

Planare SPE und microliter flow injection analysis TOFMS – ein schnelles Pestizid-Screening für Obst und Gemüse

Claudia Oellig (claudia.oellig@uni-hohenheim.de), Hohenheim

Wolfgang Schwack (wolfgang.schwack@uni-hohenheim.de), Hohenheim

Zusammenfassung

Für ein schnelles Pestizid-Screening wurde das vor kurzem entwickelte, hocheffiziente High-Throughput Planar Solid Phase Extraction (HTpSPE) Clean-up mit der hochauflösenden Time-of-Flight Massenspektrometrie (TOFMS) kombiniert. Zur Kopplung wurde eine Mikroliter-Fließinjektionsanalyse (μL -FIA) ohne Chromatographie entwickelt, bei der nur ein einziger Probenpeak innerhalb weniger Minuten erhalten wird. Das resultierende Massenspektrum liefert die gesamte Probeninformation und ermöglicht die simultane Identifizierung aller Pestizide anhand ihrer genauen Massen. Das neue HTpSPE- μL -FIA-TOFMS Screening wurde erfolgreich für diverse dotierte pflanzliche Matrices sowie für Handelsproben eingesetzt. [1]

Einleitung

Die stetig wachsenden Anforderungen des Verbraucherschutzes zur Überprüfung der EU-weit festgelegten Rückstandshöchstgehalte (RHG) in Lebens- und Futtermitteln erfordern die ständige Weiterentwicklung analytischer Methoden. Um die kontinuierlich wachsende Anzahl an Wirkstoffen schneller und sensitiver bestimmen zu können, werden leistungsfähige Methoden benötigt, die vor allem die Analytik sogenannter non-target Substanzen mittels hochauflösender Massenspektrometern (HRMS) ermöglichen, da unbekannte Wirkstoffe oder Abbauprodukte mit den heute standardmäßig eingesetzten Target-MS/MS Methoden nicht erfasst werden.

Um sichere und robuste Ergebnisse in der Rückstandsanalytik von Pestiziden in pflanzlichen und tierischen Proben zu erhalten, ist zuallererst eine sorgfältige Reinigung der Extrakte die wichtigste Voraussetzung, um störende Matrixkomponenten zu entfernen, die in der Gaschromatographie (GC) und der Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt an die MS interferieren und zu den bekannten Matrixeffekten führen. Diese verursachen Signalverstärkung oder Signalunterdrückung, führen zu falsch-negativen und falsch-positiven Treffern und sind für unsichere quantitative Ergebnisse verantwortlich [2-5]. Zur Eliminierung dieser Effekte werden unterschiedliche Clean-up Techniken wie die Gelpermeationschromatographie [6] sowie die Kartuschen- oder die dispersive Festphasenextraktion (cSPE oder dSPE) [7-9] eingesetzt. Zusätzlich werden diverse Kalibriertechniken angewendet wie die matrix-matched Kalibrierung [5, 7-9], das Standardadditionsverfahren [5, 9] oder die Kalibrierung mit Stabilisotop-markierten Standards [4, 5].

Für das hier vorgestellte Pestizid-Screening wurde das bereits für Obst und Gemüse [10] sowie für Tee [11] erfolgreich eingeführte High-Throughput Planar Solid Phase

Extraction (HTpSPE) Clean-up zur effektiven und effizienten Extrakt-Reinigung eingesetzt und mit der HRMS gekoppelt. Mit der Zielsetzung eines einfachen und schnellen target und non-target Screenings wurden die HTpSPE-Extrakte mit einer völlig neuen Microliter-Flow Injection Analysis–Time-of-Flight MS (μL -FIA–TOFMS) Strategie analysiert - ohne eine chromatographische Trennung - und nachfolgend Datenbank-basiert ausgewertet.

