



Umweltanalytik

Eis- aber nicht schadstofffrei

Benzotriazole besitzen ein gesundheitsgefährdendes Potenzial für im Wasser lebende Organismen. Im Rahmen einer Studie wurden hohe Konzentrationen der Chemikalien in Oberflächengewässern gefunden, was darauf hindeutet, dass sie Kläranlagen ungehindert passieren. Eine Überwachung der Benzotriazole in aquatischen Medien erweist sich als notwendig. Analytisches Mittel der Wahl ist die LC-MS/MS.

Mehrere tausend Liter Enteisungsmittel werden benötigt, um ein Langstreckenpassagierflugzeug von Eis zu befreien. Je strenger der Winter, desto größer der Einsatz.

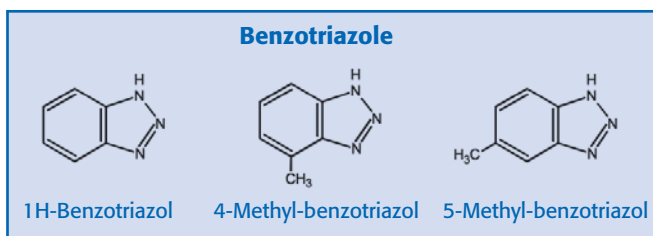
So war es auch in den vergangenen frostigen Wintern. Weil Globalität nur durch Mobilität funktioniert und Flugzeuge, die am Boden bleiben, einen wirtschaftlichen Verlust bedeuten, ist davon auszugehen, dass auch die bevorstehende kalte Jahreszeit den Trend bestätigen wird. Allerdings hatte bereits ein namhafter Hersteller von Flugzeugenteisungsmitteln in weiser Voraussicht angekündigt, sein Versorgungsnetz auszubauen, um den Bedarf in Europa zuverlässig decken zu können [1]. Womit sich eine andere Entwicklung vorhersagen lässt, die Wissenschaftler des Helmholtz-Zentrums Geesthacht in den vergangenen Jahren im Detail untersucht haben [2]. Demnach werden sich wohl auch im kommenden Frühjahr große Mengen Benzotriazole in der Deutschen Bucht nachweisen lassen, also im Wasser der Nordsee, eingetragen über die Flusszuläufe, allen voran den Rhein.

Tonnen von Benzotriazole, lautet eines der Ergebnisse der Helmholtz-Wissenschaftler, sind hierzulande über Abwasserströme und Oberflächengewässer bereits in die Nordsee eingetragen worden. Zu den Benzotriazolen zählen das 1H-Benzotriazol sowie die unter der Sammelbezeichnung Tolytriazole (TT) zusammengefassten Isomere 4- und 5-Methyl-benzotriazol. Die antikorrozierende Wirkung dieser Chemikalien, die auf ihrer Fähigkeit beruht, Metallkomplexe zu bilden, die sich wie eine wisch- und wasserfeste Schutzschicht auf Kupfer, Silber und andere Metalle legen, hat ihre Karriere als Additiv von Flugzeugenteisungsmitteln wie auch von Geschirrspülmitteln, Kühl-, Brems- und Hydraulikflüssigkeiten befördert. Kehrseite der Medaille: Benzotriazole sind als wassergefährdend und giftig für Fische und andere im Wasser lebende Organismen eingestuft.

Chemie der Benzotriazole

Wir, das heißt die TeLA GmbH, unterstützen als Auftragslabor mit Sitz in Bremerhaven insbesondere in der Region ansässige Unternehmen der Lebensmittelbranche und des Fischereigewerbes. Die Labordienstleis-

tungen der TeLA umfassen u. a. die Entwicklung und Etablierung von Methoden für die Flüssigchromatographie, verbunden mit der massenselektiven Detektion (LC/MS) sowie



die Auftragsanalytik im Rahmen von Qualitätssicherung sowie die Überprüfung der Lebensmittelsicherheit. Da sie nachweislich giftig und schädlich für Meeresfrüchte sind, besitzen Benzotriazole eine hohe Relevanz für die TeLA, vor allem falls sich die Chemikalien in Speisefischen anreichern und damit deren Verzehr zu einer Gefährdung des Verbrauchers führen könnte. Aus dieser Betrachtung heraus leitete sich für uns die Frage ab, ob wir labortechnisch derart aufgestellt sind, dass uns die Bestimmung der Benzotriazole gemäß geltender Richtlinien und Nachweisgrenzen in den Matrices „Wasser“ und „Fisch“ hinreichend sensitiv und sicher gelingen würde.

