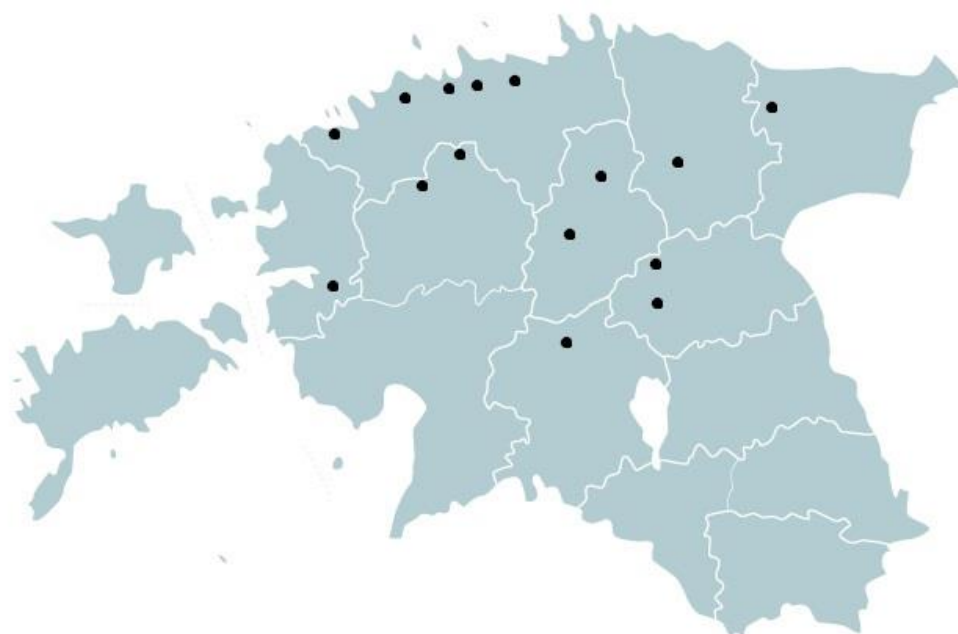
- [32] Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. Multiresidue Methods Using Solid-Phase Extraction Techniques for Monitoring Priority Pesticides, Including Triazines and Degradation Products, in Ground and Surface Waters. *J. Chromatogr. A*. **2000**, *885*, 217–236.
- [33] Papadakis, E.-N.; Tسابoula, A.; Kotopoulou, A.; Kintzikoglou, K.; Vryzas, Z.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Pesticides in the Surface Waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and Environmental Risk Assessment. *Sci. Total Environ.* **2015**, *536*, 793–802.
- [34] Żwir-Ferenc, A.; Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique—trends, Opportunities and Applications. *Pol. J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 677–690.
- [35] *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Winefordner, J. D. Ed.; Wiley: New Jersey, 2003, Vol 162, pp 78-113.
- [36] Sjerps, R.M.A.; Vughs, D.; van Leerdam, J.A.; ter Laak, T.L.; van Wezel, A.P. Data-Driven Prioritization of Chemicals for Various Water Types Using Suspect Screening LC-HRMS. *Water Res.* **2016**, *93*, 254–264.
- [37] Hogenboom, A.C.; van Leerdam, J.A.; de Voogt, P. Accurate Mass Screening and Identification of Emerging Contaminants in Environmental Samples by Liquid Chromatography–hybrid Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2009**, *1216*, 510–519.
- [38] Pugajeva, I.; Rusko, J.; Perkons, I.; Lundanes, E.; Bartkevics, V. Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* **2017**, *133*, 64-74.
- [39] Smith, D.F.; Kharchenko, A.; Konijnenburg, M.; Klinkert, I.; Paša-Tolić, L.; Heeren, R.M. Advanced Mass Calibration and Visualization for FT-ICR Mass Spectrometry Imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 1865–1872.
- [40] Bletsou, A.A.; Jeon, J.; Hollender, J.; Archontaki, E.; Thomaidis, N.S. Targeted and Non-Targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Workflows for Identification of Transformation Products of Emerging Pollutants in the Aquatic Environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 32–44.
- [41] Viant, M. Non-targeted metabolomics in environmental toxicology: workflows, challenges and routes through the maze. Ettekanne konverentsilt "Non-target 2016", Ascona, 2016.
- [42] Schymanski, E.L.; Singer, H.P.; Longrée, P.; Loos, M.; Ruff, M.; Stravs, M.A.; Ripollés Vidal, C.; Hollender, J. Strategies to Characterize Polar Organic Contamination in Wastewater: Exploring the Capability of High Resolution Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 1811–1818.
- [43] Yang, P.; Yang, C.; Nguyen, T.; Pileggi, V.; Akervik, K.; Hao, C.; Zhao, X.; Thach, S.; Newman, J.; Lu, Y.; Kleywegt, S.; Tabe, S.; Farnood, R.; Beck, J.; Bromirski, M.; Ghosh, D. Routine, Targeted and Non-Targeted Analysis of Environmental Contaminants of Emerging Concern - Development and Validation of a UHPLC Orbitrap MS Method. Thermo Fisher Scientific Inc, **2013**.
- [44] Claeys, M.; den Heuvel, H.V.; Chen, S.; Derrick, P.J.; Mellon, F.A.; Price, K.R. Comparison of High- and Low-Energy Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry in the Analysis of Glycoalkaloids and Their Aglycons. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1996**, *7*, 173–181.
- [45] Ruff, M.; Mueller, M.S.; Loos, M.; Singer, H.P. Quantitative Target and Systematic Non-Target Analysis of Polar Organic Micro-Pollutants along the River Rhine Using High-Resolution Mass-Spectrometry – Identification of Unknown Sources and Compounds. *Water Res.*, **2015**, *87*, 145–154.