Methode

Herstellung der Probenextrakte

Im Handel erhältliche Bio Obst- und Gemüse-Proben (Äpfel, Gurken, rote Trauben, Tomaten) wurden nach der QuEChERS-Methode [12] mit Acetonitril extrahiert. Für die Phasentrennung und zur Regulierung des pH-Wertes wurde ein Puffersalzgemisch bestehend aus Magnesiumsulfat (wasserfrei), Natriumchlorid, Trinatriumcitratdihydrat und Dinatriumhydrogencitratsequihydrat eingesetzt. Ein Aliquot der erhaltenen Probenextrakte wurden anschließend mittels HTpSPE Clean-up gereinigt oder einem dSPE Clean-up [12] unterzogen.

Herstellung der Pestizid-Standardlösungen

Die Probenextrakte wurden mit sieben repräsentativen Pestiziden auf 0,5 – 2,0 mg/kg dotiert: Acetamiprid, Azoxystrobin, Chlorpyrifos, Fenarimol, Mepanipyrim, Penconazol und Pirimicarb. Als interne Standards wurden zur Quantifizierung TDCPP und zur Sichtbarmachung der Pestizid-Zonen Sudan II verwendet.

HTpSPE Clean-up

DC Aluminiumfolien Kieselgel 60 NH₂ F254s (Merck), 20 x 20 cm, wurden zweimal mit Acetonitril vorgewaschen. Nach Schneiden entlang der Vorwaschrichtung auf der Breite von 10 cm ergaben sich zwei 20 x 10 cm Hälften, die für das Clean-up verwendet wurden. Vor der Auftragung wurde die Schicht 2 cm tief in eine 2%ige Ameisensäurelösung in Acetonitril getaucht und getrocknet. Die Probenauftragung (je 50 μL) erfolgte flächenförmig (3 mm x 4 mm) mit dem DC Probenautomat 4 (CAMAG). Das planare Festphasen Clean-up wurde anschließend in der automatischen Entwicklungskammer (CAMAG) durchgeführt. Es erfolgte eine 2-fache Entwicklung mit Acetonitril bis zu einer Laufstrecke von 75 mm und nach 180° Drehung der Folie mit Aceton in Rückwärtsrichtung bis zu einer Laufstrecke von 45 mm. Danach lagen alle Wirkstoffe fokussiert in einer Ziel-Zone vor. Die Plattenaktivität wurde vor beiden Entwicklungen auf 33% rel. Luftfeuchtigkeit eingestellt. Für die visuelle Dokumen-

tation des Clean-up kam der TLC Visualizer (CAMAG) unter 254 nm, 366 nm und Weißlicht-Beleuchtung zum Einsatz.

HTpSPE- μ L-FIA-TOFMS Kopplung

Nach dem HTpSPE Clean-up wurden alle Ziel-Zonen einer Schicht hintereinander mittels TLC-MS Interface (CAMAG) in Autosampler-Vials eluiert; Eluent: Aceto-nitril/10 mM Ammoniumformatpuffer (1/1, v/v), 0,2 mL/min. Jede Ziel-Zone wurde 60 Sekunden eluiert, gefolgt von der Elution an einer freien Stelle der Schicht, um Carryover-Effekte zu vermeiden.

Das μ L-FIA-TOFMS Messsystem bestand aus einer modularen HPLC Anlage (Agilent) mit einer Kapillarpumpe und einem Micro wellplate Autosampler, die ohne eine analytische Trennsäule über eine PEEK-Kapillare und ein nano-Electrospray Ionisation Interface (nano-ESI) an ein TOFMS (LECO) angeschlossen waren. Die direkte Aufgabe der Probe auf das TOFMS erfolgte mittels Fließinjektion in einen Fluss von 2 μ L/min mit einem Injektionsvolumen von 2 μ L. Der Eluent (Acetonitril/0.1% wässrige Ameisensäure, 1/1, v/v) enthielt zusätzlich fünf Substanzen für die Massenkali-
brierung des TOFMS.

