

# Herbizide bestimmen – geht's noch sensitiver?

Die Bestimmung von Pestizidrückständen in Nahrungsmitteln und Wasser ist fester Bestandteil der Routineanalytik eines Auftragslabors, das sich auf die Kontrolle und Überwachung der Güte und Qualität von Lebens- und Nahrungsmitteln fokussiert hat. Effizienz ist dabei unerlässlich. Die Strategie liegt in einer taktisch klugen Automatisierung. Die Online-SPE (SPE<sup>X05</sup>) von GERSTEL mit zusätzlicher Aufreinigung gewährleistet höhere Sensitivität bei gleichzeitig niedrigen Bestimmungsgrenzen.

Von Dr. Norbert Helle und Franziska Chmelka, TeLA GmbH

Zu den häufig vor allem im Obstanbau eingesetzten Unkrautvernichtungsmitteln (Herbiziden) gehören Präparate, die Phenylharnstoff- oder Triazinderivate enthalten. Beide Wirkstoffklassen werden von der Pflanze über die Wurzeln aufgenommen und in die Chloroplasten transportiert, wo sie den Prozess der Photosynthese stören, was letztlich zu einem Absterben der Pflanze führt.

Es liegt in der Natur der Unkrautvernichtung mittels chemischer Präparate,

dass Rückstände, auch von Pestiziden, die nach ihrer Ausbringung vornehmlich in der obersten Bodenschicht verbleiben, die tieferliegenden Wurzeln der Kulturpflanze erreichen und von dieser aufgenommen oder noch weiter in die Umwelt eingetragen werden. Bekannt ist, dass Pestizide vor allem in Grund- und Oberflächenwasser, wichtige Trinkwasserspeicher, einsickern.

Um eine Gesundheitsgefährdung durch Pestizidrückstände zu minimieren, hat der Gesetzgeber die Belastung des Trinkwas-

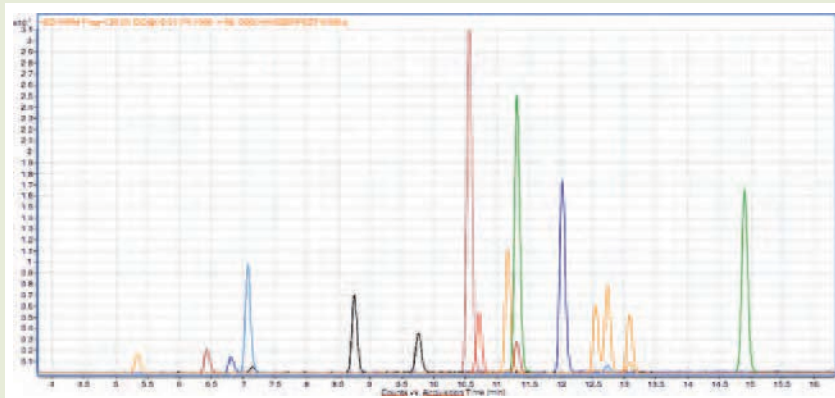
sers bezogen auf den einzelnen Wirkstoff beziehungsweise relevante Metaboliten auf 0,1 µg/L begrenzt. Ein geeignetes Analyseverfahren sollte mit 0,01 µg/L eine Bestimmungsgrenze aufweisen, die noch um eine Zehnerpotenz niedriger ist. Diese zu erreichen wird konventionell oft nur möglich durch eine Anreicherung der Analyten aus einem großen Probenvolumen (einige 100 mL) mit anschließender Injektion eines Aliquots des (reduzierten) Extrakts in ein leistungsfähiges, sensitives HPLC/MS-Sys-