- [46] Liigand, J.; Kruve, A.; Liigand, P.; Laaniste, A.; Girod, M.; Antoine, R.; Leito, I. Transferability of the Electrospray Ionization Efficiency Scale between Different Instruments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26*, 1923–1930.
- [47] Carbajo, J.B.; Petre, A.L.; Rosal, R.; Herrera, S.; Letón, P.; García-Calvo, E.; Fernández-Alba, A.R.; Perdigón-Melón, J.A. Continuous Ozonation Treatment of Ofloxacin: Transformation Products, Water Matrix Effect and Aquatic Toxicity. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *292*, 34–43.
- [48] Osano, O.; Admiraal, W.; Klamer, H.J.C.; Pastor, D.; Bleeker, E. a. J. Comparative Toxic and Genotoxic Effects of Chloroacetanilides, Formamidines and Their Degradation Products on *Vibrio Fischeri* and *Chironomus Riparius*. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987.* **2002**, *119*, 195–202.
- [49] Sinclair, C. J.; Boxall, A. B. A. Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 4617-4625.
- [50] Li, Z.; Maier, M.P.; Radke, M. Screening for Pharmaceutical Transformation Products Formed in River Sediment by Combining Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry with a Rapid Data-Processing Method. *Anal. Chim. Acta.* **2014**, *810*, 61–70.
- [51] Ruttkies, C.; Schymanski, E.L.; Wolf, S.; Hollender, J.; Neumann, S. MetFrag Relunched: Incorporating Strategies beyond in Silico Fragmentation. *J. Cheminformatics.* **2016**, *8*.
- [52] EAWAG-BBD Pathway Prediction System. <http://eawag-bbd.ethz.ch/predict/> viimati uuendatud 30.06.2014.
- [53] MAGMa Online. <http://www.emetabolomics.org/magma> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [54] Kind, T.; Fiehn, O. Seven Golden Rules for Heuristic Filtering of Molecular Formulas Obtained by Accurate Mass Spectrometry. *BMC Bioinformatics.* **2007**, *8*, 1.
- [55] Randic, M.; Trinajstić, N. On isomeric Variations in Decanes. *Match.* **1982**, *13*, 271-290.
- [56] Valgenberg, G. Pindaktiivsete ainete ja plastikutest leostuvate kui saasteainete kui saasteainete tuvastamine ning identifitseerimine FT-ICR massispektromeetria meetodil. *Bakalaureusetöö*, **2015**.
- [57] European Commission. EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN> viimati uuendatud 07.04.2016.
- [58] US EPA, O. Contaminant Candidate List 3 - CCL 3. <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-3-ccl-3> viimati uuendatud 29.09.2017.
- [59] Wood, A. Compendium of Pesticide Common Names. <http://alanwood.net/pesticides/index.html> viimati uuendatud 8.05.2017.
- [60] Ravimiregister. <http://ravimiregister.ravimiamet.ee/default.aspx?pv=VetRavimid.Otsing> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [61] ter Laak, T.L.; Puijker, L.M.; van Leerdam, J.A.; Raat, K.J.; Kolkman, A.; de Voogt, P.; van Wezel, A.P. Broad Target Chemical Screening Approach Used as Tool for Rapid Assessment of Groundwater Quality. *Sci. Total Environ.* **2012**, *427–428*, 308–313.
- [62] Aravinna, A.G.P.; Alwis, H.D. Determination of Pesticide Residues in Water by Solid Phase Extraction and GC/ ECD, NPD. *ResearchGate.* **2003**, *1*, 1–5.
- [63] Schultz, D.; Ball, C. H. Agilent's new octadecylsilane solid-phase extraction cartridges. Technical note. 2008.
- [64] Joogivee kvaliteedi- ja kontrollinõuded ning analüüsimeetodid – Riigi Teataja. <https://www.riigiteataja.ee/akt/111012013002> viimati alla laetud 18.05.2017.

- [65] Jiang, H.; Li, Y.; Pelzer, M.; Cannon, M.J.; Randlett, C.; Junga, H.; Jiang, X.; Ji, Q.C. Determination of Molindone Enantiomers in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Macrocyclic Antibiotic Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A*. **2008**, *1192*, 230–238.
- [66] U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological profile for di-n-butyl phthalate. **2001**.
- [67] Roots, O.; Nõmmsalu, H. Aruanne veekeskonnale ohtlike ainete sõeluringu tulemustest Eestis. <http://www.baltacthaz.bef.ee/> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [68] Nurk, G.; Plees, R.; Kõrgmaa, V.; Vooro, K.; Laht, M. Prioriteetsete ohtlike ainete allikaanalüüs Halliste jões Abja-Paluoja piirkonnas reostusallika kindlaks määramiseks ning reostuse lõpetamiseks. **2014**.
- [69] Zou, Y.; Cai, M. Determination of Phthalates Concentration in Toys and Children's Products. Agilent Technology, **2013**.
- [70] Lake; Cook; Worrell; Cunninghame; Evans; Price; Young; Carpanini. Dose-Response Relationships for Induction of Hepatic Peroxisome Proliferation and Testicular Atrophy by Phthalate Esters in the Rat. *Hum. Exp. Toxicol.* **1991**, *10*, 67–68.
- [71] Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme S., Choi A.H., PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (Oakland, CA, 2016). <http://www.pesticideinfo.org> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [72] mzCloud – Advanced Mass Spectral Database. <https://www.mzcloud.org/> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [73] Environmental Protection Agency. Thymol; Exemption from the Requirement of a Tolerance. **2009**, *74* (56).
- [74] Hajimehdipoor, H.; Shekarchi, M.; Khanavi, M.; Adib, N.; Amri, M. A Validated High Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Thymol and Carvacrol in *Thymus Vulgaris* L. Volatile Oil. *Pharmacogn. Mag.* **2010**, *6*, 154–158.
- [75] Caldas, E. D. Cyromazine (169). http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Cyromazine.pdf viimati alla laetud 18.05.2017.
- [76] Agency of Toxic Substances and Disease Registry. <https://www.atsdr.cdc.gov/> viimati uuendatud 15.05.2017.
- [77] Puntarulo, S. Iron, Oxidative Stress and Human Health. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 299–312.
- [78] OÜ Eesti Geoloogiakeskus. Põhjaveekatastrid. <http://www.egk.ee/hydrogeo/pohjaveekataster/index.php> viimati alla laetud 18.05.2017.
- [79] US EPA, O. National Primary Drinking Water Regulations. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations> viimati uuendatud 21.03.2017.

