

Probenvorbereitung war gestern – Pestizidanalytik mittels HILIC-RP-LC-MS/MS

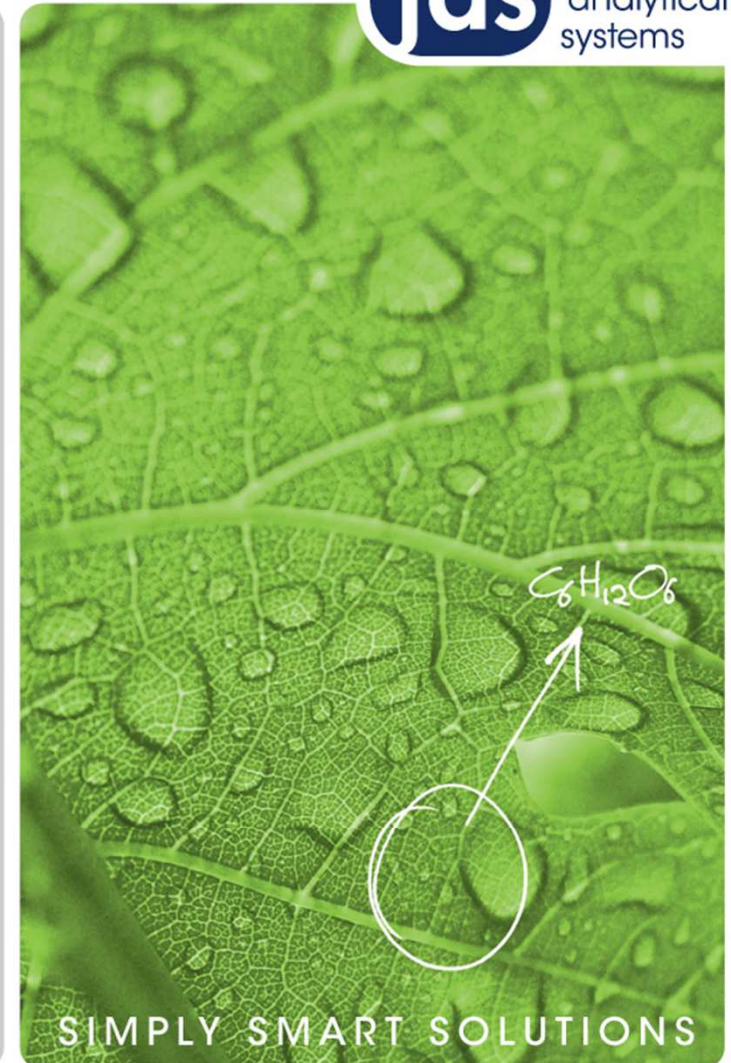
jas joint
analytical
systems

Landesuntersuchungsanstalt
Sachsen



Dipl. Leb.chem Stefan Kittlaus

Waldbronn, 24. Januar 2011



Matrixeffekte und deren Bestimmung

Ergebnisse *post column infusion* /
Matrixeffektprofile

Probenvorbereitung mit AREA-P

→ IUPAC Definitionen

NOMENCLATURE FOR AUTOMATED AND MECHANISED ANALYSIS

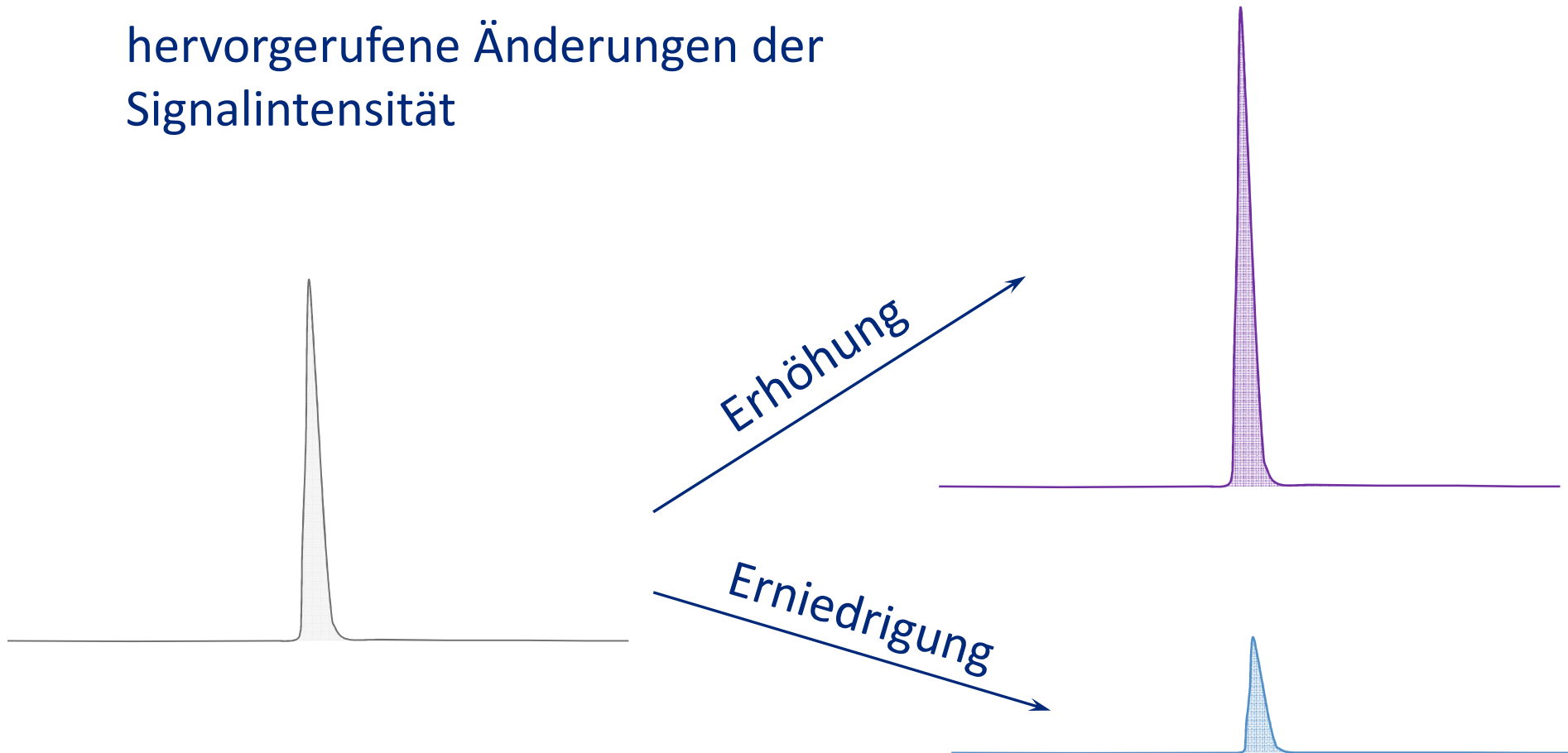
Pure & Appl. Chem., Vol. 61, No. 9, pp. 1657–1664, 1989.
Printed in Great Britain.
© 1989 IUPAC

MATRIX EFFECT
(substantive)

The combined effect of all components of the sample other than the analyte on the measurement of the quantity.

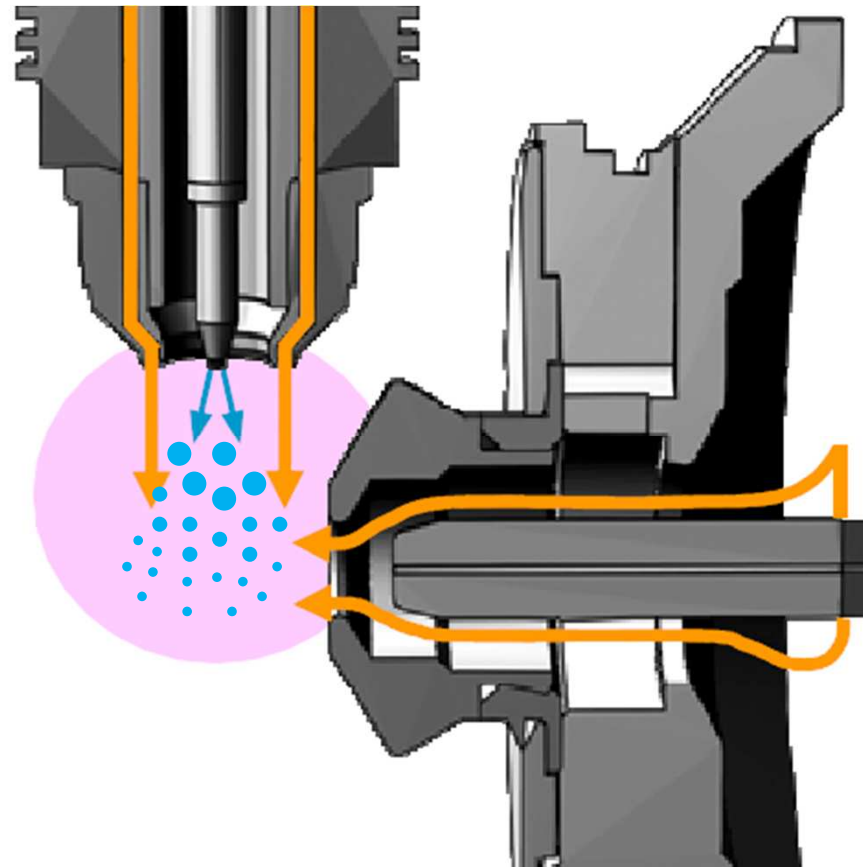
Matrixeffekte

- durch Matrixeinflüsse hervorgerufene Änderungen der Signalintensität

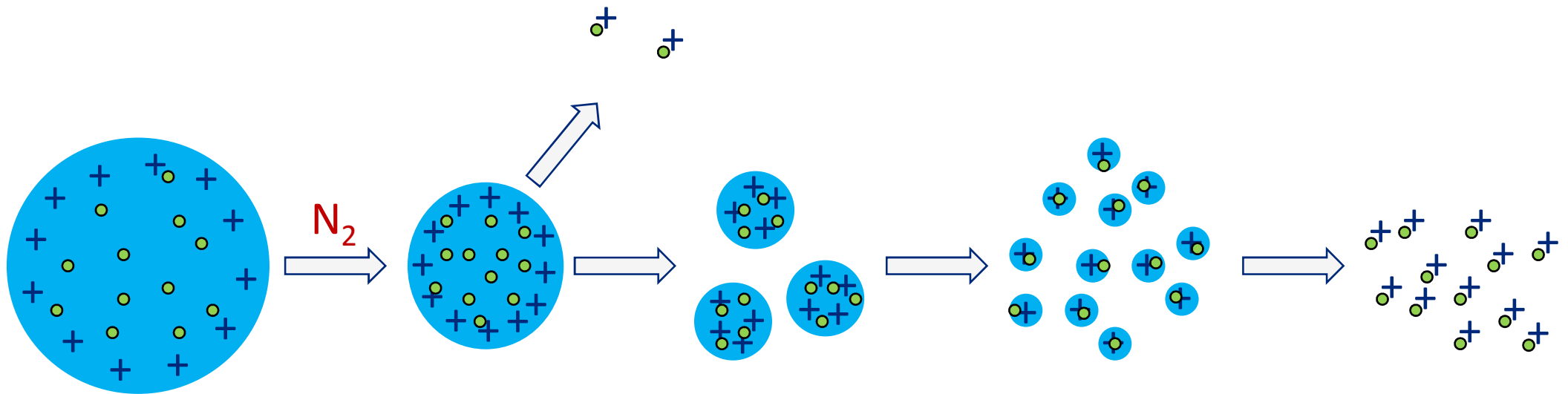


Elektrospray Ionisierung (ESI)

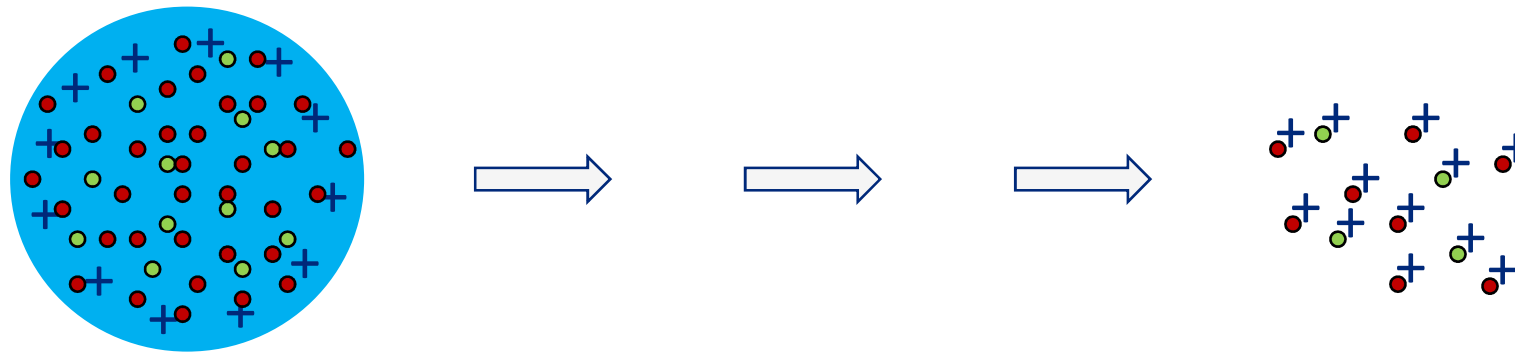
- LC Fluss wird in der Quelle versprüht
- Übertragung von Ladungen auf Tropfen durch angelegte Hochspannung
- Trocknung durch heißen Stickstoff



Elektrospray Ionisierung (ESI)



