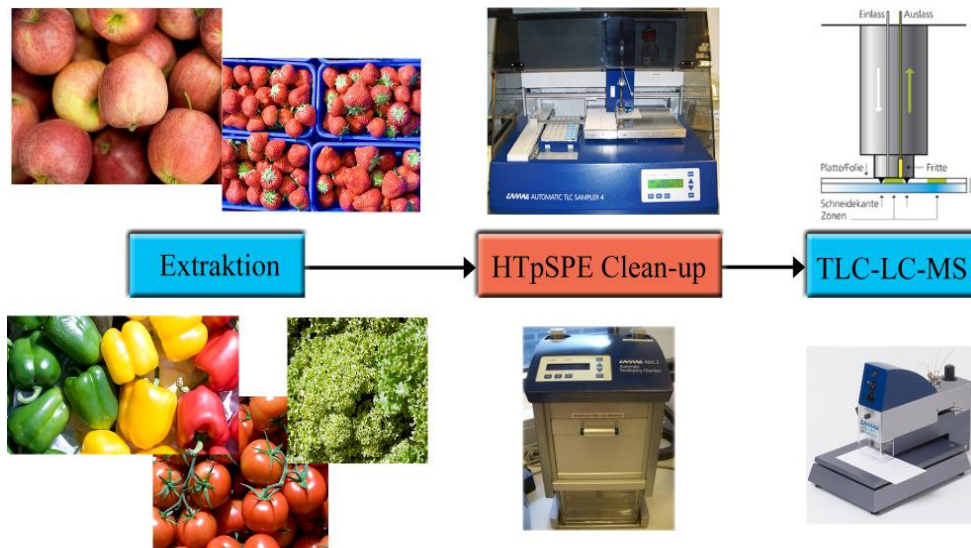


# High throughput planar solid phase extraction (HTpSPE) - Planare Festphasenextraktion als ein neues Clean-up Konzept in der Rückstandsanalytik von Pestiziden

Claudia Oellig, Wolfgang Schwack

Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, Garbenstr. 28., 70599 Stuttgart



Ablauf der planaren Festphasenextraktion (Bildquellen: Kreklau/DFHV, CAMAG)

Um Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse vor Schadorganismen zu schützen, kommen weltweit über 1000 verschiedene Pflanzenschutzmittelwirkstoffe (PSM) zum Einsatz. In der EU sind Rückstandshöchstgehalte für über 500 Pestizide in Lebens- und Futtermitteln festgelegt. Zur Überprüfung dieser Grenzwerte für den Verbraucherschutz sind sichere, robuste, schnelle und sensitive analytische Methoden notwendig.

In Obst und Gemüse ist eine Vielzahl an störenden Matrixkomponenten enthalten, welche die Signale in der GC-MS und LC-MS stark beeinflussen, meistens eine Signalsuppression bewirken. Der sicherste Weg zur Vermeidung derartiger Matrixeffekte in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln (PSM) in Obst und Gemüse ist eine sorgfältige Reinigung der Extrakte.

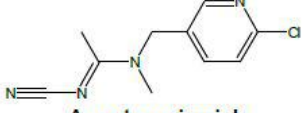
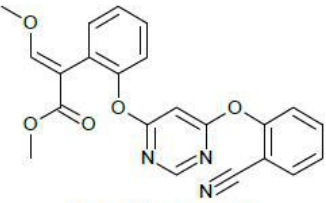
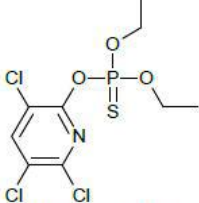