LISAD

Käesolevas töös seirataivate põhjaveekogumite asukohad

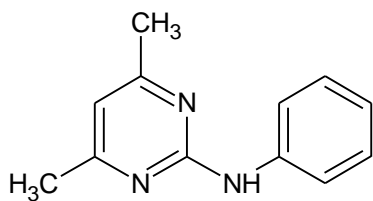


Joonis S1. Seirataivate põhjaveekogumite asukohad.

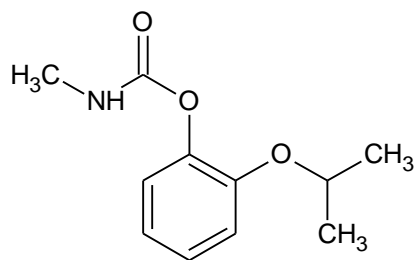
Tabel S1. Põhjaveeproovide asukohad koos veekihi sügavustega maapinnast ning veekompleksiga. S – Siluri; Q – kvaternaari; O – ordoviitsiumi; O-C – ordoviitsiumi-kambriumi; V2gd – Vendi ladestu Gdovi kihistu; C-V – kambriumi-vendi; V2vr – Vendi ladestu Voronka kihistu. [78]

Proovi number	Asukoht	Veekompleks	Veekihi sügavus maapinnast (m)
PR 1	Ida-Viru, Illuka vald, Kurtna küla	O-C	105
PR 2	Jõgeva maakond, Põltsamaa vald, Võisiku küla	O-C	334
PR 7	Jõgeva maakond, Põltsamaa vald, Mällikvere küla	S	75
PR 8	Harju, Tallinn, Väike-Õismäe, Paldiski mnt.123	Q	7
PR 10	Järva maakond, Türi vald, Türi-Alliku küla	S	60
PR 12	Lääne maakond, Lihula vald, Lihula vallasisene linn	S	101
PR 13	Otiku küla, Eivere lubjakivi karjääri territoorium, pk 2	S	25
PR 14	Ida-Viru maakond, Sonda vald, Sonda alevik	O	40,1
PR 16	Rapla maakond, Kohila vald, Salutaguse küla	V2gd	290
PR 18	Harju maakond, Tallinn, Haabersti linnaosa	Q	7
PR 20	Harju maakond, Saku vald, Saku alevik	C-V	235
PR 21	Viljandi maakond, Suure-Jaani vald, Lõhavere küla	S	60,5
PR 24	Harju maakond, Maardu linn	V2gd	161
PR 30	Harju maakond, Tallinn, Põhja-Tallinna linnaosa	V2vr	142
PR 31	Lääne-Viru maakond, Rakvere linn	V2vr	222
PR 32	Harju maakond, Padise vald, Vintse küla	O	40

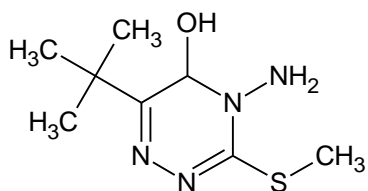
Proovide rikastamisel kasutatud pestitsiidide struktuurid