Der Chemismus der Benzotriazole, ihre enorme Löslichkeit in Wasser bzw. polaren Flüssigkeiten, spricht für den Einsatz der HPLC. Dieser Ansatz findet sich auch in der neuen Literatur [2, 3]. Die Entwicklung der im Folgenden vorgestellten automatisierten LC/MS-Methode erfolgte auf Grundlage der Arbeiten von Weber et al. [3]. Die Wissenschaftler der Betriebs- und Forschungslaboratorien des Zweckverbands Landeswasserversorgung Langenau bestimmten 1H-Benzotriazol sowie 4- und 5-Methylbenzotriazol aus Flusswasser ohne Anreicherung mittels LC-MS/MS nach Aufgabe von 100 µL Probe in ein Agilent-1200-Series-HPLC-System. Die Trennung der Komponenten führten sie auf einer C18-Reversed-Phase-Säule (Zorbax Eclipse XDB C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 µm) und mit einem mit Ameisensäure versetzten Eluentengradienten, bestehend aus Wasser und Methanol, durch. Die Detektion erfolgte mit einem API 5000 von Applied Biosystems durch Elektrospray-Ionisation (ESI) im *positive Ion Mode* (ESI). Als Nachweisgrenze ihrer Methode gaben Weber et al. 5 ng/L (LOD) an.

Die Langenauer Wissenschaftler gingen wie Wolschke et al. [2] der Frage nach den Eintragungspfad von Benzotriazolen ins Grundwasser und in Oberflächengewässer

nach. Sie identifizierten schließlich geklärte Abwässer als Verursacher. Im Rahmen einer Posterpräsentation auf dem Langenauer Wasserforum vergangenes Jahr stellten die Wissenschaftler klar, dass im Abwasser meist Tolytriazole dominierten, wohingegen in den Oberflächengewässern und besonders in Grundwässern 1H-Benzotriazol in höheren

Konzentrationen aufträte und eine Verschiebung des Verhältnisses von 1H-Benzotriazol zu Tolytriazolen zu beobachten sei. Laut Weber et al. zeige die chromatographische Unterscheidung der Tolytriazole, dass vorwiegend das 4-Methylbenzotriazol mit einem Faktor von zwei bis zehn über das Abwasser in die Umwelt gelange. In Oberflächengewässern hingegen träten die Isomere im gleichen Konzentrationsbereich auf. Ferner weisen die Wissenschaftler darauf hin, dass sich Benzotriazole mittels Ozonierung und Filtration über Aktivkohle wirksam aus Wasser entfernen lassen. Auf biologische Weise ließen sich Benzotriazole allerdings nicht abbauen [2]. Ihr gesundheitlicher Orientierungswert liege bei 100 ng/L (0,1 ng/mL).

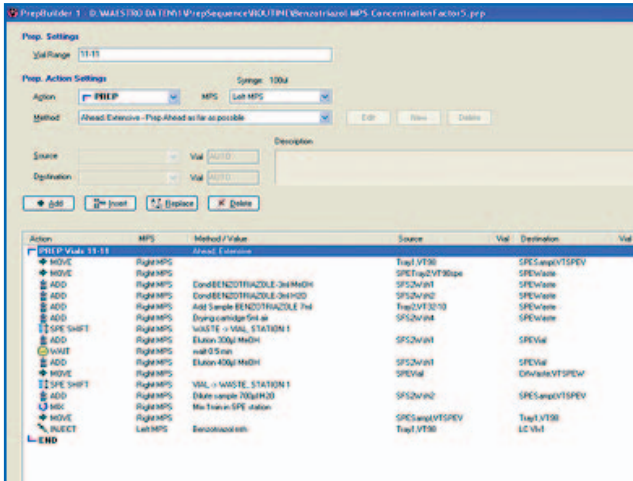
Bestimmungsmethode

Unsere HPLC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Benzotriazole entwickelten wir auf einem UHPLC-System 1290 von Agilent Technologies; zur Detektion wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer 6460 von Agilent Technologies eingesetzt. Es wurden dotierte Wasserproben untersucht, die Einsetzbarkeit der Methoden wurde anhand realer Proben (Oberflächenwasser, Meerwasser, Fisch) evaluiert. Ziel war es, einerseits die von Weber et al. vorgegebene Nachweisgrenze von 5 ng/L zu verbessern und gleichzeitig eine maximale Effizienz der Probenvorbereitung zu erreichen.