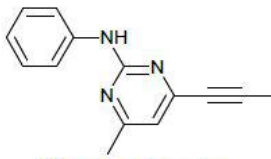
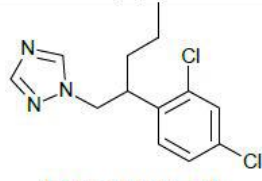
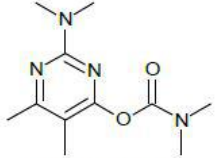
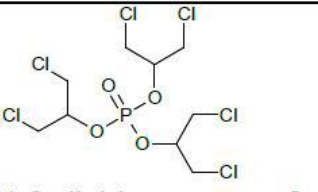
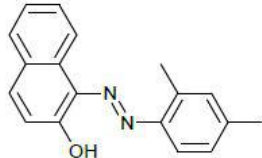
Die aktuellen Clean-up Methoden nutzen je nach Matrix eine dispersive SPE an PSA (primary secondary amine), an GCB (graphitized carbon black) oder an C18-Materialien zur Reduktion von Fettsäuren und Phenolen, von Carotinoiden und Chlorophyll bzw. von Fetten und Wachsen in den Extrakten [1]. Alternativ kommen entsprechende SPE-Kartuschen zum Einsatz. Mit Rücksicht auf die manuellen Operationen sind sie jedoch anfällig hinsichtlich möglicher Wirkstoffverluste [2]. Zudem ist die Effizienz bei weitem nicht ausreichend, so dass generell eine Kalibrierung auf Matrix (matrix-matched standards) notwendig ist, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Ein weiterer Nachteil dieser Methoden ist der teils große Lösungsmittelverbrauch sowie die hohen Kosten und der große Zeitaufwand. Ein völlig neuer Ansatz zur Extraktreinigung in der Rückstandsanalytik von

PSM wird nun mit Hilfe der Planar-Chromatographie verfolgt. Sie dient hierbei nicht dazu, die Wirkstoffe chromatographisch aufzutrennen, sondern dazu, Wirkstoffe und Matrixkomponenten quantitativ voneinander zu trennen und alle Wirkstoffe dabei in einer Zone zu sammeln. Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Einsatz der Planar-Chromatographie eine effiziente, einfache und schnelle Clean-up Methode zur nachfolgenden Bestimmung mittels LC-MS zu entwickeln [3].

Planar-Chromatographie umfasst in der Analytik alle chromatographischen Verfahren, die als stationäre Phase ein planares Medium verwenden. Hierzu zählen unter anderem die Dünnschicht-Chromatographie (DC, TLC) und die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC, high-performance thin-layer chromatography). Die DC ist aufgrund der einfacheren Ausführung die am weitesten verbreitete Methode, die HPTLC dagegen die leistungsstärkere und instrumentelle Variante der Planar-Chromatographie.

Kommerziell erhältliche Bio-Obst- und Gemüse-Proben wurden mit Acetonitril extrahiert. Die anschließende Phasentrennung erfolgte mit einem Puffersalzgemisch [1].

Die erhaltenen Proben-Rohextrakte wurden mit sieben repräsentativen Pestiziden (Tab. 1) auf 0,1 und 0,5 mg/kg dotiert. Als interne Standards wurden TDCPP (zur Quantifizierung) und Sudan II (zur Sichtbarmachung der Pestizidzonen) verwendet.

 <b>Acetamiprid</b>	 <b>Azoxystrobin</b>	 <b>Chlorpyrifos</b>
 <b>Fenarimol</b>	 <b>Mepanipyrim</b>	 <b>Penconazol</b>
 <b>Pirimicarb</b>	 <b>Tris (1,3-dichloropropan-2-yl) phosphat (TDCPP)</b>	 <b>Sudan II</b>

Tab. 1: Eingesetzte Wirkstoffe und interne Standards

Als planare Schicht kamen Aminophasen (Merck), vorgewaschen mit Acetonitril, zum Einsatz. Die Probenauftragung (50 µL Extrakt) erfolgte flächenförmig (3,0 mm x 4,0 mm) mittels DC Probenautomat 4 (ATS 4, CAMAG). Das planare Festphasen-Clean-up wurde in einer automatischen Entwicklungskammer (ADC2, CAMAG) durchgeführt. Die erste Entwicklung, die zur Abtrennung der Pestizide von den Matrixkomponenten dient, gelang mit Acetonitril (Laufstrecke 75 mm). Für die 2. Entwicklung, bei der die Pestizide in einer Zone konzentriert werden, wurde Aceton (Laufstrecke 45 mm, nach 180° Drehung) verwendet. Nach diesem HTpSPE Clean-up liegen alle Wirkstoffe fokussiert in einer scharfen Zone vor, abgetrennt von der Matrix. Mit den vielfältigen Möglichkeiten der planar-chromatographischen Detektion kann der Erfolg sogleich sichtbar gemacht werden (Abb. 1).