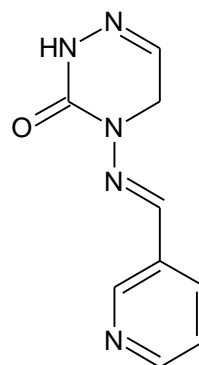
1. Pürimetaniil



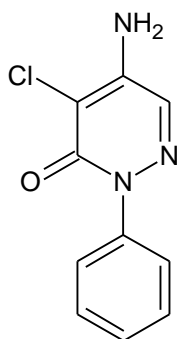
2. Propoksuur



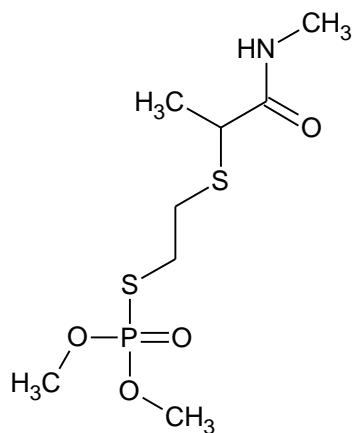
3. Metribusiin



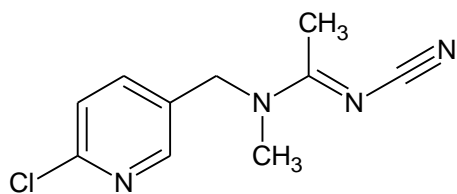
4. Pümetrosiin



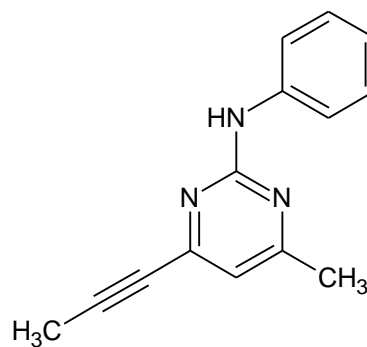
5. Kloridasoon



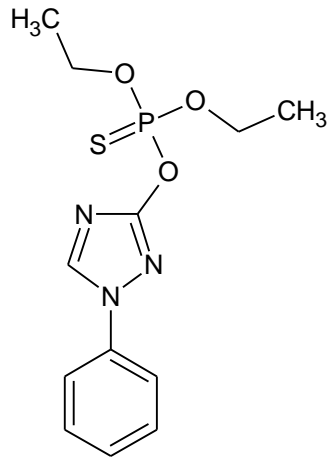
6. Vamidotioon



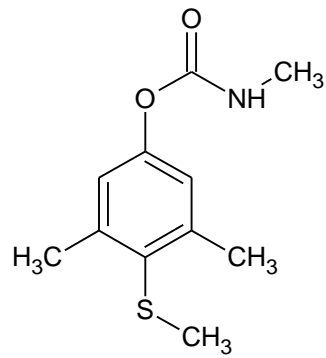
7. Atsetampiriid



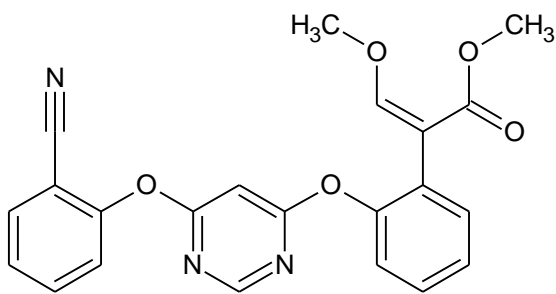
8. Mepanipüriim



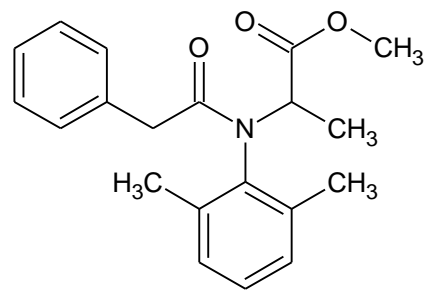
9. Triasofoos



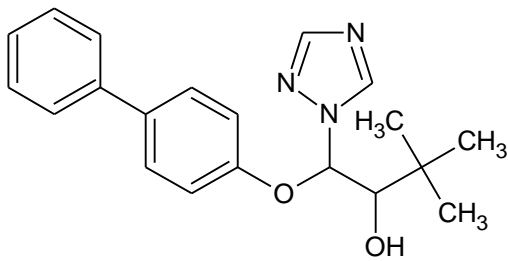
10. Metiokarb



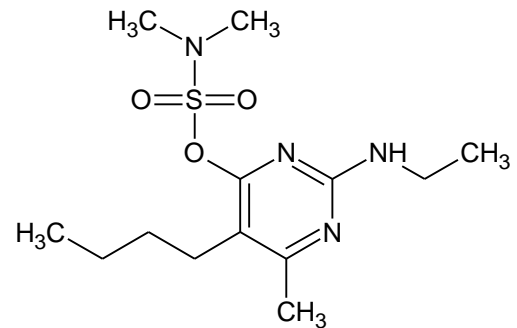
11. Asoksüstrobiin