Probenvorbereitung

Die Extraktion der Analyten führten wir mittels automatisierter Festphasenextraktion (SolidPhaseExtraction, SPE) durch. Die SPE dient in erster Linie zur Aufreinigung der Probe, um Störungen der Analyse durch die Matrixbestandteile der eingesetzten rea-

Von der TeLa für die Analyse von Benzotriazolen verwendetes MPS-SPE-LC-MS/MS-System.



Die zur Aufreinigung von Oberflächen- und Meerwasser sowie Fischproben durchgeführte Festphasenextraktion verlief automatisiert mit dem GERSTEL-MPS. Das Gesamtsystem inklusive LC/MS lässt sich mit der GERSTEL-MAESTRO- und der LC-MassHunter-Software (Agilent Technologies) über eine integrierte Sequenztafel intuitiv und komfortabel steuern. Die Sequenz einer Probenvorbereitung dauerte im vorliegenden Fall maximal 20 Minuten. Durch eine zeitliche Verschachtelung von Probenvorbereitung und LC-MS/MS-Analyse erreicht der Anwender höchste Produktivität.

len Oberflächenwasser- und Meerwasser- sowie Lebensmittelproben zu verhindern. Die Automatisierung der SPE erfolgte auf der Dual-Head-Version des GERSTEL-Multi-PurposeSampler (MPS); dieser Autosampler verfügt über zwei in alle Raumrichtungen bewegliche Spritzenröhrchen, um einer-

seits großvolumige Flüssigkeiten zu handhaben, wie sie im Rahmen der Probenvorbereitung benötigt werden, andererseits Mikrolitervolumen, die in HPLC-Systeme zu injizieren sind.

LC-MS/MS-Analyse

Die LC-MS/MS-Analyse dauerte pro Lauf

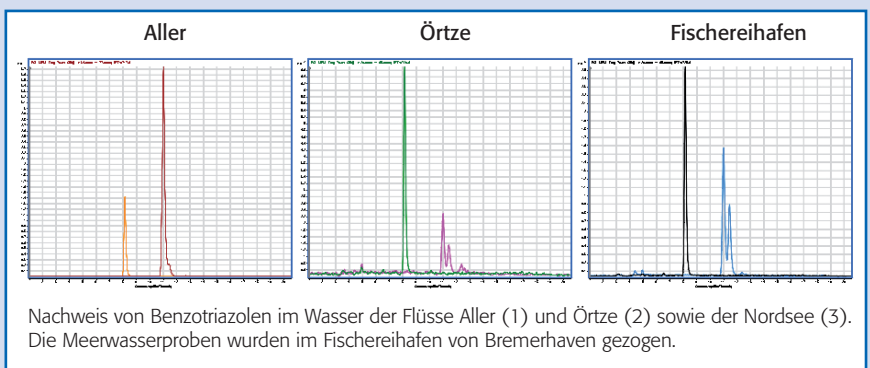
Probenvorbereitung

Die einzelnen Schritte einschließlich der SPE gestalteten sich mit dem GERSTEL-MPS wie folgt:

- Konditionieren der SPE-Kartusche mit 3 mL Methanol
 - Spülen der SPE-Kartusche mit 3 mL Wasser
 - Aufgabe von 7 mL Probe
 - Entfernen der flüssigen Phase mit 5 mL Luft
 - Elution der Analyten vom Säulenbett mit 300 µL Methanol
 - 30 Sekunden später erneute Elution mit 400 µL Methanol
 - Verwerfen der SPE-Kartusche
 - Vereinigttes Eluat mit 700 µL Wasser versetzen
 - Durchmischen des Eluat-Wasser-Gemischs für eine Minute
 - Injektion von 50 µL Probe ins LC-System
- Sämtliche Schritte verliefen automatisiert, nach 15 min war die Probenvorbereitung abgeschlossen.

Bestimmung von 1H-Benzotriazol in Fisch

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Wiederfindung
Ergebnis mit SPE-Aufreinigung				
Dorsch, 50 µg/kg (spike)	48,5	50,1	48,9	97 / 100 / 98 %
Dorsch, 20 µg/kg (spike)	19,5	19,5	19,9	98 / 98 / 100 %
Dorsch, 10 µg/kg spike	9,8	9,7	10,2	98 / 97 / 102 %
Dorsch, blank	< 0,1	< 0,1	< 0,1	
Ergebnis nach direkter Aufgabe des unbehandelten Probenextraktes				
Dorsch, 50 µg/kg (spike)	41,8	41,5	45,3	84 / 84 / 91 %
Dorsch, 20 µg/kg (spike)	16,0	16,8	18,4	80 / 84 / 92 %
Dorsch, 10 µg/kg spike	6,7	6,6	7,0	67 / 66 / 70 %
Dorsch, blank	< 0,1	< 0,1	< 0,1	