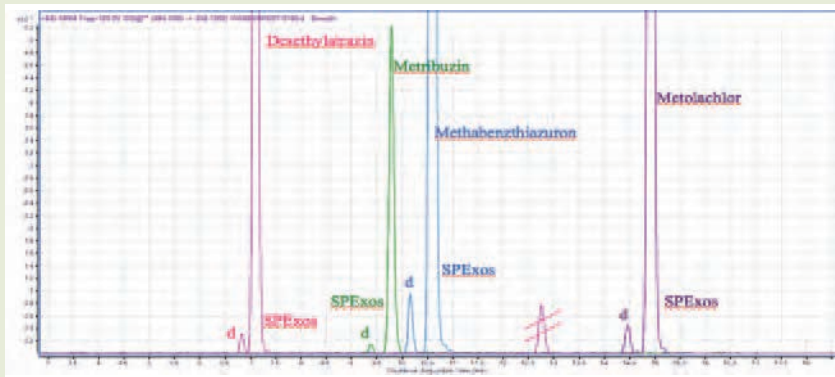
Pestizidrückstände können sich im Grund- und Oberflächengewässern anreichern.



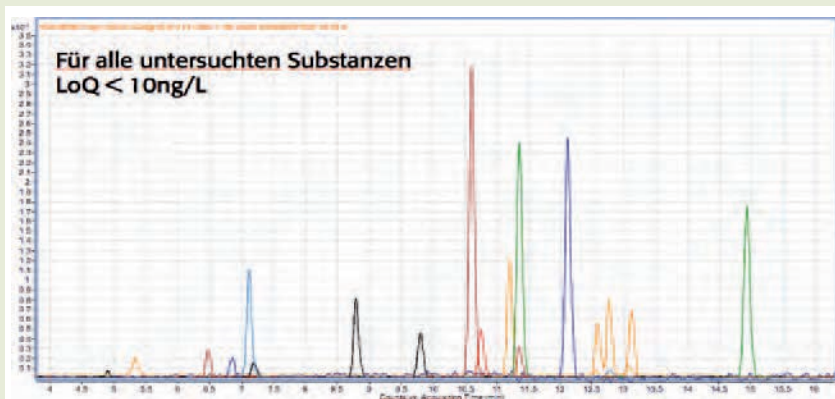
Probenvorbereitung und HPLC-Analyse verlaufen zeitlich effizient verschachtelt.



Standardmischung der Zielanalyten (100 ng/L) nach Extraktion und Aufreinigung unter Einsatz der SPEXOS-Einheit.



Deutliche Sensitivität: Vergleich der HPLC-Triple-Quad-Bestimmung einer Standardmischung (100 ng/L) nach SPEXOS und Direktinjektion von 50 µL (d).



Standardmischung der Zielanalyten (10 ng/L) nach Extraktion und Aufreinigung unter Einsatz der SPEXOS-Einheit. Für alle untersuchten Substanzen wurde eine Bestimmungsgrenze (LoQ) von < 10 ng/L erreicht.

tem. Ungeachtet dessen lassen sich nicht immer alle Substanzen bestimmen.

Aktuell geht man dazu über, größere Probenvolumina (bis 100 µL) direkt in das LC-System zu injizieren. Alternativ lassen sich die fraglichen Analyten mittels Online-Festphasenextraktion (SPE) auf festinstallierten Sammelkartuschen anreichern; ein weitverbreitetes, gängiges Prozedere. Beide Maßnahmen sind allerdings mit gewissen Nachteilen verbunden:

Die Injektion großer Probenmengen (bis 100 µL) kann oftmals zu einer ungünstigen Peakverbreiterung führen. Zudem bedarf es meist eines hochsensitiven, meist hochpreisigen Analysegeräts, um die geforderten Bestimmungsgrenzen zu erreichen.

Die Anreicherung der Analyten auf festinstallierten SPE-Kartuschen wiederum führt nicht selten zu störenden Substanzverschleppungen; ferner ist der damit verbundene vermeintliche Aufreinigungseffekt eher gering: Da die Kartusche üblicherweise von einer Seite beladen und in Gegenrichtung eluiert wird, können Störkomponenten leicht zusammen mit den Analyten auf die Trennsäule gelangen.