Ergebnisse und Diskussion

Die Planar-Chromatographie wurde als integraler Bestandteil der HTpSPE Reinigung eingesetzt, um Wirkstoffe und Matrixkomponenten quantitativ voneinander zu trennen. Durch eine 2-fache Entwicklung auf Amino-modifizierten Kieselgelschichten mit einer Gesamt-Entwicklungszeit von 20 min wurden alle Wirkstoffe quantitativ von der Matrix abgetrennt und in einer scharfen Zone fokussiert (gleicher RF-Wert) (Abb. 1).

Nach diesem planaren Clean-up wurden die Ziel-Zonen (Pestizide) einfach mittels TLC-MS Interface in Autosampler-Vials eluiert (Abb. 2 a) und die gereinigten Extrakte durch eine μ L-FIA direkt, ohne chromatographische Trennung, mit einem TOFMS analysiert (Abb. 2 b). Alle im Extrakt enthaltenen Substanzen eluieren somit in einem einzigen FIA-Peak im Full-scan Chronogramm. In dem resultierenden, einzigen Massenspektrum, das die gesamte Probeninformation enthält, werden die Pestizide eindeutig anhand der exakten Massen identifiziert (Abb. 2 c). Zudem werden in diesem Massenspektrum noch alle weiteren Substanzen des Extraktes aufgezeigt.

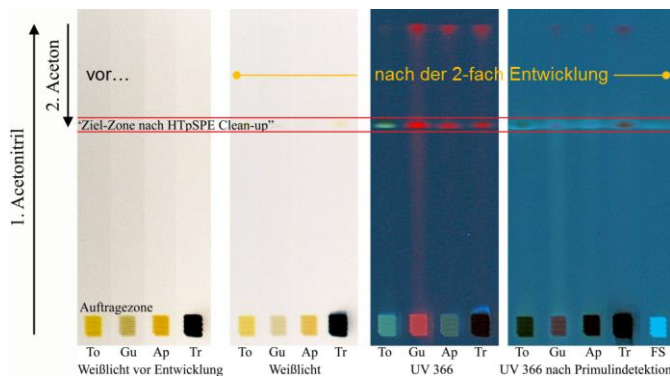


Abb. 1: HTpSPE clean-up von Tomaten (To)-, Gurken (Gu)-, Apfel (Ap)- und Trauben (Tr)-Extrakten, 50 μ L Auftragevolumen, 2-fach Entwicklung auf einer DC Aluminiumfolie Kieselgel 60 NH₂ F254s, Dokumentation unter Weißlicht, UV 366 nm und UV 366 nm nach Primulindetektion. Als eine v.a. in der GC-MS störende Matrixsubstanz wurde ein Fettsäurestandard (FS) aufgetragen.

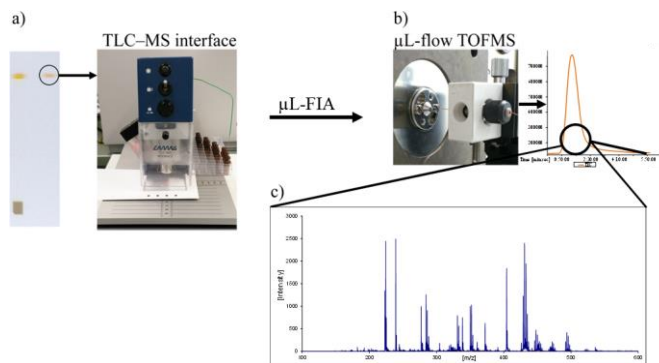


Abb. 2: Kopplung der HTpSPE mit μ L-FIA-TOFMS unter Verwendung des TLC-MS Interface; HTp-SPE und Elution der Ziel-Zone (a), nano-ESI und μ L-FIA-TOFMS Full-scan Chronogramm eines Gurken-Extraktes dotiert mit einem Pestizid-Mix aus verschiedenen Substanzklassen (b) und Massenspektrum des μ L-FIA-Probenpeaks bei Rt=1,5 min mit allen dotierten Pestizidmassen (c).