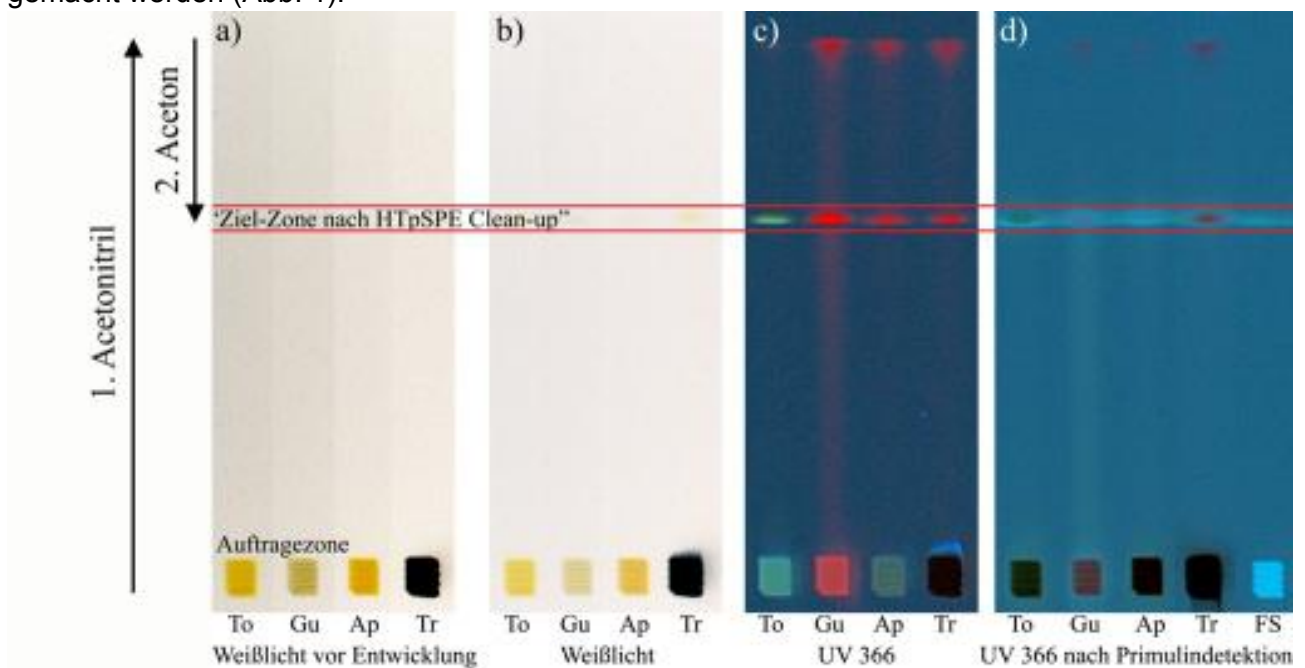


Abbildung 1: Trennung von Matrix (Tomate (To), Gurke (Gu), Apfel (Ap) und Traube (Tr)) dotiert mit Wirkstoff-Mix auf DC Kieselgel 60 NH<sub>2</sub> F<sub>254s</sub> Aluminiumfolien; zum Vergleich Ölsäure (FS): a) vor der Entwicklung, b) – d) nach der Entwicklung unter Weißlicht (b), UV 366 (c), UV 366 nach Tauchen in Primulinlösung (d) (modifiziert aus [3]).

Nach dem HTpSPE Clean-up kann die Zielzone (Pestizide) leicht mittels TLC-MS Interface (CAMAG) in Autosampler-Vials extrahiert oder direkt online auf das LC-(ESI+)/MS System übergeben werden (Abb. 2). Als Elutionsmittel wurde Acetonitril / 10 mM Ammoniumformiatpuffer (1/1, v/v) bei einer Flussrate von 0,2 mL/min und einer Extraktionszeit von 60 Sekunden eingesetzt.