Ursachen für Matrixeffekte



- Matrix
- Analyt

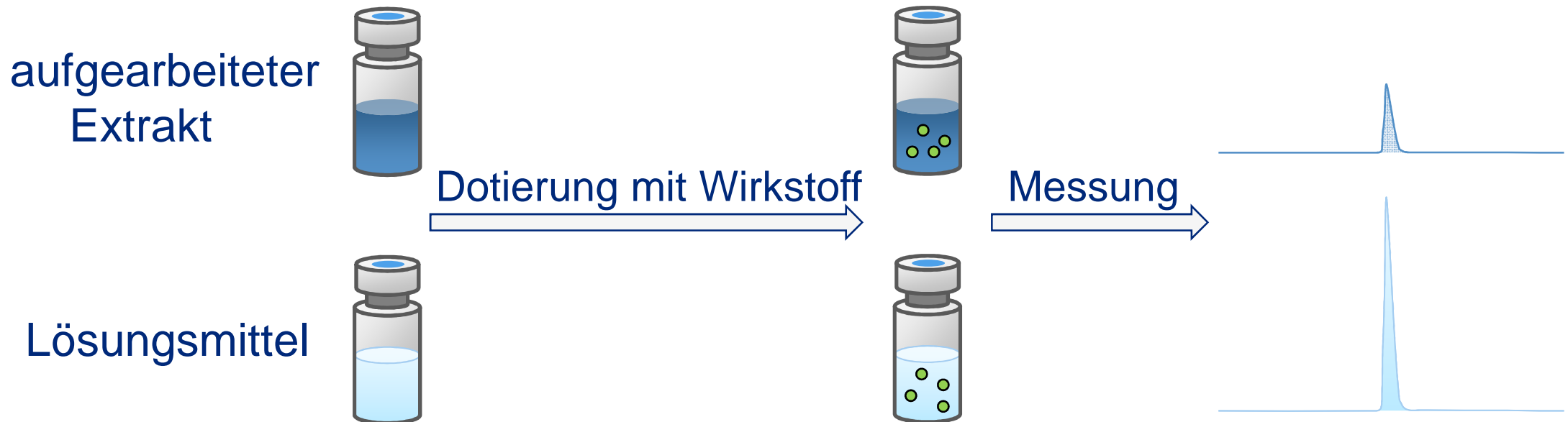
Matrixeffekte durch Konkurrenz

z.B. durch höhere Protonenaffinität
von Matrixkomponenten

Messung von Matrixeffekten

① postextraction addition

Bestimmung der Wiederfindung



① postextraction addition

↳ Bestimmung der Wiederfindung



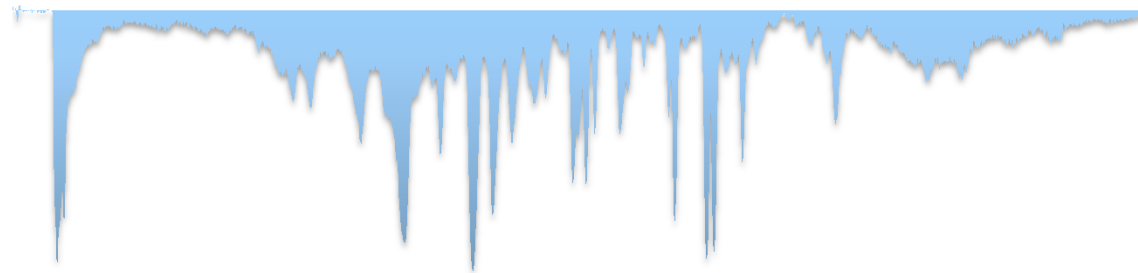
Nachteile:

- nur Aussage über Matrixeffekte für die betrachtete Substanz
- Matrixeffekte sind stark abhängig von den chromatographischen Bedingungen
- geringe Übertragbarkeit der Ergebnisse
- keine Aussage über Gesamtgehalt an Matrix bzw. Verhältnisse in anderen Bereichen des Chromatogramms

② postcolumn infusion



Bestimmung von Matrixeffektprofilen

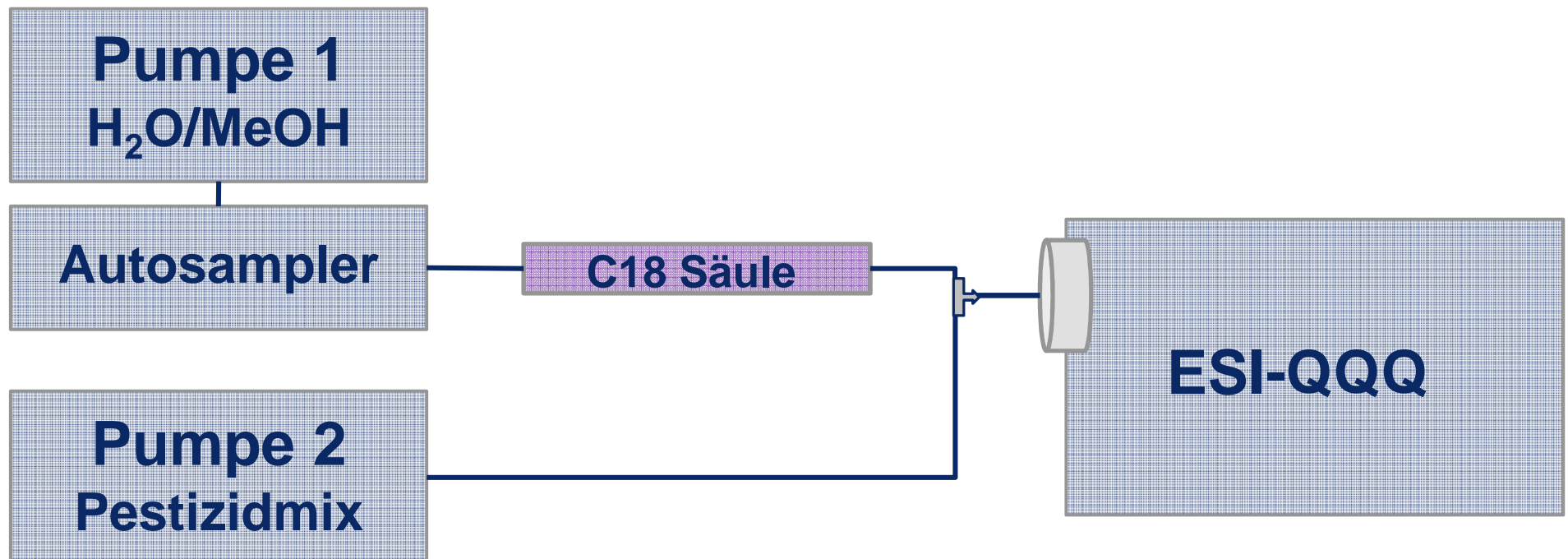


Vorteile:

- kontinuierliche Messung von Matrixeffekten
- Aussagen über Matrixbelastung in gesamten Chromatogramm

postcolumn infusion

- kontinuierliche Infusion von Pestizidmix hinter der Säule
- QQQ misst diese Pestizide während des gesamten Laufs



Eingleitete Pestizide

Wirkstoff	Vorläufer-Ion	Produkt-Ion	dwell time [ms]	Fragmentor- spannung [V]	Kollisions- energie [eV]	Polarität
Daminozid	161	143	14	60	5	Positive
Clopyralid	191,9	146	14	50	15	Positive
Carbendazim	192	160,1	14	80	15	Positive
Cymoxanil	199	128,1	14	40	0	Positive
Metamitron	203,1	175,1	14	90	15	Positive
Aldicarb	208	116	14	40	0	Positive
Monolinuron	215	126	14	70	15	Positive
2,4-D	221	163	14	50	0	Negative
Mevinphos	225	127	14	50	10	Positive
Cyprodinil	226,1	93,1	14	110	40	Positive
Terbutylazin	230,1	174,1	14	70	15	Positive
Oxamyl	237	72,1	14	50	15	Positive
Clomazon	240	125,1	14	80	15	Positive
2,4-DB	249,1	163,1	14	50	5	Negative
Prosulfocarb	252,1	91,1	14	70	20	Positive
Imidacloprid	256	209,1	14	70	10	Positive
Triclopyr	256	198	14	50	0	Negative
Bromacil	261	205	14	70	10	Positive
Fenoprop	269	197	14	50	0	Negative
Bromoxynil	275,9	79	14	100	35	Negative
Metazachlor	278	134,1	14	70	15	Positive
Oxadixyl	279,1	219,1	14	60	5	Positive
Propetamphos	282	138	14	70	15	Positive
Ethofumesat	287	121,1	14	90	10	Positive
Pyrifenox	295	93,1	14	90	25	Positive
Imazalil	297	159	14	90	20	Positive
Spiroxamin	298,2	144,2	14	90	15	Positive
Fenhexamid	302	97,2	14	100	20	Positive
Clofentezin	303	138	14	70	10	Positive
Fenazaquin	307,2	57,1	14	80	25	Positive
Quinoxifen	308	197	14	130	35	Positive
Bupirimat	317,1	166,1	14	90	20	Positive
Iprovalicarb	321,2	119,1	14	70	20	Positive
Flutolanil	324,1	262,1	14	90	15	Positive
Diniconazol	326	70,1	14	100	25	Positive
Pencycuron	329,1	125	14	90	25	Positive
Tepraloxydim	342,1	250,2	14	80	10	Positive
Tolyfluanid	346,9	238,1	14	50	0	Positive
Tebufenozid	353	133,1	14	60	15	Positive
Diclofop-methyl	358	281	14	70	10	Positive
Propargite	368,1	231,2	14	70	5	Positive
Amidosulfuron	370	261,1	14	70	10	Positive
Pyrazophos	374	222,2	14	100	20	Positive
Triforin	389,8	98,2	14	100	25	Positive
Etofenprox	394,2	177,2	14	90	10	Positive
Azoxystrobin	404	372,2	14	70	10	Positive
Fipronil	435	330,1	14	100	10	Negative
Fluoroglycofen-ethyl	465	344,1	14	70	5	Positive
Lufenuron	510,9	158	14	90	20	Positive
Fenbutatinoxid	519,1	91,1	14	170	105	Positive
Indoxacarb	528	149,9	14	90	20	Positive