Die Massensignale im hochauflösenden Massenspektrum des FIA-Probenpeaks zeigen die Reinigungs-Effizienz der HTPSPE. In der Intensität und der Anzahl der Pestizid- und Hintergrundsignale unterschieden sich dotierte Gurken-Extrakte (Abb. 3) nach HTPSPE (Spektrum b) praktisch nicht von einem reinen Lösungsmittelstandard (Spektrum c). In dem Massenspektrum nach HTPSPE waren praktisch nur die dotierten Wirkstoffmassensignale enthalten. Im Vergleich zu den Extrakten nach dSPE (Spektrum a) waren die HTPSPE-Extrakte (Spektrum b) deutlich sauberer, hier wurden nahezu keine Interferenzen durch Matrixsignale beobachtet. Die erhebliche Matrixlast, die nach dSPE Clean-up noch vorhanden war, wurde durch die vielen Matrixsignale über den gesamten Massenbereich deutlich, die zu starken Interferenzen für alle Wirkstoffe führte. Für Tomaten-, Apfel- und Trauben-Extrakte lieferte die HTPSPE praktisch identische Ergebnisse hinsichtlich der Clean-up Effizienz.

Quantitativ wurde die Leistungsfähigkeit der Methode anhand der Wiederfindungen eines Pestizid-Mixes in dotierten Obst- und Gemüse-Extrakten ermittelt. Für die Berechnung wurden die Intensitäten der Massensignale im Massenspektrum des FIA-Peaks verwendet. Mittelwerte von 86 – 116% mit sehr geringen relativen Standardabweichungen von 1,5 – 10% (n=5) für die einzelnen Wirkstoffe bestimmt gegen reine Lösungsmittelstandards zeigten, dass das neue HTPSPE μ L-FIA TOFMS Screening reproduzierbar und verlustfrei arbeitet. Im Vergleich zu den Extrakten nach dSPE wurden Matrixeffekte nahezu vollständig eliminiert, Signalverstärkungen und Signalabschwächungen wurden nicht beobachtet (Abb. 4). Nach dSPE Clean-up traten hauptsächlich Signalverstärkungen auf, besonders starke Effekte wurden hier für Fenarimol und Chlorpyrifos erhalten.

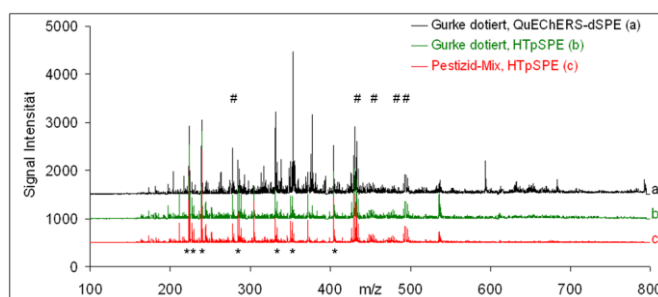


Abb. 3: μ L-FIA-TOFMS Massenspektren des FIA-Probenpeaks bei $R_t=1,5$ min eines dotierten Gurken-Extraktes (0,5; 1,0 und 2 mg/kg je Pestizid) nach dSPE (a), nach HTPSPE (b) und eines reinen Lösungsmittelstandards nach HTPSPE mit gleicher Konzentration (c), wobei alle dotierten Pestizidmassen (*) und ISTDs (#) sichtbar sind.

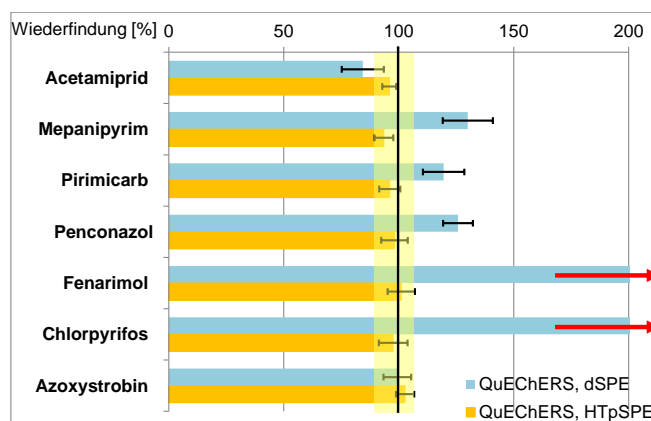


Abb. 4: Wiederfindungen aus gespikten QuEChERS-Extrakten von Apfel, Gurken, Tomaten, und Trauben (0,5 mg/kg, n = 5), nach HTPSPE und dSPE Clean-up, wirkstoffspezifische Mittelwerte über die vier untersuchten Matrices.