## Online-Festphasenextraktion plus Aufreinigung

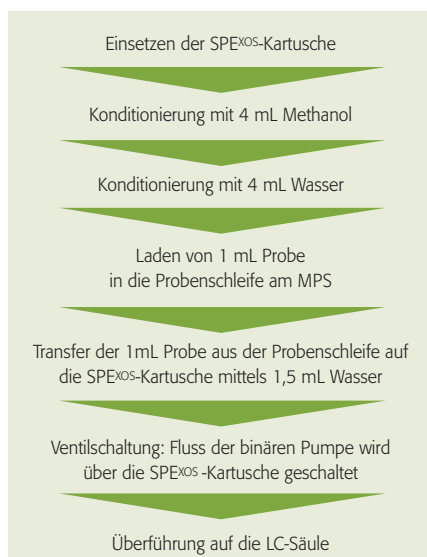
Die Idee lag nahe, den Aufreinigungsschritt der oben beschriebenen Online-SPE-Anreicherung effektiver zu gestalten. Zur Anreicherung einer 1-mL-Wasserprobe verwendeten wir ein spezielles Online-Modul (GERSTEL-SPEXOS), das eben dies erlaubt. Einige technische Details: Verglichen mit der klassischen SPE arbeitet das SPEXOS-Modul mit kleineren Kartuschen; die Sorbensmasse beträgt nur 15 mg im Unterschied zur herkömmlichen SPE mit 50 bis 1000 mg. Die Extraktion lässt sich vollständig in den HPLC-Prozess integrieren, wobei die Elution der Analyten mit signifikant weniger Lösemittel erfolgt. Die SPEXOS-Einheit wird unmittelbar zwischen Autosampler (GERSTEL-MultiPurposeSampler, MPS) und Chromatographie-System (Agilent 1260 HPLC/Triple Quad-MS 6460) geschaltet. Die Aufgabe erfolgt online, das heißt, das Eluat – und damit 100 Prozent der Analyten – wird direkt auf das HPLC-System überführt. Die Analyse erfordert, das zeigte die Pra-



Verwendetes SPEXOS-HPLC-Triple-Quad-System zur Bestimmung von Phenylharnstoff- und Triazin-Herbiziden.

xis, somit nur eine geringe Probenmenge (1-5 mL), verläuft schnell und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz. Ansteuern und in die Methode der Probenvorbereitung einbinden lässt sich die SPEXOS-Einheit komfortabel per Mausklick im Menü der MAESTRO-Steuerungssoftware; die Probenvorbereitung wiederum verläuft auf Wunsch zeitlich mit Chromatographie und Detektion der Analyten verschachtelt (PrepAhead-Funktion).

Der Einsatz eines SPEXOS-Moduls, überlegten wir bei der Methodenplanung, barg einige interessante, der Sache dienliche Aspekte: Da sich die SPE-Kartuschen automatisch vor jeder Probe auswechseln lassen, war mit Verschleppungen nicht zu rechnen. Der Reinigungseffekt wäre größer, da die Analyten das gesamte Sorbensbett der Kartusche in Beladungsrichtung zu durchwandern hätten und Störkomponenten somit effektiver zurückgehalten würden; zudem wären unterschiedliche beziehungsweise spezifische Clean-up-Schritte denkbar und möglich, da sich verschiedene Sorbensmaterialien einsetzen ließen, wahlweise auch



Vom MPS automatisiert ausgeführte Schritte der Probenvorbereitung.

Action	MPS	Method / Value	Source	Vial	Destination	Vial
PREP Vials 1-5		No Overlap				
CARTRIDGE	Left MPS	LOAD	Left Rack		Left Clamp	
SWITCH INJ	Left MPS	Active			LC Vw1	
SPE PREP	Left MPS	Cond MeOH 4000µl			LC Vw1	
SPE PREP	Left MPS	Cond_AquaUltraPur 4000µl			LC Vw1	
ADD	Left MPS	Probenaufgabe-1000µl-10ml/Vial	Tray2VT32-10		LC Vw1	
SWITCH INJ	Left MPS	Standby			LC Vw1	
SPE PREP	Left MPS	Spülen mit 1500µl AquaUltraPur			LC Vw1	
SWITCH INJ	Left MPS	Active			LC Vw1	
SPE PREP	Left MPS	Elution mit LC-Pumpe nach Ventilschaltung			LC Vw1	
INJECT	Left MPS	WASSERPEST-SPEXOS-0µl.mth	Tray2VT32-10		LC Vw1	
ADD	Left MPS	Wash valve MeOH	SFS2W/sh1		LC Vw1	
ADD	Left MPS	Wash valve H2O	SFS2W/sh2		LC Vw1	
END						