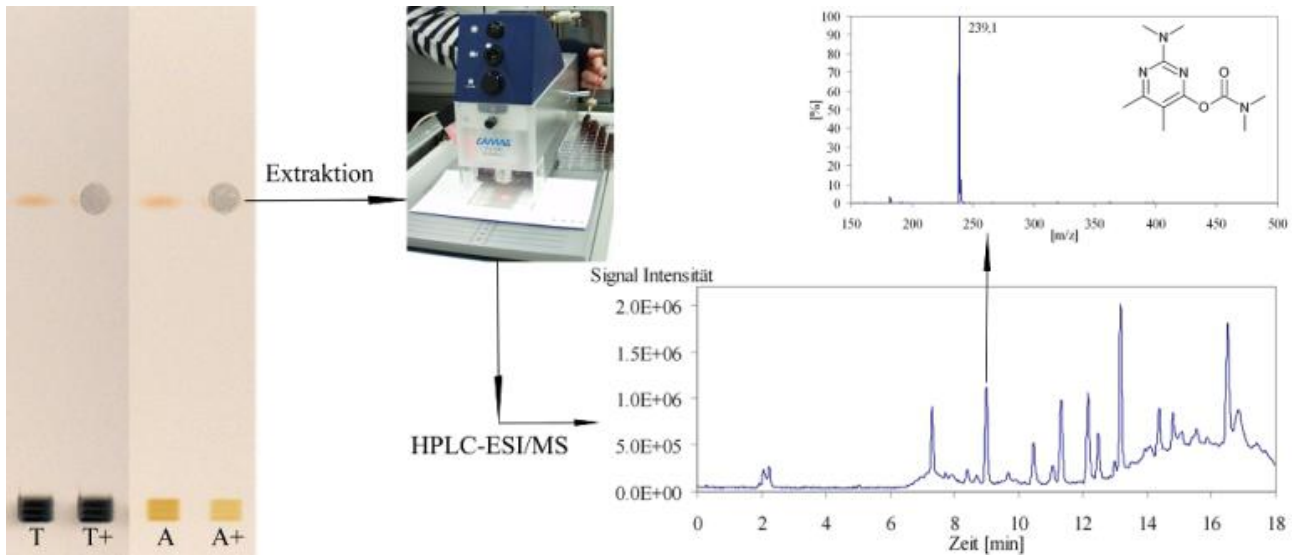


Abbildung 2: Extraktionsablauf- und Kopplung einer Zielzone nach HTpSPE Clean-up mit LC-(ESI+)/MS mittels TLC-MS Interface; LC-MS Chromatogramm (TIC) eines Apfelextraktes dotiert mit einem Pestizid-Mix aus verschiedenen Substanzklassen (A+) und Massenspektrum des Peaks bei Rt=9 min (Pirimicarb, m/z 239,1, [M+H]<sup>+</sup>).

Zur Trennung der Pestizide wurde eine Chromolith RP-18e Säule (100 mm x 3,0 mm, mit zugehöriger Vorsäule, Merck) mit Gradientenelution (Acetonitril/10 mM Ammoniumformiatpuffer) verwendet. Die Aufnahme von Totalionenstromchromatogrammen (TIC) zur Sichtbarmachung des Clean-up Erfolgs erfolgte im positiven Scan Modus (Abb. 3). Die Chromatogramme dotierter Extrakte sind nach dem HTpSPE Clean-up nahezu identisch mit dem einer Standardmischung. Somit kann zur Kalibrierung einfach ein Lösungsmittelstandard eingesetzt werden.