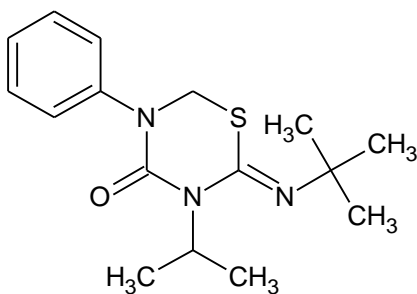
12. Benalaksüül



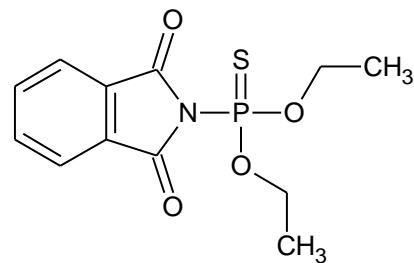
13. Bitertanool



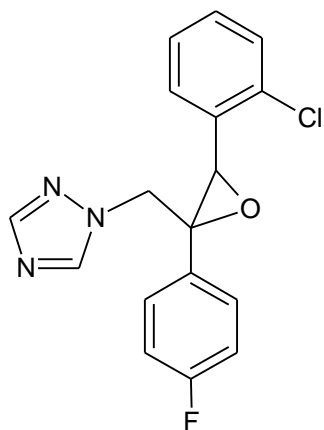
14. Bupirimaat



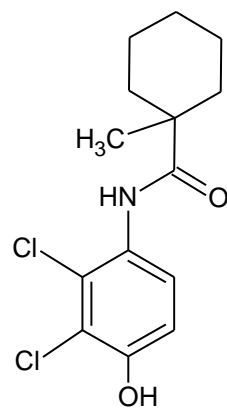
15. Buprofeesiin



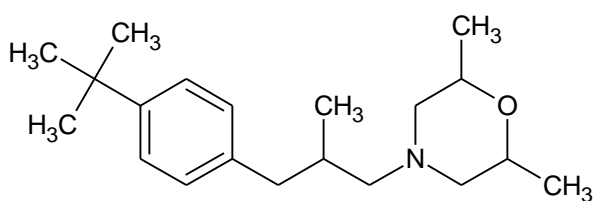
16. Ditalimfos



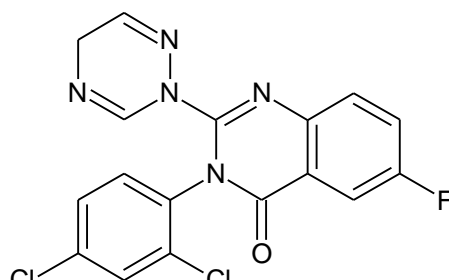
17. Epoksikonasool



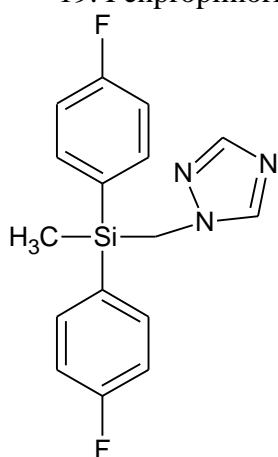
18. Fenheksamiid



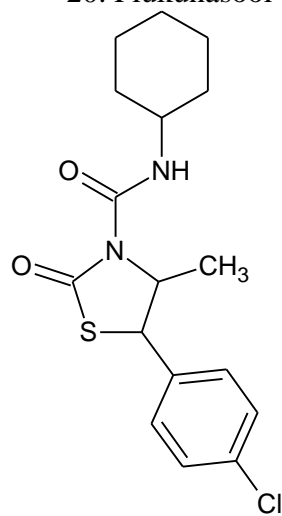
19. Fenpropimorf



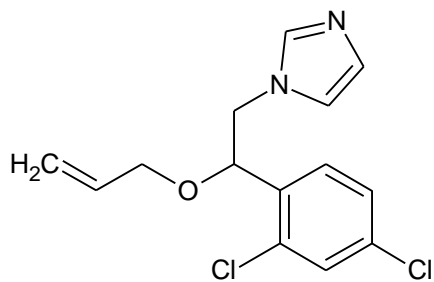
20. Flukonasool



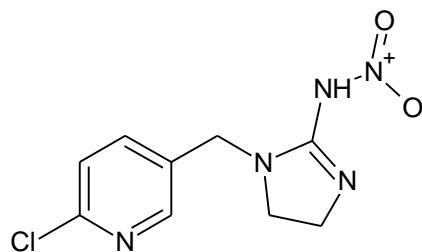
21. Flusilasool



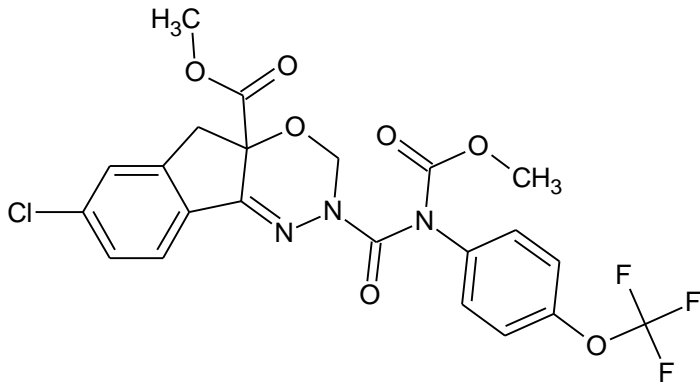
22. Heksütiasoks