Grundlage für eine einfache Datenbank-basierte Suche für die neue Methode waren zwei EXCEL-Tabellen: eine Pestizid-Datenbanktabelle, die aus ~250 Wirkstoffdaten bestand, und die Ergebnistabelle der TOFMS-Messung. Diese wurden über eine ACCESS-Abfrage, die mehreren Suchkriterien unterlag, miteinander verknüpft.

Der entwickelte Datenbank-basierte target Suchprozess, der „bekannte“ Pestizide listete, wurde anhand des bereits erwähnten Wirkstoff-Mixes in den genannten Matrices über-

prüft. Bei dem Abgleich mit der Pestizid-Datenbank ergaben sich hier sehr erfolgreiche Ergebnisse für die HTPSPE gereinigten Extrakte (Abb. 5). Im Unterschied zu den dispersiv gereinigten Extrakten wurden nur 1-2 falsch positive Treffer in den Gurken- und Tomaten-Extrakten registriert. In den dotierten Apfel-, Trauben- und Gurken-Extrakten wurden alle Wirkstoffe wiedergefunden und eindeutig identifiziert, nur in den Tomaten-Extrakten konnte Fenarimol aufgrund einer recht großen Massenabweichung nicht korrekt identifiziert werden.

Nach dSPE clean-up konnten jedoch bis zu vier der sieben dotierten Wirkstoffe nicht korrekt identifiziert werden, wobei auch hier die Tomate die größten Probleme bereitete.

Ein zusätzlich entwickelter non-target Suchprozess lieferte ferner eine Liste aller „unbekannten“ Massen(-Bestandteile) der Probe, ohne die Wirkstoffmassen aus der Pestizid-Daten-

bank, die bereits durch die target Suche identifiziert wurden. Die Option dieses echten und einfach durchführbaren non-target Screenings beruht auf dem Vorliegen der gesamten Probeninformation, gesammelt in einem einzigen Massenspektrum.

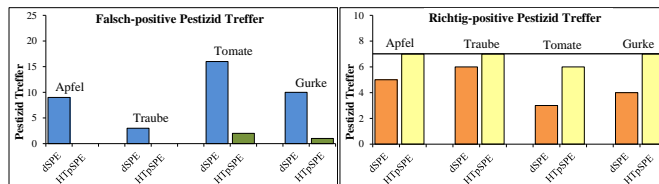


Abb. 5: Anzahl der falsch-positiven und richtig-positiven Pestizid-Treffer nach Anwendung des target Screenings auf dotierte Probenextrakte nach dSPE oder HTpSPE Clean-up.

Reale Proben

Die Anwendung des HTpSPE- μ L-FIA-TOFMS Screenings auf diverse Handelsproben lieferte ebenfalls hervorragende Ergebnisse. Die hierbei identifizierten Pestizide entsprachen denjenigen, die bei einer Vergleichsmessung mittels LC-MS/MS von dSPE-Extrakten in einem Handelslabor nachgewiesen wurden (Tab. 1). Der zuverlässige Nachweis der Wirkstoffe in den HTpSPE-Extrakten gelang zwar vorwiegend nur bei Wirkstoffgehalten $>0,5$ mg/kg, was allerdings allein auf die relativ geringe Sensitivität des verwendeten TOFMS-Gerätes zurückzuführen ist.