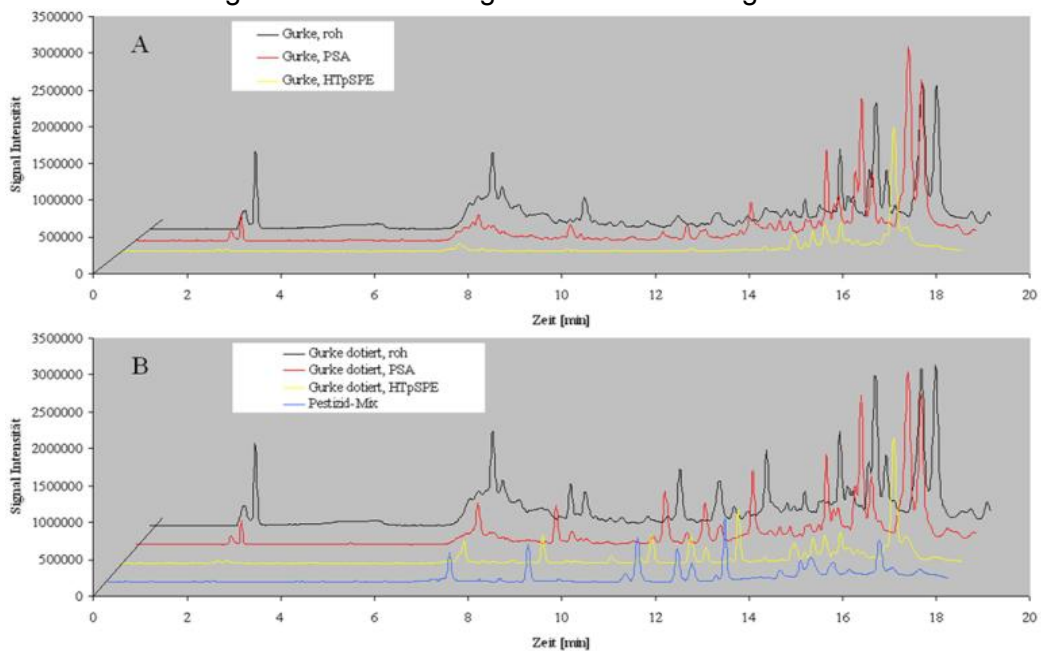


Abbildung 3: LC-(ESI+)/MS Chromatogramme (TIC) eines Gurkenextraktes nach HTpSPE Clean-up im Vergleich zum Rohextrakt und nach dSPE (PSA); (A) undotiert, (B) dotiert mit einem Pestizid-Mix (0,5mg/kg) (modifiziert aus [3]).

Quantitativ wurde der Reinigungseffekt durch die Bestimmung von Wiederfindungen der Wirkstoffe auf einem Dotierniveau von 0,5 mg/kg und 0,1 mg/kg in diversen Obst- und Gemüsematrices (Apfel, Traube, Tomate und Gurke) bestimmt, wobei sich hier die Wiederfindungen nur auf das Clean-up beziehen. Die Quantifizierung erfolgte an einem Agilent LC/MSD SL im selected ion monitoring (SIM) Modus mit sieben Zeitfenstern bei m/z 223,1, 239,1, 331, 404,1, 224,1, 284, 430,8, 447,8, 349,9 und 277,1 für Acetamiprid, Primicarb, Fenarimol, Azoxystrobin, Mepanipyrim, Penconazol, TDCPP, Chlorpyrifos und Sudan II.

Für fünf Wiederholungen ergaben sich Mittelwerte über alle Wirkstoffe von 90-104 %. Die exzellenten Standardabweichungen (< 4,1 %RSD) zeigen, dass das neue HTpSPE Clean-up reproduzierbar und verlustfrei arbeitet (Tab. 2).

	0,5 mg/kg		0,1 mg/kg	
	Wiederfindung [%]	%RSD (n=5)	Wiederfindung [%]	%RSD (n=5)
Tomate	90-102	0,8-3,4	93-103	0,3-1,4
Gurke	91-102	0,6-1,4	95-104	0,7-3,7
Apfel	95-102	0,6-4,1	97-103	0,6-2,1
Traube	94-101	0,8-2,6	100-103	0,3-1,8

Tabelle 2: Wiederfindungen und relative Standardabweichungen

## Resumee

Mit dem entwickelten HTpSPE Clean-up lassen sich auf einer 20 cm-Platte leicht 20 Probenextrakte simultan bei einer Entwicklungszeit von 20 min aufreinigen. Das gesamte Clean-up für 20 Proben (inkl. Probenauftragung) benötigt 70 Minuten. Mit einer Clean-up Zeit von 3,5 min/Probe sowie dem sehr geringe Lösungsmittelverbrauch von nur 1mL/Probe liefert HTpSPE eine sehr effiziente und schnelle Alternative zu derzeit gängigen Clean-up Techniken. Der neue Ansatz wurde mit Wirkstoffen aus verschiedenen Substanzklassen in diversen pflanzlichen Matrices erfolgreich geprüft. Im Vergleich zu bisherigen (d)SPE-Verfahren sind die Probenextrakte deutlich sauberer und Matrixeffekte vollständig eliminiert.

- [1] www.quechers.com
- [2] Hemmerling, C. et al., *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 105 (2009) 633-644
- [3] Oellig, C., Schwack, W., *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 6540-6547