postcolumn infusion

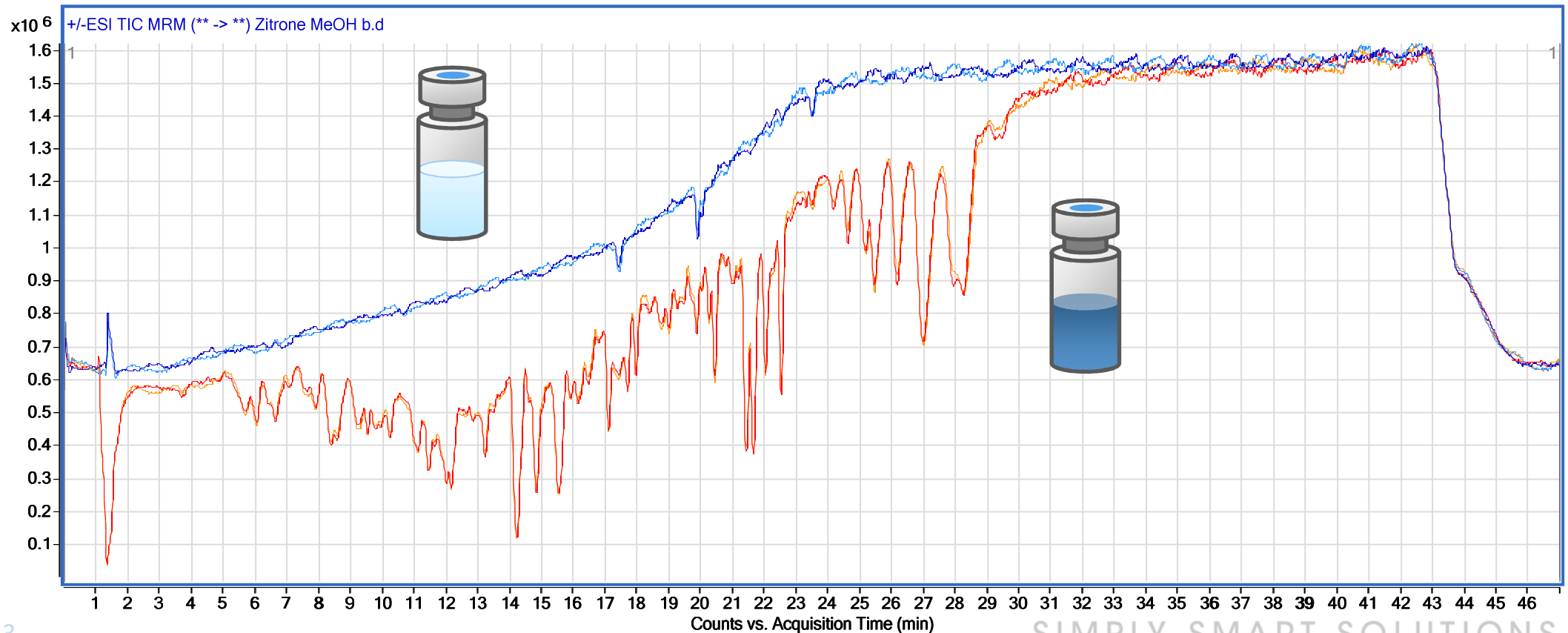


1.) Injektion von MeOH

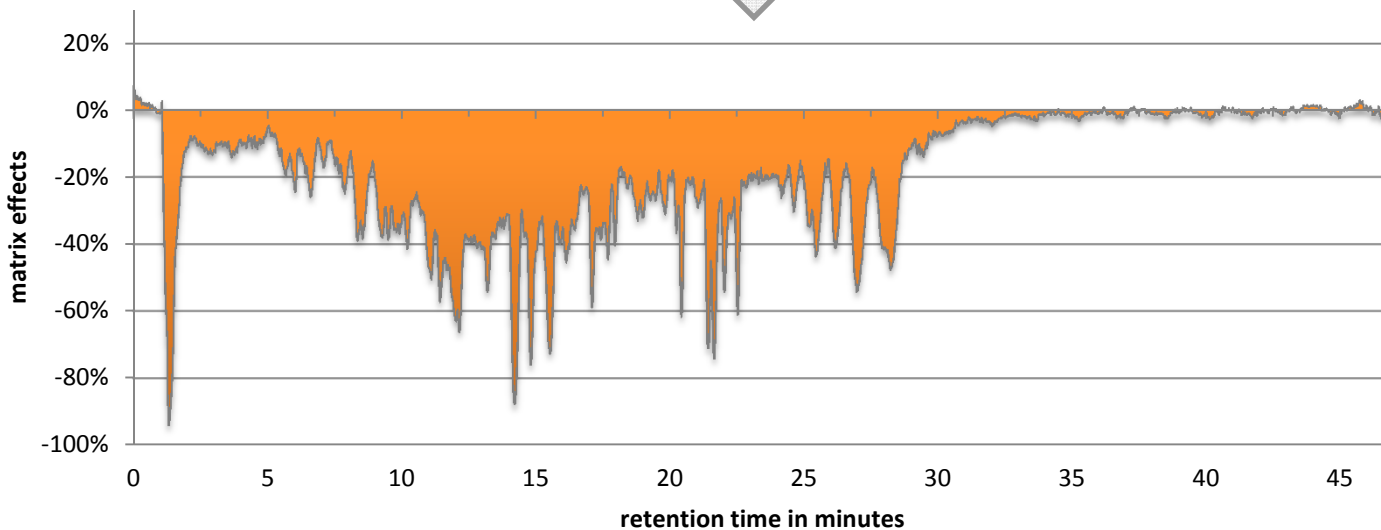
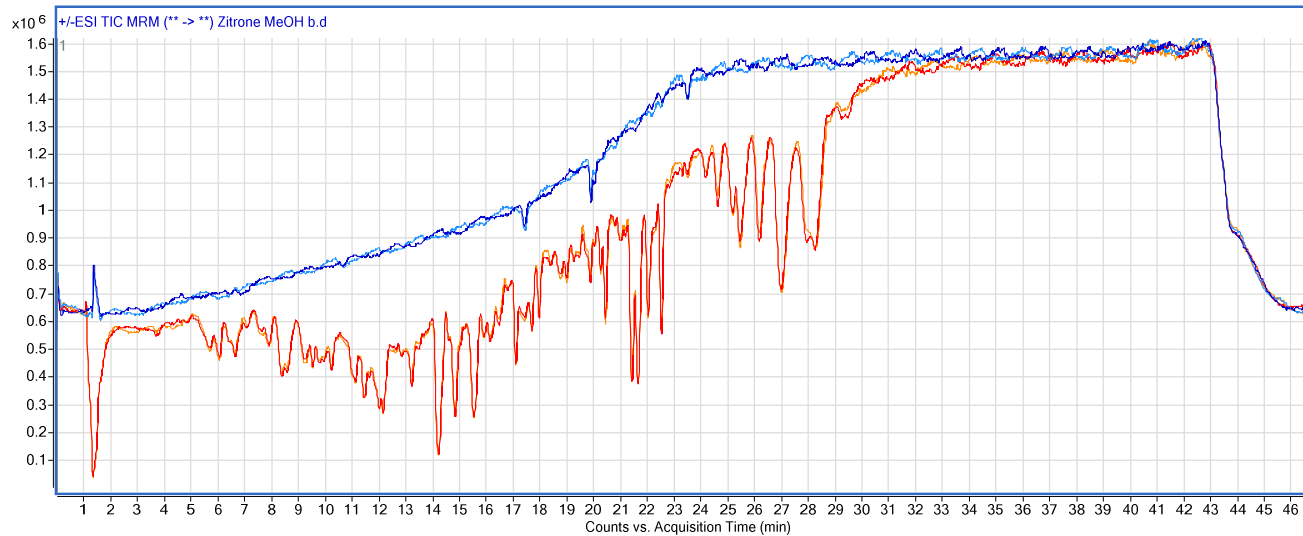
→ jeweils als Doppelbestimmung



2.) Injektion von matrixhaltigem Extrakt

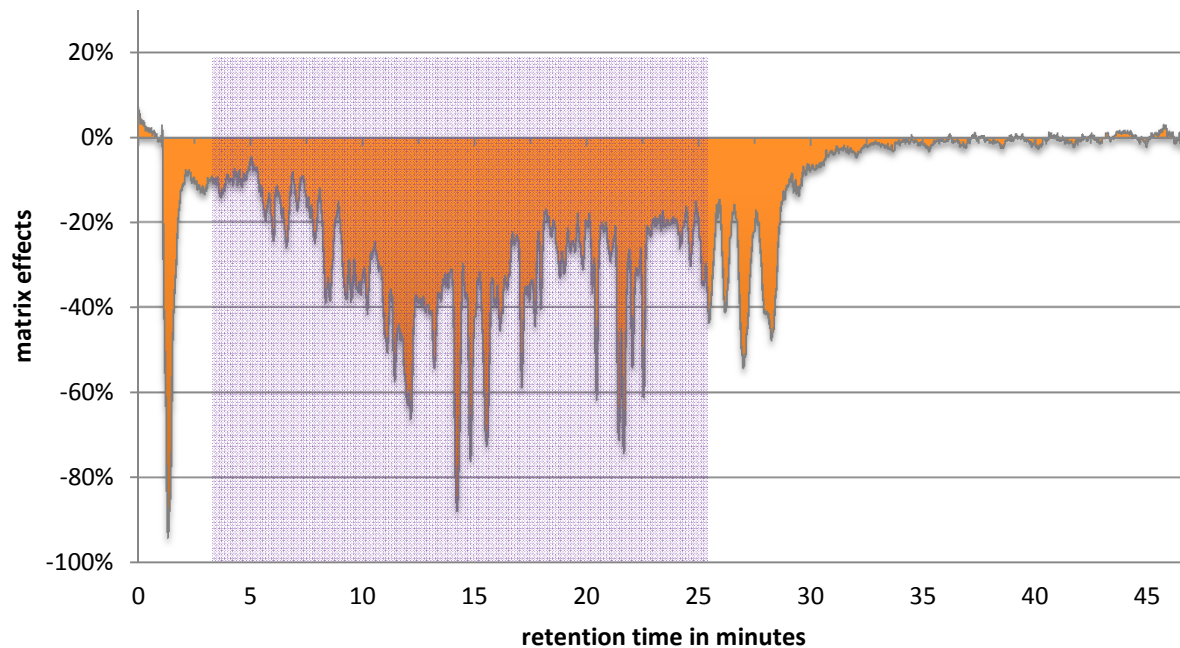


Matrixeffektprofile



- Berechnung des Verhältnisses aus MeOH- und Matrix-Lauf
- für insgesamt ca. 50 Pestizide
- Erstellung des Matrixeffektprofils (Median der Matrixeffekte über die Zeit)