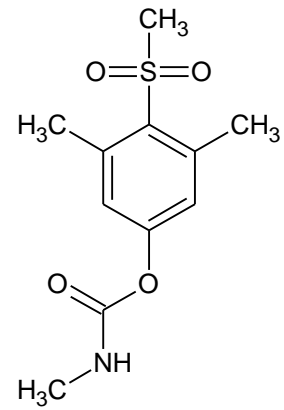
1. Imasaliil



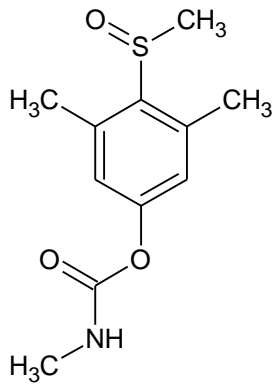
2. Imidaklopriid



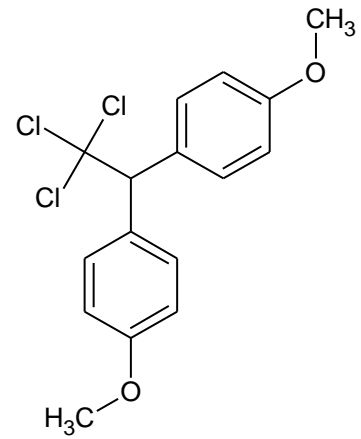
3. Indoksakarb



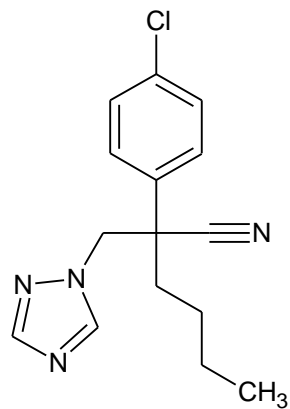
4. Metiokarbsulfoon



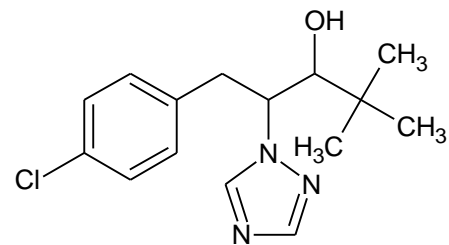
5. Metiokarb sulfoksiid



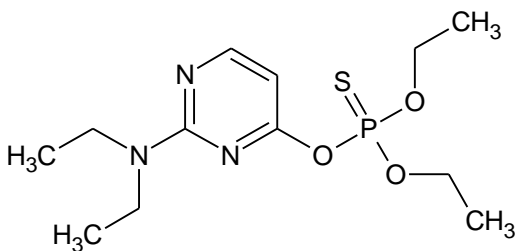
6. Metoksükloor



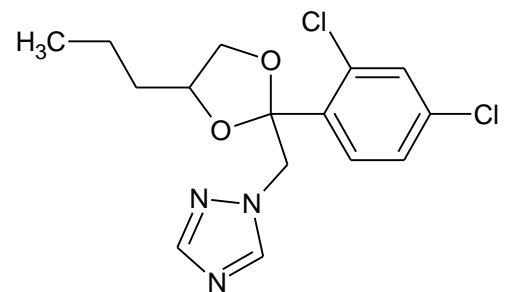
7. Müklobutaniil



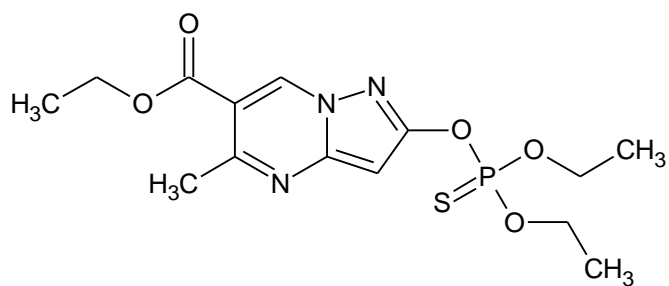
30. Paklobutrasool



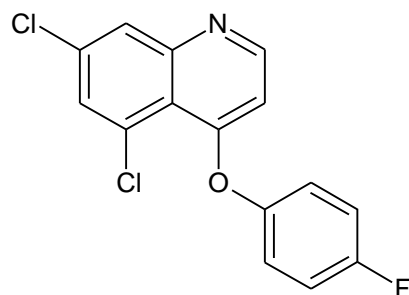
31. Pirimifoss-etiül



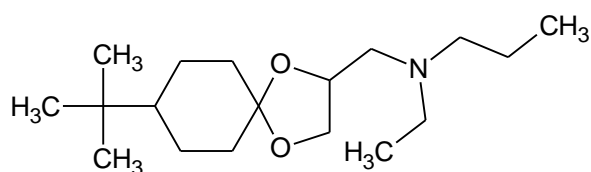
32. Propikonasool



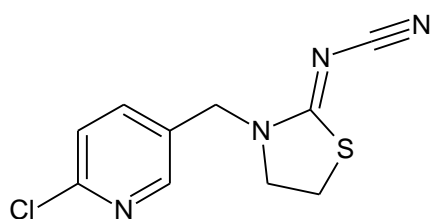
33. Pürasofoss