Benzotriazol-Konzentration in deutschen Oberflächengewässern in µg/L (Januar 2012)

Probe	1-H-Benzotriazol	4-Methyl- und 5-Methyl-benzotriazol
Aller	1639	171
Örtze	59	6
Fischereihafen	302	76

insgesamt etwa 20 Minuten. Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer C18-Reversed-Phase-Säule (Macherey&Nagel Nucleodur Sphinx C-18, 250 x 2,1 mm, 5,0 µm) unter Anwendung eines Eluentengradienten, bestehend aus 50 mM Ameisensäure (A) und Acetonitril (B): 0,0-6,0 min 30 % B, 6,0-12,0 min 60 % B, 12,0-14,0 min 70 % B, 14,0-14,1 min 30 % B. Die Säule wurde anschließend wieder auf Startbedingungen äquilibriert. Der Säulenfluss betrug konstant 0,3 mL/min bei einer Säulentemperatur von 50 °C, die Detektion der Analyten mittels Elektrospray-Ionisierung im *positive Ion Mode*. Als Inertgas wurde in der eingesetzten Jetstream-Ionenquelle Stickstoff mit einer Temperatur von 320 °C verwendet, die Zerstäubung erfolgte mit einem Druck von 45 psi. An der Düse des Jetstreams lagen 500 V („nozzle voltage“) an, die Temperatur des Jetstreams betrug 300 °C. Die automatisierte SPE-Probenvorbereitung verläuft verschachtelt mit der Analyse, d. h. 5 min nach dem Start des LC-MS/MS-Laufs beginnt der GERSTEL-MPS die nächste Probe vorzubereiten, die damit auf den Punkt bereit zur Injektion ist, wenn der vorangegangene Lauf seinen Abschluss gefunden hat.

Resultate und Schlussfolgerung

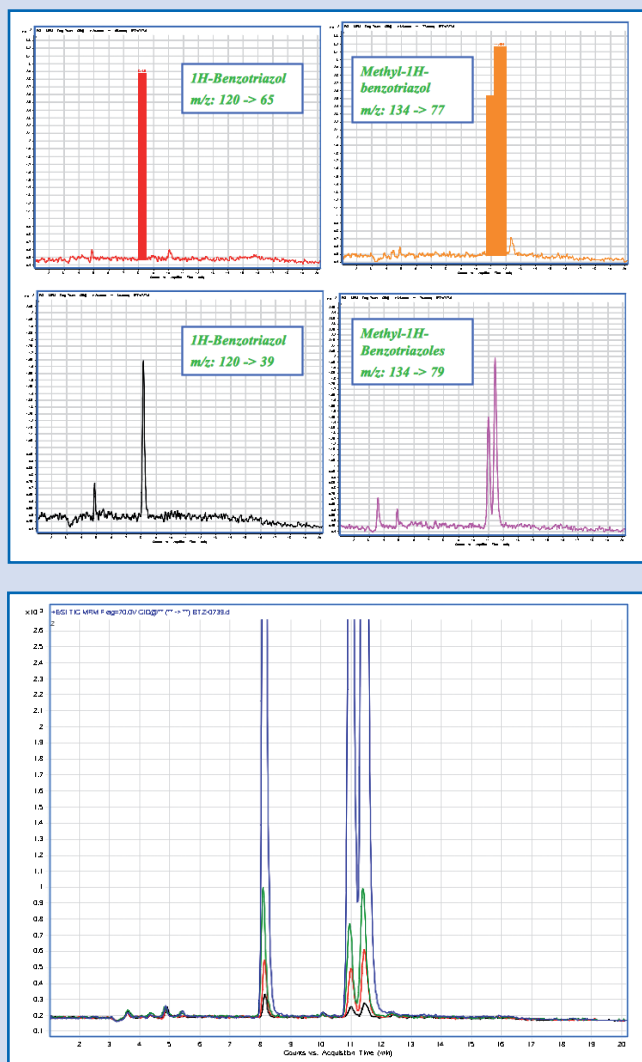
Mit der von uns entwickelten MPS-SPE-LC-MS/MS-Methode bestimmten wir erfolgreich Benzotriazole (1H-Benzotriazol sowie die Isomere 4- und 5-Methylbenzotriazol) in unterschiedlich dotierten Proben, namentlich in Oberflächen-, Fluss- und Meerwasser (Nordsee). Die Bestimmung der Verdünnungsreihe einer Mischung aus den genannten Verbindungen (2, 10, 20 und 200 ng/L) in Leitungswasser ergab eine ausgezeichnete Linearität von > 0,995 und bei einem moderaten Aufkonzentrierungsfaktor von 5 eine Bestimmungsgrenze von < 1 ng/L (LoQ). Matrixeffekte wurden nach der Aufarbeitung in keiner der untersuchten Wasserproben (z. B. Flusswasser, Hafenwasser) beobachtet. Mit diesem Resultat mehr als zufrieden, hatten wir doch unser erstes Ziel, die von Weber et al. vorgegebene Nachweisgrenze signifikant zu unterschreiten, bereits erreicht, gingen wir dazu über, Proben, gezo-gen im Januar 2012 in den niedersächsischen Flüssen Aller und Örtze sowie im Fischereihafen Bremerhaven (Nordseewasser), auf ihre tatsächliche Kontamination mit Benzo-