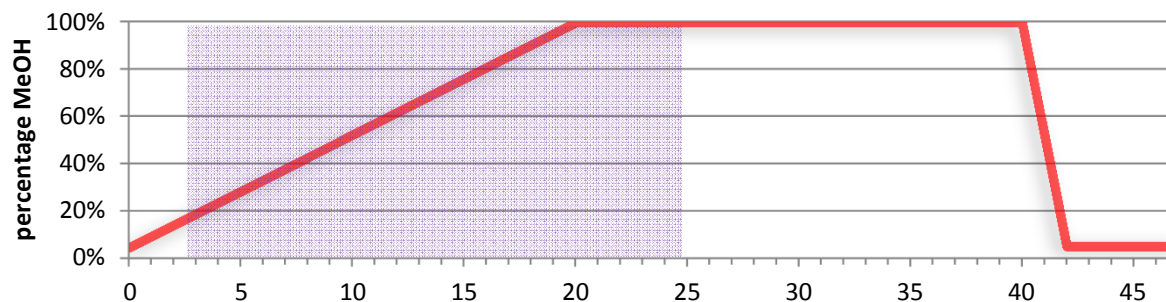
Matrixeffektprofile



Signalerhöhung

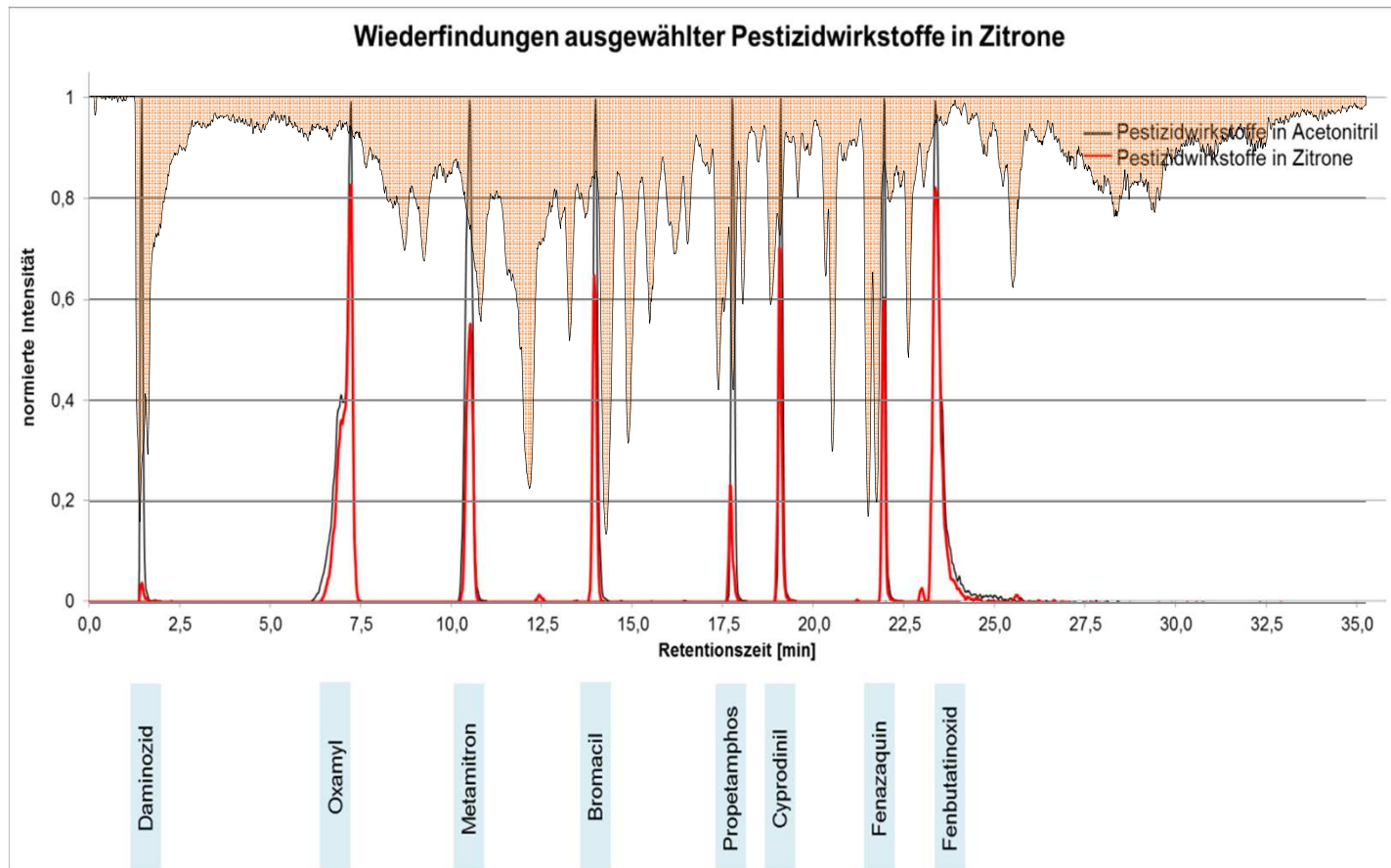
Signal suppression

Gradient während der Messung



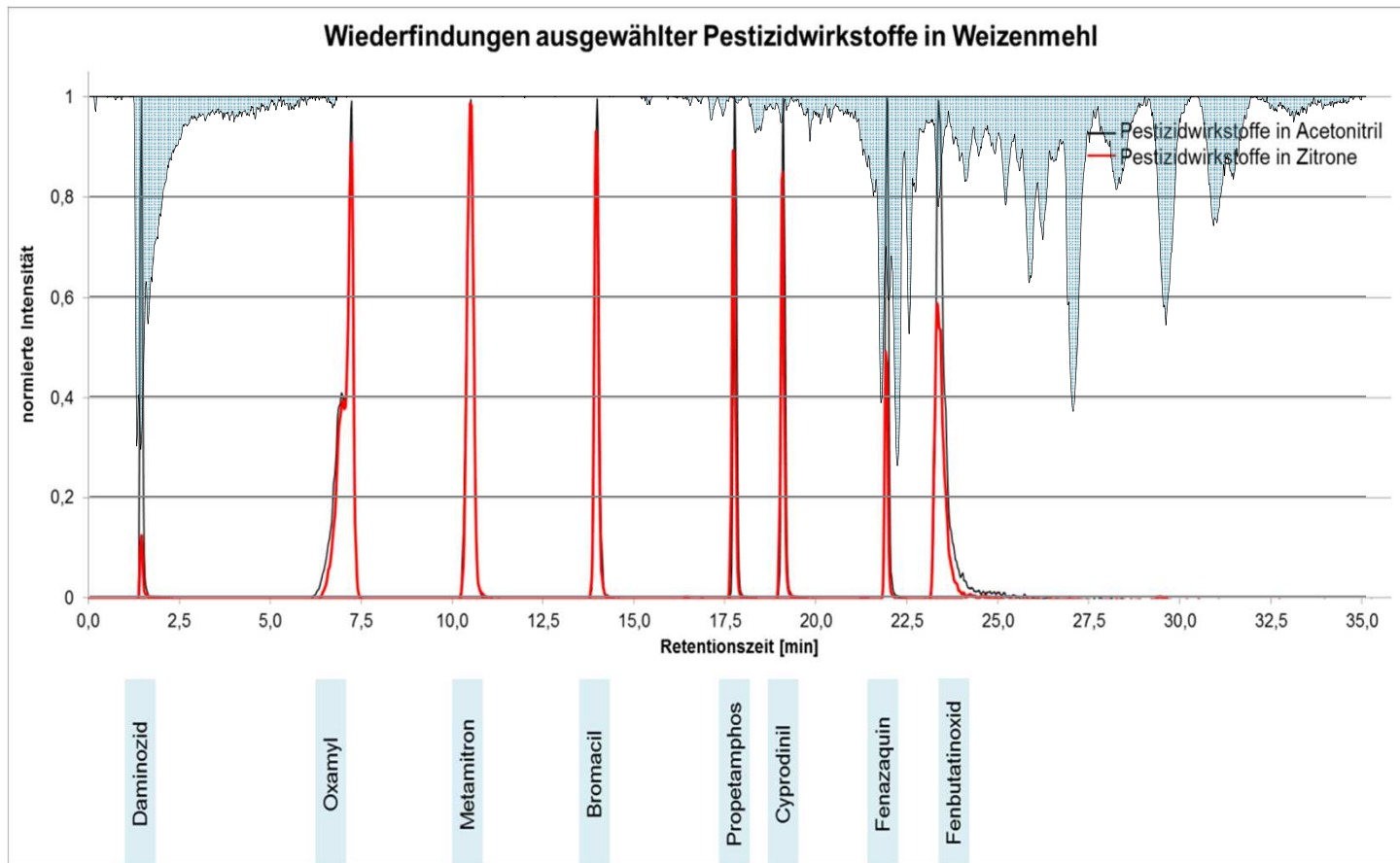
Elutionszone der
Pestizide bei
normaler Analyse

Vergleich mit Wiederfindungen



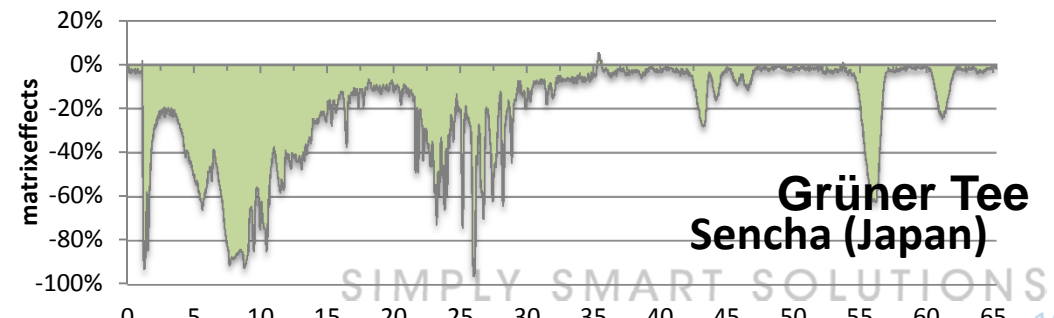
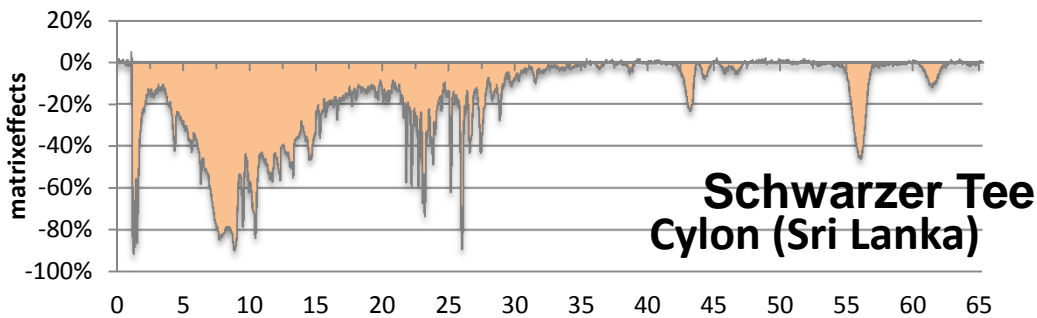
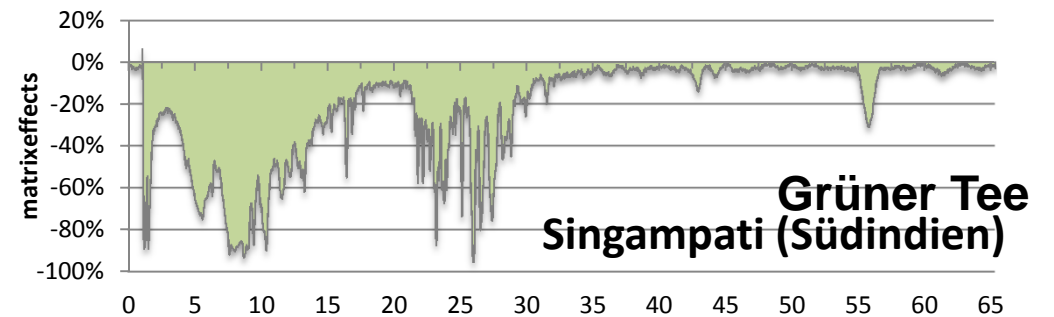
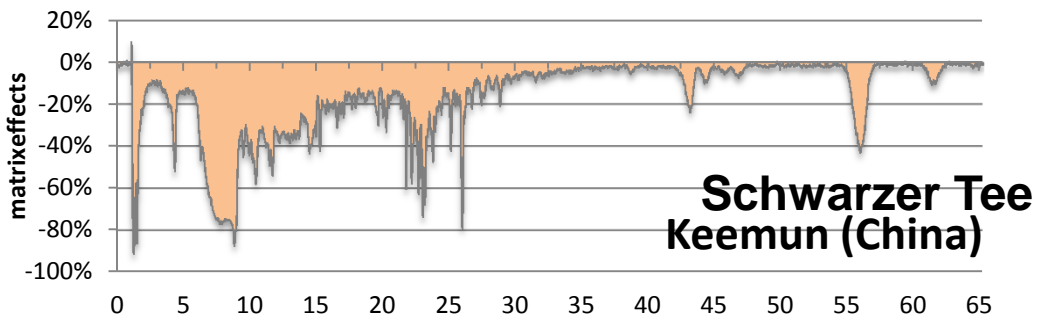
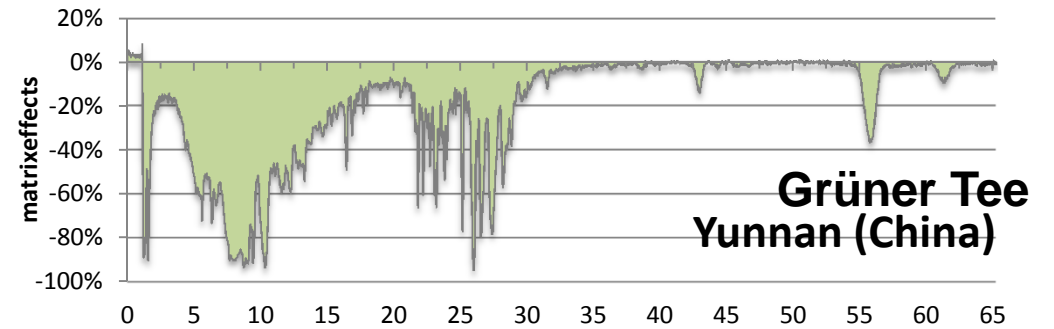
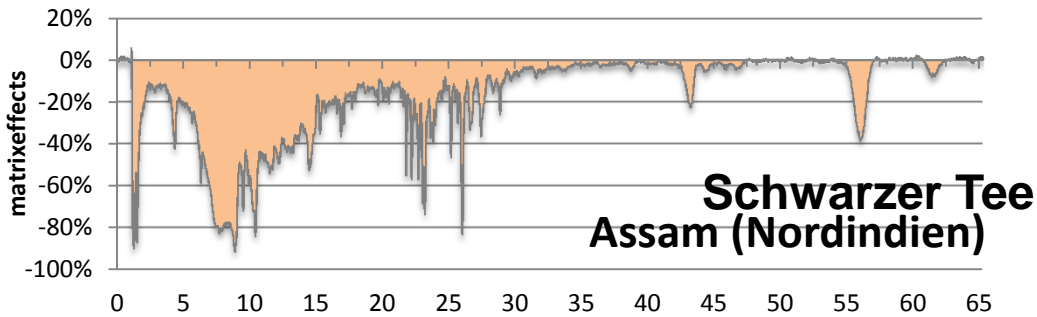
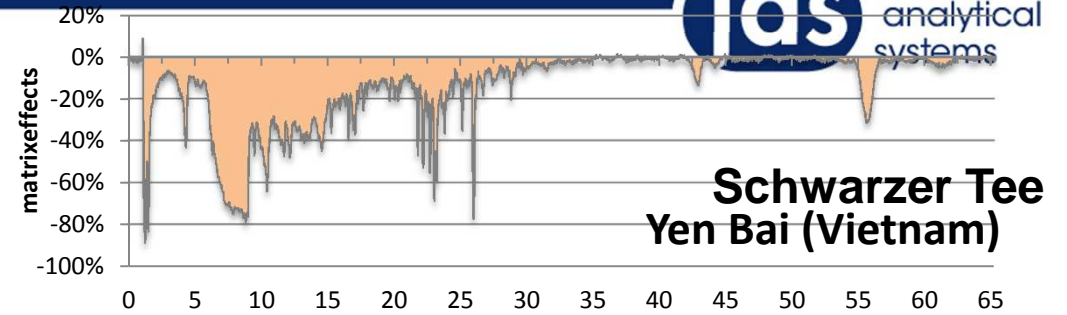
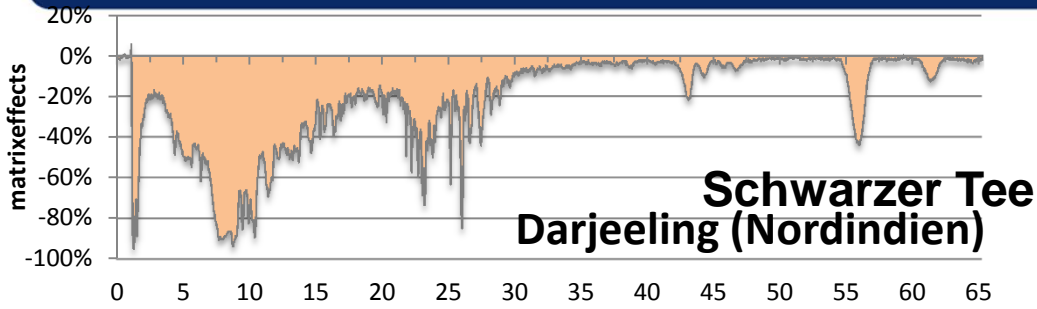
— Mix in Lösungsmittel
— dotierter Extrakt
Zitrone