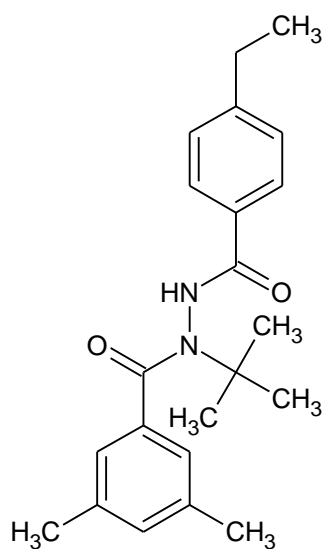
34. Kinoksüfeen



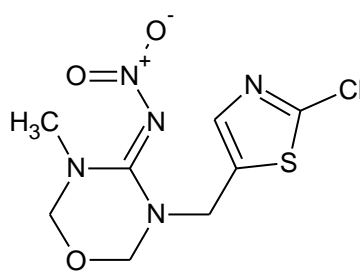
35. Spiroksamiin



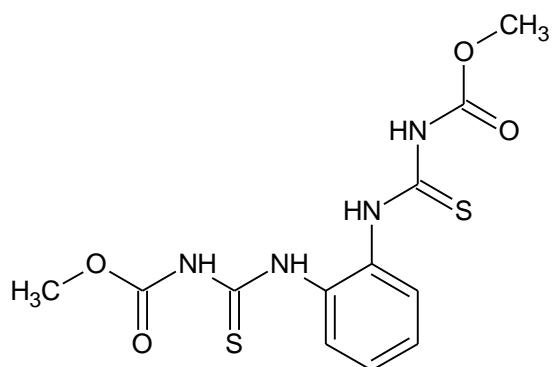
36. Tiaklopriid



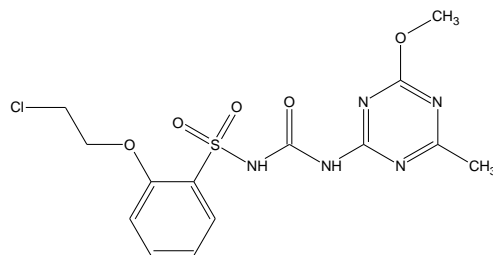
37. Tebufenosiid



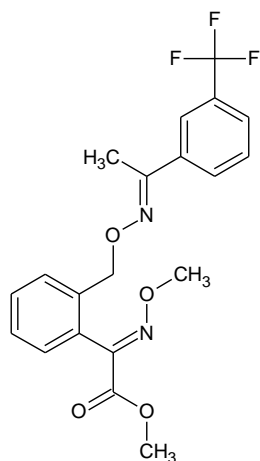
38. Tiametoksaam



39. Tiofanaat-metiül

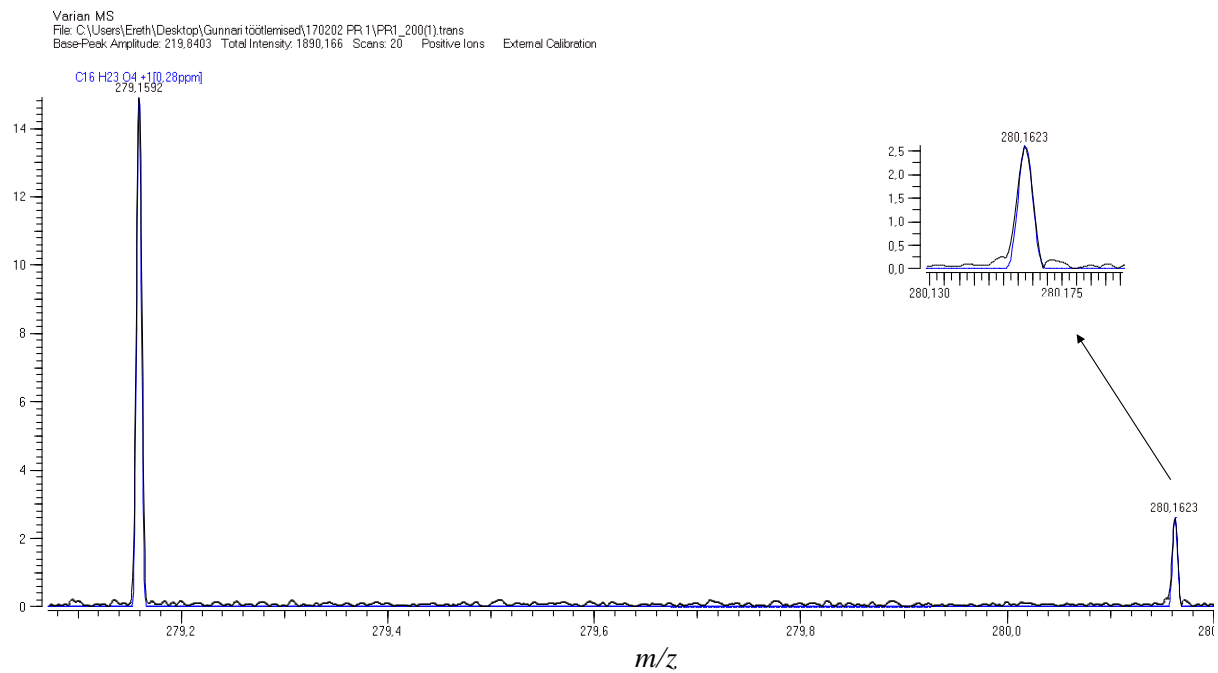


40. Triasulfuroon

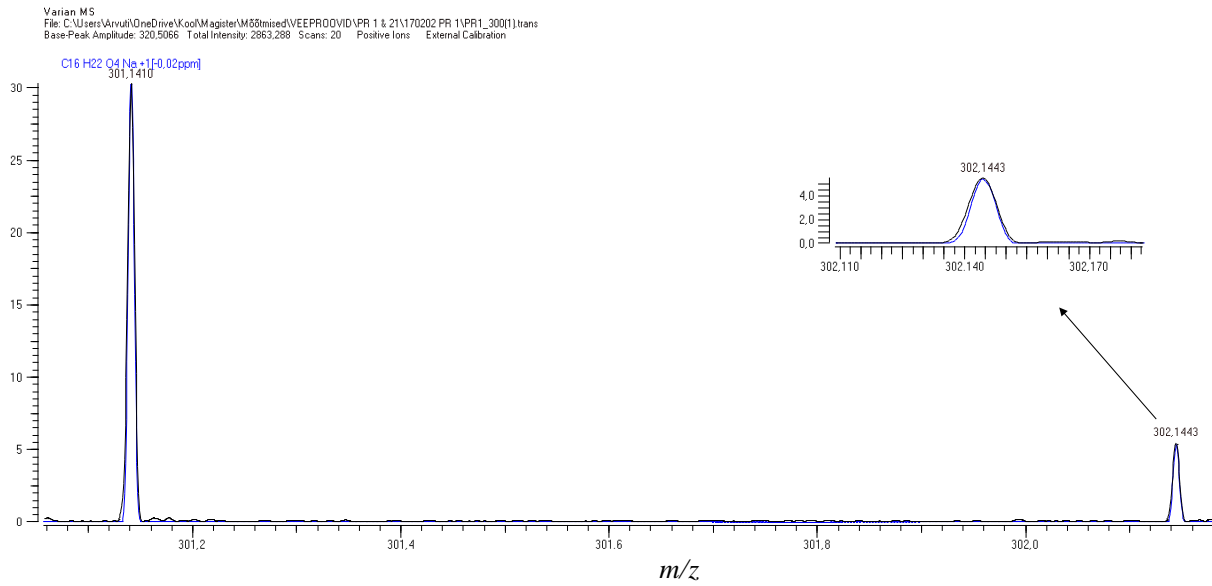


41. Trifloksüstrobiin

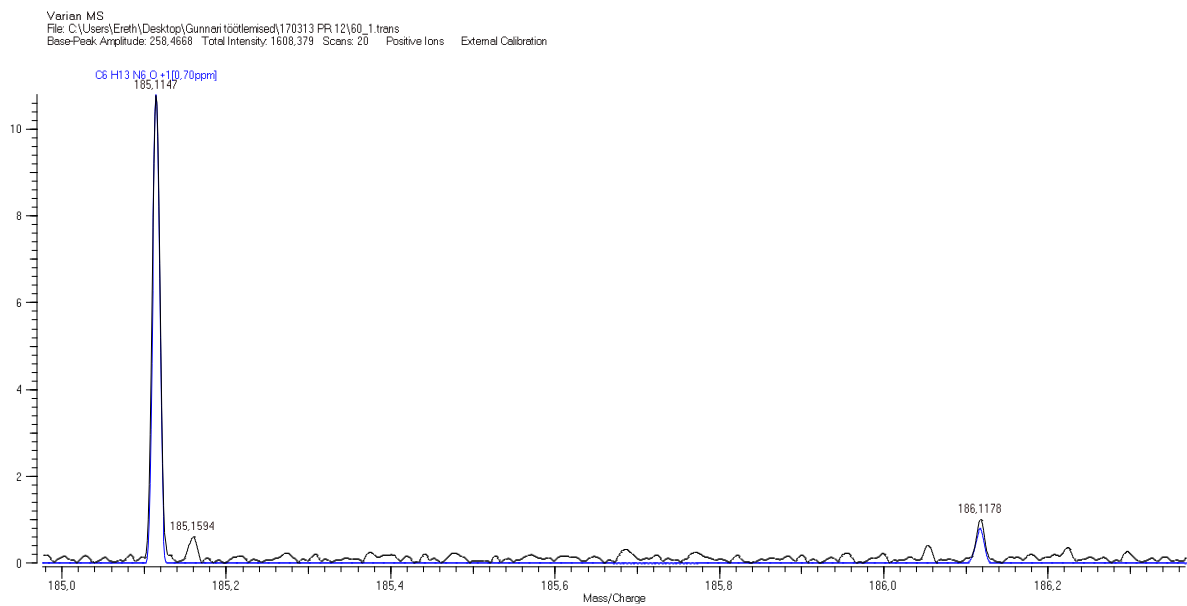
Massispektrid



Joonis S2. Dibutüülfalaadi $[M+H]^+$ vorm isotoopmustriga.

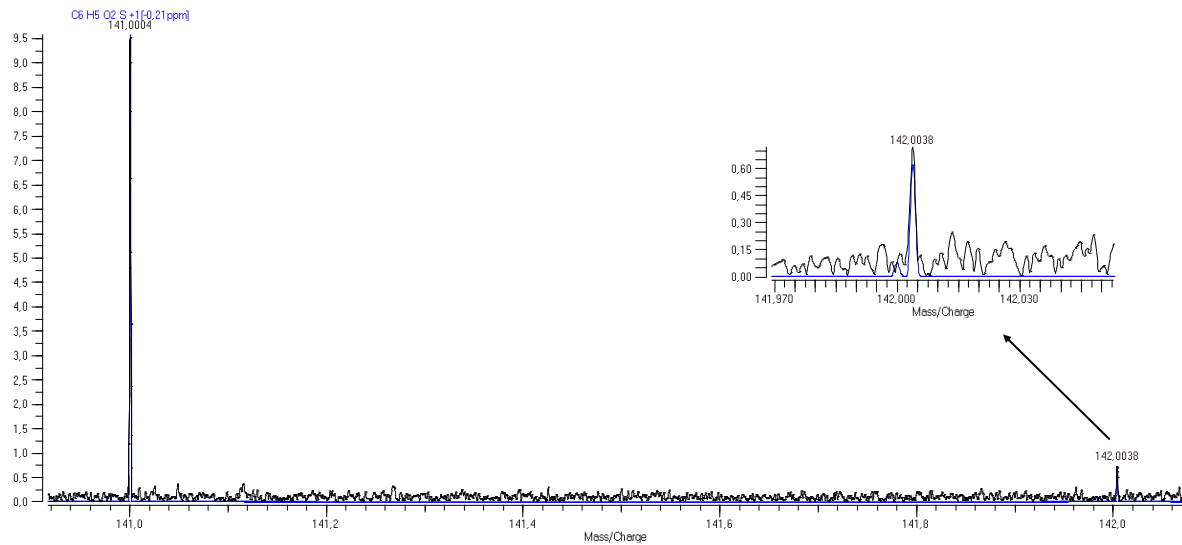


Joonis S3. Dibutüülfalaadi $[M+Na]^+$ vorm isotoopmuustriga.