| Probe | Pestizid | LC-MS/MS [mg/kg] | μ L-FIA-TOFMS [S/N] (n=2) |
|----------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| Bananen | Thiabendazol | 0.76 | 2004 |
| | Imazalil | 0.73 | 1090 |
| | Bifenthrin | <0.01 | n.n. |
| | Chlorpyrifos | <0.01 | n.n. |
| Brombeeren | Cyprodinil | 0.86 | 2347 |
| | Lambda-cyhalothrin | 0.01 | n.n. |
| | Thiacloprid | 0.01 | n.n. |
| Johannisbeeren | Cyprodinil | 0.47 | 1373 |
| | Boscalid | 0.37 | n.n. |
| | Pyraclostrobin | 0.14 | 124 |
| | Trifloxystrobin | 0.06 | 121 |
| Wirsing | Azoxystrobin | 1.3 | 1770 |
| | Difenoconazol | 0.39 | 317 |
| | Pymetrozin | 0.2 | n.n. |
| | Cyfluthrin | 0.09 | n.n. |
| | Indoxacarb | 0.03 | n.n. |
| | Thiacloprid | <0.01 | n.n. |
| | Dimethomorph | <0.01 | n.n. |

Tab. 1: Untersuchung von Handelsproben: Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen von QuEChERS dSPE-Extrakten im Vergleich zu den Ergebnissen des μ L-FIA-TOFMS Screenings von HTpSPE-Extrakten. Bei letzteren ist anstelle der Wirkstoffkonzentrationen das jeweilige Signal/Rauschverhältnis angegeben.

Fazit und Schlussfolgerung

Die μ L-FIA-TOFMS zeigte erneut die hohe Clean-up Effizienz der planaren SPE für Obst und Gemüsematrices, die schon bei der Einführung der HTpSPE erhalten wurde [10, 11]. Mit der Entwicklung eines μ L-FIA-TOFMS Konzeptes wurde hier ein einfaches und schnelles Screening für die Rückstandsanalytik von Pestiziden entwickelt. Unabdingbare Voraussetzung waren dabei die sehr sauberen und matrixfreien Pro-

ben-Extrakte, da alle Rückstände in einem einzigen Peak bzw. Massenspektrum erfasst wurden. Dadurch war ein einfaches und schnelles Datenbank-basiertes target Screening möglich, mit der zusätzlichen Option eines echten non-target Screenings. Das entwickelte Konzept wurde erfolgreich anhand repräsentativer Wirkstoffe in unterschiedlichen pflanzlichen Matrices geprüft. Durch die hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LC-MS/MS Messungen bei der Untersuchung realer Proben konnte die Leistungsfähigkeit des Screenings und die sehr gute Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse gezeigt werden. Da selbst ein niedrig auflösendes TOFMS mit sehr präzisen Ergebnissen überraschte, wird ein leistungsfähiges HRMS die Trefferquoten sicher nochmals verbessern.

Über die gezeigten Anwendungen hinaus bietet das neue Konzept zahlreiche Möglichkeiten zur organischen Spurenanalytik von Umweltproben.

Literatur

- [1] Oellig, C., Schwack, W., J. Chromatogr. A 1351 (2014) 1
- [2] Hemmerling, C. et al., Deut. Lebensm. Rundsch. 105 (2009) 633
- [3] P.J. Taylor, Clin. Biochem. 38 (2005) 328
- [4] J. Hajslova, J. Zrostlikova, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 181
- [5] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Talanta 115 (2013) 104
- [6] W. Specht, S. Pelz, W. Gilsbach, Fresenius J. Anal. Chem. 353 (1995) 183
- [7] F.J. Schenck, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 868 (2000) 51
- [8] F.J. Schenck, S.J. Lehotay, V. Vega, J. Sep. Sci. 25 (2002) 883
- [9] M. Anastassiades, S. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.
- [10] Oellig, C., Schwack, W., J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6540-6547
- [11] Oellig, C., Schwack, W., J. Chromatogr. A 1260 (2012) 42-53
- [12] www.quechers.com

Korrespondenzadresse:

Claudia Oellig
 Universität Hohenheim
 Institut für Lebensmittelchemie 170a
 Garbenstr. 28,
 70599 Stuttgart
 E-Mail: Claudia.Oellig@uni-hohenheim.de