Vergleich mit Wiederfindungen

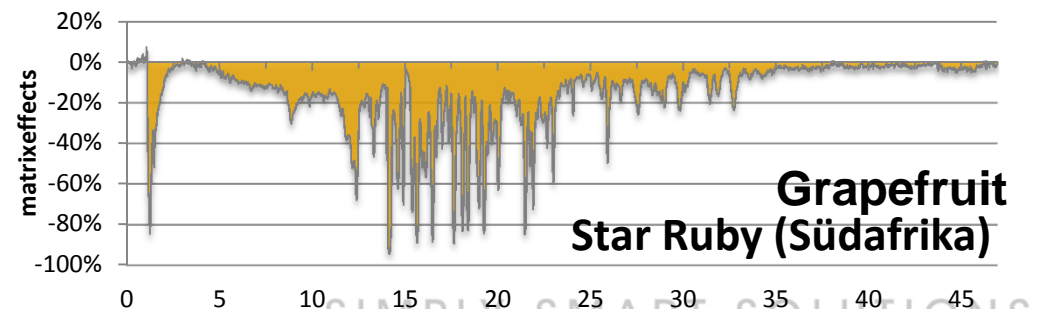
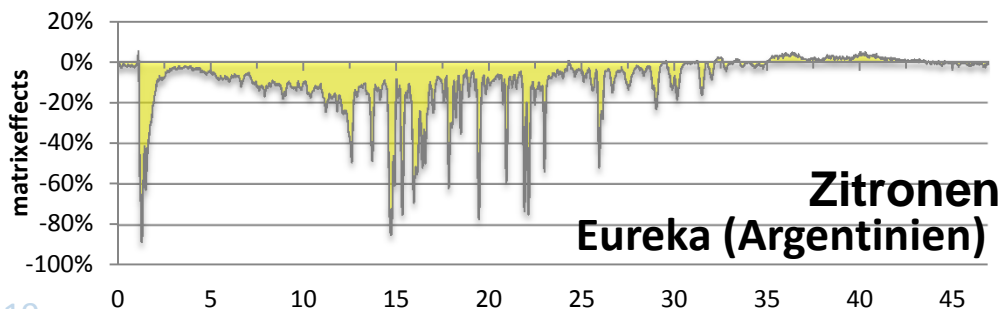
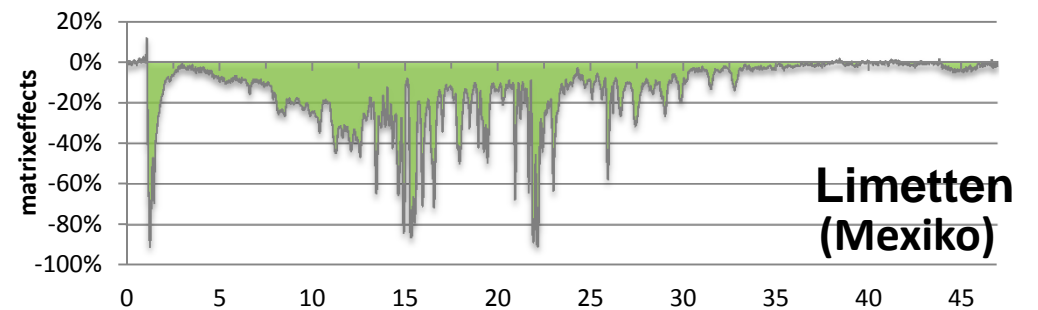
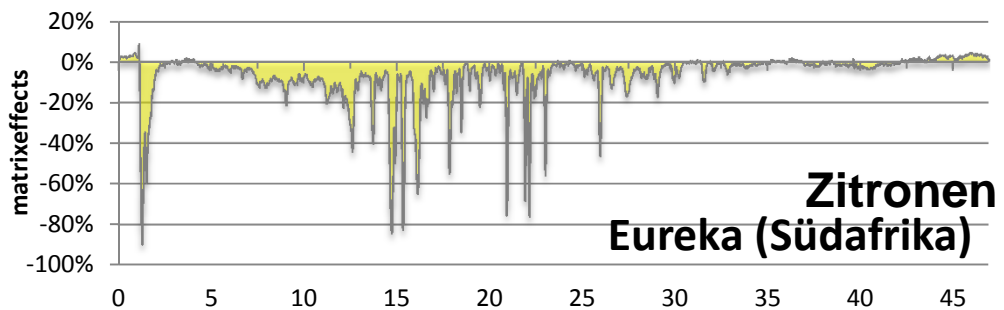
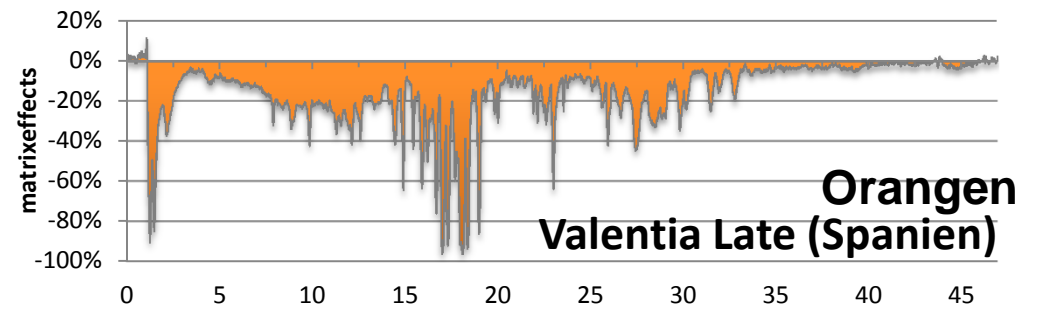
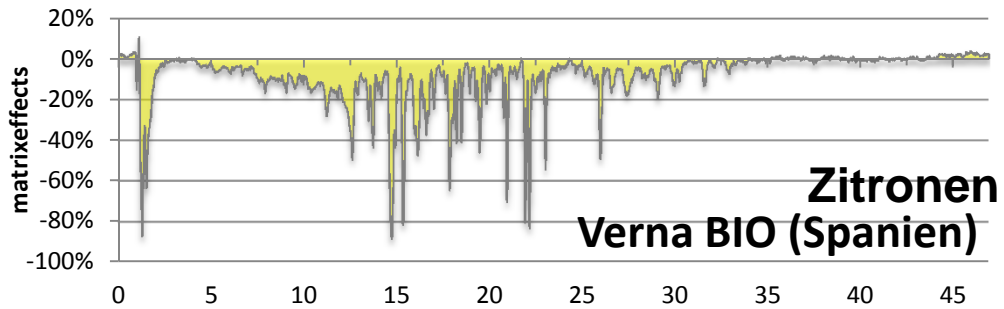
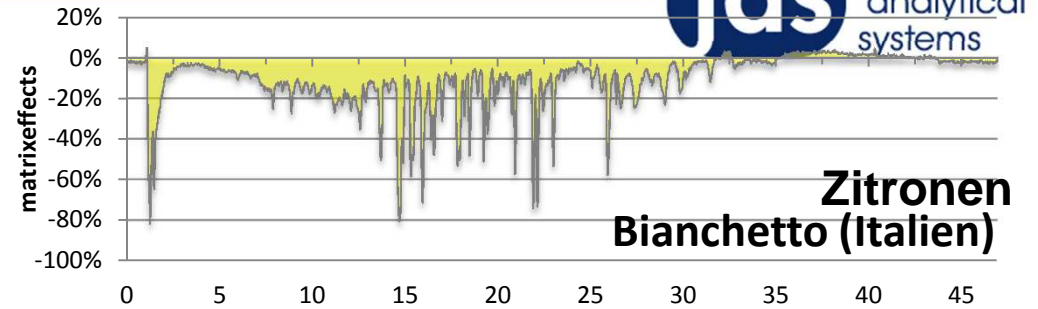
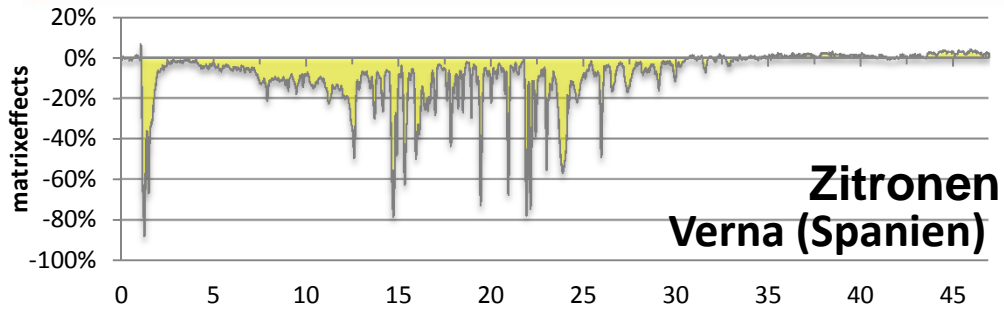


— Mix in Lösungsmittel
— dotierter Extrakt Weizenmehl

Gleiche Matrix Tee



Gleiche Matrix Zitrusfrüchte

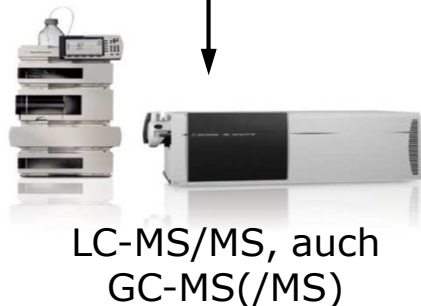
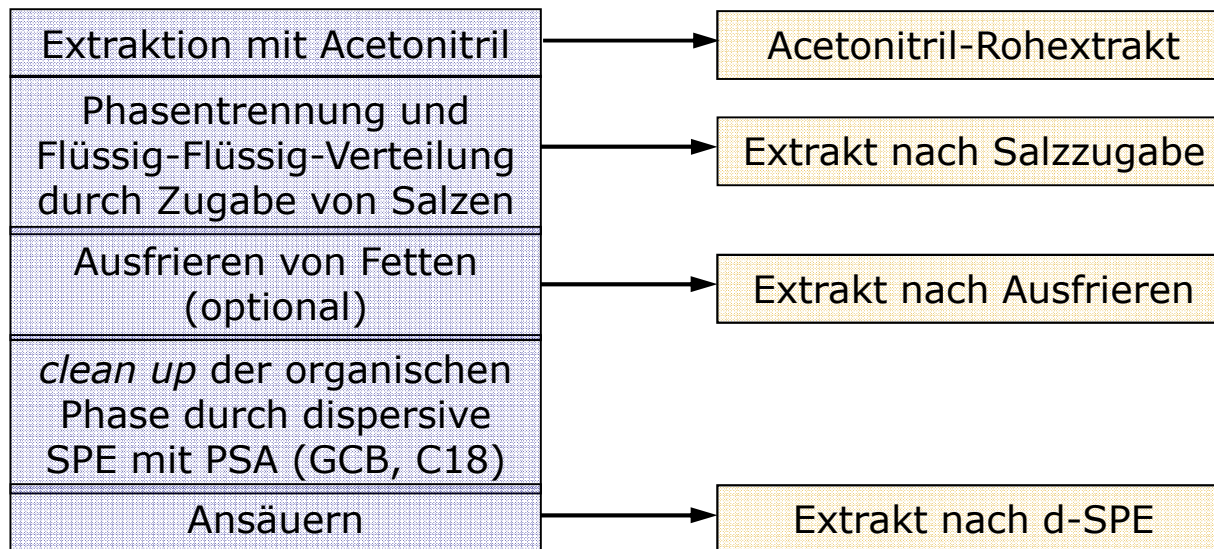


- Gleiche Matrices haben gleiche Matrixeffektprofile
 - Schwarze Tees
 - Zitronen
- jedoch bereits Unterschiede bei nah verwandten Arten
 - Schwarzer Tee ↔ Grüner Tee
 - Zitrone ↔ Orange ↔ Limette ↔ Grapefruit

→ kann zu Problemen bei Matrixkalibrierungen führen!

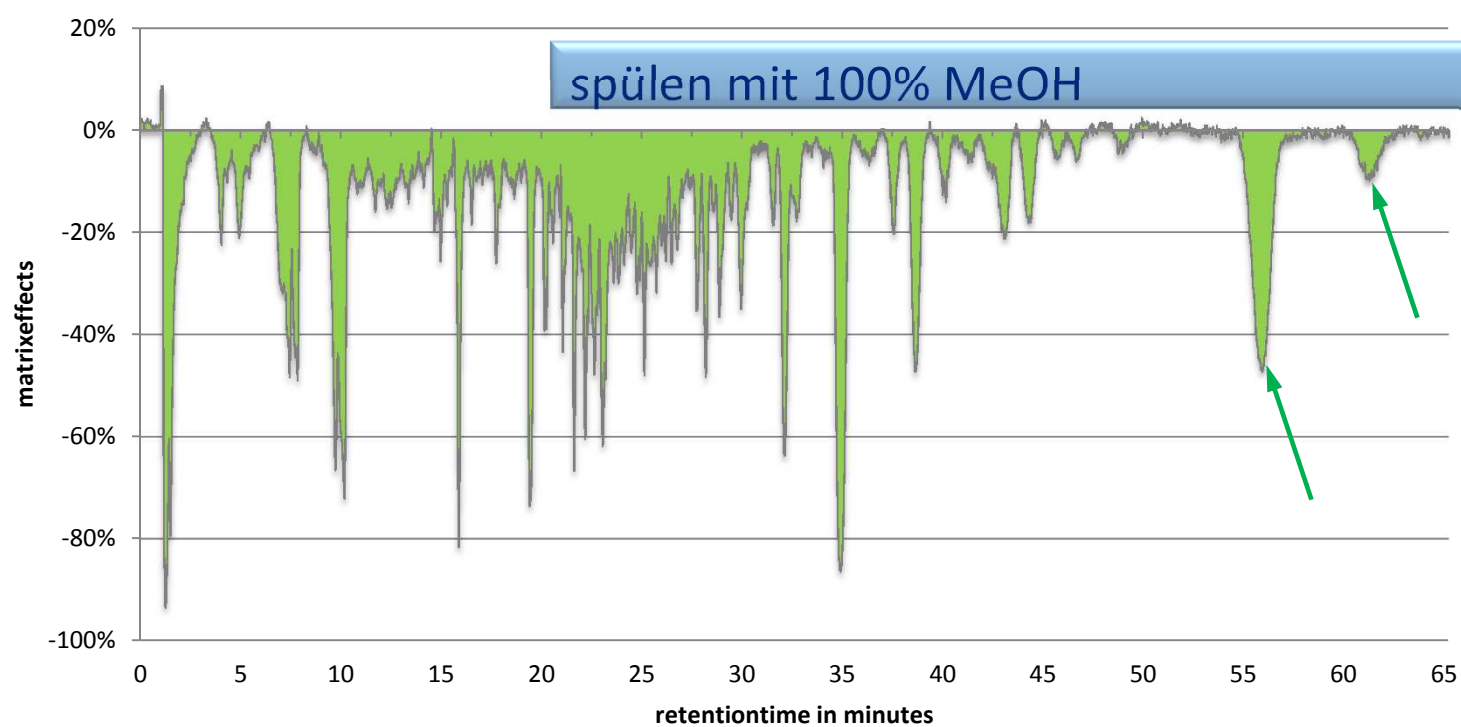
Postcolumn Infusion – QuEChERS clean-up Schritte

- Beurteilung der Effektivität der QuEChERS Probenvorbereitung
- Messung verschiedener QuEChERS-Extrakte der Standardmatrixes