Screenshot des Probenvorbereitungsablaufs innerhalb der MAESTRO-Software. Die Zusammenstellung der Methode ist intuitiv möglich durch die Wahl der erforderlichen Schritte aus einem übersichtlichen Menü. Probenvorbereitung und HPLC-Analyse verlaufen zeitlich effizient verschachtelt.

sequenziell. Die Fokussierung der Analyten, die sich vollständig und verlustfrei von der kompakten Kartusche auf die Trennsäule überführen lassen, hätte schmale Peaks zur Folge. Soweit die Theorie.

Die Praxis gestaltete sich wie folgt. Als einziger manueller Arbeitsschritt wurden die Wasserproben in Vials abgefüllt und auf dem MPS-Autosampler in Position gebracht. Die weiteren Schritte verliefen von der Software gesteuert vollständig automatisiert (siehe Ablaufdiagramm links).

Die Parameter für die LC/MS-Analyse gestalten sich wie folgt: Eluent A: Ameisensäure 5 mmol/L; Eluent B: Acetonitril, bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,35 mL/min: 0 min: 5 % B – 10 min: 50 % B – 22 min: 100 % B – 22,1 min: 5 % B – Stoppzeit: 28 min. Säulenofentemperatur: 60 °C, Säule: C18-Material. Die Einstellungen am MS (Quelle: Agilent Jetstream): ESI positiv, Gas Temp: 300 °C, Gas Flow: 9 L/min, Nebulizer: 45 psi, Sheath Gas Temp: 270 °C, Sheath Gas Flow: 12 L/min, Capillary: 550OV, Nozzle: 300 V.

### Schlussbetrachtung der Pestizidbestimmung

Jede Methode ist nur so gut, wie sie sich in der Praxis bewährt. Der Einsatz des SPEXOS Moduls, das eine Anreicherung der Analyten bei gleichzeitiger Aufreinigung des Extraktes sowie einen Wechsel der Kartuschen von Probe zu Probe zur Minimierung von Carry-over zulässt, erwies sich als treffend.

Bestimmt wurden in jeweils einem Milliliter Probe folgende Analyten: Metolachlor, Metazachlor, Diuron, Terbutylazin, Metoxuron, Methabenzthiazuron, Chloridazon, Atrazin, Metribuzin, Chlortoluron, Isoproturon, Metamitron, Desethylatrazin und Desisopropylatrazin in jeweils einem Milliliter Wasserprobe.

Das Resultat unserer Methodenentwicklung kann sich sehen lassen: Im Vergleich zu einer Direktinjektion von 50 µL erreichten wir eine Steigerung der Sensitivität um den Faktor 50 – ohne Peakverbreiterung. Lediglich die Retentionszeit verschob sich um eine halbe Minute nach hinten. Verschleppungen (carry-over) wurden nicht beobachtet. Neben der Steigerung der Sensitivität wurde ein deutlich saubererer Extrakt erhalten, was sich langfristig positiv auf das Analysensystem auswirkt. Nicht zuletzt wurde für alle untersuchten Substanzen eine Bestimmungsgrenze von < 10 ng/L erreicht. Die Kalibrierung ergab eine durchweg gute Linearität.

### Autoren

Dr. Norbert Helle, Franziska Chmelka, TeLA GmbH, Handelspark 4, 27624 Geestland, Tel.: 04745 - 931 120, E-Mail: postfach@tela-bremerhaven.de, Internet: www.tela-bremerhaven.de