triazolen zu untersuchen. Ergebnis: In allen drei aquatischen Kompartimenten fanden wir Rückstände der drei Verbindungen in mehr oder weniger großen Mengen. Anschließend bestimmten wir 1H-Benzotriazol in dotierten Fischproben (Dorsch), einerseits nach automatisierter SPE als Aufreinigungsschritt, andererseits nach direkter Aufgabe des rohen Probenextrakts. Das Resultat spricht für sich: Während die Proben, die mittels SPE aufgereinigt worden waren, Wiederfindungsraten von nahezu 100 % ohne das Anzeichen von Matrixeffekten erbrachten, zeigte die Analyse des rohen Probenextraktes signifikante Matrixeffekte. Und das umso stärker, je geringer die Konzentration des aufdotierten Benzotriazols war. Die durch Matrixeffekte beeinflusste Wiederfindung lag bei der Untersuchung der Rohextrakte zwischen 60 bis 80 Prozent.

Das erzielte Resultat der vorliegenden Studie belegt die Funktions- und Praxis-tauglichkeit der von uns entwickelten Methode für die Anwendung auf wässrige und Lebensmittelmatrices; die Bestimmungsgrenze lag in Wasserproben bei < 1 ng/L. Es zeigt sich, dass in Flüssen in Niedersachsen mitunter sehr hohe Benzotriazol-Konzentrationen bestehen; leider bot die Studie keinen hinreichenden Raum, um den Ursachen dieser hohen Werte, sprich: den Ursachen für die Kontamination, nachzugehen.

Die vorliegende Untersuchung zeigt indes, dass unsere SPE-Aufreinigung sehr gut geeignet ist, um die genannten Analyten mit hoher Wiederfindung und guter Linearität in komplexen Lebensmittelmatrices, im vorliegenden Fall Dorsch, zu bestimmen.

Eine weitere Studie zwecks Überprüfung der Kontamination von Fischen wird derzeit durchgeführt.



MS/MS-Chromatogramme der Benzotriazole. Die Aufzeichnung erfolgte unter Einsatz einer wässrigen Standardlösung (10 ng/L).

Chromatogramm von mit 2, 10, 20 und 200 ng/L Benzotriazol dotiertem Leitungswasser nach der SPE-Aufreinigung: Die Wiederfindung lag bei 100 %, die Linearität der Kalibrierung bei > 0,995. Der Anreicherungsfaktor 5 lässt sich als moderat einstufen, wobei eine Bestimmungsgrenze von < 1 ng/L (Limit of Quantification, LoQ) erreicht wurde.

Literatur

- [1] CHEManager 16 (2011) 23-24
- [2] H. Wolschke, Z. Xie, A. Möller, R. Sturm, R. Ebinghaus: Occurrence, distribution and fluxes of benzotriazoles along the German large river basins into the North Sea. Water Research 45 (2011) 6259-6266
- [3] W. H. Weber, W. Seitz, W. Schulz: Eintragspfade von Benzotriazolen in das Grundwasser und deren Verhalten am Beispiel Donauried-Hürbe. Posterpräsentation auf dem Langenauer Wasserforum 2012

Autoren

Dr. Norbert Helle, Franziska Chmelka, TeLA GmbH, Fischkai 1, 27572 Bremerhaven, Telefon 0471 / 4832 430, www.tela-bremerhaven.de