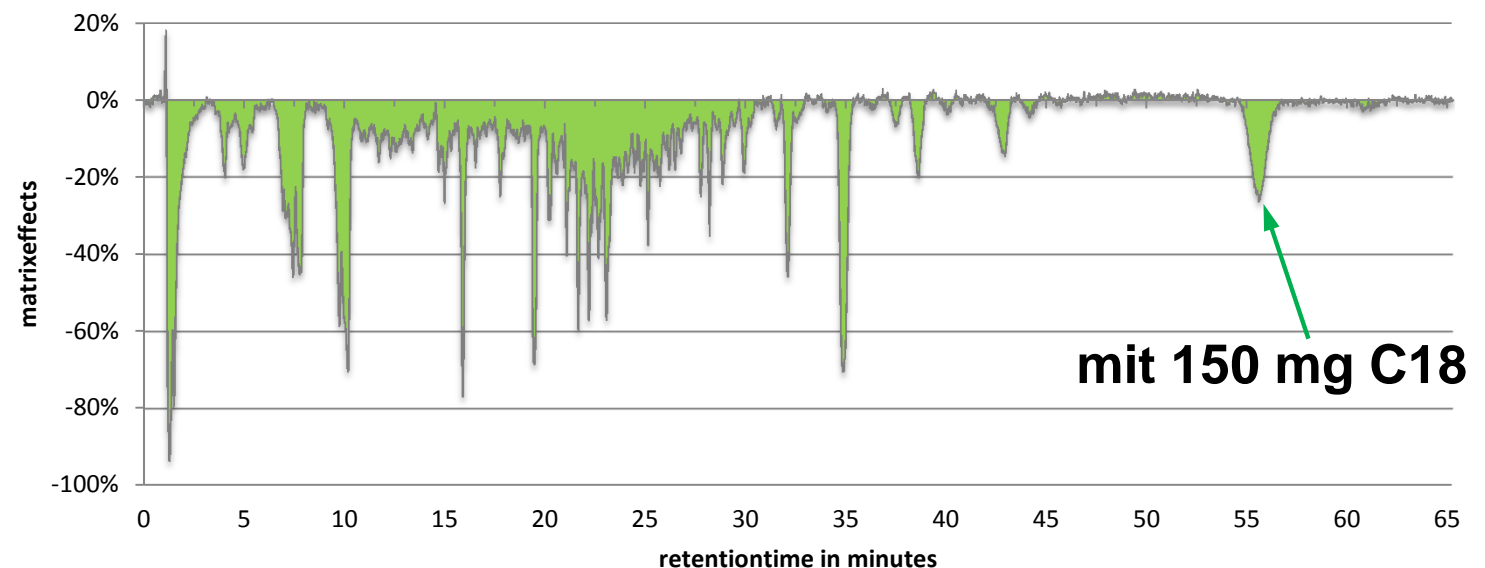
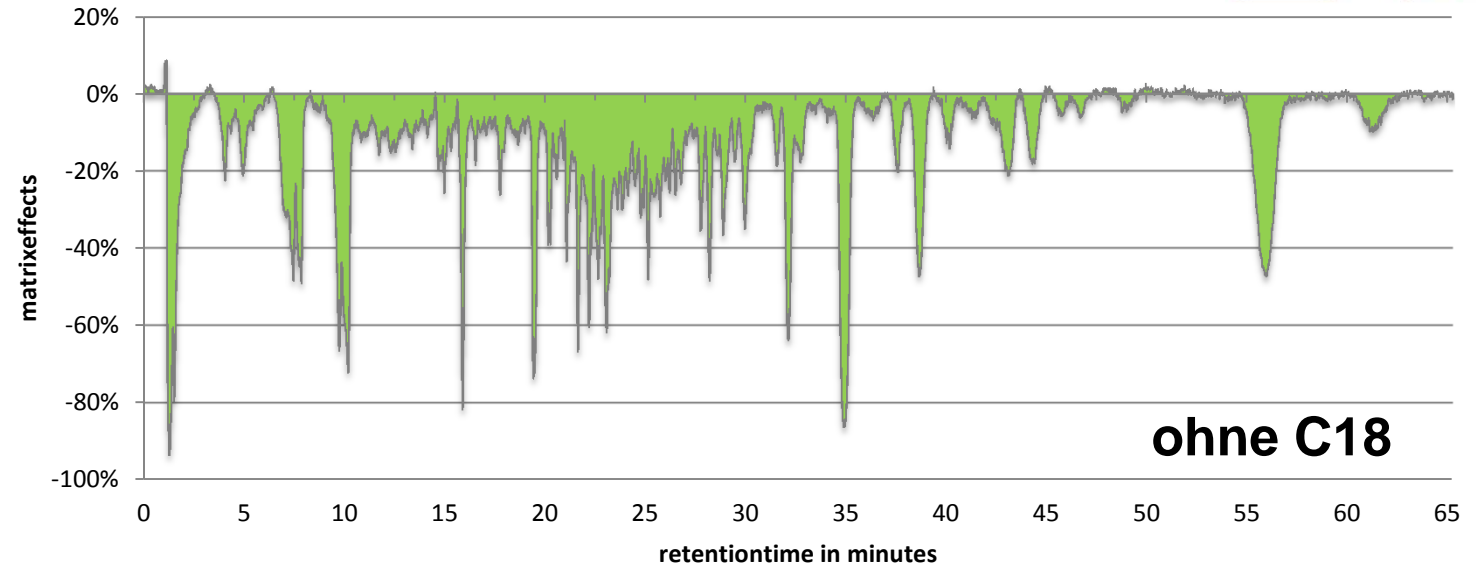
- wichtigste Schritte sind Verteilung und d-SPE
- für einige Matrices bestimmte Schritte unbedingt notwendig
 - z.B. Verteilung bei Mehl zur Entfernung der Stärke
- Probenvorbereitung entfernt nur kleinen Teil an störenden Stoffen
- „schwierige“ Matrices sind auch im gereinigten Extrakt noch reich an Matrixeffekten
- nicht alle Effekte der Probenvorbereitung lassen sich mit postcolumn infusion bewerten
 - z.B. Interferenzen, Entfernung fester Bestandteile/Fett

Rucola QuEChERS



- Elution von Substanzen nach über 30 Minuten spülen
- Verursachen noch starke Signalsuppressionen
- Gefahr von Verschleppungen

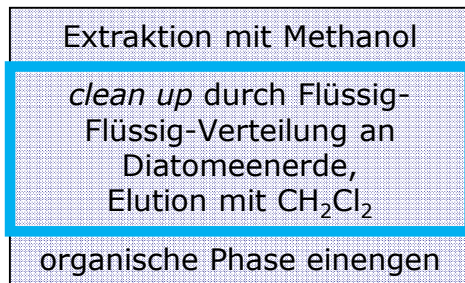
Rucola QuEChERS mit C18



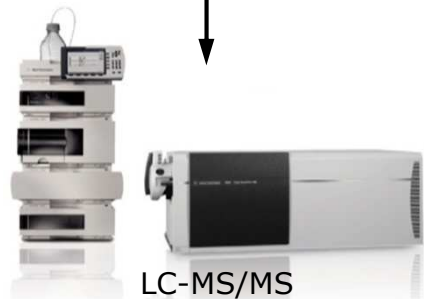
auch Zugabe von C18 bei d-SPE kann spät eluierende Substanzen nicht vollständig entfernen

- keine Methode entfernt Matrix vollständig
- starke Unterschiede in der Polarität der verbleibendem Matrix
- Ursache eventuell Extraktionsmittel

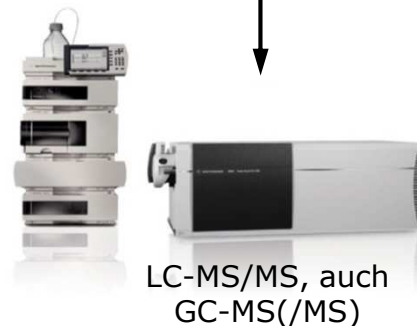
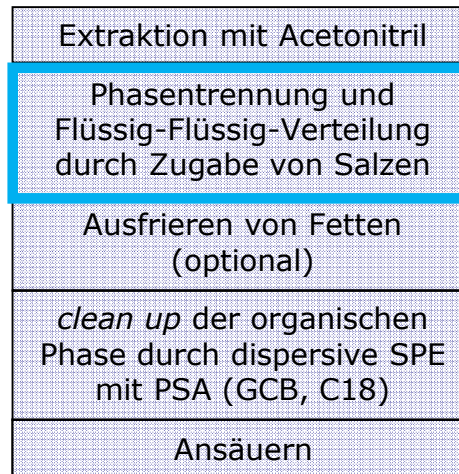
• ChemElut



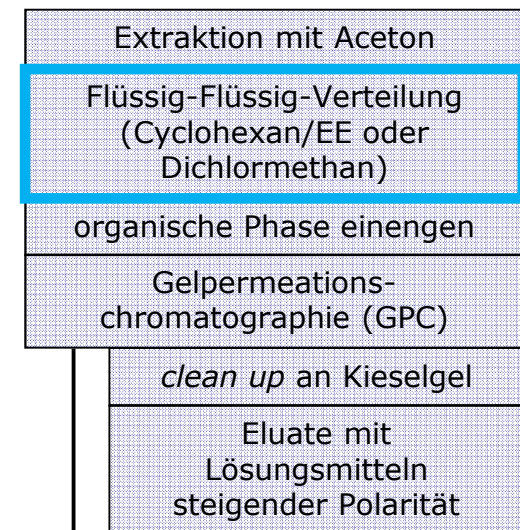
in Methanol aufnehmen



• QuEChERS



• DFG S 19

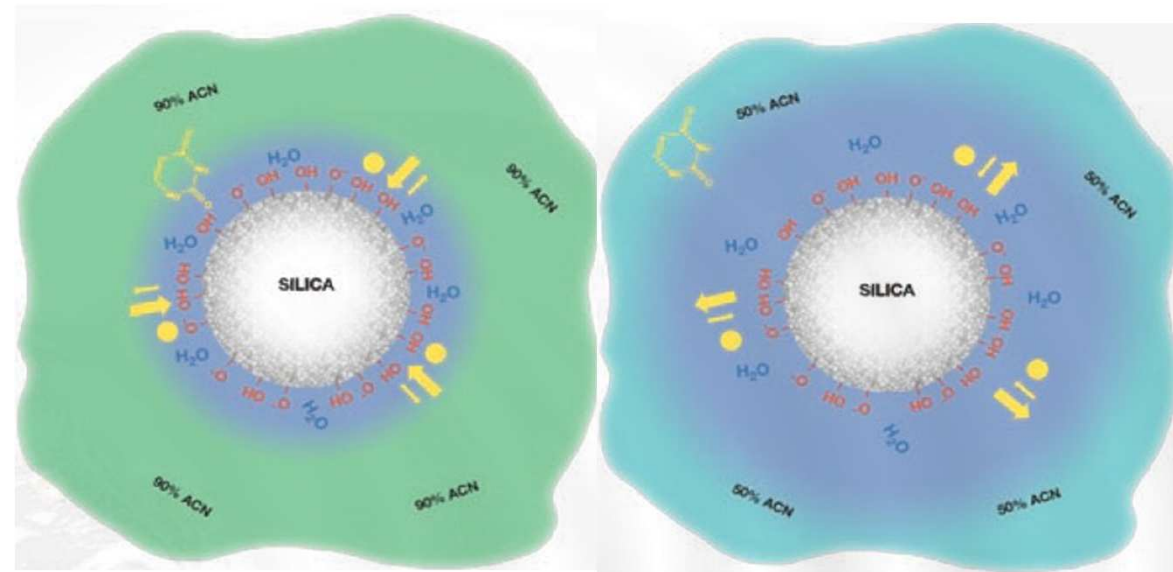


➔ Test der „hydrophilen Interaktionsflüssigchromatographie“ (HILIC) als Probenvorbereitungsschritt mittels LC-MS/MS

HILIC = hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie

- Aufgabe: Trennung von polaren Substanzen
- Prinzip: Flüssig-Flüssig-Verteilung
- stationäre Phase (Säule) = polar
mobile Phase (Eluent) = wässrig organisch

- I. Ausbildung Wasserfilm
- II. Verteilungsgleichgewicht
- III. „Verdrängung“ der am Wasserfilm gebundenen Analyten