Joonis S5. $C_6H_{13}N_6O^+$ massispekter isotoopmuustriga.

Varian MS
 File: C:\Users\Ereth\Desktop\Gunnari töötlemised\170322 PR 13160_1.trans
 Base Peak Amplitude: 104,4431 Total Intensity: 570,732 Scans: 20 Positive Ions External Calibration



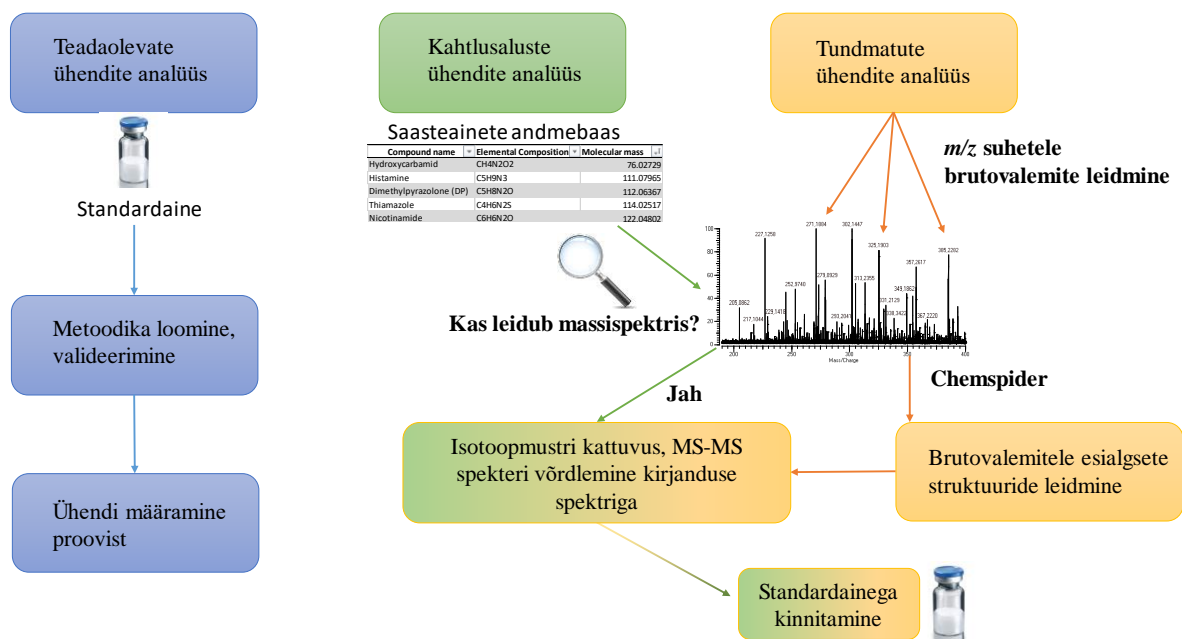
Joonis S6. C₆H₅O₂S⁺ massispekter koos isotopmustriga.

Elementanalüüsi tulemused

Tabel S2. Põhjavee proovide elementanalüüsi tulemused. Mustaga on toodud Eestis sätestatud piirmäärad joogiveele, sinisega indikaatorite piirmäärad ning punasega on toodud piirmäärad, mis kehtivad Ameerika Ühendriikides joogiveele. [64,79]

	Piirmäär	PR 1 R	PR 2 R	PR 7 R	PR 8 R	PR 10 R	PR 12 R	PR 13 R	PR 14 R	PR 16	PR 18 R	PR 20 R	PR 21 R	PR 24 R	PR 30 R	PR 31	PR 32 R	
Be	4	ug/l	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	
B	1000	ug/l	405	649	19	62	55	1293	21	163	554	30	134	131	65	124	160	881
Na	200000	ug/l	15004	110350	7337	67086	4120	176917	16202	4408	16917	10242	27302	26446	90435	31698	74984	81560
Mg	-	ug/l	16322	6047	23000	15044	36214	22370	12839	36206	22397	16031	4942	21446	16099	11470	11256	35102
Al	200	ug/l	29,0	21,8	25,6	26,9	12,9	8,4	9,6	11,0	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
K	-	ug/l	3607	5362	1992	8453	3810	7714	987	7967	6057	2287	3351	9192	9133	6948	6192	10537
Ca	-	ug/l	8843	7134	39489	36618	22247	8880	29135	199641	7919	67944	12339	11254	49374	7571	16333	19732
V	-	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Cr	50	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Mn	50	ug/l	1,0	3,7	23,3	223,0	1,3	1,3	56,5	20,6	0,7	362,6	9,4	< 1	21,1	4,5	23,8	39,8
Fe	200	ug/l	149,0	112,2	1696,6	277,7	105,8	48,4	115,9	101,9	25,1	94,3	41,6	10,7	52,9	26,4	21,7	150,0
Co	-	ug/l	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Ni	20	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,6	1,3	1,4	1,4	1,5	0,5	< 0,5	0,6	0,8	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,7
Cu	2000	ug/l	1,2	0,6	< 0,5	0,6	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	10,7	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Zn	-	ug/l	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	16,3	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
As	10	ug/l	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Se	10	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Mo	-	ug/l	< 1	< 1	1,4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	2,9	2,0	2,2	1,4	< 1	1,4
Cd	5	ug/l	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Sn	-	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Sb	-	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Ba	2000	ug/l	40,0	8,2	222,4	16,9	216,0	109,6	14,8	39,2	23,8	30,4	53,8	81,6	138,0	24,1	406,6	42,0
Hg	1	ug/l	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Tl	2	ug/l	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Pb	10	ug/l	3,6	2,3	1,8	2,2	1,7	1,2	0,8	0,6	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
U	30	ug/l	0,3	< 0,1	0,6	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,6	1,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Analüsitüüpide skeem



Joonis S7. Analüsitüüpide skeem teadaolevate, kahtlusaluste ja tundmatute ühendite analüüsil.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Gunnar Printsman,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Eesti põhjavee analüüsimine tundmatute ja kahtlusaluste ühendite meetodil“,

mille juhendajad on Jaanus Liigand ja Anneli Kruve,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **21.05.2017**