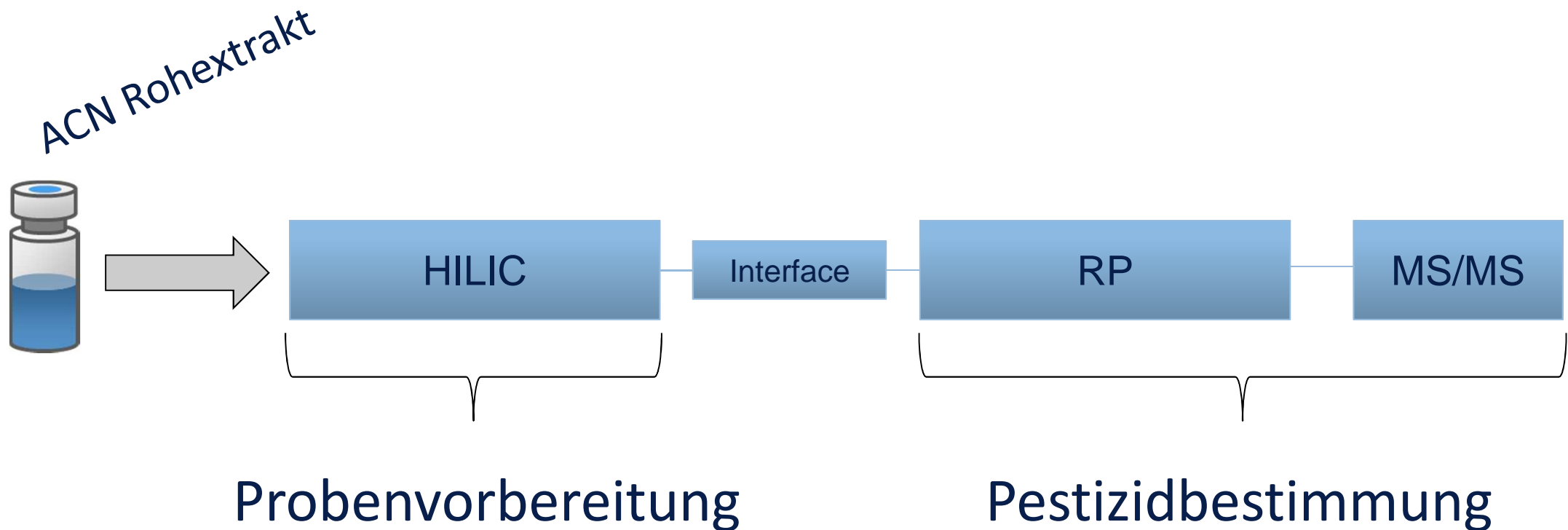


Quelle: YMC HILIC Säulen für polare Analyten, YMC EUROPE GMBH

ZIEL: unterschiedliche Elution von Pestiziden und Matrix

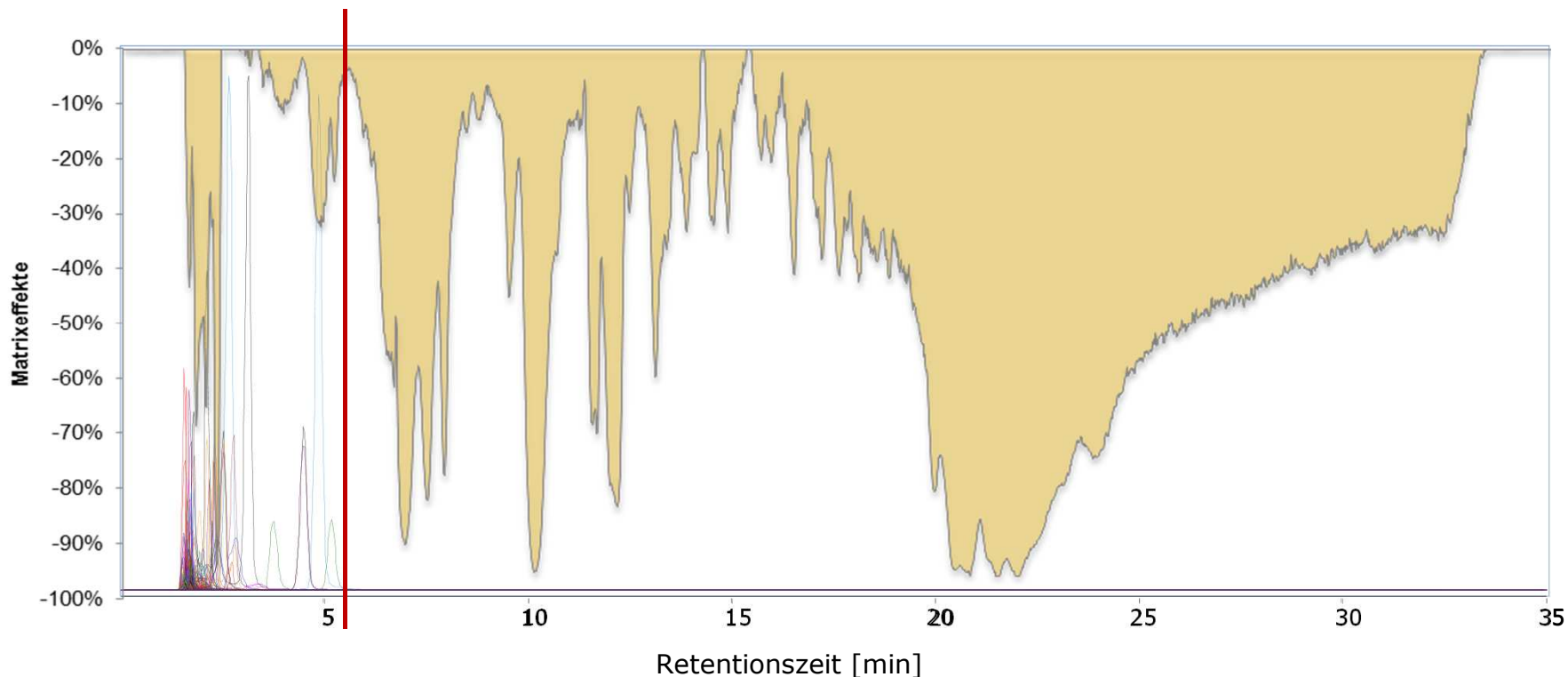
Automated Raw Extract Analyzer for Pesticides

AREA-P



Matrixabtrennung Mehl

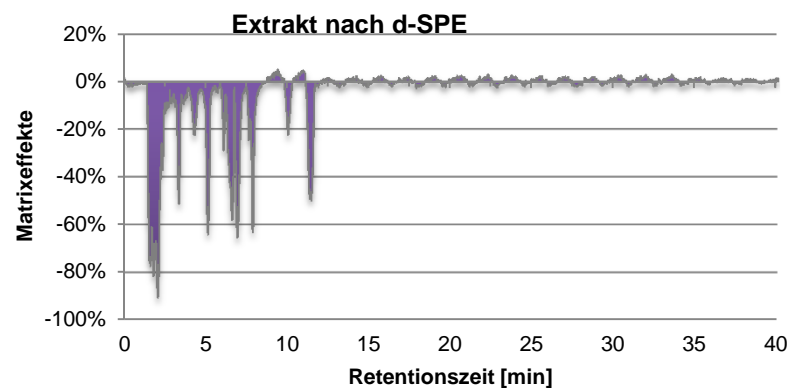
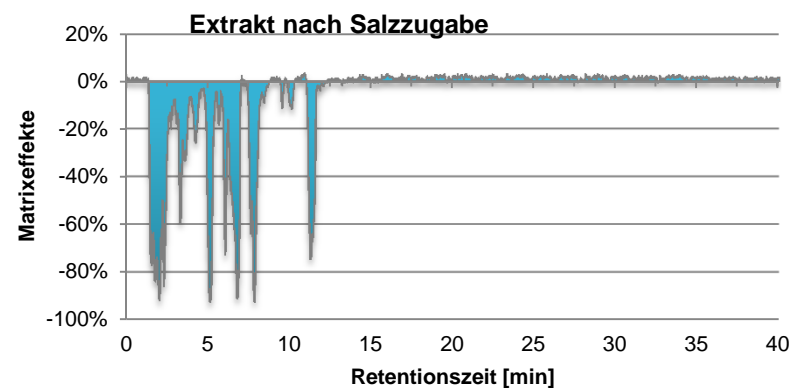
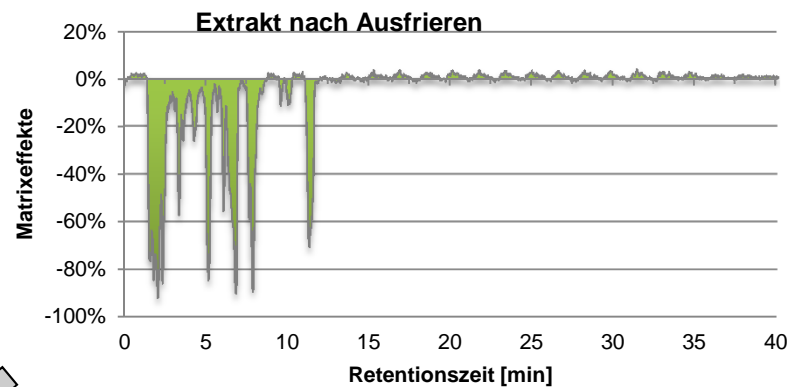
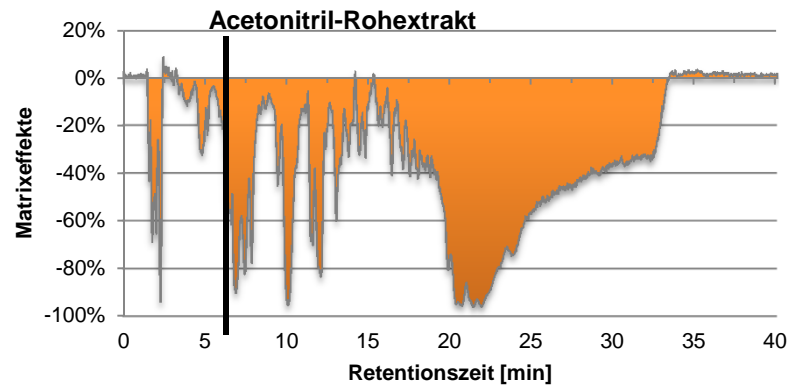
- Matrixeffektprofil von Mehl nur auf HILIC-Säule



- Chromatographie ermöglicht exakte Trennung von Analyten und Matrix

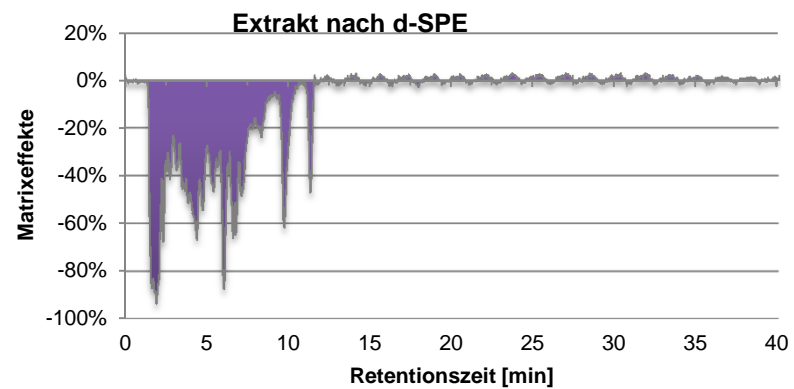
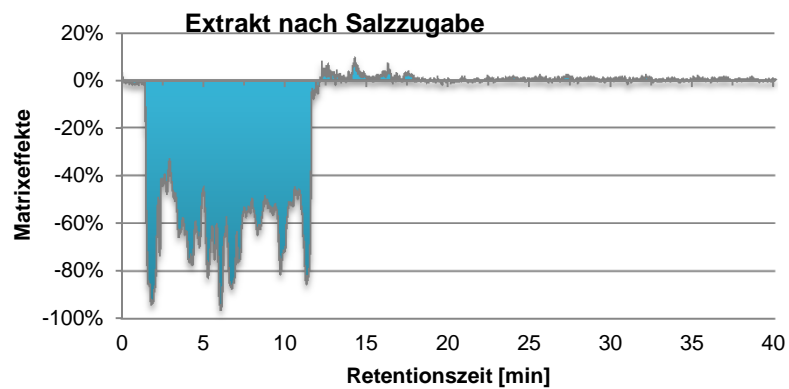
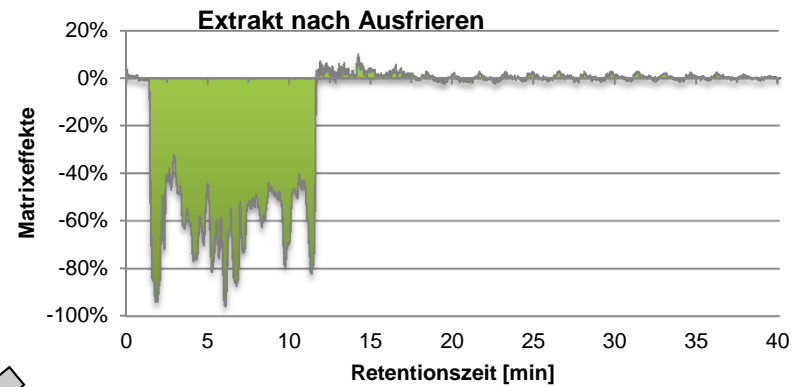
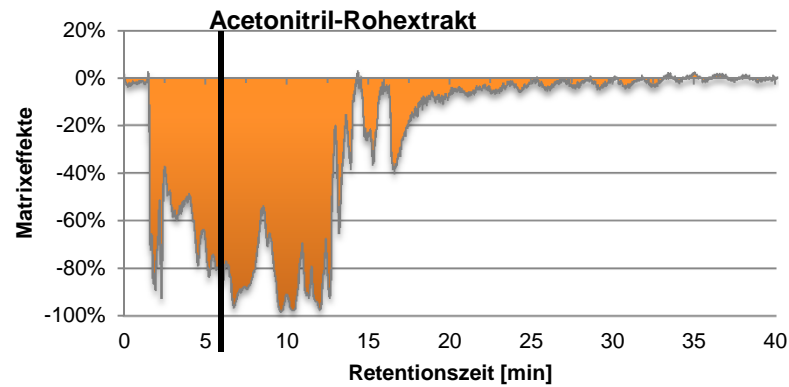
Matrixeffekt-Profile QuEChERS auf HILIC

Weizenmehl



Matrixeffekt-Profile QuEChERS auf HILIC

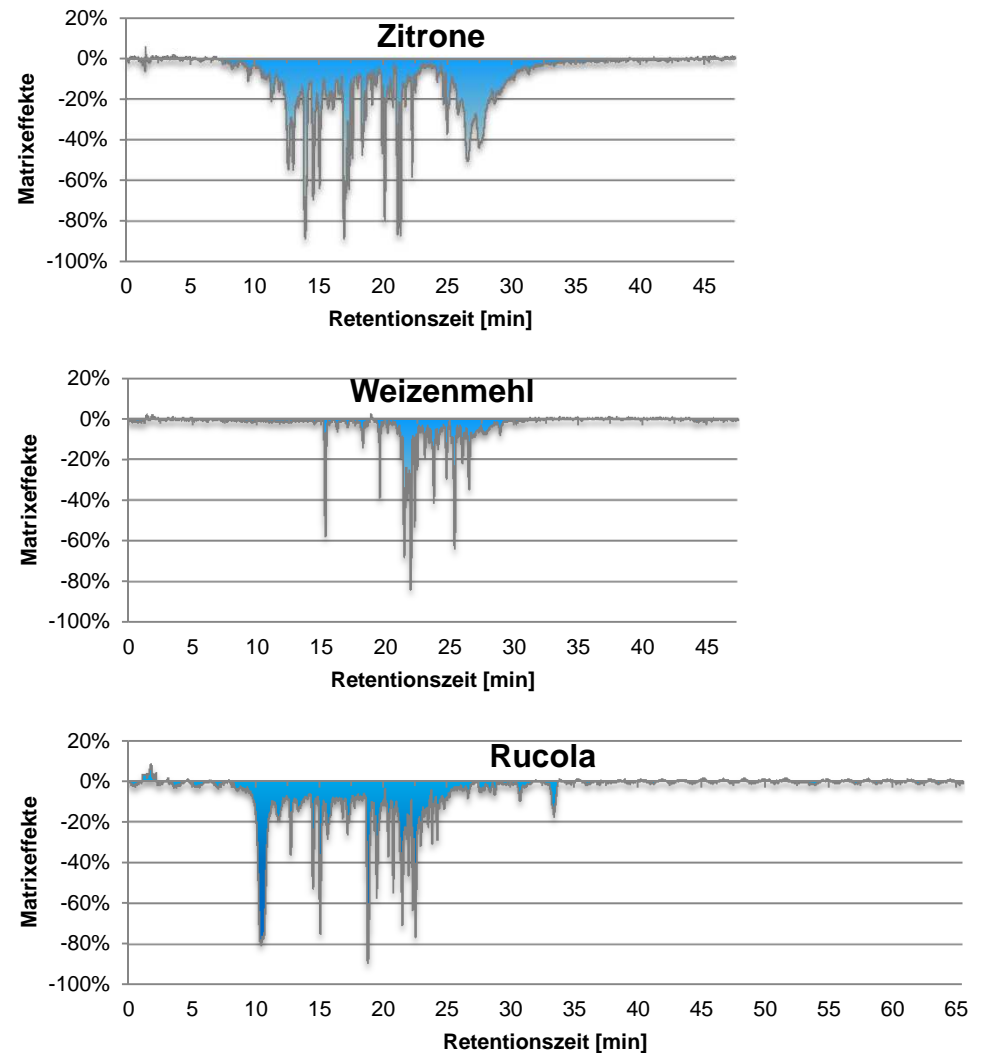
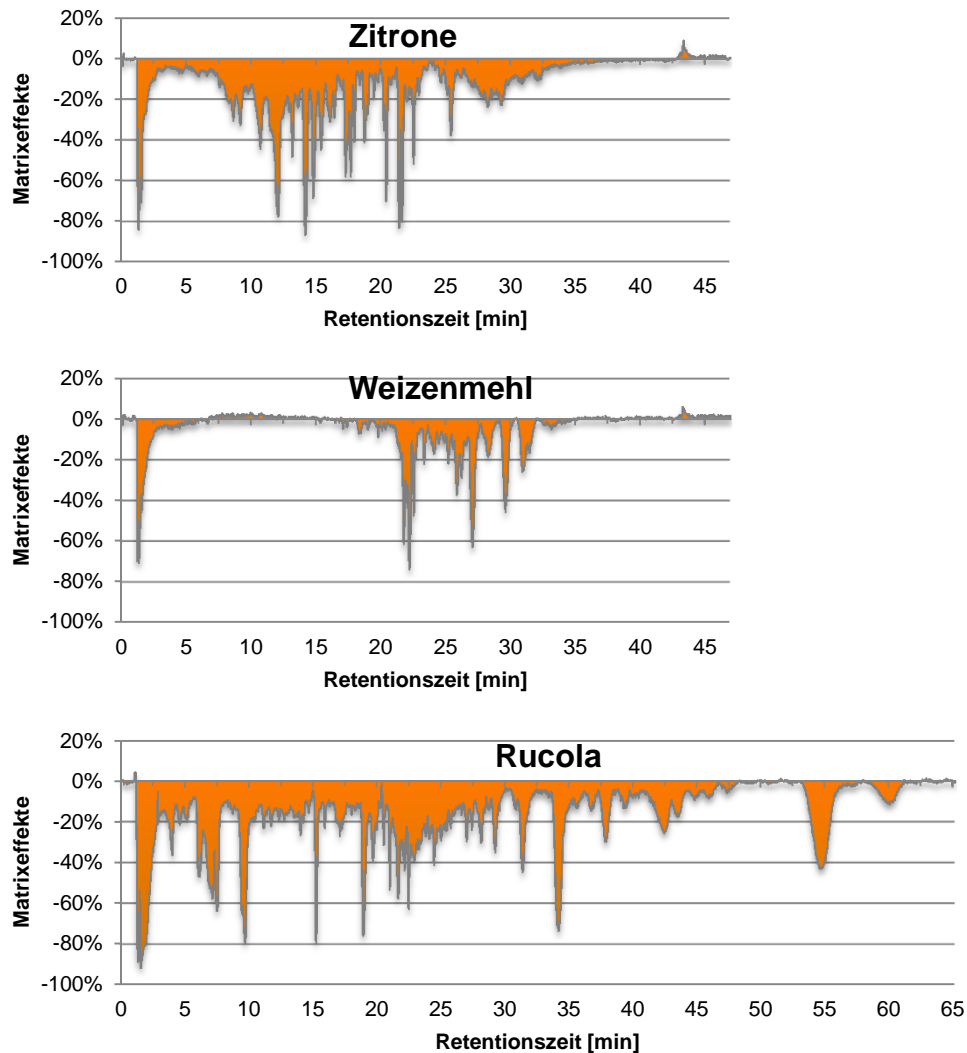
Zitrone



Vergleich AREA-P mit QuEChERS durch *postcolumn infusion*

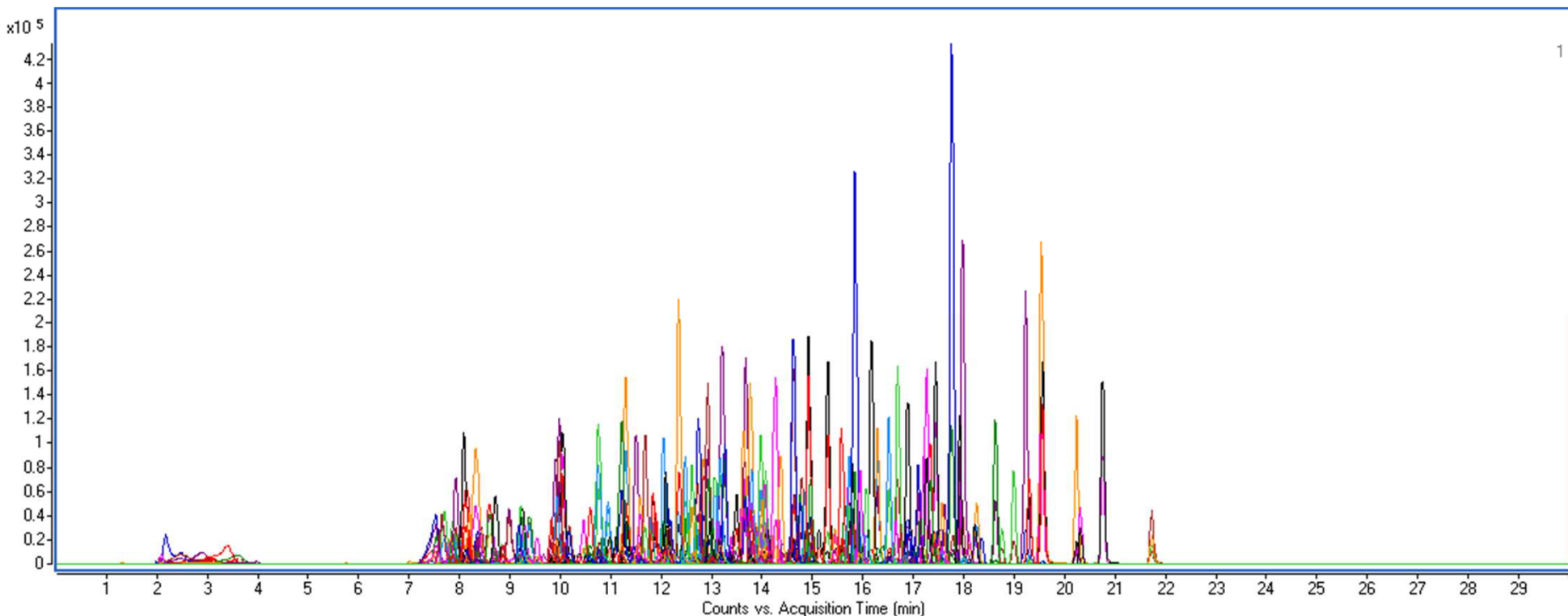
QuEChERS

AREA-P

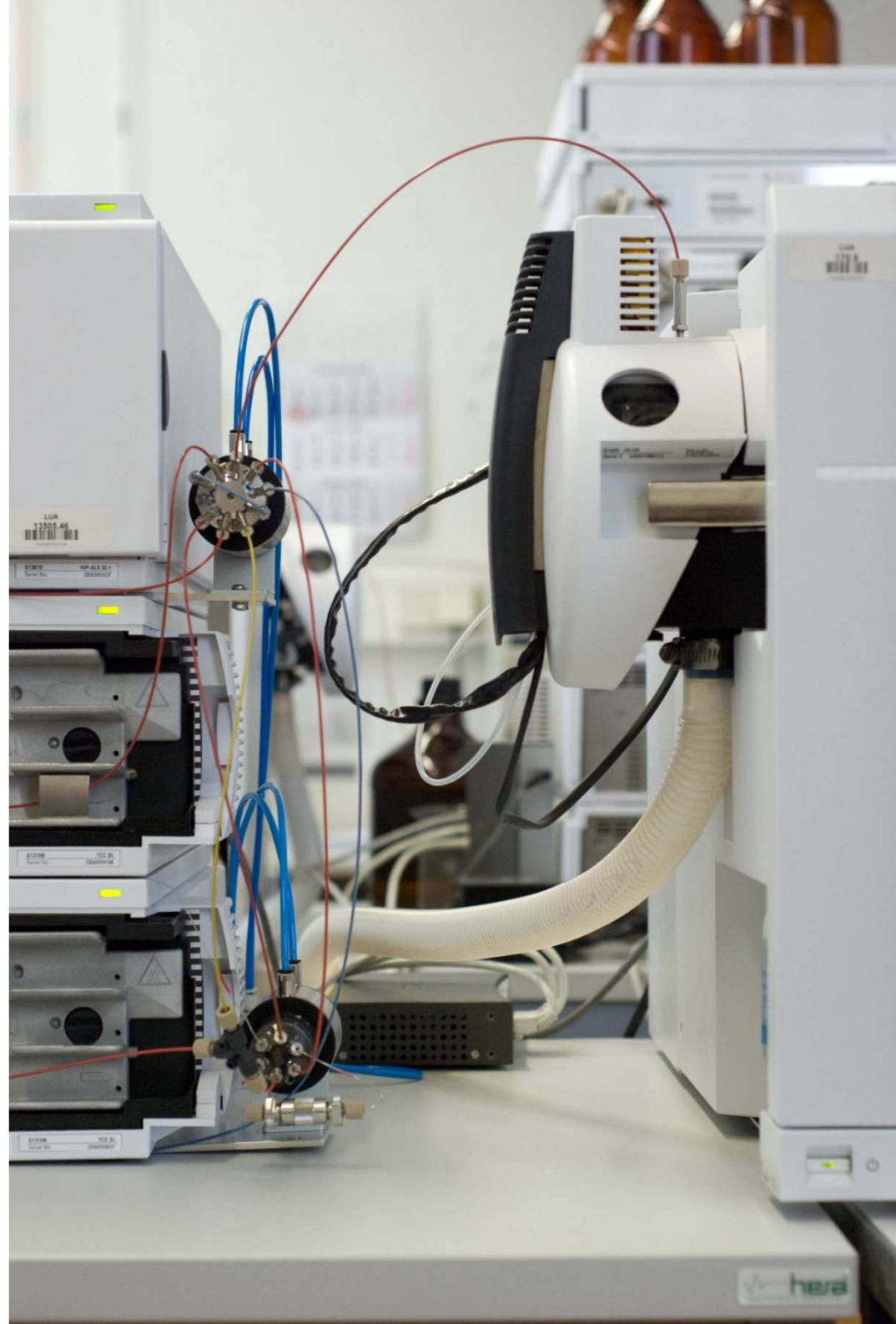


Pestizid-Multimethode

über 300 Substanzen



sehr gute Peakform auch bei hohen Injektionsvolumen
durch HILIC Trennung und Fokussierung im Interface



- sehr gute Beurteilung von Matrixeffekten mit postcolumn infusion möglich
 - „schwierige“ Matrices zeigen auch in gereinigten Extrakten starke Matrixeffekte
 - problematisch sind sehr spät eluierende Stoffe
- Kopplung von HILIC und RP bietet neue Möglichkeit zur Matrixabtrennung

- Verringerung der manuellen Probenvorbereitungsschritte im Vergleich zu anderen Verfahren
- Hoher Probendurchsatz
- Umweltfreundlich durch den geringen Einsatz von Chemikalien
- Vereinfachte Analytik, mit nur einer Injektion werden alle Pestizide erfasst
- Hohe Wiederfindungsraten selbst bei analytisch schwierigen Pestizidrückständen

Fragen ?

